

STABILISASI BEKATUL DENGAN EKSTRUDER ULIR GANDA MENGUNAKAN *RESPONSE SURFACE METHODOLOGY*

Ineke Kusumawaty¹, Dedi Fardiaz¹, Nuri Andarwulan¹, Sri Widowati², dan Slamet Budijanto¹

¹Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

²Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapenen Pertanian Bogor

Email: inne2013@gmail.com

Keterbatasan pemanfaatan bekatul dalam pangan disebabkan oleh sifatnya yang mudah tengik sehingga perlu dilakukan stabilisasi. Penelitian ini bertujuan menentukan kondisi optimum stabilisasi bekatul dengan ekstruder ulir ganda tanpa die sebagai bahan baku ekstraksi protein. Optimasi kondisi stabilisasi bekatul dilakukan dengan menggunakan *response surface methodology* (RSM) dengan *central composite design* (CCD) dua faktor yaitu X_1 (suhu/°C) dan X_2 (kecepatan ulir/Hz). Pengolahan data menggunakan program *Design Expert 7.0*[®] yang memberikan model persamaan pengaruh suhu dan kecepatan ulir ekstruder terhadap respon kadar air, kadar protein terlarut, dan aktivitas lipoksigenase. Hasil optimasi memberikan kondisi suhu ekstrusi 130,96°C dan kecepatan ulir 26,65 Hz. Bekatul yang dihasilkan memiliki kadar air 7,02%, kadar protein terlarut 2,04% (bk), aktivitas lipoksigenase 0,007 µmol/menit/ml, dan stabilitas oksidatif yang lebih tinggi yaitu 20,00 jam daripada bekatul yang tidak distabilisasi 13,50 jam.

Kata kunci: Stabilisasi bekatul, ekstruder ulir ganda, *response surface methodology*, stabilitas oksidatif

ABSTRACT. Ineke Kusumawaty, Dedi Fardiaz, Nuri Andarwulan, Sri Widowati, and Slamet Budijanto. 2013. **Rice bran stabilization with double screw extruder using response surface methodology.** The use of rice bran in food is limited because the bran becomes easily rancid, therefore stabilization was needed. This study aimed to determine the optimum conditions for the stabilization of rice bran with double screw extruder without die for raw material protein extraction. Conditions optimization for rice bran stabilization were calculated using response surface method (RSM) with Central Composite Design (CCD) with two factors were X_1 (temperature/°C) and X_2 (screw speed/Hz). The data processed using Design Expert 7.0 ® program provided equation models for extruder temperature and the speed effect of the screw on moisture, soluble protein contents, and lipoxygenase activity. The results showed optimum extrusion temperature was 130,96°C and the screw speed was 26.65 Hz. This optimum condition resulted rice bran moisture content 7.02%, soluble protein was 2.04% (db), lipoxygenase activity was 0,007 µmol/min/ml and oxidative stability was 20,00 hours higher than that of unstabilized rice bran 13,50 hours.

Keywords : Rice bran stabilization, double screw extruder, *response surface methodology*, oxidative stability

PENDAHULUAN

Bekatul merupakan hasil samping penggilingan gabah yang pemanfaatannya didominasi untuk pakan ternak karena kandungan nutrisinya. Penggilingan gabah menghasilkan sekitar 8-12% bekatul dan 60-65% beras giling¹. Produksi gabah nasional pada tahun 2012 yang mencapai 69,05 juta ton² dapat menghasilkan bekatul sebanyak 5,52 juta ton. Bekatul mengandung 12-15% protein dengan nilai PER (*protein efficiency ratio*) 2,0– 2,5 dan nilai cerna 90%³. Karena nilai gizinya ini, beberapa sifat fungsional konsentrat protein bekatul dapat menyamai kasein sehingga berpotensi sebagai ingredient⁴.

Kandungan lemak tidak jenuh pada bekatul lebih dari 70%, akibatnya bekatul mudah tengik⁵. Proses abrasif selama penggilingan mengakibatkan lipase dan lemak kontak sehingga proses hidrolisis dapat berlangsung. Asam lemak yang dihasilkan selanjutnya

dioksidasi oleh lipoksigenase menjadi hidroperoksida yang kemudian mengalami degradasi membentuk senyawa volatil seperti aldehid, keton, dan alkohol yang tercium sebagai bau tengik⁶. Oleh karena itu, lipase dan lipoksigenase dalam bekatul harus segera dinaktivasi pasca penggilingan gabah untuk mencegah ketengikan dan memperpanjang masa simpan bekatul. Proses ini disebut stabilisasi bekatul⁷.

Stabilisasi bekatul menggunakan pemanasan telah dilaporkan, seperti microwave^{6,8}, pratanak⁹, uap panas¹⁰, ohmic^{11,13}, ekstruder ulir tunggal^{6,7} dan ekstruder ulir ganda^{5,12}. Umumnya, stabilisasi bekatul dilakukan pada suhu tinggi⁵ dan waktu yang cukup lama⁷. Stabilisasi bekatul dengan pratanak lebih sesuai untuk pemanfaatan seratnya sebagai pangan fungsional⁹. Stabilisasi bekatul dengan ekstrusi memiliki kelebihan dibandingkan yang lain karena kadar airnya, lipase inaktif, dan produknya kering sehingga sesuai untuk ingredien pangan. Namun,

kondisi proses stabilisasi bekatul sebagai persiapan bahan baku ekstraksi protein belum pernah dilaporkan. Umumnya stabilisasi bekatul dilakukan sebagai persiapan bahan baku ekstraksi minyak^{10,13,14}. Stabilitas oksidatif bekatul dapat diamati menggunakan metode AOM (*Active Oxygen Method*) dengan mengukur periode induksi bahan terhadap oksidasi. Semakin lama periode induksi, bahan memiliki stabilitas oksidatif yang lebih baik^{15,16}.

Optimasi proses stabilisasi bekatul dapat dilakukan dengan menggunakan CCD dilanjutkan analisis dengan RSM. Beberapa penelitian menggunakan RSM untuk optimasi proses, antara lain optimasi suhu, pH, waktu dan rasio pelarut dengan bahan untuk ekstraksi protein jagung¹⁷, optimasi kecepatan ulir dan suhu ekstrusi terhadap karakter pasta tepung kedelai¹⁸, dan optimasi produksi hidrolisat protein bekatul dengan alkalase¹⁹. Metode RSM dapat membantu merancang model penelitian, mengurangi jumlah perlakuan dalam penelitian dan membantu mengevaluasi interaksi perlakuan yang diberikan untuk mendapatkan proses yang optimal.

Tujuan penelitian ini adalah menentukan kondisi optimum stabilisasi bekatul dengan ekstruder ulir ganda tanpa *die* sebagai persiapan bahan baku ekstraksi protein dan mempelajari pengaruh antar respon pengamatan. Parameter pengamatan meliputi kadar air, kadar protein terlarut, kadar asam lemak bebas, aktivitas lipoksigenase, dan aktivitas lipase.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Penelitian dilaksanakan di Technopark, Laboratorium Pusat Pengembangan Ilmu dan Teknologi Pangan dan Pertanian Asia Tenggara (SEAFST Centre), Laboratorium Analisis Pangan, dan Laboratorium Kimia, Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Institut Pertanian Bogor pada bulan Desember 2012 sampai dengan Mei 2013.

