

**PRODUKSI AMILASE DARI KAPANG**  
*Aspergillus awamori var kawachi* **PADA SUBSTRAT DEDAK**  
**UNTUK PEMBUATAN TEPUNG BERAS KAYA PROTEIN**

Oleh  
**S. JONI MUNARSO**  
**86080**



**FAKULTAS PASCASARJANA**  
**INSTITUT PERTANIAN BOGOR**  
**1989**

## RINGKASAN

S. JONI MUNARSO. Produksi amilase dari kapang *Aspergillus awamori* var. *kawachi* pada substrat dedak untuk pembuatan tepung beras kaya protein (di bawah bimbingan Dr.Ir. DEDI FARDIAZ, MSc sebagai Ketua ; Dr.Ir. SRIKANDI FARDIAZ, MSc dan Dr.Ir. DJOKO S. DAMARDJATI, MS sebagai anggota).

Teknologi pembuatan tepung beras kaya protein mempunyai prospek yang baik dan dapat dikembangkan untuk meningkatkan nilai tambah beras dan hasil samping pengolahannya. Kendalanya terletak pada penggunaan enzim amilase yang relatif mahal. Oleh sebab itu penelitian yang mencakup kedua aspek diatas perlu dilakukan.

Tujuan penelitian ini adalah (1) mempelajari pengaruh perbedaan komposisi mineral dengan cara ekstraksi terhadap aktivitas ekstrak amilase, (2) mengevaluasi kondisi optimum aktivitasnya, serta (3) mempelajari penggunaan ekstrak amilase dalam pembuatan tepung beras kaya protein (BKP).

Penelitian dilakukan dalam tiga tahap, yakni (1) produksi amilase, (2) penetapan kondisi aktivitas optimum, serta (3) pembuatan tepung BKP dan evaluasi sifat-sifatnya. Berbagai pengamatan yang dilakukan antara lain aktivitas  $\alpha$ -amilase, aktivitas amiloglukosidase, kadar protein terlarut, aktivitas spesifik, pH optimum dan suhu optimum, sifat fisik, kimia maupun fungsional tepung beras kaya protein.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kapang *Aspergillus awamori* dapat menghasilkan amilase dengan aktivitas maupun kemurnian yang lebih tinggi dibanding kapang *Aspergillus niger*. Penggunaan mineral dengan komposisi 4,7%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 0,1%  $\text{CaCl}_2$ ; 0,02%  $\text{KCl}$  dan 0,02%  $\text{MgCl}_2$  cenderung meningkatkan kemurnian amilase yang diperoleh daripada larutan mineral dengan komposisi yang lebih beragam. Ekstraksi amilase sebaiknya dilakukan dengan menambahkan 5 bagian air untuk 1 bagian bobot massa hasil fermentasi media dedak, dan ditambahkan pula 1 ml larutan  $\text{CaCl}_2$  20% untuk setiap 40 ml ekstrak yang dihasilkan.

Amilase hasil penelitian ini lebih cenderung bersifat sebagai AMG dibanding  $\alpha$ -amilase. Sebagai AMG, enzim ini memiliki pH optimum 5,0 dan suhu optimum  $50^\circ\text{C}$ .

Pembuatan tepung BKP dapat dilakukan dan 150 gram tepung beras ditambah 3 liter air dan digelatinisasi pada suhu  $95^\circ\text{C}$  selama 4 menit. Kemudian ditambahkan 15 ml ekstrak amilase beraktivitas 3 unit/ml dan hidrolisa dilakukan selama 45 menit pada suhu  $50^\circ\text{C}$  dan pH 5,0. Dengan proses ini dihasilkan tepung BKP dengan rendemen padatan 29,30%, rendemen protein 68,86%, serta memiliki kadar protein 3 kali lebih besar daripada kadar protein bahan dasar lainnya. Tepung BKP bersifat instant, dapat disajikan sebagai bubur dengan menambahkan 100 ml air panas ke dalam 26 gram tepung BKP.

PRODUKSI AMILASE DARI KAPANG  
*Aspergillus awamori* var *kawachi* PADA SUBSTRAT DEDAK  
UNTUK PEMBUATAN TEPUNG BERAS KAYA PROTEIN

Oleh:

S.JONI MUNARSO

Tesis sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Magister Sains

pada

Fakultas Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

BIDANG KEAHLIAN ILMU PANGAN

BOGOR

1989

Judul tesis : Produksi amilase dari kapang *Aspergillus awamori* var *kawachi* pada substrat dedak untuk pembuatan tepung beras kaya protein

Nama mahasiswa : S. Joni Munarso

Nomor pokok : 86080

Jurusan : Ilmu Pangan

Menyetujui

1. Komisi Pembimbing



Dr. Ir. Dedi Fardiaz, MSc.

