

PENGARUH PEMANASAN BERBASIS GELOMBANG MIKRO DALAM PROSES EKSTRAKSI ENZIMATIS VANILIN PADA POLONG VANILA

Vita Paramita^{*}, Wahyuningsih, Mohammad Endy Yulianto, Oktavian Dita Ratnasari

PSD III Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro

Jl. Prof. Sudarto, SH, Tembalang, Semarang 50275

^{*}Email: vita.paramita@gmail.com

Abstrak

Riset ini bertujuan untuk mengembangkan skema proses ekstraksi enzimatis untuk produksi polong vanila terhidrolisa efisien waktu dan energi. Target yang ingin dicapai berupa optimisasi parameter proses. Kajian dilakukan pada berbagai variabel, meliputi suhu (30 - 50 °C), tipe enzim (protease dan selulase) dengan rasio enzim-substrat 1:50, pH 4,5. Selama tempuhan, diukur kadar senyawa vanilin dengan alat spektrofotometer ultra violet, sebagai fungsi waktu. Penentuan variabel yang berpengaruh dapat menggunakan central composite rotatotional design (CCRD). Percobaan menunjukkan bahwa nilai vanilin optimum mencapai lebih dari 400 mg/L diperoleh pada suhu hidrolisa-ekstraksi antara 50-55 °C dengan lama waktu antara 55-60 menit.

Kata kunci: ekstraksi, gelombang mikro, polong vanila, vanilin

1. PENDAHULUAN

Tanaman tropis vanila merupakan tanaman sumber aroma dan rasa yang paling disukai pada industri makanan. Aroma dan rasa vanilin hasil hidrolisa dalam polong vanila memberikan rasa dan aroma sedap-menyenangkan murni yang tidak dapat ditiru dengan produk sintetis hasil modifikasi proses dengan metode apapun. Selain itu, ketersediaan produk vanilin alami dibatasi oleh rumitnya perlakuan tanaman vanila sebelum panen dan perlakuan polong vanila sesudah panen. Hal tersebut merupakan penyebab utama sangat mahalnya harga vanilin alami (Sinha dkk., 2008).

Pembentukan dan pelepasan aroma vanila yang lembut namun kuat terjadi dengan adanya reaksi hidrolisa senyawa pendahulu oleh aktivitas enzim β -D-glucosidase (Odoux, 2000; Odoux dkk., 2003). Glukovanilin diekstrak dari polong vanila akibat adanya aktivitas enzim yang merusak dinding sel polong dan diikuti terjadinya reaksi hidrolisa glukovanilin menjadi vanilin. Proses pemeraman polong vanila secara tradisional memberikan jumlah produk vanilin yang tidak sebanding dengan energi, waktu ataupun biaya yang dikeluarkan. Metode ekstraksi dengan soklet menghasilkan yield rendah dibandingkan dengan metode ekstraksi enzimatis (Ruiz-Terán dkk., 2001). Oleh karenanya untuk mereduksi biaya produksi, pemanfaatan enzim yang diisolasi dari rumen sapi, seperti selulase, protease, glukosidase merupakan peluang yang sangat terbuka lebar (Budiansyah dkk., 2010; Yulianto dkk., 2012). Rumen sapi memiliki berbagai macam enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang hidup di dalamnya, antara lain enzim pendegradasi glikosida (seperti glukosidase, fucosidase, xilosidase), enzim pendegradasi dinding sel tanaman (seperti selulase, xilanase, pektinase), amilase, protease dan lain-lain (Lee dkk., 1999).

Untuk itu perlu mengembangkan skema proses produksi polong vanila terhidrolisa alami menggunakan isolat enzim rumen sapi untuk mengurangi lama waktu dan energi yang digunakan. Paramita dan Yulianto (2013) menunjukkan pada perlakuan pH 7, suhu 30 °C dengan lama waktu 18 jam untuk hidrolisa enzimatis glukovanilin diperoleh hasil vanilin yang lebih tinggi dibandingkan suhu 40 °C untuk waktu lebih dari 6 jam, yaitu 369,3 dan 164,6 ppm. Namun demikian, konversi hidrolisa dan yield ekstraksi secara overall kurang maksimal. Hal ini terjadi karena laju hidrolisa dan perpindahan massa pada ekstraksi dengan pemanasan konvensional mengalami penurunan yang disebabkan oleh menurunnya fleksibilitas molekul protein, instabilitas dan inaktivasi β -glukosidase. Riset ini bertujuan meningkatkan laju hidrolisa konvensional berbasis rumen untuk produksi polong vanila terhidrolisa alami yang sehat melalui fenomena interfacial activation β -glukosidase dengan tuning-up gelombang mikro. Secara spesifik riset ini bertujuan untuk studi optimisasi parameter proses ekstraksi enzimatis dalam polong vanila.

