

Food additives yang berbasis protein dan flavor bagi kebanyakan Industri pangan di Indonesia masih impor dan harganya relatif mahal. Padahal Indonesia sangat kaya akan sumber-sumber *food ingredient* yang jika dikelola secara tepat akan menghasilkan produk yang tidak kalah dengan kualitas *food ingredient* impor, bahkan beberapa komponen tersebut bersifat *multifunctional* dan memiliki karakter yang spesifik sebagai *indigenous flavor*. Kendala eksplorasi sumber-sumber alam lokal di Indonesia masih terbatas karena penguasaan teknologi produksi *food ingredient* tersebut masih relatif rendah, atau teknologi yang sudah ada belum menjamin bisa sesuai dengan karakteristik bahan, kondisi maupun kegunaan produknya. Oleh karena itu dengan penguasaan teknologi produksi flavor khas dan berbahan asli lokal Indonesia, maka akan menstimulir upaya-upaya eksplorasi sumber-sumber alam lokal Indonesia sebagai *food ingredient* sekaligus membuka peluang dibukanya industri-industri baru produksi *food ingredient*, peningkatan nilai ekonomi bahan-bahan inferior yang kurang dimanfaatkan, serta menambah alternatif dan ketersediaan produk-produk flavor yang lebih murah, aman, bersifat multiguna dan mengurangi impor *protein based-food additive*. Terlebih sifat bahan-bahan flavor di Indonesia sangat beraneka ragam dan spesifik untuk setiap sumber dan jenisnya.

Buku ini menguraikan tentang teknologi flavor enhancer dari sumber-sumber alam lokal di Indonesia berbasis teknik hidrolisis enzimatis menggunakan enzim protease dari tanaman biduri yang juga diproduksi dari sumber alam lokal di Indonesia. Konten dari buku ini terutama disusun dari hasil-hasil penelitian penulis yang dikembangkan berdasarkan hasil-hasil penelitian sebelumnya tentang eksplorasi potensi enzim protease dari tanaman biduri yang sudah ditulis dalam buku berjudul "Enzim Biduri: Agen Aktif Potensial untuk Proses Pangan". Buku ini juga telah dielaborasi dan diperkaya dengan referensi-referensi terkait sehingga informasi dari hasil-hasil penelitian yang telah diperoleh menjadi lebih kontekstual dan menarik untuk dibaca, dikembangkan dan diaplikasikan lebih lanjut.

ISBN: 978-602-1194-05-8



**PUSTAKA
RADJA**

Penerbit dan Percetakan
Jl. Tales II No. 1 Surabaya
Telp. 031-72001887, 081249995403

Yuli Witono

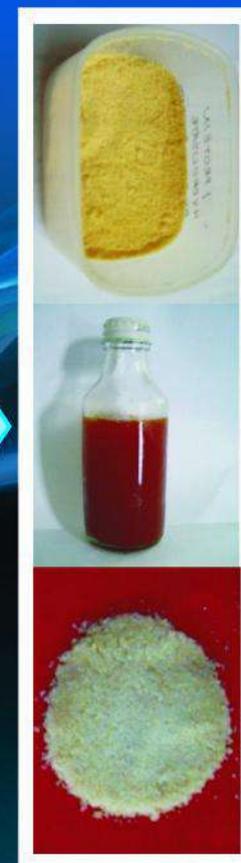
TEKNOLOGI Flavor Alami

**PUSTAKA
RADJA**

TEKNOLOGI Flavor Alami



Berbasis
Proses Hidrolisis
Enzimatis



Yuli Witono

**PUSTAKA
RADJA**

Teknologi Flavor Alami
Berbasis Proses Hidrolisis Enzimatis @2014

Pertama kali diterbitkan dalam bahasa Indonesia
Oleh Penerbit Buku Pustaka Radja, November 2014
Jl. Tales II No. 1 Surabaya.
Tlp. 031-72001887, 081249995403
(Lini Penerbit CV. Salsabila Putra Pratama)

ANGGOTA IKAPI
No. 137/JTI/2011

Oleh : Yuli Witono

Layout dan desain sampul: Salsabila Creative

Hak cipta dilindungi undang-undang dilarang mengutip
atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini
tanpa izin tertulis dari penerbit

ISBN : 978-602-1194-05-8
XV+137; 15 cm x 23 cm

*Buku ini kupersembahkan dengan tulus kepada
Bangsa dan Negaraku, Almamaterku dan keluargaku
Serta Para Paneliti yang interest mempelajarinya.
Bacalah isi buku ini, tetapi jangan lupa baca pula
Bagaimana perjuangan untuk mengisi buku ini*

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah S.W.T. yang telah melimpahkan karunianya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan buku dengan judul “Teknologi Flavor Alami”.

Keberhasilan penulisan buku ini juga tidak lepas dari kontribusi dan dukungan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Ditjen Dikti Kemendikbud R.I. yang telah mengalokasikan pendanaannya melalui program Hibah Kompetensi Tahun 2009-2011 dan Hibah Kompetitif Nasional Stranas Tahun 2013-2014.
2. Pimpinan Universitas Jember, FTP dan Jurusan THP serta segenap kawan-kawan dosen terutama yang pernah dan sedang bergabung dalam tim penelitian di Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian FTP UNEJ di antaranya Ir. Wiwik Siti Windrati, MP., Ir. Yhulia Praptiningsih, MS. Dan Dr. Ir. Iwan Taruna, M.Eng., dan para teknisi yang telah membantu menyediakan sarana dan fasilitas selama pelaksanaan penelitian.
3. Terima kasih juga disampaikan kepada orang-orang tua penulis yang selalu mendoakan dan mendorong penulis dalam bekerja dan belajar. Juga isteri tercinta dan anak-anak penulis yang selalu sabar, penuh pengertian dan selalu memberikan dukungan dalam menghadapi mengemban tugas-tugas institusi.
4. Para mahasiswa dan alumni yang pernah penulis bimbing dan telah saling membantu, serta semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu tetapi turut memberikan kontribusi yang berarti selama penulis studi, penelitian dan penyelesaian buku ini.

Semoga kerjasama dan segala bantuannya mendapatkan balasan yang setimpal dari Allah S.W.T. Penulis juga berharap semoga informasi yang diuraikan dalam buku ini dapat menambah khasanah pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi yang bermanfaat bagi masyarakat terutama para peneliti dan para praktisi industri

flavor serta industri pangan yang menggunakan proses enzimatis maupun industri lain yang terkait dan yang tertarik dengan aplikasi enzim protease.

Jember, 28 November 2014

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
PERSEMBAHAN.....	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR TABEL	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. TEKNOLOGI FLAVOR ENHANCER	5
Flavor	5
<i>Hidrolisat Protein</i>	9
<i>Garam Gurih</i>	10
<i>Ekstrak dan Seasoning</i>	11
<i>Saos</i>	12
<i>Kecap</i>	13
Bahan-Bahan Tambahan digunakan dalam Pembuatan Flavor	14
<i>CMC (Carboxymethyl Cellulose)</i>	14
<i>Maltodekstrin</i>	16
<i>Sistein</i>	19
<i>Asam Sitrat</i>	20
<i>Garam Dapur</i>	22
<i>Gula</i>	23
BAB 3. HIDROLISIS PROTEASE BIDURI PADA BAHAN BERPROTEIN	27
Hidrolisis Protease Biduri pada Substrat Kedelai	27
<i>Warna (Tingkat Kecerahan)</i>	29
<i>Kadar Protein Terlarut</i>	30
<i>Produk Maillard</i>	32
<i>Tingkat Ketengikan</i>	33
<i>Laju Reaksi Enzim Protease Biduri pada Substrat Kedelai</i>	35
<i>Sifat Organoleptik</i>	36
<i>Perlakuan Terbaik</i>	38
Hidrolisis Protease Biduri pada Substrat Koro Kratok	38

<i>Kadar Air</i>	40
<i>Kadar Protein Terlarut</i>	42
<i>Produk Maillard</i>	43
<i>Laju Reaksi Enzim Protease Biduri pada Substrat Koro Kratok</i>	44
Hidrolisis Protease Biduri pada Substrat Ayam Kampung	45
Hidrolisis Protease Biduri pada Substrat Ikan Inferior (Bernilai Ekonomi Rendah)	50
<i>Kadar Protein Terlarut</i>	51
<i>Nilai Produk Maillard</i>	54
<i>Warna</i>	56
<i>Tingkat Ketengikan</i>	58
BAB 4. MODIFIKASI PROSES HIDROLISIS PROTEASE BIDURI PADA FORMULASI FLAVOR	60
Modifikasi Proses Hidrolisis Enzimatis Protease Biduri pada Formulasi Flavor Enhancer dari Substrat Koro Kratok	60
<i>Warna</i>	60
<i>Protein Terlarut</i>	62
<i>Produk Maillard</i>	64
<i>Kadar Air</i>	66
<i>Tingkat Ketengikan</i>	67
<i>Sifat Sensoris</i>	69
<i>Laju Reaksi Enzim Biduri dan Papain pada Substrat Koro Kratok</i>	76
Modifikasi Hidrolisis Enzimatis pada Proses Formulasi Flavor Enhancer dari Substrat Koro Pedang	78
<i>Warna</i>	78
<i>Protein Terlarut</i>	80
<i>Produk Maillard</i>	82
<i>Kadar Air</i>	85
<i>Tingkat Ketengikan</i>	87
<i>Laju Reaksi Enzim Biduri, Papain dan Campuran Enzim Biduri dan Papain pada Substrat Koro Pedang</i>	89
<i>Sifat Sensoris</i>	91
<i>Perlakuan Terbaik</i>	94

<i>Kadar Asam Sianida</i>	95
<i>Kadar Anti Tripsin</i>	97
Pengembangan Teknik Formulasi pada Produk Savory Flavor	98
<i>Preparasi Sampel</i>	98
<i>Kadar Protein Terlarut Savory Flavor</i>	101
<i>Produk Maillard Savory Flavor</i>	102
<i>Kadar Air Savory Flavor</i>	103
<i>Aktivitas Air (A_w) Savory Flavor</i>	104
<i>Tingkat Ketengikan (Rancidity) Savory Flavor</i>	105
<i>Warna (Whiteness) Savory Flavor</i>	105
<i>Total Padatan Terlarut Savory Flavor</i>	106
<i>Daya Lekat Savory Flavor</i>	107
<i>Daya Simpan Savory Flavor</i>	111
<i>Sifat Sensoris</i>	114
Hasil Pengembangan Teknik Formulasi pada Uji Coba Pembuatan Garam Sedap Hasil Hidrolisis Ikan Kuwe	116
Produksi dan Karakterisasi Hidrolisat Protein dari Ikan Bibisan (<i>Apogon albimaculosos</i>) sebagai Indigenous Flavor Hasil Modifikasi Proses Hidrolisis Enzimatis Menggunakan Protease Biduri	119
<i>Komponen Proksimat</i>	119
<i>Tingkat Ketengikan</i>	120
<i>Produk Reaksi Maillard</i>	121
<i>Derajat Hidrolisis</i>	122
<i>Sifat Fisik dan Fungsional</i>	123
BAB 5. PENUTUP	125
DAFTAR PUSTAKA	126
RIWAYAT HIDUP PENULIS	136

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Reaksi Katalisa Protease dalam Menghidrolisis Ikatan Peptida Protein	8
Gambar 2.	Struktur Kimia CMC	15
Gambar 3.	Struktur Kimia Maltodekstrin	17
Gambar 4.	Struktur Kimia Sistein.....	19
Gambar 5.	Struktur Kimia Asam Sitrat.....	21
Gambar 6.	A. Rumus Bangun Sukrosa	24
	B. Struktur Kimia Sukrosa.....	24
Gambar 7.	Nilai Warna Hidrolisat Protein Kedelai pada berbagai Konsentrasi Protease Biduri dan Lama Hidrolisis.....	29
Gambar 8.	Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Protein Kedelai pada Berbagai Konsentrasi Protease Biduri dan Lama Hidrolisis	31
Gambar 9.	Nilai Produk Maillard Hidrolisat Protein Kedelai pada Berbagai Konsentrasi Protease Biduri dan Lama Hidrolisis....	32
Gambar 10.	Tingkat Ketengikan Hidrolisat Protein Kedelai pada Berbagai Konsentrasi Protease Biduri dan Lama Hidrolisis....	33
Gambar 11.	Hubungan Konsentrasi Substrat dan Kecepatan Awal Reaksi Menggunakan Metode Lineweaver-Burk.....	35
Gambar 12.	Diagram Alir Uji Hidrolisis Substrat Koro Kratok.....	39
Gambar 13.	Kadar Air Hidrolisat Protein Koro Kratok pada Berbagai Konsentrasi Enzim Biduri dan Lama Hidrolisis	41
Gambar 14.	Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Protein Koro Kratok pada berbagai Konsentrasi Enzim Biduri dan Lama Hidrolisis	42

Gambar 15.	Nilai Produk Maillard Hidrolisat Protein Koro Kratok pada berbagai Konsentrasi Enzim Biduri dan Lama Hidrolisis	43
Gambar 16.	Hubungan Konsentrasi Substrat dan Kecepatan Awal Reaksi dengan Menggunakan Metode Lineweaver-Burk	45
Gambar 17.	Tingkat Kecerahan Hidrolisat Ayam Kampung pada Berbagai Konsentrasi Protease Biduri dan Lama Hidrolisisnya	46
Gambar 18.	Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Ayam Kampung pada Berbagai Konsentrasi Protease Biduri dan Lama Hidrolisisnya	48
Gambar 19.	Produk Maillard dari Hidrolisat Ayam Kampung pada Berbagai Konsentrasi Protease Biduri dan Lama Hidrolisis....	49
Gambar 20.	Nilai produk maillard HPI dari ikan bernilai ekonomi rendah pada berbagai konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisis. Nilai dinyatakan dalam rata-rata \pm standard deviasi	55
Gambar 21.	Tingkat ketengikan HPI dari ikan bernilai ekonomi rendah pada berbagai konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisis. Nilai dinyatakan dalam rata-rata \pm standard deviasi	59
Gambar 22.	Tingkat Kecerahan Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis	61
Gambar 23.	Tingkat Kecerahan Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis dan Pengaruh Penambahan Gelatin.....	61
Gambar 24.	Kadar Protein Terlarut Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis	62

Gambar 25.	Kadar Protein Terlarut Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis dan Pengaruh Penambahan Gelatin.....	64
Gambar 26.	Produk Maillard Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis	64
Gambar 27.	Produk Maillard Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis dan Pengaruh Penambahan Gelatin.....	65
Gambar 28.	Kadar Air Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis..	66
Gambar 29.	Kadar Air Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis dan Pengaruh Penambahan Gelatin	67
Gambar 30.	Tingkat Ketengikan Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis	67
Gambar 31.	Tingkat Ketengikan Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis dan Pengaruh Penambahan Gelatin.....	68
Gambar 32.	Nilai Kesukaan Warna Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis	70
Gambar 33.	Nilai Kesukaan Aroma Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis	71
Gambar 34.	Nilai Kesukaan Aroma Flavor enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis dan Pengaruh Penambahan Gelatin.....	71
Gambar 35.	Nilai Kesukaan Rasa dari Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis	72

Gambar 36.	Nilai Kesukaan Rasa Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis dan Pengaruh Penambahan Gelatin.....	73
Gambar 37.	Intensitas Rasa Pahit dari Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis	73
Gambar 38.	Intensitas Rasa Pahit Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis dan Pengaruh Penambahan Gelatin.....	74
Gambar 39.	Nilai Kesukaan Keseluruhandari Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis	75
Gambar 40.	Nilai Kesukaan Keseluruhan Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis	76
Gambar 41.	Hubungan Konsentrasi Substrat dan Kecepatan Awal Reaksi dengan Menggunakan Metode Lineweavr-Burk	76
Gambar 42.	Hubungan Konsentrasi Substat dan Kecepatan Awal Reaksi Campuran Enzim Biduri dan Papain Menggunakan Metode Lineweaver-Burk.....	77
Gambar 43.	Tingkat Kecerahan Flavor Enhancer Koro Pedang pada Berbagai Perbandingan Enzim Biduri dan Papain serta Konsentrasi dan Lama Hidrolisis	79
Gambar 44.	Kadar Protein Terlarut Flavor Enhancer Koro Pedang Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis	81
Gambar 45.	Nilai Produk Mailard Flavor enhancer Koro Pedang pada Berbagai Perbandingan Enzim Biduri dan Papain serta Konsentrasi dan Lama Hidrolisis	84

Gambar 46.	Kadar Air Flavor Enhancer Protein Koro Pedang pada Berbagai Perbandingan Enzim Biduri dan Papain serta Konsentrasi dan Lama Hidrolisis.....	86
Gambar 47.	Tingkat Ketengikan Flavor Enhancer Protein Koro Pedang pada Berbagai Perbandingan Enzim Biduri dan Papain serta Konsentrasi dan Lama Hidrolisis	88
Gambar 48.	Hubungan Konsentrasi Substat dan Kecepatan Awal Reaksi dengan Menggunakan Metode Lineweaver-Burk dari Enzim Biduri.....	89
Gambar 49.	Hubungan Konsentrasi Substat dan Kecepatan Awal Reaksi dengan Menggunakan Metode Lineweaver-Burk dari Enzim Papain	90
Gambar 50.	Hubungan Konsentrasi Substat dan Kecepatan Awal Reaksi dengan Menggunakan Metode Lineweaver-Burk dari Campuran Enzim Biduri dan Papain	91
Gambar 51.	Nilai Kesukaan Warna Flavor Enhancer dari Koro Pedang pada Berbagai Perbandingan Enzim Biduri dan Papain serta Konsentrasi dan Lama Hidrolisis	92
Gambar 52.	Nilai Kesukaan Rasa Flavor Enhancer dari Koro Pedang pada Berbagai Perbandingan Enzim Biduri dan Papain serta Konsentrasi dan Lama Hidrolisis	93
Gambar 53.	Nilai Kesukaan Aroma Flavor Enhancer dari Koro Pedang pada Berbagai Perbandingan Enzim Biduri dan Papain serta Konsentrasi dan Lama Hidrolisis	94
Gambar 54.	Kadar Asam Sianida Koro Pedang dan Flavor Enhancer Protein Koro Pedang	96
Gambar 55.	Kadar Anti Tripsin Koro Pedang dan Flavor Enhancer Koro Pedang	97

Gambar 56.	Flavor Enhancer dari Flavor enhancer Protein Koro Kratok.....	99
Gambar 57.	Savory Flavor tanpa Penambahan Flavor Enhancer Koro Kratok (A) dan dengan Penambahan Flavor Enhancer Koro Kratok (B)	100
Gambar 58.	Kadar Protein Terlarut Savory Flavor .	101
Gambar 59.	Produk Maillard Savory Flavor	103
Gambar 60.	Kadar Air Savory Flavor	103
Gambar 61.	Aktivitas Air (A_w) Savory Flavor	104
Gambar 62.	Warna Savory Flavor	106
Gambar 63.	Total Padatan Terlarut Savory Flavor .	107
Gambar 64.	Daya Lekat Savory Flavor pada Snack	108
Gambar 65.	Daya Simpan Savory Flavor	114
Gambar 66.	Total Skor Uji Sensori Savory Flavor..	115
Gambar 67.	Rendemen Garam Sedap pada berbagai Rasio Flavor enhancer Ikan dan Garam	117
Gambar 68.	Kadar Protein Terlarut Garam Sedap pada berbagai Rasio Flavor Enhancer Ikan dan Garam	118
Gambar 69.	Produk Maillard Garam Sedap dengan Rasio Flavor Enhancer Ikan Kuwe dan Garam	119
Gambar 70.	Tingkat Ketengikan Hidrolisat Ikan Bibisan.....	121
Gambar 71.	Tingkat Ketengikan Hidrolisat Ikan Bibisan.....	121

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Syarat Mutu Garam Gurih Berdasarkan Standar Nasional Indonesia No. 1 -3556.1-1999	11
Tabel 2.	Standar Mutu Garam Konsumsi Beriodium	23
Tabel 3.	Susunan Kimia Gula Pasir.....	25
Tabel 4.	Rata-rata Nilai Kesukaan Warna, Aroma dan Rasa Hidrolisat Protein Kedelai...	36
Tabel 5.	Kadar protein terlarut pada HPI dari ikan bernilai ekonomi rendah dengan konsentrasi enzim protease biduri dan waktu hidrolisis yang berbeda.....	52
Tabel 6.	Nilai °Hue HPI dari ikan bernilai ekonomi rendah dengan konsentrasi enzim protease biduri dan waktu hidrolisis yang berbeda.....	57
Tabel 7.	Nilai Efektivitas Empat Perlakuan Tertinggi	95
Tabel 8.	Data Pengamatan Efisiensi Daya Lekat Savory Flavor dengan dan tanpa Penambahan Flavor Enhancer Koro Kratok	110
Tabel 9.	Berat Savory Flavor tanpa (A) dan dengan Penambahan Flavor Enhancer Koro Kratok (B)	112
Tabel 10.	Data Perhitungan Daya Simpan Savory Flavor	113
Tabel 11.	Rendemen Garam Sedap Alami dengan berbagai Rasio Flavor Enhancer Ikan Kuwe dan Garam.....	117
Tabel 12.	Komposisi Kimia Hidrolisat Protein Ikan Bibisan.....	120

Tabel 13.	Derajat Hidrolisis dari Hidrolisat Protein Ikan Bibisan.....	123
Tabel 14.	Sifat Fisik Hidrolisat Protein Ikan Bibisan.....	123
Tabel 15.	Sifat Fungsional Hidrolisat Ikan Bibisan.....	124

BAB 1 PENDAHULUAN

Perkembangan industri pangan yang sangat cepat dewasa ini menuntut perusahaan makanan untuk melakukan suatu inovasi produk secara cepat dan tepat. Apalagi, dengan berkembangannya ilmu gizi dan kedokteran yang banyak menginformasikan bahaya bahan-bahan sintetik bagi kesehatan, menuntut perusahaan pangan agar menggunakan bahan-bahan alami yang diyakini berkualitas lebih baik dan tidak berbahaya bagi tubuh. Tidak terkecuali bahan penimbul cita rasa dan aroma (*flavor*). Dengan alasan tersebut, usaha-usaha mengeksplorasi senyawa pembentuk flavor dari bahan-bahan alami untuk tujuan-tujuan komersial perlu terus dilakukan.

Selama ini bahan penimbul flavor yang dipergunakan pada hampir seluruh produk yang dijual di Indonesia berupa senyawa sintetik yang disebut *flavor potentiator*, yang paling terkenal adalah MSG (Monosodium Glutamat). Bahan ini umum dipakai untuk menimbulkan rasa gurih pada makanan (Maga, 1998). Keamanan dari bahan-bahan sintetik ini masih dipertanyakan seperti kekuatiran timbulnya *chinese restaurant syndrome*. Di Indonesia sendiri juga masih adanya polemik tentang dampak kesehatan dari MSG (Indriasari, 2006; Syarifah, 2006). Hasil studi Prescott and Young (2002) menunjukkan bahwa 65% dari sampel responden mengklaim terjadi reaksi alergis pada beberapa orang akibat mengkonsumsi makanan (soup) yang telah ditambahkan MSG. Oleh karena itu perlu dikembangkan teknologi proses pembuatan flavor alami yang lebih aman dan bersifat multiguna bersumber dari alam lokal di Indonesia.

Food additives yang berbasis protein dan flavor bagi kebanyakan Industri pangan di Indonesia masih impor dan

harganya relatif mahal. Padahal Indonesia sangat kaya akan sumber-sumber *food ingredient* yang jika dikelola secara tepat akan menghasilkan produk yang tidak kalah dengan kualitas *food ingredient* impor, bahkan beberapa komponen tersebut bersifat *multifunctional* dan memiliki karakter yang spesifik sebagai *indigenous flavor*. Kendala eksplorasi sumber-sumber alam lokal di Indonesia masih terbatas karena penguasaan teknologi produksi *food ingredient* tersebut masih relatif rendah, atau teknologi yang sudah ada belum menjamin bisa sesuai dengan karakteristik bahan, kondisi maupun kegunaan produknya. Oleh karena itu dengan penguasaan teknologi produksi flavor khas dan berbahan asli lokal Indonesia, maka akan menstimulir upaya-upaya eksplorasi sumber-sumber alam lokal Indonesia sebagai *food ingredient* sekaligus membuka peluang dibukanya industri-industri baru produksi *food ingredient*, peningkatan nilai ekonomi bahan-bahan inferior yang kurang dimanfaatkan, serta menambah alternatif dan ketersediaan produk-produk flavor yang lebih murah, aman, bersifat multiguna dan mengurangi impor *protein based-food additive*. Terlebih sifat bahan-bahan flavor di Indonesia sangat beraneka ragam dan spesifik untuk setiap sumber dan jenisnya.

Salah satu solusi dalam menurunkan ketergantungan terhadap impor *food ingredient* terutama *food flavor* adalah melalui pengembangan teknologi pengolahan bahan untuk industri pangan berbasis sumber alam lokal. Oleh karena itu perlu dieksplorasi lebih lanjut potensi *indigenous flavor* dari bahan-bahan alam lokal di Indonesia baik dari sumber nabati maupun hewani.

Rekayasa teknologi produksi flavor enhancer dapat dikembangkan melalui teknik hidrolisis. Dengan teknik hidrolisis, akan dihasilkan senyawa asam amino L, nukleotida dan berbagai ragam peptida. Produk hidrolisis ini

dapat menjadi sumber dari bahan-bahan pembangkit 'umami' (rasa gurih) dan juga sebagai sumber cita rasa (Maga, 1998). Proses hidrolisis dapat dilakukan secara kimiawi maupun enzimatik. Proses hidrolisis kimiawi dapat memperpendek waktu, mempermudah dan mengurangi biaya pembuatan, namun flavor yang dihasilkan kurang baik dan keamanan bagi kesehatan kurang terjamin (Anonim, 2000). Teknik hidrolisis secara kimiawi akhir-akhir ini mulai dihindari oleh kebanyakan industri food ingredient di Indonesia. Hidrolisis enzimatik merupakan pilihan metode paling aman dan lebih menguntungkan dibanding secara kimiawi, karena hidrolisis secara enzimatik dihasilkan asam-asam amino bebas dan peptida dengan rantai pendek yang bervariasi. Produk tersebut mempunyai rentang kegunaan yang lebih luas pada *food industry* (Kunsts, 2000).

Mengingat enzim protease untuk industri pangan selama ini kebanyakan masih impor dan harganya relatif mahal, maka perlu dikembangkan pemanfaatan enzim protease yang bersumber dari alam lokal di Indonesia, salah satunya adalah enzim protease dari tanaman biduri (*Calotropis gigantea*). Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak dari tanaman biduri baik dari bagian getah, batang maupun daun sangat potensial sebagai sumber enzim protease (Witono, 2002a; Witono, 2002b; Witono dkk, 2004; Witono dkk., 2006; Witono dkk., 2007a). Hasil karakterisasi enzim protease dari tanaman biduri, berdasarkan spesifitasnya mengindikasikan secara kuat termasuk dalam golongan eksopeptidase (Witono, 2009; Witono and Kang, 2010) yang sangat sesuai untuk aplikasi pada pembuatan hidrolisat protein (*flavor enhancer*) (Witono, 2013).

Berdasarkan alasan tersebut di atas, maka pengkajian tentang rekayasa teknologi *indigenous flavor* (flavor khas/spesifik) secara enzimatik dengan memanfaatkan

aktivitas enzim protease (*calotropin*) dari tanaman biduri terus dilakukan, dengan harapan dapat menjadi alternatif pengembangan teknologi pembuatan flavor alami dengan memanfaatkan sumber-sumber alam lokal di Indonesia. Penguasaan teknik tersebut akan memberikan dampak bagi pengembangan flavor-flavor alami berbasis *indigenous resources*, meningkatkan ketersediaan food ingredient bagi industri pangan di Indonesia dan mengurangi impor food ingredient.

Buku ini menguraikan tentang teknologi flavor enhancer dari bahan-bahan alami di Indonesia berbasis teknik hidrolisis enzimatis menggunakan enzim protease dari tanaman biduri. Konten dari buku ini terutama disusun dari hasil-hasil penelitian penulis yang dikembangkan berdasarkan hasil-hasil penelitian sebelumnya tentang eksplorasi potensi enzim protease dari tanaman biduri yang sudah ditulis dalam buku berjudul “Enzim Biduri: Agen Aktif Potensial untuk Proses Pangan”. Buku ini juga telah dielaborasi dan diperkaya dengan referensi-referensi terkait sehingga informasi dari hasil-hasil penelitian yang telah diperoleh menjadi lebih kontekstual dan menarik untuk dibaca, dikembangkan dan diaplikasikan lebih lanjut.

Flavor

Flavor bahan pangan sesungguhnya terdiri dari tiga komponen yaitu bau, rasa dan rangsangan mulut. Bau dapat dikenali bila berbentuk uap, rasa dapat diketahui bila dicecap oleh lidah, sedangkan rangsangan mulut terjadi sewaktu makanan tersentuh dan terasa di rongga mulut. Dua jenis bahan pembangkit cita rasa yang umum adalah asam amino L atau garamnya, nukleotida dan peptida (Maga and Tu, 1995). Kedua bahan ini umum dipakai untuk menimbulkan rasa gurih (*umami*) pada makanan.

Beberapa studi telah mendemonstrasikan bahwa senyawa-senyawa tersebut secara signifikan dapat memodifikasi cita rasa makanan. Lebih jelas lagi, senyawa-senyawa tersebut secara alamiah terdapat di dalam daging dan kedelai dalam jumlah besar. Dengan menggunakan teknik hidrolisis, protein dari bahan-bahan tersebut akan menghasilkan senyawa asam amino L, nukleotida dan berbagai ragam peptida. Produk hidrolisis ini dapat menjadi sumber dari bahan-bahan pembangkit umami (Maga, 1998).

Hidrolisat protein adalah produk dasar multi komponen, formula nutrisi yang kompleks dengan komposisi kimia yang baik. Produk ini terutama didesain sebagai sumber nutrisi bagi individu yang mempunyai kebutuhan nutrisi tertentu. Hidrolisat protein yang digunakan pada formula nutrisi secara umum dibagi menjadi dua kategori *partial hidrolisate* dan *extensive hidrolisate*. Perbedaan kedua jenis ini akan mempengaruhi produk akhir (Mahmoud dalam Anonim, 2000).

Terjadinya perubahan flavor pada protein hidrolisat disebabkan oleh formasi dari peptida dan asam amino dari

protein dan melepas komponen flavor non protein dari bahan-bahan mentah. Setiap komponen bahan mentah mempunyai karakter rasa yang sangat banyak yang dianggap berasal dari komponen non protein. Hidrolisis akan mengubah struktur dari protein, dan menyebabkan penurunan kemampuan interaksi komponen aroma tersebut. Protein pangan yang memiliki berat lebih dari 6000 dalton umumnya berperan pada rasa gurih. Sedangkan, peptida yang memiliki berat molekul rendah ditemukan memiliki rasa pahit.

Peptida yang memiliki berat molekul rendah dan berasa pahit umumnya sebagian besar mengandung residu hidrophobik. Protein dari casein, jagung, dan protein kedelai merupakan protein hidrophobik berasa pahit, tetapi hidrolisis mengurangi sifat hidrophobik protein, bahkan hidrolisis pada protein otot dan jamur dapat menghilangkan sifat hidrophobik ini. Gly, Asp, Asn, Glu dan Gln memiliki tingkat hidrophobisitas yang rendah dari pada asam amino yang lain. Rasa pada asam amino bebas adalah manis, pahit, netral dan asam. (Nordisk dalam Anonim, 2000).

Berbeda pada penyedap sintetis seperti MSG, di mana asam amino yang ada hanyalah glutamat, sedangkan pada protein hidrolisat asam aminonya lebih kompleks karena setiap jenis protein tersusun atas berbagai macam asam amino. Dengan demikian disamping sebagai penyedap rasa, juga dapat berperan sebagai protein fungsional.

Rasa pahit merupakan problem utama terhadap penerimaan protein hidrolisat. Seleksi pemisahan peptida yang pahit dilakukan dengan menggunakan metode yang berbeda. Metode penutupan rasa pahit dapat dilakukan dengan penambahan gelatin, karena glisin sebagai produk hidrolisisnya dapat menurunkan rasa pahit dari protein hidrolisat.

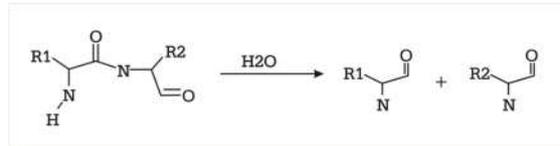
Pengembangan Flavor berbasis Teknik Hidrolisis dan Bahan Tambahan (*Food Additives*)

Flavor merupakan produk browning, dimana gula reduksi akan bereaksi dengan senyawa-senyawa amino untuk membentuk glikosilamin (Mottram, 1998). Penambahan gula reduksi sangat membantu pengoptimalan pengembangan umami hidrolisat tempe. Dalam daging, gula reduksi yang sebenarnya sangat baik untuk pengembangan flavor adalah ribosa yang tergolong senyawa pentosan (Tsai *et al.* dalam Soeparno, 1994).

Di samping gula reduksi, senyawa fosfat juga diketahui dapat meningkatkan mutu flavor dari daging selama pemrosesan (Tsai *et al.* dalam Soeparno, 1994). Dengan menggunakan bahan kedelai, hasil penelitian Witono dkk. (2007c) membuktikan kebenaran dari teori ini. Dengan menambahkan senyawa-senyawa fosfat, umami dapat ditingkatkan secara nyata. Lain lagi dengan bawang putih, rempah ini secara tradisional sudah digunakan untuk meningkatkan mutu masakan. Delaquis and Mazza dalam Anonim (2000) telah mengulas dengan jelas bahwa bawang putih mengandung senyawa-senyawa sulfur, di mana senyawa ini dapat bereaksi dengan produk-produk maillard membentuk umami pada daging (Bailey, 1998).

Hornstein dalam Anonim (2000) berpendapat bahwa ada dua pendekatan dalam flavor daging, yaitu (1) flavor prekursor, dan (2) flavor volatil. Flavor prekursor berupa bahan-bahan yang larut dalam air yang kemudian mengalami reaksi browning selama pemanasan sehingga membentuk senyawa flavor. Sedangkan flavor volatil adalah komponen-komponen yang mudah menguap dari daging yang sangat menentukan flavor daging. Akan tetapi minyak daging menyumbang flavor daging dengan terbentuknya senyawa karbonil hasil oksidasi minyak, dan sebagai media pelarut senyawa volatil pembentuk flavor.

Hidrolisis diartikan sebagai pemecahan banyak ikatan menjadi ikatan lebih kecil dan sederhana. Pada hidrolisis, sebuah ikatan antara dua atom dipecah. Meskipun demikian istilah hidrolisis kadang-kadang berkembang pada reaksi pemecahan banyak ikatan menjadi satu ikatan. Proses hidrolisis adalah proses pemecahan suatu molekul menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana dengan bantuan molekul air. Hidrolisis protein adalah proses pecahnya atau terputusnya ikatan peptida dari protein menjadi molekul yang lebih sederhana. Hidrolisis ikatan peptida akan menyebabkan beberapa perubahan pada protein, yaitu meningkatkan kelarutan karena bertambahnya kandungan NH_3^+ dan COO^- serta berkurangnya berat molekul protein atau polipeptida, rusaknya struktur globular protein (Wilson dan Walker 2000). Reaksi katalisa protease secara umum adalah menghidrolisa ikatan peptida protein seperti terlihat pada Gambar 1 di bawah ini.



