ISOLATION AND IDENTIFICATION OF VOLATILE COMPONENTS IN TEMPE BY SIMULTANEOUS DISTILLATION-EXTRACTION METHOD BY MODIFIED EXTRACTION METHOD

Isolasi dan Identifikasi Komponen-Komponen Volatil Tempe dengan Metoda Distilasi-Ekstraksi Simultan

SYAHRIAL
Chemistry Dept. Faculty of Mathematics, Syiah Kuala University, Banda Aceh
M. MUCHALAL
Chemistry Dept., Faculty of Mathematics and Natural Sciences, GMU, Yogyakarta

ABSTRACT

An isolation and identification of volatile components in tempe for 2, 5 and 8 days fermentation by simultaneous distillation-extraction method was carried out. Simultaneous distilallation-extraction apparatus was modified by Muchalal from the basic Likens-Nickerson's design. Steam distillation and benzena as an extraction solvent was used in this system. The isolation was continuosly carried out for 3 hours which maximum water temperature in the Liebig condenser was 8°C. The extract was concentrated by freeze concentration method, and the volatile components were analyzed and identified by combinied gas chromatography-mass spectrophotometry (GC-MS).

The Muchalal's simultaneous distillation extraction apparatus have some disadvantage in cold finger condenser, and it's extractor did not have condenser. At least 47, 13 and 5 volatile components was found in 2, 5 and 8 days fermentation, respectively. The volatile components in the 2 days fermentation were nonalal, α-pinene, 2,4-decadienal, 5-phenyldecane, 5-phenylundecane, 4-phenylundecane, 5-phenyldodecane, 4-phenyldodecane, 3-phenyldodecane, 2-phenyldodecane, 5-phenyltridecane, and caryophyllene; in the 5 days fermentation were nonalal, caryophyllene, 4-phenylundecane, 5-phenyldodecane, 4-phenyldodecane, 3-phenyldodecane, 2-phenyldodecane; and in the 8 days fermentation were ethenyl butanoic, 2-methyl-3-(methylethenyl)ciclohexyl etanoic and 3,7-dimethyl-5-octenyl etanoic.

Keywords: Tempe, Muchalal's simultaneous distillation-extraction apparatus;.

PENDAHULUAN

Tempe adalah produk fermentasi yang telah lama digemari di Indonesia, khususnya masyarakat Jawa. Mungkin karena nilai gizinya yang tinggi [5], tempe mulai digemari pula oleh masyarakat barat. Tempe yang umum dikenal yaitu tempe yang terbuat dari kedelai. Pembuatan tempe di daerah sekitar Yogyakarta dan Solo pada umumnya menggunakan inokulum dari spesies rhizopus oligosphorus dan rhizopus oryzae [10], dan masa fermentasinya yaitu 48 jam [5, 3, 10]. Setelah waktu 48 jam, tempe mulai mengalami perubahan nilai gizinya [5, 6] dan mulai mengalami pembusukan [2, 14]. Tempe setengah busuk (semangit) juga digemari oleh sekelompok masyarakat Indonesia, karena baunya yang dipercaya dapat mengundang selera makan. Namun demikian, senyawa yang bertanggungjawab terhadap aroma yang digemari tersebut belum diketahui hingga saat ini.

Beberapa peneliti telah mencoba mengisolasi dan mengidentifikasi flavor tempe [3] dan ditemukan diantaranya yaitu: asetoin, isobutanol, 2,3-butanadiol, diasetil, kariofilena, asam-asam palmitat, stearat, oleat, linolenat dan linoleat. Sudarmin (1996) melaporkan bahwa terdapat 9 komponen untuk aroma tempe yang disimpan 2 hari, 14 komponen untuk tempe yang disimpan 4 hari, dan 25 komponen untuk tempe yang disimpan selama 6 hari. Peneliti lain melaporkan bahwa flavor tempe usia fermentasi 2 hari paling tidak mengandung 31 komponen, 27 komponen untuk usia fermentasi 5 hari dan 43 komponen untuk usia fermentasi 8 hari.

Penelitian flavor tempe setengah busuk (semangit) yang dilakukan Sudarmin (1996) menggunakan metode absorpsi yang peralatannya dimodifikasi oleh Muchalal, serta menggunakan dietil eter sebagai pelarut.

Pada penelitian ini akan dilakukan isolasi komponen volatil flavor tempe usia fermentasi 2, 5 dan 8 hari dengan menggunakan metode

distilasi uap-ekstraksi cair-cair simultan. Sebagai pelarut ekstraksi digunakan benzena, dan peralatannya dimodifikasi oleh Muchalal dari rancangan yang diajukan Likens-Nickerson. Metode distilasi-ekstraksi simultan (DES) banyak digunakan para peneliti untuk mengisolasi komponen volatil suatu flavor [13, 4, 8, 12, 7] dan memperlihatkan hasil yang memuaskan.

EKSPERIMEN

Persiapan sampel

Tempe yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari pembuat tempe yang tinggal di sekitar kampus Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Inokulum yang digunakan adalah spesies *rhizopus oryzae* dan sampel yang digunakan yaitu tempe usia fermentasi 2, 5 dan 8 hari.

Tiga ratus gram sampel tempe dirajang kecil-kecil lalu dimasukkan ke dalam labu distilasi. Sebagai pelarut ekstraksi digunakan benzena kualifikasi analar (E'Merck) sejumlah 75 ml dan dimasukkan ke dalam labu ekstraktor. Suhu air pendingin dijaga maksimum 8°C dan suhu pendingin aseton-CO_2 padat dijaga maksimal -5°C. proses distilasi berlangsung selama 3 jam tanpa sela dengan panas api sedang. Distilat selanjutnya dipisahkan dengan corong pisah, lalu ke dalam ekstrak ditambahkan natrium sulfat anhidrous. Ekstrak bebas air dipekatkan dengan menggunakan teknik pembekuan [1].

Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa

Identifikasi komponen volatil tempe menggunakan kromatografi gas-spektroskopi massa Shimadzu QP 5000. Kolom yang digunakan yaitu DB-1 dengan panjang 50 m dan diameter 0,22 mm. Parameter operasional yaitu sebagai berikut: gas pembawa: helium; voltase ionisasi: 70 eV; suhu injektor: 260°C; suhu kolom 40-260°C (10°C/menit); tekanan: 60 kPa.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kenampakan fisik dari tempe usia fermentasi 2, 5 dan 8 hari yang dijadikan sebagai sampel dalam penelitian ini, disajikan pada tabel berikut ini:

Tabel 1. Kenampakan fisik sampel tempe A, B dan C.

Kenampakan fisik	Tempe A	Tempe B	Tempe C
Tekstur	Kenyal	Agak lunak	Lunak
Warna	Putih	Coklat muda	Coklat
Bau	Tempe segar	Sedikit busuk	Busuk

Waktu fermentasi untuk tempe berkisar 24-48 jam [3, 10] dan bila berlangsung lebih dari 48 jam, maka mulai terjadi perubahan nilai gizi tempe yang ditandai adanya komponen kimia tertentu yang bertambah kuantitasnya dan ada pula komponen kimia tertentu yang akan turun kuantitasnya [6, 5]. Perubahan komponen kimiawi pada tempe dapat menyebabkan terjadinya perubahan flavor, karena flavor yang dihasilkan suatu bahan makanan sangat bergantung pada komponen kimiawi yang ada dalam bahan makanan tersebut [14, 2]. Pemilihan selang waktu usia fermentasi tiga hari diharapkan dapat memberikan perbedaan flavor yang nyata untuk tiap sampel tempe yang digunakan.

Munculnya bau busuk pada tempe usia fermentasi 5 dan 8 hari dapat saja disebabkan karena terjadinya hidrolisis lipid oleh enzim lipase yang menghasilkan asam lemak rantai pendek, yang kemudian mengalami reaksi esterifikasi menghasilkan esternya.

Sebelum isolasi flavor dilakukan, masing-masing sampel tempe usia fermentasi 2, 5 dan 8 hari dihaluskan terlebih dahulu. Sampel yang digunakan untuk metode distilasi-ekstraksi simultan harus dihaluskan terlebih dahulu dengan cara memotong dengan ukuran kecil-kecil. Pada metode distilasi-ekstraksi simultan, sampel yang terlalu halus dapat terikut naik bersama-sama distilat dan masuk ke labu penampungan, sehingga sampel tidak boleh dihaluskan dengan blender.

Adanya perlakuan pada sampel sebelum proses isolasi dilakukan bertujuan agar lebih memudahkan uap air untuk mengeluarkan komponen volatil dari jaringan-jaringannya. Jaringan-jaringan pada sampel yang telah dihaluskan lebih mudah ditembus oleh uap air dan meningkatkan luas permukaan sentuh uap air. Sebagai pelarut pada proses ekstraksi digunakan benzena kualifikasi p.a. dengan kuantitas 75 ml. Pemilihan benzena sebagai pelarut didasari atas pertimbangan titik bekunya yang tergolong tinggi untuk pelarut organik, yaitu 5°C, sehingga ekstrak lebih mudah dipekatkan melalui teknik pembekuan. Oleh karena benzena

merupakan suatu pelarut non polar, maka senyawa-senyawa non polar diharapkan dapat terisolasi dari flavor tempe.

Pemekatan distilat atau ekstrak pada penelitian flavor sudah menjadi suatu keharusan untuk dilakukan, karena acap kali komponen-komponen penyusun flavor tersebut kualitasnya sangat kecil di dalam bahan makanan, sehingga konsentrasi distilat atau ekstrak menjadi sangat encer. Konsentrasi distilat atau ekstraks yang sangat encer menyulitkan proses analisa dengan menggunakan GC-MS.

Teknik pembekuan merupakan suatu teknik pemekatan yang menguntungkan, karena tidak menggunakan suhu tinggi yang menyebabkan hilangnya komponen-komponen volatil suatu flavor. Kelemahan yang mencolok pada teknik ini yaitu ikut terjebaknya komponen flavor di dalam pelarut yang membeku, dan untuk menghindari kejadian tersebut maka distilat atau ekstrak yang akan dipekatkan harus diaduk terus menerus. Kelemahan lain yang tidak dapat dihindari yaitu perolehan distilat atau ekstrak pekatnya hanya dalam skala ml dan tidak memungkinkan dalam skala μl.

Ekstrak komponen volatil tempe untuk usia fermentasi 2, 5 dan 8 hari yang telah dipekatkan memberikan kenampakan fisik sebagaimana yang tersaji pada Tabel 2.

Tabel 2. Kenampakan fisik sampel tempe A, B dan C.

Usia fermentasi tempe	Kenampakan fisik	
	Warna	Bau
2 hari	Bening	Segar
5 hari	Bening	Agak busuk
8 hari	Kuning pucat	Busuk

Isolasi flavor dengan menggunakan peralatan distilasi-ekstraksi cair-cair simultan (DES) yang dimodifikasi oleh Muchalal dari rancangan dasar yang diajukan oleh Likens-Nickerson, terlihat masih kurang efektif. Muchalal melakukan modifikasi pada bagian pendingin air, tempat ekstraksi (ekstraktor) dan pendingin CO_2 padat-aseton. Pada rancangan dasar yang diajukan Likens-Nickerson, pendingin air yang digunakan mirip pendingin air permukaan ganda, tetapi mempunyai 2 saluran untuk uap masuk. Pendingin ini diletakkan di tengah-tengah, di antara 2 lengan yang masing-masing mengalirkan uap pelarut dan uap flavor, dan untuk uap yang tidak terkondensasi akan naik menuju pendingin CO_2 padat-aseton. Proses ekstraksi akan berlangsung di dalam pendingin ini juga.

