

## ***Enzymes as Potencial Source for Clean Label Bakery Product: Part 1, Mechanism and Application Single Enzyme***

Evita Riviani Achmadi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Alumni Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora No. 1, Bulaksumur, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281

\* email korespondensi : [evita.achmadi@gmail.com](mailto:evita.achmadi@gmail.com)

**Background:** Increased public awareness of consuming healthy food has driven bakery industry to applied production methods and components of food products that are tailored to the market needs. Food product can be positioned as natural, organic, or free from additives/ preservatives which often referred to clean label trend. Bakery industry commonly using chemical emulsifier as component which improve characteristic and quality baked goods. Usage of chemical component is not appropriate with perception of clean label, although it is not yet clear what a clean label exactly means. Chemical emulsifier has potentially negative effect to health such as intestinal inflammation, obesity, metabolic syndrome and glucose resistance based on several research. Food enzyme can be alternative to replace chemical emulsifier and potentially source of clean label bakery product. Therefore, sustainable study was needed to find role single enzyme as food additive and processing aid in bakery product application.

**Scope and approach:** *This review explain about the role single enzyme application in bakery product which discuss under three main headings include (i) enzyme as food additive and processing aid, ii) Characteristic enzyme to improve bakery product processing (dough mixing, fermentation, baking), sensories properties and appearance iii) Enzyme mechanism and application to enhance bakery product quality. Optimization of the role and function of enzymes can be conduct by enzyme quality validation through baking tests including formulation development, process parameters (dough rheology, handling machine and baking parameter), product appearance and sensory characteristics.*

**Key findings and conclusion:** Food enzymes play a role in enzymatic modifications as biodegradable proteins which not affected to nutritional value baked goods. Enzyme technology is a clean process with low energy consumption, low waste production, safe and less toxic working environment. Therefore, enzyme has potential to fulfill clean label trends and encourage researchers and developers in food industry to explore potential use of food enzymes in bakery products. Enzymes which usually used in bakery come from hydrolase class (amylase, protease, hemicellulase, lipase, xylanase and asparaginase), oxidoreductase class (lipoxygenase and glucose oxidase) and transferase class (transglutaminase). Application enzymes in bakery processs have their respective roles according to enzymes specific characteristics. Enzymes has the main role such as improve rheological and functional properties of dough according to baked goods type, enhance quality and characteristics baked goods including volume, crumb texture, color, taste and extend shelf life (antistaling). Sustainable research and development was needed to optimize the role of enzyme in baked goods by several approach such as (i) incorporation enzymes with other ingredients in the food matrix, (ii) parameters which affect to the work of enzymes in food systems (iii) potential of enzyme combinations to improve baked goods quality and (iv) understanding of usage regulation enzymes as food additives and food processing.

**Keyword:** enzyme, clean label, food additive, processing aid, bakery product

## I. PENDAHULUAN

Produk bakeri mengalami perkembangan signifikan secara global maupun nasional didorong dengan peningkatan konsumsi sesuai dengan data penjualan produk bakeri di pasaran. Pasar bakeri secara global diestimasikan 2.89 miliar USD pada 2019 dan diprediksi mencapai USD 4.36 miliar pada 2030 dengan CAGR (*Compound Annual Growth Rate*) 3.8% dari 2020-2030. Produk bakeri meliputi cake, *pastry*, biskuit, roti, sereal dan produk bakeri sesuai permintaan konsumen berpengaruh besar terhadap pola hidup masyarakat (Nextmsc, 2022). Pemenuhan permintaan konsumen harus disesuaikan dengan preferensi gaya hidup masa kini. Gaya hidup yang dinamis memerlukan ketersediaan produk bakeri yang baru diproduksi (*fresh*), sehingga perlu diperhatikan cara yang efektif dan efisien untuk mempertahankan masa simpan produk. Selain itu, perlu juga dipertimbangkan kriteria sensoris berupa tekstur, rasa dan penampakan yang disukai oleh konsumen. Kriteria tersebut dapat terpenuhi jika setiap tahapan proses produksi diperhatikan mulai dari pemilihan bahan mentah, pengembangan formulasi, monitoring parameter proses baking sampai pada produk jadi.

Salah satu alternatif untuk mempertahankan masa simpan dan meningkatkan kualitas produk bakeri adalah dengan penggunaan enzim sebagai *food additive* dan *processing aid*. *Code of Federal Regulations* (CFR) Title 21 membahas pengertian bahan tambahan makanan yang mencakup semua zat, yang tidak dikecualikan oleh pasal 201 dari undang-undang, dengan tujuan penggunaan yang mengakibatkan atau mungkin secara wajar diharapkan mengakibatkan, secara langsung atau tidak langsung, baik sebagai komponen makanan atau mempengaruhi karakteristik makanan. Kata "langsung" yang digunakan dalam definisi ini mengacu pada zat yang sengaja ditambahkan ke dalam makanan untuk tujuan tertentu. Yang dimaksud dengan "tidak langsung" adalah zat-zat yang dengan sengaja ditambahkan ke dalam bahan yang bersentuhan dengan pangan dan akibatnya menimbulkan perpindahan yang tidak disengaja ke dalam pangan (Kocabas dan Grumet, 2019). *Processing aid* adalah zat yang membantu aspek teknis pada produksi makanan dalam proses manufaktur. *Codex Alimentarius Commission* memberikan pendekatan empat poin untuk menentukan zat yang memenuhi syarat sebagai *processing aid*, dengan kriteria utama bahwa zat tersebut "memenuhi tujuan teknologi tertentu selama perlakuan atau pemrosesan. *Processing aid* umumnya tidak wajib dicantumkan pada label kemasan makanan, meskipun penggunaannya mengandung prioritas alergen atau berasal dari hewan yang memerlukan pelabelan yang tepat. Pelabelan tersebut untuk menghindari konsumsi yang tidak disengaja oleh individu dengan pembatasan diet zat tersebut (Redan, 2020).

Metode penggunaan enzim berkaitan dengan penentuan jenis, mekanisme kerja enzim dan regulasi. Dengan demikian, pengetahuan terkait integrasi enzim dengan proses pengolahan produk bakeri yang termasuk didalamnya roti, biskuit, *pastry*, kukis, krekers, pie dan yang lainnya sangat diperlukan. Integrasi enzim dan proses pengolahan berkaitan dengan inovasi peneliti dan pengembang pada penggunaan enzim sebagai alternatif pengganti emulsifier dari bahan kimia. Substitusi tersebut dapat memberikan nilai tambah pada produk bakeri sebagai bahan pangan *clean label*. Latar belakang penggunaan enzim sebagai pengganti emulsifier kimia dapat dijelaskan melalui beberapa pendekatan sebagai berikut: a) penggunaan emulsifier kimia pada produk bakeri berpotensi negatif bagi kesehatan b) tren konsumsi *clean label* pada produk bakeri c) enzim sebagai alternatif pengganti emulsifier kimia pada tren pangan *clean label*.

### a. Penggunaan emulsifier kimia pada produk bakeri berpotensi negatif bagi kesehatan

Peningkatan kualitas produk bakeri dapat dilakukan dengan penambahan emulsifier. Emulsifier yang biasanya ditambahkan pada roti yaitu *Mono- and diglycerides of fatty acids*

(*glyceryl monostearate*, *glyceryl distearate*), *diacetyl tartaric acid ester of mono- and diglycerides* (DATEM), *Sodium stearoyl-2-lactylate*. Emulsifier tersebut termasuk dalam jenis emulsifier sintesis/kimia yang berfungsi meningkatkan volume dan memperbaiki tekstur roti. Meskipun memiliki manfaat pada kualitas hasil akhir roti, akan tetapi terdapat potensi yang beresiko pada kesehatan jika dikonsumsi tidak sesuai dengan aturan ADI (*Acceptable Daily Intake*). Berdasarkan beberapa hasil penelitian, emulsifier kimia termasuk dalam bahan tambahan makanan yang menyebabkan peradangan akut meliputi peradangan usus, obesitas yang berkaitan dengan sindrom metabolis dan resistensi glukosa (Aponso et al, 2017; Chassaing et al, 2017; Csaki dan Sebestyen, 2019; Halmos et al, 2018, Laster et al, 2019; Partridge et al, 2019; Cox et al, 2020). Penelitian menggunakan uji in vitro untuk mengetahui efek dari beberapa jenis emulsifier terhadap tikus percobaan telah dilakukan. Penambahan emulsifier pada makanan memicu translokasi bakteri yang memungkinkan bakteri melintasi sel epitel. Hal ini menimbulkan penyakit karena bakteri mampu mengubah cairan lendir usus dimana bakteri bertransisi ke daerah ini yang seharusnya bebas bakteri (Aponso et al, 2017). Efek emulsifier sebagai pengental pada membran sel bakteri atau ketersediaan grup nutrisi tertentu akan mengubah sifat patogen pada bakteri tertentu dan atau mengubah struktur komposisi mikrobial. Metabolisme dari grup polar emulsifier juga dapat memicu penyerapan molekul patogen pada mukosa (Halmos et al, 2018).