R1= rantai peptida sebelumnya R2= rantai peptida sesudahnya

Gambar 1. Reaksi Katalisa Protease dalam Menghidrolisis Ikatan Peptida Protein

Berdasarkan hasil-hasil penelitian yang telah dikembangkan oleh beberapa peneliti, teknis hidrolisis enzimatis protein alami memungkinkan untuk diaplikasikan pada industri pangan. Beberapa produk telah dikembangkan berbasis pada teknik ini, seperti: hidrolisat, garam gurih, ekstrak dan seasoning, saos, petis (ikan), dan kecap. Beberapa produk dapat merupakan satu rangkaian dari proses yang sama, hanya dibedakan pada finishingnya.

Hidrolisat Protein

Hidrolisat protein didefinisikan sebagai protein yang mengalami degradasi baik secara kimiawi, fermentasi dan enzimatis dengan hasil akhir berupa senyawa protein yang lebih sederhana. Bila hidrolisis dilakukan dengan sempurna maka akan diperoleh hidrolisat yang terdiri dari campuran 18 sampai 20 macam asam amino. Produk akhir dapat berbentuk cair, pasta atau bubuk/tepung yang bersifat higroskopis. Selain itu hidrolisat protein adalah produk dasar multi komponen, formulasi nutrisi yang kompleks dengan komposisi kimia yang baik. Produk ini biasanya dirancang sebagai nutrisi bagi individu yang mempunyai kebutuhan nutrisi tertentu. Pada umumnya hidrolisat protein digunakan untuk memperbaiki karakteristik berbagai produk pangan, sebagai penyedap rasa, sebagai lanjutan untuk isolasi asam amino, serta untuk pengobatan. Selain itu hidrolisat protein juga dapat disertakan sebagai menu para penderita gangguan pencernaan (Julianto, 2003).

Hidrolisat protein digunakan sebagai sumber asam amino untuk reaksi aromatik. Hidrolisat protein banyak digunakan pada peningkatan nilai gizi, zat pemberi citarasa daging dan makanan diet. Keuntungan menggunakan hidrolisat protein untuk berbagai pengolahan pangan adalah bahwa hidrolisat protein umumnya mudah larut, stabil pada pemanasan tinggi, tidak mudah mengendap oleh adanya berbagai agensia atau keadaan seperti misalnya adanya ion-ion logam. Dari segi gizi, hidrolisat protein bermanfaat bagi pasien yang mempunyai kelemahan pencernaan. Aplikasi produk hidrolisat protein ikan diantaranya digunakan dalam pengolahan bahan makanan tambahan dengan tujuan selain menambah sumber protein yang kaya dengan asam amino juga meningkatkan cita rasa produk (Julianto, 2003).

Produk hidrolisat protein mempunyai kelebihan karena kelarutannya tinggi dan kondisinya stabil. Rasio α -amino

nitrogen bebas dengan total nitrogen produk hidrolisat sebagai suplemen makanan yang disampaikan oleh Food Chemical Codex bervariasi antara 0,02 sampai 0,67. Hidrolisat protein yang dibuat dari ikan berlemak rendah (*non fatty fish*) mengandung protein 85–90 %, lemak 2–4 %, dan abu 6-7 % berdasarkan berat kering. Hidrolisat protein mempunyai peranan penting di dalam fortifikasi makanan dan minuman untuk memperkaya protein dan nilai gizi makanan, sehubungan dengan tingginya tingkat kelarutan dan pencernaan. Berdasarkan beberapa penelitian diketahui bahwa hidrolisat protein ikan secara luas digunakan sebagai bahan tambahan makanan dalam sup, kuah daging, rasa daging, makanan diet, penyedap sosis, biskuit, dan crackers. Hidrolisat protein ikan juga berguna sebagai bahan fortifikasi untuk memperkaya nilai gizi produk makanan suplemen terutama untuk anak-anak dan bahan pengganti albumin telur pada proses pembuatan es krim, agar-agar, serta secara fungsional dapat dikatakan sebagai bahan pengemulsi, pengembang, dan bahan pengisi (Hidayat, 2005).

Garam Gurih

Garam gurih merupakan produk inovasi penyedap masakan saat ini. Beberapa produsen besar memproduksi garam gurih untuk memperluas lini produknya. Pembuatan garam gurih sementara ini dilakukan dengan teknik *coating* garam dengan MSG dan senyawa ribotida, sehingga menghasilkan garam yang mempunyai rasa sedap atau gurih (Pramadi, 2006).

Syarat mutu garam gurih menurut Standar Nasional Indonesia No. 1-3556.1-1999 oleh Badan Standarisasi Nasional ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Syarat Mutu Garam Gurih Berdasarkan Standar Nasional Indonesia No. 1 -3556.1-1999

Komponen	Ukuran
Bau, rasa, warna	-
NaCl	min. 87% b/b
H ₂ O	maks. 1% b/b
K ₂ O	30 mg/kg-80 mg
Fe ₂ O ₃	maks. 25 mg/kg
Ca dan Mg	maks. 1,0% b/b
SO ₄ ²⁻	maks. 1,0% b/b
Bagian yang tak larut dalam air	maks. 0,1% b/b
Cemaran logam :	
Pb	maks 10,0 mg/kg
Cu	maks. 10,0 mg/kg
Hg	maks. 0,1 mg/kg)
MSG	9% b/b - 12 % b/b
Anti kempal (SiO ₂ Amorf, Natrium Alumino Silikat, Kalsium Aluminium Silikat)	maks 1,0 % b/b
Kalium Ferrosianida	maks. 5 mg/kg
Kehalusan (ayakan mesh no. 20)	min 70%

Sumber : Badan Standarisasi Nasional (2008)

Ekstrak dan Seasoning

Ekstrak merupakan salah satu bentuk produk *flavoring agent* dari bahan tertentu yang biasanya digunakan kalangan fabrikasi untuk membuat produknya beraroma dan berasa alami. Contoh produk yang terkenal adalah *beef extract* dan *chicken extract*. Dengan menggunakan teknik hidrolisis enzimatis, ekstrak dari suatu bahan khususnya hewani, seperti sapi, ayam, ikan, udang dan kerang dapat dibuat dengan mudah. Setelah bahan-bahan dihidrolisis, maka filtrat yang didapat dipekatkan dan kemudian ditambah

garam sebagai bahan pengawet, maka ekstrak telah dihasilkan.

Produk ini selanjutnya dapat dikembangkan lebih lanjut menjadi produk multi guna yang disebut sebagai *seasoning*. Pengembangan *seasoning* yang berasa daging ayam dan sapi pernah dicoba. Teknik yang digunakan adalah gabungan antara hidrolisis dan reaksi maillard. Daging sapi atau ayam dihidrolisis dengan menggunakan protease. Hidrolisat ini selanjutnya direaksikan dengan gula reduksi untuk memacu reaksi maillard. Finishing dilakukan dengan penambahan garam dan bumbu-bumbu lain serta bahan pengawet. Teknik ini masih memerlukan optimasi untuk meningkatkan hasilnya.

Saos

Saos yang dimaksud adalah produk yang biasanya dipakai untuk bumbu sewaktu masak. Contoh saos yang sangat terkenal dan berharga mahal adalah saos tiram. Saos ini biasanya digunakan sebagai sumber *flavor enhancer* pada masakan-masakan cina yang menekankan proses “penyangraian” (penggorengan secara kering). Saos ini menggunakan tiram sebagai sumber asam glutamat dan IMP/GMP-nya.

Melalui teknik hidrolisis, proses ekstraksi asam glutamat dan IMP/GMP bahan-bahan hewani dapat menjadi optimal dan juga akan memunculkan peptida-peptida berasa gurih. Beberapa jenis saos yang mungkin dikembangkan adalah saos kerang/tiram, udang, ikan, ayam dan sapi. Saos ini cukup awet, sebab diatur pada kondisi pH 4,5 – 4, dan dapat ditambah dengan bahan pengawet lainnya. Saos yang dihasilkan, disamping dapat dipasarkan dalam bentuk botolan, juga memungkinkan digunakan sebagai bumbu pada produk-produk instant seperti mie dan nasi.

Kecap

Kecap merupakan jenis makanan hasil fermentasi yang banyak dikonsumsi di seluruh dunia, termasuk Indonesia. Produk ini berbentuk cair berwarna coklat gelap mempunyai rasa asin atau manis dan digolongkan dalam makanan yang mempunyai flavor menyerupai ekstrak daging. Kecap dapat memperkuat flavor dan memberikan warna pada daging, ikan sayuran atau bahan pangan lain. Pada umumnya pembuatan kecap dilakukan dengan fermentasi dan hidrolisis kimiawi. Proses fermentasi akan menghasilkan flavor yang sangat baik, namun memerlukan waktu yang sangat panjang, yaitu lebih dari satu bulan. Sedangkan proses hidrolisis kimiawi, yaitu dengan penambahan asam klorida dapat memperpendek waktu, mempermudah dan mengurangi biaya pembuatan. Namun demikian dengan teknik ini, flavor yang dihasilkan kurang baik dan keamanan bagi kesehatan kurang terjamin (Kasmidjo dalam Anonim, 2000).

Komponen-komponen pembentuk aroma dalam kecap berupa senyawa-senyawa volatil yang terdiri dari 63 komponen. Sedangkan komponen-komponen rasa terdiri atas asam-asam amino bebas, seperti asam glutamat, arginin, histidin dan lisin, serta peptida-peptida terlarut yang berbentuk garam (Kasmidjo dalam Anonim, 2000). Selanjutnya warna kecap punya arti penting karena erat hubungannya dengan flavor yang dihasilkan, terbentuk karena reaksi browning antara asam-asam amino dengan gula reduksi.

Melalui teknik hidrolisis enzimatis, asam-asam amino bebas dan peptida sederhana dapat dihasilkan dari protein. Produk hidrolisis enzimatis ini dapat menjadi sumber dari bahan-bahan pembangkit umami dan juga sebagai sumber cita rasa makanan (Maga, 1998). Dengan teknik hidrolisis enzimatis akan memungkinkan terbentuknya bahan-bahan

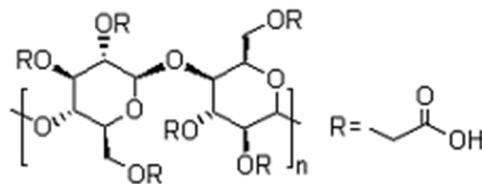
dasar pencipta rasa kecap, dan tentunya akan memperpendek waktu proses pembuatan. Hanya saja, proses hidrolisis enzimatis ini tidak akan menghasilkan senyawa-senyawa volatil yang turut menentukan aroma dari kecap. Namun demikian, masih terdapat kelemahan dalam hal rasa dan aroma lainnya, yaitu rasa dan aroma tempe yang masih tersisa dan kurang tajamnya flavor (alkoholik, aromatik dan masam menyengat). Flavor yang tajam ini memang tidak akan muncul jika kecap tidak diproses melalui fermentasi konvensional. Karena flavor spesifik kecap juga ditentukan oleh jenis bumbu-bumbu yang digunakan dan penambahan gula (Kasmidjo dalam Anonim, 2000), maka dengan perbaikan dan manipulasi bumbu kecap dengan kualitas prima diharapkan dapat dihasilkan.

Bahan-Bahan Tambahan digunakan dalam Pembuatan Flavor

CMC (Carboxymethyl Cellulose)

Gum selulosa (CMC= Carboxymethyl Cellulose) adalah salah satu jenis hidrokoloid atau bahan pengental yang sering digunakan dalam industri makanan. Gum selulosa ini merupakan turunan dari selulosa alami yang berfungsi untuk meningkatkan rasa di mulut (*mouthfeel*) dan memperbaiki tekstur, kestabilan suspensi, emulsi, busa dan meningkatkan viskositas yang lebih baik. Selain itu CMC merupakan salah satu jenis hidrokoloid alam yang telah dimodifikasi dan merupakan anionik polielektrolit. CMC berwarna putih atau sedikit kekuningan, hampir tidak berbau dan tidak berasa. Dalam bentuk serbuk bersifat higroskopis. CMC mempunyai sifat dapat larut dalam air panas dan dingin, lapisannya tahan terhadap minyak dan lemak, dan dapat digunakan pada berbagai produk pangan. Hidrokoloid atau koloid hidrofilik adalah komponen aditif yang penting

dalam industri pangan karena kemampuannya dalam mengubah sifat fungsional produk pangan. Hidrokoloid digunakan untuk kestabilan suspensi. Perubahan viskositas yang ditimbulkan dan kemampuan membentuk lapisan tipis diantaranya komponen produk pangan menyebabkan stabilisasi serta mampu memperangkap dan menahan gas yang terbentuk. Untuk setiap jenis hidrokoloid mempunyai kemampuan meningkatkan kestabilan emulsi yang berbeda-beda, tergantung besar dan bentuk polimernya. Rumus kimia CMC adalah $(C_6H_7O_2)(OH)_2OCH_2COOH)_n$. Struktur kimia CMC dapat dilihat pada Gambar 2 (Cahyadi, 2005).



Gambar 2. Struktur Kimia CMC (Fardiaz, 1986)

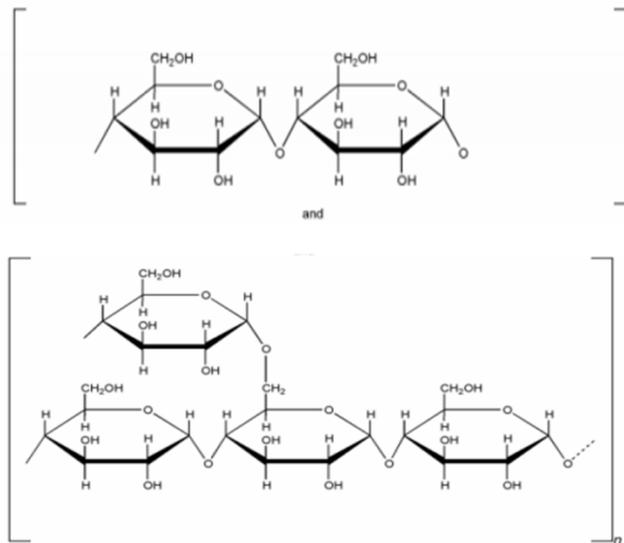
Mekanisme CMC sebagai pengental yaitu mula-mula CMC yang berbentuk garam Na terdispersi dalam air, butir-butir CMC yang bersifat hidofilik menyerap air dan membengkak. Air menjadi tidak dapat bergerak bebas sehingga keadaan larutan menjadi lebih mantap yang ditandai dengan kenaikan viskositasnya. Mekanisme CMC sebagai penyelubung butiran yaitu dengan membentuk lapisan tipis yang resisten terhadap terjadinya pengendapan. Jadi peran CMC adalah menyelubungi dan mengikat partikel-partikel tersuspensi misalnya pektin, lemak, dan fosfolipid. Hal ini mengakibatkan partikel-partikel tersuspensi tidak mengendap dan kestabilannya dapat dipertahankan. Molekul dari CMC ini sebagian besar meluas atau memanjang pada konsentrasi rendah tetapi pada konsentrasi yang lebih tinggi molekulnya bertindih dan menggulung, kemudian pada konsentrasi yang lebih tinggi

lagi membentuk benang kusut menjadi gel yang termoreversibel. Meningkatnya kekuatan ionik dan menurunnya pH dapat menurunkan viskositas CMC akibat polimernya yang bergulung. Saat ini, CMC telah banyak dan bahkan memiliki peranan yang penting dalam berbagai aplikasi. Khusus di bidang pangan, CMC dimanfaatkan sebagai bahan penstabil, thickener, adhesive dan pengemulsi (Eliasson, 2004).

Dalam industri makanan dan minuman konsentrasi CMC yang digunakan sekitar 0,1% – 2%. CMC yang banyak digunakan dalam industri makanan adalah garam Na-Carboxymethyl Cellulose dalam bentuk murninya disebut gum selulosa. CMC mempunyai gugus karboksil, maka viskositas larutan CMC dipengaruhi oleh pH larutan. pH optimumnya adalah 5 dan pada pH (< 3) maka CMC akan mengendap. CMC merupakan garam dari basa kuat dan asam lemah sehingga pH larutannya akan bersifat lebih basa, hal ini terjadi karena CMC terionisasi menghasilkan ion natrium. CMC dibuat dari sel-sel murni kayu kapas yang dapat menyerap air 50 kali dari beratnya, sehingga dapat berupa koloid yang stabil (Stephen, 1995).

Maltodekstrin

Maltodekstrin didefinisikan sebagai produk hidrolisis pati yang mengandung unit α -Dglukosa yang sebagian besar terikat melalui ikatan α 1,4 glikosidik dengan DE kurang dari 20. Rumus umum maltodekstrin adalah $[(C_6H_{10}O_5)_nH_2O]$ (Stephen, 1995). Struktur kimia maltodekstrin dapat ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur Kimia Maltodekstrin (Radley, 2008).

Maltodekstrin merupakan produk hidrolisis parsial, sehingga proses hidrolisisnya berhenti hanya sampai likuifikasi. Pada tahap likuifikasi terjadi pemecahan ikatan α -(1,4)-D glikosidik oleh enzim α amilase pada bagian dalam rantai polisakarida sehingga dihasilkan glukosa maltosa, maltodekstrin dan α limit dekstrin. Enzim α -amylase merupakan enzim yang menghidrolisis secara khas melalui bagian dalam dengan memproduksi oligosakarida dari konfigurasi alfa yang memutus ikatan α -(1,4)-D-glikosidik pada amilosa dan amilopektin. Ikatan α -(1,6)-D-glikosidik tidak dapat diputus oleh α -amylase, tetapi dapat dibuat menjadi cabang-cabang yang lebih pendek (Anonim, 2008).

Maltodekstrin biasanya dideskripsikan oleh DE (*Dextrose Equivalent*). Maltodekstrin dengan DE yang rendah bersifat non-higroskopis, sedangkan maltodekstrin dengan DE tinggi cenderung menyerap air (higroskopis).

Maltodekstrin pada dasarnya merupakan senyawa hidrolisis pati yang tidak sempurna, terdiri dari campuran gula-gula dalam bentuk sederhana (mono- dan disakarida) dalam jumlah kecil, oligosakarida dengan rantai pendek dalam jumlah relatif tinggi serta sejumlah kecil oligosakarida berantai panjang. Nilai DE maltodekstrin berkisar antara 3 – 20 (Blancard, 1995).

Maltodekstrin merupakan produk dari modifikasi pati salah satunya singkong (tapioka), selain itu harus memenuhi persyaratan yang ditetapkan yaitu susut pengeringan < 6%, sisa pemijaran < 0,5% dan pH antara 4-7. Maltodekstrin sangat banyak aplikasinya, seperti halnya pati, maltodekstrin merupakan bahan pengental sekaligus dapat sebagai emulsifier. Kelebihan maltodekstrin adalah bahan tersebut dapat dengan mudah melarut dalam air dingin. Penggunaan maltodekstrin contohnya pada minuman susu bubuk, minuman berenergi (energen) dan minuman prebiotik (Anonim, 2008). Aplikasi maltodekstrin pada produk pangan (Blancard, 1995) antara lain pada:

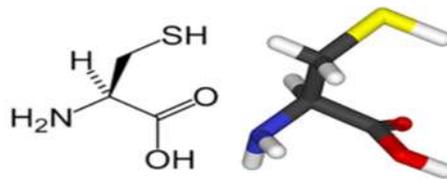
- a. Makanan beku, maltodekstrin memiliki kemampuan mengikat air (*water holding capacity*) dan berat molekul rendah sehingga dapat mempertahankan produk beku.
- b. Makanan rendah kalori, penambahan maltodekstrin dalam jumlah besar tidak meningkatkan kemanisan produk seperti gula.
- c. Produk roti, misalnya cake, muffin, dan biskuit, digunakan sebagai pengganti gula atau lemak.

Sifat – sifat yang dimiliki maltodekstrin antara lain mengalami dispersi cepat, memiliki sifat daya larut yang tinggi maupun membentuk film, membentuk sifat higroskopis yang rendah, mampu membentuk body, sifat browning yang rendah, mampu menghambat kristalisasi dan memiliki

daya ikat kuat. Maltodekstrin merupakan salah satu jenis bahan pengganti lemak berbasis karbohidrat yang dapat diaplikasikan pada produk frozen dessert seperti es krim, yang berfungsi membentuk padatan, meningkatkan viskositas, tekstur, dan kekentalan (Blancard, 1995).

Sistein

Sistein ($C_3H_7NO_2S$) merupakan asam amino bukan esensial bagi manusia yang memiliki atom S yang bersifat hidrofilik, bersama-sama dengan metionin. Atom S ini terdapat dalam gugus tiol (dikenal juga sebagai sulfhidril atau merkaptan). Karena memiliki atom S, sistein menjadi sumber utama dalam sintesis senyawa-senyawa biologis yang lain yang mengandung belerang. Sistein dan metionin pada protein juga berperan dalam menentukan konformasi protein karena adanya ikatan hidrogen pada gugus tiol. Sistein mudah teroksidasi oleh oksigen membentuk sistin, senyawa yang terbentuk dari dua molekul sistein yang berikatan pada atom S masing-masing. Reaksi ini melepas satu molekul air (reaksi hidrasi). Sistein memiliki berat molekul 12,15, jika dipaparkan pada udara akan membentuk sistin, dimana dua molekul sistein akan dihubungkan dengan ikatan disulfida (Clemente, 2000). Struktur kimia sistein dapat ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur Kimia Sistein (Clemente, 2000).

Sistem adalah senyawa pereduksi yang dapat meningkatkan aktivitas papain dengan jalan memutus ikatan

disulfida (S-S) pada senyawa sistein yang terdapat dalam struktur enzim papain. Jika ikatan disulfida terputus akan diperoleh gugus disulfhidril bebas. Dengan terbentuknya gugus sulfhidril bebas sehingga aktivitas papain meningkat. Sistein ini mudah teroksidasi oleh oksigen dan membentuk sistina, senyawa yang terbentuk dari dua molekul sisteina yang berikatan pada atom S masing-masing. Reaksi ini melepas satu molekul air (reaksi dehidrasi). Sumber utama sistein ini banyak terdapat di dalam keju, unggas ikan, cabai, bawang putih, bawang bombay, brokoli dan pada komoditi buncis. L-sistein ini juga diproduksi secara industri melalui hidrolisis rambut manusia dan bulu unggas. Namun dengan perkembangan zaman sistein telah diproduksi melalui fermentasi mikroorganisme (Clemente, 2000).

Hasil penelitian sebelumnya (Witono dkk., 2007b; Witono, 2013) menunjukkan bahwa protease biduri berdasarkan sifat kimia sisi aktifnya termasuk dalam jenis sulfidril (*cysteine protease*). Hal ini memperkuat dugaan dari hasil penelitian sebelumnya (Witono, 2002a) bahwa protease biduri juga aktif dengan penambahan aktivator spesifik lainnya yakni HCN. Rao *et al.* (1998) menyatakan bahwa protease sulfidril akan meningkat aktivitasnya bila ditambah reagen sistein.

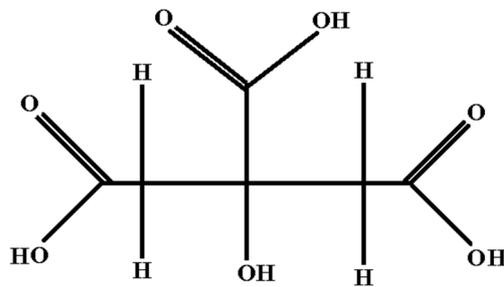
Asam Sitrat

Asam sitrat (C₆H₈O₇) merupakan asam organik lemah yang ditemukan pada daun dan buah tumbuhan genus *Citrus* (jeruk-jerukan). Senyawa ini merupakan bahan pengawet yang baik dan alami, selain digunakan sebagai penambah rasa masam pada makanan dan minuman ringan. Asam sitrat terdapat pada berbagai jenis buah dan sayuran, namun ditemukan pada konsentrasi tinggi, yang dapat mencapai 8% bobot kering, pada jeruk lemon dan limau (misalnya jeruk nipis dan jeruk purut). Kode asam

sitrat sebagai zat aditif makanan (E *number*) adalah E330. Garam sitrat dengan berbagai jenis logam digunakan untuk menyediakan logam tersebut (sebagai bentuk biologis) dalam banyak suplemen makanan. Dalam resep makanan asam sitrat dapat digunakan sebagai pengganti sari jeruk (Wikipedia, 2010).

Menurut Sakidjo (1989) salah satu sumbangan amat penting asam pada makanan yaitu kemampuannya untuk menghasilkan rasa asam yang kelat. Asam juga mempunyai kemampuan untuk mengubah dan menguatkan persepsi rasa zat-zat cita rasa. Ion hidrogen atau ion hidronium menyebabkan rasa asam. Selanjutnya asam-asam lemak bebas rantai pendek (C2-C1) memberi aroma makanan.

Asam sitrat dikategorikan aman digunakan pada makanan oleh semua badan pengawasan makanan nasional dan internasional utama. Senyawa ini secara alami terdapat pada semua jenis makhluk hidup, dan kelebihan asam sitrat dengan mudah dimetabolisme dan dihilangkan dari tubuh. Paparan terhadap asam sitrat kering ataupun larutan asam sitrat pekat dapat menyebabkan iritasi kulit dan mata. Peneakan alat protektif (seperti sarung tangan atau kaca mata pelindung) perlu dilakukan saat menangani bahan-bahan tersebut (Wikipedia, 2010). Gambar 5 menunjukkan struktur kimia asam sitrat.



Gambar 5. Struktur Kimia Asam Sitrat

Garam Dapur

Menurut Widiyanto (2009), garam dapur mengandung unsur sodium dan klor dengan rumus kimia NaCl. Senyawa ini adalah garam yang paling mempengaruhi salinitas laut dan cairan ekstraseluler pada banyak organisme multiselular. Sebagai komponen utama pada garam dapur, natrium klorida sering digunakan sebagai bumbu dan pengawet makanan. Unsur sodium ini penting untuk mengatur keseimbangan cairan di dalam tubuh.

Garam dapur (NaCl) adalah ingredien yang paling banyak digunakan dalam industri pengolahan, termasuk produk-produk bumbu instan. Rasa asin garam diberikan oleh ion Cl^- maupun Na^+ yang mempunyai kemampuan untuk menstimulasi ujung-ujung pengecap. Rasa asin hanya terdeteksi jika NaCl terdapat dalam bentuk ion bebasnya. Kemurnian garam yang digunakan akan berpengaruh pada rasa yang dihasilkan. Sebagai contoh, keberadaan KCl dalam jumlah cukup akan menyebabkan terdeteksinya rasa logam yang berasal dari ion K^+ (Anin, 2010).

Fungsi penambahan garam adalah untuk memperbaiki rasa yaitu menetralkan rasa pahit dan rasa asam, membangkitkan selera dan mempertajam rasa manis, selain itu garam mempunyai tekanan osmotik yang tinggi, higroskopik dan dapat terurai menjadi Na^+ dan Cl^- yang meracuni sel mikroba dan mengurangi kelarutan oksigen (Purba dan Rusmarilin, 1985).

Fungsi garam dapur selain sebagai penambah cita rasa, juga dapat berfungsi sebagai pengawet produk pangan. Menurut Anin (2010), pada awalnya, penggunaan garam ditujukan sebagai pengawet. Untuk tujuan ini, jumlah garam yang digunakan mencapai 10-15%. Konsentrasi garam NaCl yang tinggi menyebabkan A_w produk turun dan terjadi peningkatan tekanan osmotik terhadap sel mikroba mengakibatkan sel mikroba mengalami lisis dan mati.

Garam beryodium merupakan garam dapur yang umum diproduksi dan dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia. Di dalam buku SNI- 01-3556-2000/Rev.9 definisi garam konsumsi beryodium adalah produk makanan yang komponen utamanya natrium klorida (NaCl) dengan penambahan kalium yodat (KIO₃). Standar mutu garam konsumsi beriodium sebagaimana tertera pada Tabel 2.

Tabel 2. Standar Mutu Garam Konsumsi Beriodium

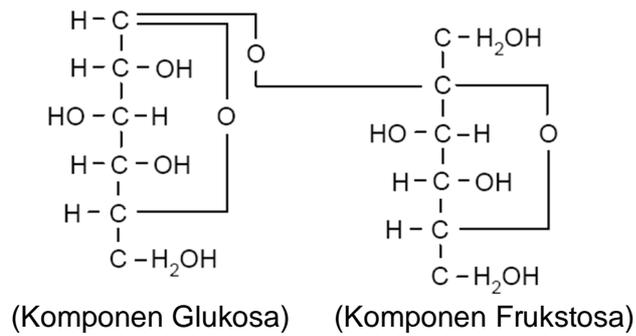
Kriteria Uji	Satuan	Persyaratan Mutu
Kadar air (H ₂ O)	% (b/b)	Maks 7
Jumlah klorida (Cl)	% (b/b)	Min 94,7
Yodium dihitung sebagai kalium yodat (KIO ₃)	mg/kg	Min 30
Cemaran logam :		
Timbal (Pb)	mg/kg	Maks 10
Tembaga (Cu)	mg/kg	Maks 10
Raksa (Hg)	mg/kg	Maks 0,1
Arsen (As)	mg/kg	Maks 0,1

Sumber: (SNI- 01-3556-2000/Rev.9).

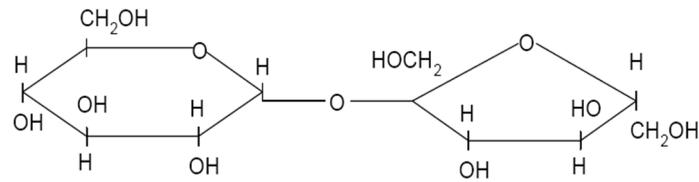
Gula

Gula merupakan suatu karbohidrat sederhana yang menjadi sumber energi dan komoditi perdagangan utama. Gula paling banyak diperdagangkan dalam bentuk kristal sukrosa padat. Gula digunakan untuk mengubah rasa menjadi manis dan keadaan makanan atau minuman. Sebagai standar kemanisan digunakan rasa manis sukrosa. Menurut Winarno (2002), dalam industri makanan biasa digunakan sukrosa dalam bentuk kristal halus atau kasar dan dalam jumlah banyak dalam bentuk cairan sukrosa (sirup).

Sukrosa adalah karbohidrat yang mempunyai rumus kimia $C_{12}H_{22}O_{11}$ yang merupakan disakarida dan terdiri dari 2 komponen monosakarida yaitu D-glukosa dan D-fruktosa. Nama kimia yang lebih tepat dari sukrosa adalah α -D-glukopyranosyl- β -D-fruktofuranoside. Rumus bangun dan struktur kimia sukrosa sebagaimana tertera pada Gambar 6.A. dan 6.B. berikut ini.



Gambar 6.A. Rumus Bangun Sukrosa (Goutara dan Soesarsono, 1980)



Gambar 6.B. Struktur Kimia Sukrosa

Winarno (2002), mengatakan bahwa terjadinya rasa manis didasarkan pada sifat-sifat ikatan hydrogen pada senyawa yang manis. Suatu senyawa yang manis dengan atom-atom elektronegatif A dan B, dengan sebuah atom

hidrogen yang terikat secara kovalen pada A, kemungkinan besar akan membentuk pasangan ikatan hidrogen dengan struktur yang sama dari reseptor pada ujung syaraf rasa, sehingga menghasilkan respon manis. A-H mewakili gugusan donor proton, sedang B sebagai gugusan fungsional bertindak sebagai akseptor proton. Jarak antara A-H dan B minimal harus 3 Å. Bila tidak pembentukan pasangan ikatan hydrogen ini akan terganggu.

Penambahan gula pada produk bukan saja untuk menghasilkan rasa manis meskipun sifat ini sangatlah penting. Jadi gula bersifat menyempurnakan rasa asam dan cita rasa. Daya larut yang tinggi dari gula, memiliki kemampuan mengurangi kelembaban relatif (ERH) dan daya mengikat air adalah sifat-sifat yang menyebabkan gula dipakai dalam pengawetan pangan (Buckle *et al.*, 1987). Tabel 3 menunjukkan susunan kimia gula pasir.

Tabel 3. Susunan Kimia Gula Pasir

Komponen	Jumlah (%)
Sukrosa	97.21
Gula reduksi	1.24
Abu	0.35
Senyawa organik selain sukrosa	0.7

Sukrosa memiliki berat molekul 342,30 terdiri dari gugus glukosa dan fruktosa. Sukrosa merupakan senyawa gula yang paling disukai. Sukrosa terdapat di alam dalam jaringan tanaman terutama buah, biji, bunga dan akar. Madu lebah mengandung sebagian besar sukrosa dan hasil hidrolisanya (Soedarmadji, 1982).

Titik cair sukrosa adalah 186 °C. kebanyakan disakarida bersifat mereduksi fehling (benedict) tetapi sukrosa merupakan perkecualian tidak mereduksi. Dalam keadaan murni sukrosa tidak dapat difermentasikan oleh khamir. Pada suhu 160 -186 °C sukrosa akan membentuk

arang yang mengeluarkan bau karamel yang spesifik. Satu gram sukrosa dapat larut dalam 0,5 ml air (suhu kamar) atau dalam 0,2 ml air mendidih, dalam 170 ml alkohol atau 100 ml metanol. Sukrosa sedikit larut dalam gliserol dan piridin. Sukrosa dapat mengalami hidrolisa dalam larutan asam encer atau oleh enzim invertase menjadi glukosa dan fruktosa. Campuran glukosa dan fruktosa disebut “gula invert” dan perubahannya disebut proses inversi. Sukrosa kristal murni mengandung energi 351 kalori/100 gram. Sedang gula merah tanpa pemurnian 389 kalori/100 gram (Soedarmadji, 1997).

BAB 3

HIDROLISIS PROTEASE BIDURI PADA BAHAN BERPROTEIN

Hidrolisis Protease Biduri pada Substrat Kedelai

Kedelai merupakan komoditi yang sangat penting karena mengandung protein dan lemak yang tinggi (Liang, 1999), sebagai sumber nutrisi bagi manusia, kedelai mengandung sejumlah asam amino essensial (Marsman *et al.*, 1997). Kedelai mempunyai banyak manfaat, di antaranya dapat diolah menjadi bahan makanan alternatif dan minuman (Kinney, 2003) serta hidrolisat protein (Hrckova *et al.*, 2002; Subagio dkk., 2002; Barac *et al.*, 2006).

Hidrolisat protein kedelai berpotensi sebagai bumbu penyedap masakan pengganti MSG (*Monosodium Glutamate*). Meskipun diperkenankan sebagai penyedap masakan, penggunaan MSG yang berlebihan bisa mengakibatkan rasa pusing dan sedikit mual. Gejala itu disebut *Chinese Restaurant Syndrome* (Indriasari, 2006; Syarifah, 2006).

