

PEMANFAATAN *MILK CLOTTING ENZYME* DARI *Lactobacillus casei* D11 UNTUK PEMBUATAN KEJU MOZZARELLA

[Utilization of Milk Clotting Enzyme from *Lactobacillus casei* D11
for Mozzarella Cheese Making]

Rohmatussolihat*, Miranti Nurindah Sari, Puspita Lisdiyanti, Yantiyati Widyastuti,
dan Endang Sukara

Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Jl. Raya Bogor KM.46 Cibinong 16911

Diterima 28 November 2014 / Disetujui 15 Juni 2015

ABSTRACT

Milk Clotting Enzyme (MCE) is an active agent for cheese making which may be produced by Lactic acid bacteria (LAB). MCE activity differs according to the LAB strains used. *Lactobacillus casei* D11 could produce MCE when it is grown in MRS broth medium. In this study, MCE of *L. casei* D11 with the addition of rennet is used and optimized for the production of mozzarella cheese using Response Surface Method (RSM) with Central Composite Design (CCD). The organoleptic properties were determined by hedonics test involving 30 respondents and analyzed statistically which was followed by a Duncan's test. Furthermore, a proximate analysis of mozzarella cheese was conducted. Our results show that the MCE activity produced by *L. casei* D11 was 8.471 Soxhlet Unit with protease activity of 3.28 U/mL. The ANOVA results showed that the concentration of MCE significantly influence the production of curd. The optimum concentration of MCE and rennet for the production of curd suited for the production of mozzarella cheese were 20 and 0.002%, respectively, with a maximum predicted curd yield of 14.996% (g/100 mL milk) which is increased by 13.9% as compared to the curd yield before optimization. The statistical analysis on taste, color, flavor, and cheese texture by respondents shows that mozzarella cheese made by a combination of 15% of MCE and 0.00079 and 0.0015% of rennet, were organoleptically superior to the commercial mozzarella used in this experiment. The proximate analysis shows that mozzarella produced has a moisture content of 33.34% (w/w), 3.48% ash, 30.44% fat, 25.12% protein, 7.53% carbohydrate and energy of 404 kkal/100g.

Keywords: *Lactobacillus casei*, milk clotting enzymes, mozzarella cheese, optimization, utilization

ABSTRAK

Milk Clotting Enzymes (MCE) merupakan enzim penggumpal susu yang dapat diproduksi oleh bakteri asam laktat (BAL). MCE yang dihasilkan bervariasi tergantung kepada strain BAL yang dipakai. *L. casei* D11 dapat menghasilkan MCE jika ditumbuhkan dalam medium cair MRS. Dalam penelitian ini MCE yang dihasilkan oleh *L. casei* D11 dengan penambahan *rennet* dipakai dan dioptimasi untuk membuat keju mozzarella dengan menggunakan metoda statistik *Response Surface Method* (RSM) dengan *Central Composite Design* (CCD). Sifat organoleptiknya ditetapkan secara statistik dengan menggunakan hasil uji kesukaan (hedonik) dari 30 panelis dan dilanjutkan dengan uji Duncan's. Selanjutnya keju mozzarella yang dihasilkan dianalisis proksimatnya. Dari penelitian ini diketahui bahwa aktivitas MCE *L. casei* D11 adalah sebesar 8,471 Soxhlet Unit dengan aktivitas protease 3,28 U/mL. Hasil ANOVA menunjukkan bahwa konsentrasi MCE berpengaruh secara signifikan terhadap produksi *curd*. Kadar MCE dan *rennet* optimum untuk produksi *curd* berturut-turut sebesar 20 dan 0,002% dengan prediksi *curd* yang dihasilkan sebesar 14,99% (g/100 mL susu) atau meningkat sebesar 13,9% dibandingkan sebelum optimasi. Hasil analisis statistik rasa, warna, aroma, dan tekstur sampel keju mozzarella percobaan menunjukkan bahwa keju mozzarella yang dibuat dengan menggunakan 15% MCE yang ditambahkan 0,00079 dan 0,0015% *rennet*, yang secara organoleptik lebih unggul dari mozzarella komersial yang digunakan dalam penelitian ini. Hasil analisis proksimat keju mozzarella menunjukkan nilai kadar air (b/b) 33,34%, abu (3,48%), lemak (30,44%), protein (25,12%), karbohidrat (7,53%) dan energi sebesar 404 kkal/100 g.

Kata kunci: keju mozzarella, *Lactobacillus casei*, milk clotting enzyme, optimasi, pemanfaatan

*Penulis Korespondensi:
E-mail: rohmatussolihat@gmail.com; Telp.021-8754587, Fax. 021-8754588

