

4.3. EFEKTIVITAS METODE AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA FRAKSI KECAP MANIS DAN MODEL GLUKOSA- GLISIN-SISTEIN

by Dedin Finatsiyatull Rosida

Submission date: 05-Jan-2021 10:56AM (UTC+0700)

Submission ID: 1483158884

File name: 4.3_EFEKTIVITAS_METODE_AKTIVITAS_ANTIOKSIDAN_DEDIN.pdf (228.59K)

Word count: 8811

Character count: 51177

EFEKTIVITAS METODE AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA FRAKSI KECAP MANIS DAN MODEL GLUKOSA-GLISIN-SISTEIN

(Efektiveness of Antioxidative Activity method on soysauce and Glucose-Glycine-cystein Model Fractions)

Dedin F.Rosida¹⁾, Wijaya CH²⁾, Apriyantono A²⁾ and Zakaria FR²⁾

¹⁾. Program Studi Teknologi Pangan, UPN "Veteran" Jawa-Timur

²⁾. Departemen Ilmu and Teknologi Pangan, IPB-Bogor
Jl. Raya Rungkut Madya Surabaya
Email: rosy.upnsby@gmail.com

ABSTRACT

The oxidative browning is considered to have a contribute to the flavor, antioxidative activity and color of food. As a result of this Maillard reaction, a variety of by products, intermediates and brown pigments (melanoidins) are produced. The objectives of this research was to study the effect of antioxidant activity method determination on model and soysauce. The soy sauce were prepared from sucrose or coconut sugar and moromi. The soysauce and model were fractionated by ultrafiltration in a molecular weight ranging between 10 kDa to 100 kDa. In this study, we report that fractions of soysauce. and model have the ability to scavenging more strongly DPPH radical on the fraction with molecular weight of 30 kDa than 100 kDa, whereas the inhibition of oil oxidation was stronger in the fraction with molecular weight <10 kDa to 30 kDa and its activity is more greater than BHT 200 ppm, although the effect of antioxidants in soy sauce is greater than the model. Each fraction of soy sauce and a model had a specific effect on the inhibition method of oil oxidation or scavenging of free radicals

Abstrak

Reaksi pencoklatan pada berbagai produk pangan dapat memberikan flavor yang spesifik dan komponen yang dihasilkan dapat bersifat sebagai antioksidan. Produk reaksi Maillard dapat berupa komponen intermediat dan pigmen coklat yang sering disebut dengan melanoidin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas tiap metode untuk menentukan aktivitas antioksidan tiap fraksi dari kecap manis dan model dari Produk Reaksi Maillard. Kecap manis dibuat dari gula kelapa dan moromi, sedangkan model dibuat dari gula sukrosa dan asam amino glisin dan sistein. Metode penentuan aktivitas antioksidan menggunakan metode rancimat, kemampuan penangkapan radikal DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), penentuan dengan TBA (thiobarbituric acid) dan reduksi dengan feri tiosianat. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa Pada produk kecap manis dan model mempunyai kemampuan menangkap radikal DPPH lebih kuat pada fraksi dengan berat molekul 30 kDa sampai lebih besar dari 100 kDa, sedangkan penghambatan oksidasi lemak atau asam lemak lebih kuat pada fraksi dengan berat molekul < 10 kDa sampai 30 kDa dan aktivitasnya lebih besar dari BHT 200 ppm, meskipun efek antioksidan pada kecap manis lebih besar daripada model. Setiap fraksi dari kecap maupun model memiliki efek spesifik terhadap metode penghambatan oksidasi minyak/lemak atau menangkap radikal bebas

PENDAHULUAN

Oksidasi terhadap bahan pangan yang mengandung lemak mempengaruhi bau dan flavornya. Umumnya pendekatan yang digunakan untuk mengatasi hal tersebut adalah dengan penggunaan bahan tambahan pangan (BTP) antioksidan. Antioksidan yang banyak digunakan dari jenis sintesis seperti Butil Hidroksi Anisol (BHA), Butil Hidroksi Toluena (BHT), propil galat dan tert-Butil Hidroksi Quinon (TBHQ). Selain antioksidan sintesis, antioksidan alami lebih aman penggunaannya di dalam pangan. Antioksidan alami dapat berasal dari: senyawa antioksidan yang sudah ada dari satu atau dua komponen pangan, senyawa antioksidan yang terbentuk dari reaksi-reaksi selama pengolahan, senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami dan ditambahkan ke dalam makanan sebagai bahan tambahan pangan (Pratt 1992). Menurut Pratt dan Hudson (1990) serta Shidi dan Nacz (1995) senyawa alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol dan asam-asam organik polifungsional.

Salah satu antioksidan yang dihasilkan dari proses pengolahan dapat dihasilkan dari reaksi Maillard. Penggunaan produk reaksi Maillard (*Maillard reaction product/MRP*) dapat mencegah oksidasi lipid (Bailey & Won Um 1992). 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 ϵ -amino residu lisin yang terikat pada peptida dan protein berperan penting dalam reaksi disebabkan kereaktifannya yang relatif tinggi. Selain itu gugus α -amino terminal juga

berperan dalam reaksi Maillard (Yokotsuka 1986).

Salah satu produk pangan yang mengandung produk reaksi Maillard (MRP) 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. Kecap manis mempunyai konsistensi sangat kental, rasa manis dengan kandungan gula 26-61% serta kandungan garam 3-6% (Judoamidjojo 1986). Pada pembuatan kecap manis, moromi sebagai bahan baku kecap manis dimasak dengan penambahan gula merah dan bumbu. Kecap manis Indonesia memiliki warna dan flavor khas yang tidak dimiliki oleh negara lain.

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 selain berkontribusi dalam pembentukan warna, flavor dan tekstur diharapkan juga memberikan potensi antioksidan yang cukup tinggi dalam produk kecap manis.

METODOLOGI

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah Kecap manis yang dibuat dari moromi dan gula kelapa. Model reaksi Maillard menggunakan glukosa – glisin dan sistein. Bahan kimia utama yang digunakan untuk penetapan kadar α -amino nitrogen adalah trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS, Sigma - Aldrich), HCl 1N dan 0,02 M, leusin, dan untuk penetapan kadar protein dengan metode Kjeldahl digunakan K_2SO_4 , H_2SO_4 , HGO, H_2BO_3 , $Na_2S_2O_3$, NaOH,

indikator metil merah dan biru, sedangkan untuk penetapan kadar protein terlarut dengan metode Lowry digunakan pereaksi Folin-Ciocalteau, Na-K tartarat, tembaga sulfat, Natrium karbonat, larutan bovine serum albumin (BSA, E. Merck). Untuk penetapan kadar fenol digunakan etanol 95%, Na₂CO₃ 5% dan asam tanat. Untuk pengukuran kadar gula digunakan larutan Fehling, dekstrosa standar, metilen biru, CaCO₃, Pb-asetat, Na-oksalat dan asam sulfat. untuk uji sifat antioksidan digunakan minyak kedelai, air bebas ion, tween-80, asam thiobarbiturat, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, asam linoleat, buffer fosfat, NH₄SCN, FeCl₂ dan HCl.

Peralatan utama yang digunakan meliputi seperangkat alat destilasi, Vortex, sentrifuse (IEC Centra-815A), spektrofotometer (shimadzu UV-160), stirred cell ultrafiltration kapasitas 50 ml (Amicon Inc.Beverly,MS) membrane ultrafiltrasi cut off 10; 30; 100 kDa), FTIR BIORAD Excalibur series, HPLC (Shimadzu Co.Japan).

Metode

Pembuatan kecap manis (KGM) dengan memanaskan gula 500 g dan air 150 g selama 45 menit pada suhu 100 °C. kemudian ditambahkan moromi sebanyak 400 g dan pemanasan dilanjutkan selama 20 menit.

Sistem model dibuat dengan menggunakan asam amino dan satu jenis gula pereduksi. Model ini dibuat untuk mengetahui kemampuan aktivitas antioksidan dari model dan membuktikan bahwa senyawa produk

reaksi Maillard dapat berperan sebagai antioksidan. Glukosa yang dipergunakan sebanyak 0.778 g (4.32 mmol) dan asam amino glisin sebanyak 1.34 mg (0.01 mmol), sistein 2.9 mg (0.02 mmol),

Pada kecap manis (KGM) dilakukan analisis meliputi: Proksimat, pH, total padatan, gula pereduksi, Kadar protein (Lowry), kadar α-amino Nitrogen (TNBS) dan kadar fenol serta serapan uv-vis. Demikian juga dilakukan analisis terhadap jenis gula yang terdapat pada gula merah yang dipergunakan dalam pembuatan kecap manis

Kemudian kecap manis dilakukan fraksinasi dengan ultrafiltrasi sehingga didapatkan 4 fraksi: F1 (BM > 100 kDa); F2 (30 kDa<BM<100 kDa); F3 (10 kDa < BM< 30 kDa) dan F4 (BM<10 kDa), kemudian masing-masing fraksi uji aktivitas antioksidan (metode Rancimat, DPPH, TBA dan Feri-tiosianat).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik kimi kecap manis meliputi: kandungan padatan, air, protein, lemak, karbohidrat, gula pereduksi dan asam amino. Kandungan padatan produk KGM 65° brix (Tabel 1). Pengukuran total padatan merupakan gambaran dari total kandungan komponen produk yang larut dalam air, terutama terdiri dari jumlah total gula dan beberapa komponen lain seperti protein dan asam. Sedangkan Nilai pH untuk produk KGM 4.55. Karakteristik kimia lainnya dari kecap manis (KGM) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik kimia kecap manis (% bk)

Komponen	Kecap manis(KGM)
Air	44.34 ± 0.66 ^b
Lemak	0.56 ± 0.03 ^b
Protein	8.57 ± 0.31 ^a
Karbohidrat	76.70 ± 0.03 ^b
gula pereduksi	11.39 ± 0.07 ^b
Tot. padatan(°brix)	65 ± 1.44 ^c

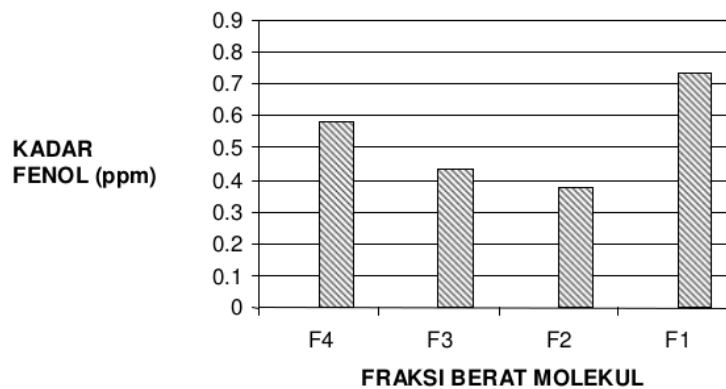
Keterangan: % bk: persen berat kering

Angka yang diikuti dengan huruf sama pada masing-masing pengamatan tiap produk menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Serapan uv-vis pada produk KGM menunjukkan adanya senyawa produk reaksi Maillard. pada kisaran panjang gelombang 380 - 400 nm. Hasil penelitian Namiki *et al* (1983) mendapatkan peak maksimum pigmen merah yang menunjukkan produk reaksi Maillard berasal dari sistem model DHA-casein dan DHA-ovalbumin terdapat pada panjang gelombang 385 nm.