Hidrolisis secara enzimatik lebih menguntungkan dibanding secara kimiawi, karena dapat menghasilkan asam-asam amino bebas dan peptida dengan rantai pendek yang bervariasi. Hal ini sangat memungkinkan untuk memproduksi hidrolisat dengan flavor yang berbeda. Produk tersebut dapat digunakan pada industri makanan seperti penggunaan emulsi pada produk-produk daging, mi instan, soup, saus atau makanan ringan. Menurut Kunts (2000), bahwa hidrolisat protein mempunyai *range* aplikasi yang sangat luas terkait dengan sifat fungsional atau sifat nutrisinya.

Seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi pangan dewasa ini, peranan teknologi flavor dalam

mendukung pengembangan produk pangan sangat diperlukan. Penggunaan flavor berbasis reaksi Maillard merupakan solusi yang tepat sebagai *food additives* di dalam suatu produk pangan olahan yang memerlukan proses pemasakan dalam pembuatan atau penyajiannya (Kumara, 2006).

Melalui hidrolisis enzimatis suatu bahan pangan berprotein, maka akan dihasilkan asam-asam amino dan peptida-peptida pendek yang berperan sebagai prekursor terjadinya reaksi *Maillard*. Menurut terminologi flavor dari *International Organization of The Flavor Industry (IOFI)* dalam Kumara (2006), yang dimaksud dengan reaksi Maillard atau *flavor reaction* adalah suatu produk yang mempunyai karakteristik flavor yang dibuat melalui proses pemanasan ingredien-ingridien pangan atau ingredien lainnya yang boleh digunakan dalam bahan pangan.

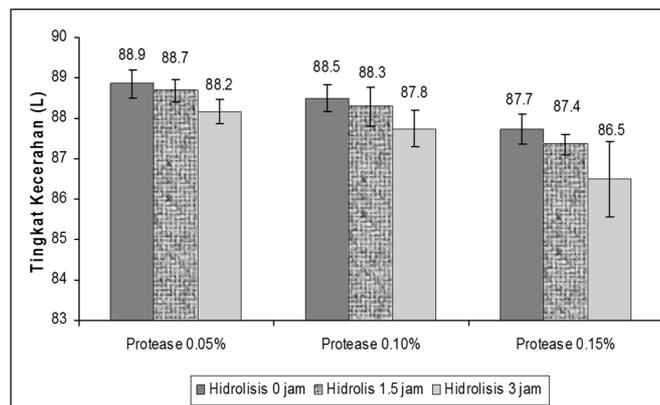
Reaksi Maillard yang menghasilkan flavor terbentuk dari 2 kategori prekursor, yakni komponen *water-soluble* dan *lipid*. Selama proses pemanasan, terjadi reaksi Maillard yang sangat kompleks dengan 3 reaksi yang dapat terjadi, yaitu (1) reaksi antara gula pereduksi dan asam amino, (2) *thermal degradation* dari lipid, dan (3) interaksi antara reaksi Maillard dengan *lipid derivatives* (Asthurst, 1995).

Witono dkk. (2007c) melaporkan hasil hidrolisis substrat kedelai secara enzimatis dilakukan menggunakan protease biduri (konsentrasi 0,05; 0,10 dan 0,15% dengan lama hidrolisis 0; 1,5 dan 3 jam). Kedelai direndam selama 24 jam, lalu direbus selama 10 menit untuk denaturasi protein, inaktivasi enzim lipoksigenase dan merusak tripsin inhibitor. Kemudian diblender dengan rasio bahan dan air = 1:2 (berat/berat). Suspensi kedelai yang dihasilkan ditambahkan enzim protease biduri dengan konsentrasi (0,05%, 0,1% dan 0,15%) (% berat dari kedelai rebus kupas). Kemudian pH diatur menjadi 7 dan dihidrolisis dalam

waterbath suhu 55 °C dengan waktu sesuai perlakuan (0 jam; 1,5 jam dan 3 jam), dididihkan selama 10 menit untuk menginaktifkan enzim. Ditambahkan 0,4 % CMC, 2 % gula dan 2 % garam (% berat dari kedelai rebus kupas) sambil terus diaduk sampai mengental. Setelah mengental dihamparkan dalam loyang dan dikeringkan dalam oven vakum suhu 40°C, tekanan 20 inHg selama 18 jam. Setelah kering diblender dan diayak 80 mesh. Hidrolisat kedelai yang dihasilkan diamati sifat fisik (warna), kimia (kadar protein terlarut, tingkat ketengikan dan produk Maillard) dan sifat organoleptik (warna, aroma dan rasa).

Warna (Tingkat Kecerahan)

Konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisis berpengaruh (α 0,05%) terhadap warna hidrolisat protein kedelai. Adapun histogram nilai warna hidrolisat protein kedelai pada berbagai variasi konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisisnya tertera pada Gambar 7.



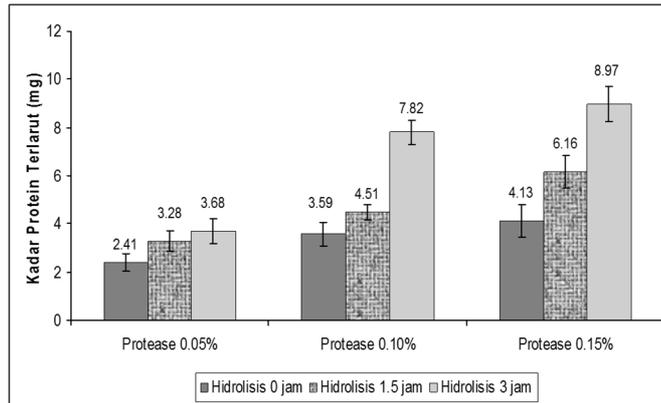
Gambar 7. Nilai Warna Hidrolisat Protein Kedelai pada berbagai Konsentrasi Protease Biduri dan Lama Hidrolisis

Gambar 7 menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi protease biduri sampai 0,15%, nilai warna hidrolisat protein kedelai yang dihasilkan semakin menurun, berarti warna yang terbentuk semakin gelap. Hal ini terjadi karena pada saat proses hidrolisis terjadi pemutusan ikatan peptida oleh enzim protease biduri menghasilkan gugus amina yang merupakan prekursor reaksi Maillard, dimana pada keadaan ini gugus amina protein bereaksi dengan gugus aldehyd atau keton dari gula reduksi, sehingga menghasilkan warna coklat. Semakin tinggi konsentrasi protease biduri yang digunakan, asam-asam amino sebagai prekursor Maillard semakin banyak, sehingga dihasilkan warna hidrolisat protein kedelai yang semakin gelap.

Demikian juga, semakin lama hidrolisis sampai 3 jam, maka nilai warna hidrolisat protein kedelai semakin rendah (semakin gelap). Hal ini karena semakin lama hidrolisis, nilai produk Maillard semakin tinggi, sehingga warna semakin gelap. Hasil serupa juga dilaporkan Subagio dkk. (2002) yaitu bahwa semakin lama inkubasi dengan enzim protease FlavourzymeTM, maka warna hidrolisat protein dari tempe kedelai yang dihasilkan semakin gelap.

Kadar Protein Terlarut

Konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisis berpengaruh (α 0,05%) terhadap kadar protein terlarut hidrolisat protein kedelai yang dihasilkan. Adapun histogram kadar protein dari hidrolisat protein kedelai pada berbagai variasi konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisisnya sebagaimana tertera pada Gambar 8.

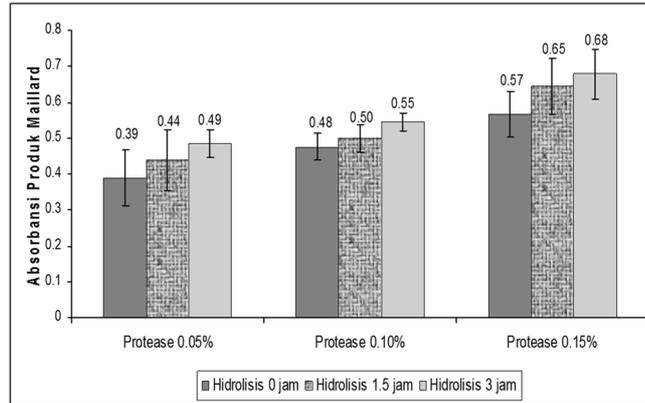


Gambar 8. Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Protein Kedelai pada Berbagai Konsentrasi Protease Biduri dan Lama Hidrolisis

Gambar 8 menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi protease biduri sampai 0,15% dan semakin lama waktu hidrolisis sampai 3 jam, kadar protein terlarut hidrolisat protein kedelai yang dihasilkan semakin meningkat. Hal ini dikarenakan semakin besar konsentrasi protease biduri sampai 0,15% dan semakin lama waktu hidrolisis sampai 3 jam, maka semakin banyak ikatan peptida dari protein yang terputus menjadi peptida dan asam-asam amino. Menurut Nielsen (1997) keberadaan peptida sederhana dan asam-asam amino dapat meningkatkan kelarutan protein. Semakin lama hidrolisis, kontak enzim dengan substrat semakin lama, sehingga dihasilkan asam-asam amino yang semakin banyak, yang pada akhirnya akan meningkatkan kelarutan produk hidrolisat. Sebagaimana juga dilaporkan oleh Hrcckova *et al.* (2002) bahwa jumlah asam amino bebas dari hidrolisis protein kedelai bebas lemak menggunakan protease selektif, juga meningkat seiring dengan lamanya waktu inkubasi.

Produk Maillard

Konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisis berpengaruh (α 0,05%) terhadap produk Maillard hidrolisat protein kedelai yang dihasilkan. Adapun histogram produk Maillard hidrolisat protein kedelai pada berbagai variasi konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisis sebagaimana tertera pada Gambar 9.



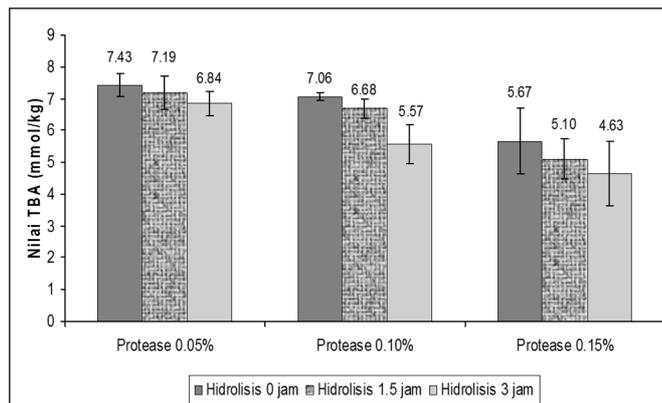
Gambar 9. Nilai Produk Maillard Hidrolisat Protein Kedelai pada Berbagai Konsentrasi Protease Biduri dan Lama Hidrolisis

Semakin besar konsentrasi protease biduri sampai 0,15%, nilai produk Maillard hidrolisat kedelai semakin tinggi. Hal ini terjadi karena dengan semakin banyaknya protease biduri yang digunakan sampai 0,15% dapat memperbanyak jumlah asam amino yang dihasilkan sebagai prekursor terjadinya reaksi dengan gula reduksi, dengan demikian produk Maillard yang dihasilkan juga semakin banyak. Karel *et al.* (1993) in Miao and Roos (2004) dan Miller and Gerrard (2005) menyatakan bahwa reaksi Maillard (*non enzymatic browning*) merupakan reaksi antara gugus karbonil dan gugus amina primer yang melibatkan reaksi kondensasi.

Gambar 9 juga menunjukkan bahwa semakin lama hidrolisis sampai 3 jam maka nilai produk Maillard hidrolisat protein kedelai yang dihasilkan semakin meningkat. Hal ini terjadi karena semakin lama hidrolisis sampai waktu inkubasi 3 jam, semakin banyak ikatan peptida yang terhidrolisis, sehingga semakin banyak pula gugus amina primer yang dihasilkan, dengan demikian reaksi Maillard yang terjadi semakin intensif. Subagio, dkk. (2002) melaporkan bahwa nilai absorban produk Maillard dari hidrolisat tempe kedelai meningkat sampai dengan 1,335 dengan waktu hidrolisis 1 sampai 2,5 jam. Semakin tinggi absorban berarti produk reaksi Maillard semakin tinggi.

Tingkat Ketengikan

Konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisis berpengaruh (α 0,05%) terhadap ketengikan hidrolisat kedelai yang dihasilkan. Histogram tingkat ketengikan hidrolisat kedelai pada berbagai variasi konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisisnya tertera pada Gambar 10.



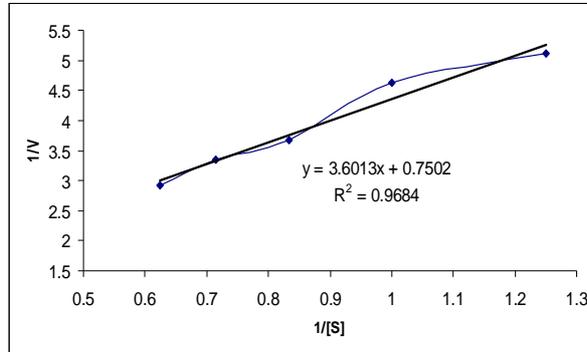
Gambar 10. Tingkat Ketengikan Hidrolisat Protein Kedelai pada Berbagai Konsentrasi Protease Biduri dan Lama Hidrolisis

Semakin besar konsentrasi protease biduri sampai 0,15%, maka tingkat ketengikan (nilai TBA) hidrolisat protein kedelai yang dihasilkan semakin menurun. Hal ini terjadi karena protease biduri yang digunakan masih mengandung komponen non enzim yang bersifat antioksidatif. Witono dkk. (2006) melaporkan, bahwa enzim protease biduri yang diekstrak secara langsung dari tanaman (daun dan batang) biduri berwarna hijau karena masih mengandung klorofil, sebagaimana enzim biduri yang digunakan sebagai sampel aplikasi ini. Menurut Dalimartha (2003) suatu protease kasar juga dapat mengandung saponin, flavonoid, polifenol, tanin dan kalsium oksalat. Klorofil, flavonoid dan polifenol merupakan antioksidan, maka semakin banyak konsentrasi enzim yang ditambahkan sampai 0,15%, diduga semakin banyak kandungan flavonoid dan polifenol pada hidrolisat protein kedelai, sehingga tingkat ketengikannya semakin kecil. Sifat antioksidatif dari protease biduri ini merupakan fenomena yang menarik untuk ditelaah lebih lanjut.

Gambar 10 juga menunjukkan bahwa semakin lama hidrolisis sampai waktu inkubasi 3 jam, maka semakin kecil tingkat ketengikan hidrolisat protein kedelai. Hal ini diduga karena dalam biji kedelai terdapat komponen antioksidatif. Erickson *et al.* (1980) menyatakan bahwa dalam biji kedelai mengandung fosfolipida dengan kadar sekitar 2 persen, juga mengandung *cephalin* yang berperan dalam meningkatkan aktivitas antioksidan. Oleh karena itu, semakin lama hidrolisis, fosfolipid yang terekstrak semakin banyak, yang berarti semakin meningkatkan aktivitas antioksidan dalam hidrolisat protein kedelai, sehingga tingkat ketengikan semakin menurun.

Laju Reaksi Enzim Protease Biduri pada Substrat Kedelai

Hubungan antara konsentrasi substrat dengan kecepatan awal reaksi menggunakan metode Lineweaver-Burk ditunjukkan pada Gambar 11.



Gambar 11. Hubungan Konsentrasi Substrat dan Kecepatan Awal Reaksi Menggunakan Metode Lineweaver-Burk

Berdasarkan Gambar 11 dapat ditentukan bahwa nilai V_{max} yang diperoleh sebesar 1,333 mg/ml/menit, sedangkan K_m -nya sebesar 4,801 gram. Apabila dihitung, untuk memperoleh kecepatan awal ($V_{max}/2$) sebesar 0,667 mg/ml/menit, maka 1 bagian enzim protease biduri dapat digunakan untuk menghidrolisis substrat kedelai sebesar 842,185 bagian. Hasil ini bila dibandingkan dengan hidrolisis protease biduri pada substrat kasein adalah lebih kecil. Hasil penelitian sebelumnya (Witono dkk, 2007a) menunjukkan bahwa untuk memperoleh kecepatan awal ($V_{max}/2$) sebesar 9,434 mg/ml/menit, 1 bagian enzim protease biduri dapat digunakan untuk menghidrolisis 1235,795 bagian substrat kasein.

Sifat Organoleptik

Konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisis berpengaruh (α 0,05%) terhadap tingkat kesukaan warna, aroma dan rasa hidrolisat protein kedelai. Adapun rata-rata nilai kesukaan warna, aroma dan rasa hidrolisat protein kedelai pada berbagai variasi konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisisnya tertera pada Tabel 4.

Tabel 4. Rata-rata Nilai Kesukaan Warna, Aroma dan Rasa Hidrolisat Protein Kedelai

Kombinasi Perlakuan	Warna	Aroma	Rasa
Protease 0,05%, hidrolisis 0 jam	3,36 \pm 0,99	3,00 \pm 0,71	2,72 \pm 0,84
Protease 0,05%, hidrolisis 1,5 jam	4,00 \pm 0,71	2,84 \pm 0,69	3,24 \pm 0,83
Protease 0,05%, hidrolisis 3 jam	4,20 \pm 0,71	2,60 \pm 0,96	3,20 \pm 0,65
Protease 0,10%, hidrolisis 0 jam	2,88 \pm 0,83	2,76 \pm 0,66	2,92 \pm 0,76
Protease 0,10%, hidrolisis 1,5 jam	3,68 \pm 1,03	3,04 \pm 0,89	3,04 \pm 0,79
Protease 0,10%, hidrolisis 3 jam	2,48 \pm 1,12	3,00 \pm 0,58	3,36 \pm 0,91
Protease 0,15%, hidrolisis 0 jam	2,52 \pm 0,77	2,56 \pm 0,58	3,12 \pm 0,78
Protease 0,15%, hidrolisis 1,5 jam	3,44 \pm 0,77	2,96 \pm 0,73	3,44 \pm 0,82
Protease 0,15%, hidrolisis 3 jam	3,36 \pm 0,64	3,12 \pm 0,83	3,20 \pm 0,87

Tabel 4 menunjukkan bahwa nilai kesukaan warna hidrolisat protein kedelai tertinggi terdapat pada konsentrasi protease 0,05 % dan lama hidrolisis 3 jam dengan nilai 4,20 \pm 0,71 (suka sampai sangat suka). Sedangkan nilai kesukaan warna hidrolisat protein kedelai terendah diperoleh

pada perlakuan konsentrasi protease 0,1 % dan lama hidrolisis 3 jam yakni sebesar $2,48 \pm 1,12$ (tidak suka sampai agak suka). Jadi warna hidrolisat protein kedelai yang disukai adalah yang tidak terlalu cerah.

Adapun nilai kesukaan aroma hidrolisat protein kedelai tertinggi terdapat pada perlakuan konsentrasi protease 0,15 % dan lama hidrolisis 3 jam dengan nilai $3,12 \pm 0,83$ (agak suka sampai suka). Sedangkan nilai kesukaan aroma hidrolisat protein kedelai terendah diperoleh pada perlakuan konsentrasi enzim 0,15 % dan lama hidrolisis 0 jam yakni sebesar $2,56 \pm 0,58$ (tidak suka sampai agak suka). Hal ini diduga karena hidrolisis protein akan mengakibatkan terjadinya perubahan flavor yang disebabkan oleh terbentuknya asam amino terutama asam glutamat bebas yang berperan dalam pembentukan flavor gurih pada hidrolisat protein kedelai yang dihasilkan. Di samping itu aroma juga disebabkan oleh adanya produk Maillard. Aroma dapat terbentuk dari gula yang ditambahkan, asam amino bebas, peptida-peptida, nukleotida dan asam-asam organik yang berperan sebagai prekursor utama dalam pembentukan flavor gurih pada hidrolisat yang dihasilkan. Selain itu, dengan adanya reaksi Maillard menyebabkan perubahan flavor yang khas pada suatu produk pangan.

Nilai kesukaan rasa hidrolisat protein kedelai tertinggi terdapat pada perlakuan konsentrasi protease biduri 0,15 % dan lama hidrolisis 1,5 jam dengan nilai $3,44 \pm 0,82$ (agak suka sampai suka). Sedangkan nilai kesukaan rasa hidrolisat protein kedelai terendah diperoleh pada perlakuan konsentrasi enzim 0,05 % dan lama hidrolisis 0 jam sebesar $2,72 \pm 0,84$ (tidak suka sampai agak suka). Hal ini karena rasa gurih yang terbentuk dari peptida-peptida rantai pendek dan asam amino hasil hidrolisis serta rasa dari produk Maillard yang dihasilkan memberikan skor rasa disukai, akan tetapi perlakuan protease biduri 0,15% dengan lama

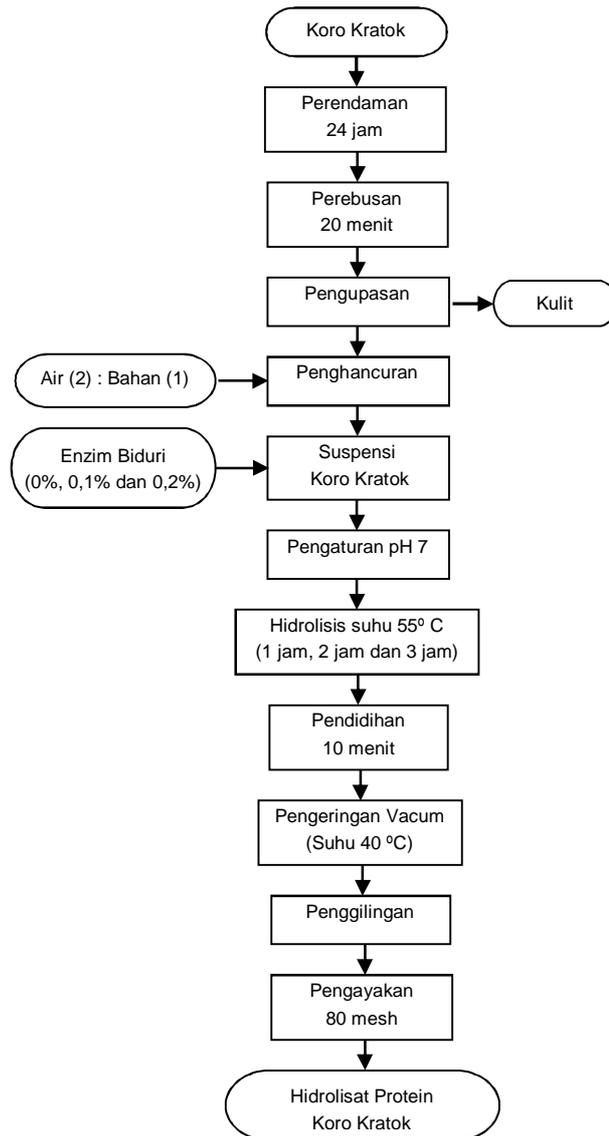
hidrolisis 3 jam menunjukkan nilai kesukaan rasa di bawah perlakuan protease biduri 0,15% dengan hidrolisis 1,5 jam. Hal ini diduga proses hidrolisis yang berlebihan akan menghasilkan rasa pahit. Sebagaimana dinyatakan oleh Nielsen (1997), apabila derajat hidrolisis mencapai kondisi dimana hidrophobik peptida terekspos, maka akan menimbulkan rasa pahit.

Perlakuan Terbaik

Berdasarkan uji efektifitas (Degarmo *et al.*, 1984) menunjukkan bahwa hidrolisat protein kedelai terbaik dihasilkan pada perlakuan konsentrasi enzim 0,15 % dan lama hidrolisis 1,5 jam yang mempunyai kadar protein terlarut 6,16 mg/ml, tingkat ketengikan (nilai TBA) 5,10 mmol/kg, nilai produk Maillard 0,65, nilai warna (tingkat kecerahan) 87,35, nilai kesukaan warna 3,44 (agak suka-suka), nilai kesukaan aroma 2,96 (tidak suka-agak suka) dan nilai kesukaan rasa 3,44 (agak suka-suka).

Hidrolisis Protease Biduri pada Substrat Koro Kratok

Hidrolisis protein koro kratok secara enzimatis menggunakan protease biduri (konsentrasi 0,00; 0,10 dan 0,15% dengan lama hidrolisis 1, 2 dan 3 jam). Adapun parameter hidrolisat koro kratok yang diamati meliputi: kadar air, kadar protein terlarut, produk maillard, tingkat ketengikan dan laju reaksi. Diagram alir hidrolisis protease biduri pada substrat koro kratok sebagaimana tertera pada Gambar 12.



Gambar 12. Diagram Alir Uji Hidrolisis Substrat Koro Kratok

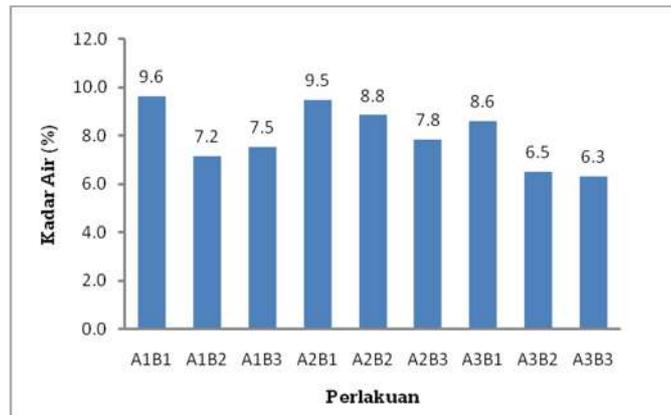
Koro kratok direndam selama 24 jam, lalu direbus selama 20 menit untuk memudahkan hidrolisis, menginaktifkan enzim lipoksigenase dan merusak tripsin inhibitor, kemudian digiling dengan ditambahkan air dengan perbandingan air : bahan = 2 : 1 (berat/berat).

Suspensi koro kratok yang dihasilkan ditambahkan enzim protease biduri dengan konsentrasi (0; 0,1 %; dan 0,2 %) (% berat dari koro kratok rebus kupas). Kemudian pH diatur menjadi 7 dan dihidrolisis dalam waterbath suhu 55 °C dengan waktu sesuai perlakuan (1 jam, 2 jam dan 3 jam), dididihkan selama 10 menit untuk menginaktifkan enzim dan dikeringkan dalam oven vacum dengan suhu 40 °C. Setelah kering dilakukan penggilingan dengan menggunakan Blender stainless steel dan diayak menggunakan ayakan 80 mesh. Diagram alir penelitian pembuatan hidrolisat koro kratok dapat dilihat pada Gambar 12.

Uji hidrolisis substrat koro kratok menggunakan Rancangan Acak Kelompok Faktorial dengan dua faktor, yaitu faktor A (konsentrasi enzim biduri) terdiri dari 3 level (A1= 0%, A2= 0,1% dan A3= 0,15%) dan faktor B (lama hidrolisis) terdiri dari 3 level (B1= 1 jam, B2= 2 jam dan B3= 3 jam).

Kadar Air

Histogram kadar air hidrolisat protein koro kratok pada berbagai konsentrasi enzim biduri dan lama hidrolisis dapat dilihat pada Gambar 13.



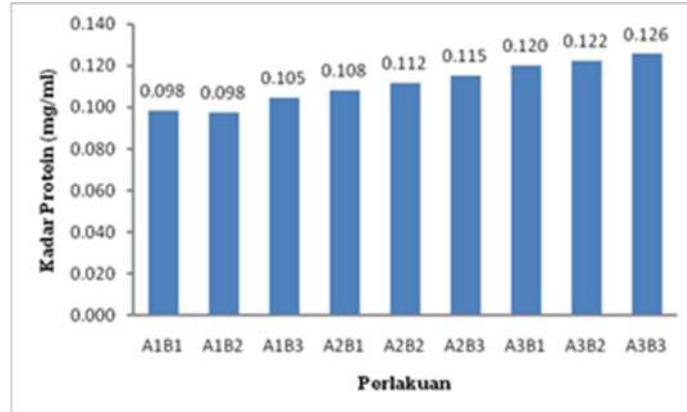
Gambar 13. Kadar Air Hidrolisat Protein Koro Kratok pada Berbagai Konsentrasi Enzim Biduri dan Lama Hidrolisis

Gambar 13 menunjukkan bahwa kadar air terendah (6,31 %) dihasilkan pada perlakuan A3B3 (konsentrasi enzim 0,2 % dan lama hidrolisis 3 jam), sedangkan kadar air tertinggi (9,63 %) dihasilkan pada perlakuan A1B1 (konsentrasi enzim 0% dan lama hidrolisis 1 jam). Semakin besar konsentrasi enzim biduri maka kadar air hidrolisat protein koro kratok yang dihasilkan semakin menurun. Hal ini disebabkan semakin banyak konsentrasi enzim protease biduri yang ditambahkan maka semakin banyak ikatan peptida dari protein yang terputus menjadi molekul yang lebih sederhana (Winarno, 1995), sehingga kemampuan protein untuk mengikat air semakin kecil.

Demikian halnya dengan pengaruh lama hidrolisis, juga terlihat bahwa semakin lama hidrolisis maka kadar air hidrolisat protein koro kratok yang dihasilkan semakin kecil. Hal ini karena semakin lama waktu hidrolisis, maka tingkat hidrolisis protein juga semakin tinggi, sehingga semakin kecil kemampuan protein untuk mengikat air.

Kadar Protein Terlarut

Kadar protein terlarut hidrolisat protein koro kratok pada berbagai konsentrasi enzim biduri dan lama hidrolisis sebagaimana tertera pada Gambar 14.



Gambar 14. Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Protein Koro Kratok pada berbagai Konsentrasi Enzim Biduri dan Lama Hidrolisis

Gambar 14 terlihat bahwa kadar protein terlarut terendah (0,098 mg/ml) terdapat pada perlakuan A1B1 (konsentrasi enzim 0 % dan lama hidrolisis 1 jam) dan perlakuan A1B2 (konsentrasi enzim 0 % dan lama hidrolisis 2 jam). Sedangkan kadar protein terlarut tertinggi (0,126 mg/ml) terdapat pada perlakuan A3B3 (konsentrasi enzim 0,2 % dan lama hidrolisis selama 3 jam). Semakin besar konsentrasi enzim biduri maka kadar protein terlarut hidrolisat koro kratok yang dihasilkan semakin meningkat. Hal ini dikarenakan semakin besar konsentrasi enzim protease biduri yang ditambahkan maka reaksi enzim yang terjadi semakin cepat. Menurut Nielsen (1997) semakin banyak ikatan peptida pada protein yang terputus menjadi peptida-peptida sederhana, maka kelarutan protein semakin meningkat.

Lama hidrolisis juga menyebabkan peningkatan kadar protein terlarut hidrolisat protein koro kratok. Hal ini terjadi karena semakin lama hidrolisis kontak enzim dengan substrat semakin lama, sehingga tingkat hidrolisis semakin tinggi dan dihasilkan molekul-molekul protein yang pendek sehingga kelarutannya meningkat. Hasil ini sesuai dengan Sarofah (2004) bahwa semakin lama hidrolisis kadar protein terlarut cenderung meningkat.

Produk Maillard

Nilai produk maillard hidrolisat protein koro kratok berkisar antara 0,292-0,913. Adapun histogram nilai produk maillard hidrolisat protein koro kratok pada berbagai konsentrasi enzim biduri dan lama hidrolisisnya dapat dilihat pada Gambar 15. Nilai produk maillard terendah (0,292) terdapat pada perlakuan A1B3 (konsentrasi enzim biduri 0 % dan lama hidrolisis 3 jam), sedangkan nilai produk maillard tertinggi (0,913) terdapat pada perlakuan A3B3 (konsentrasi enzim 0,2 % dan lama hidrolisis selama 3 jam).



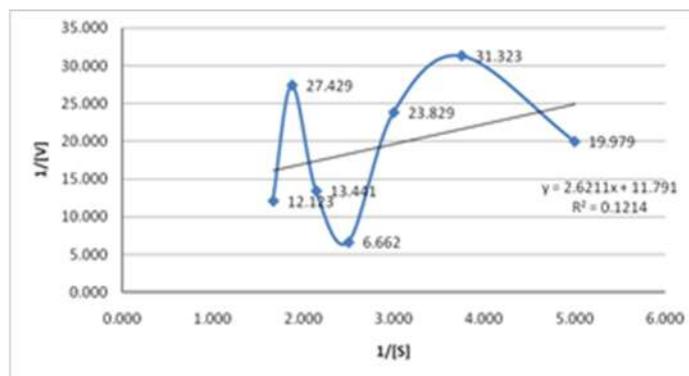
Gambar 15. Nilai Produk Maillard Hidrolisat Protein Koro Kratok pada berbagai Konsentrasi Enzim Biduri dan Lama Hidrolisis

Pengaruh penambahan enzim menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi enzim biduri maka nilai produk maillard hidrolisat protein koro kratok yang dihasilkan semakin tinggi. Hal ini terjadi karena semakin banyak enzim protease biduri yang digunakan maka kecepatan reaksi enzim semakin tinggi, yang berarti semakin banyak ikatan peptida yang dihidrolisis dengan demikian gugus amina primer yang dihasilkan semakin banyak. Reaksi maillard merupakan reaksi antara gugus karbonil dan gugus amina primer (Heath dan Reineccius, 1986). Dengan demikian semakin banyak konsentrasi enzim, reaksi maillard yang terjadi semakin intensif.

Pengaruh lama hidrolisis juga menunjukkan bahwa semakin lama hidrolisis maka nilai produk maillard hidrolisat protein koro kratok yang dihasilkan semakin meningkat. Hal ini karena semakin lama hidrolisis maka semakin banyak ikatan peptida yang terhidrolisis, sehingga semakin banyak pula gugus amina primer yang dihasilkan dengan demikian reaksi maillard yang terjadi semakin intensif. Hasil ini sesuai dengan Sarofah (2004) bahwa makin lamanya waktu hidrolisis mengakibatkan semakin banyak peptida-peptida yang terpotong sehingga akan mempertinggi jumlah gugus amina primer, maka intensitas reaksi maillard yang terbentuk akan semakin tinggi.

Laju Reaksi Enzim Protease Biduri pada Substrat Koro Kratok

Hubungan antara konsentrasi substrat dengan kecepatan awal reaksi menggunakan metode Lineweaver-Burk ditunjukkan pada Gambar 16.



Gambar 16. Hubungan Konsentrasi Substat dan Kecepatan Awal Reaksi dengan Menggunakan Metode Lineweaver-Burk

Berdasarkan hasil perhitungan yang merujuk Gambar 16 diperoleh bahwa nilai V_{\max} adalah sebesar 0,085 mg/ml/menit sedangkan K_m sebesar 0,223.

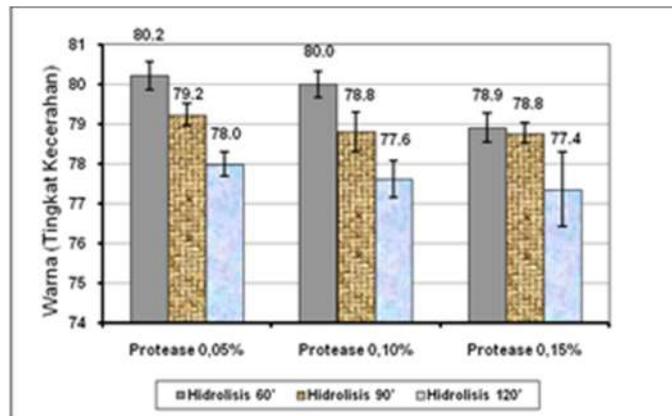
Hidrolisis Protease Biduri pada Substrat Ayam Kampung

Witono dan Windrati (2009) juga telah menguji hidrolisis substrat ayam kampung. Dilakukan dengan menelaah faktor-faktor utama yang berperan selama proses pembuatan hidrolisat ayam kampung. Faktor-faktor yang dimaksud meliputi: (1) konsentrasi protease biduri dan (2) lama hidrolisisnya. Parameter utama yang diamati adalah warna (tingkat kecerahan), kadar protein terlarut (Waterborg and Matthews, 1996) dan produk Maillard (Hofmann *et al.*, 1999). Hasil dari penelitian ini akan digunakan sebagai dasar untuk pengembangan teknologi formulasi dan produksi flavor enhancer dari ayam kampung berbasis hidrolisis enzimatik dengan memanfaatkan aktivitas proteolitik dari enzim biduri.