Pendingin yang digunakan pada rancangan modifikasi Muchalal, yaitu pendingin Liebig dengan panjang 30 cm dan diameter ruang pendingin sekitar 0,7 cm. Pendingin ini ditempatkan pada lengan yang mengalirkan uap flavor dan uap yang tidak terkondensasi akan menuju pendingin CO_2 padat-aseton. Sedangkan uap pelarut yang datang dari lengan lainnya secara keseluruhan akan terkondensasi pada pendingin CO_2 padat-aseton. Proses ekstraksi akan terjadi pada lengan bagian tengah yang tidak berpendingin.

Tata letak komponen peralatan pada rancangan modifikasi tersebut menimbulkan kesulitan untuk mengisolasi komponen flavor yang berderajat volatil tinggi. Penempatan pendingin Liebig pada lengan yang mengalirkan uap flavor menyebabkan uap pelarut yang berasal dari lengan lainnya hanya didinginkan oleh pendingin CO_2 padat-aseton, sehingga penggunaan CO_2 padat-aseton menjadi lebih banyak. Proses pendinginan pada pendingin CO_2 padat-aseton menjadi kurang efektif karena tingginya suhu uap pelarut yang harus didinginkan oleh pendingin CO_2 padat-aseton. Tempat ekstraksi (ekstraktor) yang tidak berpendingin juga menyebabkan sebagian dari flavor yang telah terkondensasi pada lengan tengah akan mengalami penguapan kembali setiap kali terkena tetesan pelarut panas, dan uap tersebut akan naik menuju pendingin CO_2 padat-aseton. Uap flavor dari ekstraktor dan sebagian besar uap flavor yang tidak dapat dikondensasikan oleh pendingin Liebig akan terus menguap keluar, karena tidak dapat dikondensasikan oleh pendingin CO_2 padat-aseton, dan fenomena ini dibuktikan dengan kuatnya bau pelarut dan flavor yang tercium pada saluran pengaman pendingin CO_2 padat-aseton.

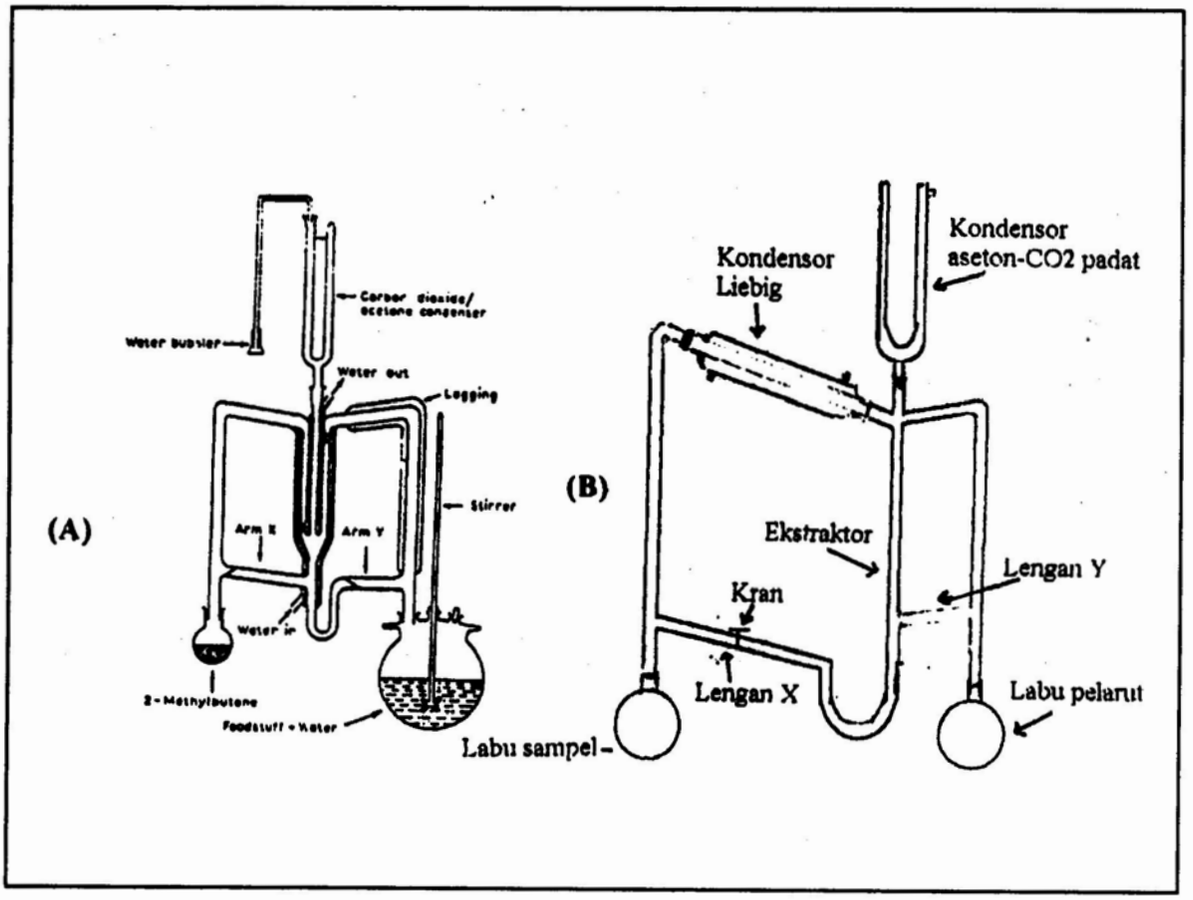
Kegagalan untuk menjebak komponen flavor yang berderajat volatil tinggi mungkin juga disebabkan pembuatan pendingin CO_2 padat-aseton yang kurang tepat. Jarak antara dinding luar dan dinding dalam pada pendingin CO_2 padat-aseton yang digunakan hampir mencapai 2 cm sehingga proses pendinginan terhadap aliran uap menjadi kurang efisien. Lain dari pada itu panjang pendingin CO_2 padat-aseton yang hanya 20 cm menambah rendahnya kualitas pendinginan. Hal ini disebabkan hanya setengah dari volume total dari pendingin CO_2 padat-aseton yang dapat diisi aseton. Pengisian lebih dari batas tersebut akan