Bekatul yang digunakan berasal dari gabah varietas Ciherang yang diperoleh dari Unit Penggilingan Gabah di Sumedang, Jawa Barat. Peralatan yang digunakan antara lain penggiling beras (Yanmar), penyosoh beras (Satake), ekstruder ulir ganda tanpa *die* (Berto), ayakan 100 mesh (Kotobuki), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), sentrifus (Hermle Z 383 K), 743 Rancimat (Methrom, UK), dan alat bantu lainnya.

Metode Penelitian

Stabilisasi bekatul

Stabilisasi bekatul dilakukan dengan teknik ekstrusi menggunakan ekstruder ulir ganda tipe *intermeshing*

co-rotating screw tanpa *die* (cetakan) skala pilot plant. Ekstruder dilengkapi mantel pendingin dan mantel pemanas untuk mempertahankan suhu, termokopel, ulir, dan selubung mesin ekstruder atau barrel. Kedua ulir memiliki jari-jari 3 cm, terdapat dalam barrel sepanjang 100 cm. Suhu ekstrusi dikondisikan isothermal pada kisaran suhu 110°C sampai 150°C dengan kecepatan ulir pada kisaran 15-35 Hz. Bekatul hasil ekstrusi diayak dengan ayakan 100 mesh, dikemas dalam plastik klip polietilen, dan disimpan pada suhu -20°C sampai dianalisa. Sebagai kontrol perlakuan adalah bekatul yang tidak distabilisasi.

Persiapan bekatul bebas lemak (*defatted rice bran*)

Bekatul lolos ayakan 100 mesh didispersikan dalam heksan (1:5 (b/v)) diaduk selama 60 menit dengan pengaduk magnetik, lalu disaring vakum dengan kertas saring²⁰. Presipitat diaplikasikan kembali dalam heksan dengan metode yang sama untuk menghilangkan kandungan lemak dalam bekatul (<1%)²⁷. Bekatul bebas lemak dikeringanginkan semalaman, disimpan suhu -20°C sampai digunakan lebih lanjut.

Rancangan penelitian

Rancangan penelitian menggunakan CCD dari RSM untuk mengoptimasi proses stabilisasi bekatul dengan ekstruder ulir ganda dengan bantuan perangkat lunak *Design Expert 7.0® (trial version)* dari *Stat Ease*²⁰. Proses stabilisasi bekatul dengan ekstruder merupakan kombinasi perlakuan suhu ekstruder (X_1) dan kecepatan ulir (X_2). Seluruh perlakuan terdiri dari 13 unit percobaan (Tabel 1).

Tabel 1. Rancangan penelitian dengan rancangan komposit terpusat
Table 1. Research design with central composite design

No	Perlakuan/Treatment	
	X_1 (°C)	X_2 (Hz)
1.	144	18
2.	130	25
3.	130	25
4.	116	18
5.	150	25
6.	110	25
7.	130	25
8.	115	32
9.	130	15
10.	130	35
11.	130	25
12.	130	25
13.	144	32

Keterangan /remark:

X_1 : suhu/temperature, X_2 : kecepatan ulir/screw speed

Seluruh nilai respon diolah dengan *Design Expert* 7.0[®] yang memberikan model persamaan pengaruh suhu dan kecepatan ulir ekstruder terhadap setiap parameter yang diujikan. Model persamaan :

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

Y = Respon Pengamatan

β_0 = Intercept

β_i = Pengaruh linier

β_{ii} = Pengaruh kuadratik

β_{ij} = Pengaruh interaksi percobaan

X_i = Kode untuk faktor ke-i

X_j = Kode untuk faktor ke-j

k = Jumlah faktor yang dicobakan

Model persamaan dapat digunakan untuk optimasi bila model dinyatakan signifikan ($p < 0,05$) dan ketidaktepatan model (*lack of fit*) dinyatakan tidak signifikan ($p > 0,05$) pada taraf signifikansi 5%^[20]. Hal ini menunjukkan bahwa variabel penelitian memberikan pengaruh yang signifikan terhadap respon perlakuan sehingga model yang dihasilkan oleh program *Design Expert* 7.0[®] dapat dipergunakan untuk memperkirakan hubungan antara variabel bebas dengan respon penelitian. Model harus memiliki nilai ketepatan yang memadai (*adequate precision*) lebih besar dari 4 dan selisih nilai R^2 yang disesuaikan (*adjusted R^2*) dengan nilai perkiraan dari model (*predicted R^2*) kurang atau sama dengan 2.

Pengaruh perlakuan dengan respon pengamatan dapat dipelajari melalui nilai korelasi (R^2) yang diperoleh menggunakan program Excel.

Optimasi dan verifikasi

Optimasi dilakukan untuk mendapatkan kombinasi suhu dan kecepatan ulir yang tepat pada proses stabilisasi bekatul dimana respon kadar air dan aktivitas enzim cukup rendah hingga reaksi kimiawi dan enzimatis terhambat, serta kadar protein terlarut tinggi. Hal ini mempertimbangkan bekatul yang distabilisasi akan dipergunakan sebagai bahan baku ekstraksi protein. Respon dikatakan optimal apabila diperoleh nilai keinginan (*desirability*) mendekati 1,0. Setiap variabel dan respon diberi pembobotan kepentingan (*importance*) dari nilai 1 (+) sampai 5 (+++++). Semakin tinggi nilai *importance* yang diberikan maka semakin besar target respon tersebut untuk dicapai.

Verifikasi kondisi optimum proses stabilisasi dilakukan sebanyak 5 kali. Verifikasi dimaksudkan untuk mengetahui konsistensi kondisi optimum berdasarkan nilai CV (*coeficient varians*) dan kesesuaian antara nilai respon aktual dengan nilai respon perkiraan (*prediction interval, PI*) yang diberikan oleh program *Design Expert*

7.0[®]. Nilai PI merupakan rentang yang menunjukkan perkiraan hasil pengukuran respon berikutnya dengan kondisi sama dengan taraf signifikansi 5%.

Metode Analisis

Analisa sifat kimia bekatul meliputi kadar air²¹, kadar asam lemak bebas²¹, kadar protein terlarut²², aktivitas lipase²³ dan Bhavani *et al.*²⁴ yang dimodifikasi, dan aktivitas lipoksigenase⁶ yang dimodifikasi. Pengujian stabilitas oksidatif menggunakan 743 Rancimat²⁵.

