

AGEN KYURING ALAMI PENGGANTI NATRIUM NITRIT SINTETIS PADA KYURING DAGING SAPI

Eko Saputro^{1,2}, V.P. Bintoro² dan Y.B. Pramono²

¹Balai Besar Pelatihan Peternakan Batu, Kementerian Pertanian
Jl. Songgoriti No. 24 Batu 65301 - Indonesia

²Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro
Kampus Tembalang, Semarang 50274 – Indonesia
Email Korespondensi: ekosaputrobbppbatu@gmail.com

ABSTRACT

The high temperature exposure on the food containing synthetic sodium nitrite (NaNO_2) can cause the formation of harmful compounds of N-nitrosamine carcinogen. Nitrite (NO_2^-) have also been reported to react with amine in gastric acid to form N-nitrosamine. N-nitrosamine carcinogen can induce tumor in many organs of the human body. The objectives of this study were to investigate the capacity of activity of nitrate reductase (ANR) and determine the formulation of various fresh vegetables that are naturally rich in nitrate (NO_3^-) as a natural curing agent substitute for synthetic sodium nitrite in beef curing. Natural sources of nitrate of fresh vegetables is expected to be safer and healthier for consumption. The leaf and leaf stalks of fresh celery, fresh red spinach and fresh marigolds were separated and evaluated ANR respectively in their ability to produce nitrite during a certain incubation time. Nitrite in fresh vegetables is utilized to react to pigment beef in complex reactions series of curing. In general, the evaluation of leaf ANR showed higher than leaf stalk ANR of fresh celery and fresh red spinach. Natural nitrite that is generated by leaf of fresh celery, fresh red spinach and fresh marigolds was 0.69; 0.73 and 0.63 mg $\text{NO}_2^-/\text{g/h}$ respectively. Natural curing process of beef requires incubation time which allows the conversion of nitrate to nitrite which is sufficient to produce the characteristics of naturally cured beef products similar to the conventional curing using synthetic sodium nitrite. Fresh celery leaf is recommended as a natural curing agent of beef curing because it has long been recognized by consumers more suited to a wide range of processed beef products. Natural curing of beef using fresh celery leaf is recommended as much as 22 g and incubate at room temperature for 2 hours to produce the NO_2^- equivalent of 30 ppm NaNO_2 .

Key Words: natural curing, natural curing agent, activity of nitrate reductase, fresh celery leaf and beef

PENDAHULUAN

Daging sapi merupakan sumber protein hewani yang paling lezat, paling mahal dan ketersediaannya di menu makan menjadi penanda kemakmuran suatu keluarga dan kemewahan suatu pesta adat di Indonesia. Daging termasuk pangan yang cepat rusak (*perishable food*) karena kaya akan nutrien/zat gizi sehingga menjadi media paling ideal bagi mikroorganisme termasuk bakteri pembusuk dan patogen tumbuh dan berkembangbiak. Upaya pengawetan daging harus dilakukan agar tetap aman dan sehat sepanjang periode penyimpanan daging sampai siap

dikonsumsi. Salah satu upaya tersebut adalah proses kyuring. Menurut Sebranek (2009) proses kyuring didefinisikan sebagai penggunaan garam dapur (NaCl) dan nitrit (NO_2^-) (bentuk yang direduksi dari nitrat, NO_3^-) untuk mengubah secara kimiawi properti fisik, kimiawi dan mikrobiologis produk daging.

Nitrit memiliki efek positif yang menguntungkan yang bertanggungjawab untuk pengembangan warna dan citarasa kyuring, sumber antioksidan yang kuat untuk melindungi citarasa dari ketengikan dan beraksi sebagai antimikrobia yang kuat untuk mengontrol pertumbuhan *Clostridium botulinum* penghasil toksin botulisme yang mematikan (Skibsted, 2011). Tidak ada senyawa yang telah ditemukan sampai saat ini yang dapat menggantikan secara efektif semua fungsi nitrit yang berperan dalam daging kyuring. Hasil dan informasi yang dikumpulkan dari berbagai upaya penggantian nitrit telah meningkatkan pengetahuan tentang pentingnya natrium nitrit serta kesulitan menghilangkannya dari sistem kyuring daging (Sebranek, 2009).