menyebabkan aseton meluap tumpah keluar saat CO_2 padat dimasukkan ke dalam pendingin.

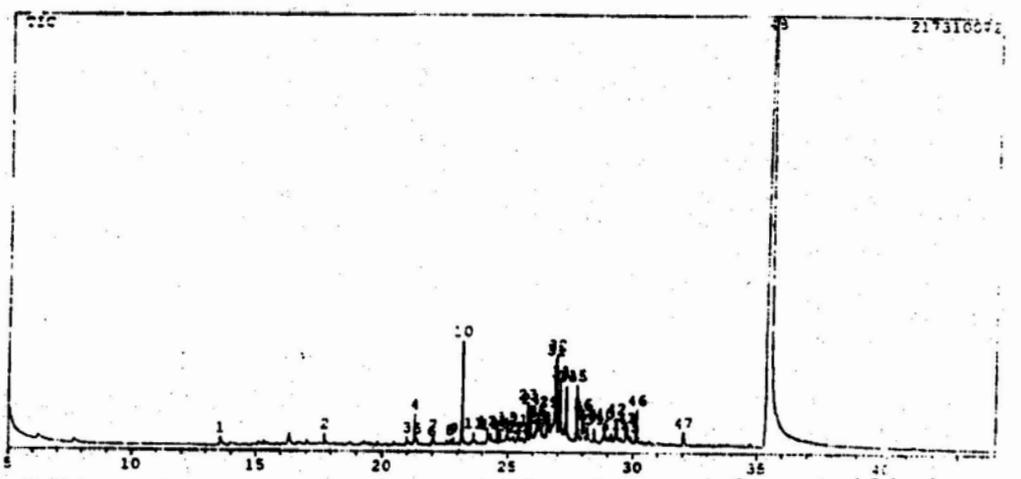
Perbandingan antara DES yang diajukan oleh Likens-Nickerson dan hasil modifikasi Muchalal dapat dilihat pada Gambar 1.

Identifikasi komponen volatil flavor tempe usia fermentasi 2, 5 dan 8 hari menggunakan peralatan GC-MS. Spektra yang diperoleh dibandingkan dengan spektra standar dari TNO dan NIST. Identifikasi senyawa-senyawa volatil penyusun flavor tempe dari berbagai usia fermentasi tersebut bersifat tentatif.

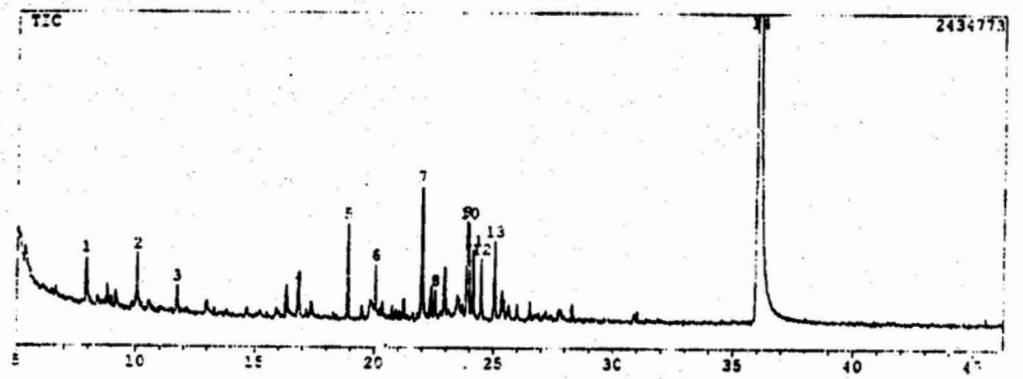
Berdasarkan spektra kromatografi gas (Gambar 2) untuk tempe usia fermentasi 2 hari, paling tidak flavornya tersusun atas 48 komponen volatil dan untuk tempe usia fermentasi 5 hari (Gambar 3) tersusun atas 14 komponen dan tempe usia fermentasi 8 hari (Gambar 4) tersusun atas 6 komponen. Berdasarkan harga T_g (waktu retensi) masing-masing komponen untuk setiap usia fermentasi tempe, terlihat beberapa komponen ditemukan pada usia fermentasi 2 hari,



