

## EFEK VARIASI PROSES PEMBUATAN AMAZAKE TERHADAP KUALITASNYA

Khairul Anam

Puslitbang Bioteknologi LIPI, Jl Raya Bogor KM 46 Cibinong, 16911

### *Abstract*

*Amazake is a traditional sweet non alcoholic Japanese drink made from fermented rice which is produced from a mix of rice koji and boiled rice. In this process production, amylases produced by the fungus *Aspergillus oryzae* grown in rice koji hydrolyze starch to dextrin and glucose which is called saccharification. The Objective of this research was to understand the influences on amazake which brewed by varying temperature, pH and other factors that affecting the enzyme effects to qualities. This research design with 6 treatments brewed amazake incubated at 60°C, 75°C, 40°C which then sterilized, fourth treatment was incubated at 60°C without sterilized, fifth treatment was within lactic acid addition and the sixth treatment, koji was substituted by enzyme agent. Parameter which observed was enzyme activity, sugar content and also organoleptic test that consist of 7 panelists. The parameters which include were sweetness, umami, sourness and aroma. From this research indicate that amazake product which incubated at 60°C have better quality than the others. Amazake which incubated at 60°C have better sweetness, good taste of umami, little sour and have good aroma.*

*Key words: Amazake, Saccharification, Aspergillus Oryzae, Koji*

## Pendahuluan

Amazake merupakan minuman yang cukup digemari di Jepang. Arti amazake dalam bahasa Jepang sendiri adalah sake manis. Amazake sendiri merupakan minuman manis yang terbuat dari beras Japonica yang tidak mengandung alkohol. Amazake memiliki kadar glukosa yang tinggi sekitar 20-30%, sehingga membuat minuman ini menjadi sumber energi yang praktis dan dapat digunakan sebagai suplemen (Oda *et al.*, 2002).

Amazake dibuat dari beras dengan cara fermentasi yaitu dengan menambahkan jamur *Aspergillus oryzae* pada proses pembuatannya atau dengan menggunakan koji, yaitu beras starter yang telah ditumbuhi jamur *A. oryzae* (Pandey *et al.*, 2000). Dengan adanya penambahan jamur ini maka akan terjadi proses sakarifikasi, yaitu proses terjadinya gula sederhana dari pati. Proses terjadinya sakarifikasi dipengaruhi oleh disekresikannya enzim yang berasal dari metabolisme *A. oryzae*. Enzim-enzim yang bertanggung jawab pada proses ini adalah enzim  $\alpha$ -amylase yang berfungsi mengubah pati menjadi dekstrin, lalu glukamylase yang mengubah dekstrin menjadi

glukosa. Ada juga enzim protease asam yang berfungsi melisis badan protein dari beras. Selain enzim-enzim tersebut, ada enzim lain yang juga ikut berperan yaitu  $\alpha$ -glukosilase dan acid carboxypeptidase (Pandey *et al.*, 2000, Pandey, 1995, Houston *et al.*, 1972).

Enzim-enzim ini berperan penting dalam proses pembuatan amazake.  $\alpha$ -amylase dan glukamylase berperan dalam proses sakarifikasi. Protease asam membantu terjadinya proses sakarifikasi dengan memudahkan  $\alpha$ -Amylase bereaksi dengan pati.  $\alpha$ -glukosilase dan glukamylase memberikan cita rasa manis sedangkan acid carboxypeptidase menentukan rasa gurih (umami) dari amazake (Imanaka *et al.*, 1986).

Proses pembuatan amazake sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor yang dapat mempengaruhi enzim-enzim tersebut, salah satunya adalah suhu (Baas, 1990). Oleh karena itu dilakukan penelitian dengan tujuan untuk mengetahui kondisi optimum yang dibutuhkan dalam proses pembuatan amazake. Dalam penelitian ini juga diteliti peran dari *A. oryzae* dalam proses pembuatan amazake.

## Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Food Research Center, Hiroshima, Jepang. Bahan yang digunakan adalah beras Japonica yang telah dipoles menjadi 70%, koji (beras starter yang ditumbuhi jamur *Aspergillus oryzae*).

### 1. Prosedur Pembuatan Amazake Secara Tradisional

Beras yang sudah di poles sejumlah 50g dicuci dengan air, lalu direndam selama satu malam, kemudian disaring. Pada beras yang telah direndam, ditambahkan 200 ml air lalu dididihkan pada suhu 105°C selama kurang lebih 10 menit. Beras kemudian dидiamkan sampai suhu 70°C, lalu di campur dengan 75g koji yang telah disiapkan, sedikit demi sedikit sambil diaduk. Lalu beras dibiarkan sampai pada suhu yang telah ditentukan kemudian dilanjutkan dengan inkubasi selama 12-24 jam pada inkubator dengan suhu yang telah ditentukan untuk proses sakarifikasi. Setelah proses inkubasi, beras disterilisasi pada suhu 100°C selama 10 menit untuk proses deaktivasi enzim, lalu

suhunya dibiarkan turun (Oda *et al.*, 2002)

### 2. Rancangan Penelitian

Dari proses pembuatan amazake secara tradisional, dilakukan 6 perlakuan yaitu sampel nomor 1, 2, 3 dan 4 secara berturut-turut diinkubasi pada suhu 60°C, 75°C, 40°C dan 60°C tetapi tanpa adanya proses sterilisasi akhir. Sampel nomor 5 diinkubasi pada suhu 60°C dengan penambahan 1,5 ml asam laktat. Pada sampel nomor 6 agen enzim untuk menggantikan peran koji, sehingga prosedur pembuatannya adalah 125g beras yang dipoles ditambah 65mg agen enzim yang dinkubasi pada suhu 60°C. Amazake yang telah jadi, disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 5°C selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan dipisahkan dari endapan dan digunakan sebagai sampel untuk uji-uji berikutnya.

### 3. Uji kekuatan sakarifikasi, $\alpha$ -amylase, carboxypeptidase asam diukur dengan menggunakan kikkoman *brewing analysis kit* dengan kode produk 60212, 60213 dan 60219.

#### 4. Pengukuran kadar protease asam

##### a. Kurva standar

Larutan natrium karbonat sejumlah 5 ml dan 1 ml phenol reagent ditambahkan pada larutan standar yang mengandung thyrosine dengan kadar 20-100 $\mu$ g/ml. Lalu larutan dipanaskan pada suhu 30°C dan mengalami perubahan warna menjadi coklat. Dengan menggunakan larutan yang tidak mengandung thyrosine sebagai kontrol, lalu dihitung dengan metode spektrofotometri pada absorbansi 660nm kemudian dibuat kurva standarnya.

##### b. Pemeriksaan sampel

Ditambahkan 1.0 ml larutan buffer McIlvaine pH 3.0 pada 1.5 ml larutan casein dan panaskan sampai suhu 40°C lalu direaksikan dengan larutan sampel selama 60 menit pada suhu 40°C. Ditambah 3 ml TCA solution untuk menghentikan reaksi. Endapannya disaring dan direaksikan dengan 5 ml larutan natrium karbonat dan 1 ml phenol reagent pada 1 ml filtrat selama 30 menit, kemudian dengan pemanasan pada suhu 40°C

mengalami pewarnaan. perubahan warna diperiksa pada panjang gelombang 660 nm.

Untuk kontrol, larutan enzim ditambahkan segera sebelum larutan TCA lalu diukur absorbansinya setelah tahap yang sama. Dihitung perbedaan E dari absorbansi antara larutan sampel dengan kontrol. Dari nilai E, diasumsikan bahwa thyrosine ( $y$   $\mu$ g) dihitung dengan menggunakan kurva standar (Anonim, 2000).

#### 5. Pemeriksaan kadar gula

Kadar glukosa diukur dengan menggunakan *glucose kit* dari wako (*glucose C2 (mutarotase-GOD method)*, kode produk 439-90901). Kadar gula pereduksi diukur dengan menggunakan metode Nelson.

