

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^{1)*}, Filli Pratama²⁾, Daniel Saputra²⁾ dan Agus Wijaya²⁾

¹⁾ Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, Bandar Lampung

²⁾ 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 CO₂ on the color and texture of tempe, and to identify the aroma of tempe after processed with supercritical CO₂. The experiment was carried out using Completely Randomized Block Design with three replications. The experimental factors were pressure treatment at supercritical (P_s) and liquid (P_c), and treatment time (T) at T₁, T₂, T₃, T₄ 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 ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE^* , but not significantly affected the textures. The best treatment was P_cT₁ 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 CO₂ treatment, but it also caused the formation of new volatile aroma compounds.

Keywords: aroma, color, supercritical CO₂, 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 CO₂ 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 CO₂ superkritis (P_s) dan CO₂ cair (P_c), dan faktor ke dua adalah waktu proses (T) yang terdiri dari T₁, T₂, T₃, T₄ masing-masing 5, 10, 15, dan 20 menit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan tekanan, waktu proses dan interaksinya berpengaruh nyata terhadap warna ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE^* dan berpengaruh tidak nyata terhadap tekstur tempe. Perlakuan P_cT₁ menghasilkan warna tempe terbaik dengan nilai $\Delta L^* - 2.13$; $\Delta a^* 0.28$; $\Delta b^* 0.97$ dan $\Delta E^* 0.77$. Perlakuan CO₂ superkritis mengakibatkan modifikasi warna, beberapa senyawa aroma tempe terekstraksi dan juga menghasilkan senyawa aroma bentuk baru.

Kata kunci: aroma, CO₂ 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 CO₂ dapat mencapai kondisi superkritik pada suhu rendah 31.1°C dan tekanan 7.35 MPa (Beckman, 2004; Brunner, 2005). Pada bentuk fluida superkritik CO₂ memiliki densitas seperti sifat zat cair, viskositas seperti sifat gas, dan difusivitas tinggi dengan sifat tegangan permukaan nol sehingga CO₂ superkritik dapat berfungsi sebagai solven di dalam ekstraksi, dan dapat menembus permukaan zat padat maupun cair. Dengan semakin berkembangnya teknologi CO₂ bertekanan tinggi, metode ini telah diaplikasikan untuk pengolahan produk pangan (Rastogi *et al.* 2007; Brunner, 2005). Hal ini karena CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂ superkritik terhadap kualitas kesegaran tempe antara lain warna, aroma dan tekstur tempe. Tempe yang telah diolah dengan CO₂ superkritik diharapkan mempunyai warna dan tekstur yang berbeda tidak nyata dengan tempe tanpa pengolahan dengan CO₂ bertekanan tinggi sehingga menghasilkan tempe segar yang masih disukai oleh konsumen. Hasil penelitian ini merupakan informasi pengetahuan dasar pengolahan minimal tempe menggunakan teknologi CO₂ superkritik.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan utama dalam penelitian ini adalah tempe dari PRIMKOPTI Macan Lindungan Palembang, dan gas karbondioksida (CO₂) 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 (Ps) dan fase cair (Pc), dan faktor II adalah waktu tekanan (T) yang terdiri dari empat level yaitu T₁, T₂, T₃, T₄ 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 Ps dan Pc 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 (± 10 cm, ± 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 CO₂ bertekanan tinggi. Alat pengolahan dengan CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂ dilakukan seperti yang diterangkan oleh Saputra *et al.* (1991) dengan cara meletakkan tempe kedalam tabung tekan kemudian setelah tabung ditutup aliran gas CO₂ 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 ΔE^* 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 Pc dan Ps 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 μ m) dan *fiber solid phase microextraction* (SPME) yaitu 65 μ 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.