Berkaitan dengan hasil penelitian tersebut, *European Food Safety Authority (EFSA)* melakukan evaluasi kembali pada emulsifier sebagai bahan tambahan pangan. Pada tahun 2014, *Emerging Risks Exchange Network* dari EFSA mempertimbangkan pengaruh emulsifier pangan terhadap dinding pemisah usus untuk dikaji kembali melalui kajian ilmiah. Jenis – jenis emulsifier yang diutamakan untuk dikaji kembali antara lain emulsifier yang ditambahkan pada pangan dan sering dikonsumsi pada produk roti. Emulsifier tersebut antara lain *sodium stearoyl-2-lactylate*, DATEM, *mono-* dan *diglycerides of fatty acids*, aplikasi pada formula untuk bayi (CITREM, *sucrose esters of fatty acids*, *mono-* dan *diglycerides of fatty acids*) dan emulsifier yang memiliki nilai *hydrophilic–lipophilic balance* (HLB) yang tinggi. Sebagian besar studi toksikologi menggunakan emulsifier pada hewan dan terbatas pada manusia. Oleh karena itu, perlu menetapkan pengemulsi mana yang paling mungkin menyebabkan efek kesehatan yang merugikan dengan paparan kronis pada individu yang melebihi ADI. Hal ini membutuhkan penyelidikan lebih lanjut melalui uji coba terkontrol yang dijalankan dengan tenaga yang memadai (Csaki dan Sebestyen, 2019; Cox et al, 2020)

b. Tren konsumsi pangan *clean label*

Keraguan konsumen terhadap bahan tambahan makanan (*E-number*) memunculkan pergeseran preferensi ke arah pangan '*clean label*'. Preferensi *clean label* mengikuti gaya hidup konsumen yang mengarah ke pangan sehat. Saat ini, belum ada definisi tetap pada regulasi *clean label* yang disarankan oleh *Food and Drug Administration (FDA)*. Maka dari itu, perusahaan pangan harus menggunakan referensi permintaan konsumen dan tren pasar untuk menentukan apakah produk tersebut memenuhi ekspektasi definisi *clean label* (Simsek, 2020).

Definisi *clean label* dapat diartikan secara luas melalui evaluasi konsumen terhadap *cleanliness* produk dengan asumsi dan interferensi pada label bagian depan dan belakang kemasan. Pertimbangan konsumen terhadap kesehatan merupakan faktor utama pada evaluasi tersebut. Keberagaman faktor pendorong mampu mempengaruhi tren *clean label* yang berkaitan dengan karakteristik produk intrinsik atau ekstrinsik dan faktor sosial budaya. Produsen makanan harus mempertimbangkan keberagaman faktor dalam memberikan informasi dan mengembangkan produk baru. Pembuat kebijakan diharapkan mengkaji pemahaman dan penerapan keseragaman definisi *clean label* dan mengidentifikasi peraturan untuk menentukan status produk makanan 'bebas dari aditif/bahan buatan'. Hal tersebut bertujuan

untuk menghindari kesalahpahaman konsumen terhadap produk makanan *clean label* (Asioli et al, 2017)

Definisi *clean label* saat ini dapat dijadikan tolak ukur untuk meningkatkan pemahaman konsumen, produsen dan pembuat kebijakan. *Clean label* merupakan pangan yang berasal dari bahan alami, organik dan bebas dari aditif atau pengawet sehingga dianggap produk unggulan oleh konsumen (Garvey et al, 2020). *Clean label* mengindikasikan produk dengan sedikit proses pengolahan dan tidak mengandung ingredien yang memberikan persepsi negatif pada konsumen. Ingredien yang menimbulkan persepsi negatif bagi konsumen meliputi ingredien yang mengandung alergen, aditif, dan kimia (Aschemann-Witzel et al, 2019). Beberapa konsumen memahami *clean label* sebagai produk yang mengandung sedikit sampai tidak mengandung ingredien yang diproses, perisa buatan, pewarna, aditif sintetis dan alergen yang tidak diharapkan (Nascimento et al, 2018).

c. Enzim sebagai alternatif pengganti emulsifier kimia pada tren pangan *clean label*

Pada pengolahan roti, terdapat beberapa jenis emulsifier dalam bentuk '*dough improver*' yang ditambahkan untuk meningkatkan toleransi *mixing*, stabilitas adonan, dan parameter lain. Beberapa konsumen menghindari ingredien tersebut dan dianggap tidak cocok dengan konsep formulasi *clean label*. Rahman dan Simsek, 2020; Simsek, 2020; Rahman et al, 2022 melakukan penelitian substitusi bahan tambahan kimia pada adonan berupa *potassium bromate* (PB), *azodicarbonamide* (ADA), *ascorbic acid* (AA), *sodium stearyl lactylate* (SSL), *calcium stearyl lactylate* (CSL), *diacetyl tartaric acid esters of mono- and diglycerides* (DATEM), dan *ethoxylated mono- and diglycerides* (EMG) dengan pencampuran tepung terigu. Campuran tepung terigu berasal dari gandum Hard Red Spring dan Hard Red Winter yang menghasilkan kualitas baking dan adonan yang lebih baik dibandingkan dengan penggunaan *dough improver* kimia. Hal ini membuktikan bahwa pengembangan formulasi sangat diperlukan untuk menemukan alternatif pengganti bahan tambahan kimia pada emulsifier dalam bentuk *dough improver*.

Optimasi potensi enzim merupakan salah satu alternatif penggunaan bahan kimia dan pengawet untuk meningkatkan kualitas produk bakeri terutama roti. Pada umumnya roti dibuat dengan kombinasi terigu, yeast, gula, garam, lemak dan air dengan tambahan komponen ingredien lainnya seperti dadih, susu skim, air limau, *whey*, glukosa cair atau gula, pati, madu, margarin/minyak/mentega/campurannya dan konsentrat protein. Penambahan komponen ingredien tersebut disesuaikan dengan jenis roti yang akan dibuat dan diikuti tahapan pengolahan selanjutnya yaitu *mixing*/pembentukan adonan, fermentasi dan *baking*. Tahapan *mixing* sangat menentukan kualitas roti yang dihasilkan terutama tekstur dan *mouthfeel* roti. *Mixing* dilakukan untuk mendapatkan konsistensi adonan yang tepat disesuaikan dengan jenis roti yang akan dibuat. Aplikasi enzim merupakan salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk mengatur konsistensi adonan agar sesuai dengan harapan. Enzim berfungsi memodifikasi sifat viskoelastis dan struktur adonan sehingga mendapatkan roti dengan kualitas yang baik (Dahiya et al, 2020)

Tahap awal pembuatan roti dimulai dengan pemilihan terigu sebagai bahan dasar dan dicampur dengan campuran enzim, polisakarida pati dan non pati, lemak dan gluten. Pati merupakan komponen pada produk bakeri yang berfungsi sebagai stabiliser emulsi, pengental, pengikat air, agen pembentuk gel dan pengganti fat. Selain pati, lemak dan *arabinoxylans* juga terdapat pada terigu dan berperan pada sifat reologi adonan. *Dough improver* yang sering dikenal dengan *bread improvers* digunakan pada pembuatan roti tidak hanya untuk meningkatkan sifat dan penanganan adonan, pembentukan dan penahanan gas, namun juga meningkatkan beberapa karakteristik roti seperti tekstur, struktur remah, volume, warna dan kualitas iris. *Dough improver* dari enzim lebih dipilih dibandingkan kimia, selain itu *dough improver* dari enzim memiliki fungsi yang sama dengan kimia.

Enzim yang digunakan pada *dough improver* tidak aktif pada produk akhir karena mengalami denaturasi selama proses *baking*. Enzim dikategorikan sebagai *processing aid* dan tidak perlu ditambahkan pada list ingredien di label produk. Sebagian besar enzim yang digunakan pada proses *baking* diperoleh dari fermentasi menggunakan bakteri atau jamur. Berbeda dengan *dough improvers* kimia, penggunaan enzim memerlukan pengetahuan pada kontrol waktu, pH dan suhu sehingga enzim dapat bekerja secara optimal. Enzim bekerja dengan memecah komponen adonan seperti pati, lemak, protein dan serat (Dahiya et al, 2020). Pengukuran faktor-faktor yang berpengaruh terhadap kerja enzim perlu dilakukan sebelum penggunaan enzim. Penggunaan enzim lebih efisien dan efektif apabila terdapat standarisasi metode untuk mengukur aktivitas enzim. Aktivitas enzim sangat bermanfaat pada tahapan *baking trial* (*baking test*) untuk mengetahui seberapa jauh potensi enzim tersebut dalam meningkatkan kualitas produk bakeri sesuai dengan karakteristik dan fungsi enzim pada sistem pangan. Gambar 1 menunjukkan faktor – faktor yang berpengaruh terhadap kerja enzim dalam sistem pangan.



