PENDAHULUAN

LATAR BELAKANG

Vanili adalah tanaman tropis bernilai ekonomi tinggi karena merupakan rempah termahal kedua yang diperdagangkan di dunia internasional. Harga vanili segar rata-rata di pasar dalam negeri dari tahun 1999 sampai 2003 naik turun, dimana pada tahun 2003 harga vanili segar melonjak tajam mencapai Rp.301.330/kg. Sedangkan harga vanili kering pada tahun 2002 cukup tinggi berkisar Rp.2.000.000 hingga Rp.3.000.000/kg (Deptan 2004). Informasi harga terakhir (tahun 2006) yang diperoleh dari para petani di Kuningan dan Sumedang adalah Rp.65.000/kg untuk vanili segar dan Rp.700.000/kg untuk vanili kering.

Berdasarkan data Biro Pusat Statistik (BPS) yang diolah Deptan (2004), sejak tahun 2001 sampai 2003, areal terluas yang digunakan untuk tanaman vanili terdapat di provinsi Sulawesi Utara, Sulawesi Selatan dan Nusa Tenggara Timur, dimana mayoritas berstatus Perkebunan Rakyat (PR). Produksi vanili kering yang mayoritas merupakan PR tersebut mengalami peningkatan, dari 1.791 ton pada tahun 1999 menjadi 1.680 ton tahun 2000, 2.196 ton tahun 2001 dan 2.730 ton tahun 2002.

Sementara itu, ekspor vanili kering dari tahun 1999 sampai tahun 2002 terus meningkat dan berdasarkan data sementara pada tahun 2003 melonjak tajam hingga mencapai 6.363 ton dengan nilai 19.275.000 US$. Meski demikian, nilai ekspor vanili turun naik sesuai dengan harga yang berlaku dipasaran, dipengaruhi oleh ketersediaan barang, besarnya permintaan serta mutu barang. Pada tahun 2003, tiga negara tujuan ekspor terbesar dalam bentuk kering utuh (*whole bean*) adalah Cina, Amerika Serikat dan Jerman. Sedangkan untuk ekspor olahan vanili kering (*other vanilla*) adalah Amerika Serikat, Korea dan Singapura.

Berdasarkan data dari *Trade Centre of the United Nation Conference in Trade and Development/World Trade Organization* (UNCTAD/WTO) (2002), diacu dalam Furth dan Cox (2004), Indonesia termasuk negara terbesar disamping Madagaskar dan Uganda yang memproduksi dan mengekspor vanili sehingga memenuhi kebutuhan pasar dunia. Walaupun demikian, Indonesia masih mengimpor vanili dalam bentuk kering utuh dan olahan vanili kering berupa ekstrak vanili, oleoresin, bubuk dan lain-lain, yang digunakan untuk memenuhi

kebutuhan dalam negeri dan sebagian lainnya diekspor kembali. Hingga saat ini, Indonesia belum mampu memproduksi bentuk olahan vanili kering secara maksimal sehingga permintaan dalam negeri terhadap produk-produk tersebut masih tergantung pada negara pengimpor seperti Korea, Amerika Serikat dan Papua New Giunea. Hal ini kemungkinan besar disebabkan vanili kering di Indonesia masih memiliki kualitas rendah dibanding potensi sebenarnya akibat pemanenan buah belum cukup tua serta proses kuring yang kurang sempurna. Diketahui bahwa vanili kering Indonesia memiliki flavor *woody* dan *burn* sehingga kualitas ekstrak vanili alami pun menjadi rendah (Zahorik, 2006).

Ekstrak vanili merupakan salah satu bentuk vanili olahan yang lebih mudah dan luas penggunaannya. Ekstrak vanili digunakan di seluruh dunia sebagai *flavouring agent dessert*, *like baked goods*, es krim, minuman dan *custard*. Selain itu ekstrak vanili digunakan oleh industri selain pangan seperti parfum, obat-obatan dan kosmetik (de Guzman dan Siemonsma 1999).