Aktivitas lipase

Bekatul bebas lemak (1:10 b/v) dalam bufer sodium fosfat 0,05 M pH 7 diaduk dengan pengaduk magnetik selama 30 menit pada 10°C. Campuran disentrifus 3000 g (3010 rpm) pada suhu 4°C selama 20 menit. Supernatan merupakan ekstrak kasar lipase bekatul²³. Sebanyak 25 ml 7,5% (b/v) minyak zaitun (*Olivaoila*) dalam 7,5% (b/v) gum akasia dalam bufer sodium fosfat 0,05 M pH 7 dihomogenisasi membentuk emulsi. Ditambahkan 2 ml ekstrak kasar lipase ke dalam substrat. Inkubasi dalam penangas goyang 170 rpm selama 30 menit pada 30°C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 15 ml etanol. Selanjutnya, dititrasi dengan NaOH 0,05 N menggunakan indikator fenoltalein²³. Satu unit lipase setara dengan jumlah μmol asam lemak yang dihasilkan dalam 30 menit, yang dihitung berdasarkan banyaknya volume NaOH yang dibutuhkan dalam titrasi.

$$\text{Aktivitas lipase } (\mu\text{mol asam lemak/menit}) = \frac{(V_{\text{sample}} - V_{\text{blanko}}) N_{\text{NaOH}} \cdot 1000}{V_{\text{substrat}}}$$

Aktivitas lipoksigenase

Bekatul bebas lemak (1:10 b/v) dalam bufer sodium fosfat 0,05 M pH 7, diaduk dengan pengaduk magnetik selama 30 menit pada 10°C lalu disentrifus 20.000g (11.000 rpm) selama 10 menit pada suhu 4°C. Ke dalam 4 ml supernatan ditambahkan 0,4 ml TCA 10% lalu disentrifus 3000 g (3010 rpm) selama 20 menit. Ke dalam endapan ditambahkan 0,1 ml dietil eter, divortek selama 30 detik lalu disentrifus pada 20.000 g selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan endapan dikeringanginkan. Ke dalam endapan ditambahkan buffer fosfat 0,05 M pH 7 hingga 4 ml dan digunakan sebagai sumber enzim⁶.

Stok substrat dibuat dengan melarutkan 25 μl asam linoleat dalam 15 ml etanol dalam labu 25 ml. Tambahkan air deionisasi sampai batas tera. Untuk pengujian, sebanyak 1 ml stok substrat ditambah 6 ml buffer borat pH 8,5 (konsentrasi 0,5 mM). Aktivitas enzim diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada 234 nm, 25°C selama 3 menit. Kuvet contoh mengandung 2,9 ml larutan substrat dan 0,1 ml enzim. Pembentukan hidropersida dihitung dengan persamaan²⁷.

$$A_{234}(\text{AU/menit}) = \varepsilon (\text{liter/cm/mol}) \times c (\text{mol/liter}) \times l (\text{cm})$$

Keterangan:

A_{234} = absorbansi pada λ 234

ε = koefisien molar 26.800 liter/cm/ml

c = konsentrasi hidroperoksida (mol/liter)

l = ketebalan cairan dalam kuvet (1 cm)

Stabilitas oksidatif

Pengujian stabilitas oksidatif bekatul dilakukan dengan menguji minyak bekatul menggunakan instrumen 743 Rancimat²⁵. Kondisi pengujian sebagai berikut: suhu 110°C, kecepatan alir gas oksigen 20 L/jam, ΔT 1,6°C, dan ukuran sampel 5,0 gr minyak bekatul dengan parameter pengukuran periodeinduksi.

Ekstraksi minyak bekatul dilakukan dengan mendispersikan bekatul dalam heksan (1:5 b/v) dan diaduk selama 60 menit dengan pengaduk magnetik¹⁹. Minyak kasar bekatul diperoleh dengan penyaringan vakum dengan kertas saring dan menguapkan heksan dengan rotary evaporator pada suhu 40°C selama 8-10 menit. Gas N₂ dihembuskan ke dalam minyak untuk menghilangkan sisa heksan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini, stabilisasi bekatul dilakukan menggunakan ekstruder ulir ganda tanpa die. Ekstruder berpotensi sebagai alat stabilisasi bekatul karena dapat digunakan secara kontinu dan diskontinu berintegrasi dengan mesin penggilingan gabah. Bahan memperoleh panas dari kedua ulir yang bergesekan sehingga proses pencampuran bahan dan distribusi panas lebih merata. Kondisi ini diharapkan dapat menurunkan waktu tinggal bahan dalam barrel²⁹. Pengaruh suhu dan kecepatan ulir sangat menentukan untuk mendapatkan kondisi proses stabilisasi bekatul yang optimal, dimana kadar air cukup rendah sehingga dapat menghambat proses kimiawi dan biologis, enzim endogenous menjadi inaktif, serta sifat fungsional komponen gizi masih dapat diperoleh. Kombinasi dan respon perlakuan disajikan pada Tabel 2.

Seluruh data respon perlakuan diolah dengan program *Design Expert 7.0*[®] sehingga diperoleh analisis ragam (ANOVA) dan model persamaan matematika untuk setiap respon perlakuan. Hasil ANOVA dan model persamaan matematika setiap respon perlakuan disajikan pada Tabel 3. Bekatul yang telah diekstrusi diharapkan memiliki stabilitas yang lebih baik terhadap ketengikan hidrolik dan ketengikan oksidatif.

Tabel 2. Kombinasi dan respon perlakuan

Table 2. Combination and treatment response

Perlakuan/Treatment		Y1 (%)	Y2(%bk)	Y3(μmol/ml/menit)	Y4(%)	Y5(U/ml)
X ₁ (°C)	X ₂ (Hz)					
144	18	5,29	2,24	0,004	2,22	0,03
130	25	5,31	2,51	0,004	2,08	0,03
130	25	5,36	2,64	0,005	2,06	0,03
116	18	6,45	2,47	0,004	2,32	0,03
150	25	5,73	1,85	0,004	2,37	0,02
110	25	7,57	2,29	0,004	2,34	0,03
130	25	5,99	2,52	0,005	2,44	0,02
115	32	6,84	2,65	0,006	2,19	0,03
130	18	5,01	2,58	0,005	2,25	0,02
130	35	5,96	2,51	0,008	2,16	0,04
130	25	5,46	2,62	0,005	2,16	0,03
130	25	5,31	2,60	0,006	2,08	0,03
144	32	5,94	2,10	0,005	2,24	0,03

Keterangan /remark : X₁ : suhu/temperature, X₂ : kecepatan ulir/screw speed, Y₁ : kadar air/moisture, Y₂ : kadar protein terlarut/soluble protein content, Y₃ : aktivitas lipoksigenase/lipoxygenase activity, Y₄ : kadar asam lemak bebas jam ke-0/free fatty acid at 0 hour, Y₅ : aktivitas lipase/lipase activity

Tabel 3. ANOVA respon pada proses stabilisasi bekatul dengan ekstruder ulir ganda tanpa die*Table 3. ANOVA on the response of rice bran stabilization process with double screw extruder without die*

Respon/ responses	ANOVA						****Nilai rata-rata mean
	Persamaan Matematika/ mathematica equation	Signifikansi Model (p<0,05) significance	*Lack of fit (p>0,05)	**Adj R ² Model	***Pred R ² Model	Standar Deviasi Standar deviation	
Kadar air/moisture	$Y=5,41-0,59x_1+0,3x_2+0,056x_1x_2+0,64x_1^2+0,058x_2^2$	<0,0001	0,44	0,97	0,93	0,13	5,84
Kadar protein terlarut/ soluble protein content	$Y=2,58-0,18x_1-0,005x_2-0,08x_1x_2-0,24x_1^2-0,002x_2^2$	<0,0001	0,44	0,94	0,85	0,06	2,43
Aktivitas lipoksigenase/ lipoxygenase activity	$Y=0,005-0,0001x_1+0,001x_2-0,0002x_1x_2-0,0007x_1^2+0,0005x_2^2$	0,0114	0,32	0,72	0,24	0,0006	0,005
Asam lemak bebas jam ke-0/ free fatty acid at 0 hour	$Y=2,22$	-	0,91	0	-0,17	0,12	2,22
Aktivitas lipase/ lipase activity	$Y=0,03$	-	0,28	0	-0,17	0,0053	0,03