Gambar 1. Faktor – faktor yang berpengaruh terhadap kerja enzim pada sistem pangan (Popper dan Losche, 2021)

Kerja enzim pada sistem pangan berkaitan dengan peranan enzim dalam melakukan modifikasi terhadap komponen-komponen dalam sistem pangan. Salah satunya adalah modifikasi pati. Modifikasi pati menggunakan enzim mampu mengubah struktur pati pada berat molekul, distribusi panjang rantai cabang dan rasio amilosa/amilopektin dikarenakan reaksi enzim dengan pati tergelatinisasi. Perubahan tersebut akan memproduksi pati dengan modifikasi struktur dan sifat fisikokimia yang berbeda. Selain itu, reaksi enzim tergolong ringan dan spesifik terhadap substrat dari pati dalam sistem yang kompleks, menghasilkan *yield* yang besar dan produk samping sedikit. Sebagai contoh, enzim efisien digunakan industri *baking* untuk meningkatkan kualitas roti pada kelembutan remah, mikrostruktur roti dan masa simpan produk (Park et al, 2017).



Aplikasi enzim pada produk bakeri yang efisien dan efektif mampu meningkatkan kebutuhan enzim secara global. Global market untuk industri enzim bernilai melebihi 490 juta USD pada 2020 dan diestimasikan mengalami pertumbuhan mencapai 6% CAGR dari 2021 sampai 2027. Hal ini merupakan dampak peningkatan konsumsi produk *confectionery* dan kebutuhan penambahan ingredien bernutrisi pada bahan pangan. Peningkatan konsumsi produk bakeri dengan pemakaian enzim paling menonjol pada produk bakeri seperti roti, cake dan pastry yang menstimulasi permintaan. Selain itu, peningkatan kebutuhan produk bakeri yang diproses dan dikemas, preferensi siap makan dan *fresh* serta gaya hidup yang sibuk merupakan pemicu pertumbuhan pasar enzim. Sebagai contoh, pasar enzim protease untuk *baking* diprediksi akan melewati 175 juta USD pada 2027 (Gminsights, 2022)

Modifikasi enzimatik lebih menguntungkan dibandingkan dengan modifikasi secara kimia dengan beberapa alasan yaitu enzim teknologi sebagai *clean* proses dengan konsumsi energi dan produksi limbah yang rendah serta kondisi lingkungan kerja yang aman dengan tidak ada/sedikit racun (Singhnia et al, 2010). Berbeda dengan modifikasi kimia, enzim merupakan *biodegradable* protein yang terdenaturasi selama *baking* sehingga tidak mempengaruhi nilai nutrisi dari gluten terigu. Enzim lebih disukai sebagai bahan tambahan pangan *clean label* dan alternatif yang baik untuk bahan tambahan kimia (Wouters et al, 2016). Modifikasi enzim meningkatkan kapasitas penyerapan air, viskoelastisitas dan sifat reologi pada ikatan gluten yang lemah, memperbaiki adonan dan kualitas roti (cita rasa roti, volume, struktur remah, dan masa simpan). Selain itu, enzim dapat menghidrolisis atau ikatan silang protein gluten sesuai dengan tipe enzim, meningkatkan emulsifikasi, solubilitas dan sifat *foaming* dari protein (Pourmohammadi dan Abedi, 2021).

Mikrobal enzim berperan penting dalam perusahaan pangan karena lebih stabil daripada enzim dari tanaman dan hewan. Enzim diproduksi dengan teknik fermentasi dengan efektifitas waktu dan biaya, kebutuhan ruang yang sedikit, memiliki konsistensi tinggi, modifikasi dan optimisasi proses yang mudah (Raveendran et al, 2018). Pemilihan enzim untuk substitusi bahan kimia pada *dough* dan *bread improver*, merupakan salah satu alternatif yang memberikan manfaat bukan hanya untuk konsumen, akan tetapi juga produsen dan lingkungan. Maka dari itu, perlu adanya kajian lebih lanjut sejauh mana enzim khususnya *single* enzim berpotensi diaplikasikan pada produk bakeri untuk menghasilkan produk *clean label*. Secara umum, pembahasan potensi enzim tersebut dapat dilakukan dengan beberapa pendekatan yaitu i) aplikasi enzim pada produk bakeri ii) peran enzim untuk meningkatkan kualitas produk mulai dari proses pengolahan (*mixing* adonan, fermentasi, *baking*) sampai hasil akhir bakeri meliputi tekstur dan appearance iii) mekanisme enzim dalam meningkatkan kualitas produk bakeri.

## II. APLIKASI DAN MEKANISME *SINGLE* ENZIM PADA APLIKASI PRODUK BAKERI

Enzim dapat ditambahkan secara individu atau dalam bentuk campuran kompleks dalam jumlah sedikit yang berperan secara sinergis, antagonis ataupun aditif selama produksi. Suplementasi tepung dan adonan dengan *improver* enzim dilakukan untuk standarisasi tepung yang akan digunakan pada pembuatan roti. Aplikasi enzim pada pembuatan roti ditambahkan selama tahapan *mixing* sebagai *technological* atau *processing aid* dengan sereal sebagai bahan mentah. Komponen sereal digunakan sebagai substrat oleh enzim untuk mengubah struktur mayor dan minor biomolekul sehingga mencapai sifat fungsional yang diinginkan (Rosell dan Collar, 2008). Jenis substrat dimana enzim bereaksi digunakan sebagai dasar klasifikasi enzim. Klasifikasi enzim berkaitan dengan struktur kimia dan karakteristik utama karbohidrat, protein dan lipid yang ditambahkan pada deskripsi enzim. Hal tersebut sesuai dengan International Union

of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) yang merekomendasikan nama enzim pada produk bakteri dan *EC number* yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. *EC number* dan rekomendasi nama enzim pada produk bakteri oleh IUBMB

1	Oksidoreduktase	(EC. 1.1) bekerja pada gugus CH-OH dari donor	(EC. 1.1.3) Dengan oksigen sebagai penerima	(EC. 1.1.3.4) Glucose oxidase
		(EC. 1.13) Bekerja pada donor tunggal dengan penggabungan molekul oksigen (oksigenase)	(EC. 1.13.11) lipoksigenase	
2	Transferase	(EC.2.3) Aciltransferase	(EC.2.3.2) Aminoaciltransferase	(EC. 2.3.2.13) Transglutaminase
3	Hidrolase	(EC. 3.1) Bekerja pada ikatan ester	(EC.3.1.1) karboksil ester hidrolase	(EC. 3.1.1.3) Lipase (EC. 3.1.1.73) Hemiselulase
		(EC. 3.2) Glikosidase	(EC. 3.2.1) Enzim menghidrolisis senyawa O- dan S-glikosil	(EC. 3.2.1.1) $\alpha$ -Amilase (EC. 3.2.1.2) $\beta$ -Amilase (EC. 3.2.1.8) Xynalase
		(EC. 3.4) Protease	Bekerja pada ikatan peptida: endopeptidases/eksopeptidase	
		(EC. 3.5) Bekerja pada ikatan karbon-nitrogen, selain ikatan peptida	(EC. 3.5.1) Dalam amida linier	(EC. 3.5.1.1) Asparaginase

Sumber: (Chandrasekan, 2016)

Sesuai dengan pengelompokan di Tabel 1 kelas enzim yang sering digunakan pada *baking* meliputi hidrolase antara lain amilase, protease, hemiselulosa dan lipase. Selain itu, kelas oksidoreduktase berupa *glucose oxidase* dan lipoksigenase.

#### A. Amilase

$\alpha$ - dan  $\beta$ -amilase secara natural ada dalam sereal,  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -1,4-*glucanohydrolase*) merupakan endo-enzim yang secara random mengkatalisis pemutusan ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik

pada bagian dalam amilosa dan amilopektin menjadi beberapa cabang dan fragmen linier yang disebut dekstrin. Hanya pati yang rusak dan tergelatinisasi yang mudah dihidrolisis oleh enzim.  $\beta$ -amilase adalah ekso-enzim yang menghasilkan maltosa dengan memecah setiap ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik dari ujung amilosa non-reduksi, amilopektin atau dekstrin. Maka dari itu,  $\beta$ -amilase memerlukan aksi dari  $\alpha$ -amilase terlebih dahulu untuk memecah pati menjadi bagian kecil atau dekstrin agar kerjanya lebih efisien (Chandrasekaran, 2016).  $\alpha$ -amilase mendegradasi pati yang rusak menjadi dekstrin yang lebih kecil dari DP2-DP12, hal ini memungkinkan *yeast* untuk bekerja berkelanjutan selama fermentasi adonan, *proofing* dan tahap awal *baking* sehingga meningkatkan volume dan remah roti. Selain itu, oligosakarida dengan berat molekul rendah dan gula seperti glukosa dan maltosa yang diproduksi oleh amilase dapat meningkatkan reaksi pencoklatan *crust* dan cita rasa hasil pemanggangan. Fungsi lain dari  $\alpha$ -amilase menurunkan viskositas adonan selama gelatinisasi pati (Whitehurst dan van Oort, 2010).