Penggunaan sendawa (natrium nitrat/nitrit) sintetis dalam proses kyuring konvensional juga memiliki efek negatif yang telah mengundang kekhawatiran terhadap keamanan pangan yang diantaranya dapat menyebabkan methaemoglobinemia dan pembentukan karsinogen N-nitrosamin (Santamaria, 2006; Sindelar dan Milkowski, 2012). Hal tersebut telah menjadi alasan banyak peneliti untuk menemukan pengganti natrium nitrit sintetis dan untuk menemukan alternatif kyuring alami yang dipersepsikan lebih sehat dan lebih aman. Selain itu, Badan Standarisasi Nasional (BSN) Indonesia juga melarang kalium/natrium nitrat/nitrit sintetis untuk digunakan dalam standar pangan organik (BSN, 2002). Menurut Mitchell (2006), produk organik dan alami tetap merupakan salah satu dari kategori produk yang paling cepat berkembang dari kategori produk pangan di pasaran.

Menurut Sebranek (2009), ada 2 pendekatan untuk menghilangkan dan mengganti nitrit, yaitu penggantian langsung dan tidak langsung. Penggantian langsung didefinisikan sebagai penghilangan lengkap nitrat dan nitrit dari sistem kyuring sementara penggantian tidak langsung adalah proses menghilangkan sebagian atau seluruh nitrat dan nitrit dari sistem kyuring dan menggantinya dengan sumber lain seperti sayuran yang secara alami kaya nitrat.

Sebranek dan Bacus (2007) telah menjelaskan proses kyuring daging yang disebut kyuring alami. Proses ini menggunakan bahan-bahan alami yang secara alamiah mengandung kadar nitrat yang relatif tinggi dikombinasi dengan kultur starter bakteri yang menghasilkan enzim nitrat reduktase untuk mereduksi nitrat menjadi nitrit. Menurut Fujihara *et al.* (2001) beberapa sayuran telah terbukti memiliki kadar tinggi nitrat secara alamiah. Sebuah survei nasional daging kyuring dan sayuran pada tahun 2009 dilakukan oleh Keeton *et al.* (2012) untuk menilai kandungan nitrat dan nitritnya disajikan pada Tabel 1. Santamaria *et al.* (1999) telah melaporkan bahwa kadar enzim nitrat reduktase (NR) paling banyak ditemukan di daun kemudian batang, akar, buah dan yang terkecil ditemukan di biji. Hal inilah yang mendasari peneliti memilih mengevaluasi kembali kandungan NR pada daun dan tangkai daun sayuran segar yang paling banyak dan mudah didapatkan di lingkungan masyarakat Indonesia.

Penelitian kyuring alami oleh Sindelar *et al.* (2007^a); Sindelar *et al.* (2007^b) Sindelar *et al.* (2010); Terns *et al.* (2011^a) dan Terns *et al.* (2011^b) menggunakan agen kyuring alami berupa bubuk jus sayuran atau buah dan kultur starter *Staphylococcus carnosus* yang menghasilkan enzim nitrat reduktase yang mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit. Reduksi nitrat menjadi nitrit oleh kultur starter dilakukan melalui tahap inkubasi pada suhu yang memenuhi persyaratan spesifik pertumbuhan dari mikroorganisme yang digunakan dan dilakukan selama jangka waktu tertentu sebelum tahap pemasakan/pengolahan termal. Penelitian sebelumnya telah merekomendasikan minimal 2 jam inkubasi untuk pembangkitan nitrit yang cukup untuk selanjutnya mengembangkan karakteristik daging kyuring.

Tabel 1. Kandungan Nitrat dan Nitrit Berbagai Sayuran Segar

| Sayuran Segar | Konsentrasi Nitrat | | Konsentrasi Nitrit | |
|---------------|--------------------|--------|--------------------|--------|
| | Kisaran | Rataan | Kisaran | Rataan |
| | (ppm) | | | |
| Bayam | 65-8.000 | 2.797 | 0,0-137,2 | 8,0 |
| Seledri | 20-4.269 | 1.496 | 0,02-0,5 | 0,1 |
| Brokoli | 29-1.140 | 394 | 0,01-9,5 | 0,6 |
| Kubis/Kol | 37-1.831 | 418 | 0,01-0,4 | 0,1 |
| Lobak | 79-2.171 | 850 | 0,01-9,7 | 0,6 |

Sumber: Keeton *et al.* (2012)

Kultur starter bakteri pereduksi nitrat, seperti *Staphylococcus carnosus* di Indonesia sampai saat ini masih belum tersedia dan terkoleksi di hampir semua lembaga penelitian yang ada, termasuk di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Ketersediaannya harus diimpor dari luar negeri seperti dari Amerika Serikat atau Eropa yang telah tersedia secara komersial untuk kultur starter bakteri pereduksi nitrat, seperti *Staphylococcus carnosus*. Tentunya akan menjadi sangat mahal untuk pengadaannya sehingga sangat tidak praktis bagi para produsen produk daging kyuring, seperti sosis, dendeng dan kornet daging.