-----  
Ketua



Dr. Ir. Srikandi Fardiaz, MSc.

-----  
Anggota



Dr. Ir. Djoko S. Damardjati, MS.

-----  
Anggota

2. Fakultas Pascasarjana

Ketua Jurusan Ilmu Pangan



Dr. Ir. Srikandi Fardiaz, MSc.



-----  
Dr. Ir. Edi Guhardja

Tanggal lulus :

## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan pada tanggal 29 Agustus 1958 di Jepara, Jawa Tengah. Ia merupakan anak ke lima dari 5 bersaudara keluarga Sukardi (almarhum) dan Siti Ramelah.

Masa kecilnya dihabiskan di kota kelahirannya itu. Memulai belajar di SD Negeri Panggang I Jepara (1966-1971), kemudian berlanjut ke SMP Negeri I Jepara (1972-1974) dan SMA Negeri Jepara (1975-1977). Menjelang kelulusannya dari SMA tersebut ia mendapat undangan dari Institut Pertanian Bogor untuk menjadi mahasiswa melalui Proyek Perintis II. Sejak tahun 1978 itulah ia menuntut ilmu dalam bidang Teknologi Hasil Pertanian di Fakultas Teknologi Pertanian, IPB hingga lulus 17 Maret 1982.

Pada tahun 1982 itu ia memulai karirnya sebagai peneliti di Balai Penelitian Tanaman Pangan Sukamandi. Tahun 1985 ia mendapat kesempatan untuk melakukan magang penelitian di Department of Food Science and Technology, University of Nebraska, Lincoln - Amerika Serikat. Tahun 1986 ia ditugaskan kembali untuk belajar di Jurusan Ilmu Pangan Fakultas Pascasarjana - IPB. Sampai kini ia tetap bekerja di Balai yang sama sebagai Ajun Peneliti Muda.

Pada tahun 1984 ia mendapatkan mata hatinya, Yuniati dan dikaruniai 2 orang putra kesayangannya Dani Yustiardi Munarso dan Diaz Sastiardi Munarso.

## KATA PENGANTAR

Enzim adalah senyawa yang tak pernah lepas dari makhluk hidup. Kemampuannya untuk melakukan fungsi-fungsi khusus telah banyak diketahui dan dimanfaatkan untuk berbagai tujuan. Berkaitan dengan hal inilah penulis tertarik untuk melakukan penelitian enzim dan penerapannya demi peningkatan nilai tambah produk pertanian. Atas limpahan rahmat Allah, akhirnya hasil penelitian itu dapat disajikan dalam tulisan ini.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasihnya yang tak terhingga kepada :

1. Pemerintah Republik Indonesia yang telah memberikan kesempatan dan dana belajar kepada penulis.
2. Kepala Balai Penelitian Tanaman Pangan atas ijin melakukan tugas belajar.
3. Dr.Ir.Dedi Fardiaz, Dr.Ir. Srikandi Fardi dan Dr.Ir Djoko S.Damardjati sebagai komisi pembimbing yang telah memberikan berbagai pengarahan dan bimbingan selama masa belajar.
4. Kepala Kelompok Peneliti Teknologi Balittan Sukamandi atas segala fasilitas dan kemudahan yang penulis terima selama melakukan penelitian.
5. Rekan-rekan peneliti dan teknisi di Laboratorium Kimia dan Teknologi Balitan Sukamandi atas kerjasama yang baik.

Kepada dik Yun penulis mengucapkan selamat atas tugas "Wapres" yang dilaksanakan secara jitu. Kepadanya beserta Dani dan Diaz, penulis juga sangat berterima kasih atas kesabaran kalian.

Tak ada gading yang tak retak. Namun sepercik air pun timbulkan riak. Semoga.