2. METODOLOGI

2.1. Bahan Penelitian

Bahan penelitian berupa polong vanila, cairan rumen sapi, dan bahan-bahan kimia yang diperlukan untuk proses ekstraksi enzimatis. Bahan untuk analisa produk meliputi: bufer phospat, etanol, distilled water, natrium hidroksida, asam klorida dan indikator phenolphtalein. Bahan kimia untuk proses isolasi enzim berupa ammonium sulfat. Bahan kimia yang digunakan dalam proses uji aktivitas enzim meliputi kasein dan TCA. Polong vanila akan dibeli dari perkebunan vanila rakyat di sekitar kota Semarang. Cairan rumen sapi akan diperoleh dari RPH Semarang, dan bahan-bahan kimia membeli di CV. Aneka Kurnia Semarang.

2.2. Alat Penelitian

Alat utama yang akan digunakan dalam penelitian adalah bioreaktor-hidrolisa. Rangkaian alat bioreaktor-hidrolisa yang akan digunakan terdiri dari sebuah tangki berkapasitas 5 liter/hari yang dilengkapi dengan pemanas, indikator temperatur, pengaduk dan indikator kecepatan putar pengaduk. Sedangkan alat yang akan digunakan untuk proses isolasi enzim antara lain sentrifugasi, magnetik stirer, neraca analitis dan peralatan gelas. Alat yang digunakan untuk analisa aktivitas enzim yaitu mikropipet 1 ml (Gilson), conical tube (Nunclon), tissue culture flask (Nunclon), stiker label, sentrifugator (Sarfall MC12V) dan mikroskop fase kontras (Zeiss MC 80), CO2 Incubator (Heraeus).

2.3. Prosedur Isolasi Enzim Cairan Rumen Sapi

Cairan rumen diambil dari isi rumen sapi dengan cara filtrasi dibawah kondisi dingin. Cairan hasil filtrasi disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 g selama 10 menit pada suhu 4oC untuk memisahkan supernatan dari sel dan isi sel mikroba. Supernatan kemudian diambil sebagai sumber enzim kasar. Supernatan selanjutnya direaksikan dengan amonium sulfat 60% dan diadakan menggunakan magnetik stirer selama 1 jam, dan didiamkan selama 24 jam pada suhu 4oC. Supernatan kembali disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 g selama 15 menit pada suhu 4oC. Endapan (enzim) yang diperoleh diambil kemudian dilarutkan dalam buffer fosfat pH 7,0 dengan perbandingan 10:1 (endapan dari 100 ml supernatan cairan rumen dilarutkan dalam 10 ml buffer fosfat pH 7,0).

2.4. Studi Optimisasi Proses

Proses optimasi dilakukan dengan menerapkan Central Composite Design (CCD). Dasar dari proses optimasi ini meliputi tiga tahap, yaitu melakukan percobaan yang dirancang secara statistik, memperkirakan koefisien dalam model matematika dan memprediksi respon dengan memeriksa kesesuaian model (Sridevi dkk., 2011; Box dan Hunter, 1957; Box dkk., 1978).

$$Y = f(X_1, X_2, X_3, \dots, X_k)$$

Hubungan antara Y dan X_k seringkali rumit dan, dalam banyak kasus, tidak diketahui. Polinomial tingkat satu umumnya digunakan ketika respon dapat dimodelkan dengan baik dalam suatu fungsi linear terhadap variabel bebas. Jika fungsi linear tidak dapat memenuhi model pendekatan yang sesuai, maka polinomial kuadratik tingkat dua dapat digunakan untuk mewakili fungsi, dengan menggunakan persamaan:

$$Y = R_0 + \sum_{i=1}^k R_i X_i + \sum_{i=1}^k R_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1, i < j}^{k-1} \sum_{j=2}^k R_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (1)$$

di mana $X_1, X_2, X_3, \dots, X_k$ adalah variabel masukan yang mempengaruhi respon Y; R_0, R_i, R_{ii} dan R_{ij} ($i = 1-k, j = 1-k$) adalah parameter diketahui, ε adalah kesalahan acak.

