

**PENGARUH AKTIVITAS PROTEOLITIK INOKULUM
Rhizopus sp-PL19 DAN *Aspergillus* sp-K3 TERHADAP KOMPOSISI
PROTEIN KALDU NABATI DARI KACANG HIJAU
(*Phaseolus radiatus* L.)**

Agustine Susilowati dan Aspiyanto

Pusat Penelitian Kimia, LIPI, Kawasan PUSPIPTEK, Serpong

ABSTRAK

Telah dilakukan pengamatan terhadap aktivitas proteolitik dalam pembuatan inokulum kaldu nabati dan aplikasinya pada pembuatan ekstrak kaldu kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) secara fermentasi garam pada rasio inokulum, garam dan kacang hijau 30 : 10 : 60% pada suhu ruang dalam wadah tertutup selama 0 - 10 minggu. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh aktivitas proteolitik inokulum dan waktu fermentasi garam terhadap komposisi protein kaldu nabati dari kacang hijau sebagai diversifikasi olahan kacang hijau dan alternatif perolehan kaldu nabati bersumber kacang-kacangan lokal. Penelitian dilakukan dengan menggunakan starter *Rhizopus* sp isolat PL-19 dan *Aspergillus* sp isolat K3 yang diinokulasi pada substrat beras pada waktu inkubasi 0 - 72 jam pada suhu 35°C. Analisis dilakukan terhadap aktivitas proteolitik inokulum kaldu dan protein total, protein terlarut, N-amino pada *crude* ekstrak kaldu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas proteolitik tertinggi menggunakan inokulum kaldu *Rhizopus* sp PL-19 (1,117 U/g) dan *Aspergillus* sp-K3 (0,715 U/g) masing-masing pada waktu inkubasi 56 dan 72 jam. Aplikasinya dalam pembuatan kaldu kacang hijau memperlihatkan kenaikan N-amino dan protein terlarut *crude* ekstrak kaldu sejalan dengan lamanya waktu fermentasi. Kaldu dengan inokulum *Rhizopus* PL-19 menunjukkan komposisi protein lebih baik daripada kaldu dengan inokulum *Aspergillus* sp-K3 yaitu total protein 12,799% protein terlarut 5,4 mg/gram dan N-amino 5,4208 mg/gram dengan waktu fermentasi 10 minggu.

Kata kunci: fermentasi garam, inokulum, proteolitik, kaldu kacang hijau, protein

ABSTRACT

The investigation on the proteolytic activity in preparation of vegetable broth inoculum and its application in preparation of mung bean (*Phaseolus radiatus* L.) broth extract through fermentation process has been conducted. This process uses inoculum, salt and mung beans ratio of 30 : 10 : 60% in closed container at room temperature for 0 – 10 weeks. This experiment was performed to know the effect of activity of proteolytic inoculum and fermentation time on protein composition of vegetable broth extract from mung beans as diversification of processed mung bean and source of vegetable protein. The experiment was done using *Rhizopus* sp isolate PL – 19 and *Aspergillus* sp isolate K3 starters inoculated at rice substrate for incubation time of 0 – 72 hours at 35°C. The quantitative analysis was conducted on activity of proteolytic inoculum, total protein, dissolved protein and N-amino in crude broth extract. The result of experiment showed that the highest proteolytic activities for *Rhizopus* sp PL-19 (1.117 U/g) and *Aspergillus* sp-K3 (0.715 U/g) extract inoculums were for incubation time of 56 and 72 hours, respectively. In preparation of mung bean broth extract indicated that increasing of dissolved protein and N-amino content in crude broth extract will extent fermentation time. Mung bean broth extract with inoculum of *Rhizopus* sp isolate PL-19 showed better composition compared with inoculum of *Aspergillus* sp isolate K3. Optimal fermentation time (10 weeks) for crude broth extract using inoculum of *Rhizopus* sp isolate PL-19 resulted contents of total protein of 12.7994 %, dissolved protein of 5.4 mg/g and N-amino 5.4208 mg/g.

Keywords: salt fermentation, inoculum, proteolytic, mung bean broth extract, protein

