

ANALISIS KOMPONEN FLAVOR YANG DIHASILKAN OLEH *Hansenula anomala* YANG DITUMBUHKAN PADA SUBSTRAT AIR KELAPA

ANALYSIS OF FLAVOR COMPONENTS PRODUCED BY *Hansenula anomala* GROWN ON COCONUT WATER SUBSTRATE

C. Hanny Wijaya¹⁾, Harsi Kusumaningrum¹⁾, Winiati Pudji Rahayu¹⁾
dan Verita Amahorseya²⁾

ABSTRACT

Many studies on microbial flavor were directed to find new sources of natural flavor. *Hansenula anomala* is a film yeast, produces little alcohols but is able to produce esters, especially ethyl acetate. The aim of this research was to examine the effects of fermentation condition (pH) and extraction methods on flavor components from *H. anomala* grown on coconut water substrate. Five major components were observed, three of them were identified as ethyl acetate, isoamyl acetate and ethyl laurate. These five components are extracted from the cell. It was found that production of each component was affected by pH of the substrate. Flavor compounds obtained were affected by the extraction methods.

PENDAHULUAN

Mikroorganisme dikenal dapat memproduksi flavor pada bahan pangan terfermentasi. Ester umumnya merupakan bagian terbesar dalam komponen flavor yang dihasilkan selama fermentasi. Senyawa kunci dalam biosintesis ester adalah asil-koA yang dapat diproduksi antara lain melalui aktivasi asam lemak (Nykanen, 1988). Asam lemak terbentuk dari degradasi lipid dengan bantuan lipase. Sebagaimana enzim lainnya, lipase memiliki pH optimum untuk melakukan aktivitasnya.

Hansenula anomala merupakan khamir pembentuk film, sedikit menghasilkan alkohol namun dapat menghasilkan ester terutama etil asetat (Amerine dan Ough, 1980). Khamir ini dikenal sebagai penghasil flavor pada tape, brem dan ragi. Sudiati (1993) meneliti fermentasi *H. anomala* dan *Candida utilis* pada air kelapa dan hati nenas dalam menghasilkan komponen flavor. Komponen flavor paling banyak dihasilkan oleh *H. anomala* yang ditumbuhkan pada air kelapa.

METODOLOGI

Bahan

Bahan yang digunakan antara lain : air kelapa yang diperoleh dari kantin Fakultas Teknologi Pertanian, IPB; kultur *Hansenula anomala* yang diperoleh dari Laboratorium Teknologi dan Fermentasi, ITB; glukosa, asam tartarat, dietil eter, dan bahan-bahan kimia penunjang diperoleh dari toko bahan kimia di Bogori, sedangkan untuk standar etil asetat, isoamil asetat, dan etil laurat diperoleh dari PT Quest International.

Metode

Pada penelitian ini dilakukan pengaturan pH substrat dengan asam tartarat 10% hingga tercapai pH yang diinginkan (3,5; 4,0; 4,5; dan 5,0). Setelah selesai masa inkubasi, sebagian kultur dipisahkan selnya dari media (tanpa sel), sedang sebagian lagi dibiarkan tetap dengan selnya untuk selanjutnya dilakukan ekstraksi. Ekstraksi dilakukan dengan dua cara, yaitu (1) ekstraksi langsung, dan (2) ekstraksi dengan pelarut dan destilasi uap sekaligus. Pada ekstraksi langsung, sampel dikocok dengan pelarut dietil eter dan dipisahkan fase ainya. Fase pelarut selanjutnya dikeringkan dengan Na₂SO₄ anhidrat dan dipekatkan dengan rotary evaporator. Sedangkan pada ekstraksi dengan alat "Likens-Nickerson" digunakan dietil eter sebagai pelarut. Sampel dicampur dengan air destilata dan suhu penangas air pada labu pelarut diatur 37,5°C, ekstraksi-destilasi dilangsungkan selama 1 jam. Pelarut yang sudah mengandung komponen volatil ini dikeringkan dengan Na₂SO₄ anhidrat, dipekatkan dengan rotary evaporator.

