

## MODIFIKASI WARNA, TEKSTUR DAN AROMA TEMPE SETELAH DIPROSES DENGAN KARBON DIOKSIDA SUPERKRITIK

[The Modification of Color, Texture, and Aroma of Tempe Processed with  
Supercritical Carbon Dioxide]

Maria Erna Kustyawati<sup>1)\*</sup>, Filli Pratama<sup>2)</sup>, Daniel Saputra<sup>2)</sup> dan Agus Wijaya<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, Bandar Lampung

<sup>2)</sup> Jurusan Teknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya, Palembang

Diterima 05 November 2013 / Disetujui 10 Desember 2014

### ABSTRACT

Supercritical carbon dioxide technology was a non thermal processing which might be applied on tempe to preserve its freshness. The aim of the research was to study the effect of supercritical CO<sub>2</sub> on the color and texture of tempe, and to identify the aroma of tempe after processed with supercritical CO<sub>2</sub>. The experiment was carried out using Completely Randomized Block Design with three replications. The experimental factors were pressure treatment at supercritical (P<sub>s</sub>) and liquid (P<sub>c</sub>), and treatment time (T) at T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> of 5, 10, 15, and 20 minutes, respectively. The results showed that the treatment of pressures, time and their interactions significantly affected the color of  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$ ,  $\Delta b^*$ ,  $\Delta E^*$ , but not significantly affected the textures. The best treatment was P<sub>c</sub>T<sub>1</sub> producing the tempe with the value of  $\Delta L^* - 2.13$ ;  $\Delta a^* 0.28$ ;  $\Delta b^* 0.97$  dan  $\Delta E^* 0.77$ . Several volatile aromas of tempe were extracted due to the supercritical CO<sub>2</sub> treatment, but it also caused the formation of new volatile aroma compounds.

**Keywords:** aroma, color, supercritical CO<sub>2</sub>, tempe, texture

### ABSTRAK

Teknologi karbon dioksida superkritis merupakan teknologi pengolahan tanpa panas yang diharapkan dapat diaplikasikan untuk mempertahankan kesegaran tempe. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan CO<sub>2</sub> superkritis terhadap warna, tekstur dan aroma tempe. Percobaan menggunakan rancangan acak kelompok faktorial dengan dua faktor perlakuan dan tiga kali pengulangan. Faktor pertama adalah tekanan (P) yang terdiri dari CO<sub>2</sub> superkritis (P<sub>s</sub>) dan CO<sub>2</sub> cair (P<sub>c</sub>), dan faktor ke dua adalah waktu proses (T) yang terdiri dari T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> masing-masing 5, 10, 15, dan 20 menit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan tekanan, waktu proses dan interaksinya berpengaruh nyata terhadap warna  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$ ,  $\Delta b^*$ ,  $\Delta E^*$  dan berpengaruh tidak nyata terhadap tekstur tempe. Perlakuan P<sub>c</sub>T<sub>1</sub> menghasilkan warna tempe terbaik dengan nilai  $\Delta L^* - 2.13$ ;  $\Delta a^* 0.28$ ;  $\Delta b^* 0.97$  dan  $\Delta E^* 0.77$ . Perlakuan CO<sub>2</sub> superkritis mengakibatkan modifikasi warna, beberapa senyawa aroma tempe terekstraksi dan juga menghasilkan senyawa aroma bentuk baru.

**Kata kunci:** aroma, CO<sub>2</sub> superkritis, tekstur, tempe, warna

### PENDAHULUAN

Tempe merupakan makanan asli Indonesia yang dibuat dari fermentasi kedelai oleh kapang *Rhizopus oligosporus*. Selama fermentasi *R. oligosporus* memproduksi berbagai enzim yang mengakibatkan hidrolisa komponen di dalam biji kedelai menjadi berbagai senyawa yang berperan di dalam pembentukan aroma tempe, pembentukan senyawa fungsional, dan pembentukan senyawa-senyawa non-gizi penting lain. *Rhizopus oligosporus* membentuk miselium yang berpenetrasi ke dalam biji kedelai dan menghubungkan antara biji kedelai sehingga membentuk tekstur tempe yang kompak dan padat (Jurus dan Sundberg, 1976; Sparringa dan Owen, 1999). Adanya miselium juga mengakibatkan warna putih cerah pada tempe dimana miselium tumbuh dan menyelimuti permukaan tempe. Sifat fisik tempe yang diamati pada penelitian ini meliputi antara lain

warna, tekstur, dan aroma. Karakteristik fisik tersebut merupakan kriteria mutu penting di dalam tempe karena penilaian utama konsumen terhadap tempe terletak pada warna, tekstur, dan kemudian aroma. Tempe umumnya dipasarkan dalam bentuk segar tetapi tempe tidak dikonsumsi dalam keadaan mentah melainkan perlu diolah lebih lanjut sebelum dikonsumsi. Konsumen lebih memperhatikan kesegaran tempe melalui kenampakan fisik dan aroma saat membeli tempe. Tempe segar dicirikan oleh tekstur yang kompak, padat, mudah diiris, diselimuti miselium berwarna putih, dan aroma khas tempe. Permasalahan utama di dalam penelitian ini adalah bahwa selama pengolahan tempe tidak hanya mengakibatkan perubahan gizi dan fungsionalnya melainkan tempe dengan pengolahan minimal dapat mempertahankan kualitas kesegaran dan citarasa disamping nilai gizinya.

Metode karbon dioksida bertekanan tinggi merupakan salah satu metode pengolahan tanpa panas yang telah populer digunakan sebagai metode ekstraksi bahan pangan, seperti ekstraksi lemak dari *rice bran* (Ramsay *et al.* 1991; Sparkset *al.*