PENDAHULUAN

Inokulum kaldu mempunyai peranan penting dalam pembuatan kaldu nabati kacang hijau. Enzim protease yang dihasilkan oleh kapang akan menghidrolisis protein kacang menjadi peptide-peptida sederhana yang akan berpengaruh terhadap proses fermentasi garam dan perolehan kaldu kacang terutama terhadap komposisi protein, seperti protein total, protein terlarut dan N-amino. Aktivitas proteolitik kapang dipengaruhi tidak hanya oleh jenis dan faktor-faktor intrinsik kapang (kemurnian dan jumlah kapang,) tetapi juga faktor-faktor ekstrinsik terutama lingkungan dimana kapang tumbuh dan jenis substrat (beras, jagung) serta kondisi substrat (padat, semi padat). Kondisi fermentasi, seperti suhu, kelembaban, waktu dan suhu inkubasi serta waktu pengeringan inokulum juga memiliki peranan terhadap aktivitas proteolitiknya. *Rhizopus* sp dan *Aspergillus* sp merupakan jenis kapang yang memiliki peranan penting dalam produk-produk fermentasi tradisional, seperti fermentasi kecap, tauco, tempe. Kaldu kacang hijau, seperti halnya tauco dan moromi (Jepang) merupakan produk olahan kacang-kacangan secara fermentasi garam dan dimaksudkan sebagai bahan penyedap rasa dan pengaroma makanan. Peranan kedua jenis kapang tersebut sebagai inokulum terkait dengan kemampuan enzim protease yang dihasilkan dalam menghidrolisis protein kacang menjadi peptida-peptida sederhana yang selanjutnya didegradasi menjadi asam-asam amino.

Komposisi protein kaldu kacang hijau merupakan parameter perolehan kaldu yang menjadi acuan kualitas dan menjadi salah satu faktor penting terhadap pembentukan citarasa, aroma, *flavor* serta kualitas fisik, seperti kelarutan dan warna kaldu sebagai penyedap rasa dan pengaroma makanan. Protein terutama protein terlarut juga merupakan faktor penting pemberi nilai tambah kaldu kacang-kacangan terhadap daya cerna protein karena terbentuknya peptida-peptida sederhana sebagai hasil hidrolisis enzim protease kapang yang mempunyai kelarutan tinggi. N-amino merupakan parameter hasil pemecahan protein menjadi komponen-komponen sederhana oleh aktivitas enzim protease yang sebelumnya terpecah menjadi peptida-peptida. Sebuah asam amino terdiri dari gugus amino, gugus karboksil, sebuah atom hydrogen dan gugus alkil yang terikat pada atom karbon (Winarno, 1989). Salah satu asam amino pemberi citarasa dan *flavor* yang khas dan spesifik adalah asam glutamat. Aktivitas proteolitik yang tinggi diperoleh dengan pengaturan proses pada pembuatan inokulum, misalnya dengan pendinginan secara cepat, pengadukan untuk aerasi dan perataan suhu, pengaturan kelembaban, maupun pemilihan jenis substrat dengan konsentrasi kultur yang sesuai dan tepat (Lotong, 1985). Waktu inkubasi merupakan faktor penting karena waktu inkubasi berkaitan dengan pertumbuhan spora kapang untuk menghasilkan enzim sejalan dengan waktu inkubasi. Apabila waktu inkubasi terlalu singkat, enzim protease yang dihasilkan tidak mencukupi namun apabila waktu inkubasi berlebihan akan terjadi sporulasi yang berlebihan dan akan terbentuk aroma tidak enak yang disertai dengan penurunan aktivitas proteolitik (Yong dan Wood, 1974).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh jenis stater kapang dan waktu inkubasi terhadap aktivitas proteolitik inokulum kaldu kacang hijau dan juga pengaruhnya terhadap komposisi protein kaldu pada aplikasinya dalam pembuatan kaldu kacang hijau sebagai olahan pangan sebagai bahan penyedap rasa dan pengaroma makanan.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Peralatan