Pada proses pembuatan kecap KGM, gula merah yang dipergunakan sudah mengandung fruktosa sebesar 2.32% dan glukosa 4.20%. Gugus karbonil dari gula reduksi ini bereaksi dengan asam-asam amino untuk menghasilkan produk reaksi Maillard. Sukrosa (64.34%) yang terdapat dalam gula merah juga diduga mengalami invertasi menjadi glukosa dan fruktosa karena KGM juga dalam suasana asam (pH 4.55) dan mengalami pemanasan. Kadar gula reduksi akhir pada KGM sebesar 11.39%

Proses pencoklatan di dalam bahan pangan dapat juga disebabkan oleh asam askorbat, polifenol dan furfural. Di dalam produk kecap manis (KGM), kadar asam askorbat, polifenol dan furfural diduga jumlahnya sangat kecil sehingga reaksi Maillard yang terjadi pada KGM diduga hanya disebabkan oleh gula dan asam amino. Hashiba (1976) berpendapat bahwa produk kecap cepat menjadi coklat dan mekanismenya berbeda dari senyawa asam askorbat, polifenol dan furfural disebabkan senyawa ini dalam kecap jumlahnya sangat sedikit. Senyawa karbonil merupakan senyawa penting yang berperan dalam proses pencoklatan. Senyawa 3-deoksiglukoson dalam kecap merupakan prekursor penting dalam reaksi pencoklatan. Senyawa 3-deoksiglukoson merupakan suatu reduktan, sehingga berpotensi sebagai antioksidan. Kadar fenol banyak terdapat pada fraksi dengan berat molekul < 10 kDa.(Gambar 1).



Gambar 1. Kadar Fenol tiap fraksi pada kecap manis

Aktivitas Antioksidan Kecap Manis

Aktivitas antioksidan diuji menggunakan beberapa metode baik dalam sistem minyak dan sistem aqueous. Metode analisis antioksidan yang dipergunakan adalah: 1) mengukur periode induksinya dengan menggunakan alat rancimat, 2) menentukan bilangan TBA (thiobarbituric acid), 3) menggunakan radikal DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), Pengujian aktivitas antioksidan pada asam linoleat merupakan sistem pengujian yang digunakan untuk mewakili sistem pangan. Pengujian ini dimaksudkan untuk melihat kemampuan pencegahan pembentukan peroksida dalam sistem emulsi asam linoleat. Pengujian ini menunjukkan aktivitas antioksidan total (Duh, *et al.* 1999).

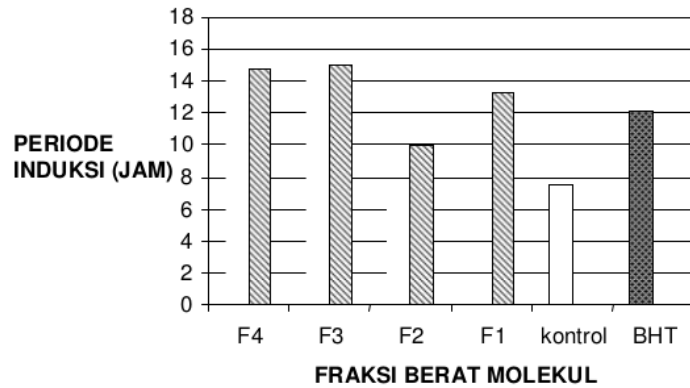
Pengujian kapasitas penangkapan radikal biasa diukur dengan menggunakan suatu senyawa radikal DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) yang bersifat stabil dan dapat menerima elektron atau radikal hidrogen menjadi suatu senyawa yang secara diamagnetik stabil (Soares *et al.*, 1997). Lebih lanjut Duh *et al.*, (1999) menyatakan bahwa kemampuan radikal DPPH untuk direduksi atau distabilisasi oleh antioksidan dengan mengukur penurunan absorbansi pada panjang gelombang 517. Oleh karena itu

DPPH biasa digunakan untuk mengkaji kapasitas penangkapan radikal.

Penggunaan empat metode analisis tersebut dimaksudkan selain untuk melihat aktivitasnya sebagai antioksidan dalam menghambat oksidasi minyak atau menangkap radikal bebas, juga dimaksudkan untuk menguatkan dugaan aktivitas suatu senyawa uji sebagai antioksidan karena sebagaimana diketahui daya antioksidan dapat dilakukan dengan berbagai macam metode. Meskipun suatu senyawa uji menunjukkan daya antioksidan yang tinggi dengan salah satu metode, tidak selalu akan memberikan hasil yang sama baiknya dengan menggunakan metode lainnya sehingga disarankan untuk mengukur daya antioksidan dengan berbagai macam metode (Takaya, *et al.*, 2003).

a. Aktivitas antioksidan dalam sistem minyak

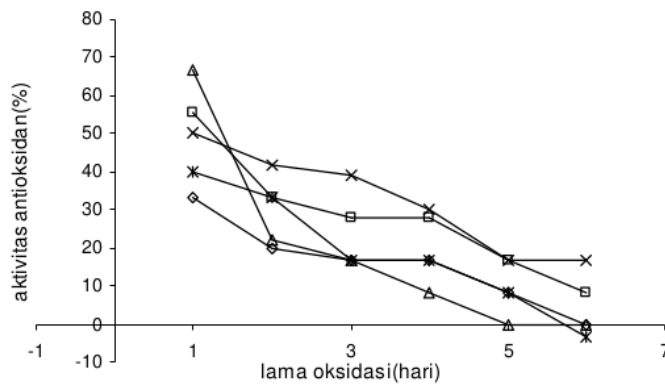
Hasil pengujian aktivitas antioksidan menggunakan rancimat didapatkan pada fraksi F1, F3 dan F4 dari kecap manis (KGM) memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan aktivitas antioksidan BHT (*butylated hidroxy toluen*) 200 ppm. Semua fraksi memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi dibandingkan dengan kontrol, dengan Indeks protektif pada kisaran 1.67 - 2.1



Gambar 2. Aktivitas antioksidan tiap fraksi kecap dengan rancimat

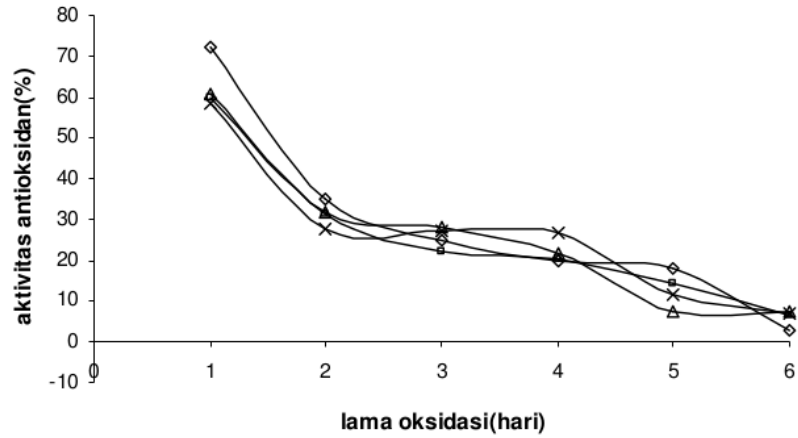
Pada metode tiosianat pengukuran aktivitas antioksidan berdasarkan daya penghambatan terbentuknya senyawa-senyawa radikal yang bersifat reaktif. Oksidasi asam linoleat umumnya berupa peroksida lipid. Proses oksidasi lemak menghasilkan produk primer peroksida (10) (n'im, *et al*/2003). Bilangan peroksida dinyatakan sebagai senyawa yang mampu mengoksidasi Fe^{2+}

menjadi Fe^{3+} , dan selanjutnya Fe^{3+} dengan ion CNS menghasilkan warna merah yang diukur pada panjang gelombang 500 nm. Pada kecap manis (KGM), aktivitas antioksidan terkuat terdapat pada F3 (66.67%), diikuti F2 (55.56%), F4 (50%) dan F1 (33.33%). (Gambar 3). Sedangkan pada model yang paling besar aktivitas antioksidannya pada fraksi 3 (F3, Gambar 4).



Keterangan: F1: fraksi BM>100 kDa; F2: fraksi BM 30-100 kDa; F3: fraksi BM 10-30 kDa; F4: fraksi BM < 10 kDa

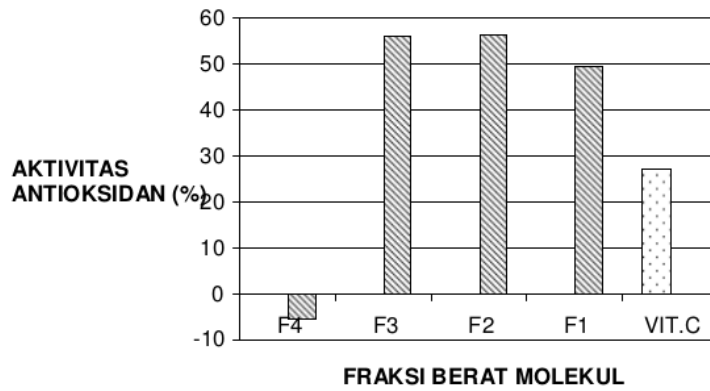
Gambar 4. Aktivitas antioksidan produk kecap manis dengan gula merah (KGM) dengan metode tiosianat pada F1(— —), F2 (—□—), F3 (—Δ—), F4 (—x—) dan BHT (—ж—)



Gambar 4. Aktivitas antioksidan sistem model glu-gli-sis dengan metode linoleat-tiosianat pada F1(- -), F2 (-□-), F3 (-Δ-), F4 (-x-)

a. Aktivitas antioksidan dalam sistem "aqueous"

Aktivitas antioksidan tertinggi pada KGM terdapat pada F2 (56.49%) dan F3 (55.97%), sedangkan pada model aktivitas antioksidan tertinggi juga pada F2 dan F3 (Gambar 6).

