

OPTIMASI PROSES PEMISAHAN WHEY PROTEIN DENGAN METODE OZONASI**OPTIMIZATION OF WHEY PROTEIN SEPARATION PROCESS USING OZONATION METHOD**Shafira Fauzi¹, Tita Rialita¹, Imas Siti Setiasih¹, Robi Andoyo^{1*}¹Departemen Teknologi Industri Pangan, Fakultas Teknologi Industri Pertanian, Universitas Padjadjaran*Email korespondensi: shafirafz@gmail.com**ARTICLE INFO***Article history*

Received: 18 March 2023

Accepted: 24 July 2023

Published: 12 August 2023

*Keywords :**aggregate, ozone, process optimization, separation method, whey protein**Kata kunci :*

agregat, metode pemisahan, optimasi proses, ozon, whey protein

ABSTRAK

Pemisahan whey protein umumnya menggunakan membran filtrasi dan pemanasan. Namun, membran filtrasi membutuhkan biaya operasional yang tinggi, sedangkan pemanasan dapat menyebabkan terjadinya protein deposit serta konsumsi energi tinggi. Metode alternatif pemisahan *whey protein* yang dapat digunakan yaitu ozonasi dengan metode gas *bubbling*. Ozon dapat digunakan dalam pemisahan *whey protein* karena dapat bereaksi dengan protein dan menyebabkan terjadinya pembentukan agregat yang dapat mempengaruhi turbiditas *defatted whey*. Faktor-faktor yang mempengaruhi kemampuan ozon dalam mengoksidasi bahan yaitu konsentrasi ozon, waktu ozonasi, laju alir, suhu, dan pH. Oleh karena itu, faktor tersebut dapat dimodifikasi agar proses pemisahan *whey* berjalan optimal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum dalam pemisahan *whey protein* menggunakan metode ozonasi dengan variasi konsentrasi ozon dan waktu ozonasi. Rancangan percobaan yang digunakan adalah *Response Surface Method* menggunakan desain *Central Composite Design* dengan faktor konsentrasi ozon (2,8-3,7 ppm) dan waktu ozonasi (10-30 menit). Hasil penelitian menunjukkan kondisi optimum pemisahan *whey protein* dengan konsentrasi ozon sebesar 3,7 ppm dan waktu ozonasi selama 27,8 menit memiliki perubahan turbiditas dengan nilai absorbansi sebesar 1,1025, warna dengan nilai *L** sebesar 73,99; nilai *a** sebesar 6,585; dan nilai *b** sebesar 29,79; solubilitas sebesar 11,69%, kadar protein sebesar 68,04%, kadar laktosa 29,61%, dan kadar air sebesar 5,58%.

ABSTRAK

Whey protein separation generally uses membrane filtration and heating. However, membrane filtration requires high operational costs, while heating can cause protein deposits and high energy consumption. An alternative method of separating whey protein that can be used is ozonation using the gas bubbling method. Ozone can react with protein and cause aggregate formation, affecting defatted whey's turbidity. Factors that influence the ability of ozone are ozone concentration, ozonation time, flow rate, temperature, and pH. Therefore, these factors can be modified to optimise the separation process. This study aims to determine the optimum conditions in whey protein separation using ozonation with variations in ozone concentration and ozonation time. The experimental design used was Response Surface Method using a Central Composite Design design with ozone concentration (2.8-3.7 ppm) and ozonation time (10-30 minutes). The results showed the optimum conditions for separation of whey protein with an ozone concentration of 3.7 ppm and an ozonation time of 27.8 minutes had a change in turbidity with an absorbance value of 1.1025, colour with a value of *L** of 73.99; *a** value of 6.585; and *b** value of 29.79; solubility of 11.69%, the protein content of 68.04%, lactose content of 29.61%, and moisture content of 5.58%.

Pendahuluan

Whey protein merupakan jenis protein globular yang terdiri atas 85-90% air dengan fraksi padat antara lain laktosa, protein, lemak, dan mineral. *Whey protein* dapat diaplikasikan pada bahan pangan sebagai bahan tambahan yang dapat meningkatkan karakteristik bahan

pangan seperti daya pengikat air, daya busa, gelasi, solubilitas, daya emulsi, dan viskositas (Shankar and Bansal, 2013).

Karakteristik *whey* yang dihasilkan dipengaruhi oleh metode pemisahan *whey protein* yang dilakukan. Metode pemisahan whey protein di industri saat ini dapat dilakukan

dengan menggunakan metode membran filtrasi dan pemanasan (Walstra *et al.*, 2006). Namun, membran filtrasi diaplikasikan terbatas pada industri besar karena biaya operasional yang tinggi, dan pemanasan dapat menyebabkan terjadinya protein deposit (Britz and Robinson, 2008). Studi perbandingan yang dilakukan oleh Agusti (2017) bahwa ozonasi dapat mereduksi bakteri *E.coli* pada susu sebanyak 1,86 D, dengan konsumsi energi lebih rendah yaitu dengan perbandingan 2:7. Oleh karena itu, dibutuhkan metode alternatif dalam pemisahan whey protein yaitu ozonasi. Menurut Violleau *et al* (2012), ozon dapat menghancurkan mikroorganisme dan bereaksi dengan molekul organik, seperti protein.

