

ISOLASI DAN KARAKTERISASI MELANOIDIN KECAP MANIS DAN PERANANNYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN

[Isolation and Characterization of Soy Sauce Melanoidin and its Role as Antioxidant]

Dedin FR¹⁾, Dedi Fardiaz²⁾, Anton Apriyantono²⁾, Nuri Andarwulan²⁾

¹⁾ Mahasiswa program studi Ilmu Pangan PPs-IPB

²⁾ Staf pengajar Fateta IPB

Diterima 10 November 2006 / Disetujui 23 Mei 2007

ABSTRACT

Controlling oxidation in natural and processed foods is a difficult aspect of food preservation, even in low-fat foods. Lipid oxidation not only produces undesirable characteristic such as odors and flavor, but also decreases the nutritional quality and safety of foods by formation of secondary reaction products during cooking and processing. Protection of foods against lipid oxidation usually involves exclusion of oxygen by packing in vacuum or inert gases and/or the addition of antioxidants.

The Maillard reaction is a complex reaction. A variety of by products, intermediates and brown pigments (melanoidins) are produced, which may contribute to the flavor, antioxidative activity and color of food. The oxidative browning of soy sauce is considered to have a different mechanism from those of ascorbic acid, polyphenols and furfural, because the amount of these compounds in soy sauce is very small.

Maillard reaction products of soy sauce were fractionated into high and low molecular weight compounds by ultrafiltration. Oxidative stability was evaluated in refined soybean oil containing compounds in soy sauce and butylated hydroxytoluene (BHT). Oils were oxidized at 110 °C and analyzed by the rancimat method and TBA determination. The high molecular compounds (MW ≥ 100 kDa) of soy sauce was found to be more inhibitory on the oxidation of soybean oil with protective index being 2.43. Characteristic of the UV-Vis absorption was 360 – 406 nm and the IR spectra indicated the presence of –OH, O groups of β-diketon or combined C=R=R groups.

Key words : Antioxidative activity, fractionation, melanoidin, Maillard reactions

PENDAHULUAN

Efek oksidasi terhadap bahan pangan yang mengandung lemak mempengaruhi bau dan rasanya. Umumnya pendekatan yang digunakan untuk mengatasi hal tersebut adalah dengan penggunaan bahan tambahan pangan (BTP) antioksidan. Antioksidan yang banyak digunakan adalah dari jenis sintesis seperti Butil Hidroksi Anisol (BHA), Butil Hidroksi Toluena (BHT), propil galat, tert-Butil Hidroksi Quinon (TBHQ) dan tokoferol, yang sampai saat ini masih dalam pengawasan keamanan penggunaannya.

Suatu solusi yang dapat digunakan untuk menurunkan resiko terhadap bahaya kesehatan dan meningkatkan penerimaan produk pangan terhadap konsumen adalah dengan penggunaan antioksidan alami. Salah satu antioksidan alami dapat dihasilkan dari reaksi Maillard. Senyawa reduktan yang terdapat dalam produk reaksi Maillard (MRP) dapat mencegah oksidasi lipid (Bailey dan Won Um 1992). Antioksidan dibentuk pada beberapa level selama pemanasan karbonil-amina, termasuk degradasi senyawa Amadori menjadi amino reduktan atau pembentukan polimer dengan aktivitas antioksidan.

Salah satu produk pangan yang mengandung produk reaksi Maillard adalah kecap. Kecap merupakan

bahan penyedap yang disukai dan banyak digunakan dalam berbagai makanan. Secara umum, ada dua jenis kecap yang dikenal di Indonesia yaitu kecap asin dan kecap manis. Pembentukan warna kecap terjadi selama fermentasi moromi dan proses pemasakan. Selama pemasakan terjadi pembentukan warna coklat disebabkan terjadinya reaksi pencoklatan non enzimatis, yaitu reaksi Maillard dan karamelisasi. Reaksi pencoklatan non enzimatis merupakan fenomena yang sering dijumpai pada penyimpanan bahan makanan maupun pengolahan makanan. Reaksi ini berkontribusi dalam pembentukan warna (melanoidin) dan flavor. Intensitas warna ditimbulkan oleh berbagai komponen pembentuk flavor seperti asam amino dan gula. Yokotsuka (1960) menambahkan bahwa adanya asam asetat, asam laktat, asam piroglutamat, asam suksinat dan asam format juga mempengaruhi pembentukan warna dan flavor.

Reaksi Maillard adalah reaksi yang terjadi antara gugus amino dari suatu asam amino bebas, residu rantai peptida atau protein dengan gugus karbonil dari suatu karbohidrat apabila keduanya dipanaskan atau tersimpan dalam waktu yang relatif lama. Gugus α-amino terminal dan gugus ε-amino residu lisin yang terikat pada peptida/ protein berperan penting dalam reaksi disebabkan kereaktifannya yang relatif tinggi (Yokotsuka 1986).

Penelitian ini bertujuan mempelajari reaksi Maillard yang terjadi pada produk moromi dan perubahannya menjadi produk kecap manis, mengisolasi dan mengkarakterisasi produk melanoidinnya pada berbagai berat molekul serta dilakukan uji potensi aktivitas antioksidan pada tiap fraksi.

METODOLOGI

Karakterisasi moromi dan kecap manis

Pada penelitian ini terdapat empat produk yang diteliti: moromi (M), moromi yang dipanaskan (MP, suhu 100°C selama 65 menit), kecap dengan gula kelapa (KGM) dan kecap dengan gula putih (KGP). Pembuatan kecap dengan memanaskan moromi pada suhu 100°C selama 65 menit dengan penambahan gula sebanyak 48% dan air 15% (Wiratma 1995).

Dari ke empat produk tersebut dilakukan analisis yang meliputi: kadar air, kadar lemak, total N, total padatan terlarut, pH (AOAC, 1984), jenis asam amino dan gula pereduksi menggunakan *High Performance Liquid Chromatography (HPLC, shimadzu tipe SCL 6A)* serta aktivitas antioksidannya dengan penentuan periode induksi dengan rancimat dan penetapan bilangan TBA. Pada gula kelapa dan gula putih dilakukan analisis kadar gula pereduksi menggunakan *HPLC*.