Ayam kampung dipisahkan dari bulu, tulang, organ dalam dan kepala, lalu dicuci, diambil sampel dan diblender bersama aquades dengan perbandingan (bahan : air = 1:2).

Suspensi ayam kampung ditambahkan enzim biduri dengan konsentrasi 0,05; 0,10 dan 0,15% (% berat dari daging ayam kampung). Kemudian dihidrolisis dalam waterbath pada suhu 55°C dengan lama inkubasi sesuai perlakuan (60, 90 dan 120 menit). Selanjutnya dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit. Setelah disaring lalu dipanaskan kembali pada suhu 100°C selama 15 menit. Lalu diamati kadar protein terlarut dan produk Maillard dari hidrolisat protein ayam kampung.

Histogram tingkat kecerahan hidrolisat ayam kampung pada berbagai variasi konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisisnya sebagaimana tertera pada Gambar 17.



Gambar 17. Tingkat Kecerahan Hidrolisat Ayam Kampung pada Berbagai Konsentrasi Protease Biduri dan Lama Hidrolisisnya

Gambar 17 menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi protease biduri sampai 0,15%, maka nilai warna hidrolisat ayam kampung yang dihasilkan semakin menurun, berarti warna yang terbentuk semakin gelap. Hal ini terjadi karena pada saat proses hidrolisis terjadi pemutusan ikatan peptida oleh enzim protease biduri menghasilkan gugus amina yang merupakan prekursor reaksi Maillard, dimana

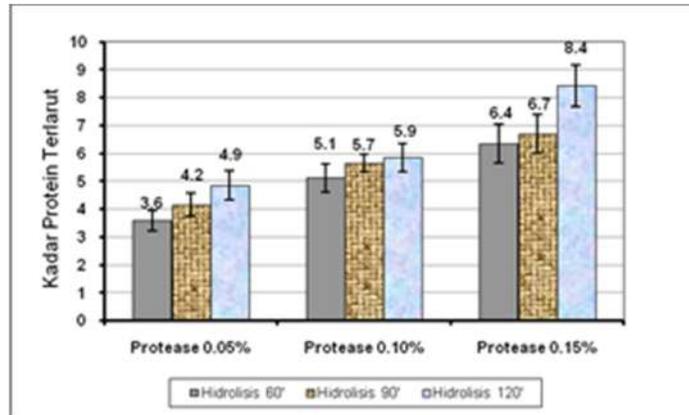
pada keadaan ini gugus amina protein bereaksi dengan gugus aldehid atau keton dari gula reduksi, sehingga menghasilkan warna coklat. Semakin tinggi konsentrasi protease biduri yang digunakan, asam-asam amino sebagai prekursor maillard semakin banyak, sehingga dihasilkan warna hidrolisat protein ayam kampung yang semakin gelap.

Demikian juga, semakin lama hidrolisis sampai 120 menit, maka nilai warna hidrolisat ayam kampung semakin rendah (semakin gelap). Hal ini karena semakin lama hidrolisis, produk Maillard semakin tinggi, sehingga warna semakin gelap. Hasil serupa juga dilaporkan sebelumnya bahwa semakin lama inkubasi dengan enzim protease biduri, maka warna hidrolisat dari protein kedelai yang dihasilkan semakin gelap.

Konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisis berpengaruh terhadap kadar protein terlarut hidrolisat ayam kampung yang dihasilkan. Adapun histogram perubahan kadar protein terlarut hidrolisat ayam kampung pada berbagai variasi konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisisnya sebagaimana tertera pada Gambar 18.

Gambar 18 menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi protease biduri sampai 0,15% dan semakin lama waktu hidrolisis sampai 120 menit, kadar protein terlarut hidrolisat ayam kampung yang dihasilkan semakin meningkat. Hal ini dikarenakan semakin besar konsentrasi protease biduri sampai 0,15% dan semakin lama waktu hidrolisis sampai 120 menit, maka semakin banyak ikatan peptida dari protein yang terputus menjadi peptida dan asam-asam amino. Menurut Nielsen (1997) keberadaan peptida sederhana dan asam-asam amino dapat meningkatkan kelarutan protein. Semakin lama hidrolisis, kontak enzim dengan substrat semakin lama, sehingga dihasilkan asam-asam amino yang semakin banyak, yang

pada akhirnya akan meningkatkan kelarutan produk hidrolisat. Sebagaimana juga dilaporkan oleh Hrcckova *et al.* (2002) bahwa jumlah asam amino bebas dari hidrolisis protein kedelai bebas lemak menggunakan protease selektif, juga meningkat seiring dengan lamanya waktu inkubasi.

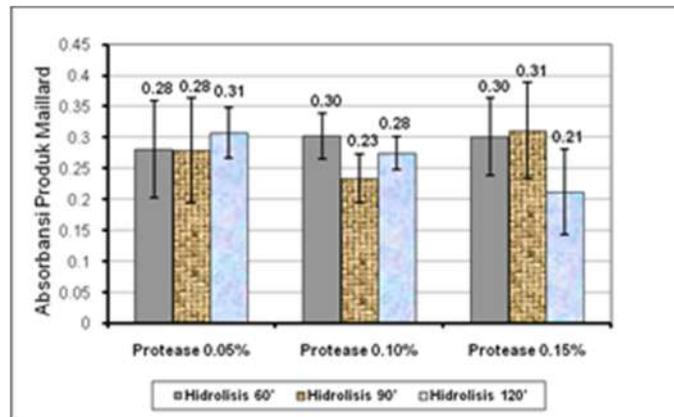


Gambar 18. Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Ayam Kampung pada Berbagai Konsentrasi Protease Biduri dan Lama Hidrolisisnya

Histogram produk Maillard hidrolisat ayam kampung pada berbagai variasi konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisisnya sebagaimana tertera pada Gambar 19.

Konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisisnya berpengaruh terhadap produk Maillard hidrolisat ayam kampung, walau pengaruhnya tidak konsisten. Semakin besar konsentrasi protease biduri sampai 0,15% (terutama pada lama hidrolisis 60 dan 90 menit), maka nilai produk Maillard hidrolisat ayam kampung yang dihasilkan semakin tinggi. Hal ini terjadi karena dengan semakin banyaknya enzim protease biduri yang digunakan sampai 0,15%, maka semakin memperbanyak jumlah asam amino yang dihasilkan sebagai prekursor terjadinya reaksi dengan gula reduksi, dengan demikian produk Maillard yang dihasilkan juga

semakin banyak. Karel *et al.* (1993) in Miao and Roos (2004) dan Miller and Gerrard (2005) menyatakan bahwa reaksi Maillard (*non enzymatic browning*) merupakan reaksi antara gugus karbonil dan gugus amina primer yang melibatkan reaksi kondensasi.



Gambar 19. Produk Maillard dari Hidrolisat Ayam Kampung pada Berbagai Konsentrasi Protease Biduri dan Lama Hidrolisis

Gambar 19 menunjukkan bahwa lama hidrolisis sampai 120 menit tidak menunjukkan perubahan yang konsisten terhadap nilai produk Maillard hidrolisat ayam kampung, sebagian meningkat tetapi sebagian lainnya justru terjadi penurunan. Hal ini diduga karena tidak semua protein terlarut maupun asam-asam amino hasil hidrolisis berpotensi sebagai prekursor reaksi Maillard. Fenomena yang sama dihasilkan dari hidrolisis enzim biduri pada substrat ikan bandeng (Witono, 2007), beberapa komponen prekursor reaksi Maillard diduga rusak atau hilang selama pemanasan. Kumara (2006) menyatakan bahwa, dalam proses panas selain terbentuk komponen-komponen flavor, pada kenyataannya ada beberapa komponen yang hilang atau

menurun (*off-flavor*) selama reaksi berjalan. Sehingga dalam suatu reaksi maillard kadang diperlukan kehadiran komponen tambahan dari luar.

Hidrolisis Protease Biduri pada Substrat Ikan Inferior (Bernilai Ekonomi Rendah)

Witono dkk. (2014) telah melakukan uji hidrolisis untuk melakukan optimasi produksi hidrolisat protein dari ikan yang bernilai ekonomi rendah yang didapat dari Pulau Talango, Madura. Ikan tersebut meliputi 'bibisan' (*Apogon albimaculosus*), 'baji-baji' (*Platycephalidae cymbacephalus*), dan 'lidah' (*Cynoglossus lingua*). Produksi hidrolisat protein dari ikan ini dilakukan dengan hidrolisis menggunakan enzim protease dari tanaman biduri (*Calotropis gigantea*). Perlakuan dengan protease dari tanaman biduri dilakukan pada berbagai konsentrasi enzim (0; 0,7; 1,4; and 2,1 Unit/g) dan waktu hidrolisis (0; 1,5; dan 3 jam). Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan dua perlakuan dan diulang sebanyak tiga kali.

Variabel yang diamati meliputi warna metode Hutching (1994) menggunakan *colour reader* (Minolta) yang menghasilkan nilai atribut L, a, dan b. Nilai °Hue dihitung dari nilai a dan b yang diperoleh menggunakan persamaan °Hue = $\text{arc tan}(a/b)$. Kadar protein terlarut menggunakan metode Lowry (1951) dalam Walker (2002) dengan modifikasi, tingkat ketengikan menggunakan metode TBA dengan modifikasi (Subagio dkk. 2002), dan nilai produk maillard (Hofmann *et al.* 1999). Analisa data menggunakan analisa ragam (ANOVA) dan jika terdapat perbedaan nyata dilanjutkan dengan uji Tukey pada taraf 5% untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

Kadar Protein Terlarut

Optimasi perlakuan dalam penelitian ini dilakukan berdasarkan hasil analisis kadar protein terlarut. Uji lanjut Tukey (Tabel 5) menunjukkan bahwa hidrolisis 0 jam menggunakan protease biduri 0,7 Unit/g tidak terdapat perbedaan nyata, sedangkan perbedaan nyata ditunjukkan pada konsentrasi enzim 1,4 Unit/g dan 2,1 Unit/g. Perlakuan 2,1 Unit/g menghasilkan kadar protein terlarut tertinggi yang menunjukkan perbedaan nyata jika dibandingkan perlakuan lainnya, sedangkan penambahan enzim 0,7 Unit/g dan 1,4 Unit/g tidak menunjukkan perbedaan nyata. Hal ini mengindikasikan bahwa protease biduri dapat bekerja pada suhu ruang sesaat setelah ditambahkan pada substrat, walaupun kondisi optimal kerjanya pada suhu 55°C. Protease biduri termasuk dalam golongan eksopeptidase yang terdiri dari karboksi-ekso-peptidase yang memotong peptida dari arah gugus karboksil terminal dan amino-eksopeptidase dari gugus terminal (Mubarik dkk., 2000). Hidrolisis menggunakan konsentrasi enzim 2,1 Unit/g dan waktu inkubasi 1,5 jam merupakan perlakuan terbaik dengan kadar kelarutan protein tertinggi sebesar 3,509%. Penelitian lain (Koesoemawardani dkk., 2011) dalam pembuatan ikan rucah menggunakan enzim papain 5% dan waktu inkubasi 1 jam menghasilkan kadar protein terlarut sebesar 12,53%.

Enzim protease mampu menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Faktor-faktor yang mempengaruhi proses hidrolisis meliputi rasio enzim dan substrat, perbedaan jenis enzim, pH, waktu dan suhu hidrolisis (Dumay *et al.*, 2006). Hidrolisis protein ikan menggunakan protease dari tanaman dan mikroba lebih sesuai untuk menghasilkan HPI jika dibandingkan protease dari hewan (Bhaskar *et al.*, 2008). Enzim protease biduri diindikasikan secara kuat termasuk dalam golongan eksopeptidase yang mampu menghasilkan fragmen peptida dan asam amino sehingga sesuai untuk

produksi *flavour enhancer* (Witono and Kang, 2010). Hidrolisis menggunakan enzim protease lainnya dari golongan endopeptidase hanya mampu menghasilkan fragmen peptida (Kaneda *et al.*, 1997) sehingga kurang sesuai digunakan dalam produksi *flavour enhancer*.

Tabel 5. Kadar protein terlarut pada HPI dari ikan bernilai ekonomi rendah dengan konsentrasi enzim protease biduri dan waktu hidrolisis yang berbeda

Waktu (jam)	Konsentrasi Enzim (Unit/g)	Protein terlarut (%)
0	0	2,244±0,009 ^a
0	0,7	2,405±0,299 ^a
0	1,4	3,017±0,045 ^{bc}
0	2,1	3,034±0,082 ^{bc}
1,5	0	2,384±0,211 ^a
1,5	0,7	3,046±0,040 ^{bc}
1,5	1,4	3,248±0,047 ^{cd}
1,5	2,1	3,509±0,055 ^d
3	0	2,534±0,269 ^a
3	0,7	2,685±0,055 ^{ab}
3	1,4	3,261±0,246 ^{cd}
3	2,1	3,436±0,078 ^{cd}

*Huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata antar perlakuan berdasarkan hasil uji lanjut Tukey pada taraf 5%.

Perubahan konsentrasi enzim protease biduri berbanding lurus dengan perubahan kadar protein terlarut dalam hidrolisat yang dihasilkan. Hal ini dikarenakan enzim protease mendegradasi protein menjadi peptida pendek dan asam amino yang mudah larut. Rasio enzim : substrat (konsentrasi enzim) berbanding lurus dengan derajat hidrolisis. Peningkatan enzim protease meningkatkan jumlah nitrogen terlarut dari hidrolisat selama proses hidrolisis (Jin

et al. 2007). Dalam penelitian ini konsentrasi enzim terbesar (2,1 Unit/g) merupakan perlakuan terbaik dengan kadar protein terlarut tertinggi. Hal ini didukung oleh penelitian Bhaskar *et al.* (2008), yang menyebutkan bahwa enzim protease dari jenis *alcalase* dapat bekerja optimal menghidrolisis protein limbah jeroan pada konsentrasi 1,5% dan dinyatakan pada konsentrasi ini derajat hidrolisis memasuki fase stasioner. Penelitian hidrolisis ikan rucah menggunakan enzim papain yang dilakukan oleh Koesoemawardani dkk. (2011) mendapatkan kondisi optimal pada konsentrasi enzim 5%. Penggunaan enzim di atas jumlah optimal tidak memberi pengaruh terhadap kadar protein terlarut karena selama proses tidak ada penambahan substrat dan substrat yang tersedia sudah habis digunakan selama proses hidrolisis.

Kadar protein terlarut hidrolisat juga dipengaruhi oleh waktu hidrolisis. Hidrolisis pada saat 0 jam dilakukan untuk mengetahui pengaruh penambahan enzim sesaat setelah ditambahkan pada substrat. Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan kadar protein terlarut dengan adanya peningkatan konsentrasi enzim. Hal ini mengindikasikan enzim protease biduri dapat bekerja pada suhu ruang sesaat setelah ditambahkan pada substrat. Peningkatan lama hidrolisis dari 0 jam ke 1,5 jam berpengaruh terhadap kenaikan kadar protein terlarut pada seluruh perlakuan. Haslaniza *et al.* (2010) menyatakan bahwa semakin lama waktu hidrolisis, aktivitas proteolisis meningkatkan degradasi protein semakin luas dan dihasilkan derajat hidrolisis yang lebih tinggi sehingga kadar protein terlarut semakin besar pula. Hal berbeda terjadi pada peningkatan lama hidrolisis dari 1,5 jam ke 3 jam yang menunjukkan penurunan yang tidak berbeda nyata, kecuali pada perlakuan konsentrasi enzim 0 Unit/g yang tetap menunjukkan adanya peningkatan. Penurunan kadar protein terlarut pada

hidrolisis selama 3 jam diduga karena semakin lama hidrolisis, lebih banyak asam amino non polar terbentuk seperti glisin, alanin, valin, leusin, isoleusin dan prolin dari fragmen peptida-peptida larut air. Secara umum penambahan lama hidrolisis dari kondisi optimal tidak memberikan pengaruh terhadap nilai protein terlarut dalam hidrolisat karena selama proses tidak ada penambahan substrat dan substrat yang tersedia sudah habis digunakan (Koesoemawardhani dkk., 2011).

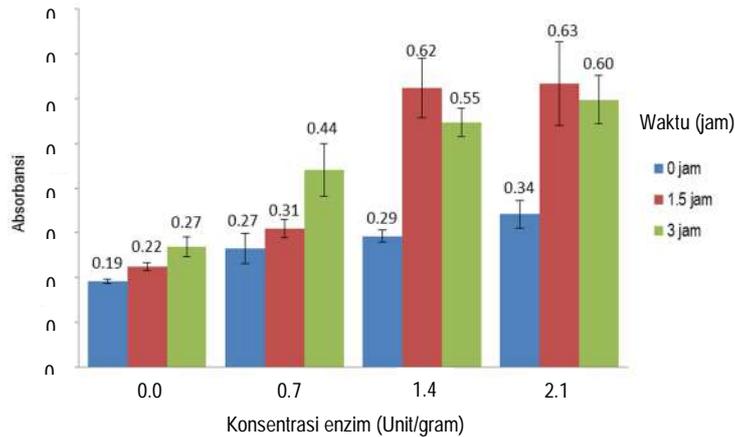
Kelarutan yang tinggi dari HPI pada berbagai pH dapat diaplikasikan pada produk pangan. Selain itu, hal ini mempengaruhi komponen fungsional HPI lainnya seperti sebagai pengemulsi dan komponen buih (Gbogouri *et al.*, 2004). HPI yang didapat melalui hidrolisis enzimatis terkontrol memiliki komponen nutrisi yang baik seperti keseimbangan komposisi asam amino dan kelarutan yang tinggi, tetapi utamanya digunakan untuk nutrisi hewan (Nolsoe and Undeland, 2009).

Nilai Produk Maillard

Reaksi maillard (*browning non enzymatic*) merupakan reaksi antara gugus karbonil dan gugus amina primer yang melibatkan reaksi kondensasi (Miao and Roos, 2004). Salah satu aplikasi produk maillard dalam bidang pangan adalah pembentukan flavour yang dihasilkan dari reaksi antara gula reduksi dan senyawa-senyawa amino untuk membentuk glikosamin (Mottram, 1998). Gugus amino residu lisin yang terikat pada peptida dan protein berperan penting dalam reaksi disebabkan kereaktifannya yang tinggi. Selain itu gugus α -amino terminal juga berperan dalam reaksi maillard.

Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi protease biduri dan waktu hidrolisis berpengaruh nyata ($\alpha=0,05$) terhadap nilai absorbansi produk maillard HPI dari ikan bernilai ekonomi rendah (Gambar 20). Semakin besar

konsentrasi protease biduri dan semakin lama hidrolisis, maka nilai produk maillard dari HPI yang dihasilkan semakin tinggi. Hasil ini didukung oleh hasil penelitian Subagio dkk. (2002) yang menunjukkan bahwa nilai absorban produk maillard dari hidrolisat tempe kedelai meningkat seiring dengan semakin lamanya waktu hidrolisis.



Gambar 20. Nilai produk maillard HPI dari ikan bernilai ekonomi rendah pada berbagai konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisis. Nilai dinyatakan dalam rata-rata \pm standard deviasi.

Lisin adalah jenis asam amino yang paling reaktif bereaksi dengan gula reduksi, sedangkan sistein adalah asam amino yang paling tidak reaktif. Residu lisin protein pada awal reaksi berikatan dengan gula reduksi membentuk senyawa turunan deoksiketosil-lisin sebagai laktulosil-lisin. Pada tahap selanjutnya, senyawa laktulosil-lisin terdekomposisi menghasilkan pramelanoidin yang dapat bereaksi dengan asam amino lain pada rantai samping protein yang berakibat terhadap kerusakan beberapa jenis

asam amino esensial dan terbentuknya ikatan silang antar rantai protein (Hurrell *et al.*, 1979).

Assoumani *et al.* (1994) menyatakan bahwa jumlah asam amino yang berkurang selama berlangsungnya reaksi maillard juga dipengaruhi oleh jenis gulanya. Fruktosa adalah gula yang sangat reaktif, sehingga memberikan efek kehilangan asam amino yang cukup besar dibandingkan jenis gula lainnya. Setelah fruktosa, sifat kereaktifan gula selanjutnya dari yang terbesar berturut-turut adalah glukosa, galaktosa, mannose, arabinose, xilosa dan ribose.

Warna

Perbandingan nilai a dan b dapat diinterpretasikan dalam nilai °Hue [$\arctan(b/a)$]. Nilai °Hue dari semua perlakuan (Tabel 6) antara 74,1-74,7 yang termasuk kategori warna kuning kemerahan. dan tidak terdapat perbedaan nyata warna antar perlakuan. Dari hasil penelitian menunjukkan perlakuan konsentrasi enzim dan lama hidrolisis dapat menyebabkan warna HPI lebih gelap walaupun tidak berbeda nyata. Warna yang lebih gelap pada HPI ini terjadi karena pada saat proses hidrolisis terjadi pemutusan ikatan peptida oleh enzim protease menghasilkan gugus amina yang merupakan bahan pereaksi maillard, dimana pada keadaan ini gugus amina protein berikatan dengan gugus aldehid atau keton dari gula pereduksi sehingga terbentuk polimer nitrogenous berwarna coklat atau yang disebut melanoidin (deMan, 1999).

Faktor rasio gula terhadap asam amino berpengaruh secara nyata terhadap reaksi pembentukan warna. Makin meningkatnya jumlah asam amino pada produk hidrolisis enzim menyebabkan makin banyak terjadi pembentukan warna. Gugus karbonil dari gula reduksi dan gugus asam amino bebas merupakan komponen penting dalam reaksi maillard. Asam amino lisin adalah jenis asam amino yang

paling cepat menghasilkan warna yang disebabkan oleh gugus karbonil pada asam amino ini sangat reaktif. Sebaliknya asam amino sistein paling lambat menghasilkan warna. Oleh karena itu bahan pangan yang mengandung asam amino lisin akan lebih mudah menjadi cokelat.

Tidak adanya perbedaan warna perlakuan dalam penelitian dapat disebabkan karena ikan tidak mengandung karbohidrat (Ahmed *et al.*, 2012) sehingga menurunkan potensi terjadinya reaksi maillard berlebih akibatnya perubahan warna dapat ditekan. Hal ini berbeda dari hasil penelitian Palupi *et al.* (2010) yang menyatakan pada hidrolisis *Volvoriella volvaceae*, semakin lama waktu hidrolisis, semakin gelap warna hidrolisat.

Tabel 6. Nilai °Hue HPI dari ikan bernilai ekonomi rendah dengan konsentrasi enzim protease biduri dan waktu hidrolisis yang berbeda

Waktu (Jam)	Konsentrasi Enzim (Unit/g)	°Hue
0	0	74,5±0,1
0	0,7	74,4±0,2
0	1,4	74,4±0,1
0	2,1	74,7±0,1
1,5	0	74,3±0,1
1,5	0,7	74,6±0,2
1,5	1,4	74,6±0,4
1,5	2,1	74,4±0,2
3	0	74,5±0,2
3	0,7	74,3±0,2
3	1,4	74,1±0,4
3	2,1	74,2±0,2

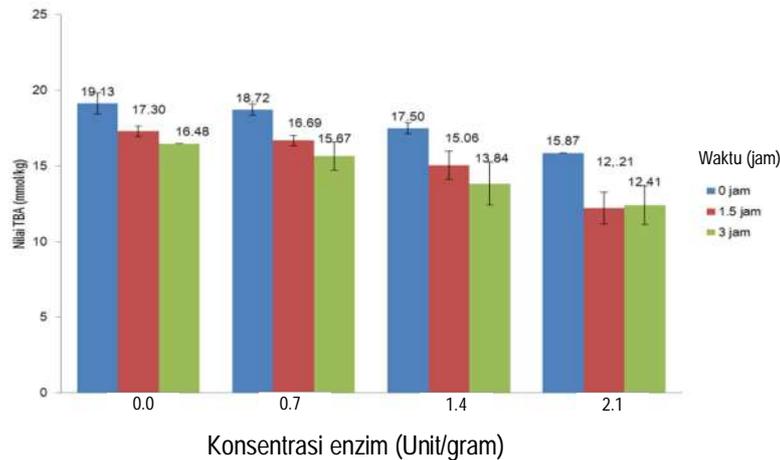
Tingkat Ketengikan

Ketengikan disebabkan oleh lepasnya komponen asam lemak bebas yang terdapat pada minyak baik akibat lipolisis maupun reaksi oksidatif. Lipolisis adalah proses hidrolisis ikatan ester pada lemak (triasilgliserol) sehingga menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol, sedangkan reaksi oksidatif disebabkan oleh reaksi oksidasi lemak dan minyak. Asam lemak bebas rantai pendek akan menghasilkan bau khas yang tidak sedap yang dikenal dengan istilah tengik. Terbentuknya asam lemak bebas dengan 6 – 10 rantai hidrokarbon dapat menunjukkan kerusakan pada minyak (Rahman, 2007).

Penelitian lainnya melaporkan bahwa aktivitas proteolitik protease pada hidrolisat tempe meningkatkan nilai ketengikan produk. Hal ini dapat disebabkan karena proses hidrolisis mendorong terbukanya selubung-selubung minyak, yang kemudian terekspos sehingga mudah mengalami oksidasi. Disamping itu, dengan adanya proses hidrolisis oleh enzim protease akan terjadi penguraian protein yang menghasilkan peptida rantai pendek dan asam amino sehingga protein yang dalam bentuk awal dapat berfungsi sebagai antioksidan menjadi rusak dan hilang sifat fungsionalnya sehingga tidak dapat menghambat proses oksidasi pada hidrolisat tempe (Subagio dkk., 2002).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi protease biduri dan waktu hidrolisis berpengaruh ($\alpha=0,05$) terhadap tingkat ketengikan HPI dari ikan bernilai ekonomi rendah (Gambar 21). Semakin besar konsentrasi protease biduri, maka tingkat ketengikan (nilai TBA) HPI dari ikan bernilai ekonomi rendah semakin menurun walaupun tidak berbeda nyata, berbeda dengan hasil penelitian pada hidrolisat tempe sebelumnya. Hal ini diduga karena enzim protease biduri yang digunakan dalam bentuk *crude* (kasar). Witono dkk. (2006) melaporkan bahwa enzim protease yang

diekstrak secara langsung dari tumbuhan (batang dan daun) biduri masih mengandung klorofil. Menurut Dalimarta (2003) suatu protease kasar juga dapat mengandung saponin, flavonoid, polifenol, tanin, dan kalsium oksalat. Flavonoid dan polifenol merupakan antioksidan, maka semakin banyak konsentrasi ekstrak kasar enzim yang ditambahkan semakin banyak kandungan antioksidan dalam hidrolisat. Hal ini menyebabkan tingkat ketengikan pada hidrolisat dari ikan inferior semakin kecil dengan adanya peningkatan konsentrasi enzim. Antioksidan dapat menghambat proses ketengikan karena antioksidan lebih reaktif bereaksi dengan oksigen daripada reaksi oksigen dengan lemak. Molekul aktif dari antioksidan menggagalkan terbentuknya peroksida dengan mengikat oksigen yang menyebabkan penghambatan ketengikan pada bahan. Sifat antioksidatif dari *crude protease* biduri ini merupakan fenomena yang menarik untuk ditelaah lebih lanjut.



Gambar 21. Tingkat ketengikan HPI dari ikan bernilai ekonomi rendah pada berbagai konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisis. Nilai dinyatakan dalam rata-rata \pm standard deviasi.

BAB 4

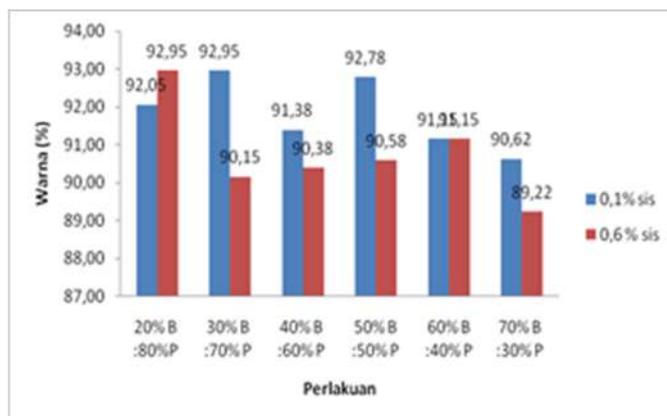
MODIFIKASI PROSES HIDROLISIS PROTEASE BIDURI PADA FORMULASI FLAVOR

Modifikasi Proses Hidrolisis Enzimatis Protease Biduri pada Formulasi Flavor Enhancer dari Substrat Koro Kratok

Modifikasi dilakukan dengan mengkombinasikan enzim protease biduri dan papain dengan proporsi sesuai perlakuan meliputi: A1 (20% biduri : 80% papain); A2 (30% biduri : 70% papain); A3 (40% biduri : 60% papain); A4 (50% biduri : 50% papain); A5 (60% biduri: 40% papain) dan A6 (70% biduri : 30% papain), konsentrasi enzim yang digunakan merujuk hasil penelitian sebelumnya yakni 0,2 % (% berat dari koro kratok rebus kupas). Ditambahkan sistein sesuai perlakuan B1 (0,1%) dan B2 (0,6%). Hidrolisis dilakukan pada suhu dan waktu yang sama (55 °C dan 3 jam). Perlakuan terbaik selanjutnya ditambahkan gelatin 1% (% berat koro kratok rebus kupas). Flavor enhancer ditambah dengan 0,4% CMC, 2% gula dan 2% garam. Adapun parameter yang diamati meliputi: sifat fisik (warna), sifat kemis (kadar protein terlarut, produk maillard dan tingkat ketengikan), laju reaksi dan sifat-sifat sensoris.

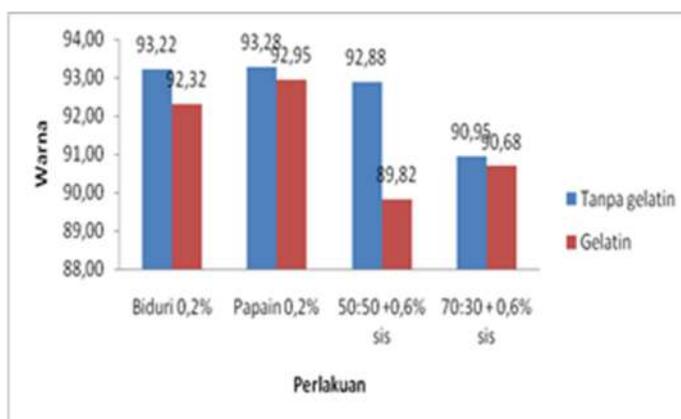
Warna

Warna flavor enhancer protein koro kratok diukur berdasarkan parameter tingkat kecerahan (*lightness*). Histogram tingkat kecerahan flavor enhancer koro kratok dapat dilihat pada Gambar 22 yang menunjukkan bahwa tingkat kecerahan hasil modifikasi hidrolisis enzimatis cenderung menurun. Hal ini karena tingkat kecerahan dipengaruhi oleh konsentrasi produk maillard. Semakin tinggi produk maillard yang dihasilkan maka warna flavor enhancer semakin gelap.



Gambar 22. Tingkat Kecerahan Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis

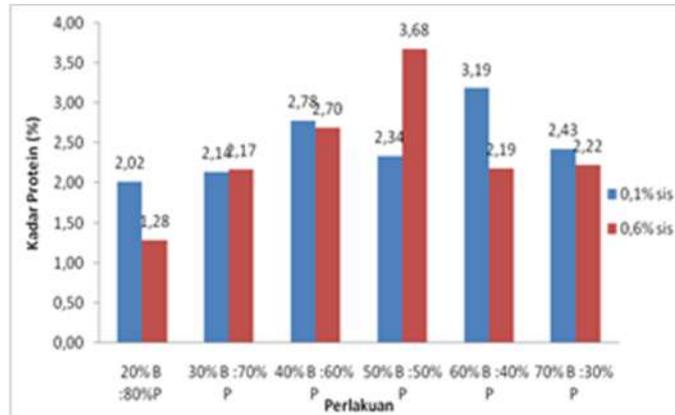
Penambahan gelatin ternyata juga dapat memberikan pengaruh terhadap warna flavor enhancer koro kratok menjadi lebih gelap pada semua perlakuan modifikasi enzimatis sebagaimana ditunjukkan oleh Gambar 23.



Gambar 23. Tingkat Kecerahan Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis dan Pengaruh Penambahan Gelatin

Protein Terlarut

Kadar protein terlarut flavor enhancer koro kratok dari hidrolisis secara enzimatis menggunakan enzim biduri dan papain serta sistein pada berbagai konsentrasi sebagaimana tertera pada Gambar 24.



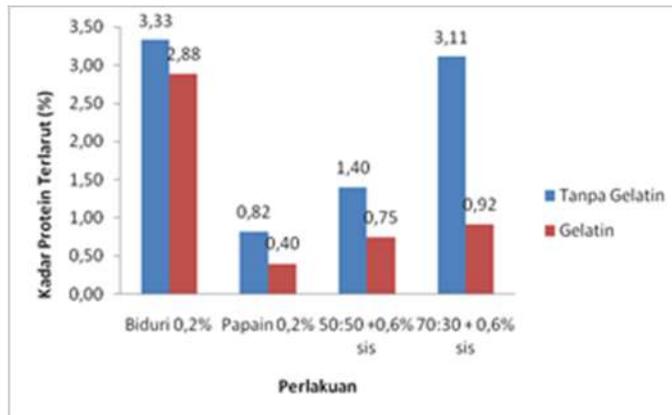
Gambar 24. Kadar Protein Terlarut Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis

Gambar 24 menunjukkan bahwa dengan meningkatnya proporsi enzim biduri dalam campuran enzim menyebabkan meningkatnya kadar protein terlarut hasil hidrolisis. Hal ini dikarenakan enzim papain dapat memotong ikatan peptida pada bagian dalam atau bagian tengah sehingga menghasilkan ikatan peptida dengan rantai pendek yang semakin banyak. Semakin banyak ikatan peptida rantai pendek menyebabkan kerja enzim biduri untuk memutus ikatan peptida pada bagian luar semakin cepat, sehingga semakin banyak ikatan peptida pada protein yang terputus menjadi peptida-peptida sederhana, dan kelarutan protein semakin meningkat. Gambar 24 terlihat bahwa penambahan sistein 0,1%, kadar protein terlarutnya cenderung meningkat sampai dengan perlakuan konsentrasi 60% biduri : 40% papain, tetapi jika proporsi enzim biduri ditingkatkan lagi dan

enzim papain diturunkan maka menyebabkan kadar protein terlarutnya cenderung menurun. Penurunan protein terlarut diduga karena ketersediaan protein rantai pendek menurun dengan semakin berkurangnya proporsi enzim papain.