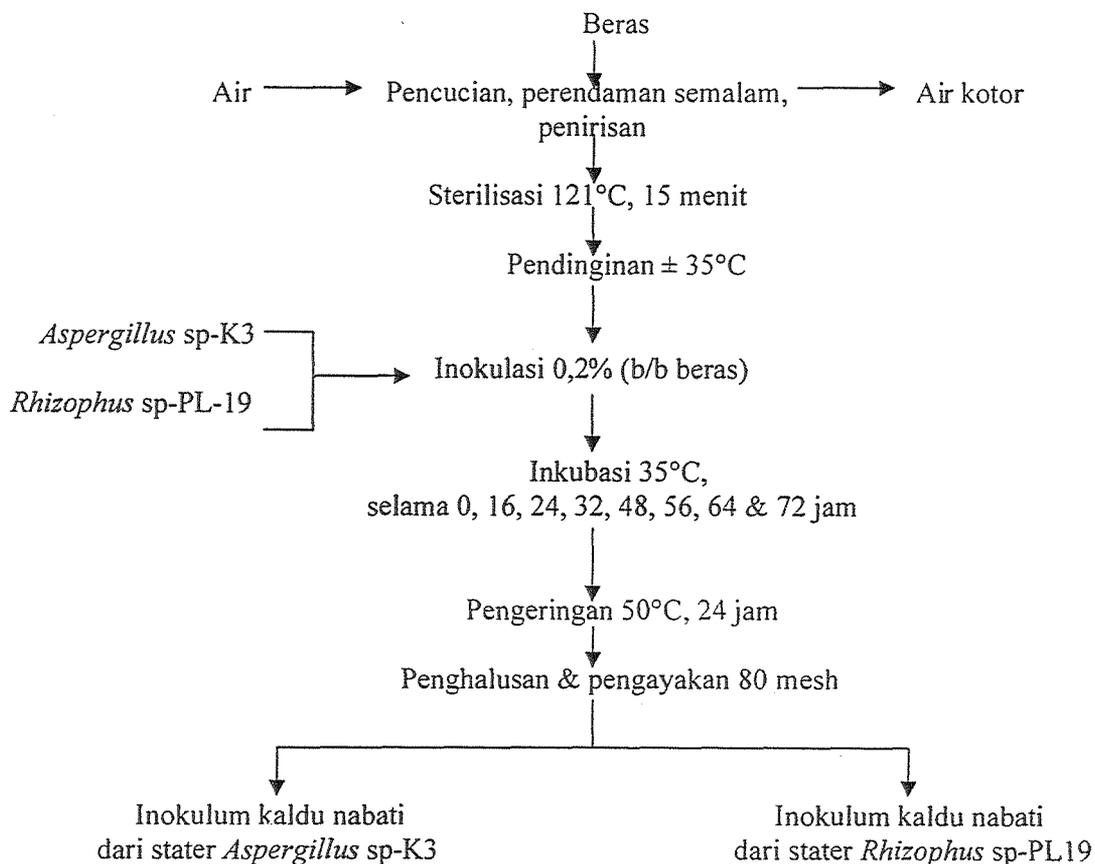
Bahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa kacang merah (*Phaseolus radiatus* L.), beras, inokulum dari stater *Rhizopus* sp PI-19 milik Pusat Penelitian Kimia-LIPI dan *Aspergillus* sp-K3 dari industri kecap di Cirebon dan bahan-bahan kimia untuk analisis kimia. Peralatan yang digunakan adalah peralatan pembuatan inokulum kaldu dan peralatan analisis kimia.

Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan menggunakan inokulum kaldu dari *Rhizopus* sp-PL 19 dan *Aspergillus* sp-K3 dengan waktu inkubasi masing-masing 0, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64 dan 72 jam pada suhu 35°C. Aplikasi inokulum dilakukan dalam pembuatan kaldu kacang hijau dengan waktu fermentasi masing-masing 0, 2, 4, 6, 8 dan 10 minggu pada suhu kamar. Masing-masing percobaan dilakukan dengan rancangan percobaan faktorial (A x B) dengan 2 x ulangan. Faktor yang berpengaruh dilakukan uji lanjut menurut Duncan (Gasperz, 1995). Analisis dilakukan terhadap kaldu kacang hijau meliputi kadar protein total (metode Kjeldahl), protein terlarut (metode Lowry) (AOAC, 1995), N-amino (metode Cu) (Pope dan Stevens, 1989) dan aktivitas proteolitik inokulum kaldu dilakukan menurut metode Kunitz (Darwis dan Sukara, 1990).