Sebuah model orde kedua dirancang sedemikian rupa sehingga varians dari Y adalah konstan untuk semua titik berjarak sama dari pusat desain.

$$X_i = \left(\frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \right) \quad (2)$$

di mana X_i adalah nilai kode, X_0 adalah nilai aktual pada titik pusat dan ΔX_i adalah nilai langkah perubahan. Parameter yang digunakan diukur pada proses optimisasi proses hidrolisa enzimatis dan ekstraksi vanilin beserta nilai-nilainya (dalam kurung) yaitu suhu ekstraksi (30, 40, 50 °C) dan lama waktu ekstraksi (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 men), yang ditambah dengan sistem blok dengan

variabel tipe enzim (blok 1 berupa protease dan blok 2 berupa selulase). Program ini juga memungkinkan identifikasi efek signifikan dari interaksi untuk studi batch.

Dalam sistem yang melibatkan dua signifikan variabel independen X_1 dan X_2 , hubungan matematis dari respon terhadap variabel-variabel ini dapat didekati dengan persamaan polinomial kuadrat (derajat kedua):

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \quad (3)$$

di mana Y adalah nilai prediksi, b_0 adalah konstanta, X_1 adalah suhu ekstraksi, X_2 adalah lama waktu ekstraksi, b_1 dan b_2 adalah koefisien linear, b_{12} adalah koefisien lintas produk (interaksi antar variabel bebas) serta b_{11} dan b_{22} adalah koefisien kuadrat. Nilai tingkat rendah, menengah dan tinggi masing-masing variabel yang diketahui, ditunjuk sebagai -1, 0, dan 1 untuk masing-masing variabel, seperti yang diberikan pada Tabel 1. Sebanyak 10 percobaan dilakukan untuk memperkirakan koefisien model menggunakan regresi linier berganda. Desain eksperimen yang digunakan untuk analisis menggunakan software Statistika versi 8.0.

Tabel 1. Nilai variabel bebas pada berbagai tingkat percobaan

Variabel	Tingkatan kode pada percobaan				
	-1,682	-1	0	1	1,682
Suhu ekstraksi	25	30	40	50	55
Lama waktu ekstraksi	0	10	30	50	60
Tipe enzim	Protease, Selulase				
Rasio enzim-substrat	1:50				

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi proses untuk ekstraksi vanilin dilakukan melalui 10 percobaan menggunakan variabel bebas suhu dan lama waktu ekstraksi (Tabel 2). Dengan menerapkan analisis regresi berganda pada data percobaan, diperoleh persamaan polinomial tingkat dua untuk mewakili perolehan kadar vanilin sebagai berikut:

$$Y = 85,4686 + 43,2005 X_1 - 70,6878 X_2 - 36,3022 X_1^2 + 131,4301 X_2^2 + 90,5730 X_1 X_2 \quad (4)$$

Nilai koefisien dari model regresi (Persamaan 4) yang diperoleh tercantum pada Tabel 3, di mana mereka mengandung dua linear, dua kuadrat, satu interaksi dan dua blok. Signifikansi masing-masing koefisien ditentukan dengan test t dan nilai p, seperti yang tercantum dalam Tabel 3.