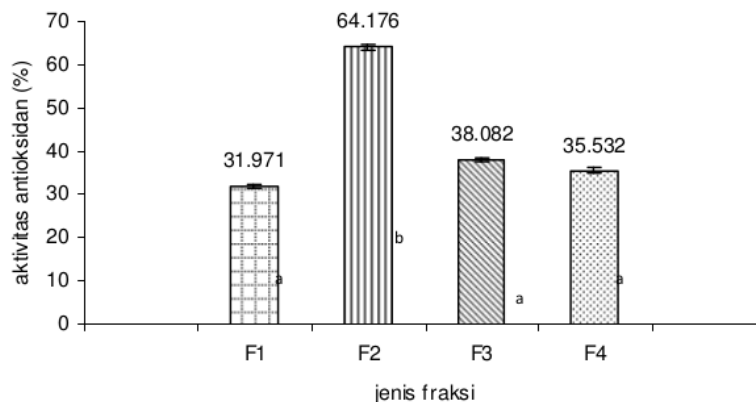


Keterangan: M: moromi; KGM: kecap manis dengan gula merah;

F1: fraksi dengan berat molekul >100 kDa; F2: fraksi dengan berat molekul 30-100 kDa;

F3: fraksi dengan berat molekul 10-30 kDa; F4: fraksi dengan berat molekul <10 kDa

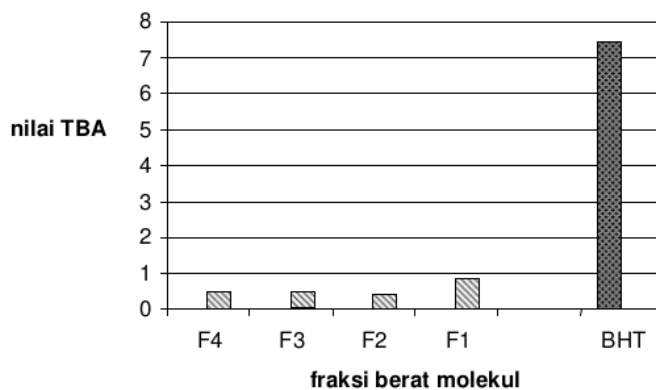
Gambar 5 Aktivitas antioksidan tiap fraksi produk Kecap manis dengan metode DPPH



Keterangan: F1: fraksi dengan berat molekul >100 kDa; F2: fraksi dengan berat molekul 30-100 kDa;
F3: fraksi dengan berat molekul 10-30 kDa; F4: fraksi dengan berat molekul <10 kDa

Gambar 3. Aktivitas antioksidan sistem model glu-gli-sis dengan DPPH

Secara keseluruhan dengan metode DPPH ini didapatkan fraksi F1, F2 dan F3 pada kecap manis KGM mempunyai aktivitas antioksidan cukup kuat (lebih dari 50%), demikian juga aktivasnya lebih besar dibandingkan vitamin C 100 ppm, sedangkan fraksi F4 pada produk KGM tidak mempunyai aktivitas antioksidan.



Keterangan: M: moromi; KGM: kecap manis dengan gula merah;

F1: fraksi dengan berat molekul >100 kDa; F2: fraksi dengan berat molekul 30-100 kDa;

F3: fraksi dengan berat molekul 10-30 kDa; F4: fraksi dengan berat molekul <10 kDa

Gambar 6 Aktivitas antioksidan tiap fraksi kecap dengan metode penentuan bilangan TBA

Produk kecap manis (KGM) nilai TBA pada F2 (5.01) dan F3 (5.44). Rata-rata fraksi F1 dan F2 memberikan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dari fraksi lainnya. Aktivitas antioksidan yang besar menunjukkan penghambatan pembentukan malonaldehid yang cukup kuat.

KESIMPULAN

Pada produk kecap manis dan model mempunyai kemampuan menangkap radikal DPPH lebih kuat pada fraksi dengan berat molekul 30 kDa sampai lebih besar dari 100 kDa, sedangkan penghambatan oksidasi lemak atau asam lemak lebih kuat pada fraksi dengan berat molekul < 10 kDa sampai 30 kDa dan aktivitasnya lebih besar dari BHT 200 ppm, meskipun efek antioksidan pada kecap manis lebih besar daripada model. Setiap fraksi dari kecap maupun model memiliki efek spesifik terhadap metode penghambatan oksidasi minyak/lemak atau menangkap radikal bebas.

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 F J. 1995 Antioxidative activity of (E)-2-octenal/amino acids reaction products. *J. Agric. Food Chem.* 43: 795-800

Antony SM, Han LY, Rieck JR dan Dawson PL. 2000. Antioxidative effect of Maillard reaction products formed from honey at different reaction times. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3985-3989

Apriyantono A, Fardiaz D, Puspitasari NL, Sedarnawati, Budijanto S. 1989. Analisa Pangan. Bogor: PAU IPB

Apriyantono A, Marianti S, Bailey RG, Royle L, Ames JM. 1997. Separation of coloured of kecap manis (a typical Indonesian soy sauce) using HPLC and capillary electrophoresis. Di dalam prosiding 6th Maillard Symposium, London 27-30 July 1997

8 Duh P, Tu Y dan Yen G. 1999. Antioxidant activity of water extract of harng lyur (*Chrysanthemum morifolium ramat*). *Lebensm Wiss U Technol.*32: 269-277

2 Hofmann 1998. Studies on relationship between molecular weght and the color potency of fractions obtained by thermal treatment of glucose/amino acid and glucose/protein solutions by using ultrasentrifugation and color dilution techniques. *J.Agric.Food Chem.*46: 3891-3895

11 Mun'im A, Negishi O and Ozawa T. 2003. Antioxidative compounds from *Crotalaria sessiliflora*. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 67 (2) p.410-414.

Nunomura N, Sasaki M. 1986. Soy sauce. dalam Reddy N, Pierson. MD, Solunke, DK (ed). Legume-based Fermented Foods. Florida: CRC Pr Inc

9 Soares JR, Dins TCP, Cunha AP dan Ameida LM. 1997. Antioxidant activity of some extract of *thymus zygis*. *Free Rad.Res.*26: 469-478

5 Takaya Y, Kondo Y, Furukawa T and Niwa M., 2003, Antioxidant constituents of radish sprout (Kaiware-daikon), *Raphanus sativus* L., *J. Agric. Food Chem.*, 51, 8061-8066.

EFEKTIVITAS METODE AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA FRAKSI KECAP MANIS DAN MODEL GLUKOSA-GLISIN-SISTEIN

(Efektiveness of Antioxidative Activity method on soysauce and Glucose-Glycine-cystein Model Fractions)

Dedin F.Rosida¹⁾, Wijaya CH²⁾, Apriyantono A²⁾ and Zakaria FR²⁾

- 1). Program Studi Teknologi Pangan, UPN "Veteran" Jawa-Timur
- 2). Departemen Ilmu and Teknologi Pangan, IPB-Bogor
Jl. Raya Rungkut Madya Surabaya
Email: rosy.upnsby@gmail.com

ABSTRACT

The oxidative browning is considered to have a contribute to the flavor, antioxidative activity and color of food. As a result of this Maillard reaction, a variety of by products, intermediates and brown pigments (melanoidins) are produced. The objectives of this research was to study the effect of antioxidant activity method determination on model and soysauce. The soy sauce were prepared from sucrose or coconut sugar and moromi. The soysauce and model were fractionated by ultrafiltration in a molecular weight ranging between 10 kDa to 100 kDa. In this study, we report that fractions of soysauce. and model have the ability to scavenging more strongly DPPH radical on the fraction with molecular weight of 30 kDa than 100 kDa, whereas the inhibition of oil oxidation was stronger in the fraction with molecular weight <10 kDa to 30 kDa and its activity is more greater than BHT 200 ppm, although the effect of antioxidants in soy sauce is greater than the model. Each fraction of soy sauce and a model had a specific effect on the inhibition method of oil oxidation or scavenging of free radicals

Abstrak

Reaksi pencoklatan pada berbagai produk pangan dapat memberikan flavor yang spesifik dan komponen yang dihasilkan dapat bersifat sebagai antioksidan. Produk reaksi Maillard dapat berupa komponen intermediat dan pigmen coklat yang sering disebut dengan melanoidin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas tiap metode untuk menentukan aktivitas antioksidan tiap fraksi dari kecap manis dan model dari Produk Reaksi Maillard. Kecap manis dibuat dari gula kelapa dan moromi, sedangkan model dibuat dari gula sukrosa dan asam amino glisin dan sistein. Metode penentuan aktivitas antioksidan menggunakan metode rancimat, kemampuan penangkapan radikal DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), penentuan dengan TBA (thiobarbituric acid) dan reduksi dengan feri tiosianat. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa Pada produk kecap manis dan model mempunyai kemampuan menangkap radikal DPPH lebih kuat pada fraksi dengan berat molekul 30 kDa sampai lebih besar dari 100 kDa, sedangkan penghambatan oksidasi lemak atau asam lemak lebih kuat pada fraksi dengan berat molekul < 10 kDa sampai 30 kDa dan aktivitasnya lebih besar dari BHT 200 ppm, meskipun efek antioksidan pada kecap manis lebih besar daripada model. Setiap fraksi dari kecap maupun model memiliki efek spesifik terhadap metode penghambatan oksidasi minyak/lemak atau menangkap radikal bebas

PENDAHULUAN

Oksidasi terhadap bahan pangan yang mengandung lemak mempengaruhi bau dan flavornya. Umumnya pendekatan yang digunakan untuk mengatasi hal tersebut adalah dengan penggunaan bahan tambahan pangan (BTP) antioksidan. Antioksidan yang banyak digunakan dari jenis sintesis seperti Butil Hidroksi Anisol (BHA), Butil Hidroksi Toluena (BHT), propil galat dan tert-Butil Hidroksi Quinon (TBHQ). Selain antioksidan sintesis, antioksidan alami lebih aman penggunaannya di dalam pangan. Antioksidan alami dapat berasal dari: senyawa antioksidan yang sudah ada dari satu atau dua komponen pangan, senyawa antioksidan yang terbentuk dari reaksi-reaksi selama pengolahan, senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami dan ditambahkan ke dalam makanan sebagai bahan tambahan pangan (Pratt 1992). Menurut Pratt dan Hudson (1990) serta Shidi dan Nacz (1995) senyawa alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol dan asam-asam organik polifungsional.