\*Penulis Korespondensi:  
Email: maria.erna@fp.unila.ac.id, Telp: 0721781823

2006), ekstraksi senyawa aroma, dan senyawa bioaktif tanaman obat (Bertucco dan Franceschin, 2008) serta ekstraksi kafein (Azevedo *et al.* 2008). Hal ini karena CO<sub>2</sub> dapat mencapai kondisi superkritik pada suhu rendah 31.1°C dan tekanan 7.35 MPa (Beckman, 2004; Brunner, 2005). Pada bentuk fluida superkritik CO<sub>2</sub> memiliki densitas seperti sifat zat cair, viskositas seperti sifat gas, dan difusivitas tinggi dengan sifat tegangan permukaan nol sehingga CO<sub>2</sub> superkritik dapat berfungsi sebagai solven di dalam ekstraksi, dan dapat menembus permukaan zat padat maupun cair. Dengan semakin berkembangnya teknologi CO<sub>2</sub> bertekanan tinggi, metode ini telah diaplikasikan untuk pengolahan produk pangan (Rastogi *et al.* 2007; Brunner, 2005). Hal ini karena CO<sub>2</sub> tekanan tinggi mampu menginaktivkan mikroorganisme di dalam produk pangan baik mikroorganisme alami maupun mikroorganisme yang ditambahkan dalam bahan pangan, seperti dekontaminasi paprika (Calvo dan Torres, 2010); pasteurisasi jus apel (Liao *et al.* 2010); pasteurisasi *must* anggur dan pasta tomat (Parton *et al.* 2007). Disamping itu, pengolahan produk pangan menggunakan metode CO<sub>2</sub> bertekanan tinggi dapat mempertahankan kesegaran produk karena tanpa adanya penggunaan panas, seperti pada pengolahan biji alfafa (Mazzoni *et al.* 2001), jus leci beku (Guo *et al.* 2011), dan buah pir segar (Valverde *et al.* 2010). Metode karbon dioksida bertekanan tinggi merupakan gas yang mudah didapat, tidak beracun, tidak reaktif dan tidak meninggalkan residu (Beckman, 2004) sehingga diharapkan mempunyai prospek ke depan sebagai metode pengolahan pangan alternatif. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pengolahan menggunakan CO<sub>2</sub> superkritik terhadap kualitas kesegaran tempe antara lain warna, aroma dan tekstur tempe. Tempe yang telah diolah dengan CO<sub>2</sub> superkritik diharapkan mempunyai warna dan tekstur yang berbeda tidak nyata dengan tempe tanpa pengolahan dengan CO<sub>2</sub> bertekanan tinggi sehingga menghasilkan tempe segar yang masih disukai oleh konsumen. Hasil penelitian ini merupakan informasi pengetahuan dasar pengolahan minimal tempe menggunakan teknologi CO<sub>2</sub> superkritik.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan utama dalam penelitian ini adalah tempe dari PRIMKOPTI Macan Lindungan Palembang, dan gas karbondioksida (CO<sub>2</sub>) dari P.T. Pusri Palembang, serta bahan untuk analisis kimia. Kedelai yang digunakan adalah varietas *Amerika* dan diperoleh dari koperasi PRIMKOPTI Macan Lindungan Palembang.

### Metode penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok Lengkap yang disusun secara faktorial dengan dua faktor perlakuan dan tiga kali pengulangan. Faktor I adalah fase karbondioksida yang terdiri dari fase superkritik (P<sub>s</sub>) dan fase cair (P<sub>c</sub>), dan faktor II adalah waktu tekanan (T) yang terdiri dari empat level yaitu T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> masing-masing 5, 10, 15, dan 20 menit. Data hasil pengukuran warna, tekstur, pH dan

pertumbuhan kapang dianalisis dengan ANOVA melalui program SAS versi 6.12 dan yang berpengaruh nyata dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf 5% (Gomez dan Gomez, 1995). Identifikasi senyawa aroma dilakukan pada tempe kontrol, tempe P<sub>s</sub> dan P<sub>c</sub> dan data hasil identifikasi dilakukan tabulasi.

### Proses pemberian tekanan pada tempe

Tempe dipersiapkan oleh pengrajin tempe yang tergabung dalam PRIMKOPTI Macan Lindungan Palembang. Tempe dibuat berbentuk selinder panjang dengan ukuran panjang: diameter ( $\pm 10$ cm,  $\pm 3$ cm) dibungkus dalam plastik dengan lubang aerasi udara yang teratur. Tempe segar yang telah jadi atau telah mengalami fermentasi selama 40 jam, selanjutnya diolah dengan pemberian CO<sub>2</sub> bertekanan tinggi. Alat pengolahan dengan CO<sub>2</sub> superkritik yang digunakan adalah satu unit alat penekan yang terdiri dari tabung tahan tekanan tinggi, tabung gas karbondioksida, jaket pemanas, pengatur tekanan, dan pipa yang tahan tekanan tinggi. Suhu dan tekanan karbon dioksida bertekanan tinggi diatur sebagai berikut tekanan gas CO<sub>2</sub> fase cair (suhu 25°C, tekanan 6.3 MPa) dan fase superkritik (suhu 37°C, tekanan 7.6 MPa). Suhu dikontrol dengan menambahkan air panas atau es. Proses perlakuan tekanan dengan gas CO<sub>2</sub> dilakukan seperti yang diterangkan oleh Saputra *et al.* (1991) dengan cara meletakkan tempe kedalam tabung tekan kemudian setelah tabung ditutup aliran gas CO<sub>2</sub> dimasukkan sampai tekanan mencapai fase yang ditentukan dengan mengatur suhu. Penekanan dilakukan selama 5, 10, 15, dan 20 menit, kemudian gas dilepas dari tabung dengan membuka katup secara perlahan-lahan untuk menghindari kerusakan tempe. Dalam penelitian ini diperlukan waktu 2-3 menit untuk membebaskan tekanan dari dalam tabung. Tempe kemudian dikeluarkan dari tabung tekan dan dilakukan analisis.

Parameter yang diamati yaitu warna meliputi kadar air, penurunan jumlah kapang, warna  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , dan  $\Delta E^*$  yang diukur menggunakan *Color Reader Type CR-10* (Konica Minolta, Japan), dan tekstur yang diukur menggunakan *Texture Analyzer LFRA 7.1* dengan *setting* kondisi pengukuran adalah: TEST: Normal; TRIGGER: 10.0 (g); DISTANCE: 10.0 (mm); SPEED: 10.0 (mm/s), *blade probe*. Mikrostruktur tempe diamati menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) (JEOL JSM 5310 LV). Ekstraksi senyawa volatil menggunakan metode *headspace* SPME-GCMS (Jelen *et al.* 2012). Identifikasi senyawa hasil ekstraksi tempe kontrol, tempe P<sub>c</sub> dan P<sub>s</sub> dilakukan menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry* (GC Hewlett-Packard HP 589011) dilengkapi dengan *quadrupole mass detector* HP 5971 (Hewlett Packard, Palo Alto, AS). Kolom yang digunakan adalah *DB-5 capillary column* (25m x 0.2 mm x 0.25  $\mu$ m) dan *fiber solid phase microextraction* (SPME) yaitu 65  $\mu$ m *carbowax/polydimethylsiloxane* (CAR/PDMS) (Supelco, Bellefonte, AS). Kondisi GC yaitu suhu oven 40°C selama 2 menit kemudian 8°C per menit sampai 260°C dan 15 menit pada suhu 260°C. *Injektor* dengan *modesplitless*, gas pembawa helium 0.8 mL per menit.

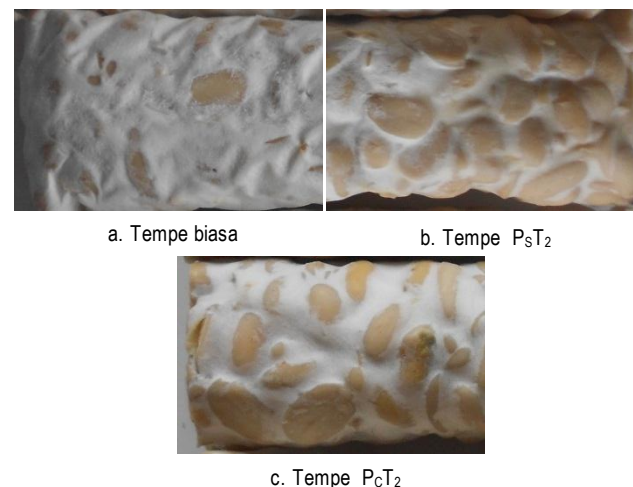
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Warna tempe tanpa perlakuan

Pengukuran warna menggunakan chromameter dengan sistem CIELAB, dan LCH color scale. Sumbu L (Lightness, %) mulai dari atas ke bawah (*top to bottom*) dengan nilai maksimum 100 yang menunjukkan *perfect reflecting diffuser* yang diindikasikan sebagai putih, dan nilai nol menunjukkan warna hitam. Sumbu  $a^*$  dan  $b^*$  tidak memiliki batasan numerik. Nilai positif  $a^*$  menunjukkan warna merah, dan negatif  $a^*$  adalah hijau. Nilai positif  $b^*$  adalah kuning, dan negatif  $b^*$  adalah biru. Pada penelitian ini, warna tempe tanpa perlakuan CO<sub>2</sub> bertekanan tinggi berfungsi sebagai warna standar yang akan dijadikan sebagai warna pembanding. Hasil pengukuran warna untuk tempe tanpa perlakuan (kontrol) dan tempe perlakuan disajikan pada Tabel 1.