Tabel 2. Nilai aktual hasil percobaan kadar vanilin pada matrix CCD

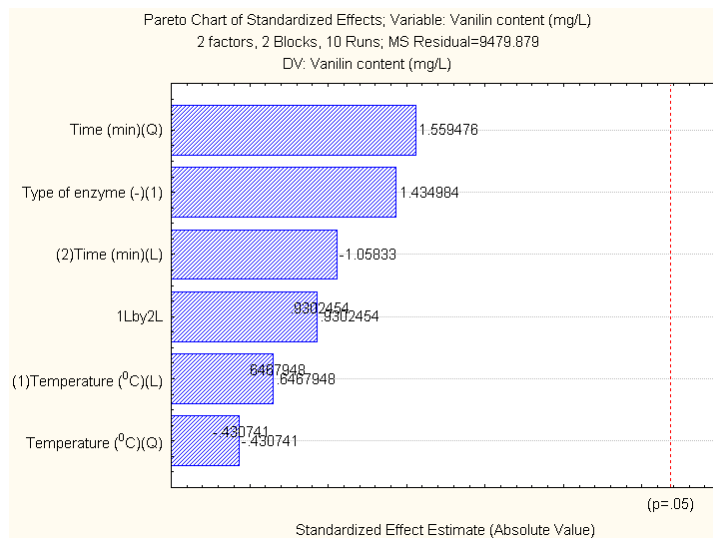
Tipe Enzim (rasio enzim-substrat)	X1	X2	Kadar vanilin (mg/L)
Protease (1:50)	30	10	117,07
	30	50	48,33
	50	10	12,22
	50	50	124,63
	40	30	92,90
Selulase (1:50)	25	30	29,93
	55	30	171,36
	40	0	404,04
	40	60	174,65
	40	30	83,80

Tabel 3. Data estimasi efek

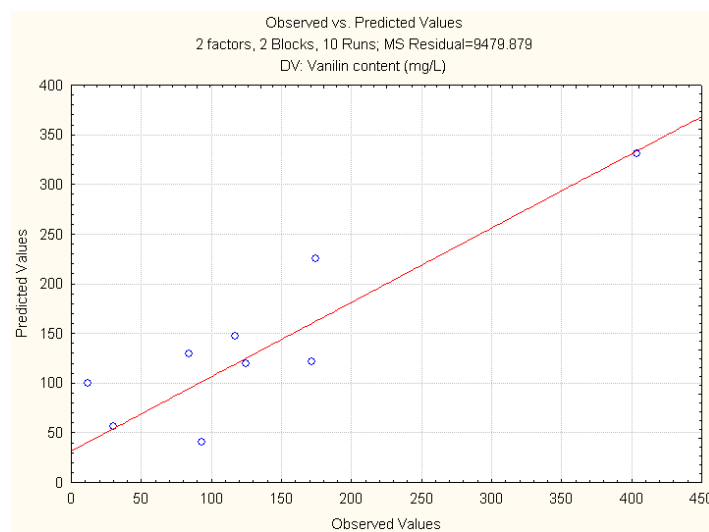
Effect Estimates; Var.:Vanilin content (mg/L); R-sq=.74809; Adj.:24428 (Spreadsheet8)
 2 factors, 2 Blocks, 10 Runs; MS Residual=9479.879
 DV: Vanilin content (mg/L)

Factor	Effect	Std.Err.	t(3)	p	-95. % Cnf.Limt	+95. % Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95. % Cnf.Limt	+95. % Cnf.Limt
Mean/Interc.	85.4686	68.75219	1.24314	0.302118	-133.332	304.2688	85.4686	68.75219	-133.332	304.2688
Type of enzyme (-)(1)	88.9719	62.00205	1.43498	0.246783	-108.346	286.2901	44.4860	31.00103	-54.173	143.1451
(1)Temperature (°C)(L)	43.2005	66.79161	0.64679	0.563841	-169.360	255.7612	21.6002	33.39581	-84.680	127.8806
Temperature (°C)(Q)	-36.3022	84.27839	-0.43074	0.695729	-304.514	231.9093	-18.1511	42.13920	-152.257	115.9546
(2)Time (min)(L)	-70.6878	66.79161	-1.05833	0.367578	-283.249	141.8729	-35.3439	33.39581	-141.624	70.9365
Time (min)(Q)	131.4301	84.27839	1.55948	0.216783	-136.781	399.6416	65.7151	42.13920	-68.391	199.8208
1L by 2L	90.5730	97.36467	0.93025	0.420863	-219.285	400.4309	45.2865	48.68234	-109.642	200.2154