¹⁾ Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fateta-IPB, Kotak Pos 220, Kampus Darmaga, Bogor 16002

²⁾ Alumni Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fateta IPB yang sekarang bekerja pada R&D PT Roda Mas

Tabel 1. Waktu retensi, identifikasi dan kondisi pH optimum perolehan kelima komponen flavor utama yang dihasilkan oleh *H. anomala* pada substrat air kelapa

Komponen	Kisaran waktu retensi (menit)	Komponen teridentifikasi	Produksi optimum pada	
			pH	Cara ekstraksi
A	4,18 - 5,68	-	3,5 - 4,0	langsung; Likens-Nickerson
B	5,08 - 7,23	etil asetat	4,5 - 5,0	Likens-Nickerson
C	10,35 - 16,15	-	3,5 - 4,0	Likens-Nickerson
D	18,16 - 21,46	isoamil asetat	3,5 - 5,0	Likens-Nickerson
E	28,10 - 33,45	etil laurat	3,5 - 5,0	langsung

Analisis profil dengan kromatografi gas Hitachi 26370 dan integrator Hitachi D-2500 dilakukan dengan menggunakan kolom jejal Carbowax 20M, fase gerak gas nitrogen (kecepatan alir 20 ml/menit), suhu terprogram 50-150°C (peningkatan suhu 2°C.menit dengan suhu injektor 200°C. Detektor yang digunakan adalah detektor pengionan nyala api. Untuk identifikasi digunakan senyawa-senyawa standar sebagai pembanding.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan terdapat lima komponen utama yang terlihat pada semua profil komponen ekstraksi kultur *H. anomala* (Tabel 1). Selanjutnya kelima komponen ini disebut sebagai komponen A, B, C, D dan E (Gambar 1). Setiap komponen yang diproduksi kemudian diurutkan berdasarkan perbandingan luas area puncak komponen tersebut terhadap komponen lain dalam kromatogram yang sama (jumlah relatif perolehan senyawa). Pengurutan ini dilakukan untuk melihat pengaruh perlakuan pH dan cara ekstraksi terhadap perolehan masing-masing komponen. Secara keseluruhan tidak tampak adanya pengaruh ekstraksi tanpa maupun dengan sel terhadap perolehan kelima komponen. Hal ini menunjukkan bahwa kelima komponen ini bersifat ekstraseluler. Grosch (1982) menyatakan bahwa lipase yang dihasilkan oleh mikroba bersifat ekstraseluler dan dapat diinduksi dengan adanya lipid pada substrat.

Komponen A

Komponen A memiliki kisaran waktu retensi 4,18-5,68 menit dan merupakan komponen yang cukup banyak dihasilkan oleh kultur *H. anomala*. Urutan perolehan komponen A dapat dilihat pada Tabel 2.

Dari Tabel 2 terlihat bahwa komponen A cenderung lebih banyak dihasilkan pada pH 3,5 dan 4,0 (urutan 2-3) daripada pH 4,5 dan 5,0 (urutan 3-4). Hal ini mungkin terjadi karena menurunnya aktivitas esterifikasi dari lipase pada pH di atas 4,5. Welsh dan Williams (1989) menyatakan bahwa untuk membentuk ester yang

berbeda-beda lipase memiliki pH optimum yang berbeda-beda pula.

Tabel 2. Pengaruh pH dan cara ekstraksi terhadap urutan jumlah relatif perolehan komponen A

Cara ekstraksi	Urutan jumlah relatif komponen E			
	pH 3,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0
A1B1	2	2	3	3
A1B2	3	3	7	5
A2B1	2	2	4	4
A2B2	2	5	3	3

A1 = ekstraksi langsung;
B1 = tanpa sel;

A2 = Likens Nickerson
B2 = dengan sel

Cara ekstraksi tampaknya tidak berpengaruh terhadap komponen A. Diduga bahwa komponen A cukup stabil terhadap panas.

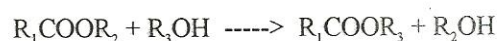
Komponen B

Komponen B memiliki kisaran waktu retensi 5,08 - 7,23 menit. Berdasarkan waktu retensi etil asetat standar, yaitu 5,59 menit dan bahwa etil asetat merupakan ester utama yang dihasilkan oleh *H. anomala* (Amerine dan Ough, 1980), maka diperkirakan bahwa komponen B adalah etil asetat.

Dari Tabel 3 terlihat bahwa komponen B lebih banyak pada pH 4,5 dan 5,0. Diduga hal ini terjadi karena aktivitas lipase untuk pembentukan ester asam asetat lebih baik pada pH di atas 4,5.

Cara ekstraksi tampak mempengaruhi produksi komponen B. Komponen B lebih banyak dihasilkan pada ekstraksi langsung. Hal ini terjadi kemungkinan karena komponen B tahan terhadap panas. Panas yang digunakan pada ekstraksi Likens-Nickerson dapat mendorong proses trans-esterifikasi dan membentuk ester yang lebih stabil (Griffin Jr, 1969).