Efektivitas ozon dalam mengoksidasi suatu bahan dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu konsentrasi ozon, *flowrate* ozon, suhu, pH, dan keberadaan molekul organik (Cullen *et al.*, 2012; Jamil *et al.*, 2017; Khadre *et al.*, 2001). Sehingga dibutuhkan modifikasi faktor-faktor yang mempengaruhi efektivitas ozon agar pemisahan whey protein berjalan optimal. Efektivitas ozonasi mempengaruhi keberhasilan pemisahan *whey protein* yang ditandai dengan adanya perubahan turbiditas pada *defatted whey* sebelum dan sesudah ozonasi. Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini yaitu untuk menentukan kondisi optimal dalam pemisahan whey protein menggunakan metode ozonasi dengan variasi waktu ozonasi dan konsentrasi ozon.

Metodologi

Penetapan Kisaran Variabel Proses

Penetapan kisaran variabel proses berdasarkan literatur dan hasil penelitian pendahuluan yaitu hubungan antara konsentrasi ozon terlarut terhadap laju alir ozon pada suhu 3°C dan pH 4,6 dengan persamaan $y = -0,1207x + 3,9518 \dots (1)$ (x =laju alir; y =konsentrasi ozon), menghasilkan konsentrasi ozon maksimum yang dapat dihasilkan oleh generator ozon LUSO yaitu 3,87 ppm dengan laju alir 1 L/menit, dan konsentrasi ozon minimum yang dapat dihasilkan yaitu 2,16 ppm dengan laju alir 15 L/menit. Semakin kecil laju alir ozon maka semakin besar konsentrasi ozon terlarut. Laju alir mempengaruhi ukuran gelembung ozon. Laju alir yang rendah menghasilkan gelembung yang kecil. Gelembung kecil menyebabkan gelembung naik ke permukaan medium dengan lambat dan menyebabkan solubilitas ozon tinggi karena waktu kontak gelembung ozon dengan medium panjang. Disamping itu, untuk memperkecil ukuran gelembung dilakukan ozonasi dengan metode *gas bubbling* menggunakan batu gelembung. Gelembung yang kecil memperluas area permukaan kontak ozon sehingga solubilitasnya meningkat (Cullen *et al.*, 2010; Khadre *et al.*, 2001). Torlak (2014), menyatakan bahwa konsentrasi ozon sebesar 2,8 ppm dapat menyebabkan penurunan spora *Alicyclobacillus acidoterrestris* sebesar 2,2 siklus log tanpa menyebabkan adanya penurunan kandungan total fenolik yang signifikan. Oleh karena itu, 3,7 ppm digunakan sebagai konsentrasi maksimum dan 2,8 sebagai konsentrasi minimum pada kisaran variabel proses.

Waktu ozonasi dapat berpengaruh terhadap kemampuan ozon yaitu solubilitas. Semakin lama waktu ozonasi maka semakin banyak ozon yang bereaksi dengan komponen dalam bahan (Cullen *et al.*, 2010). Oleh karena itu, Waktu ozonasi maksimum yang digunakan yaitu selama 30 menit dan konsentrasi ozon minimum selama 10 menit. Hal ini dikarenakan waktu ozonasi yang terlalu singkat menghasilkan agregat whey protein yang kecil dan konsentrasi agregat yang rendah, sehingga sulit dipisahkan dalam proses sentrifugasi. Sedangkan waktu ozonasi yang terlalu panjang dapat mempertinggi resiko ozon bereaksi dengan komponen lain, selain protein. Nilai variabel bebas untuk optimasi proses ozonasi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai setiap Variabel Bebas untuk Optimasi Proses Ozonasi

Variabel	(-α)	(-)	(0)	(+1)	(+α)
Konsentrasi Ozon (ppm)	2,61	2,8	3,25	3,7	3,88
Waktu (menit)	5,8	10	20	30	34,14

Optimasi Pemisahan Whey Protein

Rancangan percobaan yang digunakan dalam optimasi pemisahan whey protein ini yaitu dengan *Response Surface Methodology* (RSM) menggunakan *software Design Expert 7.0.0* dengan model *Central Composite Design* (CCD) dan respon yang diuji yaitu perubahan turbiditas *defatted whey*. Ozon dapat bereaksi dengan protein dan menyebabkan terjadinya pembentukan agregat yang dapat mempengaruhi turbiditas *defatted whey*. Faktor yang digunakan yaitu waktu ozonasi dan konsentrasi ozon, dihasilkan 13 *run* dengan titik tengah yang diulang sebanyak 5 kali. Kisaran nilai masing-masing variabel ditetapkan berdasarkan penelitian pendahuluan yang dilakukan dan literatur yang didapat.

Kondisi optimal yang dipilih yaitu kondisi yang memiliki nilai *desirability* tertinggi. Sasaran konsentrasi ozon dan waktu ozonasi diatur *in range* karena konsentrasi ozon dan waktu ozonasi yang tinggi dapat meningkatkan resiko ozon bereaksi dengan komponen lain pada *defatted whey* selain protein, sedangkan apabila konsentrasi ozon dan waktu ozonasi terlalu rendah maka proses pemisahan whey protein tidak optimal. Sasaran perubahan turbiditas diatur pada *maximize* karena semakin besar perubahan turbiditas maka semakin banyak pula agregat yang terbentuk selama proses pemisahan whey protein. Optimasi yang dilakukan dikaji menggunakan *single objective optimization*, yaitu optimasi faktor pada masing-masing respon secara terpisah. Selanjutnya, WPC yang dihasilkan dari kondisi optimal dilakukan pengujian lanjutan yaitu uji warna (L^* , a^* , b^*), kadar protein, kadar laktosa, solubilitas, dan kadar air.