Pemecahan masalah tersebut dapat dilakukan melalui penyelidikan penggunaan hanya sayuran segar sebagai agen kyuring alami daging sapi tanpa dikombinasi dengan kultur starter bakteri pereduksi nitrat. Hal ini karena sayuran segar yang secara alami memiliki kandungan nitrat yang tinggi berkorelasi dengan kadar enzim nitrat reduktase (NR) yang juga tinggi (Santamaria *et al.* 1999). Sayuran segar menyimpan banyak nitrat sebagai substrat NR dalam vakuola yang sewaktu-waktu dapat dipindahkan ke sitosol untuk direduksi menjadi nitrit oleh NR (Heldt 2005). Kyuring alami daging sapi dengan sayuran segar kaya nitrat yang akan direduksi menjadi nitrit akan mengandalkan NR yang terkandung dalam sayuran segar dan yang dihasilkan oleh bakteri pereduksi nitrat yang menurut Pinotti *et al.* (2001) secara alami terdapat pada daging sapi segar.

Penelitian ini bertujuan untuk menyelidiki ANR berbagai sayuran segar dalam kemampuannya menghasilkan nitrit dalam jangka waktu inkubasi tertentu. Kapasitas ANR akan menjadi dasar jumlah penggunaan atau formulasi sayuran segar sebagai agen kyuring alami pada kyuring alami daging sapi yang dalam

jangka waktu inkubasi tertentu dapat menghasilkan NO_2^- yang setara dengan konsentrasi NaNO_2 sintetis yang biasanya digunakan dalam kyuring konvensional.

BAHAN DAN METODE

Berbagai sayuran segar yang diselidiki kapasitas ANR-nya meliputi: seledri segar, bayam merah segar dan kenikir segar yang diperoleh dari Bandungan, Kabupaten Semarang. Bahan-bahan untuk pengujian ANR meliputi: larutan stock NaNO_3 5 M; larutan buffer fosfat 0,1 M pH 7,5; reagen pewarna N-naphthylethylene diamine (NED) 0,02% dan sulfanilamide (SA) 1% dalam 3 N HCl; aquades bebas nitrit dan larutan standard NaNO_2 40 μM . Peralatan yang dibutuhkan untuk pengujian ANR adalah spektrofotometer (Shimadzu UV Visible UVmini-1240, Jepang).

Rancangan penelitian yang digunakan adalah deskriptif (*descriptive research*) dengan 3x ulangan. Penelitian secara deskriptif, dengan hanya menjelaskan fenomena yang diperoleh dalam penelitian yang dilihat dari data keratanya.

Berbagai sayuran segar dipanen pada dini hari sehingga terjamin kesegarannya. Daun dan tangkai daun berbagai sayuran segar dipisahkan. Daun dan tangkai daun dibersihkan dengan aquades bebas nitrit, kemudian dianalisis aktivitas nitrat reduktasenya sesuai metode Karno (2015). Helaian daun dan tangkai daun diiris-iris dengan pisau tajam (silet) selebar 1-2 mm, ditimbang sejumlah 300 mg (atau sesuai dengan berat yang dikehendaki) dan segera direndam dalam buffer fosfat 0,1 M pH 7,5 menggunakan tabung gelap. Perendaman dilakukan dengan waktu perendaman minimum 18-24 jam (bervariasi menurut spesiesnya). Dilanjutkan dengan pemberian substrat NaNO_3 5 M sebanyak 0,1 ml ke dalam tabung gelap yang juga berfungsi sebagai tabung inkubasi. Sesaat setelah pemberian substrat tersebut, dilakukan inkubasi selama 2 jam (atau sesuai dengan yang dikehendaki) dalam tabung inkubasi. Inkubasi dilakukan dalam tabung gelap untuk menghentikan reaksi lebih lanjut oleh enzim nitrit reduktase yang mereduksi nitrit (NO_2^-) menjadi amonia (NH_3) yang membutuhkan reduktan NADPH yang terjadi dengan adanya cahaya. Perlakuan gelap mengakibatkan terjadinya akumulasi nitrit sebagai akibat adanya reduksi nitrat menjadi nitrit oleh enzim nitrat reduktase.