#### 6. Kadar asam amino

Pemeriksaan kadar asam amino dalam sampel dilakukan dengan titrasi menggunakan metode formol asam amino. Sampel dinetralkan dengan NaOH kemudian ditambahn formalin netral. Sampel yang telah dinetralkan dititrasi dengan larutan

NaOH 0,1 N hingga warna berubah menjadi merah jambu.

#### 7. Uji Organoleptik

Pengujian organoleptik dilakukan dengan metode skoring oleh tujuh orang panelis tidak terlatih. Parameter yang diamati adalah rasa manis, gurih (umami), asam, dan aroma. Skor penilaian tersebut adalah: 1 = sangat lemah, 2 = lemah, 3 = normal, 4 = kuat, 5 = sangat kuat untuk rasa manis, gurih, dan asam sedangkan untuk aroma adalah 1 = sangat tidak enak, 2 = tidak enak, 3 = netral, 4 = enak, dan 5 = sangat enak. Pada pengujian organoleptik ini diujikan juga 2 produk amazake yang telah dikomersialisasikan sebagai pembanding.

#### Hasil dan Pembahasan

Beras japonica mempunyai dua lapisan. Lapisan luar yang berwarna bening agak kusam merupakan lapisan

yang terdiri dari polipeptida (protein) sedangkan bintik putih yang berada di tengah merupakan pati (karbohidrat). Dengan adanya koji yang mensekresikan berbagai macam enzim, maka beras ini mengalami sakarifikasi. Beberapa enzim yang ikut berperan dalam proses sakarifikasi, seperti enzim glukosidase, glukoamilase,  $\alpha$ -amilase, sedangkan protease asam membantu terjadinya lisis dari lapisan protein yang menutupi lapisan pati, sehingga memudahkan enzim-enzim sakarifikasi bereaksi dengan pati.

Pada Tabel 1 diketahui bahwa pada sampel nomor 1, 2, 4, 5 dan nomor 6 sudah tidak terjadi lagi proses sakarifikasi karena tidak lagi atau sedikit memiliki kekuatan sakarifikasi. Hal ini didukung juga oleh sedikitnya nilai dari aktivitas enzim glukosidase, glukoamilase,  $\alpha$ -amilase, dan juga protease asam. Sedangkan untuk sampel nomor 3 masih memungkinkan terjadinya proses sakarifikasi.

Tabel 1. Pengukuran Aktivitas Enzim

No. Sampel	Kekuatan Sakarifikasi (U/ml)	Glucosidase (U/ml)	Glucoamylase (U/ml)	$\alpha$ -amylase (U/ml)	Protease asam (U/ml)
1	0	0	0	0.003	44
2	0	0	0	0.011	136
3	0.37	0.025	0.35	0.494	106
4	0.06	0.001	0.06	0.055	0
5	0	0	0	0	0
6	0.01	0	0.01	0.419	0

Dari Tabel 2 diketahui bahwa sampel nomor 1 dan 4 memiliki kadar glukosa dan gula pereduksi yang tinggi. Hal ini membuktikan bahwa pada sampel nomor 1 dan 4 terjadi proses sakarifikasi yang optimal. Hal ini dapat dilihat dari selisih perbedaan yang tidak terlalu jauh antara sampel nomor 1 yang disterilisasi dan sampel nomor 4 yang tidak disterilisasi yang sama-sama diinkubasi pada suhu 60°C. Untuk sampel nomor 6 sendiri, meskipun sampel ini disimpan pada suhu 60°C, tetapi glukosa ataupun gula pereduksi yang dihasilkan tidak terlalu banyak. Hal ini karena enzim yang digunakan pada sampel ini terbatas hanya pada agen

enzim sehingga apabila dibandingkan dengan sampel nomor 4, terlihat perbedaan yang nyata.