Pelaksanaan Penelitian

Persiapan bahan baku meliputi pembuatan *defatted whey* dari susu sapi segar melalui proses *renneting*

menggunakan rennet dan proses *defatting* menggunakan alat *cream separator*. Selanjutnya dilakukan pengondisian suhu *defatted whey* pada 3°C karena solubilitas dan stabilitas ozon lebih baik pada suhu rendah, lalu dilakukan pengondisian pH pada pH isoelektrik protein yaitu 4,6 menggunakan H₂SO₄ 1 M. Dilakukan pengujian turbiditas pada *defatted whey* sebelum ozonasi menggunakan *spectrophotometer UV-Vis*. Setelah itu, dilakukan pemisahan whey protein menggunakan metode ozonasi dengan variasi konsentrasi ozon dan waktu ozonasi. *Defatted whey* yang sudah diozonasi didiamkan selama kurang lebih 300 menit sampai konsentrasi ozon dalam bahan sebesar 0 ppm. Dilakukan uji turbiditas *defatted whey* sesudah ozonasi, agar dapat diketahui perubahan turbiditas yang dihasilkan setelah ozonasi. Selanjutnya dilakukan proses sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit, pengeringan vakum dengan tekanan 25 mmHg dan suhu sebesar 50°C selama 4 jam. Setelah itu, dilakukan pengecilan ukuran WPC menggunakan *grinder*, dan WPC bubuk disimpan di tempat tertutup. Pengamatan yang dilakukan yaitu perubahan turbiditas terhadap *defatted whey* dilakukan untuk memilih perlakuan terbaik. Selanjutnya, WPC yang dihasilkan dari perlakuan terbaik dilakukan pengujian lanjutan yaitu pengujian warna (L*, a*, b*), kadar protein, kadar laktosa, solubilitas, dan kadar air.

Uji Turbiditas

Uji turbiditas dilakukan pada seluruh sampel dengan variasi konsentrasi ozon dan waktu ozonasi. Sampel *defatted whey* sebelum dan sesudah perlakuan ozonasi, dan sampel kontrol (*aquades*) dimasukkan ke dalam kuvet yang berbeda, diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 600 nm (Liu *et al.*, 1994).

Pengujian Lanjutan WPC

Sampel WPC yang diproduksi pada kondisi pemisahan optimal dilakukan pengujian warna, kadar protein, kadar laktosa, solubilitas, dan kadar air. Uji warna menggunakan alat Spectrophotometer CM-5 dengan sistem CIE Lab dengan menguji nilai L*, a*, dan b* (De Man, 1997). Uji kadar protein dilakukan dengan metode mikro kjeldahl mengacu pada AOAC, (1990). Pengujian protein dengan metode mikro kjeldahl berfungsi untuk menganalisis kadar protein kasar dengan menghitung kadar nitrogennya, lalu mengalikan hasil kadar nitrogen dengan angka konversinya, yaitu 6,38. Uji kadar laktosa dilakukan menggunakan metode spektrofotometri mengacu pada Teles *et al.* (1978). Uji solubilitas dilakukan menggunakan metode gravimetri mengacu pada Collado, (1999). Uji kadar air dilakukan menggunakan metode gravimetri mengacu pada GEA Niro Research Laboratory (2006).

Hasil dan Pembahasan

Optimasi Pemisahan Whey Protein Menggunakan Metode Ozonasi

Optimasi proses pemisahan *whey protein* dilakukan untuk mendapatkan perlakuan terbaik untuk memisahkan *whey protein* yang diindikasikan dengan perubahan turbiditas. Perubahan turbiditas dari sebelum dan setelah ozonasi mengindikasikan adanya agregasi. Terbentuknya agregat mengindikasikan terbukanya struktur protein yang semula terlipat yang disertai dengan terjadinya agregasi, sehingga semakin tinggi turbiditas yang dihasilkan maka semakin banyak agregasi yang terbentuk (Qadeer *et al.*, 2014). Hasil perubahan turbiditas untuk setiap perlakuan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pemisahan Whey Protein

Run	Waktu Ozonasi (menit)	Konsentrasi Ozon (ppm)	Perubahan Turbiditas
1	34	3,25	1,3025
2	30	2,8	1,0895
3	30	3,7	1,38
4	20	2,61	1,0825
5	20	3,25	0,787
6	20	3,25	1,297
7	20	3,25	0,77
8	20	3,25	0,7975
9	20	3,25	0,8915
10	20	3,89	1,3945
11	10	2,8	0,1075
12	10	3,7	1,1105
13	5,8	3,25	0,016

Data respon pada Tabel 2 dikaji menggunakan *Response Surface Method* (RSM) dengan desain *Central Composite Design* menggunakan perangkat lunak *Design Expert 7.0.0*. *Design Expert* akan memberikan saran model persamaan pada respon yang menyatakan pengaruh dari faktor yang diujikan terhadap responnya, di mana model persamaan tersebut diuji menggunakan analisis varian (ANOVA) yang dapat dilihat pada Tabel 3. *Design Expert* menyarankan model persamaan liner untuk respon perubahan turbiditas. Namun model persamaan kuadratik memiliki nilai R² yang lebih tinggi, sehingga model yang digunakan adalah kuadratik.