Keterangan/remark:

Y : respon/response

* ketidaktepatan model/lack of fit

****nilai rata-rata/mean

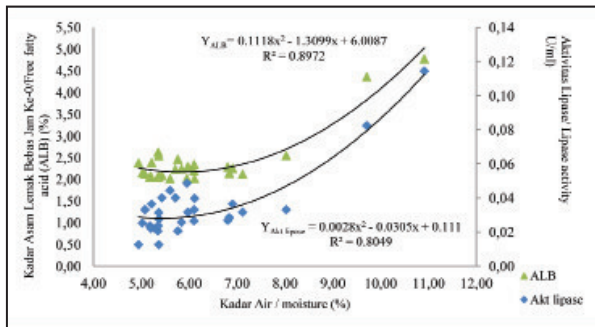
 x_1 : suhu/temperature**nilai R² model yang disesuaikan/adjusted R² model x_2 : kecepatan ulir/screw speed*** nilai R² model prediksi /predicted R² model**Stabilitas terhadap ketengikan hidrolitik**

Ketengikan hidrolitik disebabkan oleh reaksi hidrolisis lemak yang dikatalis oleh enzim lipase menghasilkan asam lemak rantai pendek. Stabilitas hidrolitik bekatul yang diekstrusi dijelaskan dengan mempelajari pengaruh kadar air dengan aktivitas lipase dan kadar asam lemak bebas bekatul pada jam ke-0 (Gambar 1).

Kadar air bekatul yang diekstrusi memiliki hubungan polinomial kuadrat dengan aktivitas lipase dan kadar asam lemak bebas pada pengamatan jam ke-0 dengan nilai korelasi (R²) masing-masing 0,89 dan 0,80. Hal ini menunjukkan adanya hubungan antara kadar air bekatul terhadap aktivitas lipase dan kadar asam lemak bebas. Aktivitas lipase dan kadar asam lemak bebas bekatul mulai mengalami peningkatan pada kadar air lebih dari 6,50%. Proses ekstrusi bekatul pada suhu 110°C – 150°C dengan kecepatan ulir 15-35 Hz menghasilkan kadar air 5,01-7,57%. Kadar air bekatul terendah diperoleh pada suhu ekstrusi 130°C dan kecepatan ulir 15 Hz, sedangkan yang tertinggi pada 110°C dan 25 Hz. Kadar air bekatul yang tidak diekstrusi adalah 10,33%. Hasil ini mendekati hasil penelitian Fuh *et al.*¹² yang melakukan stabilisasi bekatul menggunakan ekstruder ulir ganda model *co-rotating* pada suhu 130°C dan kecepatan ulir 140 rpm dengan waktu tinggal 20 detik. Hasilnya, kadar air bekatul menurun dari 11% menjadi 7%.

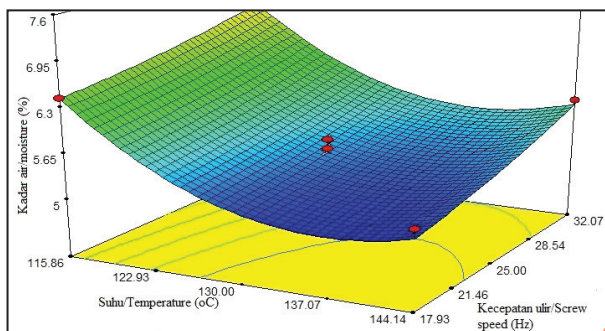
Dalam penelitian ini, kadar asam lemak bebas bekatul yang tidak diekstrusi 4,57%. Kadar asam lemak bebas pada jam ke-0 yang terukur dalam proses ekstrusi ini bervariasi antara 2,06 % sampai 2,44%. Malekian *et al.*⁶ melaporkan bahwa pada pengamatan minggu ke-0 bekatul yang diekstrusi menggunakan suhu 125-130°C selama 30 detik memiliki kadar asam lemak bebas 2,8%, sedangkan bekatul yang tidak diekstrusi memiliki kadar asam lemak bebas 3,7%. Perbedaan pengukuran kadar asam lemak bebas ini dapat disebabkan oleh perbedaan varietas bekatul.

Analisis model dengan *Design Expert 7.0*[®] memberikan model persamaan kuadrat (Gambar 2) untuk kadar air. Model ini menunjukkan nilai kadar air yang menurun kemudian meningkat pada titik tertentu. Peningkatan suhu ekstrusi yang diikuti dengan penurunan kecepatan ulir akan menurunkan kadar air. Hal ini disebabkan kecepatan ulir menentukan waktu tinggal bahan dalam barel sehingga mempengaruhi lama kontak panas dengan bahan¹⁸.



Gambar 1. Pengaruh kadar air bekatul terhadap kadar asam lemak bebas dan aktivitas lipase

Figure 1. Effect of rice bran moisture on free fatty acids and lipase activity

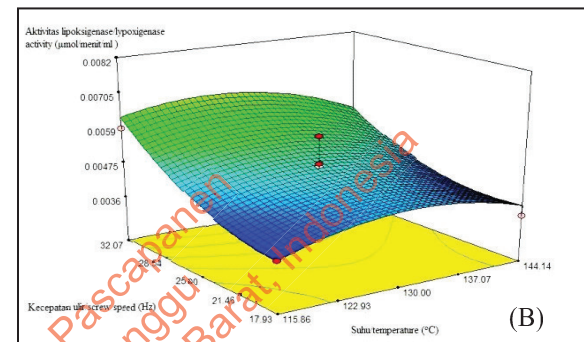
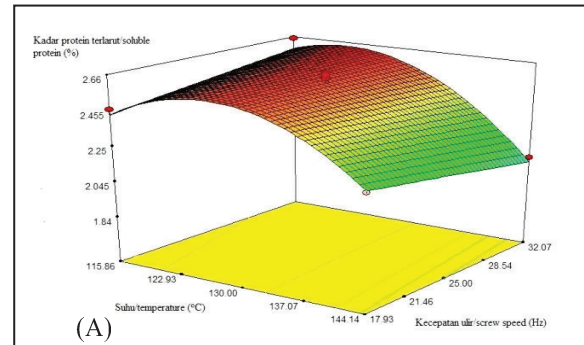


Gambar 2. Plot respon permukaan suhu dan kecepatan ulir terhadap kadar air bekatul

Figure 2. Response surface plot temperatures and screw speed on rice bran moisture

Analisis model dengan *Design Expert 7.0*[®] menunjukkan bahwa kadar asam lemak bebas bekatul pengamatan pada jam ke-0 proses ekstrusi tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan sehingga model yang dihasilkan hanya dibuat berdasarkan nilai *mean*. Hal ini sesuai dengan analisis ANOVA dimana nilai *predicted R*² yang dihasilkan bernilai negatif. Nilai *predicted R-squared* yang negatif menunjukkan bahwa nilai *mean* memberikan perkiraan yang lebih baik bagi respon kadar asam lemak bebas.