Nilai L yang diperoleh dari analisis menunjukkan bahwa tingkat kecerahan warna tempe kontrol sangat tinggi (Tabel 1). Tempe kontrol paling putih karena adanya miselium *R. oligosporus*. Miselium tersusun atas hifa yang mempunyai dinding sel yang tersusun oleh lapisan ganda fosfolipid, glikoprotein, senyawa melanin dan kitin (Madigan *et al.* 2012). Komposisi susunan dinding sel hifa ini mengakibatkan timbulnya warna putih pada tempe. Kenampakan tempe kontrol dan tempe setelah perlakuan dengan CO<sub>2</sub> superkritik dan CO<sub>2</sub> cair dapat dilihat pada Gambar 1. Perbedaan derajat kemerahan ( $\Delta a^*$ ), derajat kekuningan ( $\Delta b^*$ ) dan derajat kecerahan ( $\Delta L^*$ ) antara tempe perlakuan dengan tempe kontrol, dihitung untuk mengetahui tingkat perbedaannya secara kuantitatif. Perbedaan total warna (*total color difference*,  $\Delta E^*$ ) juga dilakukan untuk mengetahui perbedaan warna secara keseluruhan. Hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa perlakuan tekanan, waktu tekanan dan interaksinya berpengaruh nyata terhadap  $\Delta L^*$ . Hasil uji Duncan menunjukkan nilai  $\Delta L^*$  semua perlakuan berbeda nyata satu dengan yang lain dan tempe P<sub>2</sub>T<sub>1</sub> (-2.13) adalah paling cerah dan nilai  $\Delta L^*$  tempe P<sub>1</sub>T<sub>4</sub> (-7.93) paling gelap. Nilai  $\Delta L^*$  tempe perlakuan Pc lebih rendah berbeda nyata dengan tempe Ps berarti lebih cerah. Nilai  $\Delta L^*$  gelap karena warna kerusakan dinding sel miselium dan warna kedelai terkonsentrasi pada suatu area sebagai akibat proses tekanan CO<sub>2</sub> superkritik. Hal ini dapat dijelaskan bahwa aliran turbulensi CO<sub>2</sub> pada proses perlakuan tekanan CO<sub>2</sub> superkritik menyebabkan miselium tersapu dan terbawa keluar pada saat tekanan dilepaskan sehingga mengakibatkan konsentrasi warna kedelai menonjol. Menurut Beckman (2004) dan Han *et al.*

(2008), proses pengolahan CO<sub>2</sub> superkritik mempunyai aliran turbulensi yang mengarah ke segala arah dan tidak tergantung pada sifat geometri produk yang diolah. Disamping itu, warna tempe yang gelap diakibatkan oleh terlarutnya senyawa penyusun dinding sel hifa dalam CO<sub>2</sub> superkritik, dan konsentrasi warna kedelai yang menonjol. Menurut Beckman (2004) dan Brunner (2005), CO<sub>2</sub> superkritik memiliki difusivitas yang tinggi dan tegangan permukaan nol. Hal ini menyebabkan CO<sub>2</sub> superkritik mudah menembus lapisan dinding sel (Ferrentino *et al.* 2009; White *et al.* 2006). Di dalam dinding sel CO<sub>2</sub> superkritik berinteraksi dengan lapisan fosfolipid karena sifatnya yang nonpolar dan juga cenderung polar. Menurut James dan Eastoe (2012); Keskin *et al.* (2007); di dalam lingkungan senyawa ionik, organik, dan air CO<sub>2</sub> yang bersifat nonpolar dapat berubah atau berganti (*shifting*) menjadi polar. Ini mengakibatkan dinding sel hifa terdegradasi dan sebagian terekstraksi pada saat pelepasan tekanan (Werner dan Hotchkiss, 2006; Tomasula dan Boswell, 1999). Perlakuan T<sub>4</sub> lebih tinggi berbeda nyata dengan T<sub>1</sub> dapat dijelaskan bahwa semakin meningkatnya waktu perlakuan konsentrasi CO<sub>2</sub> semakin tinggi dan hal ini menyebabkan kematian kapang karena faktor anaerobisitas. Menurut Sparringa *et al.* (2002); Brooks *et al.* (2008), kapang *R. oligosporus* bersifat aerobik dan toleran terhadap CO<sub>2</sub> hingga 0.03% (v/v). Hal ini terjadi pada tempe PsT<sub>4</sub> dan PcT<sub>4</sub>.



Gambar 1. Kenampakan tempe biasa dan setelah perlakuan dengan CO<sub>2</sub> superkritik dan cair selama 10 menit

Tabel 1. Hasil pengukuran komponen warna tempe biasa dan tempe perlakuan CO<sub>2</sub> tekanan tinggi

| Perlakuan        | Penurunan Jumlah Kapang (Siklus Log) | Kadar Air    | Parameter Warna          |                         |                          |                   |
|------------------|--------------------------------------|--------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------|
|                  |                                      |              | $\Delta L^*$             | $\Delta a^*$            | $\Delta b^*$             | $\Delta E^*$      |
| Kontrol          |                                      | 65.74 ± 0.8  | 75.7 ± 1.1               | 3.1 ± 0.7               | 13.5 ± 1.7               |                   |
| PcT <sub>1</sub> | 1.17 <sup>a</sup>                    | 65.22 ± 0.5  | -2.13 ± 1.7 <sup>a</sup> | 0.28 ± 0.1 <sup>a</sup> | 0.97 ± 0.6 <sup>a</sup>  | 0.77 <sup>a</sup> |
| PcT <sub>2</sub> | 1.93 <sup>b</sup>                    | 65.33 ± 0.1  | -2.47 ± 0.9 <sup>b</sup> | 0.50 ± 0.2 <sup>b</sup> | 1.20 ± 0.6 <sup>ab</sup> | 0.87 <sup>a</sup> |
| PcT <sub>3</sub> | 5.27 <sup>e</sup>                    | 63.18 ± 0.7  | -2.80 ± 0.7 <sup>c</sup> | 0.77 ± 0.2 <sup>c</sup> | 1.37 ± 0.6 <sup>bc</sup> | 1.56 <sup>b</sup> |
| PcT <sub>4</sub> | 6.47 <sup>f</sup>                    | 64.35 ± 0.7  | -4.07 ± 0.2 <sup>d</sup> | 1.34 ± 0.2 <sup>d</sup> | 1.44 ± 1.4 <sup>c</sup>  | 1.62 <sup>b</sup> |
| PsT <sub>1</sub> | 2.33 <sup>c</sup>                    | 60.07 ± 0.15 | -6.10 ± 0.4 <sup>e</sup> | 1.70 ± 0.2 <sup>e</sup> | 2.17 ± 0.4 <sup>d</sup>  | 2.15 <sup>c</sup> |
| PsT <sub>2</sub> | 4.23 <sup>d</sup>                    | 59.56 ± 0.3  | -6.30 ± 1.6 <sup>f</sup> | 1.80 ± 0.3 <sup>e</sup> | 2.27 ± 0.3 <sup>de</sup> | 2.21 <sup>c</sup> |
| PsT <sub>3</sub> | 6.47 <sup>f</sup>                    | 60.07 ± 0.3  | -6.53 ± 0.7 <sup>g</sup> | 1.83 ± 0.2 <sup>e</sup> | 2.50 ± 0.1 <sup>e</sup>  | 2.55 <sup>d</sup> |
| PsT <sub>4</sub> | 6.53 <sup>f</sup>                    | 59.57 ± 0.5  | -6.10 ± 0.4 <sup>h</sup> | 2.00 ± 1.1 <sup>f</sup> | 2.87 ± 0.3 <sup>f</sup>  | 2.70 <sup>d</sup> |