PENDAHULUAN

Keju merupakan salah satu produk olahan susu yang mempunyai nilai gizi yang tinggi. Menurut Fox *et al.* (2000), berdasarkan konsistensinya, keju digolongkan ke dalam beberapa golongan yaitu keju sangat keras (Parmesan), keras (Cheddar, Emmental), semi lunak (Gouda, Limburger, Requefort) dan lunak (Brie, Cottage, mozzarella). Keju mozzarella merupakan keju asli Italia dan termasuk kelompok *pasca filata*. Keju jenis ini juga dikenal di Indonesia. Berbagai merk mozzarella seperti *Greenfield*, *Saputo*, *Perfetto*, *New Zealand* dan *Indrakila* sudah dapat kita peroleh dipasaran. Namun demikian, harga mozzarella cukup mahal dibandingkan dengan keju cheddar yang telah kita kenal selama ini. Harga 1 kilo mozzarella berkisar antara 85.000 dan 130.000 rupiah untuk merk lokal sedangkan untuk keju mozzarella impor jauh lebih mahal. Keju mozzarella banyak diminati karena sifat dan rasanya yang sangat khas seperti susu segar yang sedikit asin dan gurih. Kualitas keju mozzarella ditentukan oleh daya lelehnya. Semakin cepat meleleh, semakin bagus teksturnya dan semakin segar. Daya leleh mozzarella juga menentukan kemolorannya. Semakin molor, semakin bagus kualitasnya. Saat diiris, mozzarella harus terlepas dari *pizza cutter*. Bila keju mozzarella di atas pizza yang dipotong menempel pada *pizza cutter*, atau keju mozzarellanya tertarik ke salah satu sisi sehingga terlepas dari sisi lainnya, berarti daya lelehnya rendah (Kapoor dan Metzger, 2008; Mc Mahon *et al.*, 2005). Keju mozzarella adalah keju lunak dengan kandungan lemak antara 40–50%. Keju ini sangat spesifik sifatnya. Keju mozzarella akan meleleh ketika dipanggang, sangat cocok untuk topping pizza maupun campuran fritata. Penggunaan jenis keju mozzarella untuk pizza adalah untuk menambah tekstur pada bahan makanan karena sifatnya yang pejal dan mudah meleleh bila kena panas sehingga menambah cita rasa pizza Italia. Kemampuan meleleh dari keju mozzarella ini disebabkan adanya pemindahan panas sehingga terjadi perubahan fase keju dari padat menjadi leleh dan semakin besar sebaran lelehnya maka akan semakin baik. Karena sifatnya inilah keju mozzarella banyak sekali digunakan pada pizza dan lasagna.

Cara pembuatan keju mozzarella yaitu pemanasan dan pemuluran keju sampai tekstur yang diinginkan tercapai (Yu dan Gunasekaran, 2005). Pemanasan dan pelenturan dilakukan pada suhu 70–85°C tetapi kadang-kadang hanya 67°C (Purwadi dan Manab, 2014). Pemuluran dan peremasan/pengulenan juga dapat dilakukan dalam air panas sampai diperoleh produk dengan karakteristik berserabut, lunak dan elastis (Mijan *et al.*,

2010). Secara umum, proses pembuatan keju, termasuk keju mozzarella, meliputi beberapa tahap yaitu penggumpalan, pengasaman, pemotongan *curd*, penggaraman, pencetakan dan pematangan. Tahap penting dalam pembuatan keju adalah konversi susu menjadi gel semi solid melalui agregasi kasein, protein utama susu. Proses penggumpalan susu dikenal dengan istilah *milk clotting* (Rolet-Répécaud *et al.*, 2013). *Milk clotting* dapat dicapai dengan menggunakan enzim protease yang diperoleh dari berbagai sumber seperti hewan, tanaman dan fungi. *Milk Clotting Enzyme* (MCE) adalah *aspartic protease* (EC. 3.4.23.). *Milk clotting enzyme* yang umum dipakai untuk keperluan ini adalah *rennet* yang diproduksi dari perut sapi atau kambing muda (Ferrandini *et al.*, 2011; Diezhandino *et al.*, 2015). MCE asal perut sapi atau kambing muda harganya relatif mahal dan persediannya semakin terbatas seiring dengan semakin terbatasnya jumlah anak sapi atau kambing muda untuk keperluan ini. Kondisi ini telah memacu pencarian sumber *rennet* atau enzim penggumpal susu lainnya. Berbagai jenis mikroba dilaporkan mempunyai kemampuan menghasilkan MCE. Mikroba tersebut diantaranya yaitu *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus*, *Irpex lacteus*, *Penicillium oxalicum*, *M. miehei*, *Nocardiosis* sp, *Bacillus subtilis*, *A. oryzae*, *B. amyloliquefaciens* dan *Thermomucor indicaeseudaticae* (Vishwanatha *et al.*, 2010; He *et al.*, 2011; Dini *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013). *Mucor*, *aspergillus* dan *Endothia* merupakan produsen MCE komersial yang paling banyak digunakan pada pembuatan keju (Vishwanatha *et al.*, 2010).

Pada pembuatan keju mozzarella secara tradisional, penggumpalan susu biasanya dilakukan dengan pengasaman menggunakan asam organik atau diinokulasi dengan bakteri asam laktat (BAL) (Singh, 2003; Losito *et al.*, 2014). Penggunaan asam organik tidak lagi populer karena masalah keamanan pangan. Sementara itu penggunaan BAL, produk keju sulit distandarisasi kualitasnya. Penggunaan MCE yang berasal dari BAL menarik untuk dikembangkan disamping mempermudah standarisasi kualitas keju juga keamanan pangan karena BAL tergolong bakteri berkategori *Generally Recognized As Safe* (GRASS) (Sato *et al.*, 2004). Menurut (Sato *et al.*, 2004), BAL juga dapat menghasilkan proteinase ekstraselular yang memiliki sifat mampu menggumpalkan susu. MCE yang diproduksi oleh BAL ini sangat menarik untuk dikembangkan karena alasan keamanan pangan. Hasil penelitian sebelumnya (*unpublish*) telah berhasil mengisolasi BAL dari dadih yang diperoleh dari Pasar Bawah Bukit Tinggi Provinsi Sumatera Barat. Beberapa jenis BAL diketahui memiliki kemampuan menghasilkan MCE.

Jenis MCE yang dicari adalah enzim yang memiliki aktivitas *milk clotting* yang tinggi dengan aktivitas protease yang rendah (Rolet-Répécaud *et al.*, 2013). Penggunaan MCE semacam ini diasumsikan tidak akan merusak protein susu ketika susu menggumpal. Dengan penggunaan MCE tersebut, kualitas keju yang diperoleh optimal. Hal ini juga dipertegas oleh Guinee *et al.* (2002), yang mengungkapkan bahwa sifat kemoloran keju mozzarella ditentukan oleh kandungan casein yang utuh dan besarnya gugus peptida.