Sesaat setelah batas akhir waktu inkubasi, dilanjutkan dengan pengambilan alikout sebanyak 0,1 ml (atau sesuai yang dikehendaki) dan pindahkan ke dalam tabung reaksi 50 ml. Pengambilan alikout menjadi kritikal dalam interval waktu dan harus disesuaikan dengan urutan pemberian substrat NO_3^- pada awal inkubasi sehingga masing-masing enzim NR dalam tabung inkubasi mendapatkan waktu inkubasi yang relatif sama. Dilanjutkan dengan penambahan reagen pewarna (0,2 ml larutan SA 1% dalam 3 N HCl dan 0,2 ml NED 0,02%). Jumlah volume reagen pewarna yang digunakan dalam pengujian harus sama dengan jumlah volume reagen pewarna yang digunakan dalam pembuatan kurva standar nitrit. Dilanjutkan dengan penambahan aquades bebas nitrit sampai tercapai volume 3 ml (atau sampai volumenya sama dengan volume yang digunakan dalam pembuatan kurva standar nitrit) dan digojog sampai larutan tercampur rata. Dibiarkan selama 15 menit dalam suhu kamar sampai terjadi

pengembangan warna ke merah jambu sampai dengan merah maroon pekat (tergantung dengan jumlah ion nitrit yang terbentuk). Timbulnya warna ini disebabkan oleh reaksi ion nitrit dengan NED dan SA sehingga terjadi reaksi warna diazo. Reaksi ini berlangsung dalam suasana asam, oleh karena itu SA 1,0% dilarutkan dalam 3N HCl, sedangkan NED 0,02% dilarutkan dalam aquades bebas nitrit.

Terakhir dilakukan pengukuran nitrit yang terbentuk dengan mengukur absorbansi larutan secara spektrofotometrik pada panjang gelombang 540 nm. Blanko yang digunakan berupa: 0,2 ml larutan SA 1% dalam 3 N HCl; 0,2 ml NED 0,02% dan aquades bebas nitrit sampai volumenya mencapai 3 ml (atau sampai volumenya sama dengan volume yang digunakan dalam pembuatan kurva standar nitrit). Kapasitas ANR dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{ANR} = \frac{A_s}{A_o} \times \frac{V_{bi}}{V_s} \times \frac{1000}{B_s} \times \frac{1}{W_i} \times \frac{1}{1000} \mu\text{mol NO}_2^-/\text{g/jam}$$

Keterangan:

V_{bi} = Volume buffer inkubasi (5 ml)

V_s = Volume sampel/alikuot (0,1 ml)

B_s = Berat sampel (300 mg)

W_i = Waktu inkubasi (2 jam)

A_s = Absorban sample

A_o = Absorban standar = penjumlahan a+b dari persamaan garis miring yang terbentuk saat pembuatan kurva standar nitrit (y= ax + b)

1 μ mol= 1000 nmol

Kurva standar nitrit dibuat dengan mencampurkan masing-masing 0,0 ml; 0,1 ml; 0,2 ml; 0,3 ml; 0,4 ml; 0,5 ml; 0,6 ml; 0,7 ml; dan 0,8 ml larutan standard NaNO₂ 40 μM dengan 0,2 ml SA 1% dalam 3 N HCl; 0,2 ml NED 0,02% dan aquades bebas nitrit sampai volumenya 3 ml (atau sesuai yang dikehendaki). Setelah dibiarkan selama 15 menit dalam suhu kamar sampai terjadi pengembangan warna, dilakukan pengukuran absorbansi larutan secara spektrofotometrik pada panjang gelombang 540 nm.

Data yang diperoleh dianalisis dengan metode analisis deskriptif berupa analisis dari data rerata yang diperoleh. Analisis deskriptif digunakan untuk memberikan gambaran umum tentang data yang telah diperoleh.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Nitrat Reduktase (ANR)

Rataan absorbansi dan ANR daun dan tangkai daun seledri segar, bayam merah segar dan kenikir segar disajikan pada Tabel 2 dan Tabel 3. Daun dan tangkai daun bayam merah segar memiliki rata-rata ANR yang hampir sama besarnya dan paling tinggi dibandingkan sayuran segar lainnya. Daun seledri segar memiliki rata-rata ANR yang lebih besar daripada tangkai daun, selisihnya terpaut lebih dari 55%. Daun kenikir segar memiliki rata-rata ANR yang lebih kecil daripada tangkai daun, selisihnya terpaut lebih dari 12%.