Isolasi melanoidin dalam moromi dan kecap manis

Ke empat jenis produk (M, MP, KGM dan KGP) masing-masing di sentrifus dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4 °C selama 20 menit. Setelah itu dilakukan penyaringan dengan kertas Whatman 1 dan kemudian dengan membran 0.45 µm. Isolasi melanoidin dengan menggunakan *stirred cell ultrafiltration* secara axial dan bertahap dengan membran YM 10 MWCO 10 kDa, YM 30 MWCO 30 kDa dan YM 100 MWCO 100 kDa. Melanoidin yang tertahan (*nondialyzable*) didapatkan 5 fraksi:

Fraksi 1 (F1): lolos membran 0.45 µm

Fraksi 2 (F2): BM ≥ 100 kDa

Fraksi 3 (F3): 30 kDa < BM < 100 kDa

Fraksi 4 (F4): 10 kDa < BM < 30 kDa

Fraksi 5 (F5): BM ≤ 10 kDa

Total protein (Apriyantono et al., 1989)

Analisa total protein terlarut dilakukan dengan metode Lowry. Sampel sebanyak 0,05 – 2 ml ditambah dengan 5,5 ml pereaksi berupa campuran larutan natrium karbonat 2% dalam larutan NaOH 0,1 N dan tembaga sulfat 0,5% dalam larutan Na-K tartarat 1% (50:1), diaduk dan dibiarkan selama 10-15 menit pada suhu kamar. Kemudian dilakukan penambahan 0,5 ml pereaksi Folin-Ciocalteu, dikocok dan dibiarkan selama

30 menit sampai warna biru terbentuk. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 650 nm. Kurva standar dibuat menggunakan larutan bovine serum albumin.

Kadar α-amino nitrogen (Adler-Niesen 1979)

Analisa kadar α-amino nitrogen dilakukan dengan metode TNBS (trinitrobenzene sulfonic acid). Sampel sebanyak 0,1 – 0,5 ml ditepatkan menjadi 1 ml menggunakan buffer fosfat pH 8,2. Kemudian ditambah dengan 1 ml larutan TNBS 0,1% dan diletakkan dalam penangas air pada suhu 40 °C selama 2 jam. Reaksi dihentikan dengan cara menambahkan HCl 1 N. Diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm. Kurva standar dibuat dengan larutan leusin.

Absorpsi UV-Vis

Absorpsi UV-Vis diukur dengan menggunakan spektrofotometer (Shimadzu UV-160) pada kisaran panjang gelombang 200 – 500 nm

Spectra IR

Identifikasi gugus fungsional tiap fraksi dengan *Fourier Transformation Infra Red (FTIR)*. Sampel masing-masing fraksi dicampur dengan KBr dengan perbandingan 1/100 untuk dibentuk menjadi pelet, kemudian pelet ini dianalisis dengan FTIR BIORAD Excalibur series dengan kisaran panjang gelombang 400-4000 cm⁻¹.

Uji sifat antioksidan melanoidin

Metode Penetapan Periode Induksi (Alaiz et al, 1995)

Minyak kedelai dengan sampel antioksidan dihubungkan pada aliran udara dengan menggunakan suhu 110 °C. Produk oksidasinya ditransfer untuk diukur dan demikian juga absorpsinya dalam air destilat. Nilai konduktivitas sebagai produk sekunder dari oksidasi lipida dari pengukuran ini akan muncul kurva oksidasi yang diperoleh dari perubahan waktu induksi.

Penetapan bilangan TBA (Bedinghaus, 1995)

Sebanyak 5 ml sampel dan TBA (thiobarbituric acid) 0.02 M ditempatkan dalam tabung reaksi tertutup. Kemudian dilakukan pengocokan dan dibiarkan dalam ruangan gelap pada suhu ruang selama 15 jam. Pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 530 nm

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik produk moromi dan kecap manis

Kecap dihasilkan dari proses pengolahan moromi dengan pemanasan dan penambahan gula. Pada fermentasi moromi terjadi pemecahan protein, lemak dan

karbohidrat oleh kapang, khamir dan bakteri menjadi fraksi-fraksi yang lebih sederhana: asam amino, asam lemak dan glukosa, demikian juga yang terjadi pada pembuatan kecap manis. Fraksi-fraksi tersebut akan menentukan rasa, aroma, warna dan komposisi kecap (Hardjo 1964). Pada Tabel 1 dapat dilihat perubahan komposisi dari moromi, moromi yang dipanaskan sampai terbentuknya kecap manis.

Produk kecap yang dihasilkan mempunyai kekentalan yang berbeda, pada KGM sebesar 65 % Brix dan KGP 77 % Brix. Nilai pH pada ke empat produk tidak terdapat banyak perbedaan, yaitu pada kisaran 4.55 - 4.97.

Tabel 1 Komposisi moromi dan kecap ^{a)}

| Komposisi | M | MP | KGM | KGP |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|
| Kadar air (%) | 66.99 | 63.99 | 44.35 | 29.79 |
| Kadar lemak (%) | 0.35 | 0.36 | 0.31 | 0.19 |
| Total nitrogen (%) | 8.35 | 9.2 | 4.77 | 5.04 |
| Gula reduksi (%) | 1.07 | 1.25 | 6.39 | 7.18 |

M=moromi; MP=moromi dipanaskan; KGM=kecap gula merah; KGP=kecap gula putih

Kadar air moromi (66.99%) menurun ketika berubah produknya menjadi kecap (44.35% dan 29.79%). Hal ini karena adanya pemanasan, air teruapkan dan % moromi total meningkat (Tabel 1). Kadar air KGP lebih kecil dari KGM karena pada KGP banyak mengandung sukrosa yang sifatnya higroskopis sehingga pada waktu pemanasan air yang diikatnya banyak teruapkan, yaitu pada produk KGP terjadi kondensasi tapi kemudian mengalami dehidrasi.