Tabel 3. Hasil ANOVA pada Respon Perubahan Turbiditas

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F Value	p-value	
--------	----------------	----	-------------	---------	---------	--

					Prob > F	
Model	2,0196	5	0,4039	8,5667	0.0068	Signifikan
A [Ozon]	0,3762	1	0,3762	7,9779	0.0256	
B-Waktu	1,1788	1	1,1788	25,0008	0.0016	
AB	0,1269	1	0,1269	2,6917	0.1449	
A ²	0,1741	1	0,1741	3,6925	0.0961	
B ²	0,1201	1	0,1201	2,5484	0.1544	
Residual	0,3300	7	0,0471			
Lack of Fit	0,1325	3	0,0442	0,8950	0.5170	Tidak Signifikan
Pure Error	0,1975	4	0,0494			
Cor Total	2,3496	12				
R-Squared	0,8595					
Adj R-Squared	0,7592					

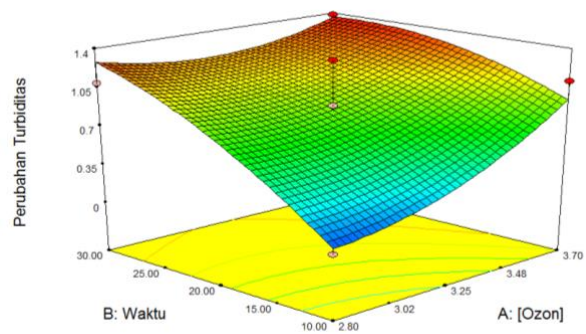
Model yang signifikan menandakan bahwa model persamaan berpengaruh secara nyata terhadap respon perubahan turbiditas. Parameter *lack of fit* dinyatakan tidak signifikan, artinya data respon yang dihasilkan memenuhi persamaan dengan model dengan ketidaksesuaian yang rendah antara data dengan model. Nilai R² menunjukkan bahwa 85,95% respon perubahan turbiditas dipengaruhi oleh kombinasi dua variabel bebas (konsentrasi ozon dan waktu ozonasi), sedangkan 14,05% respon perubahan turbiditas dipengaruhi oleh faktor diluar variabel bebas lainnya yang tidak dikondisikan dalam penelitian ini.

Berdasarkan ANOVA pada Tabel 3, diperoleh persamaan model optimasi yang digunakan untuk memprediksi respon perubahan turbiditas adalah sebagai berikut:

$$Y = 0,91 + 0,22 A + 0,38 B - 0,18 AB + 0,16 A^2 - 0,13 B^2 \dots\dots\dots (2)$$

Dimana Y adalah perubahan turbiditas, A adalah konsentrasi ozon (ppm) dan B adalah waktu ozonasi (menit).

Model persamaan (2) menunjukkan bahwa konsentrasi ozon dan waktu ozonasi mempengaruhi nilai respon perubahan turbiditas, baik pengaruh dari satu faktor secara independen maupun pengaruh dari interaksi antar faktor. Variabel dengan konstanta positif seperti konsentrasi ozon dan waktu ozonasi, akan meningkatkan nilai respon perubahan turbiditas. Sementara peningkatan nilai variabel yang memiliki konstanta negatif akan menurunkan nilai respon yang dihasilkan. Pengaruh faktor yang diujikan terhadap respon perubahan turbiditas dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Grafik Respon Perubahan Turbiditas yang dipengaruhi oleh Faktor Konsentrasi Ozon dan Waktu Ozonasi

Area grafik yang berwarna biru menunjukkan perubahan turbiditas yang rendah, sementara area grafik berwarna merah menunjukkan perubahan turbiditas yang tinggi. Gambar 1 menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ozon dan semakin lama waktu ozonasi maka semakin besar perubahan turbiditas yang dihasilkan. Menurut Cullen *et al.*, (2010) waktu kontak gelembung ozon dapat berpengaruh terhadap peningkatan kemampuan ozon salah satunya solubilitas, sehingga menyebabkan semakin banyak ozon yang bereaksi dengan protein dalam *defatted whey*. Semakin besar konsentrasi ozon terlarut maka semakin tinggi kemampuan ozon untuk mengoksidasi protein dalam *deffated whey*, sehingga terbentuk agregat dengan ukuran yang besar dan konsentrasi agregat yang tinggi, dan menghasilkan perubahan turbiditas yang besar.

Menurut Uzun *et al.*, (2012), perlakuan ozon mempengaruhi sifat fungsional protein sebagai akibat dari perubahan struktural oleh oksidasi, salah satunya yaitu solubilitas. Perubahan solubilitas pada protein diindikasikan dengan terjadinya perubahan turbiditas pada *defatted whey* setelah ozonasi. Hal tersebut didukung oleh pendapat Liu *et al.*, (1994) bahwa denaturasi protein dapat mengakibatkan terjadinya agregasi, sehingga mengakibatkan terjadinya penurunan solubilitas protein yang ditandai dengan peningkatan turbiditas.