Keterangan: Nilai yang tertulis dalam tabel adalah rata-rata dari tiga kali pengulangan dengan standard deviasinya. Huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata pada taraf 5%. Ps = 7.6 MPa, Pc = 6.3 MPa, T<sub>1</sub> = 5 menit, T<sub>2</sub> = 10 menit, T<sub>3</sub> = 15 menit, T<sub>4</sub> = 20 menit

Nilai  $\Delta a^*$  positif (+) mengindikasikan bahwa tingkat "kemerahan" pada sampel lebih tinggi dibanding standar. Analisis keragaman menunjukkan bahwa perlakuan tekanan, waktu tekanan dan interaksinya berpengaruh nyata terhadap  $\Delta a^*$ . Tabel 1 menunjukkan bahwa perlakuan PsT<sub>1</sub> tidak berbeda nyata dengan PsT<sub>2</sub>, dan PsT<sub>3</sub> tetapi berbeda nyata dengan perlakuan lain. Nilai  $\Delta a^*$  tempe pada kisaran 0.6 hingga 2.03. Tempe PsT<sub>2</sub> mempunyai nilai  $\Delta a^*$  paling tinggi berarti mempunyai warna lebih gelap. Perubahan nilai  $\Delta a^*$  diakibatkan oleh menurunnya kandungan air dan lemak di dalam tempe karena terekstraksi oleh CO<sub>2</sub> superkritik. Lemak dapat mendispersikan cahaya pada saat pengukuran sehingga menurunnya kandungan lemak mengakibatkan nilai  $\Delta a^*$  meningkat atau warna berubah menjadi gelap. Hal ini terjadi pada nilai  $\Delta a^*$  tempe PsT<sub>1</sub> (1.70) lebih tinggi dibanding perlakuan PcT<sub>1</sub> (0.28). Menurut Brunner (2005) dan Brown *et al.* (2010), CO<sub>2</sub> superkritik mempunyai densitas yang lebih tinggi dan solvenitas yang lebih baik dibanding CO<sub>2</sub> cair. Hal ini mengakibatkan lemak dan air terekstraksi dalam CO<sub>2</sub> superkritik. Menurut Namatsu *et al.* (1999), Brown *et al.* (2010), dan Brunner (2005), kelarutan air di dalam CO<sub>2</sub> superkritik lebih tinggi dibanding CO<sub>2</sub> cair disebabkan oleh terbentuknya ikatan hidrogen antara molekul air dan CO<sub>2</sub> superkritik, disamping polaritas air yang besar. Pada saat pelepasan tekanan CO<sub>2</sub> kembali menjadi gas dan mengakibatkan kadar air bahan menurun. Hasil penelitian ini sesuai Hashim *et al.* (2013) yang melaporkan bahwa daging kambing giling rendah lemak yang diproduksi dengan CO<sub>2</sub> superkritik mempunyai tingkat kecerahan yang rendah karena pengaruh dispersi cahaya.

Nilai  $\Delta b^*$  positif (+) makin tinggi mengindikasikan bahwa warna tempe lebih pucat. Hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa tekanan, waktu tekanan dan interaksinya berpengaruh nyata terhadap nilai  $\Delta b^*$ . Pada Tabel 1, nilai  $\Delta b^*$  pada kisaran 0.9 hingga 3.20, perlakuan PcT<sub>1</sub> berbeda tidak nyata dengan PcT<sub>2</sub> dan PcT<sub>3</sub> dan berbeda nyata dengan perlakuan lain. Nilai  $\Delta b^*$  tempe PsT<sub>2</sub> paling tinggi atau paling pucat. Hal ini dapat disebabkan oleh kandungan air dalam tempe. Tempe adalah pangan setengah padat dengan kandungan air tinggi (65-67%) (Mulyowidarso *et al.* 1989; Nout dan Kiers, 2005). Air bersifat polar dapat terlarut dalam CO<sub>2</sub> melalui interaksi asam basa Lewis membentuk asam karbonat. Menurut Dillow *et al.* (2008) dan Meujo *et al.* (2004), molekul air terlarut dalam CO<sub>2</sub> superkritik membentuk asam karbonat, dimana asam karbonat berfungsi sebagai donor ion H<sup>+</sup> di dalam larutan. Makin tinggi tekanan CO<sub>2</sub> jumlah ion H<sup>+</sup> makin meningkat, karena meningkatnya transfer massa CO<sub>2</sub> (Calvo dan Torres, 2010; Ferrentino *et al.* 2012). Warna pucat mengindikasikan peningkatan ion H<sup>+</sup> dalam tempe atau nilai  $\Delta b^*$  tinggi. Menurut Andres-Bello *et al.* (2013), peningkatan ion H<sup>+</sup> mempengaruhi pigmen yang menentukan warna suatu bahan pangan, misalnya warna merah daging menjadi merah pucat, atau perubahan klorofil (warna hijau) menjadi feofitin (hijau kekuningan).

Hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa perlakuan tekanan, waktu tekanan dan interaksinya berpengaruh nyata terhadap nilai  $\Delta E^*$ . Tabel 1 menunjukkan bahwa nilai  $\Delta E^*$  pada kisaran 0.77 hingga 2.70. Nilai  $\Delta E^*$  tempe PcT<sub>1</sub> tidak berbeda

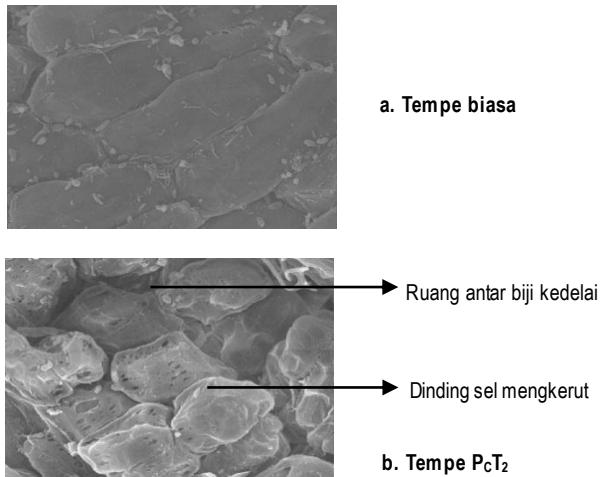
nyata dengan PcT<sub>2</sub> tetapi berbeda nyata dengan yang lain. Nilai  $\Delta E^*$  paling rendah (0.77) terdapat pada tempe PcT<sub>1</sub> berarti sekilas terlihat ada perbedaan warna ( $0.5 > \Delta E^* < 1.0$ ). Perbedaan nilai warna  $\Delta E^*$  dapat disebabkan oleh kelarutan senyawa-senyawa kimia dalam tempe dan juga oleh miselium kapang tempe. Karbon dioksida superkritik mempunyai densitas dan kelarutan yang lebih tinggi dibanding CO<sub>2</sub> cair dan oleh karena itu kelarutan senyawa-senyawa kimia tempe lebih tinggi dalam CO<sub>2</sub> superkritik. Pada fase superkritik, CO<sub>2</sub> bersifat non polar dan polar dan mudah terlarut dalam matrik tempe antara lain dengan gusur hidrofobik dan hidrofilik molekul karbohidrat, protein, dan lemak. Hal ini mengakibatkan makin banyak komponen tempe yang terlarut. Kelarutan senyawa-senyawa tempe mengakibatkan perbedaan warna yang besar yang dapat dilihat pada tempe perlakuan P<sub>1</sub>T<sub>4</sub> yang mempunyai  $\Delta E^*$  2.87. Pada CO<sub>2</sub> fase cair, hanya sedikit komponen makromolekul tempe yang terlarut, sehingga tidak menyebabkan perbedaan warna tempe yang tinggi.

Hasil penelitian ini berbeda dengan penemuan Ferrentino *et al.* (2009) dan Xu *et al.* (2011) mengenai pengaruh CO<sub>2</sub> bertekanan tinggi terhadap kualitas jus apel menemukan bahwa nilai  $\Delta E^*$  tidak berbeda dengan kontrol. Hal ini dapat disebabkan oleh perbedaan komponen penyusun matrik produk pangan. Menurut Dillow *et al.* (2008), efektivitas kelarutan CO<sub>2</sub> di dalam produk pangan dipengaruhi oleh sifat matrik dan komponen penyusunnya, dimana di dalam matrik cair difusivitas dan kelarutan CO<sub>2</sub> lebih tinggi dan sebaliknya matrik padat menghambat difusivitas CO<sub>2</sub>. Guo *et al.* (2011); Xu *et al.* (2011) mengelompokkan nilai  $\Delta E^*$  ke dalam lima golongan yaitu tidak terlihat bila  $\Delta E^*$  0 hingga 0.5, sekilas terlihat bila  $\Delta E^*$  0.5 hingga 1.0; sedikit terlihat bila  $\Delta E^*$  1.5 hingga 3.0; terlihat dengan baik bila  $\Delta E^*$  3.0 hingga 6.0; dan jelas terlihat bila  $\Delta E^*$  6.0 hingga 12.0.

### Tekstur

Tekstur dinyatakan sebagai gram gaya yang dibutuhkan untuk melakukan deformasi pada jarak 10.0 mm pada bahan pangan (Barretta *et al.* 2010). Hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa perlakuan tekanan, waktu tekanan dan interaksinya tidak berpengaruh nyata terhadap tekstur. Tekstur tempe perlakuan berkisar antara 273.10–314.72 gf. Tempe perlakuan mempunyai nilai tekstur lebih rendah atau lebih lunak dibanding kontrol karena perubahan mikrostruktur matrik tempe. Proses pelunakan tempe disebabkan oleh perubahan sifat fisik kedelai, sifat protein, lemak, dan miselium. Hilangnya kemampuan miselium kapang dalam membentuk matriks tempe dapat menjadi penyebab tekstur tempe mengalami pelunakan akibat proses tekanan CO<sub>2</sub> superkritik. Kelarutan protein yang menurun dan lemak yang terekstraksi dan timbulnya ruang-ruang kosong antar sel kedelai memudahkan probe untuk menembus matrik tempe, dan menghasilkan nilai kekerasan yang rendah. Kenampakan ruang kosong diantara dinding sel ini dapat dilihat pada Gambar 2. Perubahan struktur matrik tempe ini relatif sama dengan hasil penelitian Brown *et al.* (2010) yang mengeringkan wortel irisan menggunakan CO<sub>2</sub> superkritik. Hasil pengamatan *image* SEM terlihat adanya perubahan mikrostruktur dalam irisan wortel yaitu timbulnya ruang-ruang kosong diantara dinding sel wortel. Ruang-ruang

kosong tersebut dapat terisi air pada saat rehidrasi dan mengakibatkan tekstur wortel tidak berbeda dengan wortel segar. Menurut Aguila *et al.* (2006), mikrostruktur bahan dipengaruhi oleh tekanan turgor sel dan integritas dinding sel komponen penyusun bahan pangan. Tekanan yang tinggi menyebabkan rusaknya membran sel, tekanan turgor menurun, dinding sel mengerut dan menghasilkan ruang-ruang kosong antar sel (Brown *et al.* 2010).



Gambar 2. SEM permukaan tempe biasa dan tempe setelah perlakuan CO<sub>2</sub> cair selama 10 menit

### Senyawa aroma

Identifikasi senyawa aroma dilakukan terhadap tempe kontrol dan tempe PsT<sub>1</sub> (perlakuan CO<sub>2</sub> superkritik dan waktu 5 menit) dan tempe PcT<sub>1</sub> (perlakuan CO<sub>2</sub> cair dan waktu 5 menit). Hasil identifikasi senyawa aroma menunjukkan bahwa terdapat senyawa aroma yang terekstraksi dan terdapat senyawa aroma bentuk baru oleh perlakuan CO<sub>2</sub> tekanan tinggi. Tempe PcT<sub>1</sub> lebih banyak mengandung senyawa volatil aroma dibanding tempe PsT<sub>1</sub> karena beberapa senyawa volatil terekstraksi oleh CO<sub>2</sub> superkritik. Senyawa aroma yang berhasil diidentifikasi dari tempe PcT<sub>1</sub> meliputi alkohol (12) alkohol yang didominasi oleh etil alkohol, 1-propanol-2-metil, pentanol, 1-butanol-3-metil, 1-okten-3-ol, 5-metil-1-heptanol, dan 10 senyawa ester, sedangkan senyawa aroma dari tempe PsT<sub>1</sub> meliputi 8 senyawa alkohol, 5 senyawa ester, dan 3 senyawa asam karboksilat. Senyawa aroma yang terekstraksi oleh CO<sub>2</sub> superkritik meliputi 1-propanol, 1-propanol-2-metil, fenil-etil alkohol, asam butanoat 2-metil etil ester, 2-heksanon 5-metil, aseton, asetoin, asam propanoat, asam butanoat 2-metil, asam tetradekanoat, fenol, maltol, indol, piridin, pyrazin 2-etil 5-metil, thiopene, disulfide dimetil. Senyawa aroma yang terekstraksi oleh CO<sub>2</sub> cair meliputi 3-heksen-1-ol, 3-buten-1-ol-3metil, 1-okten-3-ol, asam butanoat, 2-butanon, asam asetat, asam propanoat, benzaldehid, fenol, styrene, furan-2-metil, 2(3) furanon dihidro-5-pentil, pyrazin 2-etil 5-metil, thiopene, dan disulfide dimetil.