Tujuan dari penelitian ini adalah menguji coba kemampuan BAL khususnya *L. casei* D11 sebagai agensia penghasil MCE dengan aktivitas MCE tinggi dan memiliki aktivitas protease rendah dalam proses pembuatan keju mozzarella. Penelitian ini juga ditujukan untuk mengoptimasi pemakaian MCE dalam proses produksi keju mozzarella menggunakan RSM, menguji sifat organoleptik dan menganalisa proksimat keju mozzarella yang dihasilkan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah *L. casei* BAL D11 yang merupakan koleksi *Biotechnology Culture Collection* (BTCC)-Laboratorium Mikrobiologi Terapan, Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI. Bahan lain yang digunakan adalah susu sapi segar yang berasal dari sapi Friesian Holland (FH) yang dipelihara di Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Cibinong dan *rennet*/fromase 50 dari *Rhizomucor miehei* ([®]DSM Food specialties).

Kultivasi dan produksi MCE

Kultivasi *L. casei* D11 dan produksi MCE dilakukan pada media MRS. Sebanyak 5% (v/v) suspensi *L. casei* D11 diinokulasikan ke dalam 5 liter media cair MRS (Oxoid). Kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Hasil fermentasi disentrifugasi dengan menggunakan sentrifuse (Hitachi CR 216III dengan kecepatan 7840 g selama 10 menit pada suhu 4°C. Endapan berupa biomasa dibuang dan supernatan diambil. Supernatan dianggap sebagai enzim kasar (*crude enzymes*/CE) yang kemudian disebut MCE. MCE diukur kemampuan menghasilkan *curd* susu dan aktivitas enzim proteasenya. MCE selanjutnya digunakan pada pembuatan keju mozzarella.

Pengujian aktivitas MCE

Sebanyak 1 mL CE dimasukkan ke dalam 5 mL larutan 10% susu skim (w/v) yang dilarutkan dalam 0,01 M CaCl₂·2H₂O (Merck, Germany), inkubasi di penangas (Inkubator *waterbath*, Grant) pada suhu 37°C, kemudian terbentuknya *curd*

diamati dan lamanya proses pembentukan *curd* dicatat. Penghitungan aktivitas MCE dipergunakan rumus Kumar *et al.* (2005) sebagai berikut: $(2400/t) \times df$, dimana *t* adalah waktu *clotting* (menit) atau terbentuknya *curd* dan *df* adalah faktor pengenceran.

Pengujian enzim protease

Pengujian aktivitas enzim protease dilakukan dengan menggunakan metoda Arima *et al.* (1968) sebagai berikut: sebanyak 2,5 mL substrat (0,5% casein hammerstein (Merck, Germany) dalam 0,02 M buffer potassium fosfat pH 6,5 ditambah 0,5 mL CE, diinkubasi pada suhu 35°C selama 10 menit. Aktivitas enzim dihentikan dengan ditambahkan 2,5 mL 0,44 M Trichloroacetic Acid (TCA) (Merck, Germany). Selanjutnya larutan tersebut disentrifugasi pada kecepatan 7840 g selama 10 menit. Sebanyak 1 mL filtrat ditambahkan 2,5 mL 0,55 M Na₂CO₃ (Merck, Germany) dan 1 mL Folin Ciocalteau (3×) (Merck, Germany), diinkubasi pada suhu 35°C selama 20 menit. Kemudian dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer UV-18 (Shimadzu, Japan) pada panjang gelombang 660 nm.

Optimasi produksi *curd* dan pembuatan keju mozzarella

Optimasi penggunaan CE yang dihasilkan oleh *L. casei* D11 dalam pembuatan keju dilakukan dengan menggunakan RSM dengan rancangan percobaan *Central Composite Design* (CCD) (Mu *et al.*, 2009). Analisis dilakukan menggunakan *Software Statistic Design-ExpertR 7* (Stat-Ease Inc., USA, 2009). Parameter yang dibuat ialah dua faktor, yaitu konsentrasi CE (*X*₁) dan konsentrasi *rennet* (*X*₂) dengan lima tingkat kombinasi (Tabel 1). Respon yang diamati adalah aktivitas MCE dari CE yang diindikasikan dengan pembentukan *curd*. Model yang digunakan ialah *response surface* mengikuti persamaan:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j$$

Y adalah berat *curd* yang dihasilkan, sedangkan *X*₁, ..., *X*_{*j*} merupakan faktor yang diuji, β_0 adalah *intercept* dan β_i , β_{ij} adalah koefisien regresi. Sebanyak 13 rancangan percobaan (P1-P13) dilakukan dengan menggunakan CCD.

Susu segar dipanaskan hingga mencapai suhu 35°C, selanjutnya ditambahkan dengan 0,05% asam sitrat, MCE dan *rennet*. Kemudian diaduk secara perlahan, diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit, *curd* yang dihasilkan dipotong-potong, didiamkan selama 10 menit, cairan (*whey*) yang dihasilkan dibuang. Pematangan *curd* di-

lakukan berulang-ulang sampai *whey* habis. *Curd* yang dihasilkan ditimbang dan ditambahkan garam dapur, asam sitrat, dan sodium sitrat masing-masing sebesar 1,0; 0,1; 1,0 (b/b). *Curd* dipanaskan diatas air mendidih, ditarik-tarik ke arah atas (*stretching*) untuk mendapatkan keju mozzarella.