Ozon bereaksi dengan protein dan menyebabkan oksidasi pada ikatan polipeptida protein, ikatan peptida pecah, *protein crosslinking*, dan modifikasi ikatan asam amino. Seluruh asam amino berpotensi menjadi target oksidasi oleh oksigen reaktif, sebagian besar asam amino aromatik tiroksin, triptofan, fenilalanin, sulfur yang mengandung asam amino sistein, metionin, dan asam amino alifatik arginin, lisin, prolin, dan histidin sensitif terhadap oksidasi. Struktur ulir (*helices*), lembaran (*sheets*), lilitan (*coil*), dan cabang terlipat (*folded branches*) yang merupakan struktur sekunder dan tersier dapat dimodifikasi oleh reaksi ozon dengan protein. Reaksi ozon mengubah gugus tiol sistein menjadi disulfida yang dapat mendenaturasi protein dan mengubah solubilitasnya (Uzun *et al.*, 2012) Pembentukan ikatan disulfida, ditirosin, dan kemungkinan hubungan silang karbonil, bersama dengan

interaksi hidrofobik, antara molekul protein teroksidasi menyebabkan agregasi protein yang luas (Kong *et al.*, 2013)

Optimasi dilakukan untuk mendapatkan kombinasi dari waktu ozonasi dan konsentrasi ozon yang menghasilkan perubahan turbiditas yang maksimal. Kriteria dari perlakuan yang diinputkan ke dalam *Design Expert* 7.0.0 adalah *in range*, yaitu menggunakan nilai faktor terendah dan tertinggi seperti yang dilakukan pada perancangan percobaan. Kriteria yang diinputkan untuk respon perubahan turbiditas adalah *maximize* yang artinya respon yang diharapkan memiliki nilai setinggi-tingginya mendekati batas maksimal. Kriteria optimasi respon dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Kriteria Optimasi Respon

Parameter	Sasaran	Batas Bawah	Batas Atas	Importance
Konsentrasi Ozon	<i>In range</i>	2,8	3,7	+++
Waktu	<i>In range</i>	10	30	+++
Perubahan Turbiditas	<i>Maximize</i>	0,016	1,3945	+++

Design Expert memberikan beberapa solusi optimasi proses dengan *desirability* yang berbeda, jika terdapat beberapa solusi yang ditawarkan maka solusi dengan nilai *desirability* yang paling mendekati 100% diharapkan menjadi solusi terbaik. Solusi optimasi yang dipilih yaitu menggunakan konsentrasi ozon sebesar 3,7 ppm dan waktu ozonasi selama 27 menit 48 detik dengan nilai *desirability* sebesar 97,799%.

Validasi Kondisi Optimal

Berdasarkan solusi optimasi proses yang dipilih oleh *Design Expert* yaitu dengan konsentrasi ozon sebesar 3,7 ppm dan waktu ozonasi selama 27 menit 48 detik dengan nilai *desirability* sebesar 97,799%, maka dilakukan validasi pada kondisi optimal tersebut. Validasi berfungsi untuk mengetahui apakah hasil yang didapat sudah sesuai dengan perhitungan model persamaan optimasi respon. Kondisi ozonasi optimal yang dipilih oleh *Design Expert* dilakukan validasi untuk mendapatkan nilai validasi. Nilai validasi merupakan rasio perbandingan antara nilai pengujian respon yang didapat dengan nilai pengujian respon yang diprediksikan oleh RSM. Hasil validasi kondisi optimal dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Validasi Kondisi Optimal

Faktor		Perubahan Turbiditas		Validasi	R ²	Desirability
Konsentrasi Ozon (ppm)	Waktu Ozonasi (menit)	Prediksi	Aktual			
3,7	27,8	1,36416	1,1025	80,82%	85,95%	97,799%

Prediksi repon perubahan turbiditas pada titik optimal yang diberikan oleh RSM yaitu dengan nilai absorbansi sebesar 1,36416. Sedangkan nilai absorbansi respon turbiditas yang didapatkan dari proses validasi yaitu

sebesar 1,1025, sehingga menghasilkan nilai validasi sebesar 80,82%. Nilai validasi dan nilai koefisien determinasi (R²) berada pada rentang 70-90% yang artinya memiliki konsistensi yang tinggi.

Pengujian Lanjutan Kondisi Optimal

WPC yang dihasilkan melalui pemisahan *whey protein* pada kondisi optimal dilakukan pengujian warna, solubilitas, kadar protein, kadar laktosa, dan kadar air pada WPC yang dihasilkan pada kondisi optimal yang dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Pengujian Lanjutan Kondisi Optimal

Faktor	Waktu Ozonasi (menit)	Warna			Solubilitas (%)	Kadar Protein (%)	Kadar Laktosa (%)	Kadar Air (%)
		L*	a*	b*				
3,7	27,8	73,99 ±0,37	6,585 ±0,07	29,79 ±0,34	11,69 ±0,01	68,04 ±0,51	29,61 ±2,91	5,58 ±0,11