Berdasarkan penelitian Goesert et al (2009), penambahan amilase meningkatkan tingkat fermentasi dan gula reduksi pada tepung dan adonan. Hal tersebut mendorong fermentasi *yeast* dan pembentukan produk dari reaksi *maillard* sehingga berkontribusi pada cita rasa roti dan warna *crust*. Fungsi dari amilase juga berkaitan dengan reduksi viskositas adonan selama gelatinisasi pati, sehingga memperpanjang pengembangan saat di oven dan meningkatkan volume roti. Sifat dan mekanisme kerja amilase menentukan pembentukan struktur pati pada roti, rekristalisasi amilopektin, ikatan pembentukan pati dan redistribusi air yang terjadi pada pembuatan dan penyimpanan roti. Selama penyimpanan roti, jaringan pati tergelatinisasi (amilopektin) yang ada dalam roti *fresh*, secara bertahap berubah dan meluas menjadi kristalit sebagian dan jaringan amilopektin permanen dengan kristalit amilopektin berperan sebagai zona persimpangan. Seiring dengan proses retrogradasi amilopektin, terjadi migrasi uap air antar struktur remah dan semakin banyak air mengalami imobilisasi dalam kristalit amilopektin. Air hidrat kristalin tidak dapat lagi melakukan plastisasi jaringan yang berbeda sehingga mengakibatkan peningkatan kekokohan remah dan menurunkan resiliensi dikarenakan ikatan fleksibel gluten yang menurun.

Efisiensi amilase sebagai antistaling berkaitan dengan kemampuan membatasi pembentukan kekuatan jaringan amilopektin permanen dan imobilisasi air.  $\alpha$ -amilase konvensional melemahkan ikatan amilopektin dengan memotong rantai polimer panjang yang menghubungkan daerah kristalin tetapi memiliki efek yang rendah terhadap rekristalisasi amilopektin. Sebaliknya, maltogenic  $\alpha$ -amilase memperpendek rantai samping amilopektin sehingga mampu merintang rekristalisasi amilopektin dan pembentukan jaringan yang bersamaan dan menghambat imobilisasi air. Maltogenic  $\alpha$ -amilase lebih efisien daripada konvensional  $\alpha$ -amilase dengan peningkatan kekokohan remah dan retrogradasi amilopektin yang rendah. Mekanisme kerja maltogenic enzim dilakukan dengan pendekatan menggunakan NIR spektra untuk melihat migrasi air yang berkaitan dengan penurunan kompleks pati-air yang mempertahankan roti tetap empuk. Degradasi profil dari amilopektin (pati) dikurangi dengan menciptakan unit kecil disakarida (maltose). Pada akhirnya retrogradasi amilopektin dapat dihalangi dan kelembaban dapat dipertahankan sehingga kesegaran roti tetap terjaga (Amigo et al, 2021). Pemanfaatan maltogenic amilase sebagai enzim antistaling dapat dilakukan dengan enkapsulasi dalam *beeswax* dan diaplikasikan pada *batter* bebas gluten. Selanjutnya, dilakukan penentuan kualitas roti dan sifat *staling*. Teknik enkapsulasi memiliki efisiensi enzim yang baik dan ketika diaplikasikan pada roti bebas gluten dapat mengatur kadar air, indeks volume yang tinggi, *crust* yang lebih gelap dan remah yang lebih putih dan mengurangi tekstur keras pada produk bakeri (Haghighat-Kharazi et al, 2020).

Fungal amilase memiliki efek terbatas pada *staling*. Enzim ini dominan pada pati yang rusak. Fungal amilase sudah tidak aktif pada suhu ketika pati mulai tergelatinisasi sehingga



tidak dapat bereaksi pada pati yang mudah diakses. Bakterial amilase lebih stabil pada panas dan enzim ini memiliki aksi yang signifikan pada pati *amorf* yang tergelatinisasi. Modifikasi pati tergelatinisasi merupakan hasil yang diinginkan dari efek *antistaling*. Kekurangan bakterial enzim adalah sangat stabil terhadap panas sehingga meninggalkan residual aktivitas enzim setelah *baking* yang dapat memicu degradasi pati yang berlebihan sehingga roti akan kolaps selama penyimpanan setelah *baking*. Maltogenic amilase (*glucans, 1,4- $\alpha$ -maltohydrolase*, EC 3.2.1.33) memproduksi maltosa (dan beberapa maltodextrines rantai panjang) dalam bentuk  $\alpha$ -konfigurasi. Enzim ini paling aktif pada suhu 60°C dan 70°C dan dapat mendegradasi amilopektin dalam tingkat yang lebih besar dibandingkan fungal amilases atau  $\beta$ -amilase (Chandrasekaran, 2016)

## B. Protease

Proteolitik enzim mengacu pada protease, proteinase dan peptidase yang mengkatalisis hidrolisis ikatan peptide pada protein. Protease dapat dibagi menjadi 2 subkelas yaitu endoprotease dan eksoprotease. Endoprotease menghidrolisis ikatan peptida pada protein bagian dalam dari rantai polipeptida, sehingga menghasilkan '*small peptide*' bahkan asam amino bebas. Eksoprotease memotong rantai protein ujung sehingga menghasilkan asam amino bebas dan terkadang '*small peptide*' (Whitehurst dan van Oort, 2010). '*Small peptide*' mengacu secara luas pada protein yang mengandung kurang dari 100 asam amino (Hsu dan Benfey, 2008).

Karakteristik teknologi tepung dan nilai nutrisi roti ditandai dengan variabel berikut: volume awal, waktu fermentasi, fleksibilitas, kondisi adonan terhadap fermentasi, retensi air, resistensi maksimum, ekstensibilitas, pengembangan akhir saat baking, volume akhir roti, nilai nutrisi dan energi. Variabel tersebut dapat ditingkatkan dengan penggunaan aditif dan substansi yang berbeda dalam pembuatan roti, beberapa substansi merupakan komponen alami yang terdapat dalam tepung. Pengaruh spesifik dari protease pada sifat fisik gluten ditunjukkan pada proteolisis yang memecah dan reorientasi rantai protein sehingga membentuk ikatan gluten. Enzim protease memberikan pengaruh positif pada volume dan porositas roti, mengurangi proses menguleni pada adonan dan menekan konsumsi energi dalam teknologi pengolahan (David dan Mischa, 2012). Peningkatan kapasitas pengemulsi dari gluten dalam proses hidrolisis dapat dijelaskan melalui penguraian struktur globular gluten dan pemecahan ikatan peptida dengan modifikasi enzimatis. Pemecahan ikatan peptida memfasilitasi interaksi antara peptida dan lipid yang berperan meningkatkan ketersediaan residu peptida antar permukaan minyak-air. Hal ini menyebabkan penurunan tegangan antar permukaan dan meningkatkan aktifitas emulsifikasi. Meskipun demikian, aktivitas proteolitik yang berlebihan menyebabkan penurunan kapasitas emulsifikasi dari hidrolisat akibat degradasi gluten yang luas (Wang et al., 2018).

Hidrolisis enzimatis mampu memutus ikatan SS untuk mengurai struktur globular gluten. Ikatan SS baru, terbentuk antara grup SH yang sudah ada dengan ikatan SH yang baru terbentuk untuk menstabilkan struktur peptida (Deng et al, 2016). Protease mengurangi konsistensi gluten yang diakibatkan oleh degradasi gluten. Pada sampel gluten yang diberi perlakuan dengan protease, terjadi reduksi ukuran polimer gluten yang memicu penurunan resistensi dan ekstensi maksimal ( $R_{max}$ ). Hasil reologi menunjukkan reduksi ukuran polimer glutenin karena hidrolisis proteolitik yang merusak struktur gluten (Koga et al, 2019). Protein yang terhidrolisis memicu pelepasan air yang berlebihan dan penurunan kapasitas pengikatan air. Hal ini menyebabkan penurunan signifikan pada viskositas adonan dan menghasilkan adonan lebih *soft* yang mudah ditangani oleh mesin. Namun, perlu diperhatikan juga penambahan enzim yang berlebihan menyebabkan adonan lembek dan lengket sehingga

terjadi masalah pada mesin *sheeter* dan *rounder* yang menurunkan kualitas roti. (Harada et al, 2000)

Gluten merupakan campuran kompleks protein dengan sekuen peptida imunogenik yang memicu aktivitas autoimun pada pasien penderita *celiac*. Kombinasi *Lactobacillus* (*L. sanfranciscensis* LS3, LS10, LS19, LS23, LS38, and LS47) dengan fungal proteases (*Aspergillus oryzae* dan *A. niger*) terbukti efektif untuk mengeliminasi imunogenitas pada terigu setelah 48 jam fermentasi (Rizzello et al, 2007). Pemilihan *Lactobacillus* yang dikombinasikan dengan fungal dan atau malt protease dapat menurunkan konsentrasi residual dari sekuen gluten imunogenik selama fermentasi jangka panjang. Pada umumnya berupa fermentasi setengah cair yang menghasilkan *sourdough*. Kombinasi fungal protease dengan fermentasi *sourdough* meningkatkan degradasi gluten khususnya fraksi gliadin yang sepenuhnya terhidrolisis menjadi *small peptide* (kurang dari 9 asam amino residu) (Rizello et al, 2014).