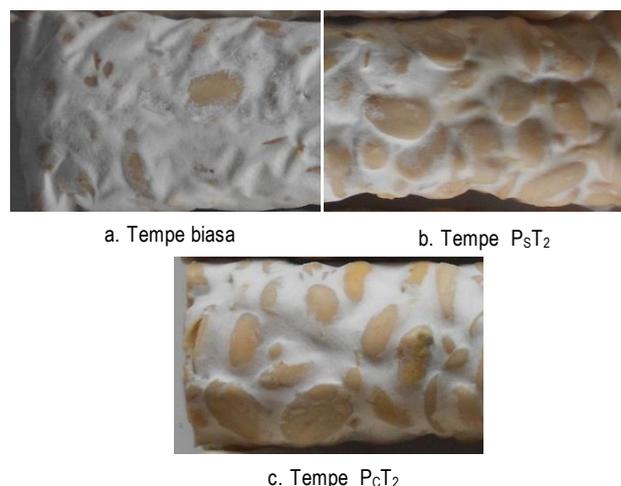
HASIL DAN PEMBAHASAN

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 CO₂ 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 CO₂ superkritik dan CO₂ cair dapat dilihat pada Gambar 1. Perbedaan derajat kemerahan (Δa^*), derajat kekuningan (Δb^*) dan derajat kecerahan (ΔL^*) antara tempe perlakuan dengan tempe kontrol, dihitung untuk mengetahui tingkat perbedaannya secara kuantitatif. Perbedaan total warna (*total color difference*, ΔE^*) juga dilakukan untuk mengetahui perbedaan warna secara keseluruhan. Hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa perlakuan tekanan, waktu tekanan dan interaksinya berpengaruh nyata terhadap ΔL^* . Hasil uji Duncan menunjukkan nilai ΔL^* semua perlakuan berbeda nyata satu dengan yang lain dan tempe P₂T₁ (-2.13) adalah paling cerah dan nilai ΔL^* tempe P₁T₄ (-7.93) paling gelap. Nilai ΔL^* tempe perlakuan Pc lebih rendah berbeda nyata dengan tempe Ps berarti lebih cerah. Nilai ΔL^* gelap karena warna kerusakan dinding sel miselium dan warna kedelai terkonsentrasi pada suatu area sebagai akibat proses tekanan CO₂ superkritik. Hal ini dapat dijelaskan bahwa aliran turbulensi CO₂ pada proses perlakuan tekanan CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂ superkritik, dan konsentrasi warna kedelai yang menonjol. Menurut Beckman (2004) dan Brunner (2005), CO₂ superkritik memiliki difusivitas yang tinggi dan tegangan permukaan nol. Hal ini menyebabkan CO₂ superkritik mudah menembus lapisan dinding sel (Ferrentino *et al.* 2009; White *et al.* 2006). Di dalam dinding sel CO₂ 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 CO₂ 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 T₄ lebih tinggi berbeda nyata dengan T₁ dapat dijelaskan bahwa semakin meningkatnya waktu perlakuan konsentrasi CO₂ 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 CO₂ hingga 0.03% (v/v). Hal ini terjadi pada tempe PsT₄ dan PcT₄.



Gambar 1. Kenampakan tempe biasa dan setelah perlakuan dengan CO₂ superkritik dan cair selama 10 menit

Tabel 1. Hasil pengukuran komponen warna tempe biasa dan tempe perlakuan CO₂ tekanan tinggi

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

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, P c= 6.3 MPa, T₁ = 5 menit, T₂ = 10 menit, T₃ = 15 menit, T₄ = 20 menit

Nilai Δa^* positif (+) mengindikasikan bahwa tingkat "kemerahan" pada sampel lebih tinggi dibanding standar. Analisis keragaman menunjukkan bahwa perlakuan tekanan, waktu tekanan dan interaksinya berpengaruh nyata terhadap Δa^* . Tabel 1 menunjukkan bahwa perlakuan PsT₁ tidak berbeda nyata dengan PsT₂, dan PsT₃ tetapi berbeda nyata dengan perlakuan lain. Nilai Δa^* tempe pada kisaran 0.6 hingga 2.03. Tempe PsT₂ mempunyai nilai Δa^* paling tinggi berarti mempunyai warna lebih gelap. Perubahan nilai Δa^* diakibatkan oleh menurunnya kandungan air dan lemak di dalam tempe karena terekstraksi oleh CO₂ superkritik. Lemak dapat mendispersikan cahaya pada saat pengukuran sehingga menurunnya kandungan lemak mengakibatkan nilai Δa^* meningkat atau warna berubah menjadi gelap. Hal ini terjadi pada nilai Δa^* tempe PsT₁ (1.70) lebih tinggi dibanding perlakuan PcT₁ (0.28). Menurut Brunner (2005) dan Brown *et al.* (2010), CO₂ superkritik mempunyai densitas yang lebih tinggi dan solvenitas yang lebih baik dibanding CO₂ cair. Hal ini mengakibatkan lemak dan air terekstraksi dalam CO₂ superkritik. Menurut Namatsu *et al.* (1999), Brown *et al.* (2010), dan Brunner (2005), kelarutan air di dalam CO₂ superkritik lebih tinggi dibanding CO₂ cair disebabkan oleh terbentuknya ikatan hidrogen antara molekul air dan CO₂ superkritik, disamping polaritas air yang besar. Pada saat pelepasan tekanan CO₂ 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 CO₂ superkritik mempunyai tingkat kecerahan yang rendah karena pengaruh dispersi cahaya.