Selain faktor-faktor tersebut yang menyebabkan perubahan kadar air produk, keterlibatan dalam reaksi Maillard juga merupakan salah satu kontribusinya. Reaksi Maillard tergantung pada kondisi saat berlangsungnya reaksi, yaitu suhu, pH, kadar air dan struktur gula. Kecepatan reaksi dan Pembentukan warna coklat akan meningkat seiring dengan meningkatnya pH, suhu dan kadar air (Hashiba 1978). Produk reaksi Maillard yang optimal juga dihasilkan pada kadar air tertentu, seperti halnya yang didapatkan oleh Eichner dan Schurmann (1992) dimana 3,5,7-trimetil-1,2,4,6-tetrapiropene yang terbentuk terbanyak pada kadar air 20% dan 50% pada pemanasan asam amino sistein dan glutation pada suhu 180 °C

Menurunnya kadar lemak dari moromi (M) menjadi KGM atau KGP (Tabel 1) karena selain proses hidrolisis atau oksidasi, yang dapat membentuk peroksida dan hidroperoksida, juga karena lemak terlibat dalam reaksi Maillard. Lemak juga mengalami degradasi menghasilkan senyawa aldehid, keton dan alkohol. KGP mengandung gula reduksi yang lebih besar dibandingkan KGM sehingga reaksi Maillard lebih banyak terjadi di KGP dan lemak yang ikut dalam reaksi Maillard juga lebih banyak. Keterlibatan lemak dalam reaksi Maillard pada hakekatnya merupakan produk degradasi lipida yang bereaksi dengan asam amino, peptida maupun

protein menghasilkan senyawa berwarna coklat atau produk-produk volatil seperti furan, pirol, pirazin dan turunannya.

Degradasi lipid menghasilkan produk volatil yang reaktif. Produk volatil yang terlibat dalam reaksi Maillard menghasilkan senyawa heterosiklik, sedangkan senyawa aldehid yang bereaksi dengan asam amino sulfur akan menghasilkan senyawa sulfur heterosiklik. Selain senyawa heterosiklik, reaksi antara produk degradasi lipid dengan produk degradasi asam amino dapat menghasilkan senyawa non heterosiklik, seperti reaksi antara 2,4-dekadienal dengan asetaldehid menghasilkan 2-pentilbenzaldehid.

Kandungan total nitrogen tidak hanya menunjukkan kadar protein sampel, namun juga mencakup senyawa nitrogen non protein. Kandungan nitrogen dalam bahan makanan berprotein tergantung dari variasi komposisi asam amino spesifik. Pada umumnya protein yang tersusun atas banyak asam amino basa mengandung lebih banyak nitrogen (Chang 1994). Proporsi nitrogen dalam berat kering juga dipengaruhi oleh kandungan lipid (Sikorski dan Ruter 1994).

Pada Tabel 1 menunjukkan penurunan kadar N total dari moromi (M) menjadi KGM atau KGP diduga disebabkan senyawa bernitrogen yang volatil menguap dan bersama gula reduksi membentuk produk-produk reaksi Maillard.

Mutu kecap dipengaruhi oleh kandungan total nitrogen, amino nitrogen dan persentase antara amino nitrogen dengan total nitrogen pada kecap. Kecap yang bermutu baik mempunyai rasio amino nitrogen dengan total nitrogen lebih besar dari 50% dan pH-nya berkisar antara 4,6 - 4,8 (Hesseltine dan Wang 1972)

Tabel 2. Kadar gula pada gula kelapa dan gula pasir (%)

| Jenis gula | gula kelapa | gula pasir |
|------------|-------------|------------|
| Sukrosa | 74.68 | 63.51 |
| Fruktosa | 1.90 | 7.31 |
| Glukosa | 3.43 | 4.35 |

Rasio gula terhadap asam amino sangat berpengaruh terhadap reaksi pembentukan warna. Makin meningkat jumlah asam aminonya, makin cepat terjadi pembentukan warna. Gugus karbonil dari gula pereduksi dengan gugus amino dari asam amino bebas merupakan komponen penting dalam reaksi Maillard. Perubahan moromi menjadi produk kecap (KGM atau KGP) dilakukan penambahan gula sebanyak 48% dan dilakukan pemanasan 65 menit, sehingga hal ini akan menyebabkan terjadinya reaksi Maillard pada produk kecap (KGM atau KGP) yang juga ditunjukkan dengan adanya perubahan warna yang lebih coklat dibandingkan produk M dan MP. Dengan adanya perubahan produk dan proses pemanasan tersebut menyebabkan terdapatnya gula reduksi yang lebih besar (KGM 6,39%; KGP 7,18%) dibandingkan produk M (1,07%) dan MP

(1.25%) (Tabel 1) dan hal inipun juga berpengaruh terhadap pembentukan warna dari reaksi Maillard.

Konfigurasi stereokimia dan ukuran molekul gula berpengaruh terhadap reaksi Maillard. Umumnya molekul gula yang lebih kecil bereaksi lebih cepat daripada yang besar. Pentosa bereaksi lebih cepat dibandingkan heksosa dan heksosa lebih cepat bereaksi dibandingkan disakarida. Galaktosa paling reaktif diantara heksosa pada umumnya. Fruktosa lebih cepat bereaksi dibandingkan glukosa pada tahap awal, tetapi untuk tahap selanjutnya sebaliknya (Miller 1998). Lebih tingginya kadar gula reduksi pada KGP daripada KGM (Tabel 1 dan Tabel 2), demikian juga lebih tingginya kadar fruktosa pada gula pasir daripada gula kelapa menyebabkan laju pembentukan warna akibat reaksi Maillard pada KGP lebih intens dibandingkan KGM (Tabel 2).

Beberapa penelitian reaksi Maillard hasil reaksi protein dan gula reduksi menunjukkan "blocking" terhadap asam amino lisin. Menurunnya kadar asam amino lisin dari moromi (0.88%) ke produk kecap (0.69%, Tabel 3) karena deaminasi gugus ε-amino lisin dalam proses reaksi Maillard dalam kecap yang akan membentuk warna coklat (melanoidin). Reaksi deaminasi amino-karbonil tersebut berbeda dengan reaksi deaminasi gugus α-amino dari suatu asam amino melalui reaksi degradasi Strecker, dimana hal ini belum banyak diketahui (Namiki et al., 1983). Asam amino lisin paling cepat menghasilkan warna yang disebabkan oleh gugus ε-amino tersebut yang sangat reaktif. Sistein paling lambat menghasilkan warna. Oleh karena itu bahan pangan yang mengandung asam amino lisin sangat mudah menjadi coklat.