Pembuatan Inokulum Kaldu

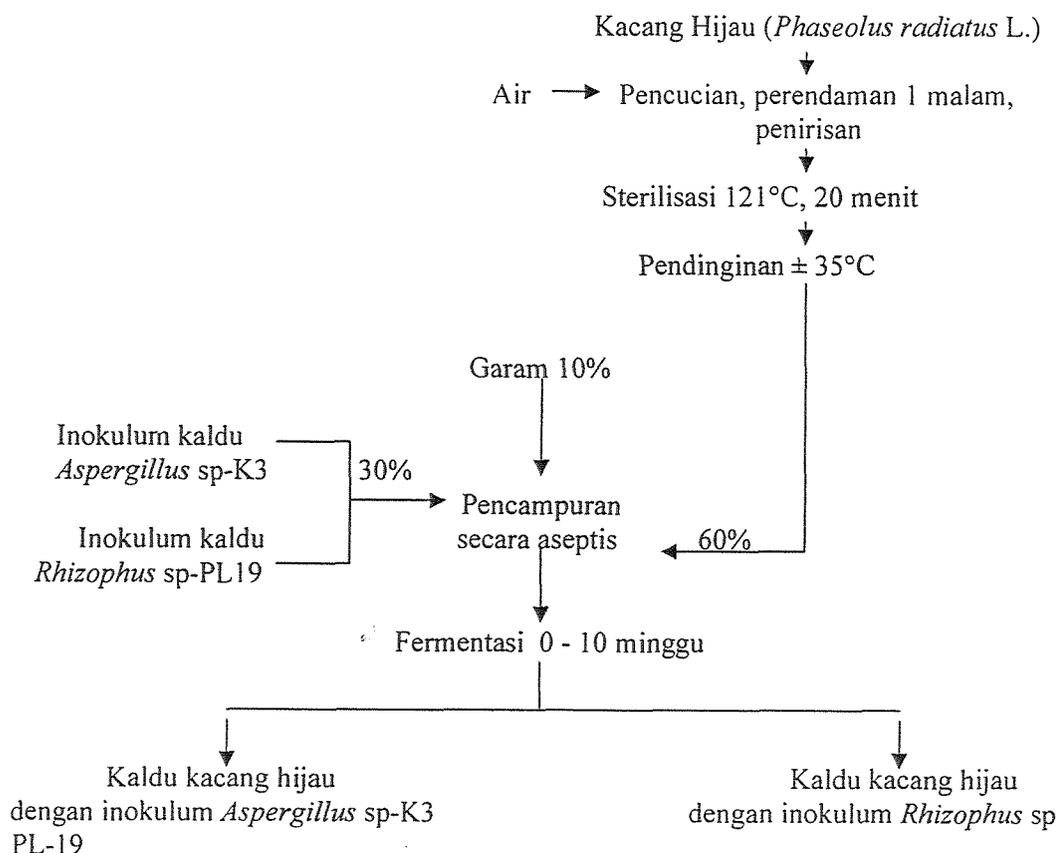
150 gram beras dicuci dan direndam dalam air semalam, kemudian dilakukan sterilisasi menggunakan *autoclave* pada temperatur 121°C selama 15 menit dan didinginkan sampai suhu $\pm 35^\circ\text{C}$. Inokulasi dilakukan dengan membubuhkan stater *Rhizopus* sp PI-19 dan *Aspergillus* sp-K3 pada beras steril dalam nampan (tray) pada konsentrasi 0,2% (b/b beras) dan diinkubasi masing-masing selama 0, 16, 24, 32, 48, 56, 64 dan 72 jam pada suhu 35°C. Selanjutnya dikeringkan pada suhu 50°C selama 24 jam, dihaluskan dan diayak melalui saringan 80 mesh serta siap digunakan. Skema proses pembuatan inokulum kaldu ditunjukkan dalam Gambar 1.



Gambar 1. Skema proses pembuatan inokulum kaldu nabati.

Fermentasi Kaldu Kacang Hijau

Kacang hijau yang telah disortir, dicuci dan direndam dalam air selama 18 - 24 jam. Selama perendaman, dilakukan penggantian air rendaman sebanyak 2 - 3 kali. Selanjutnya dikupas dan disterilisasi menggunakan autoclave pada temperatur 121°C selama 15 menit, didinginkan pada suhu $\pm 35^{\circ}\text{C}$ dan dilakukan pencampuran dengan garam dan inokulum kaldu secara aseptis pada ratio inokulum kaldu, kacang hijau dan garam adalah 60 : 30 : 10%. Kemudian campuran tersebut difermentasi dalam wadah tertutup pada temperatur kamar selama 0 - 10 minggu dengan pengadukan dan pemindahan wadah setiap 2 minggu. Sampling dan pengamatan dilakukan pada 0, 2, 4, 6, 8, dan 10 minggu. Seluruh pekerjaan dilakukan secara aseptis. Skema proses pembuatan inokulum kaldu kacang hijau ditunjukkan dalam Gambar 2.