*Microbial* protease dapat menurunkan gluten imunogenik khususnya pada produk bakeri dengan menghidrolisis gluten imunoreaktif dan meningkatkan karakteristik kualitas roti terutama spesifik volume. *Microbial* protease digunakan untuk menurunkan imunogenitas gluten. Penggunaan pada bahan mentah atau selama proses dapat meningkatkan degradasi secara menyeluruh dengan pemotongan urutan proline pada proteolisis gluten. Penggunaan *Lactobacillus* selama proses pengolahan pangan mengacu pada sistem protease yang kompleks pada *Lactobacillus* sehingga mampu menghidrolisis jenis prolin yang kaya akan peptida, termasuk 33-mer peptide (Heredia-Sandoval et al, 2016)

### C. Lipase

Lipase dikenal sebagai enzim lipolitik yang termasuk dalam kelompok serin hidrolase, mengkatalisis hidrolisis dari ikatan *estercarboxylic* pada *triacylglycerols* (TAG) menghasilkan asam lemak bebas *diglycerides* (DAG), *monoglycerides* (MAG) dan gliserol (Salgado et al, 2022). Hasil analisis reologi dan termal menunjukkan lipase mampu memodifikasi komponen adonan protein gluten dan pati. Lipase meningkatkan sifat penanganan adonan sama atau lebih baik daripada *diacetyl tartaric acid ester of mono- and diglycerides* (DATEM). Peningkatan sifat adonan ditandai dengan peningkatan stabilitas adonan, resistensi maksimum terhadap pembentangan dan kekerasan, menurunkan derajat kelembutan dan kelengketan. Pembentukan kompleks amilosa-lipid oleh lipase lebih banyak dibandingkan DATEM sehingga mampu menghambat retrogradasi pati (Colakoglu dan Ozkaya, 2012).

Rodríguez-García et al (2014) melakukan penelitian untuk meningkatkan kualitas cake dengan inkorporasi emulsifier komersial dengan lipase pada cake *batter* dengan *fat replacer* berupa inulin. Peningkatan kualitas cake melalui pendekatan sebagai berikut:

1. Pengukuran sifat viskoelastis menunjukkan inkorporasi emulsifier dan lipase mampu menurunkan tingkat struktur sistem *batter* sedangkan penambahan emulsifier meningkatkan konsistensi *batter*.
2. Surfaktan menstabilisasi gelembung yang memberikan ekspansi dan struktur yang seragam antara remah cake.
3. *Fat replacer* dengan 0.003 g/100g lipase dan 0.5g/100 g emulsifier meningkatkan homogenitas remah cake dan tekstur yang lebih baik selama penyimpanan
4. Kualitas cake yang baik diperoleh dari 50 dan 70% *fat replacement* dengan penggunaan lipase atau emulsifier dengan jumlah sedikit.

Penelitian lain oleh Huang et al (2020) menunjukkan pengaruh *lipase-treated milk fat* pada kualitas roti yang menghasilkan struktur adonan lebih kuat, peningkatan volume roti dan

menurunkan aktivitas air (mengurangi *staling*). Selain itu, *invitrodigestion glycemic load* pada roti dengan *lipase treated milk fat* lebih rendah dibandingkan kontrol. Potensi aplikasi eksogen fungal *lipase treated milk fat* untuk menggantikan sintesis surfaktan dapat meningkatkan sifat dan fungsionalitas produk serta mempersiapkan produk bakeri dengan indeks glikemik yang rendah. Mekanisme yang mendasari pengaruh fungsional lipase berkaitan dengan hidrolisis satu atau lebih bagian asam lemak dari lipid polar dan non polar untuk menghasilkan lebih banyak lipid polar yang dapat memicu peningkatan aktifitas permukaan. Peningkatan aktivitas permukaan tersebut merupakan pengaruh fungsional dari lipid endogen (Schaffarczyk et al, 2014). Lipase mengkatalisis reaksi hidrolisis TAG sehingga melepaskan MAG dan DAG yang dipertimbangkan sebagai emulsifier. MAG dan DAG membentuk inklusi kompleks dengan amilosa yang terkandung dalam tepung dan dapat meningkatkan spesifik volume dan kekokohan roti (Monie et al, 2021).

#### D. Xylanase

Xylanase (*endo-1,4- $\beta$ -D-xylan xylanohydrolase*) merupakan grup enzim yang menghidrolisis xylan dan melepaskan xylosa, begitu juga rantai pendek dan panjang dari *xylooligosaccharides* (Kheng dan Omar, 2005). Xylanase mengubah hemiselulosa tidak larut air menjadi larut air, yang mampu mengikat air dalam adonan sehingga menurunkan kekerasan adonan, meningkatkan volume dan menciptakan remah yang rapat dan seragam. Selain itu, adonan menjadi tidak lengket dan lebih mudah diproses oleh mesin saat produksi (Butt et al, 2008)

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengkaji pengaruh xylanase terhadap sifat reologi dan karakteristik produk. Xylanase dapat meningkatkan stabilitas dan fleksibilitas adonan, meningkatkan volume dan struktur remah. Aktivitas xylanase optimal dan efektif digunakan pada industri *baking* saat persiapan adonan dan *proofing* pada suhu sekitar atau dibawah 35°C (Collins et al, 2006). Penggunaan *vital wheat gluten*, *gum arabic* dan *endoxylanase* memberikan indikasi elastisitas dan ekstensibilitas adonan yang baik sehingga krekers panggang lebih mengembang. Selain itu terjadi peningkatan ekstensibilitas adonan dikarenakan kenaikan mobilitas molekul polisakarida dan penurunan viskositas adonan (Li et al, 2013). Xylanase efektif untuk mengurangi kekerasan remah dan aktivitas air, meningkatkan viskositas *batter*, suhu gelatinisasi, volume spesifik, porositas, dan karakteristik sensoris dari cake. Penggunaan xylanase optimal pada perlakuan *oat bran* dengan penambahan 70 ppm endoxylanase (Lebesi dan Tzia, 2012).

Jia et al (2011) meneliti pengaruh tepung kulit almond California (CASF) dan xylanase pada reologi adonan dan tekstur kukis. Hasil penelitian tersebut menunjukkan peningkatan penambahan CASF dari 20% menjadi 23%, dapat meningkatkan protein dan serat pangan larut pada kukis tanpa mempengaruhi *spread ratio* dan *breaking force*. Penelitian Yegin et al (2018) menunjukkan xylanase memelihara kemampuan penyerapan air, *development time*, stabilitas adonan, menurunkan derajat kelembutan adonan dan indeks toleransi *mixing* pada dosis 100 U/100 gram tepung. *A. pullulans* xylanase 125 U/100 gram tepung meningkatkan 30% volume spesifik roti dan menurunkan kekerasan remah dibandingkan dengan xylanase komersial. Xylanase memberikan sedikit perbaikan pada kohesivitas dan menurunkan *springiness* dan *gumminess*.

#### E. Asparaginase

Asparaginase mengkatalisis asparagin menjadi asam aspartat dan amonia, dengan menghilangkan prekursor kunci dalam pembentukan akrilamida (Anese et al, 2011). Beberapa penelitian menemukan bahwa jalur utama pembentukan akrilamida pada makanan berkaitan dengan reaksi *maillard* dan khususnya asam amino asparagin (Kukurova et al, 2009).