Senyawa bentuk baru merupakan senyawa aroma yang tidak teridentifikasi dari tempe kontrol, meliputi 3-buten-1-ol, asam heptanoat etil ester, asam dodekanoat etil ester, asam oktanoat etil ester, diasetil, 1-okten-3-on, heksanal, 2,6-nonenal, furan-2-pentil, 2(3) furanon dihidro-5-pentil, 1,3-oktadien, dan

naftalen. Senyawa bentuk baru dapat dihasilkan dari degradasi protein, lemak dan karbohidrat tempe oleh CO<sub>2</sub> tekanan tinggi menghasilkan asam amino bebas, asam lemak bebas dan asam-asam karboksilat yang menghasilkan aroma. Asam lemak merupakan prekursor asam heksadekanoat yang menghasilkan aroma seperti daging busuk (Qin dan Ding, 2007). Furan-2-pentil berasal dari asam linoleat dalam biji kedelai (Klensporf dan Jelen, 2012). Disulfide dimetil berasal dari degradasi enzimatis methionin yang terdapat dalam biji kedelai oleh *Bacillus subtilis* selama fermentasi (Qin dan Ding, 2007), dan menghasilkan aroma seperti kobis yang kurang disukai (Jelen *et al.* 2012). Disulfide dimetil tidak ditemukan dari tempe PcT<sub>1</sub> maupun tempe PsT<sub>1</sub>. Tempe PcT<sub>1</sub> mempunyai aroma yang lebih menyenangkan dibanding tempe PsT<sub>1</sub> karena aroma yang dihasilkan oleh heksanal ditutupi oleh aroma yang dihasilkan oleh senyawa ester dan benzaldehid. Heksanal sebagai indikator oksidasi lemak dan menghasilkan bau langu tempe kedelai (Feng *et al.* 2006). Menurut Klensporf dan Jelen (2005), senyawa aldehid menghasilkan aroma *apek* (earthy) sedangkan senyawa aromatis benzaldehid menghasilkan aroma kacang-kacangan yang disukai. Senyawa ester menghasilkan aroma harum (Belitz *et al.* 2009), dan oleh karena itu dapat menutupi aroma langu yang dihasilkan dari heksanal.

### Pertumbuhan kapang

Jumlah kapang padat tempe tanpa perlakuan adalah  $6.1 \times 10^6$  CFU/g (Tabel 1). Uji Duncan pengaruh interaksi perlakuan terhadap penurunan kapang (Tabel 1) menunjukkan bahwa perlakuan PsT<sub>3</sub> berbeda tidak nyata dengan PsT<sub>4</sub> dan PcT<sub>4</sub> tetapi berbeda nyata dengan perlakuan lain. Perlakuan PsT<sub>3</sub> dapat membunuh semua kapang yaitu sebesar 6.5 siklus log, sedangkan perlakuan PcT<sub>1</sub> hanya dapat membunuh 1.17 siklus log, atau paling rendah dalam eksperimen ini. Hal ini mengindikasikan bahwa CO<sub>2</sub> superkritik dengan 20 menit telah menginaktivasi kapang sebesar 6 siklus log sedangkan CO<sub>2</sub> cair telah menginaktivasi kapang sebesar 1 siklus log. Perlakuan Ps menurunkan jumlah kapang 4.88 siklus log lebih tinggi dan berbeda nyata dengan Pc (3.73 siklus log). Kematian kapang disebabkan oleh efek anaerobisitas dan ekstraksi sebagai akibat tekanan CO<sub>2</sub> tinggi. Karbon dioksida superkritik mempunyai kemampuan menembus lapisan membran sel kapang, kemudian melarutkan lapisan dinding sel dan dinding sel membran, serta mengakibatkan kerusakan struktur dan fungsi sel membran. Dinding sel kapang tersusun dari lapisan glikoprotein,  $\beta$ -glukan dan lapisan sel membran yang terdiri dari fosfolipid. Glikoprotein,  $\beta$ -glukan dan fosfolipid mempunyai gugus fungsi yang bersifat nonpolar sehingga larut di dalam CO<sub>2</sub> superkritik. Proses *throttling* pada saat pelepasan tekanan mengakibatkan desintegrasi dinding sel miselium yang menutupi permukaan tempe, sehingga tumpah biji kedelai mempunyai warna kuning kecoklatan. Penurunan jumlah kapang akibat perlakuan waktu (Tabel 1) menunjukkan bahwa T<sub>1</sub> menurunkan kapang paling rendah yaitu 1.75 siklus log dan penurunan kapang pada T<sub>4</sub> paling besar yaitu 6.50 siklus log. Hal ini berarti kapang mati semua setelah perlakuan waktu 20 menit. Peningkatan waktu menyebabkan konsentrasi CO<sub>2</sub> di dalam sel semakin tinggi (Hong dan Pyun, 1999; Guo *et al.* 2011; Garcia-Gonzales, 2007). Kapang merupakan mikro-

organisme aerobik, meningkatnya akumulasi CO<sub>2</sub> di dalam substrat akan meningkatkan anaerobisitas, dan mengakibatkan kematian kapang. Demikian, dapat dinyatakan bahwa CO<sub>2</sub> superkritik dengan waktu 20 menit mempunyai efek pasturisasi sedangkan CO<sub>2</sub> cair mempunyai efek reduksi terhadap kapang tempe.

Sementara itu, kematian kapang pada perlakuan tekanan P<sub>c</sub> lebih disebabkan oleh perbedaan fase CO<sub>2</sub>. Pada tekanan 6.3 MPa dan suhu 25°C CO<sub>2</sub> dalam bentuk cair, tidak mempunyai kemampuan menembus sel membran karena densitas CO<sub>2</sub> cair (0.6 hingga 1.6 kg/dm<sup>3</sup>) lebih tinggi dibanding CO<sub>2</sub> superkritik (0.2 hingga 0.9 kg/dm<sup>3</sup>) (Brunner, 2005; Brown, 2010). Oleh karena itu, CO<sub>2</sub> cair hanya melarutkan sebagian senyawa penyusun dinding sel dan sel membran yang mempunyai gugus hidrofilik (Mathias *et al.* 2010). Proses *throttling* tidak terjadi dalam CO<sub>2</sub> fase cair karena tidak terjadi penurunan tekanan secara drastis sehingga ekstraksi sel kapang tidak terjadi. Penelitian ini sesuai dengan Guo *et al.* (2011) bahwa kapang alami dalam jus leci beku menurun 5 siklus log pada perlakuan CO<sub>2</sub> tekanan 8 MPa suhu 36°C waktu 2 menit, dan pada produk padat (wortel) menurun 5 siklus log pada tekanan 8 MPa suhu 22°C waktu 10 menit (Spilimbergo *et al.* 2011) sedangkan khamir *S.cerevisiae* hanya menurun < 1 log pada tekanan 4 MPa suhu 20°C selama 2 jam.