Penulis

# DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	
DAFTAR GAMBAR	
DAFTAR LAMPIRAN	
I. PENDAHULUAN.....	1
A. Latar belakang.....	1
B. Dasar pertimbangan.....	2
C. Tujuan.....	4
D. Sasaran.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. Enzim dan mikroba penghasilnya.....	5
1. Enzim alfa - amilase.....	6
2. Enzim glukoamilase.....	8
B. Fermentasi.....	10
1. Fermentasi medium padat.....	11
2. Substrat fermentasi.....	12
3. Inokulum dan nutrisi.....	14
4. Ekstraksi enzim.....	16
C. Kinetika dan pola protein enzim.....	17
1. Kinetika enzim.....	17
2. Identifikasi pola protein enzim kasar.....	21
D. Morfologi dan komposisi kimia beras.....	23
1. Morfologi.....	23
2. Komposisi kimia beras.....	24
E. Tepung beras kaya protein (BKP).....	26
1. Pembuatan tepung BKP.....	27
2. Sifat fisik dan kimia tepung BKP.....	29
III. BAHAN DAN METODE.....	31
A. Bahan.....	31
B. Metode penelitian.....	31

C. Prosedur pengamatan.....	37
1. Produksi ekstrak enzim.....	37
2. Aktivitas alfa-amilase.....	38
3. Aktivitas amiloglukosidase.....	39
4. Kandungan protein terlarut dalam filtrat enzim.....	40
5. Pembuatan tepung beras kaya protein.....	40
6. Penentuan gula produksi (glukosa).....	41
7. Rendemen tepung BKP dan rendemen protein.....	42
8. Tingkat keputihan.....	42
9. Densitas kamba.....	43
10. Analisa proksimat.....	43
11. Penetapan viskositas optimum tepung BKP.....	43
12. Sifat penyerapan air dan minyak.....	44
13. Sifat pembentukan gel.....	45
14. Sifat kapasitas buih.....	45
15. Penentuan berat molekul ekstrak amilase.....	46
 IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	 47
A. Produksi ekstrak amilase.....	47
1. Faktor-faktor proses produksi.....	47
Substrat.....	47
Nutrien.....	48
Jumlah spora.....	48
Suhu dan waktu inkubasi.....	49
Cara panen enzim.....	49
2. Penentuan ekstrak amilase terbaik.....	50
Pengekstrak $\text{CaCl}_2$ .....	52
Larutan nutrien dan kadar protein amilase...	55
Penetapan perlakuan optimum.....	56
B. Kondisi aktivitas optimum, kinetika dan pola protein.....	57
1. pH dan suhu aktivitas optimum.....	57
2. Kinetika ekstrak amilase.....	61
3. Pola protein ekstrak enzim.....	67
C. Sifat bahan dan produksi tepung BKP.....	71
1. Sifat tepung beras sebagai bahan dasar.....	71
2. Produksi tepung BKP.....	76
Kadar glukosa sebagai penduga kadar protein.....	76
Peningkatan skala produksi.....	86

D. Sifat fisik, kimia, fungsional dan aplikasi tepung BKP.....	91
1. Sifat fisik.....	91
Derajat putih.....	91
Densitas kamba.....	92
Viskositas bubur.....	94
2. Sifat kimia.....	95
Protein.....	95
Lemak.....	96
3. Sifat fungsional, daya cerna protein dan aplikasi tepung BKP.....	98
Daya serap air.....	99
Daya serap minyak.....	101
Pembentukan gel dan daya buih.....	101
Daya cerna protein.....	103
Aplikasi tepung BKP.....	104
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	106
DAFTAR PUSTAKA.....	110
LAMPIRAN.....	115

## DAFTAR TABEL

No.	Judul tabel	Halaman
1.	Sifat enzim $\alpha$ -amilase dari beberapa jenis kapang.....	8
2.	Sifat enzim glukamilase dari beberapa kapang.....	10
3.	Komposisi kimia dedak padi.....	13
4.	Pengaruh sumber karbon pada produksi amilase dan protease dari <i>Trichoderma viride</i> .....	16
5.	Perbandingan komposisi kimia tepung BKP dengan tepung beras biasa.....	30
6.	Komposisi larutan nutrien I dan II.....	32
7.	Rekapitulasi F hitung hasil sidik ragam.....	51
8.	Uji Duncan pada taraf 5% dari setiap pengamatan...	51
9.	Nilai Km dan V maks untuk $\alpha$ -amilase dan AMG dari ekstrak AA-I-2 dan AA-II-1.....	65
10.	Hasil pengukuran mobilitas relatif (rf) dan berat molekul dari berbagai contoh.....	68
11.	Komposisi kimia tepung beras IR64 dan IR42.....	73
12.	Sifat amilografi tepung beras IR64 dan IR42.....	73
13.	Perbandingan sifat fisik tepung BKP.....	92
14.	Kekentalan rata-rata bubur bayi komersial dan bubur BKP pada berbagai konsentrasi.....	95
15.	Komposisi kimia tepung bubur bayi komersial, tepung BKP dan tepung IR64.....	96
16.	Daya serap air, minyak, pembentukan gel dan daya cerna protein pada berbagai tepung.....	100