Akrilamida diklasifikasikan sebagai komponen yang kemungkinan bersifat karsinogen bagi manusia dan keberadaannya di produk makanan masih diperdebatkan dan berpotensi memberikan resiko kesehatan melalui paparan makanan. Sebelum ada hasil dari investigasi dan evaluasi resiko, *joint FAO/WHO expert committee of Food Additive (JECFA)* merekomendasikan prosedur untuk mengurangi konsentrasi akrilamida di makanan (Whitehurst dan van Oort, 2010)

Penggunaan asparaginase paling efektif dalam hal formulasi dan suhu merupakan strategi mitigasi untuk mengurangi pembentukan akrilamida. Selain itu, asparaginase tidak mempengaruhi parameter lain seperti pencoklatan atau pembentukan *hydroxymethylfurfural* (HMF) (Capuano et al, 2009). Konsentrasi menengah asparaginase sebesar 500 U/kg dikombinasikan dengan waktu dan suhu rendah selama inkubasi terbukti efektif mengurangi pembentukan akrilamida pada biskuit *short dough* tanpa mempengaruhi warna pada produk akhir. Asparaginase berkontribusi mengurangi konsentrasi akrilamida 27-70%. Pada beberapa literatur terdapat hasil yang bervariasi dipengaruhi oleh inkorporasi enzim dengan ingredien dalam adonan yang tidak terdistribusikan dengan baik atau dikarenakan efek matriks (Anese et al, 2011). Akrilamida diduga sebagai substansi karsinogen yang ditemukan pada makanan yang dipanggang maupun digoreng, substansi tersebut terbentuk selama reaksi maillard. Asam amino asparagin merupakan faktor kunci pembentukan akrilamida. Prekursor ini dapat dihilangkan dari adonan menggunakan asparaginase. Enzim ini mengubah asparagin menjadi asam aspartat yang tidak berpartisipasi dalam reaksi maillard. Penggunaan asparaginase mampu mengurangi level akrilamida sampai 100 ppb (Popper dan Losche, 2021)

## F. Oxidoreductase

### 1. *Glucose oxidase*

*Glucose oxidase* (GOX) mengoksidasi D-glukosa menjadi D-glucono lactone dan *hydrogen peroxide* dengan keberadaan molekul oksigen sebagai penerima elektron. GOX juga mengoksidasi protein larut air (albumin dan globulin) melalui ikatan non disulfida (sebagian besar diantara residu tirosin) membentuk ikatan ditirosin (Amiri et al, 2016). GOX membuat permukaan adonan kering sehingga mudah diproses, meningkatkan pembentukan dan pemisahan pada produk jadi. Selain itu, berkaitan dengan sifat reologi, mampu meningkatkan stabilitas adonan dalam farinograf. Meningkatkan resistensi terhadap ekstensi dan menurunkan ekstensibilitas pada ekstensograf dan alveograf (Popper dan Losche, 2021). Penambahan GOX memperkuat adonan, meningkatkan kualitas roti, memodifikasi protein gluten (gliadin dan glutenin) melalui pembentukan ikatan silang disulfida dan non disulfida (Bonet et al, 2006).

Berdasarkan penelitian Buche et al (2011), ingredien berpengaruh pada reologi dalam kondisi *mixing* yang sama. Hal ini berkaitan dengan kebutuhan O<sub>2</sub> yang dapat dimodifikasi dengan penambahan ingredien lain yang terlibat dalam reaksi yang membutuhkan O<sub>2</sub> (enzim redoks, substrat reduktor, *yeast* dan lain-lain). Kompetisi antara *yeast*, GOX dan lipoksigenase (pada gandum, kacang buncis dan kedelai) dalam hal kebutuhan O<sub>2</sub> oleh adonan menyebabkan penurunan produksi hidrogen peroksida oleh GOX selama *mixing*. Rasiah et al (2005) meneliti pengaruh ikatan silang oleh GOX pada protein adonan roti dan *croissant*. Ikatan silang terjadi terutama pada fraksi larut air (albumin dan globulin) dan terbukti melibatkan ikatan disulfida dan non-disulfida. SDS pada glutenin yang larut dan tidak larut, membentuk sebagian besar jaringan gluten, terikat silang dengan tingkat yang jauh lebih rendah pada ikatan non-disulfida. Ikatan silang ini belum teridentifikasi, akan tetapi perilakunya konsisten dengan ikatan ditirosin. Hasil

penelitian ini menguatkan teori bahwa terdapat hubungan antara ikatan silang protein gandum dan sifat fungsional. Kesimpulan yang bisa diambil antara lain (i) ikatan silang protein albumin dan globulin meningkatkan sifat remah dan (ii) perubahan volume *croissant* memerlukan ikatan silang fraksi glutenin protein gandum

## 2. *Lipoxygenase*

*Lipoxygenase* (LOX) mengkonversi asam lemak tak jenuh, yang lebih spesifik mengandung *cis*, *cis-1-4-pentadiene*, menjadi asam lemak radikal peroksi. Reaksi ini membutuhkan oksigen. Reaksi radikal bebas selanjutnya menghasilkan *monohydroperoxides* dengan ikatan rangkap konjugasi (Whitehurst dan van Oort, 2010). LOX mengkatalisis peroksidasi dari asam lemak tak jenuh. Produksi  $H_2O_2$  membentuk ikatan disulfida pada gluten protein (Pourmohammadi dan Abedi, 2021). Pengaruh LOX pada gluten dan adonan berkaitan dengan oksidasi lipid oleh LOX sehingga memicu co-oksidasi grup SH pada tepung (Joye et al, 2009).

Grup *sulfhydryl* yang berubah menjadi ikatan SS dapat meningkatkan resistensi adonan terhadap *overmixing* dan deformasi. LOX memutus ikatan disulfida dan memulai ikatan silang baru antara protein gluten. LOX meningkatkan karakteristik adonan dan roti bersamaan dengan penyerapan air, stabilitas adonan dan indeks toleransi *mixing*. Meskipun demikian, LOX dalam jumlah besar menyebabkan ikatan SS yang berlebihan dan kehilangan viskositas adonan dan gluten yang optimal (Bahal et al, 2013). LOX mempengaruhi sifat adonan yang berpengaruh terhadap stabilitas adonan dan remah pada produk bakeri (tekstur lebih halus, elastis, kesesuaian dalam pemotongan) serta mencerahkan produk (*baguette*, roti bakar, roti *sandwich*) (Popper dan Losche, 2021).

## G. Transglutaminase

Transglutaminase merupakan protein-glutamine  $\gamma$ -glutamyltransferase bagian dari kelas transferase. Transglutaminase mengkatalisis pembentukan ikatan isopeptida antara grup  $\gamma$ -carboxamides dari residu glutamin (donor) dan grup  $\epsilon$ -amina orde pertama dari senyawa yang berbeda, misalnya, protein (akseptor residu *acyl*). Reaksi-reaksi yang dikatalisis oleh enzim ini menghasilkan perubahan signifikan dalam sifat fisik dan kimia protein, seperti modifikasi viskositas, stabilitas termal, elastisitas dan resiliensi protein (Kieliszek dan Misiewicz, 2014). Transglutaminase mampu membentuk ikatan silang melalui rantai protein yang berdekatan pada protein yang sama atau dengan protein lain dengan tipe yang sama atau berbeda. Pembentukan ikatan silang ini membutuhkan grup *lysine* dan glutamin sebagai target (Popper dan Losche, 2021). Jika *lysine* adalah akseptor *acyl*, maka molekul protein diperkaya dengan asam amino *lysine*. Pemindehan *acyl* ke residu lisin yang terikat pada rantai polipeptida, menginduksi proses ikatan silang, yaitu pembentukan ikatan silang antar atau intramolekul  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu) Lys (Kashiwagi et al, 2002)

Transglutaminase berpengaruh besar pada memodifikasi sifat morfometrik, tekstur dan butiran remah roti *fresh*. Transglutaminase menurunkan volume spesifik roti secara signifikan tetapi tidak menghasilkan perubahan bentuk. Ekstensibilitas adonan diperkuat dan dikurangi oleh transglutaminase serta memungkinkan untuk menurunkan pembentangan adonan saat fermentasi dan pengembangan selama pemanggangan (Caballerro et al, 2007). Berdasarkan penelitian roti dengan penambahan transglutaminase mengurangi sifat lengket adonan, pengembangan cepat, menahan air lebih banyak dan menghasilkan roti dengan tekstur dan kekokohan remah yang lebih baik dibandingkan kontrol (Bauer et al, 2003). Kombinasi transglutaminase dan maltogenic  $\alpha$ -amilase pada adonan memberikan pengaruh sinergis terhadap kualitas roti *fresh* dan menghambat kinetika *staling*. Kombinasi ini menghasilkan roti yang lebih empuk dan remah yang kurang kenyal, meningkatkan kohesivitas, resiliensi



dan kinetika *staling* remah dan penurunan sensoris yang lebih lambat selama penyimpanan (Collar and Bollain, 2005).

### III. KESIMPULAN

Emulsifier kimia memiliki potensi negatif bagi kesehatan yang menyebabkan peradangan akut meliputi peradangan usus, obesitas yang berkaitan dengan sindrom metabolis dan resistensi glukosa. Kesehatan merupakan faktor utama bagi konsumen untuk beralih ke tren konsumsi pangan *clean label*. Enzim pangan merupakan alternatif terbaik untuk menggantikan emulsifier kimia pada produk bakeri. Enzim pangan merupakan biodegradable protein yang berperan dalam modifikasi enzimatik dan tidak mempengaruhi nilai nutrisi sehingga berpotensi digunakan pada pangan *clean label*. Selain itu, teknologi enzim merupakan *clean* proses dengan konsumsi energi dan kondisi lingkungan kerja yang aman dengan tidak ada/sedikit racun. Karakteristik enzim pangan tersebut memenuhi kebutuhan tren pangan *clean label* dan mendorong peneliti dan pengembang di industri pangan untuk menggali potensi penggunaan enzim pangan pada produk bakeri.