Penambahan sistein 0,6% pada proporsi 20% biduri : 80% papain terlihat bahwa kadar protein terlarutnya masih rendah meskipun jumlah enzim papain yang ditambahkan lebih besar. Hal ini diduga karena aktivitas biduri telah mencapai maksimum meskipun aktivitas papain diperbesar. Pada penambahan sistein 0,6% terjadi peningkatan kadar protein terlarutnya sampai dengan proporsi 50% biduri : 50% papain. Hal ini dikarenakan kerja antara enzim biduri dan papain mencapai kesetimbangan. Secara keseluruhan Gambar 24 terlihat bahwa penambahan sistein 0,6% menghasilkan protein terlarut flavor enhancer yang lebih besar jika dibandingkan dengan sistein 0,1%. Semakin besar konsentrasi sistein yang ditambahkan, aktivitas dari kedua enzim tersebut juga meningkat. Hal ini karena sistein merupakan aktivator yang berperan mereduksi ikatan disulfida menjadi bentuk tiol atau sulfhidril kembali, sehingga meningkatkan aktivitas memecah ikatan peptida protein.

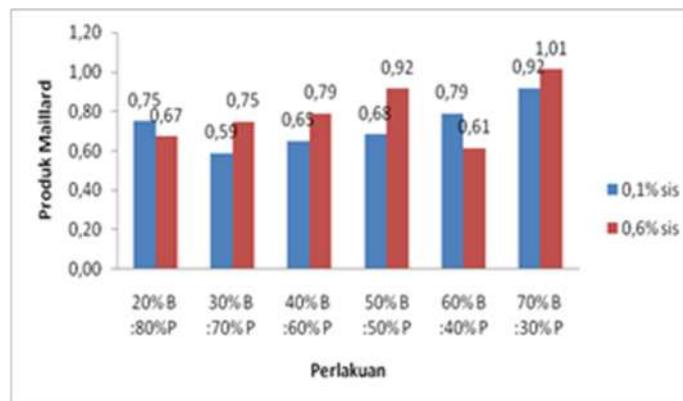
Berdasarkan parameter kadar protein terlarut yang maksimum, selanjutnya dibuat flavor enhancer dari hasil hidrolisis dengan campuran enzim sebanyak 50% biduri : 50% papain dan 70% biduri : 30% papain serta penambahan sistein 0,6% dan tanpa maupun penambahan gelatin 1%. Kadar protein terlarut flavor enhancer pada konsentrasi tersebut dengan penambahan gelatin mengalami penurunan pada kedua konsentrasi. Diduga dengan penambahan gelatin menyebabkan reaksi maillard semakin intensif, sehingga kadar protein terlarut semakin berkurang. Kadar protein terlarut yang dihasilkan ditunjukkan pada Gambar 25.



Gambar 25. Kadar Protein Terlarut Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis dan Pengaruh Penambahan Gelatin

Produk Maillard

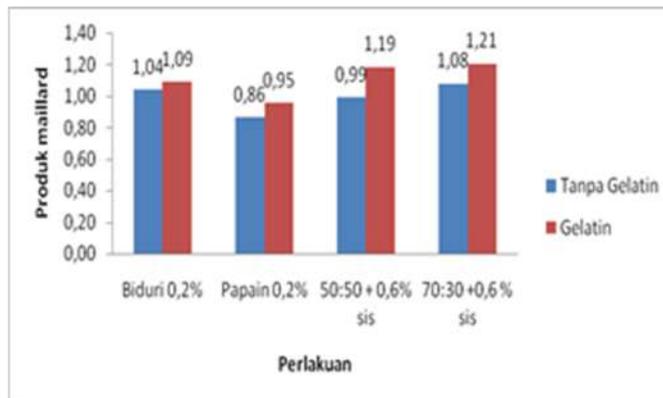
Reaksi maillard terjadi antara gula reduksi dengan gugus amina primer. Gugus amina ini diperoleh dari hasil pemecahan protein yang ada secara alami pada bahan. Nilai produk maillard flavor enhancer koro kratok hasil modifikasi proses hidrolisis enzimatis ditunjukkan pada Gambar 26.



Gambar 26. Produk Maillard Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis

Gambar 26 menunjukkan bahwa semakin besar proporsi enzim biduri dalam campuran enzim biduri dan papain, nilai produk maillard flavor enhancer koro kratok yang dihasilkan semakin tinggi baik pada penambahan sistein 0,1% maupun 0,6%. Hal ini terjadi karena aktivitas enzim biduri yang semakin tinggi dapat memperbanyak protein rantai pendek sehingga meningkatkan gugus amina primer sebagai prekursor reaksi maillard. Menurut Heath and Reineccius (1986) bahwa reaksi maillard merupakan reaksi antara gugus karbonil dan gugus amina primer. Dengan semakin banyaknya konsentrasi enzim, reaksi maillard yang terjadi semakin meningkat.

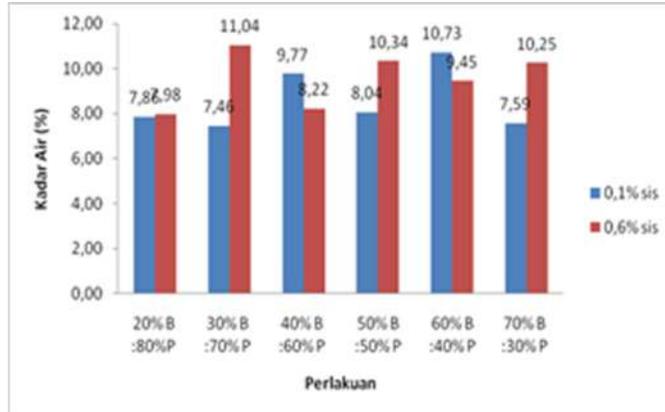
Produk maillard dari flavor enhancer baik tanpa maupun dengan penambahan gelatin cenderung meningkat, tetapi dengan penambahan gelatin menyebabkan produk maillardnya lebih tinggi dibandingkan tanpa gelatin. Hal ini diduga penambahan gelatin menyebabkan reaksi maillard semakin intensif akibat adanya peningkatan kadar protein, sebagaimana hasil yang terlihat pada Gambar 27.



Gambar 27. Produk Maillard Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis dan Pengaruh Penambahan Gelatin

Kadar Air

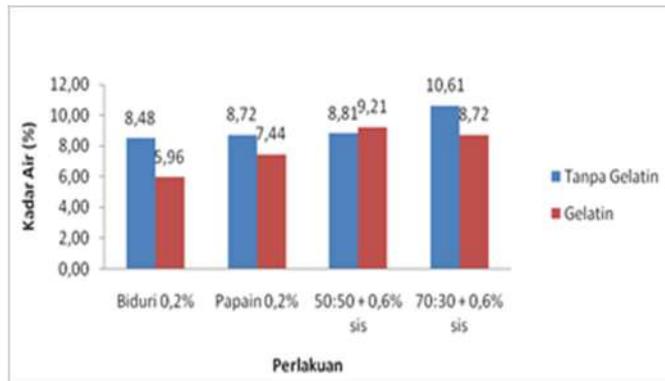
Kadar air flavor enhancer koro kratok hasil modifikasi enzimatis berkisar antara 7,46% - 11,04% sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 28.



Gambar 28. Kadar Air Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis

Kadar air flavor enhancer koro kratok yang dihasilkan cenderung meningkat dengan meningkatnya proporsi enzim biduri dalam campuran enzim biduri dan papain. Hal ini seiring dengan peningkatan kadar protein terlarutnya. Semakin banyak protein terlarut, tingkat hidrasi meningkat sehingga kadar airnya meningkat.

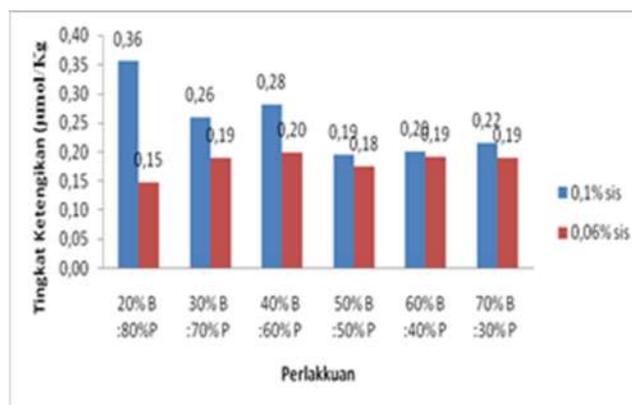
Sementara itu, penambahan gelatin pada proses hidrolisis enzimatis tidak menunjukkan adanya pengaruh yang konsisten terhadap parameter kadar air sebagaimana terlihat pada Gambar 29.



Gambar 29. Kadar Air Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis dan Pengaruh Penambahan Gelatin

Tingkat Ketengikan

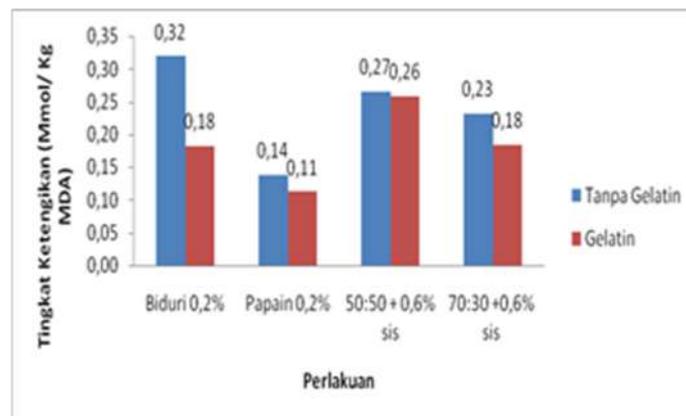
Tingkat ketengikan flavor enhancer koro kratok hasil modifikasi enzimatis ditunjukkan oleh nilai TBA dengan indikator terbentuknya warna merah hasil kondensasi antara 2 molekul TBA dengan 1 molekul malonaldehida. Tingkat ketengikan koro kratok berkisar antara 0,15 - 0,36 mmol/kg sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 30.



Gambar 30. Tingkat Ketengikan Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis

Gambar 30 terlihat bahwa penambahan sistein 0,1% dan 0,6% menghasilkan flavor enhancer protein koro kratok dengan tingkat ketengikan yang cenderung semakin menurun. Penurunan nilai ketengikan ini diduga karena enzim protease biduri yang digunakan mengandung senyawa antioksidan. Witono dkk. (2006) melaporkan bahwa enzim protease yang diekstrak secara langsung dari tanaman biduri masih mengandung klorofil. Menurut Dalimartha (2003) suatu protease kasar juga dapat mengandung saponin, flavonoid, polifenol, tanin dan kalsium oksalat. Klorofil, flavonoid dan polifenol merupakan antioksidan, semakin banyak konsentrasi enzim yang ditambahkan semakin banyak kandungan flavonoid dan polifenol pada flavor enhancer, sehingga tingkat ketengikannya semakin kecil.

Sedangkan pengaruh penambahan gelatin terhadap tingkat ketengikan flavor enhancer hasil modifikasi enzimatik sebagaimana tertera pada Gambar 31.



Gambar 31. Tingkat Ketengikan Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatik dan Pengaruh Penambahan Gelatin

Gambar 31 menunjukkan bahwa penambahan gelatin pada proses hidrolisis enzimatis juga cenderung berpengaruh terhadap tingkat ketengikan flavor enhancer yang dihasilkan. Proses hidrolisis dengan penambahan gelatin menghasilkan flavor enhancer dengan tingkat ketengikan yang lebih rendah di banding tanpa penambahan gelatin. Hal ini diduga terkait dengan produk maillard yang dihasilkan oleh pengaruh gelatin menjadi lebih tinggi. Polimerisasi dari produk maillard diduga berperan dalam menghambat oksidasi lemak pada flavor enhancer koro kratok. Menurut Bailey and Won Um dalam Dedin dkk. (2006) bahwa salah satu antioksidan alami dapat dihasilkan dari reaksi Maillard. Senyawa reduktion yang terdapat dalam produk reaksi Maillard (MRP) dapat mencegah oksidasi lipid. Antioksidan dibentuk pada beberapa level selama pemanasan karboril-amma, termasuk degradasi senyawa Amadori menjadi amino reduktion atau pembentukan polimer dengan aktivitas antioksidan.

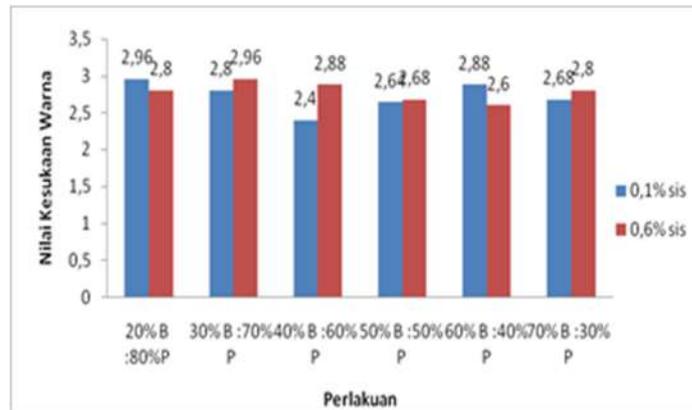
Sifat Sensoris

Sifat sensoris diukur berdasarkan parameter tingkat kesukaan. Sifat-sifat sensori tersebut meliputi: warna, aroma, rasa (gurih), intensitas rasa pahit, dan kesukaan keseluruhan.

Sensori Warna

Nilai kesukaan warna flavor enhancer koro kratok hasil modifikasi hidrolisis enzimatis tertera pada Gambar 32 yang menunjukkan bahwa nilai kesukaan warna flavor enhancer koro kratok tertinggi yakni 2,96 (tidak suka sampai suka) diperoleh pada penambahan sistein 0,1% dengan proporsi 20% biduri : 80% papain dan penambahan sistein 0,6% dengan proporsi 30% biduri : 70% papain. Nilai kesukaan

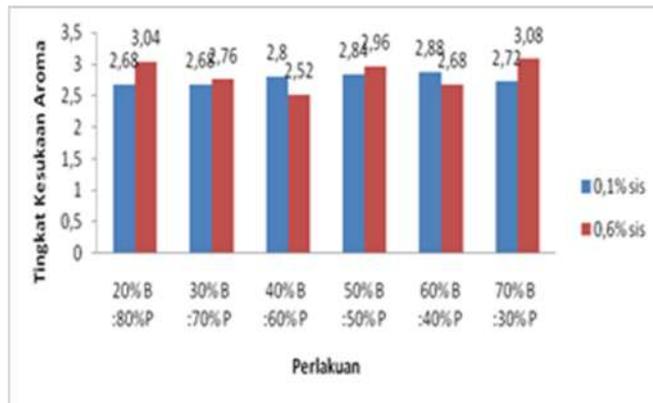
warna dari flavor enhancer koro kratok yang lebih disukai konsumen adalah berwarna cerah.



Gambar 32. Nilai Kesukaan Warna Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis

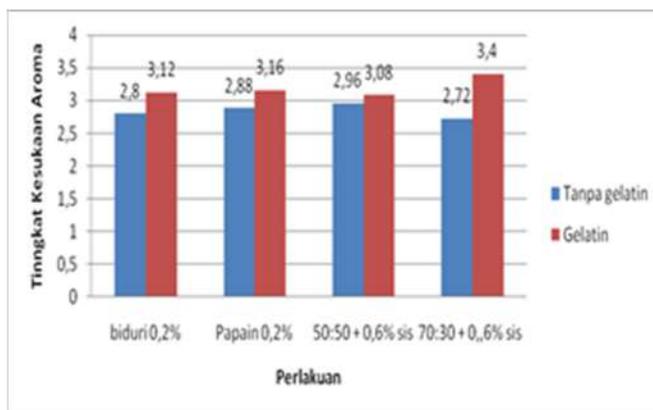
Aroma

Nilai kesukaan aroma tertinggi dari flavor enhancer koro kratok diperoleh pada proporsi 70% biduri : 30% papain dan penambahan sistein 0,6% yaitu 3,08 (agak suka). Histogram nilai kesukaan aroma flavor enhancer koro kratok hasil modifikasi enzimatis dengan pengaruh penambahan gelatin tertera pada Gambar 33. Sedangkan pengaruh penambahan gelatin pada proporsi 70% biduri : 30% papain diperoleh nilai kesukaan aroma flavor enhancer koro kratok tertinggi yakni 3,40 (agak suka sampai suka) (Gambar 34).



Gambar 33. Nilai Kesukaan Aroma Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis

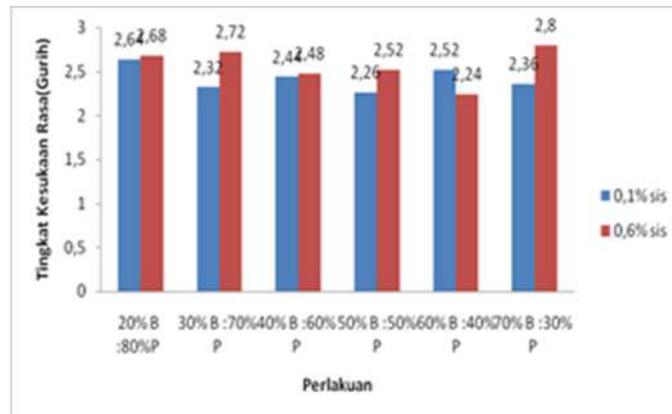
Aroma yang terbentuk dapat ditimbulkan dari gula yang ditambahkan, asam amino bebas, peptida-peptida, nukleotida dan asam-asam organik yang berperan sebagai prekursor utama dalam pembentukan flavor gurih dan produk maillard pada flavor enhancer yang dihasilkan.



Gambar 34. Nilai Kesukaan Aroma Flavor enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis dan Pengaruh Penambahan Gelatin

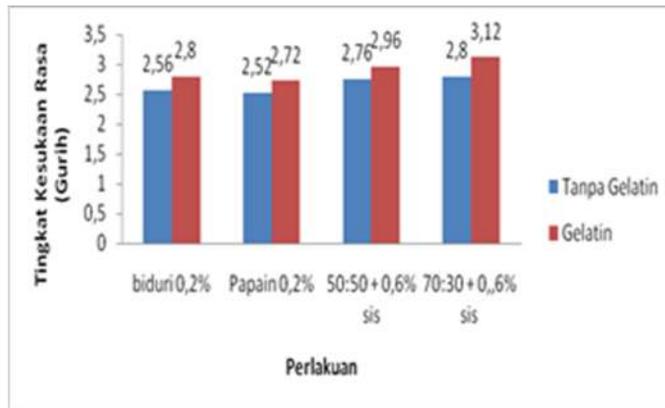
Rasa

Nilai kesukaan rasa tertinggi yakni 2,8 (tidak suka sampai agak suka) dihasilkan dari flavor enhancer koro kratok pada proporsi 70% biduri : 30% papain dan penambahan sistein 0,6% (Gambar 35).



Gambar 35. Nilai Kesukaan Rasa dari Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis

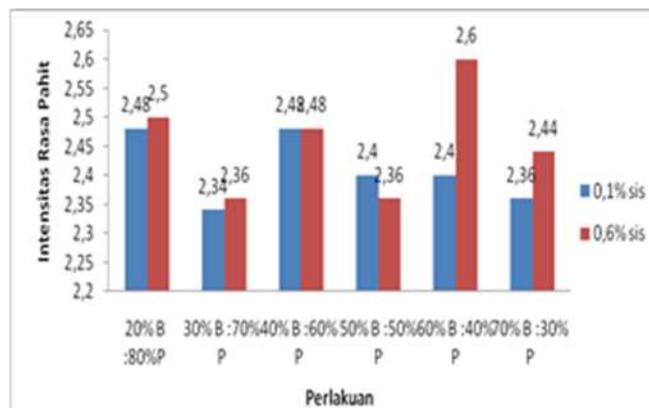
Nilai kesukaan rasa tertinggi yaitu 3,12 (agak suka sampai suka) dari flavor enhancer koro kratok dengan pengaruh penambahan gelatin dihasilkan pada proporsi 70% biduri : 30% papain, adapun histogramnya sebagaimana tertera pada Gambar 36. Rasa ditimbulkan oleh peptida-peptida pendek dan asam-asam amino hasil hidrolisis koro kratok yang sudah membentuk produk maillard. Semakin banyak produk asam-asam amino dan peptida pendek maka semakin banyak produk maillard yang menghasilkan rasa disukai.



Gambar 36. Nilai Kesukaan Rasa Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis dan Pengaruh Penambahan Gelatin

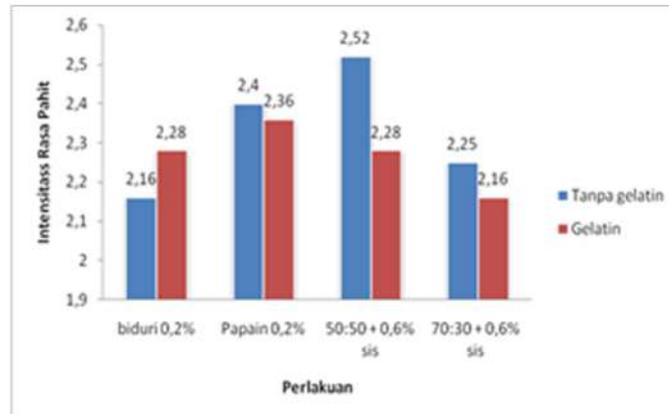
Intensitas Rasa Pahit

Intensitas rasa pahit tertinggi dihasilkan dari flavor enhancer koro kratok pada proporsi 60% biduri : 40% papain dan penambahan sistein 0,6% yakni 2,60 (tidak pahit sampai agak pahit) (Gambar 37).



Gambar 37. Intensitas Rasa Pahit dari Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis

Penambahan gelatin sangat efektif mengurangi rasa pahit yang ditimbulkan dari flavor enhancer koro kratok hasil modifikasi hidrolisis enzimatis. Intensitas rasa pahit terendah (2,16) diperoleh dari flavor enhancer koro kratok pada perlakuan modifikasi enzim dengan proporsi 70% biduri : 30% papain dan penambahan gelatin (Gambar 38).

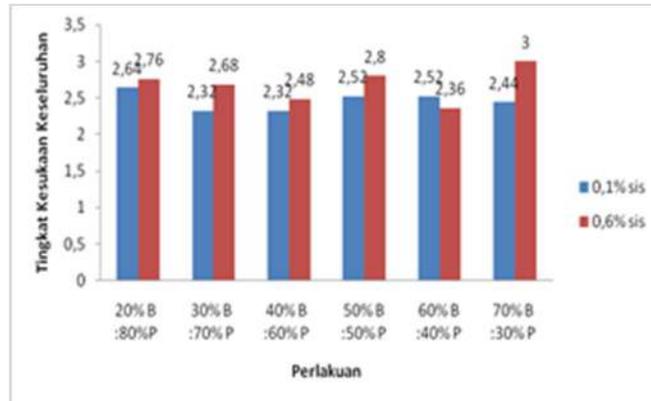


Gambar 38. Intensitas Rasa Pahit Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis dan Pengaruh Penambahan Gelatin

Penambahan gelatin pada pembuatan flavor enhancer dapat mengurangi rasa pahit. Rasa pahit pada flavor enhancer protein disebabkan oleh peptida-peptida yang bersifat hidrofobik yang dihasilkan selama proses hidrolisis (Uhlig, 1998). Pengurangan rasa pahit pada flavor enhancer dapat dilakukan dengan mencampur gelatin. Gelatin merupakan hidrokoloid yang mudah membentuk gel akibat adanya pembentukan jala atau jaringan tiga dimensi oleh molekul primer yang terentang pada seluruh volume gel yang terbentuk dengan memperangkap sejumlah air didalamnya.

Kesukaan Keseluruhan

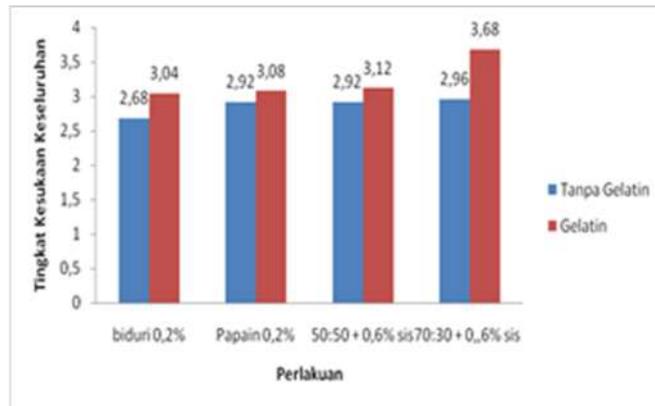
Nilai kesukaan keseluruhan tertinggi yakni 3,0 (agak suka) dari flavor koro kratok diperoleh pada proporsi enzim 70% biduri : 30% papain dan penambahan sistein 0,6% (Gambar 39).



Gambar 39. Nilai Kesukaan Keseluruhan dari Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis

Nilai kesukaan secara keseluruhan dari flavor enhancer koro kratok hasil hidrolisis enzimatis dan pengaruh penambahan gelatin tertera pada Gambar 40.

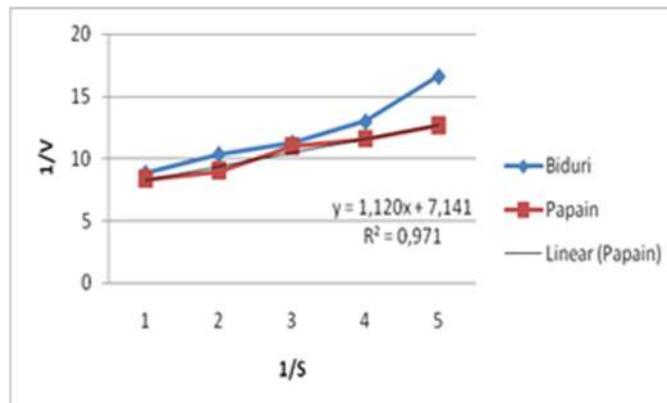
Gambar 40 menunjukkan bahwa nilai kesukaan keseluruhan tertinggi yaitu 3,68 (agak suka sampai suka) dari flavor enhancer koro kratok dihasilkan pada proporsi enzim 70% biduri : 30% papain dengan penambahan gelatin. Hal ini menunjukkan bahwa parameter aroma dan rasa gurih sangat menentukan kesukaan keseluruhan.



Gambar 40. Nilai Kesukaan Keseluruhan Flavor Enhancer Koro Kratok Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis

Laju Reaksi Enzim Biduri dan Papain pada Substrat Koro kratok

Hubungan antara konsentrasi substrat dengan kecepatan awal reaksi menggunakan metode Lineweaver-Burk ditunjukkan pada Gambar 41.



Gambar 41. Hubungan Konsentrasi Substrat dan Kecepatan Awal Reaksi dengan Menggunakan Metode Lineweaver-Burk

Berdasarkan Gambar 41 dapat diketahui bahwa laju reaksi enzim biduri lebih besar bila dibandingkan dengan enzim papain. Hal ini dikarenakan nilai V_{max} yang diperoleh enzim biduri sebesar 0,154 mg/ml/mnt dan K_m sebesar 0,281 g/ml air sedangkan pada enzim papain nilai V_{max} yang diperoleh adalah 0,140 mg/ml/mnt dan K_m sebesar 0,117 g/ml air. Untuk memperoleh kecepatan awal sebesar $V_{max}/2$ atau 0.077 mg/ml/mnt dapat menggunakan enzim biduri sebanyak 1 bagian dan konsentrasi substrat koro kratok segar sebesar 93,585 bagian. Sedangkan enzim papain, untuk memperoleh kecepatan awal sebesar $V_{max}/2$ atau 0.07 mg/ml/mnt dapat menggunakan enzim sebanyak 1 bagian dan konsentrasi substrat koro pedang segar dalam air sebesar 38,883 bagian. Dengan kata lain semakin kecil kecepatan awal yang diperoleh maka semakin tinggi laju reaksinya



Gambar 42. Hubungan Konsentrasi Substat dan Kecepatan Awal Reaksi Campuran Enzim Biduri dan Papain Menggunakan Metode Lineweaver-Burk

Laju reaksi hasil modifikasi enzim protease biduri dan papain dapat diketahui bahwa nilai V_{max} yang diperoleh

sebesar 0,1125 mg/ml/mnt, sedangkan Km sebesar 0,354. Untuk memperoleh kecepatan awal sebesar $V_{max}/2$ atau 0,056 mg/ml/mnt dapat digunakan 1 bagian enzim biduri dan papain untuk menghidrolisis substrat koro kratok sebanyak 118,3 bagian. Berarti dapat disimpulkan bahwa dengan menggunakan campuran antara kedua enzim tersebut maka dengan jumlah enzim yang sama dapat digunakan untuk menghidrolisis substrat yang lebih banyak. Adapun kurva hubungan konsentrasi substrat dan kecepatan awal reaksi dari campuran enzim biduri dan papain dapat terlihat pada Gambar 42.

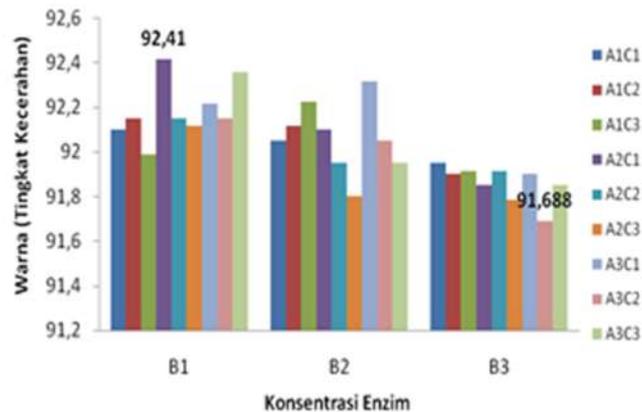
Modifikasi Hidrolisis Enzimatis pada Proses Formulasi Flavor Enhancer dari Substrat Koro Pedang

Modifikasi dilakukan dengan mengkombinasikan enzim protease biduri dan papain dengan proporsi sesuai perlakuan meliputi: A1 (1 biduri : 3 papain); A2 (2 biduri : 3 papain) dan A3 (3 biduri : 3 papain), konsentrasi enzim: B1 (0,1%); B2 (0,15%) dan B3 (0,2%) (% berat dari koro pedang rebus kupas). Hidrolisis dilakukan pada suhu sama dan waktu sesuai perlakuan meliputi: C1 (1 jam); C2 (2,5 jam) dan C3 (3 jam). Adapun parameter yang diamati meliputi: sifat fisik (warna), sifat kemis (kadar protein terlarut, produk maillard dan tingkat ketengikan), laju reaksi dan sifat-sifat sensoris.

Warna

Warna diukur berdasarkan parameter tingkat kecerahan (*lightness*). Hasil analisa ragam (tabel tidak ditunjukkan) memperlihatkan bahwa faktor A (perbandingan enzim biduri dan papain) tidak berpengaruh terhadap tingkat kecerahan flavor enhancer koro pedang yang dihasilkan, sedangkan faktor B (konsentrasi enzim) dan faktor C (lama hidrolisis) sangat berpengaruh terhadap tingkat kecerahan

flavor enhancer protein koro pedang yang dihasilkan. Tingkat kecerahan flavor enhancer koro pedang yang dihasilkan berkisar antara 91,69 - 92,41. Semakin tinggi nilai warna menunjukkan warna semakin cerah (mendekati putih). Hasil *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada α 5% terhadap tingkat kecerahan flavor enhancer protein koro pedang hasil modikasi enzimatis pada semua faktor perlakuan dapat dilihat pada histogram pada Gambar 43.



Gambar 43. Tingkat Kecerahan Flavor Enhancer Koro Pedang pada Berbagai Perbandingan Enzim Biduri dan Papain serta Konsentrasi dan Lama Hidrolisis

Gambar 43 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi enzim protease yang digunakan dan semakin lama hidrolisis, menghasilkan flavor enhancer protein koro pedang dengan intensitas warna (kecoklatan) yang semakin tinggi. Hal ini sangat terkait dengan produksi maillard dari hidrolisis substrat koro pedang yang dihasilkan. Bahwa semakin tinggi konsentrasi dan semakin lama hidrolisis, menghasilkan flavor enhancer protein koro pedang dengan

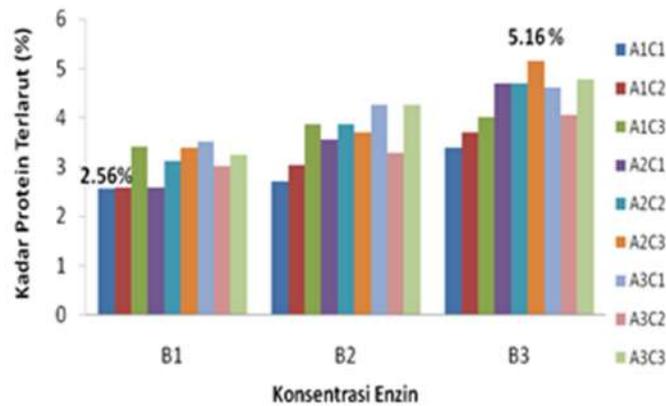
kadar protein dan produk maillard yang semakin tinggi (sebagaimana hasil pengamatan pada sub bab selanjutnya).

Maillard merupakan produk reaksi yang berwarna coklat hasil interaksi dari produk hidrolisis (amina primer) dengan gula reduksi. Menurut Miller and Gerrard (2005) bahwa reaksi maillard terjadi karena dehidrasi 3-deoksiheksoson (pelepasan 3 molekul air) yang membentuk hidroksi metal furaldehid. Reaksi-reaksi yang mengikuti pembentukan senyawa antara lain berupa reaksi kompleks yang akhirnya membentuk pigmen coklat (melanoidin) yang mengandung N dan senyawa N-heterosiklik seperti pirazin dan pirol yang bertanggung jawab atas cita rasa.

Gambar 43 menunjukkan bahwa perlakuan A2B1C1 dengan kombinasi perbandingan konsentrasi enzim biduri dan papain 2 : 3 dan konsentrasi enzim 0,1% serta lama hidrolisis 2 jam menghasilkan flavor enhancer koro pedang dengan tingkat kecerahan rata-rata tertinggi yaitu sebesar 92,41 dan berbeda sangat nyata dengan perlakuan yang lainnya. Sedangkan pada perlakuan A3B3C2 dengan kombinasi perbandingan enzim biduri dan papain 3 : 3 dan konsentrasi enzim 0,2% serta lama hidrolisis 2,5 jam menghasilkan flavor enhancer koro pedang dengan tingkat kecerahan rata-rata terendah yaitu sebesar 91,69 dan berbeda sangat nyata dengan perlakuan lainnya.

Protein Terlarut

Faktor A (perbandingan enzim biduri dan papain), faktor B (konsentrasi enzim), dan faktor C (lama hidrolisis) sangat berpengaruh terhadap kadar protein terlarut flavor enhancer protein koro pedang sebagaimana hasil analisa ragam yang telah dilakukan (tabel tidak diperlihatkan). Kadar protein terlarut flavor enhancer koro pedang hasil modifikasi hidrolisis enzimatis berkisar antara 2,56 % sampai 5,16 % sebagaimana terlihat pada Gambar 44.