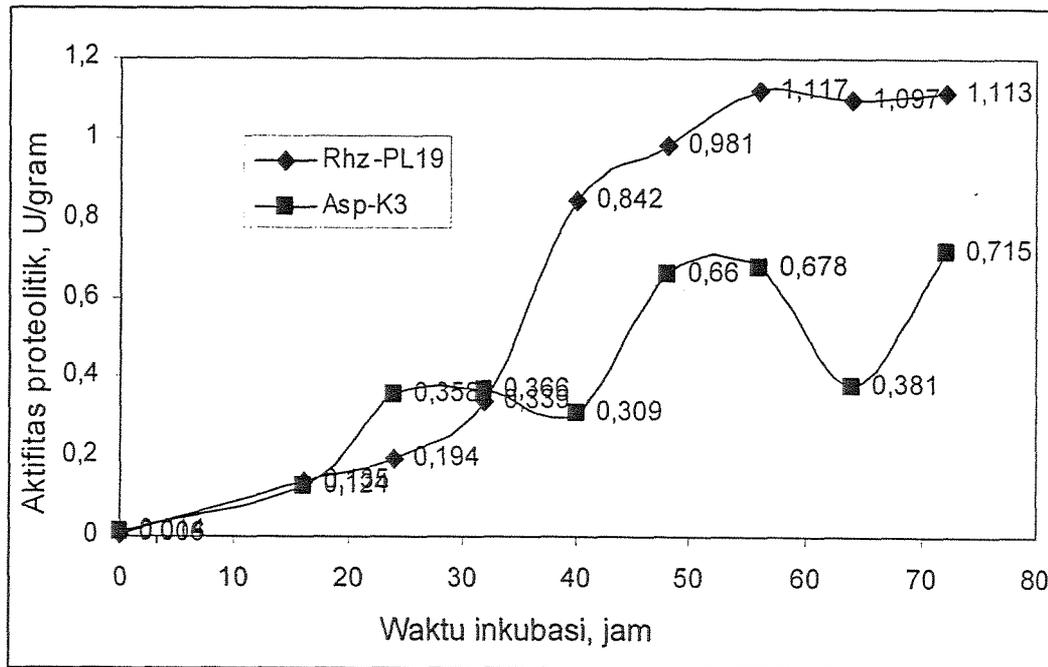


Gambar 2. Skema proses pembuatan kaldu nabati dari kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) secara fermentasi garam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Jenis Starter dan Waktu Inkubasi Terhadap Pertumbuhan Spora Kapang dan Aktivitas Proteolitik Inokulum Kaldu

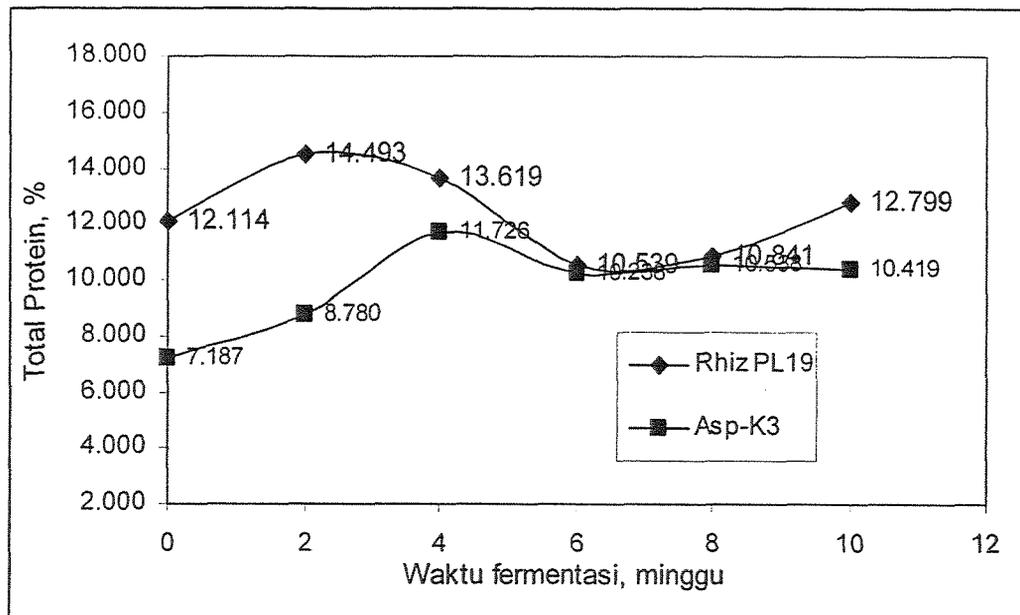
Perlakuan proses pembuatan inokulum kaldu dengan starter *Rhizopus sp-PL19* dan *Aspergillus sp-K3* dengan waktu inkubasi 0 - 72 jam serta interaksi antara jenis starter dan waktu inkubasi yang berbeda menghasilkan inokulum kaldu dengan aktivitas proteolitik berbeda nyata. Semakin lama waktu inkubasi, akan meningkatkan aktivitas proteolitik ke dua jenis inokulum kaldu, seperti ditunjukkan dalam Gambar 3. Secara keseluruhan, aktivitas proteolitik inokulum dengan starter *Rhizophus sp PL-19* lebih tinggi apabila dibandingkan dengan aktivitas proteolitik inokulum dengan starter *Aspergillus sp-K3*. Inkubasi selama 56 jam merupakan waktu optimal bagi inokulum *Rhizophus sp-PL19* karena menghasilkan aktivitas proteolitik tertinggi (1,117 Unit/gram) dan 72 jam bagi inokulum *Aspergillus sp-K3* (0,715 Unit/gram).



Gambar 3. Hubungan antara waktu inkubasi dan aktivitas proteolitik inokulum kaldu menggunakan jenis *Rhizopus sp-PL19* dan *Aspergillus sp-K3*