Penggunaan enzim tersebut dapat dikategorikan sesuai tujuannya baik sebagai *food additive* maupun *processing aid* sebagai *single* enzim. Aplikasi *single* enzim sebagai *food additive* dan *processing aid* dapat dioptimalkan dengan mempertimbangkan karakteristik, mekanisme kerja dan pemahaman regulasi enzim yang umum digunakan pada industri bakeri. Enzim yang umum digunakan antara lain kelas hidrolase: amilase, protease, hemiselulase, lipase, xylanase dan asparaginase, kelas oksidoreduktase berupa lipoksigenase dan glucose oksidase, kelas transferase berupa transglutaminase. Enzim dalam pengolahan produk bakeri memiliki peran masing-masing sesuai dengan karakteristik spesifik enzim. Peran utama enzim pada produk bakeri adalah meningkatkan sifat fungsional dan reologi adonan sesuai dengan jenis dan tipe produk bakeri, meningkatkan kualitas dan karakteristik produk bakeri meliputi volume, tekstur remah, warna dan rasa, serta memperpanjang masa simpan (*antistaling*). Optimasi peran dan fungsi enzim dapat dilakukan dengan konsep validasi kualitas enzim melalui *baking test* meliputi pengembangan formulasi, parameter proses (reologi adonan, penanganan adonan di mesin, suhu dan kecepatan *baking*) serta karakteristik penampakan dan sensoris produk.

Hasil *baking test* dapat dijadikan referensi untuk melakukan penelitian dan pengembangan dengan cara dan tahapan proses yang efisien dan efektif serta dapat menekan *trial* dan *error* selama produksi. Selain itu, penelitian dan pengembangan berkesinambungan merupakan salah satu cara untuk menggali potensi enzim pangan yang diaplikasikan pada produk bakeri. Faktor-faktor yang perlu dikaji lebih lanjut meliputi (i) inkorporasi enzim dengan ingredien lain dalam matriks pangan, (ii) parameter yang berpengaruh terhadap kerja enzim dalam sistem pangan (iii) potensi kombinasi enzim untuk meningkatkan kualitas produk bakeri dan (iv) pemahaman regulasi penggunaan enzim sebagai *food additive* maupun *food processing*. Keberlanjutan dalam mengkaji potensi enzim pangan diharapkan mampu memberikan referensi dan informasi untuk mengembangkan produk bakeri yang aman dan sehat bagi konsumen.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amigo, J.M., del Olmo, A., Engelsen, M.M, Lundkvist, H., dan Engelsen, S.B. 2021. Staling of white wheat bread crumb and effect of maltogenic  $\alpha$ -amylases. Part 3: Spatial evolution of bread staling with time by near infrared hyperspectral imaging. *Food Chemistry*, 353: 129478.
- Amiri, A., Shahedi, M., dan Kadivar, M. 2016. Evaluation of physicochemical properties of gluten modified by Glucose oxidase and Xylanase. *Journal of Cereal Science*, 71: 37–42.
- Anese, M., Quarta, B. dan Frias, J. 2011. Modelling the effect of asparaginase in reducing acrylamide formation in biscuits. *Food Chemistry*, 126: 435-440.
- Aponso, M.M.W, De Silva, G.O dan Abeysundara, A.T. 2017. Emulsifiers as food additives: An overview on the impact to obesity and gut diseases. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(3): 485-487.
- Asioli, D., Aschemann-Witzela, J., Caputo, V., Vecchio, R., Annunziata, A., Naes, T., dan Varela, P. 2017. Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. *Food Research International*.
- Aschemann-Witzel, J., Varela, P., dan Peschel, A.O. 2019. Consumers categorization of food ingredients: Do consumers perceive them as ‘clean label’ producers expect? An exploration with projective mapping. *Food Quality and Preference*, 71: 117-128.
- Bahal, G., Sudha, M. L. dan Ramasarma, P. R. 2013. Wheat germ lipoxygenase: Its effect on dough rheology, microstructure, and bread making quality. *International Journal of Food Properties*, 16(8): 1730–1739.
- Bakery market by product (bread, rolls, cakes, pastries, biscuits, pies, and others) by type (snacks, breakfast, hybrids, and specialty), by distribution channel (hypermarkets, supermarkets, specialty stores, and online) global opportunity analysis and industry forecast, 2020–2030. <https://www.nextmsc.com>. <https://www.nextmsc.com/report/bakery-market>. Diakses pada 13 Juli 2022.
- Baking enzymes market size, share and industry analysis report by product (proteases, lipases, carbohydrases [amylases, xylanases, cellulases, pectinases, lactases], polymerases & nucleases, phytases, catalyses) and application (bread, cake, biscuit), regional outlook, growth potential, competitive market share & forecast, 2021–2027. <https://www.gminsights.com>. <https://www.gminsights.com/industry-analysis/baking-enzymes-market>. Diakses pada 13 Juli 2022.
- Bauer, N., Koehler, P., Wieser, H., dan Schieberle, P. 2003. Studies on effects of microbial transglutaminase on gluten proteins of wheat. I. Biochemical analysis. *Cereal Chem*, 80(6): 781–786.
- Bonet, A., Rosell, C.M., Caballero, P.A., Gomez, M., Pe´rez-Munuera, I., dan Lluch, M.A. 2006. Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality: A study from macroscopic to molecular level. *Food Chemistry*, 99: 408–415.
- Buche, F., Davidou, S., Pommet, M., Potus, J., Rouillé, J., Verté, F., dan Nicolas, J. 2011. Competition for Oxygen Among Oxidative Systems During Bread Dough Mixing: Consequences of Addition of Glucose Oxidase and Lipoxygenase on Yeasted Dough Rheology. *Cereal Chem.*, 88 (5) :518–524.
- Butt, M.S., Tahir-Nadeem, M, Ahmad, Z. dan Sultan, M.T. 2008. Xylanases and their applications in baking industry. *Food Technol. Biotechnol*, 46 (1): 22–31.
- Caballero, P.A., Gomez, M., dan Rosell, C.M. 2007. Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelf-life by enzymes combination. *Journal of Food Engineering*, 81: 42–53.

- Capuano, E., Ferrigno, A., Acampa, I., Serpen, A., Açar, O.C., Gökmen, V., dan Fogliano, V. 2009. Effect of flour type on Maillard reaction and acrylamide formation during toasting of bread crisp model systems and mitigation strategies. *Food Research International*, 42: 1295–1302.
- Chandrasekaran, M. 2016. *Enzymes in Food and Beverage Processing*. CRC Press, USA.
- Chassaing, B., Van de Wiele, T., De Bodt, J., Marzorati, M. dan Gewirtz, A.T. 2017. Dietary emulsifiers directly alter human microbiota composition and gene expression *ex vivo* potentiating intestinal inflammation. *Gut* Published Online First, 1-14.
- Colakoglu, A.S. dan Ozkaya, H. 2012. Potential use of exogenous lipases for DATEM replacement to modify the rheological and thermal properties of wheat flour dough. *Journal of Cereal Science*, 55: 397-404.
- Collins, T., Hoyoux, A., Dutron, A., Georis, J., Genot, B., Dauvrin, T., Arnaut, F., Gerday, C., dan Feller, G. 2006. Use of glycoside hydrolase family 8 xylanases in baking. *Journal of Cereal Science*, 43: 79–84.
- Collar, C., & Bollain, C. 2005. Impact of microbial transglutaminase on the staling behaviour of enzyme supplemented pan breads. *European Food Research and Technology*, 221(3–4): 298–304.
- Cox, S., Sandall, A., Smith, L., Rossi, M. dan Whelan, K. 2020. Food additive emulsifiers: A review of their role in foods, legislation and classifications, presence in food supply, dietary exposure, and safety assessment. *Nutrition Reviews*, 79(6): 726–741.
- Csaki, K.F. dan Sebestyen, E. 2019. Who will carry out the tests that would be necessary for proper safety evaluation of food emulsifiers?. *Food Science and Human Wellness*, 8: 126–135
- Dahiya, S., Bajaj, B.K., Kumar, A., Tiwari, S.K., dan Singh, B. 2020. A review on biotechnological potential of multifarious enzymes in bread making. *Process Biochemistry*, 99: 290–306.
- David, I. dan Misca, C. 2012. The monitoring of enzyme activity of protease on the bread dough. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 18 (3): 236-241.
- Deng, L., Wang, Z., Yang, S., Song, J., Que, F., Zhang, H. dan Feng, F. 2016. Improvement of functional properties of wheat gluten using acid protease from *Aspergillus usamii*. *PLoS One*, 11.
- Garvey, E.C., O'Sullivan, M.G., Kerry, J.P., Milnerd, L., Gallagher, E., dan Kilcawleya, K.N. 2020. Characterising the sensory quality and volatile aroma profile of clean-label sucrose reduced sponge cakes. *Food Chemistry*.
- Goesaert, H., Slade, L., Levine, H., dan Delcour, J.A. 2009. Amylases and bread firming – an integrated view. *Journal of Cereal Science*, 50: 345–352.
- Haghighat-Kharazi, S., Kasaai, M.R., Milani, J.M., dan Khajeh, K. 2020. Antistaling properties of encapsulated maltogenic amylase in gluten-free bread. *Food Sci Nutr*, 8:5888–5897.
- Halmos, E.P., Mack, A., dan Gibson, P.R. 2019. Review article: Emulsifiers in the food supply and implications for gastrointestinal disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 49: 41–50.
- Harada, O., Lysenko, E. D. dan Preston, K. R. 2000. Effects of commercial hydrolytic enzyme additives on Canadian short process bread properties and processing characteristics. *Cereal Chemistry*, 77(1): 70–76.
- Heredia-Sandoval, N.G., Valencia-Tapia, M.Y., de la Barca, A.M.C., dan Islas-Rubio, A.R. 2016. Microbial proteases in baked goods: modification of gluten and effects on immunogenicity and product quality. *Foods*, 5:59
- Huang, Z., Brenna, C.S., Zheng, H., Mohana, M.S., Stipkovitsa, L., Liua, W., Kulasiria, D., Guane, W., Zhaoe, H., dan Liue, J. 2020. The effects of fungal lipase-treated milk lipids on bread making. *LWT- Food Science and Technology*, 128: 109455.
- Hsu, P. Y., and Benfey, P. N. 2018. Small but mighty: functional peptides encoded by small ORFs in plants. *Proteomics*, 18: e1700038.