Reaksi Maillard dapat dibagi dalam tiga tahapan yaitu tahap awal pembentukan glikosilamin dan *Amadori Rearrangement Product* (ARP), tahap

intermediet terjadi dekomposisi ARP dan degradasi strecker, dan pada tahap akhir senyawa karbonil (furfural, produk fisi, dehidroreduktan atau aldehid hasil degradasi strecker) mengalami perubahan menjadi senyawa yang mempunyai berat molekul tinggi (melanoidin) (Yokotsuka 1986). Sejumlah pentosa seperti xilosa dan arabinosa yang terdapat pada kecap mampu membentuk senyawa Amadori dengan asam amino. Hashiba (1978) mendapatkan total konsentrasi senyawa Amadori pada kecap sebanyak 4,5 mM. Sedangkan Kato et al., dalam Hashiba (1972) menunjukkan bahwa 3-deoxyozones dan glucosone merupakan senyawa intermediet yang penting dalam reaksi browning, dimana senyawa ini juga berperan sebagai antioksidan.

Hampir semua macam asam amino terdapat pada kecap. Asam amino hidrofobik (valin, leusin, isoleusin), asam amino hidrofilik (glutamat, glisin, aspartat) dan asam amino aromatik (fenilalanin) cenderung meningkat kadarnya dari produk moromi menjadi produk kecap. Hal ini diduga karena dengan adanya proses pemanasan dari produk moromi menjadi kecap manis, protein terdegradasi menjadi asam-asam amino.

Karakteristik Fraksi Melanoidin

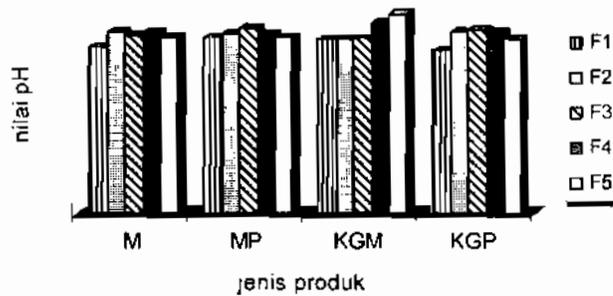
Nilai pH

Nilai pH antara tiap fraksi pada ke empat produk (M, MP, KGM, KGP) relatif sama, yaitu berada pada kisaran 4.43 - 4.81. Proses fraksinasi tidak mempengaruhi nilai pH. Hal ini diduga karena molekul asam dan basa pada umumnya tersebar merata pada berbagai berat molekul

Tabel 3 . Kadar asam amino produk moromi dan kecap (%)¹

| Asam amino | M | MP | KGM | KGP |
|---------------|-------|-------|-------|-------|
| Asam aspartat | 1.306 | 1.550 | 1.058 | 1.464 |
| Asam glutamat | 2.536 | 3.226 | 2.272 | 2.964 |
| Serin | 0.306 | 0.324 | 0.238 | 0.322 |
| Glisin | 0.460 | 0.570 | 0.524 | 0.584 |
| Histidin | 0.288 | 0.356 | 0.228 | 0.390 |
| Arginin | 0.286 | 0.386 | 0.780 | 0.298 |
| Treonin | 0.808 | 0.902 | 0.672 | 0.840 |
| Alanin | 0.674 | 0.596 | 0.452 | 0.646 |
| Prolin | 0.356 | 0.388 | 0.472 | 0.402 |
| Tirosin | 0.708 | 0.868 | 0.648 | 0.816 |
| Valin | 0.600 | 0.670 | 0.452 | 0.670 |
| Metionin | 0.314 | 0.390 | 0.300 | 0.392 |
| Sistein | 1.242 | 1.230 | 1.020 | 1.166 |
| Isoleusin | 1.072 | 1.040 | 1.040 | 1.276 |
| Leusin | 0.846 | 1.038 | 0.824 | 0.960 |
| Fenilalanin | 0.474 | 0.684 | 0.488 | 0.608 |
| Lisin | 0.886 | 1.178 | 0.694 | 0.886 |

M=moromi; MP=moromi dipanaskan; KGM=kecap gula merah; KGP=kecap gula putih



M=moromi, MP=moromi dipanaskan; KGM=kecap gula merah, KGP=kecap gula putih

Gambar 1. Nilai pH tiap fraksi melanoidin

Besarnya nilai pH pada tiap fraksi yang relatif sama, diharapkan tidak mempengaruhi reaksi Maillard yang terjadi pada moromi dan kecap serta aktivitas antioksidannya.

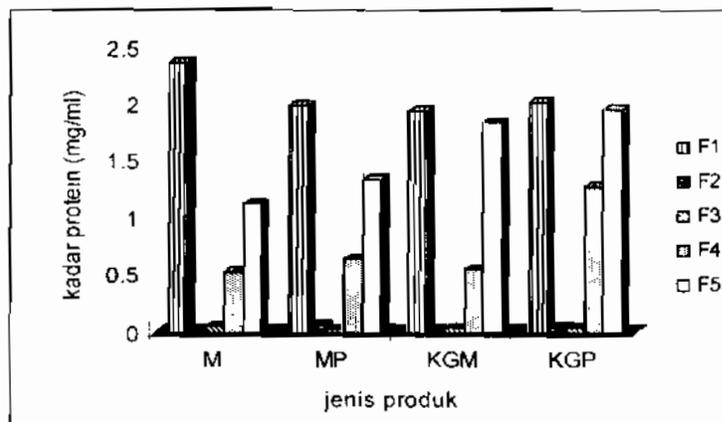
Jika terdapat perbedaan nilai pH yang signifikan akan mempengaruhi sistem reaksi terhadap laju pembentukan warna, jenis dan rasio produk reaksi Maillard yang terbentuk. Pada nilai pH rendah (lebih kecil atau sama dengan 7) reaksi mengarah ke pembentukan furfural dari ARPs, diatas pH 7 reaksi menuju pembentukan reduktan dan reaksi pembelahan (fisi). Laju pembentukan warna melalui furfural relatif lebih lambat dibandingkan melalui reduktan. Dengan demikian laju pembentukan warna meningkat sejalan dengan peningkatan pH (Tressi et al 1998).