Bekatul yang diekstrusi memiliki aktivitas lipase 0,02 U/ml sampai 0,03 U/ml, dibandingkan bekatul kontrol sebesar 0,10 U/ml. Prabu *et al.*²³ melaporkan bahwa aktivitas lipase dari ekstrak kasar bekatul adalah 0,11 U/ml. Lee²⁹ melaporkan bahwa ekstrusi bekatul yang memiliki kadar air 11% pada suhu 128°C mampu menginaktivasi lipase, dimana kadar air akhir yang diperoleh 6,94%. Pemanasan mengakibatkan perubahan struktur asli protein lipase sehingga kehilangan fungsi katalitiknya tanpa melibatkan perubahan urutan asam amino. Aktivitas lipase bekatul tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan sehingga model yang dihasilkan hanya dibuat berdasarkan nilai *mean*. Hal ini sesuai dengan analisis ANOVA dimana



Gambar 3. Plot respon permukaan suhu dan kecepatan ulir terhadap kadar protein terlarut (A) dan aktivitas lipoksigenase (B)

Figure 3. Response surface plot temperature and screw speed on soluble protein content (A) and lipoxigenase activity (B)

nilai *predicted R*² yang dihasilkan bernilai negatif. Nilai *predicted R-squared* yang negatif menunjukkan bahwa nilai *mean* memberikan perkiraan yang lebih baik bagi respon aktivitas lipase.

Stabilitas terhadap ketengikan oksidatif

Ketengikan oksidatif pada bekatul disebabkan oleh reaksi oksidasi lemak yang dikatalis oleh enzim lipoksigenase. Oksidasi menghasilkan peroksida yang akan mengalami pemecahan lebih lanjut menghasilkan senyawa aldehid, keton, alkohol, hidrokarbon, dan ester. Senyawa hasil pemecahan peroksida ini menyebabkan timbulnya bau tengik⁶. Stabilitas bekatul yang diekstrusi terhadap ketengikan oksidatif dijelaskan melalui pengujian minyak bekatul dengan metode rancimat dan mempelajari model kadar protein terlarut dan aktivitas lipoksigenase yang diberikan *Design Expert 7.0*[®] (Gambar 3).

Gambar 3 menunjukkan bahwa analisis kadar protein terlarut dan aktivitas lipoksigenase dengan *Design Expert 7.0*[®] memberikan model persamaan kuadratik. Kadar protein terlarut dari bekatul yang diekstrusi bervariasi antara 1,85-2,65%(bk). Kadar protein terlarut bekatul terendah diperoleh pada kondisi stabilisasi suhu 150°C dan kecepatan ulir 25 Hz, sedangkan yang tertinggi pada kondisi stabilisasi suhu 116°C dan kecepatan ulir 32 Hz. Chiang³⁰ melaporkan bahwa isolat protein kedelai yang diekstrusi pada suhu 125-134°C memiliki kadar protein

terlarut $4,2 \pm 0,8\%$. Pemanasan pada proses ekstrusi menyebabkan protein mengalami agregasi sehingga terbentuk protein dengan berat molekul yang lebih besar yang mengakibatkan kelarutan protein menurun.

Pada suhu di atas 122°C , kadar protein terlarut bekatul terus menurun. Kecepatan ulir mempengaruhi waktu tinggal bekatul dalam selubung pemanas. Semakin rendah kecepatan ulir maka semakin lama bahan dalam selubung pemanas sehingga semakin besar kemungkinan terjadinya denaturasi protein sehingga kadar protein terlarut semakin rendah. Sebagai perbandingan, pemanasan bungkil kedelai dengan autoklaf (121°C) selama 0 sampai 36 menit dilaporkan dapat menurunkan kelarutan protein. Persentase kelarutan protein kedelai terendah pada pemanasan 121°C selama 36 menit, yaitu 78% ³¹. Dalam penelitian ini, kelarutan protein terendah pada perlakuan ekstrusi 150°C dengan kecepatan ulir 25 Hz (39-40 detik), yaitu $63,97\%$, sedangkan yang tertinggi pada perlakuan suhu 116°C dengan kecepatan ulir 32 Hz (29,5-31,5 detik), yaitu $91,77\%$.

Dalam penelitian ini, pengujian aktivitas lipoksigenase menggunakan asam linoleat sebagai substrat⁶. Enzim ini akan mengkatalis reaksi hidroperoksidasasi asam linoleat dan asam lemak tidak jenuh serta esternya yang memiliki ikatan rangkap cis, cis 1,4-pentadiena³². Pembentukan dien terkonjugasi hidroperoksida oleh lipoksigenase diukur pada absorpsi 234 nm ²⁷.

Aktivitas lipoksigenase bekatul yang distabilisasi dengan ekstruder ulir ganda tanpa *die* bervariasi antara $0,003\text{ }\mu\text{mol}/\text{menit}/\text{ml}$ sampai $0,008\text{ }\mu\text{mol}/\text{menit}/\text{ml}$. Ekstrusi bekatul pada kisaran suhu 110°C - 150°C selama 30-65,5 detik (15-35 Hz) mampu menurunkan aktivitas lipoksigenase $36,36 - 72,73\%$ dibandingkan dengan kontrol yang tidak mengalami ekstrusi ($0,011\text{ }\mu\text{mol}/\text{menit}/\text{ml}$). Malekian *et al.*⁶ melaporkan bahwa bekatul memiliki aktivitas lipoksigenase sebesar $0,02\text{ }\mu\text{mol}/\text{menit}/\text{ml}$. Perbedaan ini dapat disebabkan oleh varietas dan metode pengujian yang berbeda.

Gambar 3 menunjukkan aktivitas lipoksigenase memberikan respon minimal pada peningkatan suhu, namun maksimal pada kondisi peningkatan kecepatan ulir. Kecepatan ulir yang rendah akan meningkatkan

waktu kontak bekatul dengan panas dalam ekstruder sehingga meningkatkan inaktivasi enzim. Penggunaan suhu 115°C dengan kecepatan ulir 25 Hz (40 detik) telah mampu menurunkan aktivitas lipoksigenase $72,73\%$. Menurut Buranasompob *et al.*³⁴ pemanasan kernel almond pada $55-60^{\circ}\text{C}$ selama 2 sampai 10 menit dapat menginaktivasi enzim lipoksigenase. Crowe *et al.*³⁵ melaporkan tidak adanya aktivitas lipoksigenase pada tepung kedelai yang diekstrusi pada suhu 117°C atau di atasnya. Proses ekstrusi kedelai pada suhu 100°C - 150°C selama 25-30 detik dilaporkan efektif menurunkan aktivitas lipoksigenase menjadi $0,019 - 0,043\text{ }\mu\text{mol}/\text{menit}/\text{ml}$ ³⁶. Aktivitas lipoksigenase pada kedelai yang tidak distabilisasi lebih tinggi daripada bekatul mencapai $5,63\text{ }\mu\text{mol}/\text{menit}/\text{ml}$.