Salah satu antioksidan yang dihasilkan dari proses pengolahan dapat dihasilkan dari reaksi Maillard. Penggunaan produk reaksi Maillard (*Maillard reaction product/MRP*) dapat mencegah oksidasi lipid (Bailey & Won Um 1992). 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 ϵ -amino residu lisin yang terikat pada peptida dan protein berperan penting dalam reaksi disebabkan kereaktifannya yang relatif tinggi. Selain itu gugus α -amino terminal juga

berperan dalam reaksi Maillard (Yokotsuka 1986).

Salah satu produk pangan yang mengandung produk reaksi Maillard (MRP) 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. Kecap manis mempunyai konsistensi sangat kental, rasa manis dengan kandungan gula 26-61% serta kandungan garam 3-6% (Judoamidjojo 1986). Pada pembuatan kecap manis, moromi sebagai bahan baku kecap manis dimasak dengan penambahan gula merah dan bumbu. Kecap manis Indonesia memiliki warna dan flavor khas yang tidak dimiliki oleh negara lain.

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 selain berkontribusi dalam pembentukan warna, flavor dan tekstur diharapkan juga memberikan potensi antioksidan yang cukup tinggi dalam produk kecap manis.

METODOLOGI

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah Kecap manis yang dibuat dari moromi dan gula kelapa. Model reaksi Maillard menggunakan glukosa - glisin dan sistein. Bahan kimia utama yang digunakan untuk penetapan kadar α -amino nitrogen adalah trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS, Sigma - Aldrich), HCl 1N dan 0,02 M, leusin, dan untuk penetapan kadar protein dengan metode Kjeldahl digunakan K_2SO_4 , H_2SO_4 , HGO, H_2BO_3 , $Na_2S_2O_3$, NaOH,

indikator metil merah dan biru, sedangkan untuk penetapan kadar protein terlarut dengan metode Lowry digunakan pereaksi Folin-Ciocalteau, Na-K tartarat, tembaga sulfat, Natrium karbonat, larutan bovine serum albumin (BSA, E. Merck). Untuk penetapan kadar fenol digunakan etanol 95%, Na₂CO₃ 5% dan asam tanat. Untuk pengukuran kadar gula digunakan larutan Fehling, dekstrosa standar, metilen biru, CaCO₃, Pb-asetat, Na-oksalat dan asam sulfat. untuk uji sifat antioksidan digunakan minyak kedelai, air bebas ion, tween-80, asam thiobarbiturat, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, asam linoleat, buffer fosfat, NH₄SCN, FeCl₂ dan HCl.

Peralatan utama yang digunakan meliputi seperangkat alat destilasi, Vortex, sentrifuse (IEC Centra-815A), spektrofotometer (shimadzu UV-160), stirred cell ultrafiltration kapasitas 50 ml (Amicon Inc.Beverly,MS) membrane ultrafiltrasi cut off 10; 30; 100 kDa), FTIR BIORAD Excalibur series, HPLC (Shimadzu Co.Japan).

Metode

Pembuatan kecap manis (KGM) dengan memanaskan gula 500 g dan air 150 g selama 45 menit pada suhu 100 °C. kemudian ditambahkan moromi sebanyak 400 g dan pemanasan dilanjutkan selama 20 menit.

Sistem model dibuat dengan menggunakan asam amino dan satu jenis gula pereduksi. Model ini dibuat untuk mengetahui kemampuan aktivitas antioksidan dari model dan membuktikan bahwa senyawa produk

reaksi Maillard dapat berperan sebagai antioksidan. Glukosa yang dipergunakan sebanyak 0.778 g (4.32 mmol) dan asam amino glisin sebanyak 1.34 mg (0.01 mmol), sistein 2.9 mg (0.02 mmol),

Pada kecap manis (KGM) dilakukan analisis meliputi: Proksimat, pH, total padatan, gula pereduksi, Kadar protein (Lowry), kadar α-amino Nitrogen (TNBS) dan kadar fenol serta serapan uv-vis. Demikian juga dilakukan analisis terhadap jenis gula yang terdapat pada gula merah yang dipergunakan dalam pembuatan kecap manis

Kemudian kecap manis dilakukan fraksinasi dengan ultrafiltrasi sehingga didapatkan 4 fraksi: F1 (BM > 100 kDa); F2 (30 kDa<BM<100 kDa); F3 (10 kDa < BM< 30 kDa) dan F4 (BM<10 kDa), kemudian masing-masing fraksi uji aktivitas antioksidan (metode Rancimat, DPPH, TBA dan Feri-tiosianat).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik kimi kecap manis meliputi: kandungan padatan, air, protein, lemak, karbohidrat, gula pereduksi dan asam amino. Kandungan padatan produk KGM 65° brix (Tabel 1). Pengukuran total padatan merupakan gambaran dari total kandungan komponen produk yang larut dalam air, terutama terdiri dari jumlah total gula dan beberapa komponen lain seperti protein dan asam. Sedangkan Nilai pH untuk produk KGM 4.55. Karakteristik kimia lainnya dari kecap manis (KGM) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik kimia kecap manis (% bk)

Komponen	Kecap manis(KGM)
Air	44.34 ± 0.66 ^b
Lemak	0.56 ± 0.03 ^b
Protein	8.57 ± 0.31 ^a
Karbohidrat	76.70 ± 0.03 ^b
gula pereduksi	11.39 ± 0.07 ^b
Tot. padatan(°brix)	65 ± 1.44 ^c

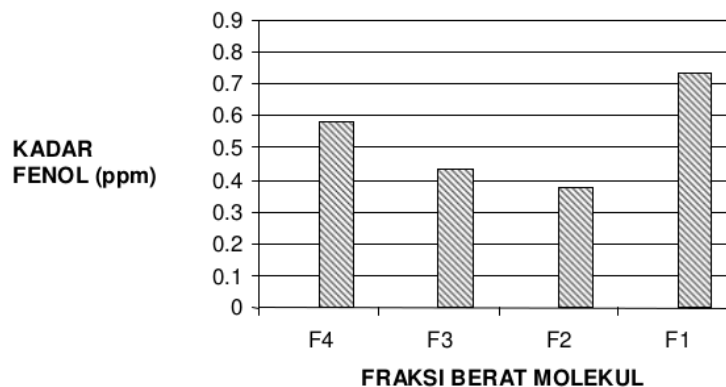
Keterangan: % bk: persen berat kering

Angka yang diikuti dengan huruf sama pada masing-masing pengamatan tiap produk menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Serapan uv-vis pada produk KGM menunjukkan adanya senyawa produk reaksi Maillard. pada kisaran panjang gelombang 380 - 400 nm. Hasil penelitian Namiki *et al* (1983) mendapatkan peak maksimum pigmen merah yang menunjukkan produk reaksi Maillard berasal dari sistem model DHA-casein dan DHA-ovalbumin terdapat pada panjang gelombang 385 nm.

Pada proses pembuatan kecap KGM, gula merah yang dipergunakan sudah mengandung fruktosa sebesar 2.32% dan glukosa 4.20%. Gugus karbonil dari gula reduksi ini bereaksi dengan asam-asam amino untuk menghasilkan produk reaksi Maillard. Sukrosa (64.34%) yang terdapat dalam gula merah juga diduga mengalami invertasi menjadi glukosa dan fruktosa karena KGM juga dalam suasana asam (pH 4.55) dan mengalami pemanasan. Kadar gula reduksi akhir pada KGM sebesar 11.39%

Proses pencoklatan di dalam bahan pangan dapat juga disebabkan oleh asam askorbat, polifenol dan furfural. Di dalam produk kecap manis (KGM), kadar asam askorbat, polifenol dan furfural diduga jumlahnya sangat kecil sehingga reaksi Maillard yang terjadi pada KGM diduga hanya disebabkan oleh gula dan asam amino. Hashiba (1976) berpendapat bahwa produk kecap cepat menjadi coklat dan mekanismenya berbeda dari senyawa asam askorbat, polifenol dan furfural disebabkan senyawa ini dalam kecap jumlahnya sangat sedikit. Senyawa karbonil merupakan senyawa penting yang berperan dalam proses pencoklatan. Senyawa 3-deoksiglukoson dalam kecap merupakan prekursor penting dalam reaksi pencoklatan. Senyawa 3-deoksiglukoson merupakan suatu reduktan, sehingga berpotensi sebagai antioksidan. Kadar fenol banyak terdapat pada fraksi dengan berat molekul < 10 kDa.(Gambar 1).



Gambar 1. Kadar Fenol tiap fraksi pada kecap manis

Aktivitas Antioksidan Kecap Manis

Aktivitas antioksidan diuji menggunakan beberapa metode baik dalam sistem minyak dan sistem aqueous. Metode analisis antioksidan yang dipergunakan adalah: 1) mengukur periode induksinya dengan menggunakan alat rancimat, 2) menentukan bilangan TBA (thiobarbituric acid), 3) menggunakan radikal DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), Pengujian aktivitas antioksidan pada asam linoleat merupakan sistem pengujian yang digunakan untuk mewakili sistem pangan. Pengujian ini dimaksudkan untuk melihat kemampuan pencegahan pembentukan peroksida dalam sistem emulsi asam linoleat. Pengujian ini menunjukkan aktivitas antioksidan total (Duh, *et al.* 1999).