Kadar ptein terlarut

Kadar protein terlarut berbeda-beda pada masing-masing fraksi, pada F1 memiliki kadar protein

tertinggi (1.94 – 2.37 mg/ml), kemudian berturut-turut menurun dari F5, F4, F2 dan F3 (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa protein produk sebagian besar berada pada kisaran berat molekul ≤ 10 kDa. Pada berat molekul besar kadar protein semakin menurun pada semua produk moromi (0.02 - 0.07 mg/ml).

Jika dibandingkan antar produk, moromi (M) pada fraksi F1 (2.37 mg/ml dan F3 (0.05 mg/ml) memiliki kadar protein tertinggi. sedangkan pada fraksi F4 kadar protein tertinggi terdapat pada produk kecap KGP, yaitu 1.27 mg/ml, diikuti oleh KGM, MP dan M. Secara keseluruhan kadar protein terlarut moromi lebih besar jika dibandingkan dengan KGP dan KGM, hal ini dapat disebabkan protein KGM dan KGP mengalami denaturasi dan protein dengan gula reduksi membentuk reaksi Maillard. Perubahan kimia protein dalam proses pengolahan tergantung pada sejumlah parameter, seperti komposisi bahan pangan dan kondisi pengolahan (suhu, pH dan adanya oksigen).



M=moromi, MP=moromi dipanaskan; KGM=kecap gula merah; KGP=kecap gula putih

Gambar 2. Kadar protein fraksi melanoidin

Kadar α -amino Nitrogen

Pada dasarnya metode TNBS (asam trinitrobenzen sulfonat) yang digunakan untuk menentukan kadar α -amino merupakan pengujian secara spektrofotometri terhadap gugus khromofor yang terbentuk melalui reaksi antara TNBS dengan gugus amina primer. Pereaksi TNBS juga bereaksi secara lambat dengan ion hidroksil (Adler-Niesen 1979). Kedua puluh asam amino penyusun protein mengandung ion hidroksil sebagai bagian dari gugus karboksil. Asam amino serin, treonin, asam aspartat dan asam glutamat juga mengandung gugus hidroksil tambahan pada rantai sampingnya. Oleh karena itu kadar α -amino tiap fraksi juga ditentukan oleh perbedaan konsentrasi ke empat asam amino tersebut.

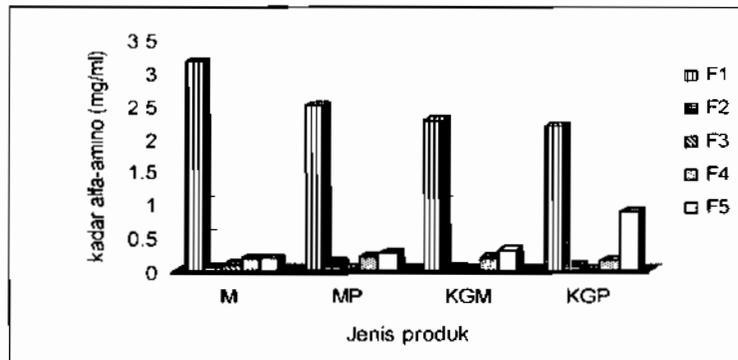
Secara keseluruhan didapatkan kadar alfa-amino nitrogen terkecil terdapat pada produk dengan berat molekul terbesar (BM \geq 100 kDa). Kadar α -amino nitrogen berada pada kisaran berat molekul \leq 10 kDa (0.172 - 3.16 mg/ml). Pada F1(3.16 mg/ml) dan F3 (0.08 mg/ml) kadar α -amino nitrogen pada moromi (M) tertinggi diikuti MP, KGM dan KGP. Pada F4 MP dan KGM kadar alfa-amino nitrogen tertinggi, yaitu 0.19 mg/ml, diikuti M dan KGP. sedangkan pada F3 kadar alfa-amino nitrogen tertinggi pada M (0.079), diikuti MP, KGP dan KGM. Pada F2 (0.13 mg/ml) kadar alfa-amino tertinggi MP, diikuti KGP, M dan KGM

Spektrum UV-Vis

Pada penelitian ini menggambarkan pengukuran pigmen coklat yang terjadi selama proses pengolahan moromi, moromi dipanaskan sampai menjadi kecap pada 5 fraksi dengan panjang gelombang pada kisaran 200-500 nm. Perubahan warna ini sebagian besar disebabkan oleh reaksi Maillard antara gugus amino dan karbonil atau karena karamelisasi melalui pirolisis gula. Selama proses pengolahan perubahan warna ini terjadi secara simultan dan berkembang menjadi beberapa tipe pigmen dengan perbedaan komposisi senyawa kimia

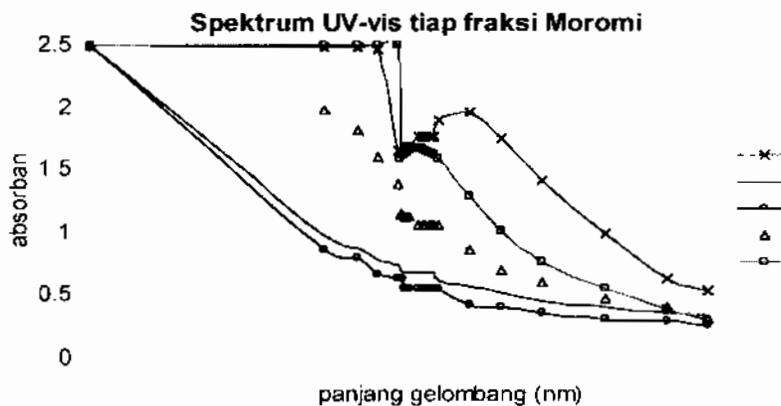
Pada produk moromi (M) serapan maksimum dari F1 pada 381 nm, F2 pada 306 nm dan 348, F3 pada 311 nm F4 pada 307 dan 345 nm, dan F5 pada 360 nm (gambar 4). Sedangkan pada produk KGM serapan maksimum dari F1 pada 393 nm, F2 pada 310 nm, F3 pada 312 nm dan 343 nm, F4 pada 380 nm dan F5 pada 368 nm.