Pengukuran periode induksi dalam pengujian stabilitas oksidatif yang dipercepat dilakukan dengan instrumen 743 Rancimat. Periode induksi dapat ditentukan karena produk-produk polar yang dihasilkan selama proses oksidasi dapat dimonitor menggunakan alat pengukur konduktivitas. Semakin lama periode induksi diperoleh suatu minyak semakin tahan minyak tersebut terhadap oksidasi. Periode induksi yang terukur dalam penelitian ini dan beberapa penelitian lain, disajikan pada Tabel 4.

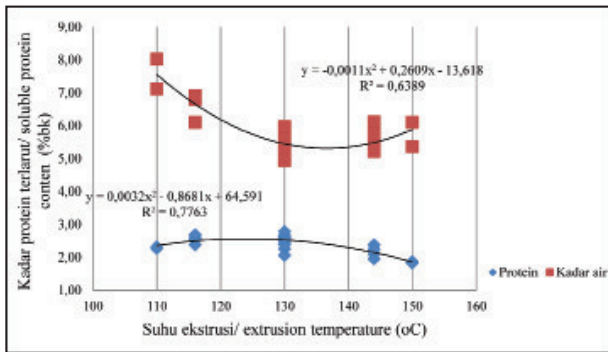
Pengukuran dengan metode rancimat menunjukkan bahwa minyak yang diekstrak dari bekatul yang telah diekstrusi memiliki stabilitas oksidatif yang lebih tinggi daripada yang tidak diekstrusi. Hal ini dapat disebabkan karena lipoksigenase telah inaktif oleh proses ekstrusi sehingga oksidasi lebih lanjut peroksida menjadi aldehid, keton, alkohol, dan hidrokarbon berlangsung lebih lambat. Perbedaan hasil penelitian ini dengan penelitian lain dapat disebabkan oleh perbedaan varietas, perlakuan terhadap bekatul, metode ekstraksi minyak bekatul yang digunakan, dan perbedaan suhu pengujian, dimana semakin rendah suhu pengujian maka periode induksi semakin lama pada bahan yang sama.

Optimasi Proses Stabilisasi Bekatul dengan Ekstruder Ulir Ganda

Optimasi proses stabilisasi dilakukan terhadap variabel suhu ekstrusi dan kecepatan ulir, serta respon kadar air, protein terlarut dan aktivitas lipoksigenase.

Tabel 4. Periode induksi minyak bekatul
Table 4. Rice bran oil induction periode

Bahan/Sample	Periode Induksi (jam) Induction periode (hours)	Suhu ($^{\circ}\text{C}$) Temperature ($^{\circ}\text{C}$)
Minyak bekatul (kontrol)/ricebran oil (control)	13,5	110
Minyak bekatul (ekstrusi 130°C -27 Hz)/ ricebran oil (extrusion 130°C -27 Hz)	20,0	110
Minyak bekatul ^[15] / ricebran oil	18,7	100
Minyak bekatul ^[16] / ricebran oil	7,4	120



Gambar 4. Pengaruh suhu ekstrusi terhadap kadar air dan protein terlarut bekatul

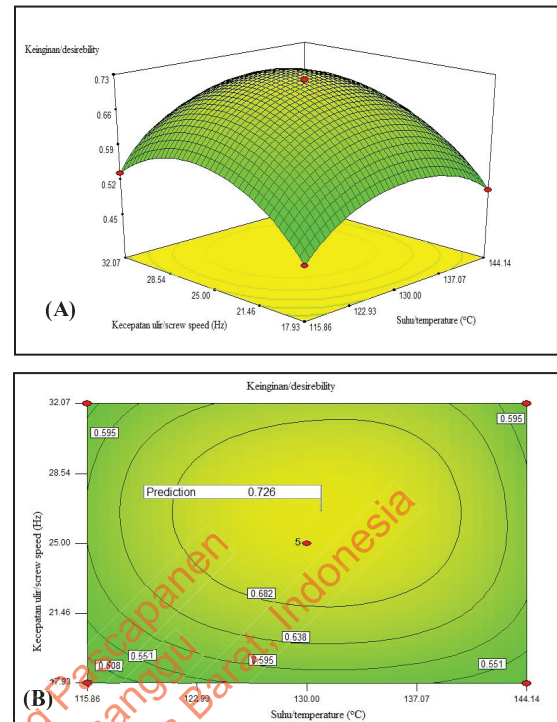
Figure 4. Effect of extrusion temperature on moisture and rice bran soluble protein

Respon kadar asam lemak bebas jam ke-0 dan aktivitas lipase tidak dioptimasi karena nilai *predicted R-squared* yang negatif dan model persamaan yang dihasilkan adalah *mean*.

Dalam penelitian ini, kisaran suhu optimum untuk stabilisasi bekatul dapat diperkirakan dengan menganalisa pengaruh suhu ekstrusi terhadap kadar protein terlarut dan kadar air bekatul (Gambar 4). Gambar 4 menunjukkan bahwa kadar air minimal pada kisaran suhu 130-140°C, sedangkan kadar protein terlarut maksimal pada kisaran suhu 120-130°C. Penentuan kondisi optimum stabilisasi dengan ekstruder selain ditentukan oleh suhu juga dipengaruhi oleh kecepatan ulir, sehingga diperlukan bantuan program *Design Expert 7.0*[®].

Dengan program *Design Expert 7.0*[®], kondisi optimum proses stabilisasi bekatul sebagai persiapan bahan baku ekstraksi protein diperoleh dengan meminimalkan respon kadar air dan aktivitas lipoksigenase, dan memaksimalkan kadar protein terlarut dengan pembobotan maksimal di skala 5 (+++++) (Tabel 5).

Program *Design Expert 7.0*[®] memberikan 1 (satu) kondisi optimum proses stabilisasi bekatul dengan nilai keinginan (*desirability*) 0,73 yaitu suhu ekstrusi 130,96°C dan kecepatan ulir 26,65 Hz. Nilai keinginan yang baik adalah 1 (satu), namun sulit diperoleh bila



Gambar 5. Plot responpermukaan (A) dan plot kontur (B) pada optimasi proses stabilisasi bekatul dengan ekstruder ulir ganda tanpa *dieterhadap* kadar air, kadar protein terlarut, dan aktivitas lipoksigenase

Figure 5. Response surface plot (A) and contour plot (B) of rice bran stabilization process optimization with a double screw extruder without die on moisture, soluble protein content, and lipoxigenase activity

semua respon diberi nilai pembobotan tertinggi, yaitu 5 (++++). Plot respon permukaan kondisi optimum proses stabilisasi bekatul disajikan pada Gambar 5.

Kontur yang memusat pada Gambar 5B menunjukkan bahwa titik stasioner merupakan respon minimum dan maksimum. Respon minimum untuk kadar air dan aktivitas lipoksigenase pada kondisi maksimum kadar protein terlarut. Untuk mengetahui validitas metode ini maka dilakukan verifikasi terhadap kondisi optimum proses stabilisasi bekatul yang diberikan oleh program.