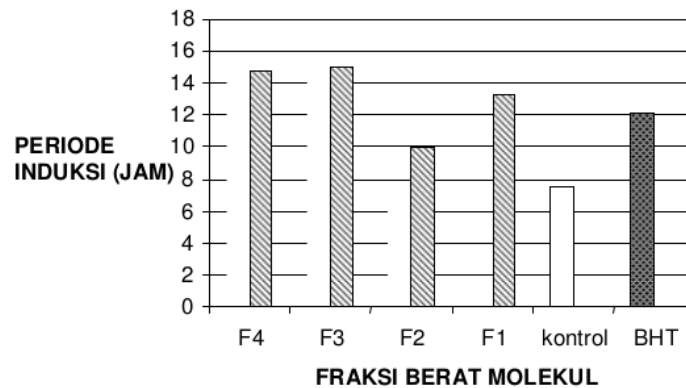
Pengujian kapasitas penangkapan radikal biasa diukur dengan menggunakan suatu senyawa radikal DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) yang bersifat stabil dan dapat menerima elektron atau radikal hidrogen menjadi suatu senyawa yang secara diamagnetik stabil (Soares *et al.*, 1997). Lebih lanjut Duh *et al.*, (1999) menyatakan bahwa kemampuan radikal DPPH untuk direduksi atau distabilisasi oleh antioksidan dengan mengukur penurunan absorbansi pada panjang gelombang 517. Oleh karena itu

DPPH biasa digunakan untuk mengkaji kapasitas penangkapan radikal.

Penggunaan empat metode analisis tersebut dimaksudkan selain untuk melihat aktivitasnya sebagai antioksidan dalam menghambat oksidasi minyak atau menangkap radikal bebas, juga dimaksudkan untuk menguatkan dugaan aktivitas suatu senyawa uji sebagai antioksidan karena sebagaimana diketahui daya antioksidan dapat dilakukan dengan berbagai macam metode. Meskipun suatu senyawa uji menunjukkan daya antioksidan yang tinggi dengan salah satu metode, tidak selalu akan memberikan hasil yang sama baiknya dengan menggunakan metode lainnya sehingga disarankan untuk mengukur daya antioksidan dengan berbagai macam metode (Takaya, *et al.*, 2003).

a. Aktivitas antioksidan dalam sistem minyak

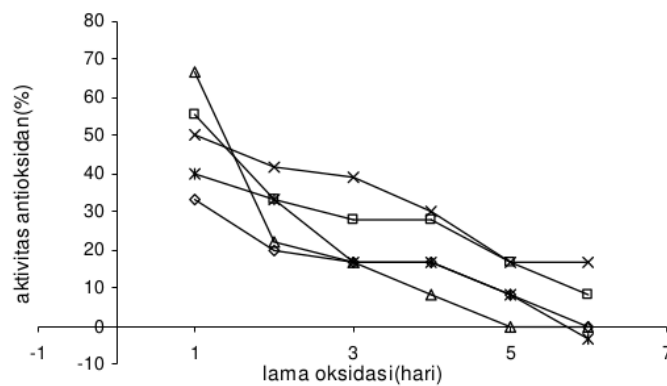
Hasil pengujian aktivitas antioksidan menggunakan rancimat didapatkan pada fraksi F1, F3 dan F4 dari kecap manis (KGM) memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan aktivitas antioksidan BHT (*butylated hidroxy toluen*) 200 ppm. Semua fraksi memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi dibandingkan dengan kontrol, dengan Indeks protektif pada kisaran 1.67 - 2.1



Gambar 2. Aktivitas antioksidan tiap fraksi kecap dengan rancimat

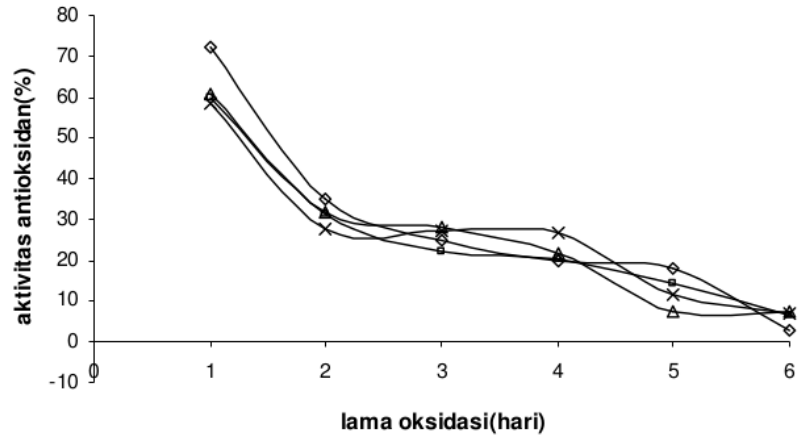
Pada metode tiosianat pengukuran aktivitas antioksidan berdasarkan daya penghambatan terbentuknya senyawa-senyawa radikal yang bersifat reaktif. Oksidasi asam linoleat umumnya berupa peroksida lipid. Proses oksidasi lemak menghasilkan produk primer peroksida (10) (n'im, *et al*/2003). Bilangan peroksida dinyatakan sebagai senyawa yang mampu mengoksidasi Fe^{2+}

menjadi Fe^{3+} , dan selanjutnya Fe^{3+} dengan ion CNS menghasilkan warna merah yang diukur pada panjang gelombang 500 nm. Pada kecap manis (KGM), aktivitas antioksidan terkuat terdapat pada F3 (66.67%), diikuti F2 (55.56%), F4 (50%) dan F1 (33.33%). (Gambar 3). Sedangkan pada model yang paling besar aktivitas antioksidannya pada fraksi 3 (F3, Gambar 4).



Keterangan: F1: fraksi BM>100 kDa; F2: fraksi BM 30-100 kDa; F3: fraksi BM 10-30 kDa; F4: fraksi BM < 10 kDa

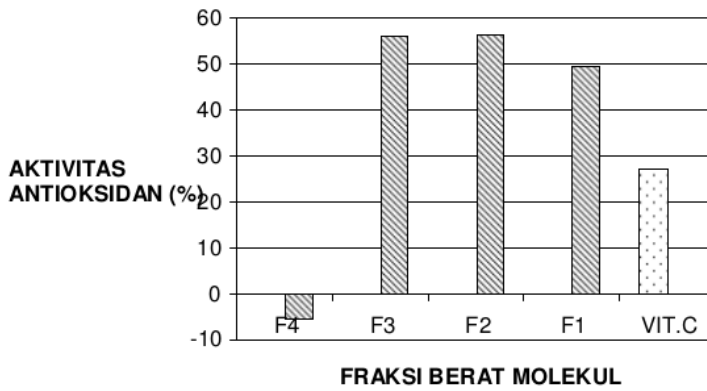
Gambar 4. Aktivitas antioksidan produk kecap manis dengan gula merah (KGM) dengan metode tiosianat pada F1(— —), F2(—□—), F3 (—Δ—), F4 (—x—) dan BHT (—ж—)



Gambar 4. Aktivitas antioksidan sistem model glu-gli-sis dengan metode linoleat-tiosianat pada F1(- -), F2 (-□-), F3 (-Δ-), F4 (-x-)

a. Aktivitas antioksidan dalam sistem "aqueous"

Aktivitas antioksidan tertinggi pada KGM terdapat pada F2 (56.49%) dan F3 (55.97%), sedangkan pada model aktivitas antioksidan tertinggi juga pada F2 dan F3 (Gambar 6).

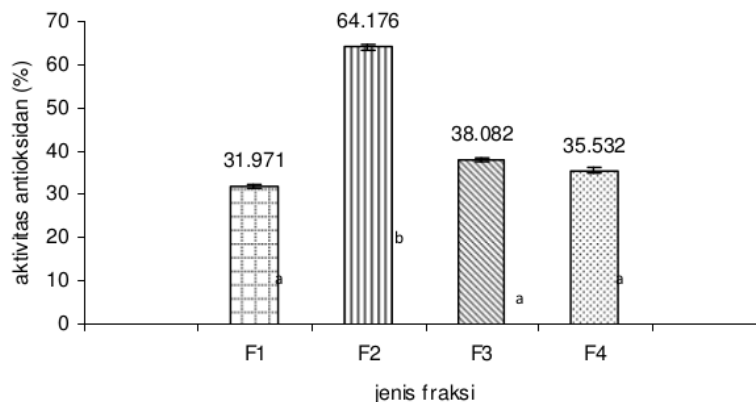


Keterangan: M: moromi; KGM: kecap manis dengan gula merah;

F1: fraksi dengan berat molekul >100 kDa; F2: fraksi dengan berat molekul 30-100 kDa;

F3: fraksi dengan berat molekul 10-30 kDa; F4: fraksi dengan berat molekul <10 kDa

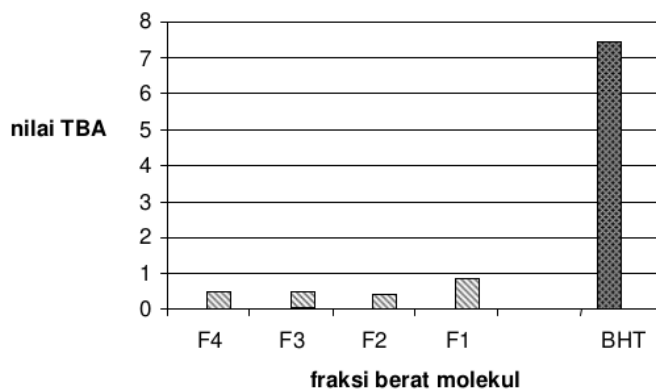
Gambar 5 Aktivitas antioksidan tiap fraksi produk Kecap manis dengan metode DPPH



Keterangan: F1: fraksi dengan berat molekul >100 kDa; F2: fraksi dengan berat molekul 30-100 kDa;
F3: fraksi dengan berat molekul 10-30 kDa; F4: fraksi dengan berat molekul <10 kDa

Gambar 3. Aktivitas antioksidan sistem model glu-gli-sis dengan DPPH

Secara keseluruhan dengan metode DPPH ini didapatkan fraksi F1, F2 dan F3 pada kecap manis KGM mempunyai aktivitas antioksidan cukup kuat (lebih dari 50%), demikian juga aktivasnya lebih besar dibandingkan vitamin C 100 ppm, sedangkan fraksi F4 pada produk KGM tidak mempunyai aktivitas antioksidan.