## DAFTAR GAMBAR

No.	Judul Gambar	Halaman
1.	Mekanisme hidrolisa pati oleh enzim perombak pati.....	5
2.	Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi yang dikatalisa enzim.....	18
3.	Kurva Lineweaver-Burk untuk menentukan V maks dan Km.....	20
4.	Skema pembuatan tepung BKP (Hansen et al., 1981).....	28
5.	Skema produksi ekstrak amilase.....	33
6.	Perbandingan aktivitas spesifik $\alpha$ -amilase dari seluruh perlakuan.....	53
7.	Perbandingan aktivitas spesifik AMG dari seluruh perlakuan.....	53
8.	Penetapan pH optimum aktivitas $\alpha$ -amilase.....	58
9.	Penetapan pH optimum aktivitas AMG.....	58
10.	Penetapan suhu optimum aktivitas $\alpha$ -amilase.....	60
11.	Penetapan suhu optimum aktivitas AMG.....	61
12.	Kurva Lineveawer-Burk aktivitas $\alpha$ -amilase dari ekstrak AA-I-2.....	62
13.	Kurva Lineveawer-Burk aktivitas $\alpha$ -amilase dari ekstrak AA-II-1.....	63
14.	Kurva Lineveawer-Burk aktivitas AMG dari ekstrak AA-I-2.....	63
15.	Kurva Lineveawer Burk aktivitas AMG dari ekstrak AA-II-1.....	64
16.	Pola protein standar BM, enzim murni dan ekstrak amilase AA-I-2 dan AA-II-1.....	70
17.	Amilogram tepung beras IR64 dan IR42.....	74
18.	Skema pembuatan tepung BKP.....	78

19. Kadar glukosa supernatan hasil aktivitas ekstrak amilase pada tepung IR42.....	81
20. Kadar glukosa supernatan hasil aktivitas ekstrak amilase pada tepung IR64.....	81
21. Kadar protein tepung BKP hasil aktivitas ekstrak amilase pada tepung IR42.....	84
22. Kadar protein tepung BKP hasil aktivitas ekstrak amilase pada tepung IR64.....	84
23. Kurva hubungan kadar protein dan glukosa hasil aktivitas AA-I-2 pada tepung IR42.....	87
24. Kurva hubungan kadar protein dan glukosa hasil aktivitas AA-II-1 pada tepung IR42.....	87
25. Kurva hubungan kadar protein dan glukosa hasil aktivitas AA-I-2 pada tepung IR64.....	88
26. Kurva hubungan kadar protein dan glukosa hasil aktivitas AA-II-1 pada tepung IR64.....	88
27. Standar pembacaan Rf (Sigma Chem.Co).....	125

DAFTAR LAMPIRAN.

No.	Judul Lampiran	Halaman
1.	Prosedur pembuatan pereaksi untuk analisa aktivitas alfa-amilase.....	115
2.	Prosedur pembuatan pereaksi untuk analisa aktivitas amiloglukosidase.....	116
3.	Prosedur pembuatan pereaksi untuk analisa protein terlarut.....	117
4.	Bahan kimia dan teknik penentuan BM ekstrak amilase.....	118

## I. PENDAHULUAN

### A. LATAR BELAKANG

Sejak tahun 1984, Pemerintah Indonesia telah berhasil mewujudkan swasembada beras. Produksi beras telah dapat ditingkatkan dari 12,3 juta ton pada tahun 1970 menjadi 27,5 juta ton pada tahun 1987 (Balai Penelitian Tanaman Pangan Sukamandi, 1988). Namun di balik keberhasilan tersebut, berbagai masalah dan tantangan segera muncul dalam bentuk yang lain. Salah satu tantangan itu menyangkut upaya peningkatan nilai tambah dari beras dan hasil sampingnya. Berbagai usaha yang dapat dilakukan antara lain peningkatan mutu beras, pengolahan beras non nasi, dan pemanfaatan hasil samping beras menjadi produk bernilai tinggi.