Permintaan yang tinggi akan ekstrak vanili menyebabkan diproduksinya vanilin sintetik yang berasal dari eugenol (minyak cengkeh), lignin (limbah bubur kertas) dan guaiakol (petrokimia). Meskipun ekstrak vanili alami masih digunakan oleh industri pangan, namun jumlahnya kurang dari 1% produksi vanilin. Sisanya sebesar 99% diperoleh melalui jalur sintetik. Hal ini disebabkan harga ekstrak vanili alami lebih mahal (sekitar 2.75 US$/oz *single fold*), akibat metode penyerbukan yang digunakan adalah penyerbukan menggunakan tangan, waktu antara penyerbukan dan pemanenan yang panjang, serta proses kuring dan metode ekstraksi yang lama juga kompleks (http://www.uyseg.org/greener_industry/pages/vanilin/1Vanilin_AP.htm 2005). Akan tetapi, akhir-akhir ini terjadi kecenderungan dimana konsumen lebih menyukai ekstrak vanili alami dengan alasan flavor yang lebih kaya dan sempurna karena adanya p-hidroksi benzaldehid dan p-hidroksi benzil metil eter serta 130 komponen lainnya, disamping vanilin sebagai komponen utama (98%) (http://www.ang.kfunigraz.ac.at/~katzer/engl/Vani_pla.html 2005). Senyawa-senyawa inilah yang mendukung terbentuknya flavor alami lembut, yang tidak dimiliki vanilin sintetik dengan flavornya yang *heavy*, *grassy odor* dan *bitter aftertaste* (Reineciuss 1994).

Pada level industri, ekstrak vanili alami diproses dengan metode konvensional (maserasi atau perkolasi) selama sekitar 1 bulan menggunakan buah yang telah melalui proses kuring karena buah vanili segar tidak memiliki aroma. Proses kuring dimulai 1 minggu setelah panen yang terdiri dari *killing*, *sweating* (*fermenting*), *drying* dan *conditioning*. Seluruh proses ini memakan waktu kurang lebih 5 bulan hingga dihasilkan vanili kering (*cured vanilla*) (Deptan 2004). Proses fermentasi yang panjang merubah beberapa glukosida menjadi glukosa, vanilin dan kompleks flavor lainnya. Glukosida dengan jumlah tertinggi adalah glukovanilin yang menghasilkan vanilin oleh aktifitas enzim β-glukosidase.

Berdasarkan hal-hal yang disebutkan di atas, penelitian ini dilakukan sebagai upaya pengembangan metode ekstraksi secara enzimatik langsung dari buah vanili segar, untuk mereduksi biaya karena harga vanili segar dan biaya produksi lebih murah serta untuk mereduksi waktu karena glukovanilin dapat langsung diekstrak dari buah vanili segar dan secara bersamaan ditransformasi menjadi vanilin oleh kombinasi enzim yang berhubungan dengan degradasi dinding sel (selulase dan pektinase komersial) dan hidrolisis glukovanilin (β-glukosidase komersial). Selain itu, kadar vanilin yang dihasilkan pun bisa lebih tinggi dibanding ekstrak vanili kering akibat digunakannya β-glukosidase komersial serta metode persiapan sampel buah vanili segar dengan cara pengeringan beku dilanjutkan dengan penggilingan menyebabkan interaksi enzim dengan substrat lebih optimum.

PERUMUSAN MASALAH

Ekstrak vanili alami yang selama ini diproduksi pada umumnya menggunakan buah vanili kering yang telah mengalami proses kuring dengan metode ekstraksi vanili secara maserasi atau perkolasi selama kurang lebih 1 bulan. Proses kuring sendiri membutuhkan waktu sekitar 5 bulan, yang terdiri dari *killing*, *sweating* (*fermenting*), *drying* dan *conditioning*. Selama kuring terjadi berbagai aktifitas enzim alami dalam buah vanili yang meliputi degradasi dinding sel serta pembentukan flavor vanilin dari glukovanilin oleh aktifitas enzim β-glukosidase. Proses kuring dan ekstraksi vanili yang kompleks dan panjang menyebabkan harga ekstrak vanili alami begitu mahal. Sebagai alternatif pemecahan masalah ini, maka dilakukan pengembangan metode ekstraksi secara

enzimatik (menggunakan enzim-enzim hidrolitik komersial) terhadap buah vanili segar yang telah mengalami persiapan sampel dengan cara pengeringan beku dilanjutkan dengan penggilingan.

Masalah yang diteliti adalah pengaruh penggunaan enzim selulase, pektinase dan β-glukosidase komersial serta pelarut yakni air dan atau etanol, serta efek sinergisme ketiga enzim komersial tersebut terhadap kadar vanilin dan glukosa yang dihasilkan dalam ekstrak vanili dari buah vanili segar. Disamping itu, penentuan konsentrasi, waktu dan suhu inkubasi enzim yang diperlukan hingga kadar vanilin bebas dalam ekstrak mencapai batas optimum, merupakan tahapan-tahapan kritis yang harus diketahui dalam pengembangan metode ekstraksi enzimatik.