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa kematian kapang pada perlakuan P<sub>c</sub>T<sub>2</sub> hanya 1.9 siklus log mengindikasikan tempe masih berwarna putih karena masih terdapat miselium. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tempe P<sub>c</sub>T<sub>2</sub> yang mempunyai nilai warna L\* sebesar 72.3 sedangkan tempe tanpa perlakuan mempunyai nilai L\* sebesar 74.5. Warna L\* menunjukkan tingkat kecerahan tempe oleh adanya miselium. Hifa miselium mempunyai dinding sel yang tersusun oleh lapisan ganda fosfolipid, glikoprotein, senyawa melanin dan kitin (Madigan *et al.* 2012) yang memberikan warna putih.

#### Kadar air

Hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa tekanan berpengaruh nyata terhadap kadar air sedangkan perlakuan waktu berpengaruh tidak nyata terhadap kadar air. Uji Duncan menunjukkan bahwa perlakuan tekanan dan waktu, dan interaksi antar perlakuan berpengaruh nyata terhadap kadar air. Kadar air tempe perlakuan pada kisaran 59.56% hingga 65.33%, dan tempe tanpa perlakuan sebesar 65.74% (Tabel 1). Tempe perlakuan tekanan P<sub>s</sub> memiliki kadar air 60.06% lebih rendah berbeda nyata dengan tempe tekanan P<sub>c</sub> yaitu 64.52% karena air terekstraksi oleh CO<sub>2</sub> superkritik. Tempe perlakuan waktu T<sub>3</sub> mempunyai kadar air 61.63% paling rendah berbeda nyata dengan perlakuan yang lain sedangkan T<sub>1</sub> (62.65%) paling tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa meningkatnya konsentrasi CO<sub>2</sub> seiring dengan meningkatnya waktu, relatif tidak berpengaruh pada perubahan kadar air. Tempe perlakuan P<sub>2</sub>T<sub>3</sub> berbeda tidak nyata dengan P<sub>2</sub>T<sub>4</sub> dan berbeda nyata dengan yang lain. Pada fase cair kelarutan CO<sub>2</sub> lebih rendah dibanding fase superkritik. Hal ini mengakibatkan kadar air menurun sedikit atau tidak signifikan karena tidak banyak air yang terlarut. Menurut Park *et al.* (2013), air meningkatkan polaritas CO<sub>2</sub> dan mengakibatkan kelarutannya dalam CO<sub>2</sub> superkritik lebih tinggi dibanding CO<sub>2</sub> cair. Hal ini terjadi pada

tempe tekanan 6.3 MPa suhu 25°C waktu 10 menit (P<sub>2</sub>T<sub>2</sub>) yang mempunyai kadar air paling tinggi (65.37%).

## KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan CO<sub>2</sub> tekanan tinggi, waktu dan interaksinya memberikan pengaruh nyata terhadap perbedaan derajat warna kemerahan, perbedaan derajat warna kekuningan, perbedaan derajat kecerahan, perbedaan total warna keseluruhan, kadar air, dan pertumbuhan kapang, akan tetapi berpengaruh tidak nyata terhadap tekstur tempe. Tekstur semua tempe perlakuan berbeda tidak nyata. Perlakuan CO<sub>2</sub> superkritik menyebabkan senyawa aroma tempe terekstraksi terutama disulfide dimetil, tetapi juga menghasilkan beberapa senyawa baru yang tidak teridentifikasi dari tempe kontrol meliputi 3-buten-1-ol, asam heptanoat etil ester, asam dodekanoat etil ester, asam oktanoat etil ester, diasetil, 1-okten-3-on, heksanal, 2,6-nonenal, furan-2-pentil, 2(3) furanon dihidro-5-pentil, 1,3-oktadien, dan naftalen. Perlakuan CO<sub>2</sub> cair dapat digunakan sebagai metode pasturisasi dingin untuk tempe. Disarankan untuk pengolahan tempe dengan metode CO<sub>2</sub> superkritik sebaiknya dilakukan pada tekanan 6.3 MPa dan waktu 10 menit.

## DAFTAR PUSTAKA

- Andres-Bello A, Barreto-Palacios V, Garcia-Segovia P, Mir-Bel J, Martinez-Monzo J. 2013. Effect of pH on color and texture of food products. *Food Eng Rev* 5: 158-170. DOI: 10.1007/s12393-013-9067-2.
- Aguila JS, Sasaki FF, Heiffig LS, Ortega EMM, Jacomino AP, Kluge RA. 2006. Fresh cut raddish using different cut types and storage temperature. *Postharvest Biol Tec* 40: 149-154. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2005.12.010.
- Azevedo ABA, Paulo M, Mohammed RS, Viera DM, Kieckbusch TG. 2008. Extraction of caffeine, chlorogenic acids and lipids from green coffee beans using supercritical carbon dioxide and co-solvents. *Braz J Chem Eng Brazilian* 25: 16-22. DOI: 10.1590/S0104-66322008000300012.
- Barrett DM, Beaulieu JC, Shewfelt R. 2010. Color, flavor, texture, and nutritional quality of fresh-cut fruits and vegetables: desirable levels, instrumental and sensory measurement, and the effects of processing. *Crit Rev Food Sci* 50: 369-389. DOI: 10.1080/10408391003626322.
- Beckman EJ. 2004. Supercritical and near-critical CO<sub>2</sub> in green chemical synthesis and processing. *J Supercrit Fluid* 28: 121-191. DOI: 10.1016/S0896-8446(03)00029-9.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. 2009. *Aroma Compounds*, In *Food Chemistry*, Springer.
- Bertucco A, Franceschin G. 2008. *Supercritical Fluid Extraction of Medicinal and Aromatic Plants: Fundamentals and Applications*. In *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Sukhdev Swami Handa, Suman Preet Singh Khanuja, Gennaro Longo, Dev Dutt Rakesh