Tabel 1. *Central Composite Design* (CCD) dua aktor dengan lima tingkat kombinasi

Faktor	Tingkat Kombinasi				
	-1,414	-1	0	1	1,414
MCE (% v/v) (X_1)	7,929	10	15	20	22,071
<i>Rennet</i> (%, b/v) (X_2)	0,0008	0,001	0	0,002	0,002

Uji organoleptik keju mozzarella

Pengujian organoleptik keju mozzarella dilakukan dengan uji kesukaan (hedonik) menghasilkan metoda yang dikembangkan oleh Effendi *et al.* (2009). Uji kesukaan (hedonik) merupakan uji melibatkan panelis/responden. Dalam uji ini, panelis/responden diminta untuk memberi tanggapan pribadi mengenai kesukaan atau ketidaksukaan dan mengemukakan tingkat kesukaannya. Produk keju mozzarella komersial yang sudah dikenal oleh konsumen dikut sertakan sebagai pembanding.

Jumlah sampel yang diujikan pada penelitian ini yaitu sebanyak 15 sampel keju mozzarella terdiri atas 13 sampel hasil perlakuan menggunakan metode RSM (P1-P13), satu sampel tanpa penambahan MCE (P14) dan satu sampel keju mozzarella komersial (P15). Indikator pengujian ialah warna, aroma, rasa dan tekstur. Indikator penilaian yaitu tidak suka, kurang suka, suka dan sangat suka dengan skor penilaian masing-masing yaitu satu, dua, tiga dan empat. Jumlah panelis/responden non standar pada pengujian ini sebanyak 30 orang berdasarkan metode SNI 01-2346-2006 (BSN, 2006). Data yang diperoleh dalam bentuk angka, kemudian dianalisa dengan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Duncan.

Analisis proksimat keju mozzarella

Analisa proksimat keju meliputi kadar air, abu, lemak, protein, karbohidrat, analisis energi dan warna dan tekstur. Analisis proksimat dilakukan dengan menggunakan metode SNI 01-2891-1992 (BSN, 1992) dan AOAC (2010).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas MCE

Pertumbuhan dan produksi BAL *L. casei* D11 menggunakan media MRS. Media MRS mengan-

dung nutrisi yang sangat kaya dan dibutuhkan oleh BAL untuk pertumbuhan dan produksi metabolit sekunder (Zalán *et al.*, 2010; Moon *et al.*, 2012). Kandungan glukosa pada media MRS merupakan sumber karbon dan energi utama yang diperlukan untuk pertumbuhan BAL. Tween 80 yang terkandung dalam media MRS dapat merangsang pertumbuhan BAL dan meningkatkan laju pertumbuhan dan juga meningkatkan permeabilitas sel sehingga memungkinkan ekskresi produk dari sel ke medium pertumbuhan (Corcoran *et al.*, 2007).

Hasil pengujian menunjukkan, bahwa supernatan yang diproduksi oleh *L. casei* D11 memiliki aktivitas MCE sebesar 8471 Soxhlet unit. Supernatan juga memiliki aktivitas enzim protease sebesar 3,28 U/mL. Rolet-Répécaud *et al.* (2013) menekankan perlunya mencari MCE yang memiliki aktivitas proteolitik rendah agar susu tidak mengalami penguraian (*dissolution*) yang berlebihan. Penelitian mengenai MCE dari *L. casei* belum banyak diungkapkan. Sato *et al.* (2004) melaporkan bahwa salah satu jenis BAL yaitu *Enterococcus faecalis* TUA2495L mampu menghasilkan MCE sebesar 20 Soxhlet unit yang diproduksi pada medium produksi. *Milk clotting enzyme* dari *E. faecalis* TUA2495L telah berhasil dipakai untuk membuat keju camembert. Perbedaan aktivitas MCE dari kedua BAL tersebut disebabkan karena perbedaan jenis BAL yang digunakan, medium yang digunakan untuk produksi MCE dan metode pengukuran aktivitas MCE.

Proses produksi *curd* dan pembuatan keju mozzarella optimum

Pada penelitian pendahuluan, pembuatan keju dengan menggunakan MCE yang dihasilkan oleh *L. casei* D11 tidak optimal. Sehingga dalam penelitian ini, penambahan *rennet* juga dilakukan. Untuk mendapatkan konsentrasi MCE dan *rennet* yang tepat untuk menghasilkan *curd* yang optimal, dilakukan pengujian menggunakan metoda RSM-CCD seperti diuraikan dalam Tabel 2. Untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi MCE dan *rennet* dikembangkan model kuadratik (nilai *P*-nya <0,05) dengan selang kepercayaan 95%.

Berdasarkan hasil ANOVA (Tabel 3), nilai *F* dari model sebesar 11,3 dan nilai *prob>F* kurang dari 0,05. Nilai tersebut menunjukkan model yang signifikan dan hanya 0,0032 atau 0,32% kemungkinan terjadi gangguan. Hasil ANOVA menunjukkan konsentrasi MCE secara signifikan mempengaruhi produksi *curd*. Berdasarkan koefisien regresi (Tabel 4) dengan nilai regresi (R^2) sebesar 0,97 diperoleh persamaan sebagai berikut:

$$Y=12,934+1,133 X_1+0,734 X_1^2$$

pada persamaan tersebut, X_1 menunjukkan konsentrasi MCE dan Y adalah berat *curd* yang dihasilkan.

Grafik hasil percobaan divisualisasikan dalam bentuk tiga dimensi dan *plot contour* dari *response surface* yang menunjukkan hubungan antara dua faktor yang saling berinteraksi terhadap respon. Hubungan antara konsentrasi MCE, *rennet* dan interaksinya berpengaruh terhadap berat *curd* diperlihatkan pada Gambar 2. Hasil analisis data optimasi menunjukkan bahwa kondisi optimum untuk produksi *curd* ialah 20% MCE dan 0,002% *rennet*. Berdasarkan kondisi tersebut, dari perhitungan persamaan diperoleh berat *curd* yaitu sebesar 14,996% (gr/100 mL susu). Hasil optimasi tersebut meningkat 13,9% jika dibandingkan dengan produksi *curd* tanpa penambahan enzim MCE.