Tabel 2. Rataan absorbansi dan ANR daun seledri segar, bayam merah segar dan kenikir segar

| Daun Sayuran | Absorbansi | ANR Daun | |
|-------------------|------------|---|-------------------------------------|
| | | ($\mu\text{mol NO}_2^-/\text{g/jam}$) | ($\text{mg NO}_2^-/\text{g/jam}$) |
| Seledri segar | 1,61 | 14,97 | 0,69 |
| Bayam merah segar | 1,71 | 15,86 | 0,73 |
| Kenikir segar | 1,49 | 13,76 | 0,63 |

Tabel 3. Rataan absorbansi dan ANR tangkai daun seledri segar, bayam merah segar dan kenikir segar

| Tangkai Daun Sayuran | Absorbansi | ANR Tangkai Daun | |
|----------------------|------------|---|-------------------------------------|
| | | ($\mu\text{mol NO}_2^-/\text{g/jam}$) | ($\text{mg NO}_2^-/\text{g/jam}$) |
| Seledri segar | 0,89 | 8,26 | 0,38 |
| Bayam merah segar | 1,63 | 15,23 | 0,70 |
| Kenikir segar | 1,67 | 15,49 | 0,71 |

Rataan ANR daun dan tangkai daun bayam merah segar yang tinggi pada penelitian ini berkorelasi dengan rata-rata kandungan nitrat dan nitritnya yang juga tinggi yang berkorelasi dengan rata-rata kandungan enzim nitrat reduktase (NR) yang juga tinggi. Menurut Keeton *et al.* (2012), bayam segar memiliki rata-rata kandungan nitrat dan nitrit yang paling tinggi diantara semua sayuran segar yaitu masing-masing 2.797 ppm dan 8,0 ppm. Menurut Santamaria *et al.* (1999), sayuran segar yang secara alami memiliki kandungan nitrat yang tinggi berkorelasi dengan kadar enzim nitrat reduktase (NR) yang juga tinggi.

Jumlah Sayuran Segar untuk Agen Kyuring Alami

Daun segar berbagai sayuran segar yang diteliti dipilih untuk digunakan sebagai agen kyuring alami. Hal ini karena secara umum kapasitas ANR bagian daun lebih besar daripada bagian tangkai daun. Berdasarkan kapasitas ANR daun segar berbagai sayuran segar yang diteliti dapat dihitung formulasi penggunaannya sebagai agen kyuring alami. Hal ini ditempuh dengan cara menyetarakan konsentrasi nitrit yang terbentuk akibat aktivitas ANR dalam jangka waktu inkubasi tertentu dengan konsentrasi natrium nitrit sintetis yang biasanya digunakan sebagai agen kyuring konvensional.

Kementerian Kesehatan Indonesia membatasi penggunaan natrium atau kalium nitrit yang dimasukkan pada daging olahan ataupun daging awetan maksimal 125 ppm (mg/kg) dan khusus untuk korned kalengan maksimal 50 mg/kg baik tunggal atau campuran dengan kalium atau natrium nitrit dan dihitung sebagai natrium nitrit (Kementerian Kesehatan, 2012). Tabel 4 menyajikan imbalanced jumlah berbagai daun sayuran segar (berdasarkan kapasitas ANR selama 2 jam inkubasi) dengan berbagai konsentrasi natrium nitrit sintetis. Misalnya, sebanyak 21,74 g daun seledri segar yang digunakan sebagai agen kyuring alami pada proses kyuring daging sapi segar dengan inkubasi selama 2 jam pada suhu ruang, dengan kapasitas ANR yang dimilikinya menghasilkan ion

nitrit setara dengan 30 ppm natrium nitrit sintetis.

Tabel 4. Imbangan jumlah berbagai daun sayuran segar (berdasarkan ANR selama 2 jam inkubasi) dengan berbagai konsentrasi natrium nitrit sintetis

| Konsentrasi NaNO ₂ (ppm)..... | Jumlah Daun Segar | | |
|---|-------------------|-------------|---------|
| | Seledri | Bayam Merah | Kenikir |
| 10 | 7,25 | 6,85 | 7,94 |
| 20 | 14,49 | 13,70 | 15,87 |
| 30 | 21,74 | 20,55 | 23,81 |
| 40 | 28,99 | 27,40 | 31,75 |
| 50 | 36,23 | 34,25 | 39,68 |
| 60 | 43,48 | 41,10 | 47,62 |
| 70 | 50,72 | 47,95 | 55,56 |
| 80 | 57,97 | 54,79 | 63,49 |
| 90 | 65,22 | 61,64 | 71,43 |
| 100 | 72,46 | 68,49 | 79,37 |
| 110 | 79,71 | 75,34 | 87,30 |
| 120 | 86,96 | 82,19 | 95,24 |
| 125 | 90,58 | 85,62 | 99,21 |