Keterangan: M: moromi; KGM: kecap manis dengan gula merah;

F1: fraksi dengan berat molekul >100 kDa; F2: fraksi dengan berat molekul 30-100 kDa;

F3: fraksi dengan berat molekul 10-30 kDa; F4: fraksi dengan berat molekul <10 kDa

Gambar 6 Aktivitas antioksidan tiap fraksi kecap dengan metode penentuan bilangan TBA

Produk kecap manis (KGM) nilai TBA pada F2 (5.01) dan F3 (5.44). Rata-rata fraksi F1 dan F2 memberikan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dari fraksi lainnya. Aktivitas antioksidan yang besar menunjukkan penghambatan pembentukan malonaldehid yang cukup kuat.

KESIMPULAN

Pada produk kecap manis dan model mempunyai kemampuan menangkap radikal DPPH lebih kuat pada fraksi dengan berat molekul 30 kDa sampai lebih besar dari 100 kDa, sedangkan penghambatan oksidasi lemak atau asam lemak lebih kuat pada fraksi dengan berat molekul < 10 kDa sampai 30 kDa dan aktivitasnya lebih besar dari BHT 200 ppm, meskipun efek antioksidan pada kecap manis lebih besar daripada model. Setiap fraksi dari kecap maupun model memiliki efek spesifik terhadap metode penghambatan oksidasi minyak/lemak atau menangkap radikal bebas.

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 F J. 1995 Antioxidative activity of (E)-2-octenal/amino acids reaction products. *J. Agric. Food Chem.* 43: 795-800

Antony SM, Han LY, Rieck JR dan Dawson PL. 2000. Antioxidative effect of Maillard reaction products formed from honey at different reaction times. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3985-3989

Apriyantono A, Fardiaz D, Puspitasari NL, Sedarnawati, Budijanto S. 1989. Analisa Pangan. Bogor: PAU IPB

Apriyantono A, Marianti S, Bailey RG, Royle L, Ames JM. 1997. Separation of coloured of kecap manis (a typical Indonesian soy sauce) using HPLC and capillary electrophoresis. Di dalam prosiding 6th Maillard Symposium, London 27-30 July 1997

Duh P, Tu Y dan Yen G. 1999. Antioxidant activity of water extract of harng lyur (*Chrysanthemum morifolium ramat*). *Lebensm Wiss U Technol.*32: 269-277

Hofmann 1998. Studies on relationship between molecular weght and the color potency of fractions obtained by thermal treatment of glucose/amino acid and glucose/protein solutions by using ultrasentrifugation and color dilution techniques. *J.Agric.Food Chem.*46: 3891-3895

Mun'im A, Negishi O and Ozawa T. 2003. Antioxidative compounds from *Crotalaria sessiliflora*. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 67 (2) p.410-414.

Nunomura N, Sasaki M. 1986. Soy sauce. dalam Reddy N, Pierson. MD, Solunke, DK (ed). Legume-based Fermented Foods. Florida: CRC Pr Inc

Soares JR, Dins TCP, Cunha AP dan Ameida LM. 1997. Antioxidant activity of some extract of *thymus zygis*. *Free Rad.Res.*26: 469-478

Takaya Y, Kondo Y, Furukawa T and Niwa M., 2003, Antioxidant constituents of radish sprout (Kaiware-daikon), *Raphanus sativus* L., *J. Agric. Food Chem.*, 51, 8061-8066.

EFEKTIVITAS METODE AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA FRAKSI KECAP MANIS DAN MODEL GLUKOSA-GLISIN-SISTEIN

(Efektiveness of Antioxidative Activity method on soysauce and Glucose-Glycine-cystein Model Fractions)

Dedin F.Rosida¹⁾, Wijaya CH²⁾, Apriyantono A²⁾ and Zakaria FR²⁾

¹⁾. Program Studi Teknologi Pangan, UPN "Veteran" Jawa-Timur

²⁾. Departemen Ilmu and Teknologi Pangan, IPB-Bogor
Jl. Raya Rungkut Madya Surabaya
Email: rosy.upnsby@gmail.com

ABSTRACT

The oxidative browning is considered to have a contribute to the flavor, antioxidative activity and color of food. As a result of this Maillard reaction, a variety of by products, intermediates and brown pigments (melanoidins) are produced. The objectives of this research was to study the effect of antioxidant activity method determination on model and soysauce. The soy sauce were prepared from sucrose or coconut sugar and moromi. The soysauce and model were fractionated by ultrafiltration in a molecular weight ranging between 10 kDa to 100 kDa. In this study, we report that fractions of soysauce. and model have the ability to scavenging more strongly DPPH radical on the fraction with molecular weight of 30 kDa than 100 kDa, whereas the inhibition of oil oxidation was stronger in the fraction with molecular weight <10 kDa to 30 kDa and its activity is more greater than BHT 200 ppm, although the effect of antioxidants in soy sauce is greater than the model. Each fraction of soy sauce and a model had a specific effect on the inhibition method of oil oxidation or scavenging of free radicals

Abstrak

Reaksi pencoklatan pada berbagai produk pangan dapat memberikan flavor yang spesifik dan komponen yang dihasilkan dapat bersifat sebagai antioksidan. Produk reaksi Maillard dapat berupa komponen intermediat dan pigmen coklat yang sering disebut dengan melanoidin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas tiap metode untuk menentukan aktivitas antioksidan tiap fraksi dari kecap manis dan model dari Produk Reaksi Maillard. Kecap manis dibuat dari gula kelapa dan moromi, sedangkan model dibuat dari gula sukrosa dan asam amino glisin dan sistein. Metode penentuan aktivitas antioksidan menggunakan metode rancimat, kemampuan penangkapan radikal DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), penentuan dengan TBA (thiobarbituric acid) dan reduksi dengan feri tiosianat. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa Pada produk kecap manis dan model mempunyai kemampuan menangkap radikal DPPH lebih kuat pada fraksi dengan berat molekul 30 kDa sampai lebih besar dari 100 kDa, sedangkan penghambatan oksidasi lemak atau asam lemak lebih kuat pada fraksi dengan berat molekul < 10 kDa sampai 30 kDa dan aktivitasnya lebih besar dari BHT 200 ppm, meskipun efek antioksidan pada kecap manis lebih besar daripada model. Setiap fraksi dari kecap maupun model memiliki efek spesifik terhadap metode penghambatan oksidasi minyak/lemak atau menangkap radikal bebas

PENDAHULUAN

Oksidasi terhadap bahan pangan yang mengandung lemak mempengaruhi bau dan flavornya. Umumnya pendekatan yang digunakan untuk mengatasi hal tersebut adalah dengan penggunaan bahan tambahan pangan (BTP) antioksidan. Antioksidan yang banyak digunakan dari jenis sintesis seperti Butil Hidroksi Anisol (BHA), Butil Hidroksi Toluena (BHT), propil galat dan tert-Butil Hidroksi Quinon (TBHQ). Selain antioksidan sintesis, antioksidan alami lebih aman penggunaannya di dalam pangan. Antioksidan alami dapat berasal dari: senyawa antioksidan yang sudah ada dari satu atau dua komponen pangan, senyawa antioksidan yang terbentuk dari reaksi-reaksi selama pengolahan, senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami dan ditambahkan ke dalam makanan sebagai bahan tambahan pangan (Pratt 1992). Menurut Pratt dan Hudson (1990) serta Shidi dan Nacz (1995) senyawa alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol dan asam-asam organik polifungsional.

Salah satu antioksidan yang dihasilkan dari proses pengolahan dapat dihasilkan dari reaksi Maillard. Penggunaan produk reaksi Maillard (*Maillard reaction product/MRP*) dapat mencegah oksidasi lipid (Bailey & Won Um 1992). 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 ϵ -amino residu lisin yang terikat pada peptida dan protein berperan penting dalam reaksi disebabkan kereaktifannya yang relatif tinggi. Selain itu gugus α -amino terminal juga

berperan dalam reaksi Maillard (Yokotsuka 1986).

Salah satu produk pangan yang mengandung produk reaksi Maillard (MRP) 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. Kecap manis mempunyai konsistensi sangat kental, rasa manis dengan kandungan gula 26-61% serta kandungan garam 3-6% (Judoamidjojo 1986). Pada pembuatan kecap manis, moromi sebagai bahan baku kecap manis dimasak dengan penambahan gula merah dan bumbu. Kecap manis Indonesia memiliki warna dan flavor khas yang tidak dimiliki oleh negara lain.

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 selain berkontribusi dalam pembentukan warna, flavor dan tekstur diharapkan juga memberikan potensi antioksidan yang cukup tinggi dalam produk kecap manis.

METODOLOGI

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah Kecap manis yang dibuat dari moromi dan gula kelapa. Model reaksi Maillard menggunakan glukosa – glisin dan sistein. Bahan kimia utama yang digunakan untuk penetapan kadar α -amino nitrogen adalah trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS, Sigma - Aldrich), HCl 1N dan 0,02 M, leusin, dan untuk penetapan kadar protein dengan metode Kjeldahl digunakan K_2SO_4 , H_2SO_4 , HGO, H_2BO_3 , $Na_2S_2O_3$, NaOH,

indikator metil merah dan biru, sedangkan untuk penetapan kadar protein terlarut dengan metode Lowry digunakan pereaksi Folin-Ciocalteau, Na-K tartarat, tembaga sulfat, Natrium karbonat, larutan bovine serum albumin (BSA, E. Merck). Untuk penetapan kadar fenol digunakan etanol 95%, Na₂CO₃ 5% dan asam tanat. Untuk pengukuran kadar gula digunakan larutan Fehling, dekstrosa standar, metilen biru, CaCO₃, Pb-asetat, Na-oksalat dan asam sulfat. untuk uji sifat antioksidan digunakan minyak kedelai, air bebas ion, tween-80, asam thiobarbiturat, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, asam linoleat, buffer fosfat, NH₄SCN, FeCl₂ dan HCl.

Peralatan utama yang digunakan meliputi seperangkat alat destilasi, Vortex, sentrifuse (IEC Centra-815A), spektrofotometer (shimadzu UV-160), stirred cell ultrafiltration kapasitas 50 ml (Amicon Inc.Beverly,MS) membrane ultrafiltrasi cut off 10; 30; 100 kDa), FTIR BIORAD Excalibur series, HPLC (Shimadzu Co.Japan).

Metode

Pembuatan kecap manis (KGM) dengan memanaskan gula 500 g dan air 150 g selama 45 menit pada suhu 100 °C. kemudian ditambahkan moromi sebanyak 400 g dan pemanasan dilanjutkan selama 20 menit.