Reaksi umum trans-esterifikasi adalah sebagai berikut :

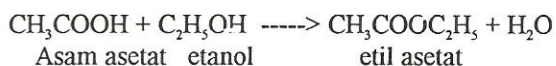


Tabel 3. Pengaruh pH dan cara ekstraksi terhadap urutan jumlah relatif perolehan komponen B

Cara ekstraksi	Urutan jumlah relatif komponen E			
	pH 3,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0
A1B1	4	4	2	2
A1B2	2	2	2	1
A2B1	1	4	1	1
A2B2	1	2	1	2

A1 = ekstraksi langsung; A2 = Likens Nickerson
 B1 = tanpa sel; B2 = dengan sel

Reaksi yang mungkin terjadi dalam trans-esterifikasi ester-ester lain menjadi etil asetat adalah sebagai berikut:



Etil asetat mempunyai rumus molekul $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$, dengan berat molekul 88,10. Etil asetat merupakan komponen berbentuk cair, jernih, volatil dan mudah terbakar dengan karakteristik organoleptik aroma vinegar dan cat kuku dengan sedikit rasa khas (Stecher, 1960). Dalam industri flavor etil asetat digunakan untuk memberi kesan seperti buah dan meningkatkan flavor.

Komponen C

Komponen C memiliki kisaran waktu retensi 10,35 - 16,15 menit. Pengaruh pH dan cara ekstraksi terhadap perolehan komponen C dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Pengaruh pH dan cara ekstraksi terhadap urutan jumlah relatif perolehan komponen C

Cara ekstraksi	Urutan jumlah relatif komponen E			
	pH 3,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0
A1B1	5	5	6	6
A1B2	5	5	8	8
A2B1	4	3	5	5
A2B2	5	4	7	6

A1 = ekstraksi langsung; A2 = Likens Nickerson
 B1 = tanpa sel; B2 = dengan sel

Dari Tabel 4 terlihat bahwa pH mempengaruhi perolehan komponen C. Komponen C lebih banyak dihasilkan pada pH 3,5 dan 4,0 (urutan 3-5) daripada pH 4,5 dan 5,0 (urutan 5-8). Kemungkinan aktivitas lipase untuk membentuk ester komponen C lebih baik pada pH 3,5 dan 4,0. Pengaruh ekstraksi menunjukkan bahwa komponen C dihasilkan lebih banyak pada ekstraksi Likens-Nickerson. Hal ini terjadi kemungkinan karena komponen C tahan terhadap panas yang digunakan dalam ekstraksi Likens-Nickerson.

Komponen D

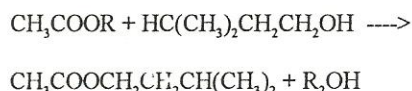
Komponen D memiliki kisaran waktu retensi 18,16 - 21,46 menit. Berdasarkan waktu retensi isoamil asetat standar, yaitu 18,58 menit, maka diperkirakan bahwa komponen D adalah isoamil asetat. Perolehan komponen D tidak menunjukkan perbedaan nyata pada kisaran pH 3,5 - 5,0. Kemungkinan aktivitas lipase untuk membentuk ester isoamil asetat tidak berubah pada kisaran pH tersebut.

Tabel 5. Pengaruh pH dan cara ekstraksi terhadap urutan jumlah relatif perolehan komponen D

Cara ekstraksi	Urutan jumlah relatif komponen E			
	pH 3,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0
A1B1	3	3	4	5
A1B2	4	4	6	4
A2B1	3	1	3	3
A2B2	3	1	2	1

A1 = ekstraksi langsung; A2 = Likens Nickerson
 B1 = tanpa sel; B2 = dengan sel

Dari Tabel 5 dapat dilihat bahwa komponen D lebih banyak dihasilkan dengan cara ekstraksi Likens-Nickerson daripada ekstraksi langsung. Ini menunjukkan bahwa kemungkinan komponen D tahan terhadap panas. Panas dapat mendorong terjadinya transesterifikasi dari ester-ester lain menjadi isoamil asetat. Reaksi yang terjadi pada pembentukan ester adalah sebagai berikut :



Senyawa isoamil asetat mempunyai rumus molekul $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ dengan berat molekul 130,18. Komponen ini dikenal juga dengan nama minyak pir atau minyak pisang (Stecher, 1960). Karakteristik organoleptik isoamil asetat adalah aroma dan rasa pir dan pisang yang kuat.