Penerapan Berbagai Daun Sayuran Segar pada Kyuring Alami

Kyuring konvensional biasanya menggunakan natrium nitrit sintetis sebagai agen kyuring dalam jumlah yang sangat sedikit. Biasanya digunakan maksimal 50 ppm natrium nitrit sintetis sebagai agen kyuring konvensional. Menurut Sebranek dan Bacus (2007), sangat sedikit nitrit yang diperlukan untuk menginduksi warna kyuring yaitu sedikitnya 2-14 ppm (tergantung pada spesies). Namun, secara signifikan diperlukan level yang lebih tinggi untuk mencegah pemudaran yang cepat dan tidak seragamnya warna kyuring serta untuk mempertahankan warna kyuring sepanjang masa penyimpanan. Para peneliti menyimpulkan bahwa konsentrasi nitrit sangat penting untuk penerimaan konsumen pada karakteristik produk daging kyuring. Level nitrit minimum antara 25-50 ppm cukup untuk warna daging kyuring yang dapat diterima konsumen di sebagian besar produk daging kyuring. Menurut Sebranek (2009), paling sedikit 50 ppm nitrit telah terbukti mengurangi ketengikan sebesar 50-64% pada daging sapi, daging babi dan daging ayam. Efek akan lebih besar pada konsentrasi nitrit yang lebih tinggi. Menurut Lövenklev *et al.* (2004), 45 ppm natrium nitrit efektif menekan ekspresi gen *Clostridium botulinum*.

Hal tersebut di atas menjadi dasar penentuan jumlah daun sayuran segar yang digunakan sebagai agen kyuring alami. Jumlah daun seledri segar, bayam merah segar atau kenikir segar masing-masing sejumlah 36,23 g; 34,25 g; dan 39,68 g yang digunakan sebagai agen kyuring alami dapat membentuk nitrit hasil

ANR selama 2 jam inkubasi setara dengan konsentrasi natrium nitrit sintetis sebesar 50 ppm (lihat Tabel 4).

Jumlah daun berbagai sayuran segar tersebut dapat diturunkan jumlahnya sesuai kehendak produsen untuk disetarakan dengan konsentrasi natrium nitrit sintetis yang lebih rendah. Misalnya, ingin disetarakan dengan 30 ppm natrium nitrit sintetis, maka jumlah agen kyuring alami berupa daun seledri segar, bayam merah segar atau kenikir segar masing-masing sejumlah: 21,74 g; 20,55 g; dan 23,81 g (lihat Tabel 4). Penggunaan daun berbagai sayuran segar sebagai agen kyuring alami pada jumlah yang lebih tinggi tidak dikehendaki karena diduga dapat menyebabkan dominasi aroma dan citarasa sayuran pada produk jadi daging kyuring. Menurut Saputro (2016), jumlah daun berbagai sayuran segar yang rendah (maksimal setara dengan konsentrasi natrium nitrit sintetis sebesar 50 ppm) yang digunakan sebagai agen kyuring alami dapat ditutupi aroma dan citarasa sayurannya akibat *masking* dan dominasi oleh bumbu/rempah-rempah yang digunakan pada produk daging kyuring.

Menurut Saputro (2016), daun seledri segar sejumlah 22 g (setara dengan sekitar 30 ppm natrium nitrit sintetis) yang digunakan sebagai agen kyuring alami pada pembuatan dendeng daging sapi dengan inkubasi selama 2 jam pada suhu ruang dapat menghasilkan dendeng daging sapi dengan aktivitas air, *cook yield*, proksimat, warna, pigmen kyuring, total pigmen, residu nitrit dan citarasa kyuring yang mirip dengan kontrol atau dendeng daging sapi yang dikyuring dengan agen kyuring konvensional (50 ppm natrium nitrit sintetis).