Sistem model dibuat dengan menggunakan asam amino dan satu jenis gula pereduksi. Model ini dibuat untuk mengetahui kemampuan aktivitas antioksidan dari model dan membuktikan bahwa senyawa produk

reaksi Maillard dapat berperan sebagai antioksidan. Glukosa yang dipergunakan sebanyak 0.778 g (4.32 mmol) dan asam amino glisin sebanyak 1.34 mg (0.01 mmol), sistein 2.9 mg (0.02 mmol),

Pada kecap manis (KGM) dilakukan analisis meliputi: Proksimat, pH, total padatan, gula pereduksi, Kadar protein (Lowry), kadar α-amino Nitrogen (TNBS) dan kadar fenol serta serapan uv-vis. Demikian juga dilakukan analisis terhadap jenis gula yang terdapat pada gula merah yang dipergunakan dalam pembuatan kecap manis

Kemudian kecap manis dilakukan fraksinasi dengan ultrafiltrasi sehingga didapatkan 4 fraksi: F1 (BM > 100 kDa); F2 (30 kDa<BM<100 kDa); F3 (10 kDa < BM< 30 kDa) dan F4 (BM<10 kDa), kemudian masing-masing fraksi uji aktivitas antioksidan (metode Rancimat, DPPH, TBA dan Feri-tiosianat).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik kimi kecap manis meliputi: kandungan padatan, air, protein, lemak, karbohidrat, gula pereduksi dan asam amino. Kandungan padatan produk KGM 65° brix (Tabel 1). Pengukuran total padatan merupakan gambaran dari total kandungan komponen produk yang larut dalam air, terutama terdiri dari jumlah total gula dan beberapa komponen lain seperti protein dan asam. Sedangkan Nilai pH untuk produk KGM 4.55. Karakteristik kimia lainnya dari kecap manis (KGM) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik kimia kecap manis (% bk)

Komponen	Kecap manis(KGM)
Air	44.34 ± 0.66 ^b
Lemak	0.56 ± 0.03 ^b
Protein	8.57 ± 0.31 ^a
Karbohidrat	76.70 ± 0.03 ^b
gula pereduksi	11.39 ± 0.07 ^b
Tot. padatan(°brix)	65 ± 1.44 ^c

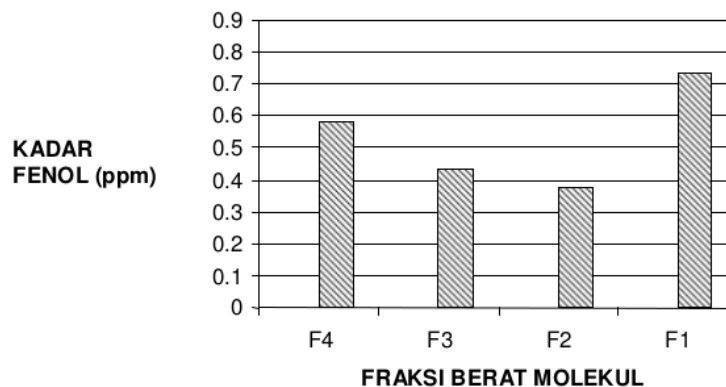
Keterangan: % bk: persen berat kering

Angka yang diikuti dengan huruf sama pada masing-masing pengamatan tiap produk menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Serapan uv-vis pada produk KGM menunjukkan adanya senyawa produk reaksi Maillard. pada kisaran panjang gelombang 380 - 400 nm. Hasil penelitian Namiki *et al* (1983) mendapatkan peak maksimum pigmen merah yang menunjukkan produk reaksi Maillard berasal dari sistem model DHA-casein dan DHA-ovalbumin terdapat pada panjang gelombang 385 nm.

Pada proses pembuatan kecap KGM, gula merah yang dipergunakan sudah mengandung fruktosa sebesar 2.32% dan glukosa 4.20%. Gugus karbonil dari gula reduksi ini bereaksi dengan asam-asam amino untuk menghasilkan produk reaksi Maillard. Sukrosa (64.34%) yang terdapat dalam gula merah juga diduga mengalami invertasi menjadi glukosa dan fruktosa karena KGM juga dalam suasana asam (pH 4.55) dan mengalami pemanasan. Kadar gula reduksi akhir pada KGM sebesar 11.39%

Proses pencoklatan di dalam bahan pangan dapat juga disebabkan oleh asam askorbat, polifenol dan furfural. Di dalam produk kecap manis (KGM), kadar asam askorbat, polifenol dan furfural diduga jumlahnya sangat kecil sehingga reaksi Maillard yang terjadi pada KGM diduga hanya disebabkan oleh gula dan asam amino. Hashiba (1976) berpendapat bahwa produk kecap cepat menjadi coklat dan mekanismenya berbeda dari senyawa asam askorbat, polifenol dan furfural disebabkan senyawa ini dalam kecap jumlahnya sangat sedikit. Senyawa karbonil merupakan senyawa penting yang berperan dalam proses pencoklatan. Senyawa 3-deoksiglukoson dalam kecap merupakan prekursor penting dalam reaksi pencoklatan. Senyawa 3-deoksiglukoson merupakan suatu reduktan, sehingga berpotensi sebagai antioksidan. Kadar fenol banyak terdapat pada fraksi dengan berat molekul < 10 kDa.(Gambar 1).



Gambar 1. Kadar Fenol tiap fraksi pada kecap manis

Aktivitas Antioksidan Kecap Manis

Aktivitas antioksidan diuji menggunakan beberapa metode baik dalam sistem minyak dan sistem aqueous. Metode analisis antioksidan yang dipergunakan adalah: 1) mengukur periode induksinya dengan menggunakan alat rancimat, 2) menentukan bilangan TBA (thiobarbituric acid), 3) menggunakan radikal DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), Pengujian aktivitas antioksidan pada asam linoleat merupakan sistem pengujian yang digunakan untuk mewakili sistem pangan. Pengujian ini dimaksudkan untuk melihat kemampuan pencegahan pembentukan peroksida dalam sistem emulsi asam linoleat. Pengujian ini menunjukkan aktivitas antioksidan total (Duh, *et al.* 1999).

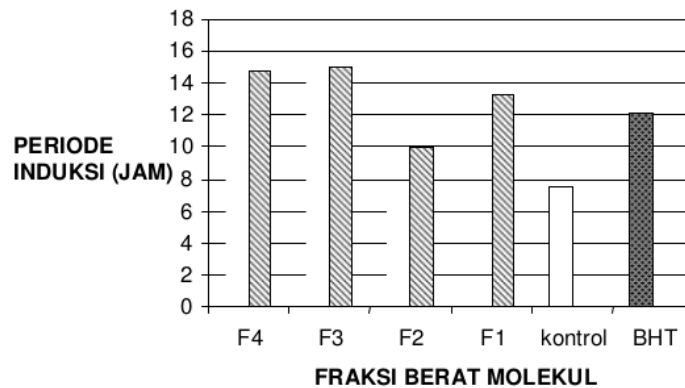
Pengujian kapasitas penangkapan radikal biasa diukur dengan menggunakan suatu senyawa radikal DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) yang bersifat stabil dan dapat menerima elektron atau radikal hidrogen menjadi suatu senyawa yang secara diamagnetik stabil (Soares *et al.*, 1997). Lebih lanjut Duh *et al.*, (1999) menyatakan bahwa kemampuan radikal DPPH untuk direduksi atau distabilisasi oleh antioksidan dengan mengukur penurunan absorbansi pada panjang gelombang 517. Oleh karena itu

DPPH biasa digunakan untuk mengkaji kapasitas penangkapan radikal.

Penggunaan empat metode analisis tersebut dimaksudkan selain untuk melihat aktivitasnya sebagai antioksidan dalam menghambat oksidasi minyak atau menangkap radikal bebas, juga dimaksudkan untuk menguatkan dugaan aktivitas suatu senyawa uji sebagai antioksidan karena sebagaimana diketahui daya antioksidan dapat dilakukan dengan berbagai macam metode. Meskipun suatu senyawa uji menunjukkan daya antioksidan yang tinggi dengan salah satu metode, tidak selalu akan memberikan hasil yang sama baiknya dengan menggunakan metode lainnya sehingga disarankan untuk mengukur daya antioksidan dengan berbagai macam metode (Takaya, *et al.*, 2003).

a. Aktivitas antioksidan dalam sistem minyak

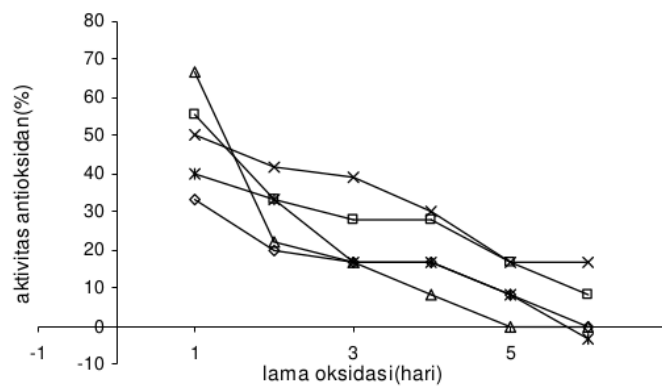
Hasil pengujian aktivitas antioksidan menggunakan rancimat didapatkan pada fraksi F1, F3 dan F4 dari kecap manis (KGM) memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan aktivitas antioksidan BHT (*butylated hidroxy toluen*) 200 ppm. Semua fraksi memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi dibandingkan dengan kontrol, dengan Indeks protektif pada kisaran 1.67 - 2.1



Gambar 2. Aktivitas antioksidan tiap fraksi kecap dengan rancimat

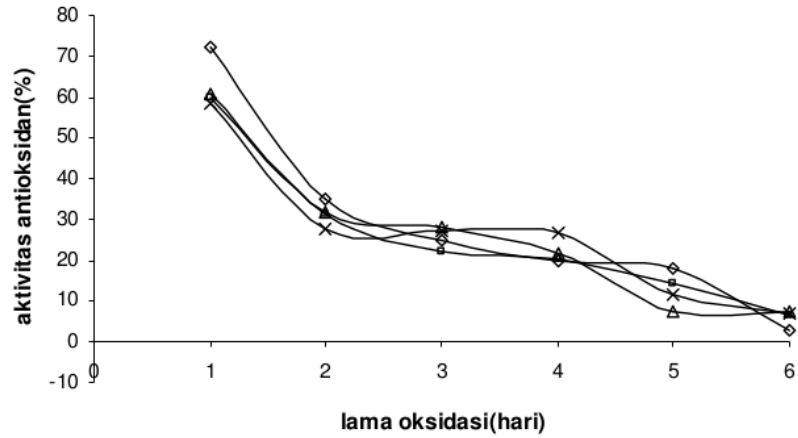
Pada metode tiosianat pengukuran aktivitas antioksidan berdasarkan daya penghambatan terbentuknya senyawa-senyawa radikal yang bersifat reaktif. Oksidasi asam linoleat umumnya berupa peroksida lipid. Proses oksidasi lemak menghasilkan produk primer peroksida (10) (n'im, *et al*/2003). Bilangan peroksida dinyatakan sebagai senyawa yang mampu mengoksidasi Fe^{2+}

menjadi Fe^{3+} , dan selanjutnya Fe^{3+} dengan ion CNS menghasilkan warna merah yang diukur pada panjang gelombang 500 nm. Pada kecap manis (KGM), aktivitas antioksidan terkuat terdapat pada F3 (66.67%), diikuti F2 (55.56%), F4 (50%) dan F1 (33.33%). (Gambar 3). Sedangkan pada model yang paling besar aktivitas antioksidannya pada fraksi 3 (F3, Gambar 4).