**Tabel 2.** Pengukuran volume pH, Brix, kadar glukosa dan gula pereduksi dari supernatan tiap nomor sampel

No. Sampel	Volume (ml)	pH	Brix (%)	Glukosa (%)	Gula reduksi (%)
1	160	5.88	26	22.7	19.5
2	68	5.76	18	3.6	6.7
3	145	4.45	17	10.5	19.4
4	166	5.54	16	25.2	22.2
5	-	3.38	-	0.92	5.5
6	140	6.46	-	9.9	13.1

Pada sampel nomor 3 dapat dilihat bahwa kadar glukosa yang dikandung lebih sedikit daripada sampel nomor 1 ataupun nomor 4. Sedikitnya kadar glukosa yang dikandung sampel nomor 3 diikuti dengan turunnya pH sampel. Hal ini dapat disebabkan oleh tumbuhnya bakteri penghasil asam yang tumbuh optimal pada suhu inkubasi sampel tersebut, yaitu 40°C. Bakteri tersebut memetabolisme glukosa menjadi asam-asam organik yang lebih sederhana, sehingga pH pada sampel tersebut menurun diikuti turunnya kadar glukosa. Apabila dilihat dari volume supernatan yang dihasilkan, sampel nomor 2 dan 5 memiliki jumlah supernatan yang sedikit. Hal ini diakibatkan karena sedikitnya enzim sakarifikasi yang

dihasilkan oleh kedua sampel. Kondisi pH dari sampel nomor 5 mengakibatkan tidak terjadinya proses sakarifikasi karena enzim-enzim sakarifikasi bekerja optimal pada pH netral, sedangkan pada sampel nomor 2, suhu inkubasi yang tinggi menyebabkan deaktivasi dari enzim-enzim sakarifikasi tersebut (Robyt, 1984).

Jumlah asam amino yang dihasilkan selama proses fermentasi menggambarkan tingkat produksi enzim. Dalam pembuatan amazake, koji memiliki peran penting untuk produksi enzim dilihat dari jumlah asam amino yang tinggi pada sampel 1, 3, 4, dan 5 (Schwimmer, 1981).

**Tabel 3.** Pengukuran asam karboksipeptidase dan jumlah asam amino

No. Sampel	Asam Karboksipeptidase (U/ml)	Jumlah Asam Amino (ml)
1	0.0318	2.798
2	0.0023	0.982
3	0.0582	3.566
4	0.0425	2.708
5	0.0677	2.082
6	0.0047	0.310

Pada sampel 2 dan 6 yang tidak menggunakan koji, jumlah asam amino yang dihasilkan rendah, dapat dilihat pada Tabel 3 Koji dapat mensekresikan berbagai macam enzim pada rentang waktu yang lama sehingga proses sakarifikasi dapat berlangsung secara kontinyu selama penyimpanan. Pemberian enzim secara langsung sebagai pengganti koji memiliki kelemahan karena begitu enzim terdeaktivasi atau rusak.

Dari Tabel 4 diperoleh bahwasanya sampel nomor 1 memiliki keunggulan dalam kualitas rasa dibandingkan dengan sampel nomor 2 dan 3. Sampel nomor 1 ini memiliki rasa yang manis, rasa gurih yang pas dan aroma yang khas, diikuti dengan sampel

nomor 4, sedangkan untuk sampel nomor 6 memiliki kelebihan tersendiri. Sampel nomor 6 ini memiliki rasa dan aroma yang netral, produk ini dapat dikombinasikan dengan rasa dan aroma artifisial lainnya seperti ditambahkan dengan rasa jeruk, apel atau rasa lainnya.