Tabel 5. Respon proses stabilisasi yang dioptimasi, target, batas bawah dan atas, serta pembobotan kepentingan

Table 5. Stabilization process response are optimized, the target, the lower limit, and upper limit and importance

Respon/ response	Target/ goal	Batas bawah/ lower limit	Batas atas/ upper limit	Pembobotan/ Importance
Suhu/ temperature	Kisaran/ in range	110°C	150°C	5 (+++++)
Kecepatan ulir/ screw speed	Maksimal/ maximize	15 Hz	35 Hz	5 (+++++)
Kadar air/ Moisture content	Minimal/ minimize	5,01%	7,57%	5 (+++++)
Kadar protein terlarut/ soluble protein content	Maksimal/ maximize	1,85%	2,65%	5 (+++++)
Aktivitas lipoksigenase/ lipoxigenase activity	Minimal/ minimize	0.004µmol/menit/ml	0.008µmol/menit/ml	5 (+++++)

Verifikasi Kondisi Optimum Stabilisasi Bekatul

Verifikasi dilakukan sebanyak 5 kali terhadap kondisi optimum. Keseluruhan hasil pengujian diukur konsistensinya berdasarkan nilai *coefficient of variant* (CV). Nilai CV yang kurang dari 15% menunjukkan ketelitian yang semakin tinggi. Hasil verifikasi kondisi optimum disajikan pada Tabel 6 yang menunjukkan bahwa nilai CV masing-masing parameter pada uji verifikasi adalah lebih kecil daripada 15%. Dengan demikian, kondisi yang diperoleh dari model perhitungan analisa RSM sudah konsisten.

Terdapat penyimpangan nilai terukur kadar air, protein terlarut, dan aktivitas lipoksigenase berturut-turut 18,35%, 15,70% dan 5,68% dengan nilai perkiraan yang diberikan program *Design Expert 7.0®*. Penyimpangan nilai terukur ini dihitung berdasarkan perbedaan nilai perkiraan dengan nilai respon yang diperoleh saat verifikasi yang dapat disebabkan oleh perbedaan bahan baku bekatul. Di samping itu, stabilisasi menggunakan ekstruder ulir ganda skala pilot plant sehingga kisaran suhu dapat naik dan turun hingga 5-7°C dari suhu yang diatur. Hal ini dapat mengakibatkan perbedaan nilai pengukuran sehingga terjadi penyimpangan dari nilai perkiraan.

Tabel 6. Hasil verifikasi kondisi optimum stabilisasi bekatul dengan ekstruder ulir ganda tanpa die
Table 6. Verification optimum condition bran stabilization with double screw extruder without die

No	Kadar Air/ moisture (%bb)	Kadar Protein Terlarut/protein soluble content(%bk)	Aktivitas Lipoksigenase/ lipoxigenase activity (μmol/ menit/ml)
1	6,93	1,99	0,007
2	7,08	1,93	0,007
3	7,06	2,08	0,007
4	7,31	2,19	0,008
5	6,70	2,18	0,008
Rata-rata/mean	7,02	2,00	0,007
SD/standard deviation	0,22	0,10	0,000
%CV/coefficient of variant	3,18	5,04	3,90
Nilai perkiraan/prediction value	5,73	2,42	0,007
%penyimpangan/deviation	18,35	15,70	5,68

Tabel 7. Komposisi kimia bekatul

Table 7. Chemical composition of rice bran

Komposisi (%)/ Composition	Bekatul segar/ fresh ricebran	Bekatul segar bebas lemak/ defatted fresh ricebran	Bekatul ekstrusi/ extruded ricebran	Bekatul ekstrusi bebas lemak/ defatted extruded ricebran
Kadar air/water content	10,33	11,54	6,12	9,05
Abu/ash	7,02	8,01	7,41	8,38
Protein/protein	9,20	10,54	10,13	11,29
Lemak/fat	12,78	0,63	12,63	0,64
Karbohidrat (carbohydrate, by difference)	60,66	69,28	63,71	70,64

Dalam penelitian ini, persentase penyimpangan yang diperoleh masih dapat diterima. Inasaki³⁶ melaporkan perbedaan nilai verifikasi dengan perkiraan sebesar 18% dalam pemantauan proses penggilingan menggunakan sensor emisi. Antoniadis *et al.*³⁷ memperkirakan hasil penggilingan dengan *ball-end milling* menggunakan model simulasi *MSN-milling* dengan tingkat penyimpangan 17%.

Komposisi kimia bekatul ekstrusi

Komposisi kimia bekatul yang tidak diekstrusi dan bekatul yang diekstrusi pada kondisi optimum (130,96°C-26,65 Hz) disajikan pada Tabel 7. Proses ekstrusi bekatul pada kondisi optimum yang disarankan dapat menurunkan kadar air bekatul dari 10,33% menjadi 7,02%. Hasil ini mendekati penelitian Fuh *et al.*¹² dimana bekatul yang diekstrusi dengan ekstruder ulir ganda model *co-rotating* pada suhu 130°C dan kecepatan ulir 140 rpm dengan waktu tinggal 20 detik memiliki kadar air 7%. Kondisi tersebut dilaporkan menghasilkan bekatul yang stabil selama penyimpanan 20 hari pada suhu 25°C dimana angka asam tidak menunjukkan kenaikan yang signifikan.

Penghilangan lemak yang dilakukan dalam penelitian ini mampu menurunkan kadar lemak bekatul segar dari 12,78% menjadi 0,63%, dan kadar lemak

bekatul ekstrusi dari 12,63% menjadi 0,64%. Bekatul yang akan digunakan sebagai bahan baku ekstraksi protein harus memiliki kadar lemak kurang dari 1% karena adanya lemak dapat menurunkan efisiensi ekstraksi protein²⁶.

KESIMPULAN

Penentuan proses optimum stabilisasi bekatul untuk bahan baku ekstraksi protein, dengan ekstruder ulir ganda tanpa *die* menggunakan RSM memberikan kondisi optimum pada suhu 130,96°C dan kecepatan ulir 26,65 Hz. Bekatul yang dihasilkan memiliki kadar air 7,02%, kadar protein terlarut 2,04% (bk), aktivitas lipoksigenase 0,007 μ mol/menit/ml, dan stabilitas oksidatif yang lebih tinggi yaitu 20,00 jam daripada bekatul yang tidak distabilisasi 13,50 jam.

SARAN

Data periode induksi yang diberikan dalam pengukuran stabilitas oksidatif dengan metode di atas sesungguhnya dapat menggambarkan masa simpan bekatul yang sudah distabilisasi. Meskipun demikian untuk menstandarisasi hubungan antara periode induksi yang diperoleh dengan masa simpan bekatul, diperlukan penelitian yang khusus. Mengukur masa simpan bekatul dengan periode induksi yang berbeda-beda akan memberikan data hubungan di antara keduanya dengan akurat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Prof. Slamet Budijanto atas pemberian gabah varietas Cihwang dan penggunaan fasilitas di Technopark dan Prof. Nuri Andarwulan untuk standar asam linoleat (Wako).