Keterangan: F1: fraksi BM>100 kDa; F2: fraksi BM 30-100 kDa; F3: fraksi BM 10-30 kDa; F4: fraksi BM < 10 kDa

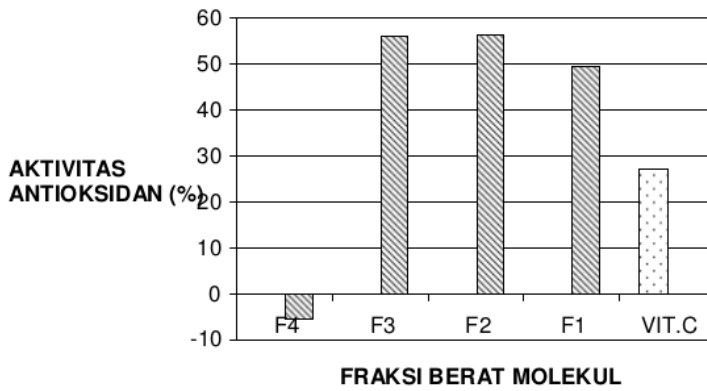
Gambar 4. Aktivitas antioksidan produk kecap manis dengan gula merah (KGM) dengan metode tiosianat pada F1(- -), F2(-□-), F3 (-Δ-), F4 (-x-) dan BHT (-ж-)



Gambar 4. Aktivitas antioksidan sistem model glu-gli-sis dengan metode linoleat-tiosianat pada F1(- -), F2 (-□-), F3 (-Δ-), F4 (-x-)

a. Aktivitas antioksidan dalam sistem "aqueous"

Aktivitas antioksidan tertinggi pada KGM terdapat pada F2 (56.49%) dan F3 (55.97%), sedangkan pada model aktivitas antioksidan tertinggi juga pada F2 dan F3 (Gambar 6).

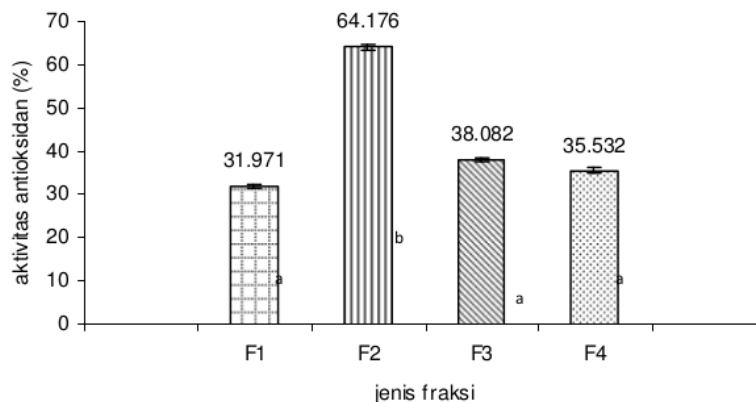


Keterangan: M: moromi; KGM: kecap manis dengan gula merah;

F1: fraksi dengan berat molekul >100 kDa; F2: fraksi dengan berat molekul 30-100 kDa;

F3: fraksi dengan berat molekul 10-30 kDa; F4: fraksi dengan berat molekul <10 kDa

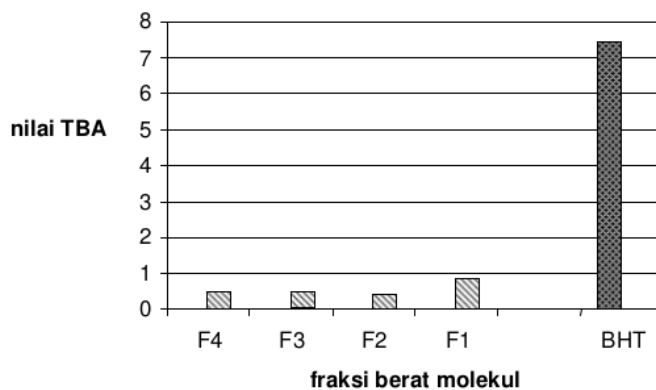
Gambar 5 Aktivitas antioksidan tiap fraksi produk Kecap manis dengan metode DPPH



Keterangan: F1: fraksi dengan berat molekul >100 kDa; F2: fraksi dengan berat molekul 30-100 kDa;
F3: fraksi dengan berat molekul 10-30 kDa; F4: fraksi dengan berat molekul <10 kDa

Gambar 3. Aktivitas antioksidan sistem model glu-gli-sis dengan DPPH

Secara keseluruhan dengan metode DPPH ini didapatkan fraksi F1, F2 dan F3 pada kecap manis KGM mempunyai aktivitas antioksidan cukup kuat (lebih dari 50%), demikian juga aktivasnya lebih besar dibandingkan vitamin C 100 ppm, sedangkan fraksi F4 pada produk KGM tidak mempunyai aktivitas antioksidan.



Keterangan: M: moromi; KGM: kecap manis dengan gula merah;

F1: fraksi dengan berat molekul >100 kDa; F2: fraksi dengan berat molekul 30-100 kDa;

F3: fraksi dengan berat molekul 10-30 kDa; F4: fraksi dengan berat molekul <10 kDa

Gambar 6 Aktivitas antioksidan tiap fraksi kecap dengan metode penentuan bilangan TBA

Produk kecap manis (KGM) nilai TBA pada F2 (5.01) dan F3 (5.44). Rata-rata fraksi F1 dan F2 memberikan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dari fraksi lainnya. Aktivitas antioksidan yang besar menunjukkan penghambatan pembentukan malonaldehid yang cukup kuat.

KESIMPULAN

Pada produk kecap manis dan model mempunyai kemampuan menangkap radikal DPPH lebih kuat pada fraksi dengan berat molekul 30 kDa sampai lebih besar dari 100 kDa, sedangkan penghambatan oksidasi lemak atau asam lemak lebih kuat pada fraksi dengan berat molekul < 10 kDa sampai 30 kDa dan aktivitasnya lebih besar dari BHT 200 ppm, meskipun efek antioksidan pada kecap manis lebih besar daripada model. Setiap fraksi dari kecap maupun model memiliki efek spesifik terhadap metode penghambatan oksidasi minyak/lemak atau menangkap radikal bebas.

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 F J. 1995 Antioxidative activity of (E)-2-octenal/amino acids reaction products. *J. Agric. Food Chem.* 43: 795-800

Antony SM, Han LY, Rieck JR dan Dawson PL. 2000. Antioxidative effect of Maillard reaction products formed from honey at different reaction times. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3985-3989

Apriyantono A, Fardiaz D, Puspitasari NL, Sedarnawati, Budijanto S. 1989. Analisa Pangan. Bogor: PAU IPB

Apriyantono A, Marianti S, Bailey RG, Royle L, Ames JM. 1997. Separation of coloured of kecap manis (a typical Indonesian soy sauce) using HPLC and capillary electrophoresis. Di dalam prosiding 6th Maillard Symposium, London 27-30 July 1997

8 Duh P, Tu Y dan Yen G. 1999. Antioxidant activity of water extract of harng lyur (*Chrysanthemum morifolium ramat*). *Lebensm Wiss U Technol.*32: 269-277

2 Hofmann 1998. Studies on relationship between molecular weght and the color potency of fractions obtained by thermal treatment of glucose/amino acid and glucose/protein solutions by using ultrasentrifugation and color dilution techniques. *J.Agric.Food Chem.*46: 3891-3895

11 Mun'im A, Negishi O and Ozawa T. 2003. Antioxidative compounds from *Crotalaria sessiliflora*. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 67 (2) p.410-414.

Nunomura N, Sasaki M. 1986. Soy sauce. dalam Reddy N, Pierson. MD, Solunke, DK (ed). Legume-based Fermented Foods. Florida: CRC Pr Inc

9 Soares JR, Dins TCP, Cunha AP dan Ameida LM. 1997. Antioxidant activity of some extract of *thymus zygis*. *Free Rad.Res.*26: 469-478

5 Takaya Y, Kondo Y, Furukawa T and Niwa M., 2003, Antioxidant constituents of radish sprout (Kaiware-daikon), *Raphanus sativus* L., *J. Agric. Food Chem.*, 51, 8061-8066.

4.3. EFEKTIVITAS METODE AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA FRAKSI KECAP MANIS DAN MODEL GLUKOSA-GLISIN-SISTEIN

ORIGINALITY REPORT

11 %	%	%	11 %
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	Submitted to Udayana University Student Paper	3 %
2	Submitted to The University of the South Pacific Student Paper	1 %
3	Submitted to Sriwijaya University Student Paper	1 %
4	Submitted to Universitas Andalas Student Paper	1 %
5	Submitted to Higher Education Commission Pakistan Student Paper	1 %
6	Submitted to West Virginia University Student Paper	1 %
7	Submitted to Universitas Diponegoro Student Paper	1 %
8	Submitted to National Chung Hsing University Student Paper	1 %

9

Submitted to Fırat Üniversitesi

Student Paper

1%

10

Submitted to Universitas Brawijaya

Student Paper

1%

11

Submitted to Universitas Indonesia

Student Paper

1%

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography Off