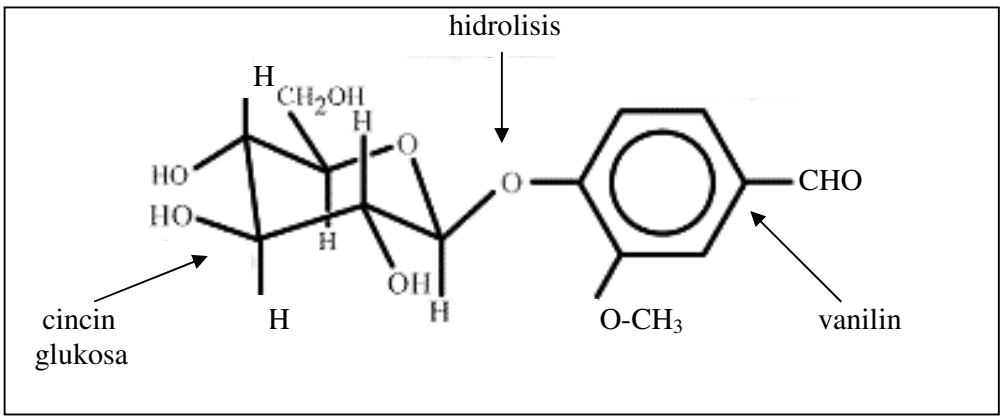
KERANGKA PEMIKIRAN

Pada level industri, ekstrak vanili alami umumnya diproses menggunakan buah vanili kering yang telah melalui proses kuring karena buah vanili segar tidak memiliki aroma. Proses kuring dapat dilakukan dengan beberapa cara, tapi pada prinsipnya metode kuring yang dilakukan di Indonesia tidak jauh berbeda dengan metode kuring klasik yang dilakukan di negara-negara lainnya seperti Madagaskar dan Meksiko. Tahap pertama adalah *killing* dengan mencelupkan vanili segar ke dalam air panas 65^0C selama 2-3 menit. Setelah itu dilakukan pemeraman (*sweating* atau *fermenting*) selama 48 jam agar terjadi reaksi enzimatik dalam buah untuk pembentukan aroma, dimana pada tahap ini β-glukosidase mengubah glukovanilin menjadi vanilin dan glukosa. Tempat fermentasi terbuat dari peti kayu yang dilapisi serbuk gergaji atau *styrofoam* untuk mempertahankan suhu 38-40^0C. Tahap selanjutnya adalah pengeringan (*drying*) dengan sinar matahari selama 10-20 hari dari jam 8.00-10.00, lalu dibungkus kain hitam dan dijemur kembali jam 14.00-15.00 dan dibungkus lagi pada malam harinya. Setelah itu dilakukan pengeringan lambat dengan suhu 28-29^0C dan kelembaban 80% selama 30-35 hari. Tahap terakhir adalah pemantapan aroma (*conditioning*) dengan menyimpan vanili di dalam kotak kering selama 2-3 bulan (Deptan 2004).

Buah vanili segar tidak memiliki aroma karena vanilin yang merupakan komponen flavor utama masih terikat sebagai glukosida dan harus dibebaskan

melalui reaksi enzimatik. Goris (1947), diacu dalam Purseglove *et al.* (1981), menemukan bahwa vanili segar mengandung paling sedikit 4 glukosida yang menghasilkan vanilin dan komponen flavor lainnya. Glukosida dengan jumlah tertinggi adalah glukovanilin. Selanjutnya glukovanililalkohol ditemukan dalam jumlah yang lebih sedikit, diikuti oleh glukosida dari asam protokatekuat (asam 3,4-dihidroksi benzoat).