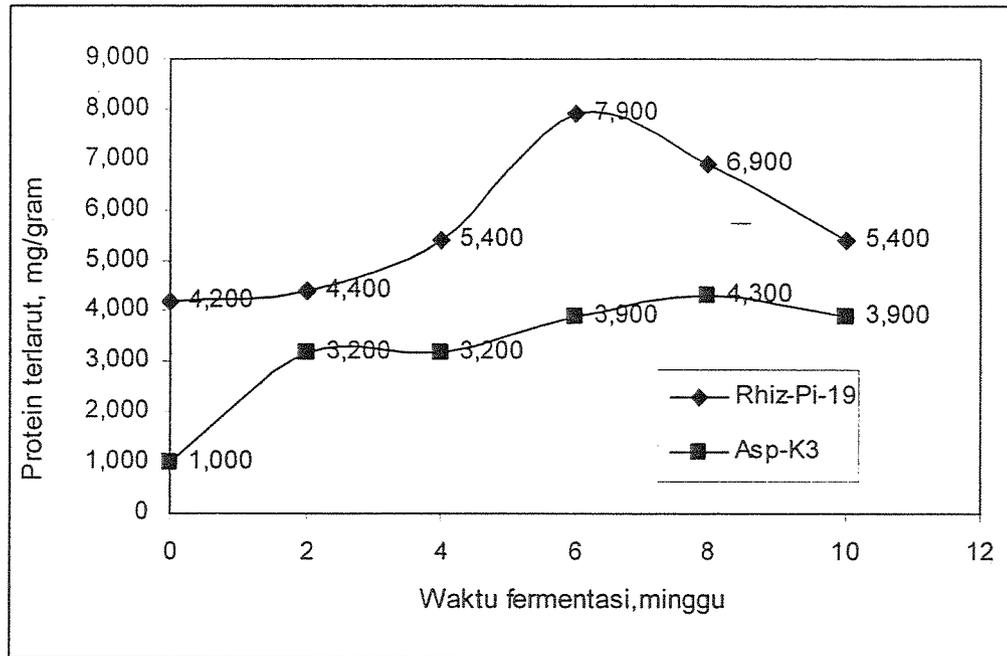
Inokulum dengan starter *Rhizopus sp-PL19* menunjukkan kenaikan aktivitas proteolitik lebih signifikan apabila dibandingkan dengan starter *Aspergillus sp-K3* yang terlihat lebih fluktuatif selama proses inkubasi. Perbedaan aktivitas proteolitik ini kemungkinan disebabkan perbedaan jenis kapang dan kemampuan kapang dalam memproduksi enzim protease. Jenis substrat dan kondisi proses inkubasi (waktu, kelembaban, pH dan suhu inkubasi) merupakan faktor-faktor yang berpengaruh pada pembentukan enzim protease selain daripada tingkat kemurnian kapang. Inokulum dengan starter *Aspergillus sp-K3* merupakan inokulum dengan campuran dari berbagai spesies dimana pada pertumbuhannya dengan substrat beras seperti umumnya pada koji mempunyai aktivitas cukup tinggi. Namun apabila dibandingkan dengan inokulum *Rhizopus sp-PL19* dengan substrat yang sama, maka aktivitas proteolitik yang dihasilkan inokulum *Aspergillus sp-K3* lebih rendah.

Perbedaan jenis kapang memungkinkan terbentuknya jenis enzim protease yang berbeda dengan aktivitas proteolitik yang berlainan. *Aspergillus sp* menghasilkan enzim protease netral, protease alkali dan protease asam tergantung pada kisaran pH pertumbuhan. Pada pertumbuhan dengan substrat beras, pH berkisar antara 6 - 7 yang memungkinkan terbentuknya enzim protease netral yang merupakan endopeptidase logam dan ini dihasilkan oleh *Aspergillus soyae*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus* dengan aktivitas relatif sebagai aktivitas keseluruhan antara 24 - 48%. Enzim endopeptidase logam aktivitasnya tergantung dari adanya logam (Zn, Cd, Mg, Co, Fe, Hg, Cu dan Ni) (Suhartono, 1989), sedangkan pada inokulum *Rhizopus sp PL19* seperti halnya kapang *Rhizopus sp* lainnya menghasilkan jenis enzim protease asam yang aktivitasnya disebabkan oleh adanya dua gugus karboksil pada sisi aktifnya yang memungkinkan aktivitasnya lebih



Gambar 4. Hubungan antara waktu inkubasi dan kandungan protein total kaldu kacang hijau menggunakan inokulum jenis *Rhizopus sp-PL19* dan *Aspergillus sp-K3*