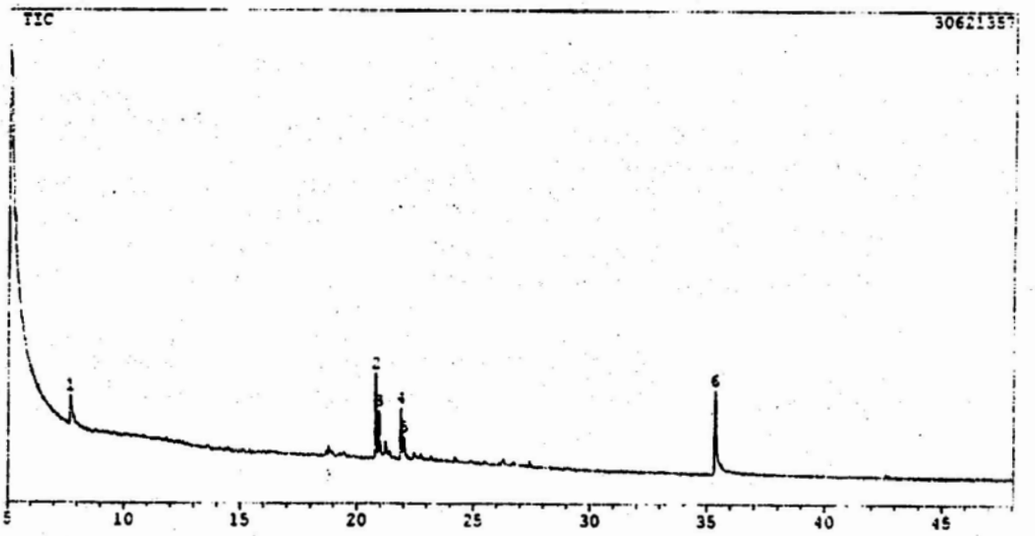
Gambar 1. Peralatan distilasi-ekstraksi cair-cair simultan (DES); (A) desain dari Likens-Nickersons dan (B) hasil modifikasi Muchalal.



Gambar 2. Spetra kromatografi gas untuk flavor tempe usia fermentasi 2 hari.



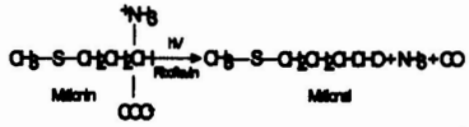
Gambar 3. Spetra kromatografi gas untuk flavor tempe usia fermentasi 5 hari.



Gambar 4. Spektra kromatografi gas untuk flavor tempe usia fermentasi 8 hari.

tetapi tidak ditemukan pada tempe usia fermentasi 5 dan 8 hari, demikian pula sebaliknya. Sebagian komponen terlihat mengalami penurunan persen relatifnya pada tempe usia fermentasi 5 dan 8 hari serta sebagian lainnya ada yang mengalami penambahan. Fakta yang demikian dapat diterangkan sebagai berikut:

1. terjadi reaksi degradasi terhadap senyawa-senyawa yang ada selama tempe dibiarkan hingga 8 hari. Reaksi degradasi ini dapat saja disebabkan oleh enzim-enzim yang dihasilkan oleh *Rhizopus oligosporus* atau kontaminan lainnya. Hasil reaksi degradasi tersebut ditengarai dapat berupa air, gas dan/atau senyawa-senyawa lebih sederhana yang bersifat lebih volatil atau dapat pula bersifat lebih polar. Sebagai indikasi terbentuknya air dan gas sebagai hasil reaksi degradasi yaitu meningkatnya kadar air pada tempe yang mempunyai usia fermentasi 5 dan 8 hari, serta terciumnya bau seperti gas amoniak pada tempe usia fermentasi 8 hari. Terbentuknya senyawa-senyawa lebih sederhana yang mempunyai volatilitas tinggi ditunjukkan oleh meningkatnya bau yang keluar saat proses isolasi berlangsung untuk tempe usia fermentasi 5 dan 8 hari. Adanya senyawa-senyawa sederhana yang mempunyai polaritas tinggi sebagai hasil reaksi degradasi ditunjukkan dengan semakin kuatnya bau air sebagai distilat pada distilasi uap untuk tempe usia fermentasi 5 dan 8 hari. Gas dan senyawa bervolatilitas tinggi yang dihasilkan tidak dapat terisolasi karena sistem pendingin alat distilasi uap-ekstraksi cair-cair simultan yang digunakan kurang efektif, sedangkan senyawa-senyawa sederhana yang polaritasnya tinggi tentu lebih larut di dalam air daripada di dalam benzena. Oleh karena demikian senyawa-senyawa tersebut tidak akan terlihat pada spektra kromatografi gas untuk tempe usia fermentasi 5 dan 8 hari dan menyebabkan jumlah komponen volatil flavor tempe usia fermentasi 5 dan 8 hari terlihat menjadi lebih sedikit bila dibandingkan dengan tempe usia fermentasi 2 hari. Kesimpulan yang demikian beranalogi pada penemuan Ship, dkk (1978) yang menemukan adanya degradasi asam amino dengan bantuan riboflavin dan cahaya pada produk-produk susu. Telah diketahui pula bahwa tempe mengandung riboflavin dan metionin [3, 5] sehingga pada tempe memungkinkan terjadinya tipe reaksi degradasi asam amino.



Skema 1. Reaksi degradasi asam amino yang menghasilkan ammonia

2. terjadinya komponen volatil flavor yang baru pada usia fermentasi 5 hari dikarenakan terjadinya reaksi pada komponen volatil pada tempe usia fermentasi sebelumnya. Indikasi ini diperlihatkan dengan tidak munculnya beberapa komponen volatil tempe usia fermentasi 2 hari pada spektra kromatografi gas tempe usia fermentasi 5 dan 8 hari, yang seiring dengan munculnya puncak yang baru. Keterangan yang sama berlaku pula untuk tempe usia fermentasi 8 hari, dimana terlihat ada beberapa puncak baru yang sebelumnya tidak terlihat pada kromatografi gas tempe usia fermentasi 2 dan 5 hari.
3. Beberapa komponen volatil flavor tempe usia fermentasi 2 hari terlihat bertambah persen relatifnya pada spektra kromatografi gas tempe usia fermentasi 5 dan 8 hari, serta demikian pula untuk beberapa komponen volatil flavor tempe usia fermentasi 5 hari terlihat bertambah persen relatifnya pada spektra kromatografi gas tempe usia fermentasi 8 hari.