Warna

Sistem warna yang digunakan adalah CIELAB dengan parameter L*, a*, dan b*. Perubahan warna yang terjadi pada produk WPC setelah mengalami proses pengeringan vakum menyebabkan warna menjadi kuning kecoklatan sampai coklat gelap. Warna yang gelap ditunjukkan dengan nilai L* yang rendah, warna yang berubah menjadi coklat ditunjukkan dengan peningkatan nilai a* (mendekati merah), dan warna kuning ditunjukkan dengan nilai b* yang tinggi (mendekati kuning). Hasil WPC pada kondisi optimal memiliki warna dengan nilai L* sebesar 73,99±0,37, nilai a* sebesar 6,585±0,07, dan nilai b* sebesar 29,79±0,34. Rendahnya nilai L*, cukup tingginya nilai a*, dan tingginya nilai b* menunjukkan bahwa WPC kondisi optimal memiliki warna kuning kecoklatan. (Wright *et al.*, 2009) menyatakan bahwa nilai L* dan a* sangat sensitif terhadap perubahan warna selama penyimpanan bubuk *sweet whey* yang disebabkan adanya reaksi maillard.

Reaksi Maillard merupakan reaksi antara gugus amino protein dengan gugus karbonil laktosa. Reaksi Maillard meningkat seiring dengan tingkat keparahan perlakuan panas dan peningkatan pH. Efek merugikan dari reaksi ini adalah hilangnya asam amino esensial, terutama lisin yang sangat reaktif. Hasil akhir dari reaksi Maillard ini adalah melanoidin yang berwarna coklat sehingga nilai kecerahan pada WPC rendah (Onwulata, 2005; Winarno, 2002).

Faktor lain yang dapat mempengaruhi warna WPC yaitu ukuran partikel WPC. Ukuran partikel yang lebih kecil akan membuat luas permukaan menjadi lebih besar, sehingga lebih banyak sinar yang dipantulkan dibandingkan dengan partikel yang lebih besar sehingga akan menghasilkan kecerahan yang lebih tinggi (Brimelow and Joshi, 2001).

Kadar Protein

Kemampuan WPC dalam meningkatkan karakteristik bahan pangan seperti memodifikasi tekstur, menstabilkan emulsi, daya ikat air, daya busa, gelasi, dan solubilitas, sangat dipengaruhi oleh kemampuan protein (Shankar and Bansal, 2013). Kadar protein WPC pada kondisi ozonasi optimal sebesar $68,04 \pm 0,51\%$, yang berarti bahwa WPC yang dihasilkan termasuk ke dalam WPC 60. Menurut Page *et al.*, (2004), WPC 60 memiliki kadar protein tidak kurang dari 60%.

Faktor yang mempengaruhi kadar protein yaitu banyaknya agregat yang terbentuk saat ozonasi yang dapat diindikasikan dengan terjadinya peningkatan turbiditas setelah ozonasi. Ozonasi mempengaruhi sifat fungsional protein sebagai akibat dari perubahan struktural oleh oksidasi. Denaturasi protein dapat mengakibatkan terjadinya agregasi, sehingga mengakibatkan terjadinya penurunan solubilitas protein yang ditandai dengan peningkatan turbiditas (Liu *et al.*, 1994; Uzun *et al.*, 2012). Semakin banyak molekul whey protein yang teragregasi maka semakin banyak molekul protein yang dapat terpisah saat dilakukan sentrifugasi, sehingga kadar protein WPC akan meningkat.

Kadar protein WPC juga dipengaruhi oleh ukuran agregat whey protein. Ukuran agregat yang maksimal terbentuk pada pH isoelektrik protein. Menurut Guyomarc'h *et al.*, (2015), pada rentang pH 4,5-5,7 dan 5,7-5,9 whey protein berada pada titik isoelektriknya sehingga terbentuk agregat besar bulat monodispersi dan menghasilkan pemisahan fasa makroskopik. Sementara pada pH rendah (2,5-4,0) dan pH tinggi ($>6,3$) terbentuk untaian kecil yang fleksibel. Ukuran agregat mempengaruhi berat molekul whey protein. Partikel protein dengan berat molekul yang rendah akan sulit terpisah menjadi endapan saat proses sentrifugasi, sehingga akan terbawa bersama supernatan.

Kadar Laktosa

WPC yang dihasilkan pada kondisi optimal ozonasi memiliki kadar laktosa sebesar $29,61 \pm 2,91\%$. Hal tersebut sudah sesuai dengan pendapat Page *et al.*, (2004) bahwa kadar laktosa pada WPC 60 yaitu sebesar 25-30%.

Laktosa merupakan disakarida yang terdiri dari D-glukosa dan D-galaktosa. Gugus aldehida galaktosa berikatan dengan gugus glukosa C-4 melalui ikatan β -1,4-glikosidik. Reagen atau enzim yang sesuai dapat menyebabkan oksidasi ringan, dimana gugus aldehida diubah menjadi gugus karboksil. Oksidasi yang lebih kuat dapat merusak ikatan glikosidik dan menghasilkan gugus karboksil pada gula yang tersisa (Walstra *et al.*, 2006). Menurut Gutiérrez *et al.* (2012), oksidasi pada laktosa dapat menghasilkan asam laktobionat yang dapat meningkatkan rasa pahit atau asam dari makanan, sehingga keberadaannya dalam WPC dapat mempengaruhi rasa produk akhir dari makanan yang diformulasikan dengan WPC.