DAFTAR PUSTAKA

- Widowati S. Pemanfaatan hasil penggilingan padi dalam menunjang sistem agroindustri di pedesaan. *Buletin AgroBio*. 2001; 4(1): 33 – 38.
- Produksi padi, jagung, dan kedelai. Badan Pusat Statistik 2013. *Berita Resmi Statistik* No 20/03/Th. XVI 1 Maret 2013.
- Wang M, Hettiarachchy NS, M Qi, Burk W, Siebenmorgen T. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 1999; 47: 411-416.
- Chandi GK, Sogi DS. Functional properties of rice bran protein concentrates. *Journal of Food Engineering*. 2007; 79: 592–597.
- Ubaidillah. *Stabilisasi Bekatul dengan Ekstrusi Tanpa Die* [Thesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor; 2010.
- Malekian F, Rao RM, Prinyawiwatkul W, Marshal WE, Windhauser M, Ahmedna M. Lipase and lipoxigenase activity, functionality, and nutrient losses in rice bran during storage. *Buletin* 2000; 870. Louisiana State University Agricultural Center.
- Randall JM, Sayre RN, Schultz WG, Fong RY, Mossman AP, Tribelhorn RE, Sanders RM. Rice bran stabilization by extrusion cooking for extraction of edible oil. *Journal of Food Science*. 1985; 50 (2): 361–364, 368.
- Tao J, Rao R, Liuzzo J. Microwave heating for rice bran stabilization. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*. 1993; 28 (3): 156–164.
- da Silva MA, Sanches C, Amante ER. Prevention of hydrolytic rancidity in rice bran. *Journal of Food Engineering*. 2006; 75: 487–491.
- Pourali O, Asghari FS, Yoshida H. Simultaneous rice bran oil stabilization and extraction using sub critical water medium. *Journal of Food Engineering*. 2009; (95) : 510–516.
- Loypimai P, Moongarm A, Chottanom P. Effects of ohmic heating on lipase activity, bioactive compounds and antioxidant activity of rice bran. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2009; 3(4): 3642–3652.
- Fuh W, Chiang B. Dephytinisation of rice bran and manufacturing a new food ingredient. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 2001; 81:1419–1425/
- Lakkakula NR., Lima M, Walker T. Rice bran stabilization and rice bran oil extraction using ohmic heating. *Bioresource Technology*. 2004; 92:157–161.
- Thanonkaew A, Wongyai S, McClements DJ, Decker EA. Effect of stabilization of rice bran by domestic heating on mechanical extraction yield, quality, and antioxidant properties of cold-pressed rice bran oil (*Oryza sativa* L.). *LWT Food Science and Technology*. 2012; 1–6.
- Madawala SRP, Kochhar SP, Dutta PC. Lipid components and oxidative status of selected specialty oils. *Grasas y Aceites*. 2012; 63 (2): 143–151.
- Anwar F, Anwer T, Mahmood Z. Methodical characterization of rice (*Oryza sativa*) bran oil from Pakistan. *Grasas y Aceites*. 2005; 56 (2) : 125–134.
- Kongo-Dia-Moukala JU, Hui Z. Defatted corn protein extraction: Optimization by response surface methodology and functional properties. *American Journal of Food Technology*. 2011; 6 (10): 870–881.
- Anuonye JC, Badifu GIO, Inyang CU, Akpapunam MA. Effect of extrusion process variables on the amylose and pasting characteristic of acha/soybean extrudates using response surface analysis. *American Journal of Food Technology*. 2007; 2 (5) : 354–365.

19. Silpradit K, Tadakittasarn S, Rimkeeree H, Supanida S, Haruthaithanasan V. Optimization of rice bran protein hydrolysate production using alcalase. *Research Article Asian Journal of Food and Agro-Industry*. 2010; 3(2): 221-231.
20. Lenth RV. Response-surface methods in R, using RSM. *Journal of Statistical Software*. 2009; 32 (7): 1-17.
21. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. Illinois: American Oil Chemistry Society; 2005.
22. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. St. Louis, Missouri: Washington University School of Medicine; 1951.
23. Prabhu AV, Tambe SP, Gandhi NN, Sawant SB, Joshi JB. Rice bran lipase: extraction, activity, and stability. *Biotechnology Progress*. 1999;15:1083-1089.
24. Bhavani M, Chowdary GV, David M, Archana G. Screening, isolation and biochemical characterization of novel lipase producing bacteria from soil samples. *International Journal of Biological Engineering*. 2012; 2(2): 18-22.
25. Abramovic H, Abram V. Physico-chemical properties, composition and oxidative stability of Camelina sativa oil. *Food Tecnology and Biotechnical*. 2005; 43(1) : 63-70.
26. Yeom H, Lee E, Ha M, Ha S, Bae D. Production and physicochemical properties of rice bran protein isolates prepared with autoclaving and enzymatic hydrolysis. *Journal Korean Social Application Biology and Chemistry*. 2010 ; 53 (1) : 62-70.
27. Gardner HW. Current protocols in food analytical chemistry: Analysis of lipoxigenase activity and products. Singapore: John Wiley & Sons, Inc.; 2001. Chapter 4.2.1-Chapter 4.2.16.
28. Senanayake SAMANS, Clarke B. A simplified twin screw co-rotating food extruder: design, fabrication and testing. *Journal of Food Engineering*. 1999; 40: 129-137.
29. Lee Cherl-Ho. Application of extrusion cooking to traditional Korean food. Di dalam : Kokini JL, Ho C, Karwe MC, editor. *Food Extrusion Science and Technology*. New York: Marcel Dekker; 1992. Hal. 711-723.
30. Chiang A. Protein – protein Interaction of Soy Protein Isolate from Extrusion Processing. [Thesis]. Columbia: University Missouri Columbia; 2007.
31. Batal AB, Douglas MW, Engram AE, Parsons CM. Protein dispersibility index as an indicator of adequately processed soybean meal. *Poultry Science*. 2000;79: 1592-1596.
32. Szymanowska U, Jakubczyk A, Baraniak B, Kur A. Characterisation of lipoxigenase from pea seeds (*Pisum sativum* var. Telephone L.). *Food Chemistry*. 2009;116: 906-910.
33. Buranasompob A, Tang J, Powers JR, Reyes J, Clark S, Swanson BG. Lipoxigenase activity in walnuts and almonds. *LWT Food Science and Technology*. 2007; 40: 893-899.
34. Crowe TW, Johnson LA, Wang T. Characterization of extruded-expelled soybean flours. *Journal American Oil Chemistry Society*. 2001; 78 (8): 775 - 779.
35. Zilic SM, Sobajic SS, Drinic SDM, Kresovic BJ, dan Vasic MG. Effect of heat processing on soya bean fatty acids content and lipoxigenase activity. *Journal of Agricultural Sciences*. 2010; 55 (1): 55-64.
36. Inasaki I. Sensor fusion for monitoring and controlling grinding processes. *International Journal Advanced Manufacturing Technology*. 1999; 15 :730-736.
37. Antoniadis A, Savakis C, Bilalis N, Balouktsis A. Prediction of surface topomorphy and roughness in ball-end milling. *International Journal Advanced Manufacturing Technology*. 2003; 21: 965-971.