Hal tersebut menjadi dasar direkomendasikannya formulasi kyuring alami menggunakan 21,74 g (atau 22 g) daun seledri segar sebagai agen kyuring alami dengan 2 jam inkubasi pada suhu ruang yang akibat adanya aktivitas nitrat reduktase dapat menghasilkan nitrit setara dengan 30 ppm natrium nitrit sintetis. Seledri telah dikenal sejak lama oleh konsumen lebih cocok untuk digunakan pada produk olahan daging dibandingkan bayam atau kenikir. Hal ini didukung oleh penelitian kyuring alami oleh Sindelar *et al.* (2007^a); Sindelar *et al.* (2007^b); dan Sindelar *et al.* (2010) yang juga menggunakan bubuk jus sayuran seledri dan kultur starter *Staphylococcus carnosus* sebagai agen kyuring alami untuk menggantikan natrium nitrit sintetis. *Staphylococcus carnosus* digunakan untuk mempercepat reduksi nitrat menjadi nitrit karena diduga enzim nitrat reduktase (NR) yang secara alami terdapat pada sayuran seledri segar telah rusak akibat proses pembubukan.

Penerapan daun seledri segar sebagai agen kyuring alami direkomendasikan diterapkan dengan metode kyuring kering (*dry curing*) pada daging giling (*comminuted meat curing*) (Saputro, 2016). Misalnya, produk daging kyuring yang dihaluskan adalah dendeng giling, sosis dan korned daging. Daun seledri segar dicampur dengan daging saat penghalusan daging dan pelumatan adonan daging sehingga daun seledri segar juga tergiling halus. Setelah adonan tercampur rata, dilakukan inkubasi pada suhu ruang selama 2 jam untuk memberikan waktu yang cukup bagi enzim nitrat reduktase untuk menghasilkan nitrit yang cukup untuk proses kyuring. Penelitian sebelumnya tentang kyuring alami oleh kyuring Sindelar *et al.* (2007^a) dan Sindelar *et al.* (2007^b) juga telah

merekomendasikan minimal 2 jam inkubasi untuk pembangkitan nitrit yang cukup untuk selanjutnya mengembangkan karakteristik daging kyuring.

Tahap inkubasi direkomendasikan dilakukan pada suhu ruang karena merupakan suhu optimal bagi pertumbuhan bakteri pereduksi nitrat yang secara alami terdapat pada daging segar. Menurut Sindelar *et al.* (2010), bakteri pereduksi nitrat yang secara alami terdapat pada daging segar dan kultur starter pereduksi nitrat seperti strain *Staphylococcus carnosus* memiliki suhu pertumbuhan minimal pada suhu 10°C dan suhu pertumbuhan optimal untuk beraktivitas pada suhu 30°C.

Daging segar direkomendasikan untuk digunakan sebagai komposisi produk daging kyuring alami dengan agen kyuring alami berupa daun seledri segar. Nitrit yang terbentuk akan lebih optimal dengan dipercepatnya reduksi nitrat daun seledri segar tidak hanya oleh enzim nitrat reduktase daun seledri segar tetapi juga oleh bakteri pereduksi nitrat yang secara alami terdapat pada daging segar. Menurut Pinotti *et al.* (2001) bakteri pereduksi nitrat secara alami terdapat pada daging sapi segar.

KESIMPULAN

Evaluasi ANR daun seledri segar dan bayam merah segar menunjukkan lebih tinggi dibandingkan dengan ANR tangkai daun. Nitrit alami yang dihasilkan daun seledri segar, bayam merah segar dan kenikir segar masing-masing adalah 0,69; 0,73 dan 0,63 mg NO₂⁻/g/jam. Proses kyuring alami daging sapi membutuhkan waktu inkubasi yang cukup untuk memungkinkan konversi nitrat menjadi nitrit yang cukup untuk menghasilkan karakteristik produk daging sapi kyuring alami yang menarik. Daun seledri segar direkomendasikan sebagai agen kyuring alami daging sapi karena telah sejak lama dikenal oleh konsumen lebih cocok dengan berbagai produk olahan daging sapi. Kyuring alami daging sapi menggunakan daun seledri segar direkomendasikan sebanyak 22 g dan inkubasi pada suhu ruang selama 2 jam yang dapat menghasilkan NO₂⁻ setara dengan sekitar 30 ppm NaNO₂.

Riset lebih lanjut terkait penerapan dan pengaruh berbagai level konsentrasi agen kyuring alami berupa daun seledri segar pada mutu sensori, fisiko-kimia dan mikrobiologis produk daging sapi kyuring dibutuhkan. Selain itu juga pada pengendalian pembentukan karsinogen N-nitrosamin pada produk daging sapi kyuring juga dibutuhkan untuk membuktikan bahwa kyuring alami dengan daun seledri segar lebih aman dan lebih sehat.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini dibiayai dari Bantuan Dana Penelitian Tahun 2015 Program Tugas Belajar Badan Penyuluhan dan Pengembangan Sumberdaya Manusia Pertanian, Kementerian Pertanian Republik Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

Badan Standarisasi Nasional (BSN). 2002. SNI 01-6729-2002 tentang Sistem Pangan Organik, Jakarta.