Gambar 44. Kadar Protein Terlarut Flavor Enhancer Koro Pedang Hasil Modifikasi Hidrolisis Enzimatis

Gambar 44 memperlihatkan bahwa semakin besar konsentrasi enzim yang ditambahkan maka kadar protein terlarut flavor enhancer koro pedang yang dihasilkan semakin meningkat. Hal ini dikarenakan semakin besar konsentrasi enzim yang ditambahkan maka reaksi enzim yang terjadi semakin cepat, sehingga semakin banyak ikatan peptida yang terputus menjadi peptida-peptida sederhana (Nielsen, 1997) dan kadar protein terlarut yang dihasilkan oleh flavor enhancer protein koro pedang juga meningkat. Demikian juga lama hidrolisis, menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap peningkatan kadar protein terlarut. Semakin lama hidrolisis menunjukkan peningkatan kadar protein terlarut flavor enhancer koro pedang. Hal ini dikarenakan semakin lama hidrolisis maka kontak enzim dengan substrat semakin lama, sehingga tingkat hidrolisa semakin tinggi dan dihasilkan molekul-molekul protein pendek yang menyebabkan meningkatnya kelarutan protein. Hasil ini sesuai dengan Sarofah (2004) dan Witono dkk (2010) bahwa semakin lama hidrolisis maka kadar protein terlarut cenderung meningkat.

Gambar 44 menunjukkan bahwa pada perbandingan enzim biduri dan papain yang sama yaitu 3 : 3 menghasilkan flavor enhancer protein koro pedang dengan kadar protein terlarut paling tinggi. Hal ini karena pada proporsi tersebut merupakan perbandingan yang tepat untuk terjadinya sinergisme proteolitik dari enzim biduri dan papain dalam menghidrolisis substrat koro pedang. Enzim biduri yang tergolong eksopeptidase dan enzim papain yang tergolong endopeptidase apabila bergabung dapat mempercepat pemutusan ikatan peptida protein sehingga akan membentuk protein sederhana dan meningkatkan kadar protein terlarut pada flavor enhancer protein koro pedang.

Gambar 44 juga menunjukkan bahwa perlakuan A2B3C3 dengan kombinasi perbandingan enzim biduri dan papain 2 : 3, konsentrasi enzim 0,2% dan lama hidrolisis 3 jam menghasilkan kadar protein terlarut tertinggi yaitu sebesar 5,16% dan berbeda sangat nyata dengan perlakuan yang lainnya. Sedangkan pada perlakuan A1B1C1 dengan kombinasi perbandingan enzim biduri dan papain 1 : 3, konsentrasi 0,1% dan lama hidrolisis 2 jam menghasilkan kadar protein terlarut paling rendah yaitu sebesar 2,56% dan berbeda tidak nyata dengan perlakuan A1B1C2, A2B1C1, dan A1B2C1 tetapi berbeda sangat nyata dengan perlakuan yang lainnya sebagaimana hasil uji beda (DMRT α 5%) (Tabel tidak ditunjukkan).

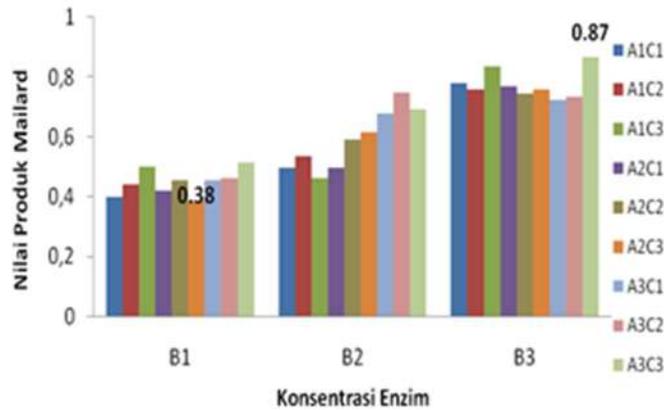
Produk Maillard

Hasil analisa ragam (tabel tidak ditunjukkan) memperlihatkan bahwa faktor A (perbandingan enzim biduri dan papain), faktor B (konsentrasi enzim) dan faktor C (lama hidrolisis) sangat berpengaruh terhadap nilai produk maillard flavor enhancer koro pedang yang dihasilkan. Histogram nilai rata-rata produk maillard flavor enhancer protein koro

pedang hasil modikasi enzimatis pada semua faktor perlakuan dapat dilihat pada Gambar 45.

Gambar 45 menunjukkan bahwa nilai produk maillard flavor enhancer koro pedang yang dihasilkan berkisar antara 0,39 sampai 0,84. Proses pembuatan flavor enhancer koro pedang pada penambahan enzim biduri dan papain dengan proporsi sama yaitu 3 : 3 menghasilkan nilai produk maillard yang semakin meningkat. Hal ini karena pada proporsi tersebut sangat tepat untuk terbentuknya sinergisme kerja enzim biduri dan papain. Enzim papain memutus ikatan peptida protein pada bagian dalam sehingga memperbanyak ujung amino, sedangkan enzim biduri memutus ikatan protein pada bagian ujung tersebut. Sinergisme tersebut dapat mempercepat reaksi enzimatis, sehingga menghasilkan amina primer yang semakin banyak. Menurut Heath and Reineccius (1986), reaksi maillard merupakan reaksi antara gugus karbonil dan gugus amina primer. Gugus karbonil dalam makanan banyak berasal dari gula-gula pereduksi, sementara gugus amina primer berasal dari asam amino atau protein.

Gambar 45 menunjukkan bahwa perlakuan A3B3C3 dengan kombinasi perbandingan enzim biduri dan papain 3 : 3 dan konsentrasi enzim 0,2% serta lama kombinasi 3 jam menghasilkan flavor enhancer koro pedang dengan nilai rata-rata produk maillard tertinggi yakni sebesar 0,87 dan berbeda sangat nyata dengan perlakuan yang lainnya. Sedangkan perlakuan A2B1C3 dengan kombinasi perbandingan enzim biduri dan papain 2 : 3 dan konsentrasi enzim 0,1% serta lama hidrolisis 3 jam menghasilkan flavor enhancer dengan nilai rata-rata produk maillard terendah yaitu sebesar 0,39 yang berbeda tidak nyata dengan perlakuan A1B1C1 tetapi berbeda sangat nyata dengan perlakuan lainnya.



Gambar 45. Nilai Produk Maillard Flavor enhancer Koro Pedang pada Berbagai Perbandingan Enzim Biduri dan Papain serta Konsentrasi dan Lama Hidrolisis

Gambar 45 menunjukkan bahwa semakin banyak konsentrasi enzim yang ditambahkan, nilai produk maillard dari flavor enhancer koro pedang semakin tinggi. Hal ini karena semakin banyak konsentrasi enzim protease yang ditambahkan, kecepatan reaksi enzim akan semakin tinggi, yang berarti semakin banyak ikatan peptida yang dihidrolisis, gugus amina primer yang dihasilkan juga semakin banyak. Hal ini sesuai dengan laporan Witono dkk (2010) bahwa semakin banyak konsentrasi enzim yang ditambahkan pada substrat kedelai maka produk maillard semakin banyak.

Demikian juga lama hidrolisis, semakin lama waktu hidrolisis maka nilai produk maillard flavor enhancer protein koro pedang semakin meningkat. Hal ini dikarenakan semakin lama hidrolisis maka semakin banyak ikatan peptida yang terhidrolisis, sehingga semakin banyak pula gugus amina primer yang dihasilkan. Dengan demikian reaksi maillard yang terjadi semakin intensif. Hasil ini sesuai dengan Sarofah (2004) dan Witono dkk. (2010) bahwa

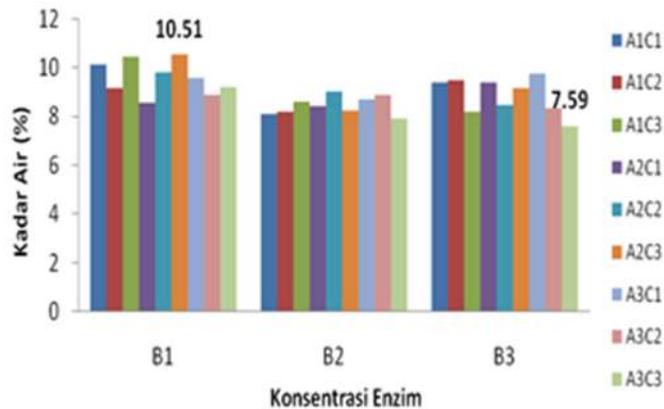
semakin lama waktu hidrolisis mengakibatkan semakin banyak peptida yang terpotong menghasilkan gugus amina primer, maka intensitas reaksi maillard yang terbentuk juga akan semakin tinggi.

Gambar 45 menunjukkan bahwa nilai produk maillard tertinggi (0,87) terdapat pada perlakuan perbandingan enzim biduri dan papain 3 : 3 dengan konsentrasi enzim 0,2% dan lama hidrolisis 3 jam. Sedangkan nilai produk maillard terendah (0,38) terdapat pada perlakuan perbandingan biduri dan papain 2 : 3 dengan konsentrasi 0,1% dan lama hidrolisis 3 jam.

Kadar Air

Hasil analisa ragam (tabel tidak ditunjukkan) memperlihatkan bahwa faktor A (perbandingan enzim biduri dan papain), faktor B (konsentrasi enzim) dan faktor C (lama hidrolisis) sangat berpengaruh terhadap kadar air flavor enhancer protein koro pedang yang dihasilkan. Histogramnya tertera pada Gambar 46.

Kadar air flavor enhancer koro pedang yang dihasilkan berkisar antara 10,51 sampai 7,59%. Gambar 46 menunjukkan bahwa perlakuan perbandingan enzim biduri dan papain 3 : 3 menghasilkan flavor koro pedang dengan kadar air rendah. Hal ini diduga berhubungan erat dengan kadar protein flavor enhancer koro pedang yang dihasilkan. Pada perbandingan yang sama antara protease biduri dan papain (3 : 3) menghasilkan flavor enhancer protein dengan kadar air paling tinggi sehingga kemampuan protein untuk mengikat air semakin kecil.



Gambar 46. Kadar Air Flavor Enhancer Protein Koro Pedang pada Berbagai Perbandingan Enzim Biduri dan Papain serta Konsentrasi dan Lama Hidrolisis

Gambar 46 menunjukkan bahwa perlakuan dengan penambahan konsentrasi protease terbesar (0,2%) menghasilkan flavor enhancer koro pedang dengan kadar air yang rendah. Hal ini dikarenakan semakin banyak konsentrasi enzim yang ditambahkan, maka semakin tinggi kadar protein terlarut dari flavor enhancer yang dihasilkan, sehingga kemampuan protein untuk mengikat air semakin kecil. Demikian juga pengaruh lama hidrolisis, bahwa semakin lama hidrolisis, kadar protein terlarut flavor enhancer koro pedang yang dihasilkan semakin tinggi sehingga kadar air flavor yang dihasilkan semakin kecil.

Gambar 46 juga menunjukkan bahwa perlakuan A2B1C3 dengan kombinasi enzim biduri dan papain 2 : 3 dan konsentrasi enzim 0,1% serta lama hidrolisis 3 jam menghasilkan flavor enhancer dengan nilai rata-rata tertinggi yaitu sebesar 10,51% dan beda sangat nyata dengan perlakuan yang lain. Sedangkan pada perlakuan A3B3C3 dengan kombinasi enzim biduri dan papain 3 : 3 dan

konsentrasi enzim 0,2% serta lama hidrolisis 3 jam menghasilkan flavor enhancer koro pedang dengan kadar air rata-rata terendah yaitu sebesar 7,59% dan hasil ini berbeda sangat nyata dengan perlakuan yang lainnya.

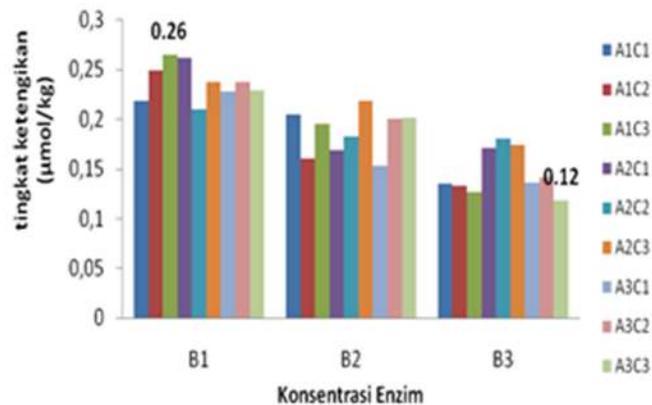
Tingkat Ketengikan

Hasil sidik ragam (tabel tidak diperlihatkan) menunjukkan bahwa faktor A (perbandingan enzim biduri dan papain) dan faktor B (konsentrasi enzim) sangat berpengaruh terhadap tingkat ketengikan flavor enhancer protein koro pedang, sedangkan faktor C (lama hidrolisis) tidak berpengaruh terhadap tingkat ketengikan flavor enhancer koro pedang yang dihasilkan.

Tingkat ketengikan flavor enhancer koro pedang yang dihasilkan berkisar antara 0,12 sampai 0,26 $\mu\text{mol/kg}$. Histogramnya dapat dilihat pada Gambar 47 yang menunjukkan bahwa perbandingan enzim biduri dan papain yang sama yaitu 3 : 3 menghasilkan flavor enhancer protein koro pedang dengan tingkat ketengikan yang rendah. Hal ini dikarenakan kedua enzim tersebut merupakan enzim protease yang dapat memecah ikatan peptida protein dari dalam (papain) maupun dari luar (biduri). Sehingga bila jumlahnya sama akan menghasilkan lebih banyak protein yang bentuknya lebih sederhana. Oleh karena itu dengan banyaknya protein yang terbentuk dapat mengikat lebih banyak air yang ada dalam bahan sehingga akan mengurangi keberadaan oksigen yang akan berikatan dengan lemak dan akibatnya dapat menurunkan tingkat ketengikan pada flavor enhancer protein koro pedang yang dihasilkan. Menurut Min and Boff dalam Akoh and Min (2002) bahwa salah satu faktor yang dapat menyebabkan ketengikan adalah ketersediaan oksigen dalam bahan.

Gambar 47 menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi enzim, maka tingkat ketengikan flavor enhancer

protein koro pedang yang dihasilkan semakin menurun. Hal ini dikarenakan enzim protease yang digunakan mengandung senyawa antioksidan. Witono dkk. (2006) melaporkan bahwa enzim protease yang diekstrak secara langsung dari tanaman biduri masih mengandung klorofil. Menurut Dalimartha (2003) suatu protease kasar juga dapat mengandung saponin, flavonoid, polifenol, tanin dan kalsium oksalat. Klorofil, flavonoid dan polifenol merupakan antioksidan, semakin banyak konsentrasi enzim yang ditambahkan semakin banyak kandungan flavonoid dan polifenol pada flavor enhancer protein kedelai, sehingga tingkat ketengikannya semakin kecil.



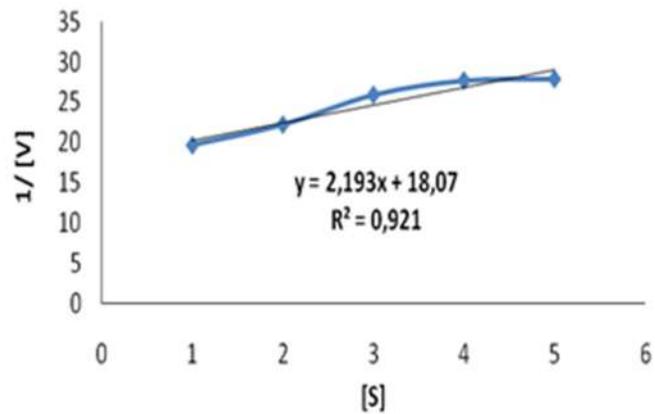
Gambar 47. Tingkat Ketengikan Flavor Enhancer Protein Koro Pedang pada Berbagai Perbandingan Enzim Biduri dan Papain serta Konsentrasi dan Lama Hidrolisis

Gambar 47 menunjukkan bahwa tingkat ketengikan tertinggi (0,26 µmol/kg) terdapat pada perlakuan enzim biduri dan papain 1 : 3 dengan konsentrasi 0,1% dan lama hidrolisis 3 jam. Sedangkan tingkat ketengikan terendah (0,12 µmol/kg) terdapat pada perlakuan biduri dan papain 3 : 3 dengan konsentrasi 0,2% dan lama hidrolisis 3 jam.

Gambar 47 menunjukkan bahwa perlakuan A1B1C3 dengan kombinasi enzim biduri dan papain 1 : 3 dan konsentrasi enzim 0,1% serta lama hidrolisis 3 jam menghasilkan flavor dari koro pedang dengan nilai rata-rata ketengikan tertinggi yaitu sebesar 0,26 $\mu\text{mol/kg}$ dan berbeda tidak nyata dengan perlakuan A2B1C1 serta berbeda sangat nyata dengan perlakuan yang lainnya. Sedangkan perlakuan A3B3C3 dengan kombinasi perbandingan enzim biduri dan papain 3 : 3 dan konsentrasi enzim 0,2% serta lama hidrolisis 3 jam menghasilkan flavor enhancer koro pedang dengan nilai rata-rata ketengikan terendah yaitu sebesar 0,12 $\mu\text{mol/kg}$ dan berbeda sangat nyata dengan perlakuan yang lainnya.

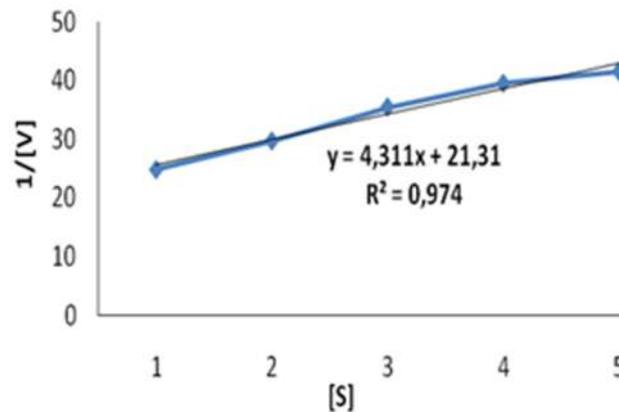
Laju Reaksi Enzim Biduri, Papain dan Campuran Enzim Biduri dan Papain pada Substrat Koro Pedang

Hubungan antara konsentrasi substrat dengan kecepatan awal reaksi menggunakan metode Lineweaver-Burk dari enzim biduri dapat dilihat pada Gambar 48, enzim papain dapat dilihat pada Gambar 49 dan campuran enzim biduri dan papain dapat dilihat pada Gambar 50.



Gambar 48. Hubungan Konsentrasi Substat dan Kecepatan Awal Reaksi dengan Menggunakan Metode Lineweaver-Burk dari Enzim Biduri

Berdasarkan Gambar 48 dapat diketahui bahwa nilai V_{max} yang diperoleh sebesar 0,055 mg/ml/mnt, sedangkan K_m sebesar 0,121. Untuk memperoleh kecepatan awal sebesar $V_{max}/2$ atau 0,028 mg/ml/mnt dapat digunakan 1 bagian enzim biduri untuk menghidrolisis 40,454 bagian substrat koro pedang.

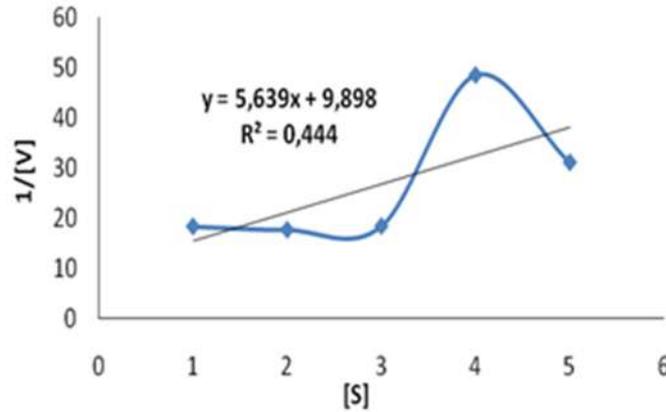


Gambar 49. Hubungan Konsentrasi Substat dan Kecepatan Awal Reaksi dengan Menggunakan Metode Lineweaver-Burk dari Enzim Papain

Berdasarkan Gambar 49 dapat diketahui bahwa nilai V_{max} yang diperoleh sebesar 0,047 mg/ml/mnt, sedangkan K_m sebesar 0,202. Oleh karena, untuk memperoleh kecepatan awal sebesar $V_{max}/2$ atau 0,023 mg/ml/mnt dapat digunakan 1 bagian enzim papain dalam menghidrolisis 67,433 bagian substrat koro pedang.

Sedangkan Berdasarkan Gambar 50 dapat diketahui bahwa nilai V_{max} yang diperoleh sebesar 0,101 mg/ml/mnt, sedangkan K_m sebesar 0,570. Untuk memperoleh kecepatan awal sebesar $V_{max}/2$ atau 0,051 mg/ml/mnt dapat digunakan 1 bagian campuran enzim biduri dan papain (masing-masing 0,5 gram) dengan substrat koro pedang sebesar 189,904 bagian. Berarti dengan

menggunakan campuran kedua enzim tersebut dalam jumlah yang sama dapat menghidrolisis substrat koro pedang yang lebih banyak.



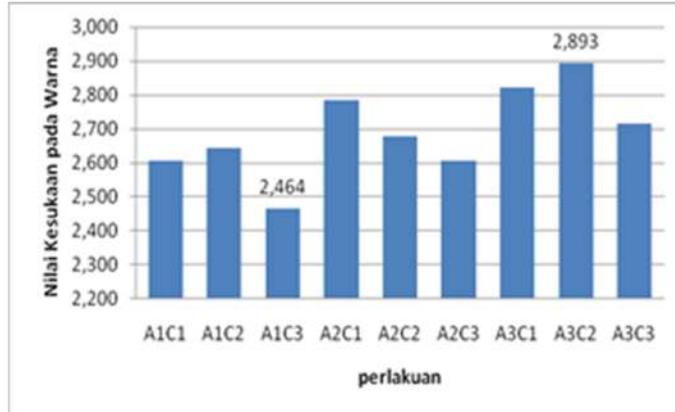
Gambar 50. Hubungan Konsentrasi Substat dan Kecepatan Awal Reaksi dengan Menggunakan Metode Lineweaver-Burk dari Campuran Enzim Biduri dan Papain

Sifat Sensoris

Uji organoleptik hanya menggunakan sampel yang konsentrasi enzimnya 0,2%. Hal ini dikarenakan pada konsentrasi tersebut flavor enhancer koro pedang mempunyai kadar protein yang relatif lebih tinggi bila dibandingkan dengan konsentrasi yang lain. Selain itu juga untuk mempermudah panelis dalam menilai parameter dan menghindari kejenuhan panelis. Parameter yang digunakan dalam uji sensoris adalah nilai kesukaan warna, rasa dan aroma flavor enhancer koro pedang yang telah ditambahkan pada sup.

Sensori Warna

Nilai kesukaan warna flavor koro pedang yang telah ditambahkan pada sup berkisar antara 2,464 sampai dengan 2,893 (tidak suka sampai suka). Histogram nilai kesukaan warna flavor enhancer dari koro pedang pada berbagai perbandingan enzim biduri dan papain serta konsentrasi dan lama hidrolisis dapat dilihat pada Gambar 51.

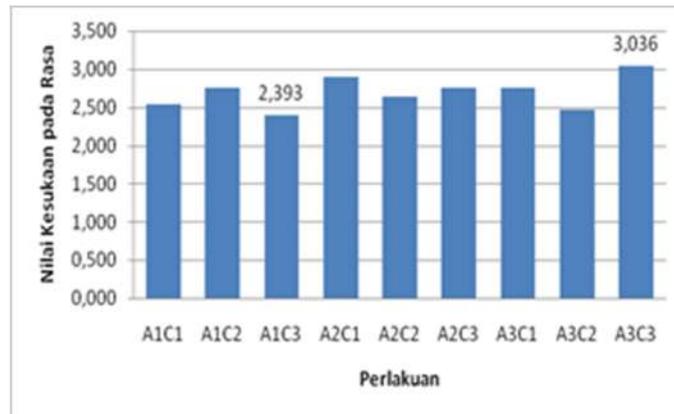


Gambar 51. Nilai Kesukaan Warna Flavor Enhancer dari Koro Pedang pada Berbagai Perbandingan Enzim Biduri dan Papain serta Konsentrasi dan Lama Hidrolisis

Gambar 51 menunjukkan bahwa nilai kesukaan warna flavor koro pedang yang ditambahkan pada sup didapatkan hasil tertinggi pada perlakuan A3C2 (biduri dan papain 3:3 dan lama hidrolisis 2,5 jam) yakni 2,89 (tidak suka sampai agak suka). Sedangkan nilai kesukaan warna flavor koro pedang terendah diperoleh pada perlakuan A1C3 (biduri dan papain 1:3 dan lama hidrolisis 3 jam) sebesar 2,46. Jadi warna yang disukai adalah warna yang cerah.

Rasa

Nilai kesukaan rasa flavor enhancer koro pedang yang telah ditambahkan pada produk sup berkisar antara 2,39 sampai dengan 3,04 (tidak suka sampai agak suka). Histogram nilai kesukaan rasa flavor enhancer dari koro pedang pada berbagai perbandingan enzim biduri dan papain serta konsentrasi dan lama hidrolisis tertera pada Gambar 52.

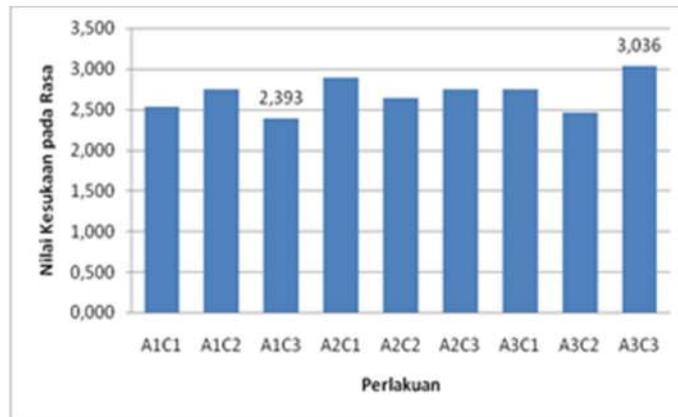


Gambar 52. Nilai Kesukaan Rasa Flavor Enhancer dari Koro Pedang pada Berbagai Perbandingan Enzim Biduri dan Papain serta Konsentrasi dan Lama Hidrolisis

Gambar 52 menunjukkan bahwa nilai kesukaan rasa flavor enhancer koro pedang yang telah ditambahkan pada sup didapatkan hasil tertinggi yakni 3,036 (agak suka sampai suka) pada perlakuan A3C3 (perbandingan biduri dan papain 3 : 3 dan lama hidrolisis 3 jam). Sedangkan nilai kesukaan rasa flavor enhancer koro pedang terendah yakni 2,393 (tidak suka sampai agak suka) diperoleh pada perlakuan A1C3 (perbandingan biduri : papain 1 : 3 dan lama hidrolisis 3 jam).

Aroma

Nilai kesukaan aroma flavor enhancer dari koro pedang yang telah ditambahkan pada sup berkisar antara 2,36 sampai 2,89 (tidak suka sampai agak suka) sebagaimana terlihat pada Gambar 53.



Gambar 53. Nilai Kesukaan Aroma Flavor Enhancer dari Koro Pedang pada Berbagai Perbandingan Enzim Biduri dan Papain serta Konsentrasi dan Lama Hidrolisis

Gambar 53 menunjukkan bahwa nilai kesukaan aroma flavor enhancer dari koro pedang yang telah ditambahkan pada sup didapatkan hasil tertinggi pada perlakuan A3C3 (perbandingan biduri : papain = 3 : 3 dan lama hidrolisis 3 jam) yakni 2,36 (tidak suka sampai agak suka). Nilai kesukaan aroma flavor enhancer koro pedang terendah yakni sebesar 2,89 (tidak suka sampai suka) diperoleh pada perlakuan A1C3 (perbandingan biduri : papain 1 : 3 dan lama hidrolisis 3 jam).

Perlakuan Terbaik

Berdasarkan hasil uji efektivitas (Galmo, Sullivan and Canada, 1984) menunjukkan bahwa flavor enhancer koro

pedang terbaik dihasilkan pada perlakuan A3B3C3 dengan kombinasi perbandingan biduri : papain 3 : 3, konsentrasi enzim 0,2% dan lama hidrolisis 3 jam. Hasil uji efektivitas pada empat perlakuan terbaik tertera pada Tabel 7.

Tabel 7. Nilai Efektivitas Empat Perlakuan Tertinggi

Parameter	Empat Perlakuan Tertinggi			
	A1B3C2	A2B3C1	A2B3C3	A3B3C3
Produk mailard	0.132	0.135	0.131	0.170
Kadar protein terlarut	0.120	0.158	0.189	0.157
Warna (tingkat kecerahan)	0.170	0.009	0.000	0.009
Organoleptik (warna)	0.063	0.113	0.050	0.088
Organoleptik (rasa)	0.094	0.132	0.094	0.170
Organoleptik (aroma)	0.111	0.081	0.121	0.151
Nilai Efektivitas	0.690	0.629	0.585	0.745

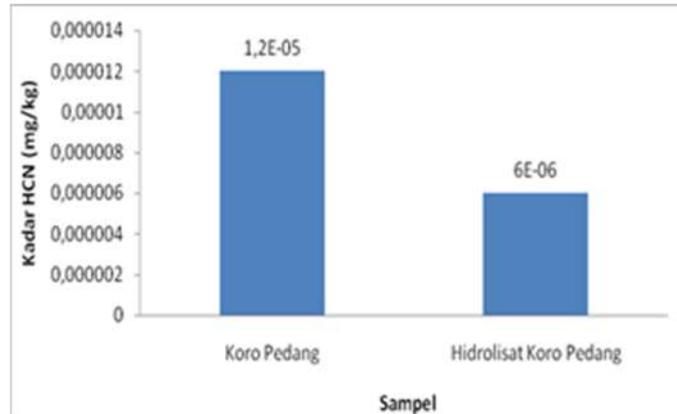
Tabel 7 menunjukkan bahwa nilai efektivitas tertinggi terletak pada perlakuan A3B3C3. Perlakuan tersebut menghasilkan flavor enhancer koro pedang dengan kadar protein terlarut sebesar 0,157, warna (tingkat kecerahan) sebesar 0,009 dan nilai kesukaan warna sebesar 0,088 dan total nilai efektivitasnya paling tinggi.

Kadar Asam Sianida

Secara umum adanya senyawa antigizi pada koro pedang akan menimbulkan cita rasa yang kurang disukai serta mengurangi bioavailabilitas nutrien di dalam tubuh (Akpapunam and Sefa-dedeh, 1997). Menurut Noor (1992) bahwa keracunan asam sianida ini menyebabkan muntah-muntah, pusing sampai mematikan. Mekanisme keracunan asam sianida (HCN) adalah tidak terjadinya proses oksidasi

dalam sel, karena asam sianida terikat erat pada enzim sitokrom. Dosis yang mematikan adalah 2-3 mg/kg.

Histogram kadar HCN pada koro pedang (tanpa diberi perlakuan) dan flavor enhancer koro pedang perlakuan optimal (perbandingan biduri dan papain 2 : 3 dengan konsentrasi enzim 0,2% pada lama hidrolisis 3 jam) dapat dilihat pada Gambar 54.



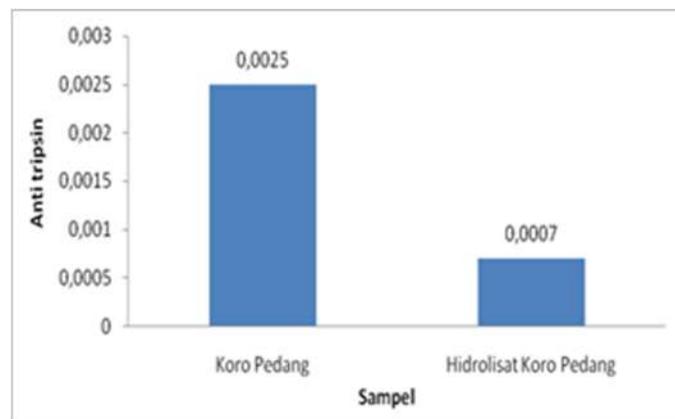
Gambar 54. Kadar Asam Sianida Koro Pedang dan Flavor enhancer Protein Koro Pedang

Gambar 54 menunjukkan bahwa koro pedang yang telah diberi perlakuan enzim biduri dan papain dengan rasio 2 : 3 sebanyak konsentrasi 0,2% dan lama hidrolisis 3 jam mengalami penurunan kadar HCN yang signifikan bila dibandingkan dengan koro pedang yang tanpa perlakuan yaitu dari 0,000012 mg/kg (untuk koro pedang sebelum perlakuan) menjadi 0,000006 mg/kg (untuk flavor enhancer koro pedang). Hal ini dikarenakan dengan perlakuan perendaman dan perebusan dapat mengurangi senyawa antigizi, termasuk HCN. Tahapan proses pembuatan flavor enhancer protein koro pedang di antaranya ialah perendaman selama 24 jam dan perebusan selama 20 menit,

hal ini sangat efektif untuk menurunkan kandungan HCN pada flavor enhancer koro pedang. Selama perendaman senyawa antigizi yang bersifat larut air banyak berkurang karena ikut terbangun bersama air rendaman dan perebusan. Menurut Matthews (1989) dan Winarno (1997), senyawa antigizi dapat rusak oleh adanya panas. Dengan demikian flavor enhancer koro pedang aman dikonsumsi karena kadar asam sianidanya jauh dibawah ambang batas.

Kadar Anti Tripsin

Histogram anti tripsin pada perlakuan optimal flavor enhancer koro pedang (yakni pada perbandingan enzim biduri dan papain 2 : 3 dalam konsentrasi enzim 0,2% dan lama hidrolisis selama 3 jam) dan koro pedang tanpa perlakuan dapat dilihat pada Gambar 55.



Gambar 55. Kadar Anti Tripsin Koro Pedang dan Flavor enhancer Koro Pedang

Gambar 55 menunjukkan bahwa koro pedang yang telah diberi perlakuan penambahan perbandingan enzim biduri dan papain (2 : 3) dengan jumlah enzim 0,2% dan lam hidrolisis 3 jam mengalami penurunan kadar anti tripsin yang cukup signifikan dibandingkan dengan koro pedang tanpa

perlakuan. Pada koro pedang tanpa perlakuan kadar anti tripsinnya 0,0025, sedangkan pada flavor enhancer koro pedang mengalami penurunan menjadi 0,0007. Hal ini karena perlakuan perendaman dan perebusan selama proses pembuatan flavor enhancer dapat mengurangi senyawa antigizi, di antaranya ialah anti tripsin. Menurut Liener dalam Muchtadi (1998) bahwa sebagian besar faktor anti nutrisi dapat dihilangkan dengan proses pemasakan. Perlakuan perebusan lebih efektif untuk menghancurkan anti tripsin dibandingkan dengan proses pengukusan. Pada proses flavor enhancer koro pedang dilakukan perendaman selama 24 jam dan perebusan selama 20 menit, hal ini sangat efektif menurunkan kadar anti tripsin pada flavor enhancer koro pedang yang dihasilkan.