Menir dan beras pecah merupakan komponen yang dapat menurunkan mutu pasar suatu jenis beras. Kadar kedua komponen ini biasanya dibatasi dan bahkan dipisahkan sama sekali untuk mendapatkan beras dengan mutu pasar yang sangat baik. Tergantung pada jenis dan umur alat penggiling (huller), potensi menir dan beras pecah ini berkisar 20-38% dari seluruh produksi beras. Beras pecah dan menir ternyata juga memiliki harga yang relatif murah, yakni sekitar 50% dari harga beras (Winarno, 1986). Oleh karena salah satu sasaran pembangunan pertanian adalah me-

tingkatkan pendapatan dan kesejahteraan petani, maka usaha peningkatan nilai tambah beras dan hasil sampingnya merupakan usaha yang perlu dilakukan.

## B. DASAR PERTIMBANGAN

Mengolah beras, terutama beras pecah dan menir, menjadi tepung merupakan suatu alternatif yang memungkinkan untuk meningkatkan nilai tambahnya. Selain telah lama dikenal sebagai bahan dasar berbagai produk makanan, tepung beras juga dapat berfungsi sebagai wahana pencampuran bahan pangan lain. Sifat ini dapat digunakan sebagai sarana untuk mewujudkan upaya diversifikasi pangan.

Tepung beras juga dapat diperbaiki nilai gizinya. Beberapa peneliti membuktikan bahwa tepung beras dapat ditingkatkan kadar proteinnya dari 7-8% menjadi lebih dari 20% melalui teknologi pemanfaatan enzim perombak pati (Hansen et al., 1981; Purwani, 1987; Hartanto, 1987).

Sebagai makanan pokok, beras telah menyumbang sekitar 40-80% kalori dan 45-55% protein dalam rata-rata menu makanan rakyat Indonesia (Damardjati, 1983). Namun demikian masalah kekurangan kalori protein (KKP) masih tetap menjadi masalah pangan dan gizi di Indonesia. Oleh

karena itu pembuatan tepung beras kaya protein dengan penggunaan teknologi enzimatik di atas mempunyai prospek yang cukup baik untuk ikut menanggulangi masalah ini.

Enzim perombak pati (amilase) merupakan kunci utama dalam teknologi pembuatan tepung beras kaya protein (tepung BKP) ini. Harga enzim yang mahal merupakan salah satu kendala dalam pengembangannya. Dengan demikian penelitian yang menyangkut produksi enzim dan aktivitasnya perlu dilakukan terlebih dahulu.

Berbagai penelitian melaporkan bahwa enzim kasar (ekstrak amilase) dapat dihasilkan melalui proses fermentasi medium padat dari berbagai mikroba seperti *Aspergillus oryzae* (Hansen et al., 1981; Hansen, 1985; Chang et al., 1986) dan *Aspergillus niger* (Hartanto, 1987). Kapang *Aspergillus awamori* juga mendapat cukup banyak perhatian karena kemampuannya menghasilkan 3 jenis glu-koamilase (AMG) (Crueger et al., 1986). Penggunaan berbagai jenis kapang ini tentu tidak menjadi masalah, karena di negara tropis seperti Indonesia, bermacam-macam kapang dapat diperoleh dengan mudah.

Di lain pihak aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh substrat tempat tumbuh kapang, ketersediaan berbagai nutrisi, kondisi pertumbuhan kapang dan cara ekstraksinya. Oleh sebab itu faktor-faktor ini mutlak perlu diperhatikan untuk memperoleh enzim kasar dengan aktivitas maupun kemurnian yang cukup tinggi.

### C. TUJUAN

Dengan memperhatikan dasar pertimbangan di atas, maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan :

1. Mempelajari pengaruh perbedaan komposisi mineral dan cara ekstraksi terhadap aktivitas ekstrak amilase yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* dan *Aspergillus awamori* pada proses fermentasi media dedak padi.
2. Menentukan ekstrak amilase dengan kemurnian tertinggi dan mengevaluasi sifat kinetika maupun kondisi optimum aktivitasnya.
3. Mempelajari penggunaan ekstrak amilase dalam proses pembuatan tepung beras kaya protein (tepung BKP) dan mengevaluasi sifat-sifat tepung BKP yang dihasilkan.