- International Centre for Science and High Technology. Trieste, p.169-180.
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA. 2008. Mikrobiologi Kedokteran. Ed. 23, Penerbit Buku Kedokteran EGC. Hal 72-85.
- Brown ZK, Fryer PJ, Norton IT, Bridson RH. 2010. Drying of agar gels using supercritical carbon dioxide. J Supercrit Fluid 54: 89-95. DOI: 10.1016/j.supflu.2010.03.008.
- Brunner G. 2005. Supercritical fluids: technology and application to food processing. J Food Eng 67: 21-33. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2004.05.060.
- Calvo L, Torres E. 2010. Microbial inactivation of paprika using high-pressure CO<sub>2</sub>. J Supercrit Fluid 52: 134-141. DOI: 10.1016/j.supflu.2009.11.002.
- Dillow A, Dehghani F, Hrkach JS, Foster NR, Langer R. 2008. Bacterial inactivation by using near-and supercritical CO<sub>2</sub>. Proc Nat Acad Sci USA 96: 10344-10348.
- Feng XM, Larsen TO, Schnürer J. 2007. Production of volatile compounds by *Rhizopus oligosporus* during soybean and barley tempeh fermentation. Int J Food Microbiol 113: 133-141. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.025.
- Ferrentino G, Bruno M, Ferrari G, Poletto M, Balaban MO. 2009. Microbial inactivation and shelf life of apple juice treated with high pressure carbon dioxide. J Biol Eng 3: 1-9. DOI: 10.1186/1754-1611-3-3.
- Ferrentino G, Balzan S, Spilimbergo S. 2013. Optimization of supercritical carbon dioxide treatment for the inactivation of the natural microbial flora in cubed cooked ham. Int J Food Microbiol 2: 544-551. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.004.
- Gomez KA, Gomez AA. 1995. Statistical Procedures for Agricultural Research. Ed. 2. An International rice research Institute Book. John Wiley and Sons, New York.
- Guo M, Wu J, Xu Y, Xiao G, Zhang M, Chen Y. 2011. Effects on microbial inactivation and quality attributes in frozenlychee juice treated by supercritical carbon dioxide. Eur Food Res Technol 232: 803-811. DOI: 10.1007/s00217-011-1447-3.
- Han SH, Choi YD, Shin JK, Kim YC, Kim MS. 2008. Turbulent heat transfer of supercritical carbon dioxide in square cross-sectional duct flow. J Mech Sci Technol 22: 2563-2577. DOI: 10.1007/s12206-008-0711-3.
- Hashim IB, Nuaimi SA, Afifi HS, Taher H, Al-Zuhair S, Al-Marzouqi A. 2013. Quality Characteristics of low fat lamb meat produces by supercritical CO<sub>2</sub> extraction. Global Ins Res Edu 2: 5-9.
- James C, Eastoe J. 2012. Ion specific effects with CO<sub>2</sub>-philic surfactants. Cur Opin Colloid Int 18: 40-46. DOI: 10.1016/j.cocis.2012.12.004.
- Jelen H, Majchar M, Ginja A, Kuligowski M. 2012. Determination of compounds responsible for tempeh aroma. Food Chem 141: 459-465. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.03.047.
- Jurus AM, Sundberg WJ. 1976. Penetration of *Rhizopus oligosporus* into soybeans in tempe. Appl Environ Microbiol 32: 284-287.
- Keskin S, Kayrak-Talay D, Akman U, Hortac O. 2007. A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications. J Supercrit Fluid 43: 150-180. DOI: 10.1016/j.supflu.2007.05.013.
- Klensporf D, Jelen HK. 2005. Analysis of volatile aldehydes in oat flakes by SPME-GC/MS. Pol J Food Nutr Sci 14: 389-395.
- Liao H, Zhang L, Hu X, Liao X. 2010. Effect of high pressure CO<sub>2</sub> and mild heat processing on natural microorganisms in apple juice. Int J Food Microbiol 137: 81-87. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.004.
- Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP. 2012. Brock Biology of Microorganisms. 25-30. Pearsons Education Inc. San Fransisco.
- Mazzoni AM, Sharma RR, Demirci A, Ziegler GR. 2001. Supercritical carbondioxide treatment to inactivate aerobic microorganisms on alfalfa seeds. J Food Safety 21: 215-223. DOI: 10.1111/j.1745-4565.2001.tb00320.x.
- Meujo DAF, Kevin D, Peng J, Bowling JJ, Liu J, Hamann MT. 2004. Reducing oyster-associated bacteria levels using supercritical fluid CO<sub>2</sub> as an agent of warm pasteurization. Int J Food Microbiol 138: 63-70. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.012.
- Mulyowidarso RK, FleetGH, Buckle KA. 1989. The microbial ecology of soybean soaking for tempe production. Int J Food Microbiol 8: 35-46. DOI: 10.1016/0168-1605(89)90078-0.
- Namatsu H, Yamazaki K, Kurihara K. 1999. Supercritical drying for nanostructure fabrication without pattern collapse. J Microelectronic Eng 46: 129-132. DOI: 10.1016/S0167-9317(99)00033-7.
- Nout MJR, Kiers JL. 2005. Tempe fermentation, innovation and functionality: Up date into the third millennium. J Appl Microbiol 98:789-805. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02471.x.
- Parton TA, Bertucco, Bertoloni G. 2007. Pasteurization of grape must and tomato paste by dense-phase CO<sub>2</sub>. Ital J Food Sci 19: 425-437.
- Qin L, Ding X. 2007. Formation of taste and odor compounds in Douchiba, a Chinese traditional soy-fermented appetizer. J Food Biochem 31: 230-251. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2007.00105.x.
- Ramsay ME, Hsu JT, Novak RA, Reighter WJ. 1991. Processing rice brand by supercritical fluid extraction. Food Technol 30: 98-104.
- Rastogi NK, Raghavarao KS, Balasubramaniam VM, Niranjana K, Knorr D. 2007. Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. Crit Rev Food Sci Nutr 47: 69-112.
- Sparks D, Hernandez R, Zappi M, Blackwell D, Fleming T. 2006. Extraction of rice bran oil using supercritical carbon dioxide and propane. J Am Oil Chem Soc 83: 885-891. DOI: 10.1007/s11746-006-5042-x.
- Saputra D, Payne FA, Cornelius PL. 1991. Puffing dehydrated green bell pappers with CO<sub>2</sub>. Am Soc Agric Biol Eng 34: 475-480. DOI: 10.13031/2013.31686.

- Sparringa RA, Owens JD. 1999. Glucosamine content of tempe mould, *Rhizopus oligosporus*. *Int J Food Microbiol* 47: 153–157. DOI: 10.1016/S0168-1605(99)00020-3.
- Sparringa RA, Kendall M, Westby A, Owens JD. 2002. Effects of temperature, pH, water activity and CO<sub>2</sub> concentration on growth of *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710. *J Appl Microbiol* 92: 329–337. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01534.x.
- Tomasula PM, Boswell RT. 1999. Measurement of the solubility of CO<sub>2</sub> in milk at high pressure. *J Supercrit Fluids* 16: 21-26. DOI: 10.1016/S0896-8446(99)00019-4.
- Valverde MT, Marin-Iniesta F, Calvo L. 2010. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in conference pear with high pressure carbon dioxide and effects on pear quality. *J Food Eng* 98: 421-428. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2010.01.022.
- Werner BG, Hotchkiss JH. 2006. Continuous flow nonthermal CO<sub>2</sub> processing: The lethal effects of subcritical and supercritical CO<sub>2</sub> on total microbial population and bacterial spores in raw milk. *J Dairy Sci* 89: 872-881. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72151-8.
- White A, Burns D, Christensen TW. 2006. Effective terminal sterilization using supercritical carbon dioxide. *J Biotechnol* 123: 504-515. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.12.033.
- Xu Z, Zhanga L, Wanga Y, Bi X, Buckow R, Liao X. 2011. Effects of high pressure CO<sub>2</sub> treatments on microflora, enzymes and some quality attributes of apple juice. *J Food Eng* 104: 577–584. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2011.01.020.