Bertambahnya kuantitas persen relatif sebuah komponen volatil flavor mengisyaratkan bahwa reaksi pembentukan senyawa tersebut masih terus berlangsung selama proses penyimpanan.

Berdasarkan hasil analisa GC dan GC-MS diperoleh data sebagaimana yang disajikan pada Tabel 3, 4 dan 5.

Tabel 3. Identifikasi senyawa volatil tempe segar yang diisolasi dengan metode DES.

No puncak	Nama senyawa	Waktu retensi (menit)	Berat molekul	Karakter data MS: *M/z* (intensitas relatif)				
1	α-pinena	13,608	136	93(100)	91(40)	92(37)	41(27)	77(27)
2	nonalal	17,724	142	57(100)	41(88)	43(60)	56(59)	69(27)
3	2,4-dekadienal	21,000	152	81(100)	41(42)	55(21)	67(21)	83(17)
6	*belum diketahui*	21,992	164	164(100)	55(52)	77(40)	149(33)	41(33)
7	*belum diketahui*	22,067	168	41(100)	55(92)	70(81)	57(75)	43(63)
8	*belum diketahui*	22,733	204	162(100)	41(92)	147(69)	55(65)	105(63)
10	*belum diketahui*	23,208	204	41(100)	69(72)	93(68)	91(53)	133(45)
12	*belum diketahui*	24,200	220	57(100)	43(77)	71(35)	41(33)	205(29)
15	5-fenildekana	24,600	218	91(100)	105(38)	147(38)	161(8)	41(6)
18	*belum diketahui*	25,017	222	149(100)	177(25)	65(13)	50(8)	76(8)
23	5-fenilundekana	25,808	232	91(100)	105(15)	147(13)	41(9)	175(8)
24	4-fenilundekana	25,933	232	91(100)	133(24)	119(21)	105(19)	41(11)
29	1,3,3-trimetilonilbenzena	26,633	232	105(100)	57(37)	119(35)	43(33)	135(23)
31	*belum diketahui*	26,900	246	91(100)	105(19)	161(13)	175(9)	119(8)
32	5-fenildodekana	26,917	246	91(100)	105(32)	161(24)	175(20)	246(11)
33	4-fenildodekana	26,975	246	91(100)	147(42)	105(19)	189(18)	246(9)
34	3-fenildodekana	26,992	246	91(100)	147(16)	105(15)	41(9)	189(5)
35	2-fenildodekana	27,092	246	91(100)	135(29)	105(8)	203(6)	246(6)
36	6-feniltridekana	27,367	246	91(100)	119(45)	41(15)	105(11)	246(6)
37	*belum diketahui*	27,808	246	105(100)	91(8)	41(7)	79(6)	246(6)
38	*belum diketahui*	28,008	260	91(100)	105(19)	119(13)	41(11)	161(11)
42	*belum diketahui*	29,358	256	83(100)	57(75)	55(73)	43(72)	73(45)
46	*belum diketahui*	30,167	154	57(100)	97(61)	43(29)	83(17)	69(13)
48	*belum diketahui*	35,583	279	149(100)	167(80)	57(71)	43(67)	71(63)

Tabel 4. Identifikasi senyawa volatil tempe usia fermentasi 5 hari yang diisolasi dgn metode DES.

No puncak	Nama senyawa	Waktu retensi (menit)	Berat molekul	Karakter data MS: *m/z* (intensitas relatif)				
1	*belum diketahui*	7,933	136	93(100)	41(40)	55(37)	93(27)	92(27)
2	*belum diketahui*	10,058	130	57(100)	41(59)	43(52)	56(26)	70(17)
3	*belum diketahui*	11,750	142	43(100)	41(79)	57(68)	65(440)	55(43)
4	*belum diketahui*	16,833	176	134(100)	43(59)	133(560)	77(24)	51(22)
5	*belum diketahui*	18,900	204	41(100)	69(48)	91(39)	79(33)	133(22)
6	*belum diketahui*	20,058	206	1642(100	43(93)	149(41)	91(32)	55(26)
7	*belum diketahui*	22,000	192	)	150(65)	192(15)	93(7)	77(7)
8	4-fenilundekana	22,558	232	43(100)	133(20)	41(20)	119(18)	43(18)
9	6-fenildodekana	23,892	246	91(100)	105(18)	41(18)	42(17)	161(7)
10	5-fenildodekana	23,958	246	91(100)	147(22)	41(19)	105(19)	117(7)
11	4-fenildodekana	24,150	246	91(100)	133(30)	41(15)	105(11)	43(11)
12	3-fenildodekana	24,492	246	91(100)	119(39)	41(22)	43(13)	105(11)
13	2-feniltridekana	25,058	246	91(100)	41(19)	43(13)	91(11)	55(6)
14	*belum diketahui*	36,067	249	105(100) 149(100)	57(67)	41(52)	43(52)	71(35)

Tabel 5. Identifikasi senyawa volatil tempe usia fermentasi 8 hari yang diisolasi dgn metode DES.