Nilai Δb^* positif (+) makin tinggi mengindikasikan bahwa warna tempe lebih pucat. Hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa tekanan, waktu tekanan dan interaksinya berpengaruh nyata terhadap nilai Δb^* . Pada Tabel 1, nilai Δb^* pada kisaran 0.9 hingga 3.20, perlakuan PcT₁ berbeda tidak nyata dengan PcT₂ dan PcT₃ dan berbeda nyata dengan perlakuan lain. Nilai Δb^* tempe PsT₂ 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 CO₂ melalui interaksi asam basa Lewis membentuk asam karbonat. Menurut Dillow *et al.* (2008) dan Meujo *et al.* (2004), molekul air terlarut dalam CO₂ superkritik membentuk asam karbonat, dimana asam karbonat berfungsi sebagai donor ion H⁺ di dalam larutan. Makin tinggi tekanan CO₂ jumlah ion H⁺ makin meningkat, karena meningkatnya transfer massa CO₂ (Calvo dan Torres, 2010; Ferrentino *et al.* 2012). Warna pucat mengindikasikan peningkatan ion H⁺ dalam tempe atau nilai Δb^* tinggi. Menurut Andres-Bello *et al.* (2013), peningkatan ion H⁺ 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 ΔE^* . Tabel 1 menunjukkan bahwa nilai ΔE^* pada kisaran 0.77 hingga 2.70. Nilai ΔE^* tempe PcT₁ tidak berbeda

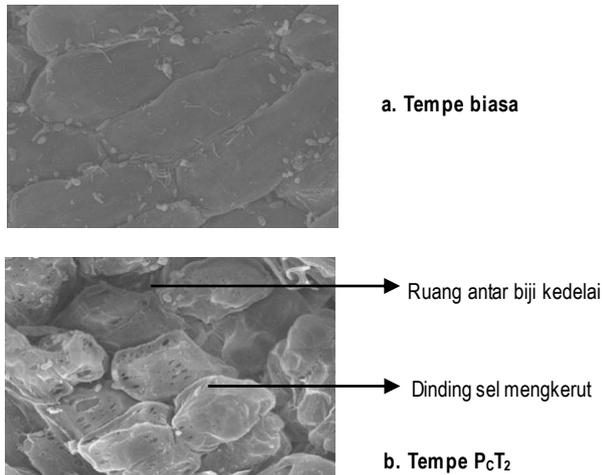
nyata dengan PcT₂ tetapi berbeda nyata dengan yang lain. Nilai ΔE^* paling rendah (0.77) terdapat pada tempe PcT₁ berarti sekilas terlihat ada perbedaan warna ($0.5 > \Delta E^* < 1.0$). Perbedaan nilai warna ΔE^* dapat disebabkan oleh kelarutan senyawa-senyawa kimia dalam tempe dan juga oleh miselium kapang tempe. Karbon dioksida superkritik mempunyai densitas dan kelarutan yang lebih tinggi dibanding CO₂ cair dan oleh karena itu kelarutan senyawa-senyawa kimia tempe lebih tinggi dalam CO₂ superkritik. Pada fase superkritik, CO₂ 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 P₁T₄ yang mempunyai ΔE^* 2.87. Pada CO₂ 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 CO₂ bertekanan tinggi terhadap kualitas jus apel menemukan bahwa nilai ΔE^* tidak berbeda dengan kontrol. Hal ini dapat disebabkan oleh perbedaan komponen penyusun matrik produk pangan. Menurut Dillow *et al.* (2008), efektivitas kelarutan CO₂ di dalam produk pangan dipengaruhi oleh sifat matrik dan komponen penyusunnya, dimana di dalam matrik cair difusivitas dan kelarutan CO₂ lebih tinggi dan sebaliknya matrik padat menghambat difusivitas CO₂. Guo *et al.* (2011); Xu *et al.* (2011) mengelompokkan nilai ΔE^* ke dalam lima golongan yaitu tidak terlihat bila ΔE^* 0 hingga 0.5, sekilas terlihat bila ΔE^* 0.5 hingga 1.0; sedikit terlihat bila ΔE^* 1.5 hingga 3.0; terlihat dengan baik bila ΔE^* 3.0 hingga 6.0; dan jelas terlihat bila ΔE^* 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 CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂ cair selama 10 menit

Senyawa aroma

Identifikasi senyawa aroma dilakukan terhadap tempe kontrol dan tempe PsT₁ (perlakuan CO₂ superkritik dan waktu 5 menit) dan tempe PcT₁ (perlakuan CO₂ cair dan waktu 5 menit). Hasil identifikasi senyawa aroma menunjukkan bahwa terdapat senyawa aroma yang terekstraksi dan terdapat senyawa aroma bentuk baru oleh perlakuan CO₂ tekanan tinggi. Tempe PcT₁ lebih banyak mengandung senyawa volatil aroma dibanding tempe PsT₁ karena beberapa senyawa volatil terekstraksi oleh CO₂ superkritik. Senyawa aroma yang berhasil diidentifikasi dari tempe PcT₁ 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 PsT₁ meliputi 8 senyawa alkohol, 5 senyawa ester, dan 3 senyawa asam karboksilat. Senyawa aroma yang terekstraksi oleh CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂ 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 (Klensporff 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 PcT₁ maupun tempe PsT₁. Tempe PcT₁ mempunyai aroma yang lebih menyenangkan dibanding tempe PsT₁ 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 Klensporff 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 padatempe tanpa perlakuan adalah 6.1×10^6 CFU/g (Tabel 1). Uji Duncan pengaruh interaksi perlakuan terhadap penurunan kapang (Tabel 1) menunjukkan bahwa perlakuan PsT₃ berbeda tidak nyata dengan PsT₄ dan PcT₄ tetapi berbeda nyata dengan perlakuan lain. Perlakuan PsT₃ dapat membunuh semua kapang yaitu sebesar 6.5 siklus log, sedangkan perlakuan PcT₁ hanya dapat membunuh 1.17 siklus log, atau paling rendah dalam eksperimen ini. Hal ini mengindikasikan bahwa CO₂ superkritik dengan 20 menit telah menginaktivasi kapang sebesar 6 siklus log sedangkan CO₂ 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 CO₂ 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, β -glukan dan lapisan sel membran yang terdiri dari fosfolipid. Glikoprotein, β -glukan dan fosfolipid mempunyai gugus fungsi yang bersifat nonpolar sehingga larut di dalam CO₂ 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 T₁ menurunkan kapang paling rendah yaitu 1.75 siklus log dan penurunan kapang pada T₄ paling besar yaitu 6.50 siklus log. Hal ini berarti kapang mati semua setelah perlakuan waktu 20 menit. Peningkatan waktu menyebabkan konsentrasi CO₂ di dalam sel semakin tinggi (Hong dan Pyun, 1999; Guo *et al.* 2011; Garcia-Gonzales, 2007). Kapang merupakan mikro-

organisme aerobik, meningkatnya akumulasi CO₂ di dalam substrat akan meningkatkan anaerobisitas, dan mengakibatkan kematian kapang. Demikian, dapat dinyatakan bahwa CO₂ superkritik dengan waktu 20 menit mempunyai efek pasturisasi sedangkan CO₂ cair mempunyai efek reduksi terhadap kapang tempe.

Sementara itu, kematian kapang pada perlakuan tekanan P_c lebih disebabkan oleh perbedaan fase CO₂. Pada tekanan 6.3 MPa dan suhu 25°C CO₂ dalam bentuk cair, tidak mempunyai kemampuan menembus sel membran karena densitas CO₂ cair (0.6 hingga 1.6 kg/dm³) lebih tinggi dibanding CO₂ superkritik (0.2 hingga 0.9 kg/dm³) (Brunner, 2005; Brown, 2010). Oleh karena itu, CO₂ cair hanya melarutkan sebagian senyawa penyusun dinding sel dan sel membran yang mempunyai gugus hidrofilik (Mathias *et al.* 2010). Proses *throttling* tidak terjadi dalam CO₂ 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 CO₂ 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_cT₂ hanya 1.9 siklus log mengindikasikan tempe masih berwarna putih karena masih terdapat miselium. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tempe P_cT₂ 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_s memiliki kadar air 60.06% lebih rendah berbeda nyata dengan tempe tekanan P_c yaitu 64.52% karena air terekstraksi oleh CO₂ superkritik. Tempe perlakuan waktu T₃ mempunyai kadar air 61.63% paling rendah berbeda nyata dengan perlakuan yang lain sedangkan T₁ (62.65%) paling tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa meningkatnya konsentrasi CO₂ seiring dengan meningkatnya waktu, relatif tidak berpengaruh pada perubahan kadar air. Tempe perlakuan P₂T₃ berbeda tidak nyata dengan P₂T₄ dan berbeda nyata dengan yang lain. Pada fase cair kelarutan CO₂ 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 CO₂ dan mengakibatkan kelarutannya dalam CO₂ superkritik lebih tinggi dibanding CO₂ cair. Hal ini terjadi pada

tempe tekanan 6.3 MPa suhu 25°C waktu 10 menit (P₂T₂) yang mempunyai kadar air paling tinggi (65.37%).

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂ cair dapat digunakan sebagai metode pasturisasi dingin untuk tempe. Disarankan untuk pengolahan tempe dengan metode CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂. *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 CO₂. *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 frozen lychee 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 CO₂ extraction. *Global Ins Res Edu* 2: 5-9.
- James C, Eastoe J. 2012. Ion specific effects with CO₂-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 CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂. *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 CO₂. *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 CO₂ 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 CO₂ in milk at high pressure. *J Supercrit Fluids* The 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 CO₂ processing: The lethal effects of subcritical and supercritical CO₂ 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 CO₂ 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.