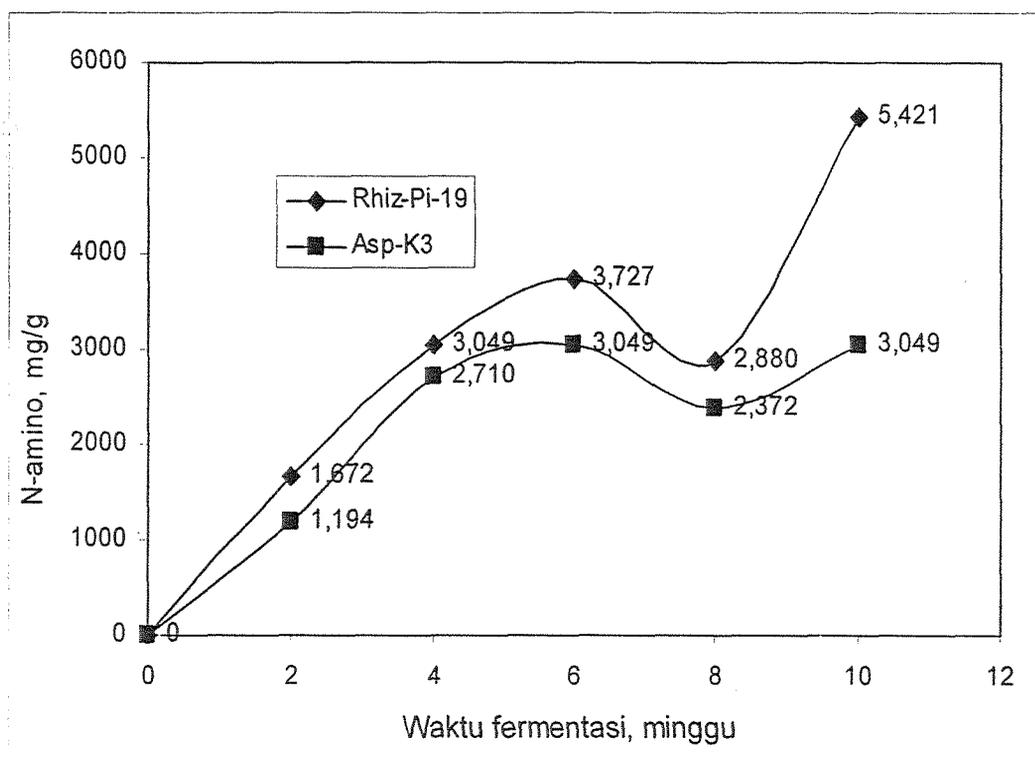
Hubungan antara waktu inkubasi dan kandungan protein terlarut inokulum kaldu kacang hijau menggunakan jenis *Rhizopus sp-PL19* dan *Aspergillus sp-K3* ditunjukkan dalam Gambar 5. Terhadap kandungan protein terlarut, perlakuan waktu fermentasi, jenis inokulum dan interaksi antara keduanya menghasilkan kaldu kacang hijau dengan kandungan protein terlarut tidak berbeda nyata, meskipun terjadi peningkatan protein terlarut kaldu selama proses fermentasi garam.



Gambar 5. Hubungan antara waktu inkubasi dan kandungan protein terlarut kaldu kacang hijau menggunakan inokulum jenis *Rhizopus sp-PL19* dan *Aspergillus sp-K3*

Kaldu kacang hijau dengan inokulum *Rhizophus sp-PL 19* menunjukkan kandungan protein terlarut lebih tinggi daripada kaldu dengan inokulum *Aspergillus sp-K3* dengan waktu fermentasi optimal yang berbeda. Kemungkinan hal ini disebabkan oleh aktivitas enzim proteolitik kedua jenis inokulum tersebut berbeda. Waktu fermentasi 6 minggu menghasilkan kaldu dengan inokulum *Rhizophus sp-PL 19* tertinggi (7,9 mg/gram) dan 4 minggu pada kaldu dengan inokulum *Aspergillus sp-K3* (4,3 mg/gram). Penurunan kandungan protein terlarut mulai tampak setelah fermentasi 6 minggu pada kaldu dengan inokulum *Rhizophus sp-PL19* dan 10 minggu pada kaldu dengan inokulum *Aspergillus sp-K3*. Perbedaan waktu ini diduga berkaitan dengan perbedaan laju reaksi aktivitas proteolitik enzim protease, dimana pada aktivitas proteolitik yang lebih tinggi pada inokulum *Rhizophus sp-PL19* kecepatan perombakan juga lebih besar sampai pada batas dimana enzim tidak mampu lagi untuk merombak substrat dengan kata lain mulai terjadi penurunan energi aktivitasnya yang diperlihatkan dengan mulai terjadi penurunan produk hasil hidrolisisnya (Lehninger, 1982). Pada kaldu dengan inokulum *Aspergillus sp K3*, penurunan aktivitas ini tidak cukup tajam dan kemungkinan ini disebabkan oleh sifat hidrolisisnya yang berbeda oleh karena perbedaan jenis proteasenya.

Hubungan antara waktu inkubasi dan kandungan N-amino inokulum kaldu kacang hijau menggunakan jenis *Rhizopus sp-PL19* dan *Aspergillus sp-K3* ditunjukkan dalam Gambar 6. Perlakuan proses dengan jenis inokulum yang berbeda dan waktu fermentasi yang semakin meningkat akan menghasilkan kaldu kacang hijau dengan kandungan N-amino yang berbeda nyata, namun tidak berbeda nyata pada interaksi antara jenis inokulum dan waktu fermentasi. Laju penguraian protein kacang hijau oleh aktivitas proteolitik menjadi N- amino oleh kedua jenis inokulum menunjukkan waktu fermentasi yang optimal (10 minggu) menghasilkan perolehan N-amino yang berbeda namun secara keseluruhan dengan semakin lamanya waktu fermentasi meningkatkan kandungan N-amino kaldu kacang hijau.