Solubilitas

Solubilitas WPC sangat mempengaruhi tekstur akhir produk yang dihasilkan. Penambahan WPC dengan solubilitas yang tinggi pada bahan pangan padat dapat menyebabkan tekstur bahan menjadi keras. Oleh karena itu, WPC dengan solubilitas yang tinggi lebih cocok diformulasikan dalam minuman tinggi protein, sedangkan WPC dengan solubilitas yang rendah lebih cocok diformulasikan dalam makanan padat. WPC pada kondisi optimal memiliki solubilitas sebesar $11,69 \pm 0,01\%$, sehingga baik untuk diformulasikan pada makanan padat.

Solubilitas dipengaruhi oleh kadar air, daya serap dan ukuran partikel WPC. Kadar air yang tinggi menyebabkan WPC menjadi sulit menyebar apabila dilarutkan di dalam air, hal tersebut dikarenakan WPC cenderung lekat sehingga tidak terbentuk pori-pori dan akibatnya bahan menjadi tidak mampu untuk menyerap air dalam jumlah besar, sehingga solubilitasnya pun rendah. Daya serap air yang rendah menyebabkan solubilitas WPC dalam air rendah pula (Kania *et al.*, 2015). Ukuran partikel berpengaruh pada luas permukaan WPC. Semakin kecil ukuran partikel, maka semakin besar luas permukaan WPC, maka interaksi antara air dan protein akan semakin besar, sehingga solubilitasnya pun akan semakin meningkat.

Kadar Air

Kadar air pada WPC bubuk dapat mempengaruhi kenampakan, tekstur, serta cita rasa. Kandungan air dalam bahan ikut menentukan penerimaan, kesegaran, dan daya tahan bahan (Winarno, 2002). WPC yang dihasilkan pada kondisi optimal ozonasi memiliki kadar air sebesar $5,58\% \pm 0,11$. Kadar air pada WPC kondisi optimal melebihi literatur kadar air WPC 60, yaitu pada rentang 3,0%-5,0%. Hal ini dikarenakan perbedaan proses pengeringan WPC oleh Page *et al.*, (2004) yang menggunakan proses pengeringan *spray dryer* dengan suhu yang lebih tinggi, sementara pengeringan WPC hasil ozonasi dilakukan dengan *vacuum dryer* dengan suhu yang lebih rendah. Faktor lain yang mempengaruhi perbedaan kadar air WPC dengan literatur yaitu penyimpanan. Penyimpanan yang kurang baik menyebabkan terjadinya peningkatan kadar air pada WPC karena proses adsorpsi. Adsorpsi merupakan proses penyerapan uap air dari udara ke dalam bahan sampai mencapai titik kesetimbangan (Nurhadi and Nurhasanah, 2010).

Perbedaan karakteristik WPC komersial yang diperoleh dengan metode membran filtrasi, WPC yang diperoleh menggunakan metode ozonasi pada kondisi optimal berdasarkan hasil penelitian ini, dan WPC yang diperoleh menggunakan metode pemanasan pada suhu 90°C dan pH 4,6 yang dihasilkan oleh Agusti (2017) dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Perbedaan Karakteristik WPC

Karakteristik	WPC Komersial	WPC Kondisi Optimal Ozonasi	WPC dengan metode pemanasan (90°C; pH 4,6)
Kadar Protein	73,36%	68,04%	54,935%
Kadar Laktosa	15,64%	29,61%	41,505%
Kadar Air	4,81%	5,58%	6,5675%

Tabel 7 menunjukkan bahwa proses pemisahan whey protein dapat mempengaruhi karakteristik WPC yang dihasilkan.

Kesimpulan

Keberhasilan pemisahan whey protein menggunakan metode ozonasi dengan faktor konsentrasi ozon dan waktu ozonasi diindikasikan dengan terjadinya perubahan turbiditas sebelum dan setelah ozonasi. Kondisi optimal didapatkan pada konsentrasi ozon sebesar 3,7 ppm dan waktu ozonasi selama 27 menit 48 detik. Perubahan turbiditas yang didapatkan dengan nilai absorbansi sebesar 1,1025 dengan tingkat validasi dari model persamaan kuadrat sebesar 80,82%. Variabel konsentrasi ozon dan waktu ozonasi berkorelasi positif terhadap perubahan turbiditas. WPC yang diperoleh pada keadaan ozonasi optimal memiliki warna dengan nilai L^* sebesar 73,99; nilai a^* sebesar 6,585; dan nilai b^* sebesar 29,79; solubilitas sebesar 11,69%, kadar protein sebesar 68,04%, kadar laktosa 29,61%, dan kadar air sebesar 5,58%.

Ucapan Terimakasih

Ucapan terimakasih bersifat opsional. Bagian ini memuat apresiasi penulis kepada pihak-pihak yang membantu dalam terlaksananya penelitian baik dalam bentuk dana, perizinan, pengerjaan, pengumpulan dan analisis data, konsultan, dan lainnya.