Proses pengumpulan susu menggunakan MCE dari *L. casei* D11 menghasilkan *curd* yang kurang ideal untuk pembuatan keju mozzarella. *Curd* yang dihasilkan memiliki ikatan yang tidak terlalu. *Curd* yang dihasilkan akan hancur ketika dilakukan pemotongan kuat sehingga diperlukan

sedikit penambahan *rennet*. Penambahan *rennet* dapat memperbaiki kualitas *curd*. Penggunaan campuran MCE dan *rennet* berhasil membentuk *curd* yang cukup ideal dikembangkan menjadi keju mozzarella. *Curd* memiliki ikatan yang cukup kuat dan tidak hancur ketika dilakukan pemotongan. Elastisitas keju yang dihasilkan menjadi lebih baik. Sifat kemoloran/*stretching* keju mozzarella sangat penting. Sifat ini terkait dengan keutuhan kasein dan besarnya gugus peptida (Dave *et al.*, 2003).

Tabel 4. Koefisien regresi dan signifikansi dari model *response surface quadratic*

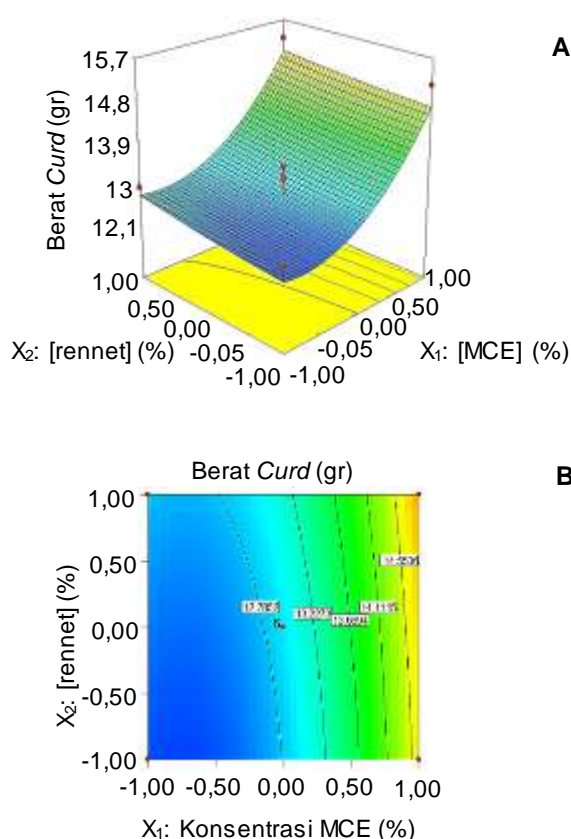
Faktor	Coefficient Estimate
Intercept	12,934
X_1 -[MCE]	1,133
X_2 -[Rennet]	0,176
X_1X_2	-0,022
X_1^2	0,734
X_2^2	0,041

Tabel 2. Rancangan percobaan CCD dan hasil

Faktor 1	Faktor 2	Faktor 1	Faktor 2	Nilai Respon
X_1	X_2	X_1	X_2	
(Konsentrasi MCE, %)	(Konsentrasi <i>Rennet</i> , %)	(Konsentrasi MCE, %)	(Konsentrasi <i>Rennet</i> , %)	
Level Terkode		Level Tak Berkode		Berat <i>Curd</i> (gr/100 mL Susu)
-1	-1	10	0,001	12,704 ± 0,317
1	-1	20	0,001	15,137 ± 0,305
-1	1	10	0,002	12,931 ± 0,440
1	1	20	0,002	15,275 ± 0,714
-1,414	0	7,929	0,0015	12,582 ± 0,906
1,414	0	22,071	0,0015	15,615 ± 0,130
0	-1,414	15	0,00079	12,341 ± 0,055
0	1,414	15	0,00221	13,081 ± 0,329
0	0	15	0,0015	13,403 ± 0,217
0	0	15	0,0015	12,857 ± 0,524
0	0	15	0,0015	13,167 ± 0,432
0	0	15	0,0015	12,114 ± 0,672
0	0	15	0,0015	13,127 ± 0,362

Tabel 3. ANOVA untuk *response surface quadratic*

Sumber	Sum of Squares	db	Mean Square	Nilai F	Nilai P Prob > F	Keterangan
Model	14,297	5	2,859	11,033	0,0032	signifikan
X_1 -[MCE]	10,275	1	10,275	39,647	0,0004	
X_2 -[Rennet]	0,249	1	0,249	0,961	0,359	
X_1X_2	0,002	1	0,002	0,008	0,933	
X_1^2	3,749	1	3,749	14,466	0,007	
X_2^2	0,011	1	0,011	0,044	0,840	
Residual	1,814	7	0,259			
Lack of fit	0,825	3	0,275	1,112	0,442	tidak signifikan
Pure error	0,989	4	0,247			
Cor total	16,111	12				



Gambar 2. *Response surface plots* bentuk tiga dimensi (A) dan bentuk *contour* (B) yang menggambarkan pengaruh konsentrasi MCE dan *rennet* terhadap berat *curd*

Keju mozzarella termasuk tipe keju dengan pengasaman langsung sehingga diperlukan penambahan asam sitrat. Asam sitrat dapat mempercepat proses penurunan pH susu dibandingkan dengan penambahan bakteri *starter*. Asam yang ditambahkan dalam pembuatan keju akan menurunkan pH susu segar dari 6,9-7,1 menjadi 5,8-6 sehingga kerja *rennet* optimal (Arinda *et al.*, 2013). Penambahan natrium sitrat pada proses pembuatan keju mozzarella berfungsi sebagai pengemulsi. Menurut Mc Sweeney (2007), fungsi penambahan pengemulsi pada keju olahan adalah mencegah pemisahan protein dan lemak dengan mengubah globula lemak menjadi lebih kecil, melarutkan protein keju dan mengikat air.