Gambar 6. Hubungan antara waktu inkubasi dan kandungan N-amino kaldu kacang hijau menggunakan inokulum jenis *Rhizopus sp-PL19* dan *Aspergillus sp-K3*

Inokulum *Rhizopus sp-PL19* menghasilkan kandungan N-amino 5,421 mg/gram, lebih tinggi daripada inokulum *Aspergillus sp-K3* (3,049 mg/gram) pada waktu fermentasi 10 minggu. Perbedaan ini selain dari kandungan protein awal fermentasi yang berlainan juga disebabkan oleh aktivitas proteolitiknya yang berbeda. Perombakan protein kaldu oleh enzim protease memungkinkan terbentuknya asam-asam amino dengan berat molekul lebih rendah guna memudahkan daya cerna dan terbentuknya citarasa yang enak terutama oleh terbentuknya asam glutamat sehingga dengan semakin lamanya waktu fermentasi akan meningkatkan citarasa kaldu. Dalam fermentasi ini, kontrol terbentuknya N-amino menjadi penting untuk tidak sampai pada pembentukan amoniak, namun pada umumnya fermentasi sampai 6 bulan masih pada batas waktu yang menghasilkan citarasa enak oleh karena proses perombakan lebih optimal.

KESIMPULAN

1. Waktu inkubasi, jenis stater dan interaksi antara keduanya berpengaruh terhadap aktivitas proteolitik inokulum kaldu. Waktu inkubasi yang lama akan meningkatkan aktivitas proteolitik inokulum kaldu. Aktivitas proteolitik tertinggi pada inokulum jenis *Rhizopus sp-PL19* dicapai pada waktu inkubasi 56 jam (1,117 Unit/gram) dan inokulum jenis *Aspergillus sp-K3* dicapai pada waktu inkubasi 72 jam (0,715 Unit/gram);

2. Jenis inokulum, waktu fermentasi garam dan interaksi antara keduanya berpengaruh terhadap komposisi protein kaldu kacang hijau. Lamanya waktu fermentasi akan meningkatkan kandungan protein terlarut dan N-amino. Komposisi protein total, protein terlarut dan N-amino kaldu kacang hijau dengan inokulum jenis *Rhizophus sp-PL 19* lebih baik daripada kaldu dengan inokulum jenis *Aspergillus sp-K3*;
3. Kaldu kacang hijau terbaik dihasilkan oleh inokulum jenis *Rhizophus sp-PL19* dengan kandungan protein total 12,7994%, protein terlarut 5,4 mg/gram dan N-amino 5,4208 mg/gram dengan waktu fermentasi 10 minggu.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pemimpin Proyek Pengembangan Bahan Pangan Hewani dan Nabati – LIPI atas diikutsertakannya kegiatan ini di dalam DIP Tahun Anggaran 2004. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Dra. Thelma A Budiarti M.S. atas bantuan stater inokulum *Rhizophus sp-PL19* dan Sdri. Herliana atas bantuan teknisnya sehingga kegiatan ini dapat terlaksana.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. Daftar komposisi bahan makanan. Direktorat Gizi. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- AOAC. 1995. Official Method of Analysis of Association of Official Analytical Chemistry. Washington D.C.
- Darwis, A.A. dan Sukara, E. 1990. Isolasi, purifikasi dan karakterisasi enzim. Departemen P & K. Dirjen Pendidikan Tinggi. PAU Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Gasparz, V. 1995. Teknik analisis dalam penelitian percobaan. Tarsito. Bandung.
- Lehninger. 1982. Dasar-dasar Biokimia. Jilid I. Di Indonesiakan oleh Maggy Thenawijaya. Erlangga. Jakarta.
- Lotong, N., Koji. 1985. *Di dalam* Wood B.J.B (ed). Microbiology of fermented food. Vol. 2. Elsevier Applied Science Publisher. New York.
- Pope, C.G. dan Stevens, M.F. 1989. The determination of amino nitrogen using copper method. Biochemical Journal.
- Suhartono, M.T. 1989. Protease. Departemen P & K. Dirjen Pendidikan Tinggi. PAU Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Susilowati, A., d.k.k. 2002. Kaldu nabati : alternatif pasta kaldu dari kacang-kacangan secara fermentasi. Prosiding Seminar Nasional Tantangan Penelitian Kimia Dalam Era Biologi dan Super Informasi. Jakarta.
- Winarno, F.G. 1989. Kimia pangan dan gizi. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

- Wood B.J.B. 1985. *Microbiology of fermented food*. Vol. 2. Elsevier Applied Science Publishers. New York.
- Yong, F.M. dan B.J.B. Wood. 1974. *Microbiology and biochemistry of soy sauce fermentation*. *Adv. Applied Microbial*. London.