Perubahan warna moromi (M) menjadi MP, KGM dan KGP cenderung dari warna coklat muda menjadi coklat tua atau coklat kehitaman, tetapi ternyata setelah di fraksinasi menunjukkan tidak banyak perubahan dalam masing-masing serapannya. Pada Gambar 4 dan 5 di atas, serapan maksimum pada masing-masing fraksi produk moromi dan kecap hampir sama, kecuali ada sedikit perbedaan pada F3 dan F4.

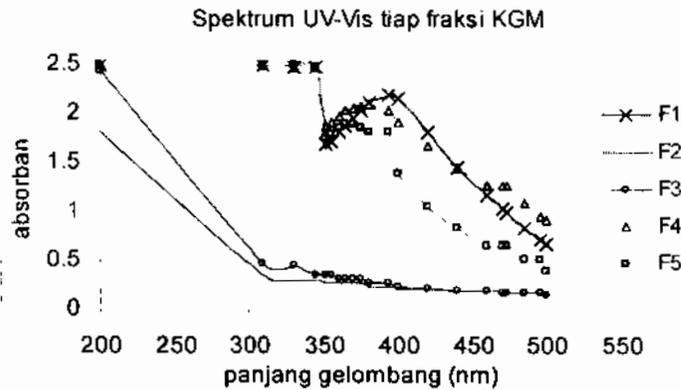


M=moromi; MP=moromi dipanaskan; KGM=kecap gula merah; KGP=kecap gula putih

Gambar 3 Kadar alfa-amino nitrogen fraksi melanoidin



Gambar 4. Spektrum UV-Vis dari fraksi Moromi (M)



Gambar 5. Spektrum UV-Vis dari fraksi kecap (KGM)

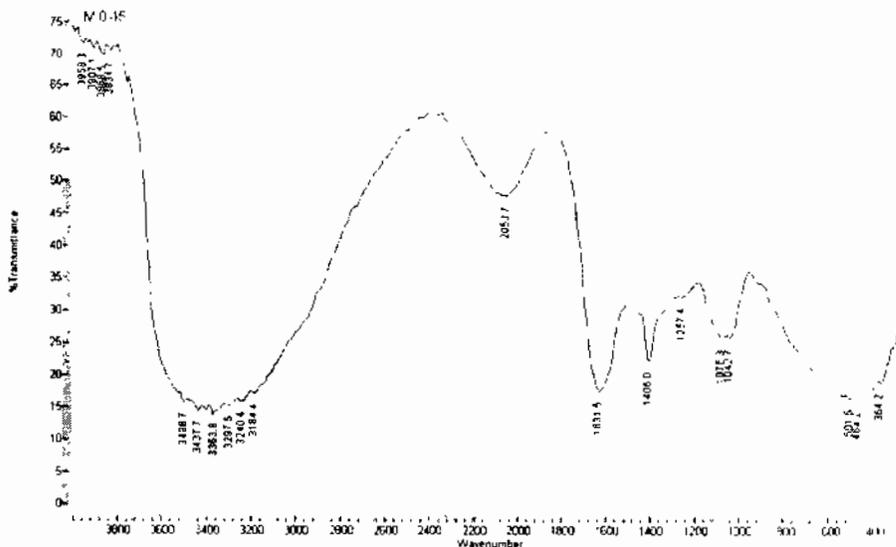
Jika dilihat serapan UV Vis pada semua produk (M, MP, KGM, KGP), pada F1 hampir tidak ada perbedaan serapan, yaitu di kisaran 380-398 nm. Pada F2 dan F3 terdapat dua serapan maksimum, yaitu di daerah 306 nm dan 348 nm. Pada F4 serapan UV-Vis semakin meningkat pada produk moromi menjadi produk kecap, yaitu dari 345 nm (M), 365 nm (MP), 380 nm (KGM) dan 397nm (KGP). Pada F5 hanya pada produk KGP terdapat perbedaan serapan yang cukup intens, yaitu di daerah 403 nm, produk yang lainnya di kisaran 360 nm.

Serapan maksimum dari fraksi melanoidin produk moromi dan kecap di atas mirip yang didapatkan oleh Hofmann (1998) yang menunjukkan serapan maksimum melanoidin dari arginin dan glyoxal dan furan-2-carboxaldehyde pada panjang gelombang 314 nm dan 472 nm. Terasawa et al (1991) mendapatkan serapan maksimum melanoidin dari glukosa dan glisin pada panjang gelombang 320 nm, sedangkan dari penelitian Namiki et al (1983) mendapatkan spektra maksimum pigmen merah yang berasal dari sistem model DHA-

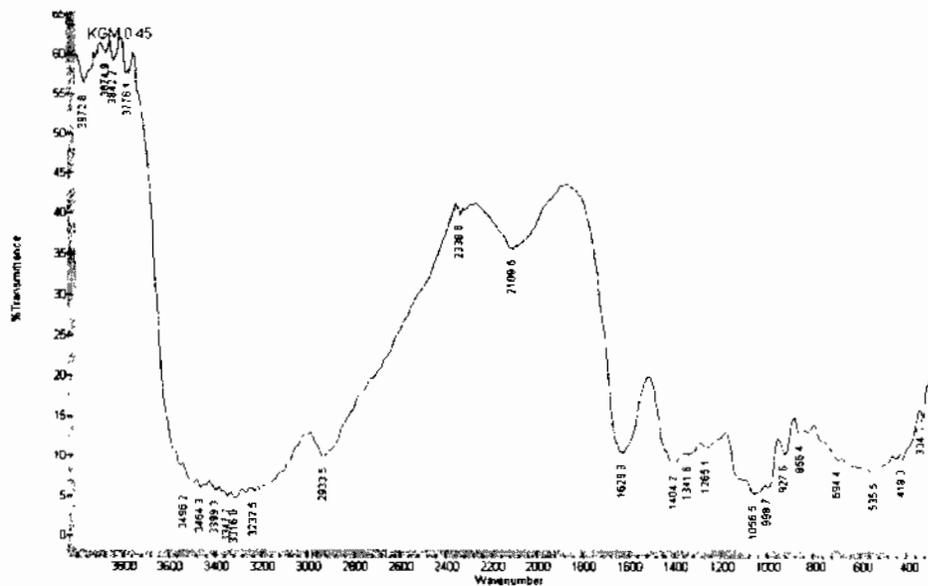
casein dan DHA-ovalbumin pada panjang gelombang 385 nm dan 512-513 nm.