Nilai organoleptik keju mozzarella

Hasil uji hedonik (Tabel 5) menunjukkan bahwa panelis lebih menyukai rasa dan tekstur keju mozzarella hasil percobaan (P7 dan P11) dibandingkan dengan keju mozzarella komersial. Sedangkan untuk parameter warna dan aroma, keju mozzarella hasil percobaan tidak berbeda nyata dengan keju

mozzarella kontrol ($P > 0,05$) tetapi berbeda nyata dengan keju mozzarella komersial ($P < 0,05$).

Tabel 5. Hasil uji beda nyata terhadap uji organoleptik dari keju mozzarella

Sampel	Rasa	Warna	Aroma	Tekstur
P1	2,37 ± 0,81 ^{bc}	2,83 ± 0,70 ^b	2,63 ± 0,49 ^b	2,60 ± 0,56 ^{def}
P2	2,23 ± 0,82 ^b	2,83 ± 0,65 ^b	2,37 ± 0,61 ^b	2,77 ± 0,57 ^{def}
P3	2,60 ± 0,89 ^{bc}	3,03 ± 0,61 ^b	2,73 ± 0,78 ^b	2,47 ± 0,57 ^{cd}
P4	2,23 ± 0,97 ^b	2,97 ± 0,56 ^b	2,40 ± 0,72 ^b	2,70 ± 0,92 ^{def}
P5	2,60 ± 0,72 ^{bc}	2,97 ± 0,56 ^b	2,60 ± 0,67 ^b	2,10 ± 0,61 ^{bc}
P6	2,53 ± 0,82 ^{bc}	2,80 ± 0,89 ^b	2,50 ± 0,86 ^b	2,60 ± 0,81 ^{def}
P7	2,90 ± 0,80 ^d	3,07 ± 0,64 ^b	2,67 ± 0,80 ^b	2,73 ± 0,87 ^{def}
P8	2,77 ± 0,89 ^{cd}	3,07 ± 0,87 ^b	2,83 ± 0,91 ^b	2,83 ± 0,65 ^{def}
P9	2,60 ± 0,81 ^{bc}	2,97 ± 0,72 ^b	2,63 ± 0,85 ^b	2,57 ± 0,68 ^{de}
P10	2,27 ± 0,87 ^b	2,90 ± 0,86 ^b	2,43 ± 0,94 ^b	2,60 ± 0,88 ^{def}
P11	2,90 ± 0,88 ^d	3,00 ± 0,74 ^b	2,87 ± 0,82 ^b	3,03 ± 0,61 ^f
P12	2,77 ± 0,73 ^{cd}	3,07 ± 0,74 ^b	2,83 ± 0,83 ^b	2,97 ± 0,61 ^{def}
P13	2,77 ± 0,87 ^{cd}	3,03 ± 0,76 ^b	2,60 ± 0,81 ^b	2,87 ± 0,82 ^{def}
P14 (kontrol)	2,17 ± 0,98 ^b	2,80 ± 0,89 ^b	2,50 ± 0,82 ^b	2,03 ± 0,85 ^b
P15 (komersial)	1,17 ± 0,38 ^a	2,17 ± 0,95 ^a	1,73 ± 1,14 ^a	1,53 ± 0,86 ^a

Angka proksimat keju mozzarella

Keju mozzarella hasil percobaan perlu dianalisis proksimat untuk memperoleh informasi mengenai parameter kadar air, abu, lemak, protein, karbohidrat, warna dan tekstur. Analisis ini dilakukan pada keju hasil percobaan yang banyak disukai panelis. Informasi dari analisis proksimat diharapkan dapat dibandingkan dengan standar yang ada sehingga dapat menentukan kualitas keju yang dihasilkan.

Pada Tabel 6 menunjukkan bahwa kadar air keju mozzarella hasil percobaan yaitu 33,34%. Sedangkan menurut USDA (2005) kadar air keju mozzarella yaitu 52-60%. Sedangkan menurut Mc Mahon (2007) kadar air keju mozzarella sebesar 46%. Oleh karena itu keju mozzarella disebut keju semi padat. Perbedaan nilai kadar air keju percobaan yang berada dibawah standar dapat dipengaruhi oleh kualitas susu yang digunakan dan pemisahan *curd* dengan *whey*. Semakin banyak *whey* yang dapat dikeluarkan dari *curd* maka massa *curd*nya akan semakin padat. Pemotongan *curd* yang dilakukan berulang ulang menyebabkan *whey*

akan keluar lebih maksimal. Kadar air perlu diperhatikan karena berpengaruh terhadap masa simpan suatu produk. Kadar air dalam makanan dapat mempengaruhi penampakan, tekstur, cita rasa, kesegaran dan penerimaan konsumen. Kadar abu keju mozzarella percobaan cukup tinggi yaitu 3,48%, nilai ini lebih tinggi dibandingkan menurut Fox *et al.* (2000) yaitu sebesar 2,3.