**Tabel 4.** Hasil uji organoleptik

Sampel	Rasa Manis	Gurih	Asam	Aroma	Jumlah
Sampel 1	4.3 ± 0.7	3.7 ± 0.1	2.7 ± 0.7	3.5 ± 0.2	3.3 ± 0.3
Sampel 2	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.0 ± 1.0
Sampel 3	1.0 ± 0.1	1.9 ± 0.3	3.3 ± 0.1	1.6 ± 0.6	1.4 ± 0.7
Sampel 4	3.7 ± 0.7	3.1 ± 0.6	2.7 ± 0.6	3.0 ± 0.6	3.4 ± 0.2
Sampel 5	1.6 ± 0.3	2.1 ± 0.3	5.0 ± 1.0	1.7 ± 0.3	1.4 ± 0.3
Sampel 6	2.5 ± 0.2	2.3 ± 0.1	1.6 ± 0.3	3.3 ± 0.6	2.6 ± 0.3
Komersial 1	2.5 ± 0.3	3.1 ± 0.6	2.9 ± 0.5	3.0 ± 0.1	3.0 ± 1.0
Komersial 2	4.1 ± 0.5	3.4 ± 0.4	2.7 ± 0.3	3.0 ± 0.5	3.1 ± 1.0

Selain itu dari Tabel 4 juga diperoleh bahwa sampel nomor 3 dan nomor 5 merupakan produk yang kualitasnya kurang. Hal ini disebabkan karena pH yang dimiliki oleh sampel tersebut. Diketahui bahwa sampel nomor 3 dan nomor 5 memiliki pH yang rendah. Hal ini dipengaruhi oleh kemungkinan tumbuhnya bakteri yang memproduksi asam pada sampel nomor 3 karena rendahnya suhu pada waktu penyimpanan, sedangkan untuk sampel nomor 5 karena adanya penambahan asam laktat (Oda *et al.*, 2002 dan Schwimmer, 1981).

#### Kesimpulan

Dari penelitian yang dilakukan, disimpulkan bahwa suhu 60°C merupakan suhu optimum proses sakarifikasi. Sampel yang disimpan pada suhu ini memiliki kualitas yang baik. Sampel nomor 1 yang disimpan pada suhu 60°C mempunyai rasa yang lebih manis, lebih gurih, sedikit masam dan aroma yang khas.

#### Ucapan Terima kasih

Terima kasih kami ucapkan kepada *Japan International Cooperation Agency* yang telah menyelenggarakan training Food Processing and Preservation, sehingga penelitian ini

dapat dilaksanakan. Terima kasih kepada Dr. Ahkam Subroto dan Mr. Tanimoto atas bimbingannya Oliver Evangelista, Viet Anh, Nur Izalin, Supamas, Aye Chan Moe and Ms. Kiyoshi yang telah menyertai selama training dilaksanakan.

#### Daftar Pustaka

- Anonim, 2000, *Textbook for the group training course on food processing and preservation technology III: Training in rice saccharification and the amazake brewing test using enzymes. Biological application technology department, food research center, Hiroshima, Japan.*
- Baas JE., 1990, *Enzyme: their application and biochemical characterization. Surfactant Science. Series Library of Congress Cataloging in Publication Data*
- Houston DF, Rice Bran, 1972, Polish. In : Houston DF, editor. *Rice chemistry and technology.* Minnesota: American Association of Cereal Chemists, Inc. p. 275-283, 306-313.
- Imanaka T, Shibasaki M, Takagi MA., 1986, *New way of enhancing the stability of proteases. Nature.*; 324:695-697.
- Oda Y, Ichinose Y, Yamauchi H., 2002, *Utilization of Lactobacillus amylovorus as an alternative microorganism for saccharifying boiled rice.* Food Science Technology Research; 8 (2), 166-168
- Pandey A., 1995, *Glucoamylase research: an overview. Starch.* 47:439-445.
- Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, Mohan R., 2000, *Advances in microbial amylases.* Biotechnol Appl Biochem 31:135-152.
- Robyt JF., 1984, *Enzymes in hydrolysis and synthesis of starch. 2<sup>nd</sup> ed.* In: Whistler RL, Bemiller JN, Paschall EF, editors. *Starch: chemistry and technology.* London: Academic Press; p.95-96.
- Schwimmer S., 1981, *Source book of food enzymology. Enzyme technology investigations.* Avi Sourcebook and Handbook series