Pengembangan Teknik Formulasi pada Produksi Savory Flavor

Preparasi Sampel

Penyediaan sampel untuk penelitian utama dilakukan dengan menggunakan satu formula yang dipilih dari tahap preparasi dan formula tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok dijadikan sebagai formula dasar (blanko). Formula blanko selanjutnya diberi kode sampel A sedangkan formula dengan penambahan flavor enhancer koro kratok diberi kode sampel B.

Bahan dasar yang digunakan untuk penelitian ini adalah flavor enhancer hasil modifikasi proses hidrolisis protein koro kratok secara enzimatis menggunakan enzim protease biduri sebagai eksopeptidase dengan bantuan enzim papain sebagai endopeptidase serta penambahan gula dan garam untuk memperkuat rasa. Enzim protease biduri memiliki sifat eksopeptidase yaitu dapat memecah ikatan peptida secara acak dari salah satu ujung protein,

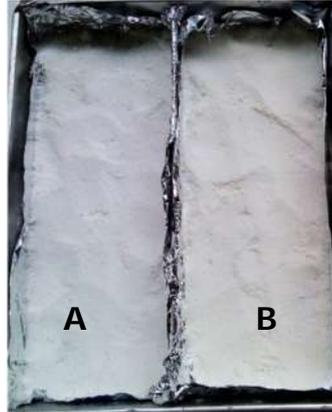
sedangkan enzim papain memiliki sifat endopeptidase yaitu dapat memecah ikatan peptida secara acak pada bagian tengah (dalam) rantai molekul protein, sifat-sifat ini apabila digabungkan dapat mempercepat proses hidrolisis. Flavor enhancer yang dihasilkan dari proses modifikasi hidrolisis enzimatik protein koro kratok tertera pada Gambar 56.



Gambar 56. Flavor Enhancer dari Flavor enhancer Protein Koro Kratok

Formulasi dilakukan untuk mencari pengganti komponen savory flavor (yang sulit didapatkan) dengan komponen lain yang sejenis dan mudah didapatkan, seperti filler yang pada formulasi asli adalah serbuk laktosa murni. Untuk mencari pengganti serbuk laktosa murni dilakukan variasi substitusi dengan serbuk susu sapi, serbuk susu kedelai dan maizena pada penelitian pendahuluan. Pengamatan dilakukan secara visual dan rasa dicicipi oleh lima orang panelis semi terlatih. Savory flavor dengan filler serbuk susu sapi maupun serbuk susu kedelai tidak menunjukkan hasil yang begitu baik karena dari segi rasa tidak disukai dan menjadi sangat mudah rusak, dari pengamatan visual yang telah dilakukan, savory flavor dengan filler serbuk susu sapi maupun susu kedelai sangat

mudah menggumpal dan menjadi lengket dalam 3 hari dengan wadah tertutup pada suhu ruang atau dapat dikatakan sangat mudah rusak, sedangkan formula dengan filler maizena memberikan hasil terbaik karena dari segi rasa lebih disukai dan secara visual lebih tidak mudah rusak. Formula dengan filler maizena kemudian dijadikan sampel pada penelitian utama.



Gambar 57. Savory Flavor tanpa Penambahan Flavor Enhancer Koro Kratok (A) dan dengan Penambahan Flavor Enhancer Koro Kratok (B)

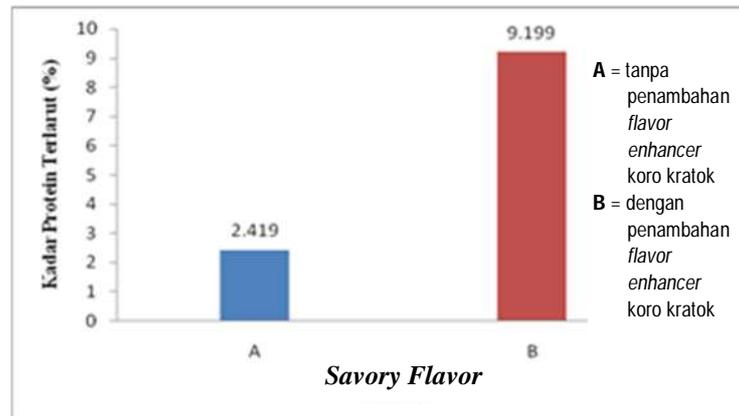
Gambar 57 memperlihatkan savory flavor tanpa (A) dan dengan penambahan flavor enhancer koro kratok (B) menunjukkan adanya sedikit perbedaan warna antara kedua sampel savory flavor. Savory flavor dengan penambahan flavor enhancer koro kratok memiliki warna sedikit lebih gelap dibandingkan dengan savory flavor tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok, hal ini dapat disebabkan oleh produk maillard pada savory flavor dengan penambahan flavor enhancer koro kratok lebih banyak dibandingkan dengan savory flavor tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok. Ukuran partikel kedua sampel

adalah sebesar 80 mesh, sehingga tekstur kedua sampel berbentuk serbuk halus.

Karakteristik pengeringan savory flavor dilakukan dengan memberikan variasi waktu pengeringan pada suhu dan ketebalan tetap dalam lima tingkatan waktu yaitu 0; 16; 20; 24 dan 28 jam. Data yang diperoleh dihitung untuk melihat hasil terbaiknya. Waktu pengeringan terbaik yang didapatkan yaitu selama 28 jam 20 menit. Lima variasi ketebalan dilakukan untuk mendapatkan ketebalan terbaik dalam pengeringan 28 jam 20 menit yaitu 0,5; 1; 1,5; 2 dan 2,5 cm. Data yang didapatkan dihitung untuk dilihat hasil terbaiknya. Data yang diperoleh menunjukkan ketebalan pengeringan terbaik pada suhu 45°C selama 28 jam 20 menit yaitu 0,5 cm.

Kadar Protein Terlarut Savory Flavor

Adanya protein terlarut menjadikan savory flavor memiliki sifat fungsional disamping perannya sebagai penyedap rasa pada snack. Selain memiliki rasa gurih, savory flavor yang dihasilkan juga berperan sebagai asupan protein untuk tubuh.



Gambar 58. Kadar Protein Terlarut Savory Flavor

Hasil analisa menunjukkan bahwa kadar protein terlarut savory flavor dengan (B) dan tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok (A) adalah sebesar 17,8% dan 11%. Kadar protein terlarut savory flavor dengan (B) dan tanpa penambahan falvor enhancer koro kratok (A) tertera pada Gambar 58.

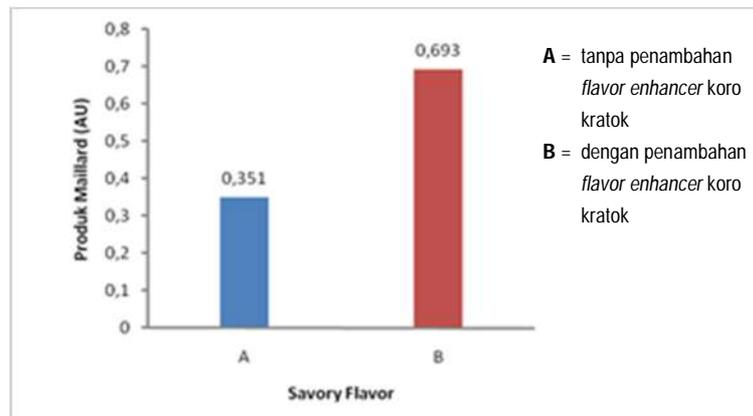
Savory flavor dengan penambahan flavor enhancer koro kratok memiliki kadar protein terlarut yang lebih tinggi dibandingkan dengan savory flavor tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok, hal ini dikarenakan penambahan flavor enhancer koro kratok yang berbahan utama flavor enhancer protein koro. Dengan demikian savory flavor dengan penambahan flavor enhancer koro kratok dapat dinilai lebih baik dari pada savory flavor tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok karena memiliki kadar protein terlarut lebih besar. Peningkatan kadar protein terlarut dapat dijadikan sebagai indikasi peningkatan nilai gizi pada savory flavor yang mengandung flavor enhancer koro kratok.

Produk Maillard Savory Flavor

Produk Maillard dianalisa dengan cara absorbansi. Reaksi Maillard merupakan reaksi antara gugus karbonil dan gugus amina primer (Heath dan Reineccius, 1986). Reaksi tersebut menghasilkan warna coklat yang dapat terbaca oleh spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm. Produk maillard savory flavor sebagaimana tertera pada Gambar 59.

Gambar 59 menunjukkan bahwa sampel A memiliki nilai maillard sebesar 0,35 AU sedangkan sampel B memiliki nilai maillard sebesar 0,69 AU. Sampel B memiliki produk maillard lebih besar dibandingkan dengan sampel A, hal ini dikarenakan di dalam flavor enhancer koro kratok yang ditambahkan pada sampel B terdapat kadar protein yang

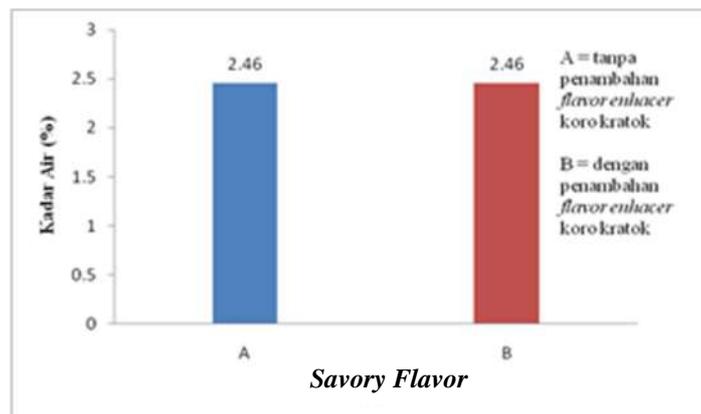
lebih besar sehingga memicu reaksi maillard yang lebih tinggi dan menghasilkan produk maillard lebih banyak.



Gambar 59. Produk Maillard Savory Flavor

Kadar Air Savory Flavor

Savory flavor dengan (B) maupun tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok (A) tertera pada Gambar 60.



Gambar 60. Kadar Air Savory Flavor

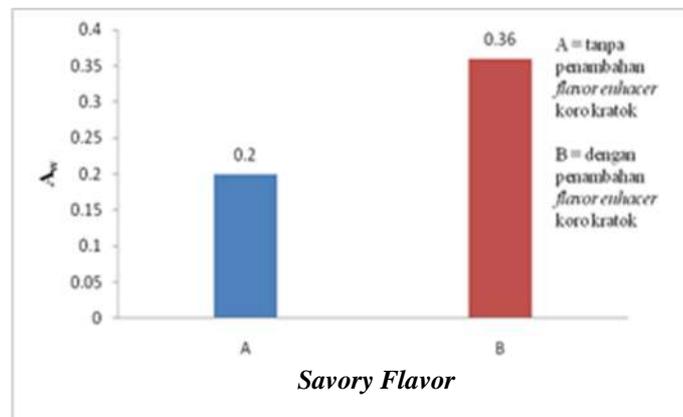
Hasil analisa menunjukkan bahwa baik pada savory flavor dengan maupun tanpa penambahan flavor enhancer

koro kratok terdapat kadar air sebesar 2,46%. Gambar 60 menunjukkan bahwa kadar air savory flavor dengan dan tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok relatif sama, karena tingkat kekeringan sampel kedua savory flavor sama maka keduanya memadai untuk dijadikan sampel penelitian.

Aktivitas Air (A_w) Savory Flavor

Aktivitas air (A_w) adalah jumlah air bebas yang dapat digunakan oleh mikroba untuk pertumbuhannya. Istilah aktivitas air digunakan untuk menjabarkan air yang tidak terikat atau bebas dalam suatu sistem yang dapat menunjang reaksi biologis dan kimiawi.

Hasil analisa menunjukkan bahwa savory flavor dengan dan tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok memiliki A_w secara berturut-turut sebesar 0,36 dan 0,20. Savory flavor dengan (B) dan tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok (A) tertera pada Gambar 61.



Gambar 61. Aktivitas Air (A_w) Savory Flavor

Nilai A_w minimum untuk pertumbuhan bakteri adalah sebesar 0,90; khamir sebesar 0,88 dan kapang sebesar 0,80 (Jay *et al.*, 2005). Histogram di atas menunjukkan bahwa kedua sampel memiliki A_w lebih rendah dari nilai A_w minimum

yang diperlukan oleh mikroorganisme untuk tumbuh, selain itu kedua sampel juga memiliki kandungan garam tinggi yang merupakan kondisi hipertonik bagi mikroorganisme dan dapat mencegah pertumbuhan mikroorganisme hingga kematian. Oleh karena itu bila terjadi kerusakan pada kedua savory flavor tersebut akan lebih dahulu disebabkan oleh kerusakan fisik diiringi oleh kerusakan kimia dan biologis.

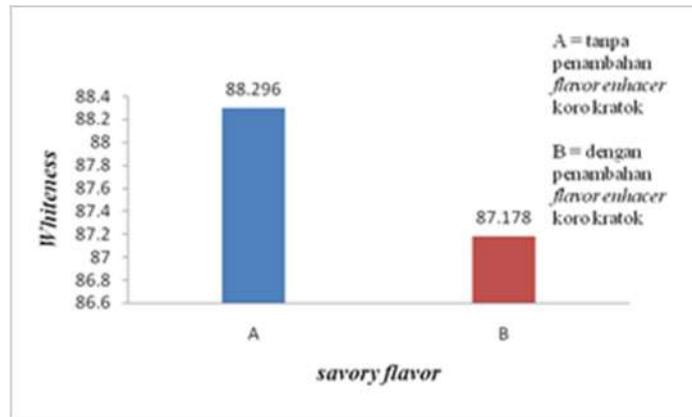
Tingkat Ketengikan (Rancidity) Savory Flavor

Ketengikan disebabkan oleh otooksidasi radikal asam lemak tidak jenuh dalam lemak. Molekul-molekul lemak yang mengandung radikal asam lemak tidak jenuh mengalami oksidasi dan menjadi tengik. Bau tengik yang tidak sedap tersebut disebabkan oleh pembentukan senyawa-senyawa hasil pemecahan hidropersida.

Tingkat ketengikan dianalisa dengan metode angka peroksida. Hasil analisa menunjukkan bahwa angka peroksida baik pada savory flavor dengan maupun tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok adalah 0 m.eq artinya kedua savory flavor tidak tengik. Hal ini dapat dikarenakan oleh kandungan asam lemak tidak jenuh pada kedua savory flavor belum mengalami proses otooksidasi yang menjadi penyebab ketengikan, sehingga kedua sampel belum mengalami ketengikan.

Warna (Whiteness) Savory Flavor

Analisa warna dilakukan dengan menggunakan color reader untuk mengukur whiteness sampel. Nilai whiteness savory flavor dengan dan tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok secara berturut-turut adalah sebesar 87,178 dan 88,296. Warna savory flavor dengan (B) dan tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok (A) dapat dilihat pada Gambar 62.



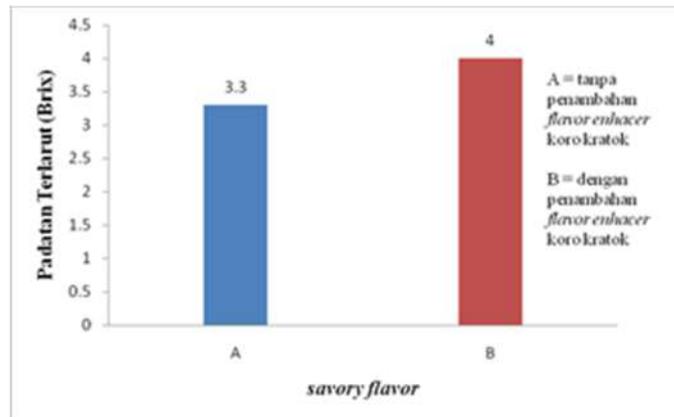
Gambar 62. Warna Savory Flavor

Gambar 62 menunjukkan bahwa savory flavor tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok memiliki nilai whiteness lebih besar dari pada savory flavor dengan penambahan flavor enhancer koro kratok artinya savory flavor tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok lebih putih dibandingkan dengan yang ditambahkan flavor enhancer koro kratok. Hal ini dapat disebabkan oleh produk maillard yang terdapat pada savory flavor dengan penambahan flavor koro kratok lebih besar dari pada savory flavor tanpa penambahan flavor koro kratok. Reaksi maillard menghasilkan warna kecoklatan pada sampel sehingga mengurangi derajat putih (whiteness) pada sampel.

Total Padatan Terlarut Savory Flavor

Total padatan terlarut dianalisa untuk mengetahui seberapa besar serbuk sampel yang dapat terlarut dalam air. Hal ini terkait erat dengan seberapa kuat rasa dari savory flavor dapat dirasakan oleh lidah, semakin besar total padatan terlarut maka rasa dari savory flavor semakin kuat terasa oleh lidah.

Total padatan terlarut savory flavor dengan dan tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok adalah sebanyak 4 dan 3,3 brix. Histogram total padatan terlarut savory flavor dengan (B) dan tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok (A) tertera pada Gambar 63.



Gambar 63. Total Padatan Terlarut Savory Flavor

Gambar 63 menunjukkan bahwa savory flavor dengan penambahan flavor enhancer koro kratok memiliki total padatan terlarut lebih besar dari pada savory flavor tanpa penambahan flavor koro kratok, hal ini dapat disebabkan oleh kandungan flavor enhancer yang ditambahkan pada savory flavor memiliki komponen-komponen yang dapat terlarut dalam air.

Daya Lekat Savory Flavor

Savory flavor yang sering digunakan pada makanan ringan adalah racikan bumbu penambah rasa yang berupa serbuk. Ukuran partikel savory flavor cukup kecil agar mudah ditaburkan pada suatu sajian snack. Bumbu tabur diharapkan sebanyak-banyaknya dapat melekat pada permukaan snack.

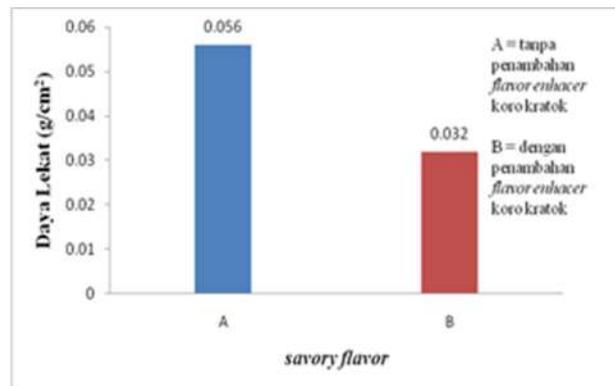
Daya lekat yang dianalisa merupakan daya lekat savory flavor pada snack. Prinsip dari metode penetapan daya lekat savory flavor ini adalah dengan menetapkan jumlah berat (gram) savory flavor yang melekat pada setiap cm^2 snack. Penetapan luas permukaan snack dilakukan dengan cara mengukur rata-rata densitas dan ketebalan snack. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa densitas snack sebesar $0,86 \text{ g/cm}^3$ dan ketebalan rata-rata snack sebesar $0,05 \text{ cm}$. Luas permukaan dapat dihitung dengan persamaan (1).

$$Ls = \frac{ws}{\rho_s ts} \times 2 \dots\dots\dots(1)$$

Keterangan:

- Ls = luas snack (cm^2)
- ws = berat snack (g)
- ρ_s = densitas snack (g/cm^3)
- ts = tinggi snack (cm)

Hasil analisa menunjukkan bahwa daya lekat savory flavor dengan dan tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok adalah sebesar $0,032 \text{ g/cm}^2$ dan $0,056 \text{ g/cm}^2$. Savory flavor dengan dan tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok terlihat pada Gambar 64.



Gambar 64. Daya Lekat Savory Flavor pada Snack

Daya lekat savory flavor dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu ukuran partikel, tingkat kebasahan, tingkat kekasaran dan muatan permukaan.

a. Ukuran partikel

Materi savory flavor berupa serbuk halus dengan ukuran partikel yang sangat kecil, semakin kecil ukuran partikel maka semakin besar luas permukaan untuk tiap volume atau berat savory flavor yang akan melekat pada snack. Semakin luas permukaan savory flavor maka semakin luas pula area kontak permukaan antara savory flavor dengan makanan ringan yang ditaburi, oleh sebab itu ukuran partikel savory flavor merupakan salah satu faktor yang menentukan kemampuan lekat savory flavor. Ukuran partikel yang semakin besar menurunkan kemampuan lekat karena luas permukaan yang lebih kecil dan berat partikel yang besar.

b. Tingkat kebasahan

Tingkat kebasahan permukaan partikel dan permukaan snack menentukan daya lekat savory flavor. Semakin besar tingkat kebasahan maka semakin besar pula daya lekat savory flavor dengan syarat bahwa kebasahan savory flavor dan snack disebabkan oleh bahan yang kompatibel. Kebasahan yang disebabkan oleh bahan yang tidak kompatibel pada savory flavor dan snack menyebabkan penurunan daya lekat savory flavor.

c. Tingkat kekasaran

Tingkat kekasaran permukaan snack merupakan faktor yang menentukan daya lekat savory flavor. Semakin kasar permukaan snack, semakin luas permukaan snack tersebut, sehingga meningkatkan jumlah kontak permukaan yang dapat dilekati oleh savory flavor.

d. Muatan permukaan

Muatan permukaan yang saling berlawanan memberikan tambahan daya lekat savory flavor, secara umum dapat

dinyatakan bahwa semakin besar beda elektronegatifitas kedua permukaan, semakin besar pula tambahan daya lekat savory flavor tersebut terhadap snack yang ditaburi savory flavor.

Gambar 64 menunjukkan bahwa savory flavor tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok memiliki daya lekat lebih besar dari pada savory flavor dengan penambahan flavor enhancer koro kratok, namun demikian dalam penerapannya di industri daya lekat savory flavor merupakan faktor yang penting untuk diperhitungkan efisiensi penggunaannya. Tabel 8 menunjukkan data untuk menghitung efisiensi daya lekat savory flavor.

Tabel 8. Data Pengamatan Efisiensi Daya Lekat Savory Flavor dengan dan tanpa Penambahan Flavor Enhancer Koro Kratok

Rata-rata	Savory flavor dengan penambahan flavor enhancer koro kratok	Savory flavor tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok
A	10.09033	10.06367
BL	6.916	6.633333
C	20.06033	20.06033
Esv	34,47%	33,07%

Keterangan:

A = Berat snack (g)

BL = Savory flavor yang melekat pada snack (g)

C = Total savory flavor yang ditaburkan (g)

Esv = Efisiensi daya lekat savory flavor

Jumlah savory flavor yang melekat pada tiap gram snack dihitung dengan persamaan (2).

$$\Sigma BLs = \frac{BL}{A} \dots\dots\dots (2),$$

Jika ΣBLs adalah jumlah savory flavor yang melekat pada snack ($\frac{g \text{ savory flavor}}{g \text{ snack}}$). Efisiensi daya lekat savory flavor dapat dihitung menggunakan persamaan (3).

$$Esv = \frac{BL}{c} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

Hasil analisa menunjukkan bahwa efisiensi daya lekat savory flavor dengan dan tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok secara berturut-turut adalah sebesar 34,47% dan 33,07%. Efisiensi dapat ditingkatkan dengan mengurangi jumlah savory flavor yang ditaburkan, namun dalam penerapannya di industri, berat savory flavor yang ditaburkan pada snack perlu dilebihkan dalam batas-batas yang ditentukan untuk mempermudah pencampuran.

Daya Simpan Savory Flavor

Savory flavor memiliki daya simpan tertentu seperti pada produk pangan lainnya. Savory flavor yang telah mengalami granulasi dapat dikatakan kadaluwarsa secara fisik karena proses granulasi dipicu oleh meningkatnya kadar air dalam bahan pangan serbuk selama penyimpanan. Kadar air yang semakin tinggi dapat menyebabkan terjadinya proses kimia seperti hidrolisis. Oleh karena itu, peningkatan kadar air pada savory flavor dapat dijadikan indikasi waktu kadaluwarsa savory flavor secara kimiawi.

Pengamatan terhadap peningkatan kadar air sampel dilakukan dengan mempercepat proses penyerapan air oleh sampel. Pengamatan dilakukan dengan meratakan 5-10 gram sampel diatas alas alumunium foil yang disimpan di dalam sebuah *chamber* dengan keadaan jenuh oleh uap air pada suhu 30°C.

Analisa daya simpan savory flavor dilakukan dengan metode *days until caking* (DUC). Days until caking didefinisikan sebagai waktu hingga kondisi partikel tepung

tidak dapat lagi memisah seperti semula dan berubah menjadi lengket antara satu dengan lainnya meskipun diaduk dan dituangkan (Arpah dkk, 2002). Data perubahan berat selama 10 hari penyimpanan tertera pada Tabel 9.

Tabel 9. Berat Savory Flavor tanpa (A) dan dengan Penambahan Flavor Enhancer Koro Kratok (B)

Savory	Berat Hari Ke (gram)										
Flavor	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	2,5	3,1	3,8	5,5	7,0	8,7	11	11	14	19	19
B	2,5	3,4	4,7	7,7	7,7	8,4	8,4	11	15	23	25

Penambahan berat disebabkan oleh adanya serapan air oleh sampel dari udara selama penyimpanan. Serapan air tersebut mengakibatkan terjadinya perubahan fisik seperti aglomerasi. Aglomerasi didefinisikan sebagai proses pembesaran ukuran, dimana material awal yang berbentuk partikel halus seperti debu akan saling tergabung atau terikat satu sama lain, sehingga menghasilkan struktur agregat berpori yang berukuran jauh lebih besar dari pada material awal (Ortega and Rivas, 2005). Adanya aglomerat hasil proses aglomerasi pada sampel dapat diamati dengan cara pengayakan.

Daya simpan dengan metode *DUC* menggunakan sampel dalam gram berat kering. Air yang diserap oleh setiap 100 g berat kering sampel, dapat dihitung dengan persamaan (4), (5) dan (6).

$$W_k = W_s - \frac{k_a}{100} W_s \dots\dots\dots (4),$$

$$W_a = \frac{k_a}{100} W_s \dots\dots\dots(5),$$

$$W_{a100} = \frac{100}{W_k} W_a \dots\dots\dots (6).$$

Keterangan:

Wk = Berat kering (g)

- Ws = Berat sampel (g)
 Ka = Kadar air berat kering
 Wa = Jumlah air yang diserap (g)
 Wa₁₀₀ = Jumlah air yang dalam 100 gram berat kering (g)

Daya simpan dapat dihitung dengan persamaan (7).

$$Q = \frac{\ln \left[\frac{m_c - m_i}{m_e - m_c} \right]}{\frac{k A P_0}{x Wk b}} \dots\dots\dots (7)$$

Keterangan:

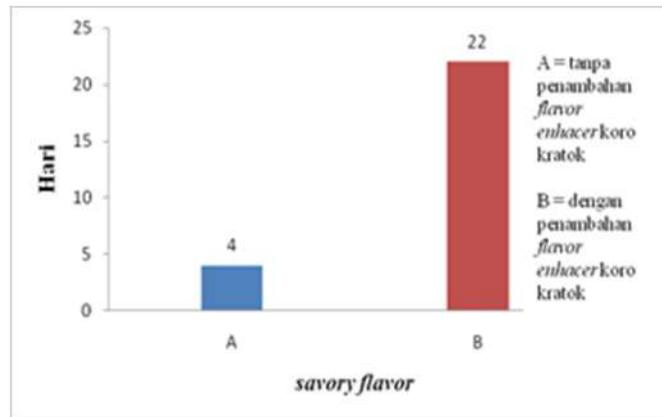
- Q = waktu kadaluwarsa (hari)
 m_e = kadar air kesetimbangan (% Wk)
 m_i = kadar air awal (% Wk)
 m_c = kadar air kritis (kadar air pada titik DUC)
 Wk = berat kering bahan (g)
 A = luas permukaan kemasan (cm²)
 k/x = permeabilitas uap air kemasan (g/m². Hari. mmHg)
 P₀ = tekanan uap jenuh (mmHg)
 b = slope kurfa sorpsi isothermis

Data perhitungan daya simpan dengan metode *DUC* sebagaimana tertera pada Tabel 10.

Tabel 10. Data Perhitungan Daya Simpan Savory Flavor

Faktor	Savory Flavor A	Savory Flavor B
Mc	21.7	28.48
Mi	2.52	2.52
Mk	11.165	26.61
k/x	1	1
A	6.9	6.88
Wk	100	100
P0	0.3	0.3
b	0.155	0.175
Q	4	22

Tabel 10 menunjukkan bahwa daya simpan tanpa kemasan savory flavor dengan dan tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok adalah 22 dan 4 hari. Daya simpan savory flavor dengan dan tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok terlihat pada Gambar 65.



Gambar 65 Daya Simpan Savory Flavor

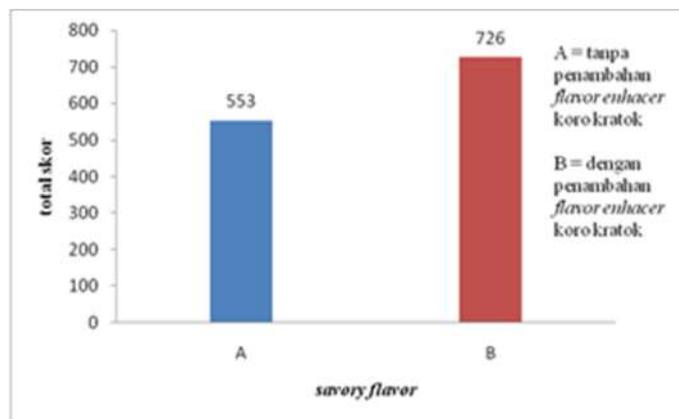
Gambar 65 menunjukkan bahwa savory flavor dengan penambahan flavor enhancer koro kratok memiliki daya simpan yang lebih lama dari pada savory flavor tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok, hal ini dapat dikarenakan flavor enhancer koro kratok bersifat tidak higroskopis, sehingga dapat mengurangi serapan air atau dapat dikatakan dapat berfungsi sebagai anti kempal.

Sifat Sensoris

Evaluasi sensori adalah suatu metode ilmiah yang digunakan untuk mengukur, menganalisis, dan menginterpretasikan respon terhadap suatu produk berdasarkan yang ditangkap oleh indera manusia, seperti penglihatan, penciuman, perasa, peraba, dan pendengaran.

Sifat-sifat sensori pada penelitian ini dievaluasi menggunakan metode deskriptif. Uji deskriptif didesain untuk

mengidentifikasi dan mengukur sifat-sifat sensori. Dalam kelompok pengujian ini dimasukkan rating atribut mutu dimana suatu atribut mutu dikategorikan dengan suatu kategori skala (suatu uraian yang menggambarkan intensitas dari suatu atribut mutu) atau dapat juga besarnya suatu atribut mutu diperkirakan berdasarkan salah satu sampel, dengan menggunakan metode skala rasio. Uji deskriptif terdiri atas Uji Pemberian skor atau pemberian skala. Kedua uji ini dilakukan dengan menggunakan pendekatan skala atau skor yang dihubungkan dengan deskripsi tertentu dari atribut mutu produk. Dalam sistem pemberian skor, angka digunakan untuk menilai intensitas produk dengan susunan meningkat atau menurun. Uji sensori pada penelitian ini meliputi rasa, warna dan aroma.



Gambar 66. Total Skor Uji Sensori Savory Flavor

Sifat sensori dievaluasi menggunakan 20 panelis semi terlatih. Panelis menilai intensitas atribut savory flavor yang telah ditentukan dengan cara memberi skor pada masing-masing atribut. Atribut sensori yang dievaluasi masing-masing diberi bobot nilai yang diasumsikan sebagai bobot nilai keseluruhan untuk kemudian diperhitungkan dengan

skor yang diberikan oleh panelis. Bobot nilai keseluruhan masing-masing atribut sampel yaitu 4 untuk rasa, 3 untuk aroma dan 2 untuk warna. Jumlah bobot nilai yang lebih besar mengindikasikan bahwa salah satu savory flavor lebih baik dari savory flavor lainnya secara keseluruhan. Histogram sifat sensori savory flavor dengan dan tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok tertera pada Gambar 66.

Gambar 66 menunjukkan bahwa savory flavor tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok memiliki jumlah bobot nilai untuk warna sebesar 90, rasa sebesar 244 dan aroma sebesar 219, sedangkan savory flavor dengan penambahan flavor enhancer koro kratok memiliki jumlah bobot nilai untuk warna sebesar 154, rasa sebesar 268 dan aroma 304, sehingga jumlah bobot nilai keseluruhan untuk semua atribut pada savory flavor dengan dan tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok adalah sebesar 553 (sampel A) dan 726 (sampel B). Jumlah bobot nilai keseluruhan untuk semua atribut pada savory flavor dengan penambahan flavor enhancer koro kratok lebih besar dari pada savory flavor tanpa penambahan flavor enhancer koro kratok, oleh karena itu dapat dikatakan bahwa savory flavor dengan penambahan flavor enhancer koro kratok memiliki sifat sensori yang lebih baik.

Hasil Pengembangan Teknik Formulasi pada Uji Coba Pembuatan Garam Sedap Hasil Hidrolisis Ikan Kuwe

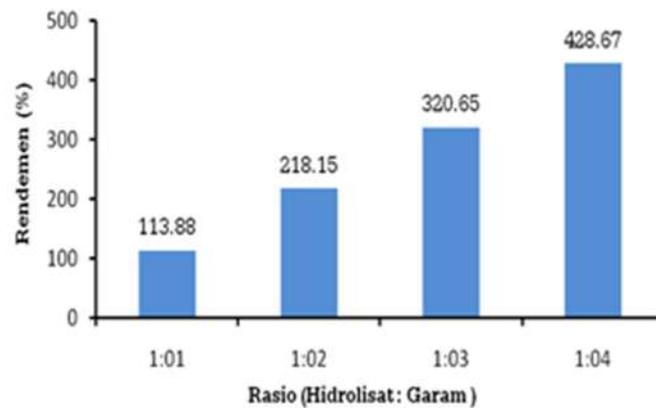
Merujuk dari hasil penelitian sebelumnya (Witono dkk., 2013) diperoleh informasi bahwa hidrolisis ikan kuwe dengan konsentrasi 0,2% dan lama hidrolisis 120 menit diperoleh flavor enhancer dengan kadar protein terlarut dan nilai produk maillard yang relatif lebih tinggi. Selanjutnya ditentukan formula garam sedap yang paling tepat dengan menelaah 4 level rasio flavor enhancer ikan kuwe dan

garam: 1:1, 1:2, 1:3 dan 1:4. Sedangkan parameter yang diamati meliputi rendeman, kadar protein terlarut dan nilai produk maillard garam sedap yang dihasilkan.