- Fujihara SA, Kasuga and Aoyagi Y. 2001. Nitrogen-to-protein conversion factors for common vegetables in Japan. *J. Food Sci.* 66: 412-415.
- Heldt HW and Piechulla B. 2005. Nitrate assimilation is essential for the synthesis of organic matter. *Plant Biochem.* p. 275-308.
- Karno. 2015. Petunjuk teknis *assay* aktivitas nitrat reduktase (ANR) tanaman. Semarang (Indonesia): Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro.
- Keeton JT, Osburn WN, Hardin MD, Bryan NS and Longnecker MT. 2009. A national survey of the nitrite/nitrate concentrations in cured meat products and nonmeat foods available at retail, American Meat Institute Foundation Report [Internet]. [cited August 11, 2015]. Available from: <http://www.amif.org/ht/a/GetDocumentAction/i/52741>
- Lövenklev M, Artin I, Hagberg O, Borch E, Holst E and Rådstöm P. 2004. Quantitative interaction effects of carbon dioxide, sodium chloride, and sodium nitrite on neurotoxin gene expression in nonproteolytic *Clostridium botulinum* type b. *Appl. Environ Microb.* 70:2928-2934.
- Mitchell R. 2006. Outrunning supplies. *Meat and Deli Retailer*. November, 2006. <http://www.meatanddeliretailer.com>.
- Pinotti A, Graiver N, Califano A and Zaritzky N. 2001. Diffusion of nitrite and nitrate salts in pork tissue in the presence of sodium chloride. *J. Food Sci.* 67: 2165-2171.
- Santamaria P. 2006. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *J. of the Sci. of Food and Agri.* 86(1): 10-17.
- Santamaria P, Elia A, Serio F and Todazo E. 1999. A survey of nitrate and oxalate content in fresh vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 79:1882-1888.
- Saputro E. 2016. Penentuan formulasi kyuring alami pada pembuatan dendeng daging sapi lokal (tesis S2). [Semarang (Indonesia)]: Universitas Diponegoro.
- Sebranek JG. 2009. Basic curing ingredients. In: R. Tarte (Ed.). *Ingredients in Meat Products*. New York (NY): Springer Science+Business Media.
- Sebranek JG and Bacus JN. 2007. Natural and organic cured meat products: Regulatory, manufacturing, marketing, quality and safety issues (American Meat Science Association White Paper Series No. 1) [Internet]. [cited August 11, 2015]. Available from: http://www.meatscience.org/Pubs/White%20Papers/wp_001_2007_Natural_Organic_Cured_Meat.pdf
- Sindelar JJ and Milkowski AL. 2012. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. *Nitric Oxide.* 26: 259–266.
- Sindelar JJ, Cordray JC, Sebranek JG, Love JA and Ahn DU. 2007^a. Effects of vegetable juice powder concentration and storage times on some chemical and sensory quality attributes of uncured, emulsified cooked sausages. *J. of Food Sci.* 72: S324-S332.
- Sindelar JJ, Cordray JC, Sebranek JG, Love JA and Ahn DU. 2007^b. Effects of varying levels of vegetable juice powder and incubation time on color, residual nitrate and nitrite, pigment, pH, and trained sensory attributes of ready-to-eat uncured ham. *J. of Food Sci.* 72: S388-S395.

- Sindelar JJ, Terns MJ, Meyn E and Boles JA. 2010. Development of a method to manufacture uncured, no-nitrate/nitrite-added whole muscle jerky. *Meat Sci.* 86: 298–303.
- Skibsted LH. 2011. Review: Nitric oxide and quality and safety of muscle based foods. *Nitric Oxide.* 24: 176–183.
- Terns MJ, Milkowski AL, Claus JR, and Sindelar JJ. 2011^a. Investigating the effect of incubation time and starter culture addition level on quality attributes of indirectly cured, emulsified cooked sausages. *Meat Sci.* 88: 454-461.
- Terns MJ, Milkowski AL, Rankin SA and Sindelar JJ. 2011^b. Determining the impact of varying levels of cherry powder and starter culture on quality and sensory attributes of indirectly cured, emulsified cooked sausages. *Meat Sci.* 88: 311-318.