Daftar Pustaka

- Agusti, H.R., 2017. Studi Perbandingan Proses Pasteurisasi dan Ozonasi Susu pada Penurunan *Escherichia coli* (Skripsi). Departemen Teknologi Industri Pangan, Fakultas Teknologi Industri Pertanian, Jatinangor.
- Association of Official Analytical Chemists, Helrich, K. (Eds.), 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 2: ..., 15th. ed. ed. AOAC, Arlington, Va.
- Brimelow, C.J.B., Joshi, P., 2001. Colour measurement of foods by colour reflectance, in: Instrumentation and Sensors for the Food Industry. Elsevier, pp. 85–116. <https://doi.org/10.1533/9781855736481.1.85>
- Britz, T.J., Robinson, R.K. (Eds.), 2008. Advanced Dairy Science and Technology. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. <https://doi.org/10.1002/9780470697634>
- Collado, L., 1999. Heat-moisture treatment effects on sweetpotato starches differing in amylose content. Food Chemistry 65, 339–346. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00228-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00228-3)

- Cullen, P.J., Tiwari, B.K., Valdramidis, V.P. (Eds.), 2012. Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods, 1st ed. ed, Food science and technology international series. Academic, London; Waltham, MA.
- Cullen, P.J., Valdramidis, V.P., Tiwari, B.K., Patil, S., Bourke, P., O'Donnell, C.P., 2010. Ozone Processing for Food Preservation: An Overview on Fruit Juice Treatments. Ozone: Science & Engineering 32, 166–179. <https://doi.org/10.1080/01919511003785361>
- De Man, J., 1997. Kimia Pangan. Penerbit ITB, Bandung.
- GEA Niro Research Laboratory, 2006. GEA Niro Analytical Method. Available at : <http://www.niro.com/methods> (accessed 9.20.17).
- Gutiérrez, L.-F., Hamoudi, S., Belkacemi, K., 2012. Lactobionic acid: A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications. International Dairy Journal 26, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.05.003>
- Guyomarc'h, F., Famelart, M.-H., Henry, G., Gulzar, M., Leonil, J., Hamon, P., Bouhallab, S., Croguennec, T., 2015. Current ways to modify the structure of whey proteins for specific functionalities—a review. Dairy Science & Technology 95, 795–814. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0190-5>
- Jamil, A., Farooq, S., Hashmi, I., 2017. Ozone Disinfection Efficiency for Indicator Microorganisms at Different pH Values and Temperatures. Ozone: Science & Engineering 1–10. <https://doi.org/10.1080/01919512.2017.1322489>
- Kania, W., Andriani, M.M., Siswanti, 2015. Pengaruh Variasi Rasio Bahan Pengikat Terhadap Karakteristik Fisik dan Kimia Granul Minuman Fungsional Instan Kecambah Kacang Komak (*Lablab purpureus* (L) sweet). Jurnal Teknosains Pangan 4.
- Khadre, M.A., Yousef, A.E., Kim, J.-G., 2001. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. Journal of Food Science 66, 1242–1252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15196.x>
- Kong, B., Xiong, Y.L., Cui, X., Zhao, X., 2013. Hydroxyl Radical-Stressed Whey Protein Isolate: Functional and Rheological Properties. Food and Bioprocess Technology 6, 169–176. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0674-8>
- Liu, T.X., Relkin, P., Launay, B., 1994. Thermal denaturation and heat-induced gelation properties of β -lactoglobulin. Effects of some chemical parameters. Thermochemica Acta 246, 387–403.
- Nurhadi, B., Nurhasanah, S., 2010. Sifat Fisik Bahan Pangan. Widya Padjadjaran, Bandung.
- Onwulata, C. (Ed.), 2005. Encapsulated and powdered foods, Food science and technology. Taylor & Francis, Boca Raton.
- Page, J., Meyer, D., Haines, B., 2004. Reference Manual for U.S. Whey and Lactose Products. Dairy Export Council, United State.
- Qadeer, A., Zaman, M., Khan, R.H., 2014. Inhibitory effect of post-micellar SDS concentration on thermal aggregation and activity of papain. Biochemistry (Moscow) 79, 785–796. <https://doi.org/10.1134/S0006297914080069>
- Shankar, J.R., Bansal, G.K., 2013. A Study on Health Benefits of Whey Proteins. International Journal of Advanced Biotechnology and Research 4, 15–19.

- Teles, F.F.F., Young, C.K., Stull, J.W., 1978. A Method for Rapid Determination of Lactose. *Journal of Dairy Science* 61, 506–508.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(78\)83626-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(78)83626-1)
- Torlak, E., 2014. Efficacy of ozone against *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. *International Journal of Food Microbiology* 172, 1–4.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.035>
- Uzun, H., Ibanoglu, E., Catal, H., Ibanoglu, S., 2012. Effects of ozone on functional properties of proteins. *Food Chemistry* 134, 647–654.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.146>
- Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J., 2006. *Dairy science and technology*, 2nd ed. ed, Food science and technology. CRC/Taylor & Francis, Boca Raton.
- Winarno, F., 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Wright, B.J., Zevchak, S.E., Wright, J.M., Drake, M.A., 2009. The Impact of Agglomeration and Storage on Flavor and Flavor Stability of Whey Protein Concentrate 80% and Whey Protein Isolate. *Journal of Food Science* 74, S17–S29.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00975.x>