Tabel 6. Hasil proksimat keju mozzarella percobaan

Parameter	Unit	Hasil Analisis
Kadar air (%)	g/100 g	33,34±0,33
Kadar abu (%)	g/100 g	3,48±0,16
Kadar lemak (%)	g/100 g	30,44±0,33
Kadar protein (%)	g/100 g	25,12±0,46
Kadar karbohidrat (%)	g/100 g	7,53±0,12
Energi (kkal/100 g)	g/100 g	404±0,70
Warna :		
Hunter L	-	68,96±0,29
Hunter a	-	2,65±0,07
Hunter b	-	26,46±0,28
Hunter C	-	26,59±0,28
Hunter h	-	84,33±0,47
Tekstur :		
Kekerasan	gf (gram force)	2596,07±1,46
Kelengketan	gf	-618,5±1,06
Keempukan	-	0,53±0,02
Kekenyalan	-	0,56±0,02

Keterangan: Perlakuan yang diikuti oleh huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata pengaruhnya

Analisa kadar lemak dan protein diperlukan untuk menentukan daya leleh keju mozzarella. Daya leleh berpengaruh terhadap kemuluran keju sehingga menentukan kualitas keju mozzarella. Dave *et al.* (2003) menyatakan bahwa daya leleh keju Mozzarella dipengaruhi oleh beberapa hal, antara lain kadar lemak dan keseimbangan interaksi antar molekul protein dan interaksi antara molekul protein dan air. Kadar lemak dan protein keju mozzarella percobaan yaitu 30,44 dan 25,12%. Menurut USDA (2005) kadar lemak dari keju mozzarella ≤ 10,8%. Sedangkan menurut Fox *et al.* (2000) keju mozzarella memiliki kandungan lemak sebesar 18,0% dan protein 22,1%. Kadar protein dan lemak yang lebih tinggi dipengaruhi oleh proses pengasaman awal dalam pembentukan *curd*. Pengasaman awal dapat mempengaruhi kadar kalsium, protein dan lemak keju. Gumpalan pada kondisi asam yang optimum mampu menghasilkan *curd* yang kompak dan kokoh, sehingga pada saat *curd* dipotong, tidak banyak lemak dan kasein hilang bersama *whey*. Hal ini yang menyebabkan kadar protein dan lemak di keju hasil percobaan cukup tinggi. Selain lemak dan

protein, kandungan karbohidrat dalam keju perlu diperhatikan. Keju mozzarella hasil percobaan mempunyai kandungan karbohidrat sebesar 7,5 gr/100 gr. Sedangkan berdasarkan informasi kandungan karbohidrat dipasaran yaitu 3 gr/100 g. Kandungan energi yang terdapat pada keju mozzarella hasil percobaan yaitu 404 kkal/100 gr lebih tinggi dari Fox *et al.* (2000) yaitu sebesar 289 kkal/100 gr.

Warna merupakan salah satu parameter yang diukur untuk menentukan kualitas keju. Keju mozzarella hasil percobaan memiliki warna putih kekuningan, hal ini sesuai dengan karakteristik keju mozzarella yang berwarna putih kekuningan yang lembut. Menurut USDA (2005) warna keju mozzarella adalah putih alami hingga krem muda. Keju mozzarella berwarna putih kekuningan dapat dipengaruhi oleh MCE yang dihasilkan oleh *L.casei* D11 berwarna coklat. Warna tersebut dihasilkan karena medium yang digunakan adalah MRS dan juga susu sebagai bahan baku. Menurut Legowo (2002), warna putih dari susu diakibatkan oleh dispersi yang merefleksikan sinar dari globula-globula lemak serta partikel-partikel koloid senyawa kasein dan kalsium fosfat. Warna kekuningan disebabkan adanya pigmen karoten yang terlarut di dalam lemak susu, sedangkan warna putih sedikit kebiruan dapat tampak pada susu yang memiliki kadar lemak rendah atau pada susu skim.