Spektra-IR

Spectra IR dari beberapa fraksi melanoidin pada ke empat produk (M), MP, KGM dan KGP pada dasarnya hampir sama. Spectra IR dari beberapa fraksi melanoidin pada dasarnya hampir sama. Pada sampel moromi (M), MP, KGM dan KGP hampir semua fraksi mempunyai serapan yang cukup tajam di daerah sekitar 2060 cm^{-1} yang kemungkinan mengindikasikan gugus $-OH...O$ dari β -diketon atau kombinasi $C=R=R$. Selain itu juga spectra IR mempunyai band di sekitar daerah 600-900, 1020-1080, 1240-1265, 1350-1415, 1610-1650, 2300-2360 dan 2900-3500 cm^{-1} yang menunjukkan gugus fungsional $\rightarrow CH$, $\rightarrow COC$, $>C=C<$, $>C=N$, $>NH$, $\rightarrow N+H$, COO dan gugus fungsional yang lain.



Gambar 6. Spectra IR produk moromi F1



Gambar 7. Spectra IR produk KGM F1

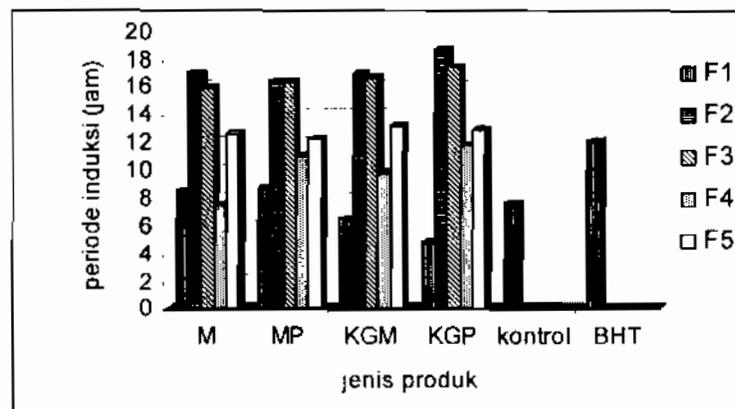
Pada prinsipnya, spectra IR menunjukkan bahwa struktur melanoidin merupakan senyawa polimer (*spreading bands*). Posisi dan tipe karakteristik absorpsinya tidak banyak dipengaruhi oleh kondisi reaksi yang berbeda. Cammerer dan Kroh, 1995 mendapatkan gugus $-N=C-$ atau $>N=C$ dan memberikan hipotesis bahwa elemen utama dalam struktur melanoidin merupakan penggabungan nitrogen dalam polimer melanoidin. Intensitas yang lebih kecil didapatkan pada amida sekunder dan juga amina sekunder dan tersier

Struktur kimia melanoidin belum sepenuhnya dijelaskan dengan lengkap dalam publikasi-publikasi, untuk itu masih sangat sulit menentukan dengan tepat, meskipun secara umum struktur melanoidin terdiri dari pengulangan gugus aromatik. Homma et al.,(1997) menjelaskan hasil analisisnya mengatakan bahwa

struktur melanoidin mirip dengan produk reaksi Amadori, dan juga merupakan unit pengulangan dari konyugasi ikatan rangkap dari karbon dan nitrogen tersier. Struktur ini sebagaimana halnya pada redukton, seperti enol dan enaminal

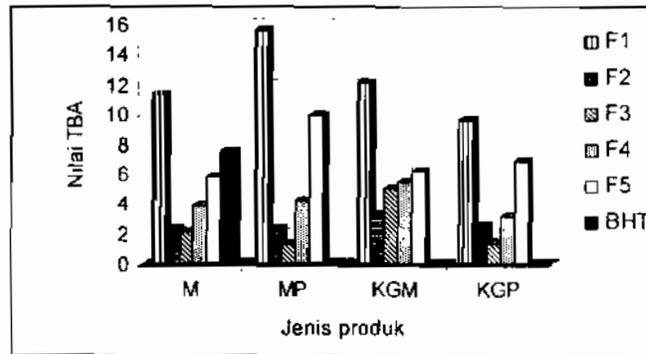
Aktivitas antioksidan

Antioksidan dibentuk pada beberapa tahap selama reaksi Maillard, termasuk degradasi senyawa Amadori pada amino redukton, atau redukton, dan pembentukan polimer dengan aktivitas antioksidan (Bailey dan Won Um 1992). Proses fraksinasi menunjukkan bahwa fraksi dengan berat molekul yang berbeda akan mempengaruhi efek antioksidan (Hofmann 1998).



M = moromi, MP = moromi dipanaskan; KGM = kecap gula merah; KGP = kecap gula putih; BHT = Butylated hidroxytoluene

Gambar. 8. Periode induksi fraksi melanoidin



M = moromi; MP = moromi dipanaskan; KGM = kecap gula merah; KGP = kecap gula putih; BHT = Butylated hydroxytoluene

Gambar 9. Nilai TBA fraksi melanoidin

Pengukuran periode induksi dari ke empat produk menunjukkan bahwa pada produk M, MP, KGM dan KGP periode induksinya lebih lama dibandingkan dengan kontrol dan antioksidan sintesis BHT, terutama pada fraksi F4, F3 dan F2 (Gambar 8). Sedangkan dengan nilai TBA, nilai tertinggi berturut-turut terdapat pada fraksi F1, F5, F4, F3 dan F2 (Gambar 9). Semakin besar bilangan TBA menunjukkan besarnya malonaldehid yang dihasilkan akibat oksidasi. Hasil ini menunjukkan bahwa senyawa berwarna (melanoidin) terutama pada berat molekul besar mempunyai aktivitas antioksidan yang cukup besar. Hal ini diduga karena struktur melanoidin yang merupakan suatu polimer, yaitu suatu unit pengulangan karbon yang berikatan rangkap dan nitrogen tersier dimana struktur ini terdiri atas reduktan seperti enol atau enaminoil mampu sebagai antioksidan, demikian juga gugus hidroksil yang terdapat pada melanoidin mampu mengurangi proses oksidasi dengan cara mereduksi logam, mengkelat logam dan menangkap radikal bebas. Dengan semakin besarnya berat molekul melanoidin akan meningkatkan potensinya sebagai antioksidan.