Komponen E

Komponen E memiliki kisaran waktu retensi 28,10 - 33,45 menit. Berdasarkan waktu retensi etil laurat standar, yaitu 31,68 menit dan pernyataan Amerine dan Ough (1980) bahwa etil laurat merupakan salah satu komponen yang banyak diproduksi oleh khamir, maka diperkirakan E ini adalah etil laurat.

Dari Tabel 6 terlihat bahwa perolehan komponen E tampaknya tidak dipengaruhi oleh pH, namun dipengaruhi oleh cara ekstraksi. Komponen E lebih banyak dihasilkan pada ekstraksi langsung daripada ekstraksi Likens-Nickerson. Hal ini terjadi kemungkinan karena komponen E tidak tahan terhadap panas. Panas yang digunakan dalam ekstraksi Likens-Nickerson membuat komponen E terurai dan atau mengalami trans-esterifikasi menghasilkan ester laurat dan etanol.

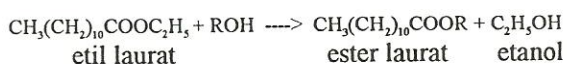
Tabel 6. Pengaruh pH dan cara ekstraksi terhadap urutan jumlah relatif perolehan komponen E

Cara ekstraksi	Urutan jumlah relatif komponen E			
	pH 3,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0
A1B1	1	1	1	1
A1B2	1	1	1	3
A2B1	11	5	2	2
A2B2	4	3	9	8

A1 = ekstraksi langsung;
B1 = tanpa sel;

A2 = Likens Nickerson
B2 = dengan sel

Reaksi yang terjadi pada pembentukan ester adalah sebagai berikut :



Etil laurat (etil dodekanoat) memiliki rumus molekul $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOC}_2\text{H}_5$ dengan berat molekul 228,36. Komponen ini tidak larut dalam air, namun sangat larut dalam alkohol dan ester (Stecheer, 1960). Karakteristik organoleptik etil laurat adalah aroma seperti lemak, minyak dengan rasa seperti lemak dan buah.

KESIMPULAN DAN SARAN

Pada penelitian ini diperoleh komponen A, B, C, D dan E yang bersifat ekstraseluler, karena ekstraksi tanpa maupun dengan sel tidak mempengaruhi jumlah ester yang dihasilkan. Perolehan kelima komponen ini dipengaruhi oleh pH substrat dan cara ekstraksi. Pengaruh pH substrat diduga berhubungan dengan pengaruh pH terhadap aktivitas esterifikasi lipase yang mempengaruhi jenis ester yang dihasilkan. Pengaruh cara ekstraksi diduga berhubungan dengan panas yang digunakan pada ekstraksi Likens-Nickerson yang mempengaruhi jumlah ester-ester yang tampaknya memiliki ketahanan panas yang berbeda-beda. Untuk identifikasi lebih lanjut perlu digunakan standar yang lebih beragam dan standar internal. Selain pH dan cara ekstraksi, perolehan ester juga dipengaruhi oleh adanya alkohol dan lipid pada substrat serta aerasi selama fermentasi, sehingga perlu dilakukan penelitian untuk melihat pengaruh faktor-faktor tersebut terhadap produksi ester.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat yang telah membiayai penelitian ini melalui proyek Hibah Bersaing III/1.

DAFTAR PUSTAKA

- Amerine, M.A. dan Ough, C.S. 1980. *Methods for Analysis of Musts and Wines*. John Wiley and Sons. New York.
- Griffin Jr., R.G. 1969. *Modern Organic Chemistry*. McGraw Hill Book Company. New York.
- Grosch, W. 1982. *Lipid Degradation Products and Flavour*. Di dalam *Food Flavours Part A: Introduction*. Morton, I.D. dan Macleod, A.J. Elsevier. Amsterdam.
- Nykanen, L. 1988. *Potential Means for Improving the flavour of alcoholic beverages*. Di dalam *Characterization, Production and Application of Food Flavours*. Rothe, M. (ed.). Akademie Verlag. Berlin.
- Stecheer, P.G. (ed.) 1960. *The Merck Index of Chemicals and Drugs*. Merck & Co., Inc. New Jersey.
- Sudiati, S. 1993. *Penggunaan mikroorganisme *Hansenula anomala* dan *Candida utilis* dalam produksi komponen citarasa*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian, IPB. Bogor.
- Welsh, F.W. dan Williams, R.E. 1989. *Lipase mediated production of flavor and fragrance esters from fusel oil*. *J. of Food Sci.* 54(6):1565-1568