Adanya enzim hidrolitik yang dapat memecah glukovanilin menjadi vanilin pertama kali dicatat oleh Lecompt tahun 1913 yang didukung oleh Arana tahun 1943 yang menyatakan itu sebagai β-glukosidase. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa prekursor flavor terutama terakumulasi dalam jaringan plasenta di sekeliling biji, dimana biji dan dinding buah bagian luar tidak mengandung glukovanilin (Havkin-Frenkel *et al.* 2004; Kuras *et al.* 1999, diacu dalam Odoux *et al.* 2003; Odoux *et al.* 2003). Aktifitas enzim β-glukosidase sendiri beberapa kali lebih tinggi dalam dinding buah bagian luar dari pada dalam jaringan plasenta dan *glandular* sel rambut (Havkin-Frenkel *et al.* 2004). Bahkan Arana (1943) diacu dalam Odoux *et al.* (2003), menyatakan bahwa β-glukosidase terdapat dalam dinding buah bagian luar, sedangkan jaringan plasenta sama sekali tidak mengandung aktifitas β-glukosidase. Artinya bahwa enzim dan substrat terdapat dalam lokasi yang berbeda dalam buah, sehingga proses kuring berfungsi memicu terjadinya difusi glukovanilin dari bagian pusat ke permukaan buah. Di sisi lain, menurut Odoux *et al.* (2003), β-glukosidase terutama berlokasi dalam lamina plasenta dan dengan jumlah yang lebih sedikit terdapat dalam papila. Enzim dan substrat terdapat dalam jaringan yang sama, meskipun mungkin terdapat dalam 2 bagian berbeda di dalam sel (sitoplasma dan atau periplasma untuk β-glukosidase dan vakuola untuk glukovanilin). Hal inilah yang menyebabkan mengapa kuring perlu dilakukan. Hidrolisis glukovanilin yang terjadi pada tahap pematangan lambat ketika buah menjadi hitam dan pada tahap awal kuring, dapat disebabkan adanya perubahan tonoplas sehingga membran sitoplasma dan dinding sel bersatu. Pada Gambar 1 ditunjukkan reaksi hidrolisis yang terjadi pada glukovanilin oleh β-glukosidase (http://www.uyseg.org/greener_industry/ pages/vanilin/1Vanilin_AP.htm 2005).



Gambar 1 Reaksi hidrolisis glukovanilin oleh enzim β-glukosidase

Metode ekstraksi menggunakan buah vanili kering telah banyak dikembangkan. Dua metode yang paling banyak digunakan adalah metode maserasi dan perkolasi. Cowley (1973), menggunakan metode perkolasi menggunakan buah vanili kering yang diawali dengan pemotongan buah vanili dan pencampuran gula untuk meningkatkan viskositas, membantu memperkuat dan menahan senyawa aromatik, meningkatkan warna serta memperpanjang umur simpan. Selanjutnya dilakukan perkolasi (sirkulasi) menggunakan campuran etanol dan air selama 3 sampai 4 minggu. Kemudian dilakukan *aging*, sentrifugasi dan filtrasi hingga diperoleh ekstrak vanili. Metode yang lebih modern adalah maserasi yakni dengan menempatkan buah vanili kering dalam maserator yang dilengkapi pengaduk selama 1 sampai 3 bulan dengan penambahan etanol 60% (Purseglove *et al.* 1981).

Disisi lain, penggunaan buah vanili segar sebagai bahan baku pembuatan ekstrak sebenarnya telah dilakukan oleh industri-industri besar, meski waktu yang diperlukan untuk ekstraksi tersebut relatif lebih lama dibanding ekstrak buah vanili kering. Tahapannya terdiri dari seleksi buah, pencucian, pengepresan, ekstraksi, pemurnian, pencampuran (alkohol dan air) serta pengemasan ekstrak (http://www.hyperdictionary.com 2004). Disamping itu terdapat 2 metode pembuatan ekstrak vanili komersial yang direkomendasikan oleh industri (http://www.uyseg.org/greener_industry/pages/vanilin/1Vanilin_AP.htm 2005) yakni maserasi dan perkolasi. Pada ekstraksi maserasi, vanili segar dipotong 1-2 cm dan direndam dalam alkohol 50% selama 1 tahun. Selanjutnya proses *aging* dilakukan sampai 6 bulan sebelum ekstrak siap digunakan. Sedangkan pada

metode perkolasi, vanili segar yang telah dipotong diletakkan diatas alas berlubang, kemudian direndam dengan alkohol 60%, dimana larutan alkohol tersebut disirkulasi dan suhu dipertahankan 38-49^{0}C. Proses ekstraksi ini berlangsung selama 2 minggu, lalu dilakukan *aging* selama 3-6 bulan.