Tabel 11. Rendemen Garam Sedap Alami dengan berbagai Rasio Flavor Enhancer Ikan Kuwe dan Garam

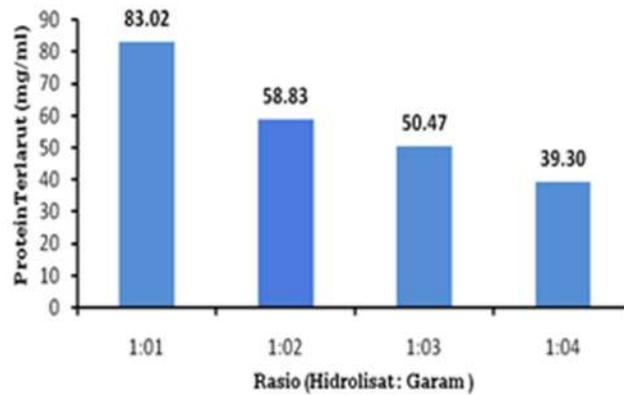
Perlakuan	Berat Ikan	Berat Produk	Rendemen (%)
1 : 1	10	11.388	113.88
1 : 2	10	21.815	218.15
1 : 3	10	32.065	320.65
1 : 4	10	42.867	428.67

Rendemen garam sedap alami yang dihasilkan dengan rasio flavor enhancer ikan kuwe dan garam tertera pada Tabel 11 yang menunjukkan bahwa semakin besar rasio penambahan garam terhadap flavor enhancer ikan kuwe, maka rendemennya semakin tinggi. Perbandingan flavor enhancer ikan dengan garam 1 : 4 menghasilkan rendemen paling tinggi disusul perbandingan flavor enhancer ikan dengan garam 1 : 3, 1 : 2 dan 1 : 1. Sebagaimana juga tertera pada Gambar 67.



Gambar 67. Rendemen Garam Sedap pada berbagai Rasio Flavor enhancer Ikan dan Garam

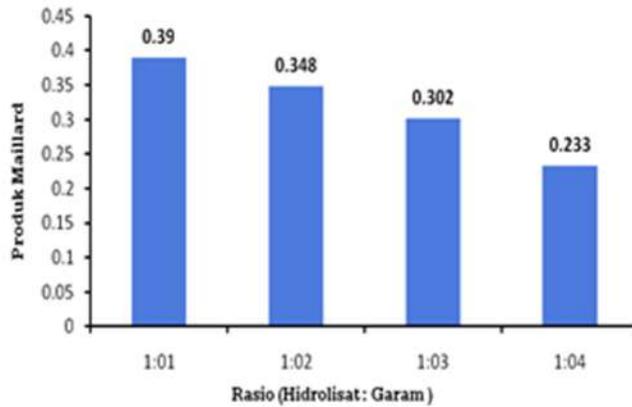
Sementara itu, kadar protein terlarut garam sedap hasil hidrolisis ikan kuwe dengan berbagai rasio flavor enhancer ikan dan garam tertera pada Gambar 68.



Gambar 68. Kadar Protein Terlarut Garam Sedap pada berbagai Rasio Flavor enhancer Ikan dan Garam

Gambar 68 menunjukkan bahwa perbandingan flavor enhancer ikan kuwe dengan garam 1 : 1 menghasilkan garam sedap dengan kadar protein terlarut paling tinggi dibanding perlakuan lainnya. Semakin besar penambahan garam dihasilkan garam sedap dengan kadar protein terlarut semakin rendah, karena kadar protein hanya dipengaruhi oleh ikan bukan garam, sehingga semakin besar garam rasio protein terlarut terhadap total produk yang dihasilkan semakin rendah.

Produk maillard garam sedap hasil hidrolisis ikan kuwe dengan berbagai rasio flavor enhancer ikan dan garam dapat dilihat pada Gambar 69.



Gambar 69. Produk Maillard Garam Sedap dengan Rasio Flavor Enhancer Ikan Kuwe dan Garam

Produk maillard mempunyai pola yang sama dengan kadar protein terlarut garam sedap. Semakin besar perbandingan ikan dengan garam maka semakin kecil produk maillard yang dihasilkan. Hal ini karena reaksi maillard terjadi antara gugus karbonil dari gula dengan gugus amina dari protein, garam maupun derivatnya bukan merupakan prekursor terjadinya reaksi maillard. Oleh karena itu semakin besar garam yang ditambahkan, rasio produk maillard terhadap total produk semakin rendah.

Produksi dan Karakterisasi Hidrolisat Protein dari Ikan Bibisan (*Apogon albimaculosus*) sebagai Indigenous Flavor Hasil Modifikasi Proses Hidrolisis Enzimatis Menggunakan Protease Biduri

Komponen Proksimat

Analisis proksimat hidrolisat protein ikan bibisan meliputi kadar air, protein, lemak, dan abu. Pengamatan komposisi kimia ikan hidrolisat protein bibisan sebagaimana disajikan pada Tabel 12.

Tabel 12. Komposisi Kimia Hidrolisat Protein Ikan Bibisan

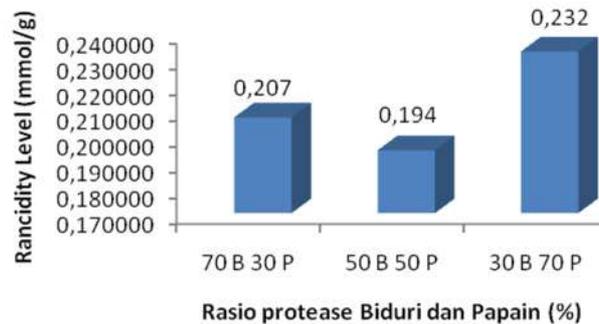
Rasio Biduri: Papain (%)	Kadar Air (%)	Kadar Lemak (%)	Kadar Abu (%)	Kadar Protein (%)
70B30P	9.763 ±0.001	0.033 ±0.0004	5.468 ±0.0006	41.908
50B50P	10.826 ±0.003	0.0335 ±0.0007	2.715 ±0.0046	34,324
30B70P	10.454 ±0.001	0.0371 ±0.0064	2.468 ±0.0054	34,615

Penelitian ini mengkombinasikan enzim papain dan biduri untuk mendapatkan hidrolisat protein yang optimal. Hasilnya analisa dinyatakan sebagai nilai rata-rata dan direpresentasikan dalam Tabel 12. Hidrolisat protein ikan menunjukkan air rendah (9-10%) dan lemak sangat rendah (0.03%). Kandungan protein sekitar 34-41% yang lebih rendah dari hasil sebelumnya. Ovisspour melaporkan bahwa protein hidrolisat tuna berkisar 70-80%. Hidrolisat protein terliofilisasi dari raja ikan menunjukkan kadar protein sekitar 85,57%. Hal ini mungkin karena perbedaan jenis enzim yang digunakan, waktu inkubasi dan metode analisis yang digunakan untuk estimasi.

Tingkat Ketengikan

Konsentrasi protease biduri dan papain serta lama hidrolisis berpengaruh terhadap tingkat ketengikan hidrolisat protein ikan yang dihasilkan. Histogram ketengikan hidrolisat ikan pada berbagai konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisis tertera pada Gambar 70. Tingkat ketengikan hidrolisat ikan berkisar 0,19 sampai 0,23 mmol/kg. Semakin besar konsentrasi protease biduri, maka tingkat ketengikan

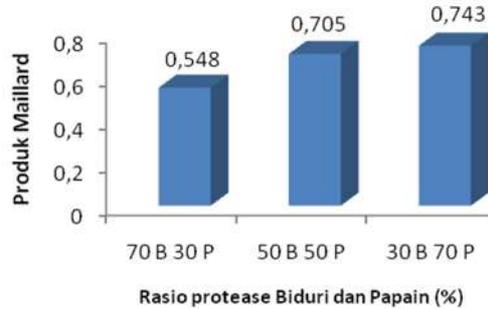
(nilai TBA) hidrolisat protein ikan yang dihasilkan semakin menurun. Peningkatan proporsi enzim biduri menyebabkan terjadinya peningkatan produk maillard diduga dapat menurunkan tingkat oksidasi karena oksigen sulit menetrasi.



Gambar 70. Tingkat Ketengikan Hidrolisat Ikan Bibisan

Produk Reaksi Maillard

Reaksi maillard terjadi antara gula reduksi dengan gugus amina primer. Gugus amina diperoleh dari hasil pemecahan protein yang ada secara alami pada bahan. Nilai maillard hidrolisat ikan pada berbagai konsentrasi sekitar 0,54-0,74. Produk maillard dinyatakan dalam absorbansi unit. Semakin tinggi absorbansi maka produk maillard semakin tinggi sebagaimana diperlihatkan oleh Gambar 71.



Gambar 71. Produk Reaksi Maillard Hidrolisat Ikan Bibisan

Gambar 71 menunjukkan bahwa semakin besar proporsi enzim papain dalam campuran enzim maka nilai produk reaksi maillard hidrolisat ikan yang dihasilkan cenderung semakin tinggi. Hal ini terjadi karena aktivitas enzim papain semakin tinggi sehingga memperbanyak protein rantai pendek dan meningkatkan gugus amina primer. Semakin banyak ikatan peptida yang dihidrolisis dengan demikian gugus amina primer yang dihasilkan semakin banyak. Reaksi maillard merupakan reaksi antara gugus karbonil dan gugus amina primer (Witono *et al.*, 2007b). Dengan demikian semakin banyak konsentrasi enzim, reaksi maillard yang terjadi semakin meningkat.

Derajat Hidrolisis

Derajat hidrolisis (DH) didefinisikan sebagai persentase ikatan peptida yang terpotong, sebagai salah satu parameter dasar yang menggambarkan sifat-sifat hidrolisat protein (Silizyte *et al.*, 2005). DH merupakan faktor penting, yang dapat mempengaruhi berat molekul, jumlah dan komposisi asam amino bebas, sifat fungsional dan gizi hidrolisat. Tabel 13 menunjukkan perkembangan hidrolisis enzimatis ikan bibisan menggunakan kombinasi enzim biduri dan papain selama 1,5 jam. DH meningkat dengan meningkatnya waktu hidrolisis. Kombinasi biduri dan papain dengan penambahan papain terbanyak yaitu 70% semakin meningkatkan degree of hydrolysis. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya (Lee, 2011) yang menyatakan bahwa semakin meningkatnya penambahan papain pada hidrolisat ikan akan meningkatkan derajat hidrolisat.

Table 13. Derajat Hidrolisis dari Hidrolisat Protein Ikan Bibisan

Rasio Biduri: Papain (%)	Waktu (jam)	DH (%)
70 B 30 P	0,5	6,77±0.023
	1	7,43±0.058
	1,5	9,35±0.143
50 B 50 P	0,5	6,92±0.065
	1	7,69±0.175
	1,5	9,52±0.021
30 B 70 P	0,5	7,34±0.148
	1	9,15±0.105
	1,5	11,98±0.024

Sifat Fisik dan Fungsional

Analisa sifat fisik hidrolisat protein dari ikan bibisan meliputi rendemen dan warna. Dari hasil analisa didapatkan, semakin banyak penambahan kombinasi enzim biduri maka rendemen yang dihasilkan juga semakin banyak. Rendemen hidrolisat protein dari ikan bibisan berkisar antara 13,542 hingga 18,165%. Hal ini berhubungan dengan peningkatan komponen hasil hidrolisis seperti padatan terlarut, asam amino, dan komponen lainnya. Warna pada hidrolisat protein ikan bibisan, menunjukkan semakin berkurang dengan penambahan enzim biduri dan enzim papain maka warna hidrolisat semakin tidak cerah. Hasil tersebut dapat dilihat pada nilai L (*Lightness*) Tabel 14.

Tabel 14. Sifat Fisik Hidrolisat Protein Ikan Bibisan

Rasio Biduri : Papain (%)	Rendemen (%)	Warna		
		L	a	B
70B:30P	28,99	47,9	8,9	26,0
50B:50P	21,03	45,7	9,4	27,2
30B:70P	20,66	45,4	9,5	27,4

Sifat fungsional yang diamati adalah *water holding capacity* (WHC) dan *oil holding capacity* (OHC). Kapasitas

penyerapan air dan minyak digunakan untuk mengukur besarnya kemampuan menyerap air dan minyak yang ditentukan dengan cara sentrifugasi. Kapasitas penyerapan air paling besar yaitu pada hidrolisat dengan konsentrasi penambahan biduri dan papain yang sama. Kapasitas penyerapan air dipengaruhi oleh kandungan protein, dimana protein memiliki sifat hidrofilik dan hidrofobik. Tetapi karbohidrat juga pernah dilaporkan mempengaruhi kapasitas penyerapan air bahan (Appiah *et al.*, 2011).

Tabel 15. Sifat Fungsional Hidrolisat Ikan Bibisan

Rasio Biduri : Papain (%)	OHC (%)	WHC (%)
70B : 30P	78,26±0.0983	90,89±0.0102
50B : 50P	68,06±0.0823	103,32±0.0147
30B : 70P	80,09±0.0658	89,01±0.0529

Sesuai dengan hasil pengamatan WHC, kecenderungan yang sama untuk pengamatan hidrolisat protein ikan dalam penyerapan air dari 89.01 sampai 103,32% dari sampel dalam enzim kombinasi yang berbeda (Tabel 15). Sedangkan kapasitas penyerapan minyak paling tinggi juga pada sampel dengan perbandingan yang sama antara kedua enzim. Kapasitas penyerapan minyak yang besar dapat meningkatkan flavor dan *mouth feel* pada makanan.

Kebaharuan yang dicapai meliputi: (1) hidrolisat spesifik hasil proses enzimatis menggunakan protease biduri dari bahan-bahan lokal (seperti: kedelai, koro kratok, ayam kampung, ikan 'kuwe') dan ikan-ikan inferior (bernilai ekonomi rendah) lainnya yang berpotensi sebagai indigenous flavor enhancer alami; (2) teknik hidrolisis enzimatis pengembangan indigenous flavor dari bahan-bahan lokal yang diproses dengan protease yang juga berasal dari sumber alam lokal Indonesia; (3) teknik modifikasi proses hidrolisis enzimatis dari protease biduri untuk formulasi flavor enhancer dari bahan alami dengan mengintegrasikan penggunaan papain, penambahan sistein dan gelatin; (4) savory flavor spesifik dari koro kratok dan ikan-ikan inferior yang berpotensi sebagai flavor yang memiliki daya simpan lebih tinggi dan bersifat multiguna untuk makanan.

Hasil-hasil kajian ini selanjutnya perlu dikembangkan dan diterapkan lebih lanjut untuk proses industri flavor komersial dengan memanfaatkan sumber-sumber flavor dari alam lokal di Indonesia menggunakan enzim protease biduri yang juga berasal dari Indonesia. Dengan penerapan ini, diharapkan akan mendorong penggalian sumber-sumber flavor baru yang lebih murah, aman dan bersifat multiguna, serta akan berdampak terhadap upaya pengurangan ketergantungan produk flavor yang diperoleh secara impor. Beberapa temuan yang telah diuraikan dalam buku ini dapat dijadikan dasar dengan melakukan penyesuaian dan pengembangan untuk produksi skala industri.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, S, Rahman, A.F.M.A., Mustafa, M.G., Hossain, M.B., and Naha N. 2012. Nutrient composition of indigenous and exotic fishes of rainfed waterlogged paddy fields in Lakshmipur, Bangladesh. *World J. Zoo.* 7 (2): 135-140,
- Anin. 2010. Peranan Garam NaCl terhadap Mutu. WWW Shvoong [serial on line]. <http://id.shvoong.com/exact-sciences/1963977-peranan-garam-nacl-terhadap-mutu/>.
- Anonim, 2000. *Hidrolisis Enzimatis Protein pada Pembuatan Flavor Hewani Alami*. Laporan Penelitian. FTP UNEJ dan PT. Sentrafood Indonusa Corporation. Jember.
- AOAC, 1997. *Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemist*. 14th ed. AOAC. Inc. Arlington. Virginia.
- Appiah,F., Asibuo, J.Y., Kumah, P. 2011. Phsycochemical and Functional Properties of Bean Flours of Three Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) Varieties in Ghana. *African J. of Food Sci.*, 5(2): 100-104.
- Arpah, M., Syarief, R. dan Daulay, S. 2002. Penerapan Uji DUC (*Days Until Caking*) dalam Penerapan Waktu Kedaluarsa Tepung. *J. Teknologi & Industri Pangan*. 13(3), 217-223.
- Assoumani, M.B, Maxime, D., Nguyen, P. 1994. Evaluation of a lysine-glucose Maillard model system using three rapid analytical methods. *J. Food Chem*, 46:383-387
- Bailey, M. E.. 1998. *Maillard Reactions and Meat Flavour Development*, in Shahidi, F. ed. Flavor of Meat, Meat Products and Seafoods, Blackie Academic & Professional, London.

- Barac, M.B., Jovanovic, S.T., Stanojevic, S.P. and Pesic, M.B., 2006. Effect of Limited Hydrolysis on Traditional Soy Protein Concentrate. *Sensors*, 6: 1087-1101.
- Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., Lalitha, R.G. 2008. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Catla (*Catla catla*) for Preparing Protein Hydrolysate Using a Commercial Protease. *Bioresource Technology*, 99: 335-343.
- Blancard, P. H. and F. R. Katz. 1995. *Starch Hydrolysis in Food Polysaccharides and Their Application*, Marcell Dekker, Inc. New York.
- Buckle, K. A., Edwards, R.A., Fleet, G.H. dan Wooton, M. 1987. *Ilmu Pangan*. Diterjemahkan oleh: Purnomo, H. dan Adiono. UI-Press. Jakarta.
- Cahyadi. 2005. Analisis dan Aspek Kesehatan Bahan Tambahan Pangan. Bumi Aksara. Jakarta.
- Clemente, A. 2000. Enzymatic Protein Hydrolysates in Human Nutrition. *J. Food Sci. and Tech.* 11: 254-262.
- Dalimartha S. 2003. *Biduri (Calotropis gigantea [Wild.] Dryand.ex W.T.Ait.)*. Pdpersi, Jakarta.
- Dedin, F.R., Fardiaz, D., Apriyantono, A. dan Andarwulan, N. 2006, Isolasi dan Karakterisasi Melanoidin Kecap Manis dan Peranannya sebagai Antioksidan, *J. Teknologi & Industri Pangan*, 17 (3), 204-213.
- deMan, J.M. 1999. *Principles of Food Chemistry*, 3 rd Ed. Aspen Pub. Inc. Gaithersbury, Maryland.
- Dumay J, Donnay-Moreno C, Barnathan G, Jaouen P, Berge. 2006. Improvement of Lipid and Phospholipid Recoveries from Sardine (*Sardina pilchardus*) Viscera Using Industrial Proteases. *Process Biochemistry*, 41:2327-2332.

- Eliasson, A.C., 2004. *Starch in Food*. Structure, Function and Application. Woodhead Publishing Limited. England.
- Erickson, D.R., Pryde, E.H., Brekke, O.L., Mounts, T.L. and Falb, R.A. 1980. *Handbook of Soy Oil Processing and Utilization*. American Soybean Association and the American Oil Chemist's Society. St. Louis, Missouri and Champaign, Illinois.
- Fardiaz, S. 2002. *Hidrokoloid dalam Industri Pangan Dalam Risalah seminar Bahan Tambahan Kimiawi*. PAU Pangan dan Gizi. IPB, Bogor.
- Galmo, E.P., Sullivan, W.E. and Canada, C.R. 1984. *Engineering Economy*. Mac. Publishing Company, New York.
- Gautara dan Soesarsono. 1975. *Dasar-dasar Pengolahan Gula II*. Departemen Teknologi Hasil Pertanian. Fatemeta, IPB, Bogor.
- Gbogouri, G.A., Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M. 2004. Influence of Hydrolysis Degree on the Functional Properties of Salmon by Product Hydrolysates. *J. Food Sci.*, 69: 615–622.
- Haslaniza, H., Maskat, M.Y., Wan Aida, W.M., and Mamot, S. 2010. The Effects of Enzyme Concentration, Temperature and Incubation Time on Nitrogen Content and Degree of Hydrolysis of Protein Precipitate from Cockle (*Anadara granosa*) Meat Wash Water. *International Food Research Journal*, 17: 147152.
- Heath, H.B. and Reineccius, G., 1986. *Flavour Chemistry and Technology*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Hofmann, T., Bors, W., and Stettmaier, K. 1999. Studies on Radical Intermediates in The Early Stage of The Nonenzymatic Browning Reaction of Carbohydrates and Amino Acids, *J. Agric. Food Chem.* 47: 379-390.

- Hidayat, T. 2005. *Pembuatan Hidrolisat Protein dari Ikan Selar Kuning (Caranx leptolepis) dengan Menggunakan Enzim Papain* [Skripsi]. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB, Bogor.
- Hrckova, M., Rusnakova, M. and Zemanovic, J. 2002. Enzymatic Hydrolysis of Defatted Soy Flour by Three Different Proteases and their Effect on the Functional Properties of Resulting Protein Hydrolysates. *Czech J. Food Sci.* 20 (1): 7–14.
- Hurrell, R.F., Lerman, P., Carpenter, K.K.J. 1979. Reactive lysine in Foodstuffs as Measured by Dye-Binding Procedure. *J. Food Sci.* 44:1221-1227.
- Hutching, J.B. 1994. *Food Colour and Apperance*. Blackie Academic and Professional. Glasgow.
- Indriasari, L., 2006. *Waspada! Bahan Kimia Lain dalam Makanan*. Kompas. Jakarta.
- Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A., 2005, *Modern Food Microbiology*, Seventh Edition, Springer, New York.
- Jin, S., Mou, M.Z., Qiang, Z.Z., Yang, B., Yue, M.J. 2007. Characterization of Hydrolysates Derived from Enzymatic Hydrolysis of Wheat Gluten. *J. Food Sci.*, 72 (2): 103–107.
- Julianto. 2003. *Teknik Penanganan Ikan*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Kaneda, Makoto, Yonezawa and Hirro. 1997. Purification and Some Properties of a Protease from The Sarcocarp of Musk Melon Fruit. *J. Biosci. Biotech. Biochem.*, 61 (12), 2100-2102.
- Kinney, A.J. 2003. Engineering Soybeans for Food and Health. *AgBioForum*, 6 (1 & 2): 18-22.

- Koesoemawardani, D., Nurainy, F., and Hidayati, S. 2011. Proses Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan Rucuh. *Jurnal Natur Indonesia*, 13 (3): 256 -261.
- Kumara, B. 2006. Meat Flavor Imitation Berbasis Reaksi Maillard. *Food Review*. Vol 1 No. 11: 42-49.
- Kunst, A., 2000. Enzymatic Modification of Soy Proteins to Improve Their Functional Properties, *Magazine of Industrial Protein*, 8 (3), 9-11.
- Lee, J., 2011. Soy Protein Hydrolysate; Solubility, Thermal Stability, Bioactivity, and Sensory Acceptability in a Tea Beverage. faculty of gradute scholl, University of Minnesota.
- Liang, J.H., 1999. Fluorescence due to Interactions of Oxidizing Soybean Oil and Soy Proteins. *J. Food Chem.*, 66: 103–108.
- Maga, J. A., 1998, *Umami Flavor of Meat*, In Shahidi, F. ed. "Flavor of Meat, Meat Products and Seafoods", Blackie Academic & Professional, London, pp: 197-215
- Maga, J.A. and Tu, A.T. 1995. *Food Additive Toxicology*, Marcel Dekker, New York.
- Marsman, G.J.P., Gruppen H., Mul, AJ. and Voragen, AG., 1997. *In Vitro* Accessibility of Untreated, Toasted and Extruded Soybean Meals for Proteases and Carbohydrates. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 4088–4095.
- Matthews, R.H. 1989. *Legume, Chemistry, Tecnology and Human Nutrition*. Marcell Dekker inc., New York.
- Miao S, and Roos, Y.H. 2004. Comparison of Nonenzymatic Browning Kinetics in Spray-dried and Freeze-dried Carbohydrate-based Food Model Systems. *J. Food Sci.*, 69 (7): 321–331.
- Miller A.G. and Gerrard J.A., 2005. The Maillard Reaction and Food Protein Crosslinking. *Progress in Food Biopolymer Researh*.

- Mottram D. S., 1998, *The Chemistry of Meat Flavor*, dalam Shahidi, F. ed. "Flavor of Meat, Meat Products and Seafoods", Blackie Academic and Professional, London.
- Mubarik, N.R., Suwanto A dan Suhartono MT, 2000. Isolasi dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler dari Isolat Bakteri Termofilik Ekstrim. *Prosiding Seminar Nasional Industri Enzim dan Bioteknologi II*. Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Jakarta, 15- 16 Februari 2000. 151–158.
- Muchtadi, D. 1998. *Aspek Biokimia dan Gizi dalam Keamanan Pangan*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, IPB, Bogor.
- Naz, S., 2002. *Enzymes and Food*, Oxford University Press, Pakistan.
- Nielsen, P. M. 1997. Functionality Of Protein Hydrolysates. In Damodaran, S. 1997. *Food Proteins and Their Applications*. Marcel Dekker. New York
- Nolsoe, H., and Undeland, I. 2009. The Acid and Lkaline Solubilisation Process for the Isolation of Muscle Proteins. *Food Bioprocess Technology*, 2: 1-27.
- Noor, Z., 1992. *Senyawa Anti Gizi*. PAU Pangan dan Gizi, UGM. Yogyakarta.
- Ortega and Rivas E., 2005. Handling and Processing of Food Powders and Particulates, In C. Onwulta (Ed.), *Encapsulated and Powdered Foods* (pp 75-144). CRC Press, Boca Raton.
- Palupi NW, Windrati SW, Tamtarini. 2010. The effect of Enzymatic Hydrolysis on the Properties of Protein Hydrolysate from Baddy Mushroom. *Makara, Teknologi*, 14 (2): 73-76.

- Pramadi, D. 2006. Flavor Enhancer dalam Produk Pangan. *Food Review: Referensi Industri dan Teknologi Pangan Indonesia: Teknologi Flavour*. Vol 1. No 11.
- Prescott, J. and Young, A., 2002. Does Information about MSG (Monosodium Glutamate) Content Influence Consumer Ratings of Soups with and without added MSG ?. *Appetite*. 39: 25-33.
- Purba, A., dan Rusmarilin, H. 1985. *Dasar Pengolahan Pangan*. Fakultas Pertanian. USU-Press, Medan.
- Radley, J.A, 2008. *Starch Production Technology*, Applied Science Publ., London.
- Rahman, M.S. 2007. *Handbook of Food Preservation*, 2nd Ed. CRC Press. Boca Raton.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. and Desphande, V.V. 1998, *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Protease*, American Society for Microbiology.
- Sakidjo. 1989. Peranan Asam Sitrat Dalam Makanan. WWW Blogspot [serial on line]. <http://id. Blog-pangan-peranan-asam.//> [2 September 2010].
- Sarofah, A., 2004. *Pembuatan Seasoning Alami dari Udang Putih (*Penaeus merguensis*) dengan Variasi Lama Hidrolisis dan Jumlah Penambahan HVP* [Skripsi]. Fakultas Teknologi Pertanian UNEJ, Jember.
- Šližytė, R., Daukšas, E., Falch, E., Storrø, I., and Rustad T. 2005. Characteristics of Protein Fractions Generated from Cod (*Gadus morhua*) By-Products. *Process Biochem*, 40: 2021–2033.
- Soeparno. 1994, *Ilmu dan Teknologi Daging*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Stephen, A. M., 1995. *Food Polysaccharides and Their Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Subagio, A., Hartanti, S., Windrati, W. S., Unus, Fauzi, M.

- dan Herry, B., 2002. Characteristics of protein hydrolysate from tempeh, *Jurnal Teknologi & Industri Pangan*, 8, 204-210.
- Sudarmadji, S., B. Haryono and Suhardi., 1997. Procedures for the Analysis of Food and Agriculture. Liberty. Yogyakarta.
- Syarifah, 2006. MSG dan "Chinese Restaurant Syndrome", *Pikiran Rakyat* 24 Maret 2006. Bandung.
- Uhlig, H. 1998. *Industrial Enzymes and Their Application*. John Wiley & Son Inc., New York.
- Walker, J.M. 2002. *The Protein Protocols Handbook*. Second Edition. 3–10. Humana Press, New Jersey.
- Widianto. 2009. Garam Dapur. WWW Blogspot [serial on line]. [//widianto-blog-spot-garam-pangan-2009//](http://widianto-blog-spot-garam-pangan-2009//). [2 September 2010].
- Wikipedia. 2010. Asam Sitrat. WWW Wikipedia [serial on line]. http://id.wikipedia.org/wiki/Asam_sitrat/index.html. [2 September 2010].
- Winarno , F.G., 1995. *Enzim Pangan*. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Winarno, .G., 1997. *Kimia Pangan dan Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Witono, Y., 2002a. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Protease dari Getah Tanaman Biduri. *J. Teknologi Hasil Pertanian* 1(1), 1- 14.
- Witono, Y., 2002b. Pemanfaatan Enzim Protease dari Tanaman Biduri untuk Pengolahan Makanan. *J. Sains dan Teknologi*, 1(1): 32 - 37.
- Witono, Y., Subagio, A., Windrati, W.S., Hartanti, S. dan Praptiningsih, J. (2004): Protease dari Getah Biduri, *Prosiding Seminar Nasional*, Perhimpunan Ahli

Teknologi Pangan Indonesia, Jakarta. 14-15 Desember 2004.

- Witono, Y., Subagio, A., Susanto T. dan Widjanarko, S.B., 2006. Telaah Teknik Produksi Enzim Protease dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*), *Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia*, Yogyakarta 2-3 Agustus 2006.
- Witono, Y., Aulanni'am, Subagio, A. dan Widjanarko, S.B. 2007a. Isolasi Enzim Protease dari Getah Biduri, *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*, 7(1), 20-26.
- Witono, Y., Aulanni'am, Subagio, A. dan Widjanarko, S.B. 2007b. Purifikasi dan Karakterisasi Parsial Enzim Protease dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*), *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 18 (1), 1-9.
- Witono, Y., Aulanni'am, Subagio, A. and Widjanarko, S.B. 2007c. Karakteristik Hidrolisat Protein Kedelai dari Proses Hidrolisis secara Enzimatis Menggunakan Protease dari Tanaman Biduri, *Berkala Penelitian Hayati*. Perhimpunan Biologi Indonesia, 3 (1), 7-13.
- Witono, Y. 2007. Studi Pendahuluan Proses Pembuatan Hidrolisat Ikan Bandeng secara Enzimatis Menggunakan Protease Biduri, *Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia*, Bandung, 17-18 Juli 2007.
- Witono, Y. 2009. Spesifikasi dan Stabilitas Enzim Protease dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*), *Prosiding Seminar Nasional - Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia*, Denpasar, 19 Agustus 2009.
- Witono, Y. dan Windrati, W.S. 2009. Hidrolisis Enzimatis dari Protease Biduri pada Substrat Ayam Kampung sebagai Flavor Enhancer Alami, *Prosiding Seminar Nasional - Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia*, Jakarta, 3-4 Nopember 2009.

- Witono, Y dan Windrati, W.S., 2010. Pengembangan Teknologi Enzim Biduri untuk Produksi Flavor Enhancer, Laporan Hasil Penelitian Hibah Kompetensi DIKTI Batch 2 Tahun 2, Universitas Jember, Jember.
- Witono, Y. and Kang, W.W. 2010. Specific Characteristic of Novel Cystein Protease From Indonesian 'Biduri' Plant (*Calotropis gigantea*), *The Korean Society of Food Science and Technology*, 16-18 June 2010.
- Witono, Y., Windrati, W.S., dan Zamroni, I. 2013. Telaah Teknologi Pembuatan Garam Sedap Hasil Hidrolisis dari Ikan Kuwe Berbasis Teknik Hidrolisis Enzimatis Menggunakan Protease Biduri, *Prosiding Seminar Nasional - Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia*, Jember, 28-31 Agustus 2013.
- Witono, Y., 2013. *Enzim Biduri, Agen Aktif yang Potensial untuk Proses Pangan*, Pustaka Radja, Jember.

RIWAYAT HIDUP SINGKAT PENULIS

Penulis adalah putra pertama dari pasangan keluarga Bpk. Ngatemo dan Ibu Sri Linartini yang lahir di Desa Kepatihan Kec. Tirtoyudo Kab. Malang tanggal 12 Desember 1969. Penulis mengenyam pendidikan sejak SD (1975-1982), SMP (1982-1985) dan SMA (1985-1988) di Kab. Malang. Penulis yang berlatar belakang keluarga pasangan ini tahun 1988 bertekad melanjutkan pendidikan sarjana (S1) di Jurusan Teknologi Pertanian Fakultas Pertanian UNEJ-Jember.



Setelah lulus S1, penulis juga ternyata tidak mudah untuk mendapatkan pekerjaan. Bertani untuk sekedar mengisi waktu dan membantu kedua orangnyapun juga dilakukan. Penulis juga pernah menyisir pekerjaan mulai dari ujung timur sampai ke ujung barat pulau Jawa. Karena kesabaran dan keuletan penulis yang tidak punya koneksi siapa-siapa selain dengan mengandalkan koneksinya pada Allah S.W.T., akhirnya baru tahun 1995 penulis diterima bekerja sebagai karyawan di PT. Miwon Indonesia, lalu setahun kemudian penulis bekerja sebagai dosen di Stiper Tribhuwana (kini UNITRI) Malang. Tahun 1996-2000, melalui support beasiswa TMPD (BPDN) Dikti berhasil mengenyam pendidikan S2 pada Program Studi Teknologi Hasil Pertanian PPS-UNIBRAW (UB) Malang.

Di tengah periode perjalanan studi S2-nya, penulis mencoba mengadu nasib untuk mengembangkan kariernya dengan berkompetisi mengikuti seleksi PNS Dosen di Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Sejak tahun 1998 sampai sekarang penulis bekerja sebagai Dosen FTP-UNEJ. Pada pertengahan tahun 2004 penulis juga pernah short-course selama 3 bulan di Van Hall Instituut-Belanda & Sheffield Hallam University-Inggris. Sejak tahun 2004 menempuh pendidikan S3 dengan beasiswa BPPS (BPDN) Dikti. Selama 15 tahun semenjak aktif menjadi dosen dan peneliti, penulis telah melakukan penelitian sebanyak 34 judul penelitian kompetitif nasional dan telah menghasilkan publikasi ilmiah nasional dan internasional sebanyak 44 judul.

Penulis yang pernah menjadi pengamen sejak SLTA hingga mahasiswa S1 semester IV ini juga pernah diundang sebagai Special Lecturer (Dosen Terbang) Bidang Food Technology pada Kyungpook National University, Gyungwon University dan University of Daegu, Korea (Tahun 2008) dan Yeungnam University & Kyungpook National University, Korea (2010). Juga sebagai Reviewer Nasional PKM DIKTI Tahun 2012 dan Pokja Ahli Badan Ketahanan Pangan Propinsi Jawa Timur (2009 s/d sekarang).

Penulis yang sedang mengemban amanah sebagai Dekan FTP UNEJ 2013-2017 ini juga pernah dinobatkan sebagai Peneliti Penyaji Makalah Terbaik Penelitian Hibah Bersaing XII Tahun 2006 di Jakarta dan Peneliti Penyaji Makalah Terbaik Hibah Penelitian Kompetitif Nasional Tahun 2014 di Surabaya.

Penulis menikah dengan Idha Kurniawati tahun 1995 putri keempat dari Bpk. H.M. Nur Yasin Sugiono dan Hj. Mujiati yang berasal dari satu desa dengan penulis, dan telah dikaruniai 2 putra, yaitu: Zul Ilman Rafi' Ramadhan (SMA Kelas 3) dan Zul Fahmi Fadhlhan Fadhlillah (SD-6) serta 1 putri, yaitu Zul Alina Khansa Khairina (TK).