Nilai test t menunjukkan nilai lebih besar dari nilai p. Keakuratan model ini dapat diketahui dari harga koefisien determinasi (R^2). Nilai R^2 memberikan ukuran seberapa banyak variabilitas dalam nilai-nilai respon yang diamati dapat dijelaskan oleh variabel percobaan dan interaksi mereka. Dari harga R^2 ini dapat disimpulkan bahwa nilai yang diperkirakan dengan model mendekati nilai yang diperoleh dari hasil percobaan. Nilai R^2 selalu berada di antara 0 dan 1. Semakin dekat nilai R^2 terhadap 1, menunjukkan bahwa model tersebut baik dalam memprediksi respon. Dalam hal ini, nilai koefisien determinasi ($R^2 = 0.748$) menunjukkan bahwa 74,8% dari variabilitas dalam respon dapat dijelaskan oleh model (Tabel 3).



Gambar 1. Diagram pareto pengaruh variabel terhadap kadar vanilin



Gambar 2. Perbandingan data percobaan dan perkiraan kadar vanilin

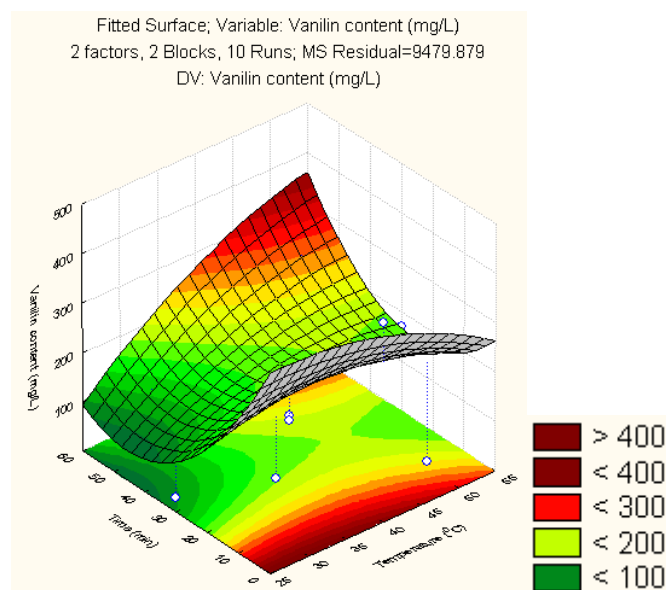
Kedekatan nilai yang diperkirakan dengan model mendekati nilai yang diperoleh dari hasil percobaan disajikan pada Gambar 2. Nilai plot dalam grafik menunjukkan korelasi yang memuaskan antara nilai-nilai percobaan dan perkiraan (diperoleh dari Persamaan 4), karena penyimpangan antara nilai-nilai percobaan dan perkiraan mendekati garis linear. Koefisien regresi dapat diperjelas dengan diagram pareto (Gambar 1) untuk setiap variabel. Dari blok diagram, tampak bahwa variabel bebas yang paling berpengaruh dalam proses ekstraksi vanilin adalah lama waktu ekstraksi.

Hasil dari model respon permukaan tingkat kedua sesuai dalam bentuk Analysis of Variance (ANOVA) yang diberikan dalam Tabel 4. Hal ini diperlukan untuk menguji signifikansi dan kecukupan model. Fisher rasio varians, nilai $F (= S_r^2 / S_e^2)$, adalah ukuran statistik yang valid dari seberapa baik faktor menjelaskan variasi dalam data tentang mean. Semakin besar nilai F semakin menunjukkan keseragaman, yang lebih pasti adalah bahwa faktor menjelaskan secara memadai variasi dalam data tentang mean, dan efek faktor yang diperkirakan adalah nyata. ANOVA dari model regresi menunjukkan bahwa model ini sangat signifikan, seperti terbukti dari nilai F dari tes Fisher ($F_{model} = 7,08$).