- Jia, C., Huang, W., Abdel-Samie, M.A., Huang, G., dan Huang, G. 2011. Dough rheological, Mixolab mixing, and nutritional characteristics of almond cookies with and without xylanase. *Journal of Food Engineering*, 105: 227–232.
- Joye, I. J., Lagrain, B. dan Delcour, J. A. 2009. Endogenous redox agents and enzymes that affect protein network formation during breadmaking: A review. *Journal of Cereal Science*, 50(1): 1–10.
- Kheng, P.P. dan Omar, I.C., 2005. Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using Palm Kernel Cake (PKC) as substrate. *Songklanakarinn J. Sci. Technol*, 27: 325–336.
- Kieliszek, M. dan Misiewicz, A. 2014. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiology*, 59: 241–250.
- Kocabas, D.S. dan Grumet, R. 2019. Evolving regulatory policies regarding food enzymes produced by recombinant microorganisms. *GM Crops & Food*, 10:191–207.
- Koga, S., Rieder, A., Ballance, S., Uhlen, A. K., & Veiseth-Kent, E. 2019. Gluten-degrading proteases in wheat infected by *Fusarium graminearum*—protease identification and effects on gluten and dough properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(40): 11025–11034.
- Kashiwagi, T., Yokoyama, K., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H. dan Suzuki, E. 2002. Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*. *J Biol Chem*, 277: 44252–44260.
- Kukurova, K., Morales, F.J., Bednaříková, A., dan Ciesarova, Z. 2009. Effect of L-asparaginase on acrylamide mitigation in a fried-dough pastry model. *Mol. Nutr. Food Res*, 53: 1532–1539.
- Laster, J., Bonnes, S.L., dan Rocha, J. 2019. Increased use of emulsifiers in processed foods and the links to obesity. *Current Gastroenterology Reports*, 21: 61.
- Lebesi, D. dan Tzia, C. 2012. Use of endoxylanase treated cereal brans for development of dietary fiber enriched cakes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 13: 207–214.
- Li, J., Hou, G.G., Chen, Z., dan Gehring, K. 2013. Effects of endoxylanases, vital wheat gluten, and gum arabic on the rheological properties, water mobility, and baking quality of whole wheat saltine cracker dough. *Journal of Cereal Science*, 58: 437-445.
- Monie, A., David, A., Clemens, K., Malet-Martino, M., Balayssac, S., Perez, E., Franceschi, S., Crepin, M., dan Delample, M. 2020. Enzymatic hydrolysis of rapeseed oil with a non-GMO lipase: A strategy to substitute mono- and diglycerides of fatty acids and improve the softness of sponge cakes. *LWT - Food Science and Technology*.
- Nascimento, K., Paes, S.D., dan Augusta, I.M. 2018. A Review 'Clean labeling': Applications of Natural Ingredients in Bakery Products. *Journal of Food and Nutrition Research*, 6 (5): 285-294.
- Park, S.H., Na, Y., Kim, J., Kang, S.D., dan Park, K. 2017. Properties and applications of starch modifying enzymes for use in the baking industry. *Food Sci Biotechnol*.
- Partridge, D., Lloyd, K.A., Rhodes, J. M., Walker, A. W., Johnstone, A. M. dan Campbell, B. J. 2019. Food additives: Assessing the impact of exposure to permitted emulsifiers on bowel and metabolic health – introducing the FADiets study. *Nutrition Bulletin*, 44: 329-349.
- Popper, L. dan Losche, K. 2021. *Understanding Baking Enzymes*. Robert Wenzel. Hamburg, Germany
- Pourmohammadi, K. dan Abedi, E. 2021. Enzymatic modifications of gluten protein: Oxidative enzymes. *Food Chemistry*, 356: 129679.
- Pourmohammadi, K. dan Abedi, E. 2021. Enzymatic modifications of gluten protein: Oxidative enzymes. *Food Chemistry*, 356: 129679.
- Rahman, M.M. dan Simsek, S. 2020. Go clean label: replacement of commercial dough strengtheners with hard red spring wheat flour in bread formulations. *J Food Sci Technol*.

- Rahman, M.M., Ohm, J., dan Simsek, S. 2022. Clean-label breadmaking: Size exclusion HPLC analysis of proteins in dough supplemented with additives vs hard red spring wheat flour. *Journal of Cereal Science*, 104: 103426.
- Rasiah, I.A., Sutton, K.H., Low, F.L., Lin, H.M. dan Gerrard, J.A. 2005. Crosslinking of wheat dough proteins by glucose oxidase and the resulting effects on bread and croissants. *Food Chemistry*, 89: 325–332.
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S.B., Abraham, A.A., Mathew, A.K., Madhavan, A., Rebello, S., dan Pandey, A. 2018. *Food Technol. Biotechnol*, 56 (1): 16-30.
- Redan, B.W. 2020. Processing aids in food and beverage manufacturing: Potential source of elemental and trace metal contaminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, A-G.
- Rizzello, C.G., De Angelis, M., Di Cagno, R., Camarca, A., Silano, M., Losito, I., De Vincenzi, M., De Bari, M., Palmisano, F., Maurano, F., Gianfrani, C. dan Gobbetti, M. 2007. Highly efficient gluten degradation by *Lactobacilli* and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14): 4499–4507.
- Rizzello, C.G., Curiel, J.A., Nionelli, L., Vincentini, O., Di Cagno, R., Silano, M., Gobbetti, M., dan Coda, R. 2014. Use of fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria for making wheat bread with an intermediate content of gluten. *Food Microbiology*, 37: 59-68.
- Rodríguez-García, J., Sahi, S.S. dan Hernando, I. 2014. Functionality of lipase and emulsifiers in low-fat cakes with inulin. *LWT - Food Science and Technology*, 58: 173-182.
- Rosell, C. M. dan C. Collar. 2008. Effect of various enzymes on dough rheology and bread quality. In *Recent Research Developments in Food Biotechnology. Enzymes as Additives or Processing Aids*, 165–183. Kerala, India: Research Signpost.
- Salgado, C.A., dos Santos, C.I.A. dan Vanetti, M.C.D. 2022. Microbial lipases: Propitious biocatalysts for the food industry. *Food Bioscience*, 45: 101509.
- Schaffarczyk, M., Østdal, H., Koehler, P., 2014. Lipases in wheat breadmaking: Analysis and functional effects of lipid reaction products. *J. Agric. Food Chem*, 62: 8229-8237.
- Simsek, S. 2020. Clean-label bread: Using hard red spring wheat to replace dough improvers in whole wheat bread. *J Food Process Preserv*, 00: e14920.
- Singhania, R.R., Sukumarana, R.K., Patel, A.K., Larroche, C., dan Pandey, A. 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46: 541–549.
- Wang, P., Zou, M., Tian, M., Gu, Z., dan Yang, R. 2018. The impact of heating on the unfolding and polymerization process of frozen-stored gluten. *Food Hydrocolloids*, 85: 195–203.
- Whitehurst, R.J. dan van Oort, M. 2010. *Enzymes in Food Technology*, Second Edition. Blackwell Publishing Ltd, USA.
- Wouters, G.B., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K. dan Delcour, J.A. 2016. Relevance of the functional properties of enzymatic plant protein hydrolysates in food systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15: 786-800.
- Yegin, S., Altinel, B., dan Tuluk, K. 2018. A novel extremophilic xylanase produced on wheat bran from *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311-1: Effects on dough rheology and bread quality. *Food Hydrocolloids*, 81: 389-397.