KESIMPULAN

Lactobacillus casei mempunyai aktivitas MCE sebesar 8,471 Soxhlet Unit dengan aktivitas protease 3,28 U/mL dan berpengaruh secara signifikan terhadap produksi *curd* pada proses pembuatan keju mozzarella. Kadar optimum MCE dan *rennet* berturut-turut yaitu 20% dan 0,002% dengan prediksi *curd* yang dihasilkan sebesar 14,996% (g/100 mL susu) atau meningkat sebesar 13,9%. Panelis lebih menyukai rasa dan tekstur sampel keju mozzarella yang dibuat dengan menggunakan 15% MCE yang ditambahkan 0,00079% dan 0,0015% *rennet* dibandingkan dengan keju komersial. Hasil analisis proksimat keju mozzarella menunjukkan nilai kadar air, abu, lemak, protein, karbohidrat masing masing sebesar 33,34; 3,48; 30,44; 25,12; 7,53% dan energi sebesar 404 kkal/100 g.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh DIPA Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI tahun 2014. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kurniawan dan Ade Nurrohmattullah yang telah membantu penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [AOAC] Association of Official Analytical Chemistry. 2010. Microchemical determination of nitrogen. Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry Washington DC: AOAC Int.
- Arima K, Yu J, Iwasaki S, Tamura G. 1968. Milk-clotting enzyme from microorganism: Purification and crystallization of *Mucor* rennet from *Mucor pusillus* var. Lindt. Appl Microbiol 16: 1727–1733.
- Arinda AF, Sumarmono J, Sulistyowati M. 2013. Pengaruh bahan pengasam dan kondisi susu sapi terhadap hasil/rendemen, keasaman, kadar air dan ketegaran (*firmness*) keju tipe mozzarella. J Ilmiah Peternakan 1: 455–462.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 1992. Standar Nasional Indonesia. SNI 01-2891-1992. Cara Uji Makanan dan Minuman. Badan Standardisasi Nasional. Jakarta
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2006. Standar Nasional Indonesia. SNI 01-2346-2006. Petunjuk Pengujian dan atau Sensori. Badan Standardisasi Nasional. Jakarta
- Corcoran BM, Stanton C, Fitzgerald GF, Rose RP. 2007. Growth of probiotic lactobacilli in the presence of oleic acid enhances subsequent survival in gastric juice. Microbiol 153: 291–299. DOI: 10.1099/mic.0.28966-0.
- Dave RIP, Sharma P, McMahon DJ. 2003. Melt and rheological properties of mozzarella cheese as affected by starter culture and coagulating enzymes. Le Lait 83: 61-77. DOI: 10.1051/lait:2002050.
- Diezhandino I, Fernández D, González L, Mc Sweeney PLH, Fresno JM. 2015. Microbiological, physico-chemical and proteolytic changes in a Spanish blue cheese during ripening (*Valdeón cheese*). Food Chem 168: 134–141. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.07.039.
- Dini CM, Garcia APC, Penna ALB, Gomes E, da Silva R. 2012. Use of a new milk-clotting protease from *Thermomucor indicaseudaticae* N31 as coagulant and changes during ripening of Prato cheese. Food Chem 130: 859–865. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.07.105.
- Effendi MH, Hartini S, Lusiastuti AM. 2009. Peningkatan kualitas yoghurt dari susu kambing dengan penambahan bubuk susu skim dan pengaturan suhu pemeraman. J Penelitian Medika Eksakta 8: 185-192.
- Ferrandini E, López MB, Castillo M, Laencina J. 2011. Influence of an artisanal lamb rennet paste on proteolysis and textural properties of Murcia al Vino cheese. Food Chem 124: 583–588. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.06.079.
- Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PLH. 2000. Fundamentals of Cheese Science. Aspen Publisher, Inc. Maryland.
- Guinee TP, Feeney EP, Auty MAE, Fox PF. 2002. Effect of pH and calcium concentration on some textural and functional properties of mozzarella cheese. J Dairy Sci 85: 1655–1669. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74238-0.
- He XL, Ren FZ, Guo HY, Zhang WB, Song X, Gan BZ. 2011. Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* D4. Korean J Chem Eng 28: 203–208. DOI: 10.1007/s11814-010-0347-8.
- Kapoor R, Metzger LE. 2008. Process cheese: scientific and technological aspects: a review. Compr Rev Food Sci Food F 7: 194-214. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2008.00040.x.
- Kumar S, Sharma NS, Saharan MR, Singh R. 2005. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. Process Biochem 40: 1701–1705. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.06.047.
- Legowo AM. 2002. Sifat Kimiawi, Fisik dan Mikrobiologi Susu. Diktat Program Studi Teknologi Hasil Ternak. [Diktat]. Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro. Semarang.
- Losito F, Arienzo A, Bottini G, Priolisi FR, Mari A, Antonini G. 2014. Microbiological safety and quality of mozzarella cheese assessed by the microbiological survey method. J Dairy Sci 97: 46–55. DOI: 10.3168/jds.2013-7026.
- Mc Mahon DJ, Paulson B, Oberg CJ. 2005. Influence of calcium, pH, and moisture on protein matrix structure and functionality in direct-acidified nonfat mozzarella cheese. J Dairy Sci 88: 3754-3763. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(05)73061-7.
- Mc Mahon DJ. 2007. Product specifications: mozzarella cheese specification no. 603. Mc mahon food global marketers. <http://www.mcmahon.com.au/specifications.html.29/01/07>. [9 Maret 2015].

- Mc Sweeney PLH. 2007. Cheese Problem Solved. CRC Press. New York.
- Mijan MA, Haque MA, Habib MA, Wadud MA. 2010. Evaluation of quality of mozzarella cheese. *Bangladesh Veterinarian* 27: 36–42. DOI: 10.3329/bvet.v27i1.5913.
- Moon SK, Wee YJ, Choi GW. 2012. A novel lactic acid bacterium for the production of high purity L-lactic acid *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CHB2121. *J Bioscience Bioeng* 114: 155–159. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.03.016.
- Mu W, Chen C, Li X, Zhang T, Jiang B. 2009. Optimization of culture medium for the production of phenyllactic acid by *Lactobacillus* sp. SK007. *Bioresource Technol* 100: 1366–1370. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.08.010.
- Purwadi, Manab A. 2014. Penggunaan tepung terigu dan alginat dalam pembuatan keju mozzarella ditinjau dari kualitas fisik dan organoleptik. *Res J Life Sci* 1: 43-53.
- Rolet-Répécaud O, Berthier F, Beuvier E, Gavoye S, Notz E, Roustel S, Gagnaire V, Achilleos C. 2013. Characterization of the non-coagulating enzyme fraction of different milk-clotting preparations. *LWT-Food Sci Technol* 50: 459–468. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.08.021.
- Sato S, Tokuda H, Koizumi T, Nakanishi K. 2004. Purification and characterization of an extracellular proteinase having milk-clotting activity from *Enterococcus faecalis* TUA2495L. *Food Sci Technol Res* 10: 44–50. DOI: 10.3136/fstr.10.44.
- Singh TK, Drake MA, Cadwallader KR. 2003. Flavor of cheddar cheese: a chemical and sensory perspective. *Compr Rev Food Sci Food F* DOI: 10.1111/j.1541 4337.2003.tb00021.x/pdf.
- [USDA] United State Department of Agricultural. 2005. Commercial Item Discription. Cheese, Mozzarella, Lite. The U.S. Department of Agriculture. United State.
- Vishwanatha KS, Appu Rao AG, Singh SA. 2010. Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 1849–1859. DOI: 10.1007/s00253-009-2197-z.
- Wu FC, Chang CW, Shih IL. 2013. Optimization of the production and characterization of milk clotting enzymes by *Bacillus subtilis* natto. *Springer Plus* 2: 33. DOI: 10.1186/2193-1801-2-33.
- Yu C, Gunasekaran S. 2005. A systems analysis of pasta filata process during mozzarella cheese making. *J Food Eng* 69: 399–408. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2004.08.031.
- Zalán Z, Hudáček J, Štětina J, Chumchalová J, Halász A. 2010. Production of organic acids by *Lactobacillus* strains in three different media. *Eur Food Res Technol* 230: 395–404. DOI: 10.1007/s00217-009-1179-9.