Tabel 4. Analisa varian model persamaan polinomial ekstraksi vanilin

ANOVA; Var.:Vanilin content (mg/L); R-sqr=.74809; Adj:.24428 (Spreadsheet8)					
2 factors, 2 Blocks, 10 Runs; MS Residual=9479.879					
DV: Vanilin content (mg/L)					
Factor	SS	df	MS	F	p
Blocks	19520.8	1	19520.76	2.059178	0.246783
(1)Temperature (°C)(L)	3965.8	1	3965.85	0.418343	0.563841
Temperature (°C)(Q)	1758.9	1	1758.88	0.185538	0.695729
(2)Time (min)(L)	10618.1	1	10618.13	1.120070	0.367578
Time (min)(Q)	23054.7	1	23054.73	2.431965	0.216783
1L by 2L	8203.5	1	8203.48	0.865356	0.420863
Error	28439.6	3	9479.88		
Total SS	112897.3	9			

Dari hasil percobaan dapat dibuat response fitted surface (Gambar 3). Gambar 3 menunjukkan bahwa nilai vanillin optimum mencapai lebih dari 400 mg/L dicapai pada suhu hidrolisa-ekstraksi antara 50-55 °C dengan lama waktu antara 55-60 menit.



Gambar 3. Response fitted surface variabel lama waktu dan suhu ekstraksi terhadap respon kadar vanilin

4. KESIMPULAN

Nilai koefisien determinasi ($R^2 = 0.748$) menunjukkan bahwa 74,8% dari variabilitas dalam respon dapat dijelaskan oleh model. Model regresi menunjukkan bahwa model ini sangat signifikan, seperti terbukti dari nilai F dari tes Fisher ($F_{\text{model}} = 7,08$). Nilai vanilin optimum mencapai lebih dari 400 mg/L diperoleh pada suhu hidrolisa-ekstraksi antara 50-55 °C dengan lama waktu antara 55-60 menit.

DAFTAR PUSTAKA

- Budiansyah, A., Resmi, K., Wiryawan, K.G., Soehartono, M.T., Widyastuti, Y., dan Ramli, N., (2010), Isolasi dan karakterisasi Enzim Karbohidrase Cairan Rumen Sapi Asal Rumah Potong Hewan. *Media Peternakan*. 33 (1): 36-43.
- Box, G.E.P., Hunter, J.S., (1957), Multi-factor experimental designs for exploring response surfaces. *Ann Math Statist* 28:195-241.
- Box, G.E.P., Hunter, W.G., and Hunter, J.S., (1978), *Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building*. John Wiley & Sons. New York.
- Lee, S.S., Shin, K.J., Kim, W.Y., Ha, J.K., Han, I.K., (1999), The rumen ecosystem: as a fountain source of novel enzymes review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 12(6): 988–1001.
- Odoux, E., (2000), Changes in vanillin and glucovanillin concentrations during the various stages of the process traditionally used for curing vanilla fragrans beans in Réunion. *Fruits* 55: 119–125
- Odoux, E., Escoute, J., Verdeil, J.-L., and Brillouet, J.-M., (2003a), Localization of β -D-glucosidase activity and glucovanillin in vanilla bean (*vanilla planifolia andrews*). *Annals of Botany* 92: 437–444
- Paramita, V. and Yulianto, M.E., (2013). Effect of Beta-Glucosidase Activity on the Vanillin Enzymatic Formation by using Rumen Liquid for Cell Walls Degradation. *Journal of Food Research* 2(2), 65–69
- Ruiz-Terán, F., Perez-Amador, I., and López-Munguía, A., (2001), Enzymatic extraction and transformation of glucovanillin to vanillin from vanilla green pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(11): 5207–5209
- Sinha, A.K., Sharma, U.K., and Sharma, N., (2008), A comprehensive review on vanilla flavor: extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 59(4): 299–326
- Sridevi, V., Lakshmi, M.V.V.C., Swamy, A.V.N., and Rao, M.N., (2011), Implementation of response surface methodology for phenol degradation using *Pseudomonas putida* (NCIM 2102). *J Bioremed Biodegrad* 2(2): 1–7.
- Yulianto, M.E., Krisetya, A.B., Azzhara, S., dan Adhim, M.D.K., (2012), Pengembangan Teknik Ekstraksi Non Termal Berbasis Elektrodialisis Untuk Produksi Antimikrobal Alternatif Pengawet Makanan dari Rempah-Rempah Herbal. Laporan Kemajuan PKMP DP2M-DIKTI.