No puncak	Nama senyawa	Waktu retensi (menit)	Berat molekul	Karakter data MS: *m/z* (intensitas relatif)				
1	Etenil butanoat	7,733	150	43(100)	71(61)	41(32)	42(27)	55(21)
2	2-metil-3-(1-metiletenil) sikloheksiletanoat	20,817	139	43(100)	93(21)	81(19)	136(19)	121(16)
3	*belum diketahui*	20,958	136	43(100)	93(19)	41(19)	121(16)	81(13)
4	*belum diketahui*	21,900	154	43(100)	41(32)	71(24)	55(21)	84(19)

5	3,7-dimetil-6-oktenil etanoat	22,017	219	43(100)	41(40)	81(35)	69(32)	55(29)
6	*belum diketahui*	35,375	390	149(100)	57(53)	41(36)	167(35)	43(32)

Berdasarkan spektra dari spektroskopi massa, maka senyawa-senyawa komponen penyusun flavor tempe usia fermentasi 2, 5 dan 8 hari dapat dikelompokkan menjadi:

1. senyawa hidrokarbon
2. senyawa terpena
3. senyawa karbonil
4. senyawa ester karbokasilat

Rekapitulasi senyawa volatil yang menjadi komponen flavor tempe untuk usia fermentasi 2, 5 dan 8 hari disajikan pada Tabel 6 di bawah ini.

Sebagian besar komponen volatil flavor tempe usia fermentasi 2 dan 5 hari adalah sama dan merupakan kelompok senyawa hidrokarbon jenuh. Senyawa-senyawa tersebut tidak ditemukan dalam flavor tempe usia fermentasi 8 hari ataupun pada kedelai mentah yang menjadi bahan dasar untuk pembuatan tempe. Kelompok senyawa alkana dan terpena hanya ditemukan pada flavor usia fermentasi 2 hari, dan ditemukan juga pada kedelai mentah. Kelompok senyawa ester karboksilat hanya ditemukan pada flavor tempe usia fermentasi 8 hari, dan tidak ditemukan pada kedelai mentah.

Nonalal mempunyai aroma khas, yaitu seperti aroma gemuk, lemak (*tallowy*) [15] yang ditemukan Persson dan von Sydow (1973) pada flavor daging. Bahkan nonalal juga ditemukan pada buah *bittermelon* [15], dan buah jambu biji [15]. Menurut Belitz dan Grosch (1987), 2,4-dekadineal mempunyai aroma seperti gorengan (*flying odor*), dan selain pada flavor tempe usia fermentasi 2 hari, senyawa ini juga ditemukan pada terasi (Moeljohardjo dalam TNO) dan pada flavor buah jambu biji [15].

α-pinena merupakan senyawa monoterpena yang oleh Belitz dan Grosch (1987) digambar beraroma seperti terpentin. α-pinena ditemukan pada flavor tempe usia fermentasi 2 hari dan tidak ditemukan pada flavor tempe usia fermentasi 5 dan 8 hari.Rao, *et al.*, (1989) menemukan pula di dalam flavor kunyit. Bila dibandingkan dengan senyawa yang menjadi komponen flavor tempe lainnya, terlihat bahwa α-pinena mempunyai waktu retensi yang kecil, yaitu 13,608 menit; dan ini bermakna α-pinena lebih bersifat volatil.

Senyawa-senyawa komponen flavor tempe untuk usia fermentasi 2 hari pada penelitian ini jauh berbeda dengan apa yang ditemukan oleh Moroe, Sato dan Yoshida (1986), Watanabe (dalam BPPT, maupun oleh BPPT. Hanya ada satu senyawa, yaitu kariofilena yang ditemukan BPPT pada tempe usia fermentasi 2 hari, juga ditemukan dalam penelitian ini. Penelitian yang dilakukan ini menghasilkan 9 senyawa alkil benzena sebagai komponen flavor tempe usia fermentasi 2 hari dan senyawa-senyawa tersebut sama sekali tidak ditemukan oleh peneliti-peneliti terdahulu. Hal ini wajar mengingat adanya perbedaan penggunaan pelarut dan metode isolasi. Penelitian sebelumnya menggunakan pelarut dietil eter dan menggunakan metode ekstraksi serta metode headspace.

Tabel 6. Senyawa volatil komponen flavor tempe pada berbagai usia fermentasi.

Komponen flavor	Waktu retensi (r_t)	Usia fermentasi tempe		
		2 hari	5 hari	8 hari
Etenil butanoat	7,733	-	-	+
α-pinena	13,608	+	-	-
nonalal	17,742	+	-	-
2-metil-3-(1-metiletenil) sikloheksiletanoat	20,817	-	-	+
2,4-dekadienal	21,000	+	-	-
3,7-dimetil-6-oktenil etanoat	22,017	-	-	+
1-butilheksilbenzena	24,600	+	-	-
1-butilheptilbenzena	25,808	+	-	-
1-propiloktilbenzena	25,933	+	+	-
1-pentilheptilbenzena	26,917	+	+	-
1-butiloktilbenzena	26,992	+	+	-
1-prorilnonilbenzena	27,092	+	+	-
1-etildekilbenzena	27,367	+	+	-
1-metilundekilbenzena	27,808	+	+	-
1-pentiloktilbenzena	28,008	+	-	-

KESIMPULAN

Bedasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disajikan sebelumnya, maka dapat disusun kesimpulan sebagai berikut:

1. Komponen volatil flavor tempe dari berbagai usia fermentasi dapat diisolasi dengan menggunakan peralatan distilasi-ekstraksi cair-cair simultan hasil modifikasi Muchalal. Meskipun demikian, peralatan tersebut masih mempunyai kelemahan pada sistem pendingin aseton-CO_2 padat dan sistem ekstraksinya.
2. Lamanya waktu proses fermentasi pada pembuatan tempe, menyebabkan terjadi perubahan kuantitas komponen penyusun flavor yang dapat diisolasi dengan menggunakan peralatan DES yang menggunakan pelarut benzena. Ditemukan paling tidak ada 48 komponen folatil di dalam flavor tempe usia fermentasi 2 hari, 14 komponen folatil di dalam flavor tempe usia fermentasi 5 hari dan 6 komponen folatil di dalam flavor tempe usia fermentasi 8 hari.
3. Komponen volatil yang dapat diidentifikasi dengan menggunakan kromatografi gas-spektrometer massa untuk,
   1. flavor tempe usia fermentasi 2 hari, yaitu: α-pinena, nonalal, 2,4-dekadineal, 5-fenildekana, 5-fenilundekana, 4-fenilundekana, 6-fenildodekana, 5-fenildodekana, 4-fenildodekana, 3-fenildodekana, 2-fenildodekana, 6-feniltridekansa dan kariofilena.
   2. flavor tempe usia fermentasi 5 hari, yaitu: 4-fenilundekana, 6-fenildodekana, 5-fenildodekana, 4-fenildodekana, 3-fenildodekana, 2-fenildodekana dan kariofilena.
   3. flavor tempe usia fermentasi 8 hari, yaitu: etenilbutanoat, 2-metil-3-(1-metiletenil)sikloheksiletanoat dan 3,7-dimetil-6-oktenil etanoat.

Berdasarkan kesulitan-kesulitan yang ditemukan dalam melaksanakan penelitian serta pembahasan yang telah disajikan; maka perlu dilakukan:

1. kajian ulang terhadap flavor tempe dari berbagai usia fermentasi dengan menggunakan peralatan DES yang lebih disempurnakan dan dengan menggunakan jenis pelarut ekstraksi yang berbeda, serta menggunakan lebih banyak spektra referensi sebagai pembanding.
2. Kajian terhadap flavor tempe dari berbagai usia fermentasi dengan menggunakan variasi teknik isolasi berbeda dan menggunakan lebih banyak spektra referensi sebagai pembanding.
3. Analisa hasil isolasi dengan menggunakan instrumen lain yang lebih mendukung kerja elusidasi, seperti melakukan pemisahan dengan kolom kromatografi yang dilanjutkan dengan analisa spektroskopi infra merah dan NMR.
4. Kajian yang bersifat kuantitatif untuk masing-masing komponen volatil flavor tempe dari berbagai usia fermentasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan kepada:

1. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan c.q. Direktur Jenderal Perguruan Tinggi yang telah menyediakan dana pada penelitian ini.
2. PT. Unilever divisi Walls Ice Cream Yogyakarta yang telah menyediakan CO_2 padat.

DAFTAR PUSTAKA

1. Fennema, Owen R., *eds.*, 1971, *Flavour Research; Principles and Techniques,* Marcel Dekker, Inc., New York.
2. Heath, Henry, B., Reineccius, Gary., 1986, *Flavour Chemistry and Technology,* AVI Publishing Co., Inc., Wesport, Connecticut.
3. Kasmidjo, R.B., 1990, *Tempe, Mikrobiologi Biokimia Pengolahan serta Pemanfaatannya,* PAU Pangan dan Gizi UGM, Yogyakarta.
4. Kubota, Kikkue, Kobayashi, Akio, 1988, Identification of Unknown Methyl Ketones in Volatile Flavor Components from Cooked Small Shrimp, *J. Agric. Food Chem.,* 36, 121-123.
5. Murata, Kiku, Ikehata, Hideo, Miyamoto, Teijiro, 1967, Studies on the Nutritional Value of Tempeh, *Journal of Food Science,* 32, 580-586.
6. Nout, M.J.R., Rombouts, F.M., Review Recent Developments in Tempe Research, *J. Apll. Bac.*
7. Rao, Alapati Srinivasa, Rajanikant, Bandaru, Seshadri, Ramachandran., 1989, Volatile Aroma Components of *Curcuma amada* Roxb., *J. Agric. Food Chem.,* 37, 740-743.

8. Schieberle, Peter, Grosch, Werner, 1988, Identification of Potent Flavour Compounds Formed in an Aqueous Lemon Oil/Citric Acid Emulsion, *J. Agric. Food Chem.*, 36, 797-800.
9. Sudarmin, 1996, Analisa Senyawa Flavor/Senyawa Residu pada Tempe Selama Penyimpanan, *Laporan Magang Penelitian*, Laboratorium Kimia Organik FMIPA UGM Yogyakarta.
10. Stenkraus, Keith H., 1983, *Handbook of Indigenous Fermented Foods*, Marcel Dekker Inc., New York.
11. Yu, Tung-His, Wu, Chung-May, Liou, Yoh-Cherng, 1989, Volatile Compounds from Garlic, *J. Agric. Food Chem.*, 37, 725-730.
12. Yu, Tung-His, Wu, Chung-May, Chen, Shih-Yuan, 1989, Volatile Compounds from Garlic, *J. Agric. Food Chem.*, 37, 725-730.
13. Wu, Chung-May, *dkk.*, 1987, Volatile Compounds of the Wax Gourd (*Benincasa hispida*, Cogn) and a Wax Gourd Beverage, *Journal of Food Science*, 52, 1, 132-134.
14. Zapsalis, Charles dan Beck, R, R. Anderle, 1985, *Food Chemistry and Nutritional Biochemistry*, John Willey and Sons, New York.
15. Belitz, H,D., Grosch, W., 1987, *Food Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin.
16. Bessiere, Y., Thomas, A.F., *eds.*, 1990, *Flavour Science and Technology*, John Willey & Sons, Chicester.
17. BPPT, 1986, *Tempeh Fermentation*, BPPT, Jakarta.