KESIMPULAN

Kadar air pada degradasi termal asam amino berpengaruh terhadap jenis produk reaksi Maillard yang terbentuk, sedangkan rasio gula terhadap asam amino sangat berpengaruh terhadap laju reaksi pembentukan warna. Menurunnya kadar asam amino lisin dari moromi ke kecap (dari 0.886% menjadi 0.694%) karena deaminasi gugus ϵ -amino lisin dalam proses reaksi Maillard dalam kecap yang akan membentuk warna coklat (melanoidin).

Kadar protein (1.12 - 2.37 mg/ml) dan alfa-amino (0.17 - 3.16 mg/ml) tertinggi terdapat pada fraksi dengan berat molekul ≤ 10000 dalton. Serapan maksimum dengan UV-Vis pada masing-masing fraksi melanoidin moromi (M) dan kecap (KGM) hampir sama, kecuali pada fraksi berat molekul 10-30 kDa, sedangkan dengan serapan IR hampir semua fraksi mempunyai serapan

yang cukup tajam di daerah sekitar 2060 cm^{-1} yang kemungkinannya mengindikasikan gugus $\text{-OH}\dots\text{O}$ dari β -diketon atau kombinasi $\text{C}=\text{R}=\text{R}$

Aktivitas antioksidan fraksi melanoidin cukup tinggi pada fraksi dengan berat molekul besar, yaitu pada BM 30-100 kDa dengan indeks protektif 2.17 dan BM > 100 kDa dengan indeks protektif 2.43

DAFTAR PUSTAKA

- Adler, Niesen. 1979. Determination of Degree of Hidrolisis of Food Protein Hidrolisat by Trinitrobenzene Sulfonic Acid. *J. Agric. Food. Chem.* 27: 1256 - 1262
- Alaiz M, Zamora R, Hidalgo FJ. 1995. Natural Antioxidants Produced in Oxidized Lipid/amino Acid Browning Reactions. *JAOCS*. Vol. 72 No.12
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). 1984. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14 th ed. AOAC. Virginia : Inc. Arlington
- Apriyantono A, Fardiaz D, Puspitasari NL, Sedarnawati, Budijanto S. 1989. *Analisa Pangan*. Bogor: PAU IPB
- Bailey ME, Won Um K. 1992. Maillard Reaction and Lipid Oxidation Di dalam: Angelo AJS. *Lipid Oxidation in Food* ACS Symposium Series. New York: August 25-30
- Cammerer B, Kroh LW. 1995. Investigation of the Influence of Reaction Conditions on The Elementary Composition of Melanoidins. *Food chem.* 53:55-59
- Chang SKC. 1994. Protein Analysis. Di dalam Nielsen SS, editor. *Introduction to the Chemical Analysis of Foods*. Boston: Jones and Bartlett
- Eichner K dan Schuirmann. 1992 The Influence of

- Temperature and water Activity on The Formation of Aminoimidazoquinolines and Quinoxalines (IQ compounds) in Meat Product. *J.Agric.Food Chem.* 42: 106-110
- Hardjo S. 1964.** Pengolahan dan Pengawetan Kedelai untuk Makanan Manusia. Bogor
- Hashiba H. 1972.** Non-enzymatic Browning of Soy Sauce Comparison of the Browning of Soy Sauce with That of a Sugar-amino Acid Model System. *Agric Biol. Chem.* 36(3): 390-397
- Hashiba H. 1978.** Isolation and Identification of Amadori Compounds From Soy Sauce. *Agric. Biol Chem.* 42(4): 763-768
- Hesseltine CW, Wang HL. 1972.** Fermented Soybean Food Product. Di dalam: A.K. Smith dan S. J. Circle (eds). *Soybean Chemistry and Technology Vol I.* Westport : AVI Publ. Co. Inc..
- Hofmann 1998.** 4-Alkylidene-2-imino-5-[4-alkylidene-5-oxo-1,3 - imidazol-2-iny]aza-methylidene-1,3-imidazolidine- A Novel Colored Substructure in Melanoidins Formed by Maillard Reactions of Bound Arginine with Glyoxal and Furan-2-carboxaldehyde. *J.Agric.Food Chem.*46: 3896-3901
- Homma S, Terasawa N, Kubo T, Yoneyama-Ishi, Aida K. 1997.** Changes in Chemical Properties of Melanoidin by Oxidation and Reduction. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61 (3): 533-535
- Miller DD. 1998.** Food Chemistry. A Laboratory manual. New York: J Wiley & Sons Inc.
- Namiki M, Terao A, Ueda S dan Hayashi T. 1983.** Deamination of Lysine in Protein by Reaction with Oxidized Ascorbic Acid or Active Carbonyl Compounds Produced by Maillard reaction. *Agric Biol.Chem.*47.106-114
- Sikorski ZE, Ruiter A. 1994.** Changes in Protein and Nonprotein Nitrogen Compounds in Cured, Fermented and Dried Seafood. Di dalam Sikorski ZE, Pan BS, Shahidi F, editor. *Seafood Protein.* New York: Chapman and Hall.
- Tarladgis BG, Watts BM dan Younathan MT. 1960.** A Distillation Method for the Quantitatif Determination of Malonaldehyde in Rancid Foods. *JAOCS.* 37:44-46
- Terasawa N, Murata M dan Homma S . 1991.** Separation of Model Melanoidin Into Components With Copper Chelating Sepharose 6B Column Chromatography and Comparison of Chelating Activity. *Agric.Biol.Chem.*55(6), 1507-1514
- Tressl R, Wondrak GT dan Garbe LA. 1998.** Pentoses and Hexoses as Sources of New Melanoidin-like Maillard Polymers. *J.Agric.Food chem.*, 46. 1765-1776
- Wiratma E. 1995.** Analisis Komponen Flavor Kecap Manis [skripsi]. IPB ,Fateta
- Yokotsuka T. 1986.** Soy Sauce Biochemistry. *Adv. Food. Res.* (30): 195-329
- Yokotsuka T. 1960.** Aroma and Flavor of Japanese Soy Sauce. Di dalam CO Chicester (ed). *Advanced in Food Research.* Vol.X. Academic press. New York