Perkembangan selanjutnya dalam ekstraksi vanili segar adalah dengan menambahkan enzim komersial. Sreenath *et al.* (1994), menunjukkan bahwa penambahan enzim selulase, pektinase atau kombinasi keduanya menghasilkan nilai perolehan kembali (*recovery*) 81-86%. Nilai perolehan kembali ini lebih tinggi dibanding sampel yang tidak mengalami perlakuan enzim yakni sebesar 72%. Penemuan mengenai ekstraksi vanili segar menggunakan enzim kemudian dipatenkan oleh Brunerie (1998) (U.S. patent 5705205). Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa penggunaan enzim pektinase dan hemiselulase dalam ekstraksi vanili segar diikuti penambahan etanol 50%v/v mampu menghasilkan kadar vanilin lebih tinggi dibanding ekstraksi tanpa penambahan enzim. Selanjutnya Ruiz-Teran *et al.* (2001), melaporkan bahwa ekstraksi vanili segar dalam 2 tahap reaksi enzimatik menggunakan *Viscozyme* lalu *Celluclast* yang mengandung aktifitas pektinase dan selulase, diikuti penambahan etanol 47,5%v/v menghasilkan kadar vanilin ekstrak 3.13 kali lebih tinggi dibanding ekstrak vanili kering metode Soxhlet. Selain itu, Waliszewski *et al.* (2003), merekomendasikan penelitiannya yang menggunakan enzim komersial *Crystalzyme PML-MX* (*Valley Reserarch Inc*), *Novozym 342* (*Novo Nordisk*) dan *Zymafilt L-300* (*Enmex*) dengan aktifitas selulosik tinggi di dalam etanol konsentrasi 5-12%, diikuti dengan ekstraksi vanilin dengan etanol 60%v/v. Hasilnya menunjukkan bahwa konsentrasi vanilin ekstrak buah vanili segar dengan *Novozym*, *Crystalzyme* dan *Zymafilt* adalah lebih tinggi dibanding ekstraksi tanpa penambahan enzim.

Berdasarkan uraian diatas, diketahui bahwa penggunaan metode ekstraksi vanili secara enzimatik dari buah vanili segar memiliki prospek yang cukup baik terutama karena perolehan kembali vanilin yang dihasilkan jauh lebih tinggi dalam waktu relatif singkat. Dengan kata lain, penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode ekstraksi vanili dalam rangka mengatasi keterbatasan metode ekstraksi kovensional yang begitu kompleks dan panjang. Enzim yang digunakan dalam penelitian ini adalah enzim selulase dan pektinase komersial

yang mampu mendegradasi dinding sel serta β-glukosidase komersial yang dapat menghidrolisis glukovanilin. Disamping itu, dilakukan metode persiapan sampel buah vanili segar dengan cara pengeringan beku dilanjutkan dengan penggilingan sehingga luas permukaan bahan lebih besar yang menyebabkan interaksi enzim dengan substrat lebih optimum. Hal ini berbeda dengan penelitian ekstraksi enzimatik buah vanili segar lainnya, yang pada umumnya menggunakan buah vanili segar utuh dengan suhu penyimpanan 4^0C sebelum percobaan dilakukan.

TUJUAN PENELITIAN

Tujuan Umum

Tujuan penelitian ini secara umum adalah untuk mendapatkan metode ekstraksi vanili secara enzimatik dari buah vanili segar.

Tujuan Khusus

Tujuan yang lebih khusus dari penelitian ini antara lain:

1. Mengetahui karakteristik kimia buah vanili segar dan kering.
2. Menentukan suhu inkubasi optimum enzim β-glukosidase.
3. Menentukan pengaruh penggunaan enzim selulase, pektinase dan β-glukosidase komersial secara tunggal maupun kombinasi serta penggunaan pelarut air dan atau etanol terhadap kadar vanilin dan glukosa dalam ekstrak vanili dari buah vanili segar.
4. Menentukan konsentrasi optimum enzim terpilih yang terbaik.
5. Menentukan waktu inkubasi optimum enzim terpilih yang terbaik.
6. Mengetahui karakteristik kimia ekstrak vanili segar.

HIPOTESIS

Hipotesis dari penelitian ini adalah penambahan enzim selulase, pektinase dan β-glukosidase komersial secara tunggal maupun kombinasi serta penambahan pelarut air dan atau etanol akan berpengaruh terhadap kadar vanilin dan glukosa ekstrak vanili segar. Ekstrak vanili segar yang diperoleh melalui optimasi metode ekstraksi enzimatik memiliki kadar vanilin dan glukosa yang lebih tinggi dibanding ekstrak buah vanili segar dan vanili kering sebagai kontrol tanpa penambahan enzim komersial.

MANFAAT PENELITIAN

Penelitian ini diharapkan dapat berguna bagi:

1. Industri flavor agar mendapatkan ekstrak vanili alami dengan kadar vanilin tinggi dan waktu ekstraksi yang singkat.
2. Pengembangan diversifikasi hasil olahan vanili disamping ekstrak, seperti *vanilla flavouring*, *vanilla tincture*, *vanilla ole*oresin, *vanilla-vanilin extract and flavoring*, *solvent-extracted product for perfume*, *perfumery vanilla tincture*, *vanilla absolute* dan lain-lain.