### D. SASARAN

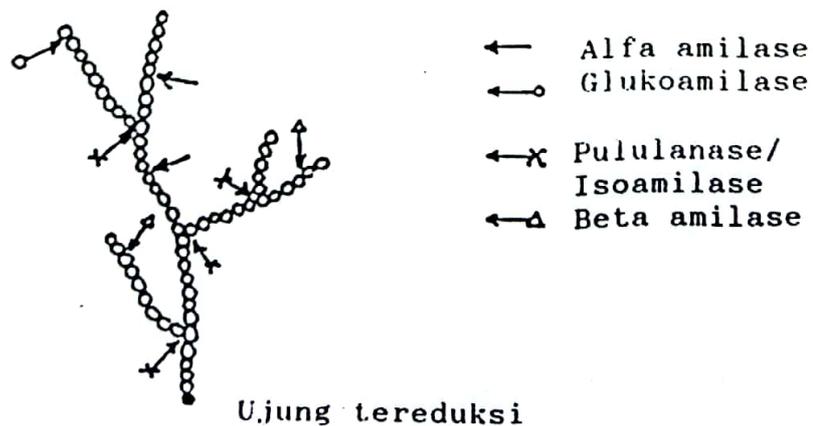
Sasaran yang hendak dicapai dari penelitian ini adalah 1) mendapatkan metode pembuatan ekstrak amilase, 2) mendapatkan teknologi pembuatan tepung BKP dengan proses yang lebih mudah, dan 3) karakterisasi sifat ekstrak amilase yang diperoleh dari *A. awamori*.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. ENZIM DAN MIKROBA PENGHASILNYA

Pati merupakan salah satu polisakarida dalam tanaman yang tersedia dalam jumlah yang sangat banyak. Amilase adalah enzim yang mampu menghidrolisa pati. Hidrolisa pati dengan enzim amilase, pada mulanya akan menghasilkan polimer glukosa rantai pendek yang disebut dekstrin. Hidrolisa lanjut akan memecah polimer ini menjadi maltosa dan akhirnya terbentuk glukosa.

Dari beberapa jenis enzim perombak pati, terdapat 6 jenis enzim yang paling penting, yaitu alfa-amilase, beta-amilase, glukoamilase, glukosa isomerase, pululanase, dan isoamilase (Crueger dan Crueger, 1986). Gambar 1 menunjukkan cara kerja enzim-enzim tersebut pada pati.



Gambar 1. Mekanisme hidrolisa pati oleh enzim perombak pati

## 1. Enzim alfa-amilase

Enzim  $\alpha$ -amilase (E.C.3.2.1.1) yang juga disebut 1,4 -  $\alpha$ -glukan-glukanohidrolase adalah enzim ekstra-selular yang mampu memecah ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik. Enzim ini termasuk dalam kelompok endoenzim, yakni memotong substrat dari bagian dalam molekul. Oleh sebab itu enzim ini disebut juga endoamilase. Kerja enzim ini tidak dihambat oleh adanya ikatan  $\alpha$ -1,6-glikosidik, namun enzim ini tidak pula memecah ikatan tersebut (Fogarty, 1983).

Enzim  $\alpha$ -amilase juga dikelompokkan menurut kemampuannya melakukan liquifikasi dan atau sakarifikasi, menurut pH optimum, selang suhu, dan stabilitasnya. Amilase yang bersifat sakarogenik menghasilkan gula-gula bebas, sedang yang berkemampuan liquifikasi tinggi akan memecah polimer pati, namun tidak menghasilkan gula bebas.

Fogarty (1983) mengatakan bahwa enzim  $\alpha$ -amilase umumnya stabil pada pH 5,5-8,0. Aktivitas optimalnya secara normal terjadi pada pH 4,8-6,5. Enzim ini tidak mempunyai koenzim melainkan sebagai kalsium metalo enzim dengan sekurang-kurangnya satu atom Ca terdapat dalam molekul enzim (Fogarty, 1983).

Terhadap amilosa, enzim  $\alpha$ -amilase mula-mula akan mendegradasi menjadi maltosa dan maltotriosa. Proses ini terjadi sangat cepat dan diikuti dengan penurunan viskositas yang nyata. Selanjutnya maltosa dan maltotriosa akan didegradasi lanjut membentuk glukosa dan maltosa dengan kecepatan yang lebih lambat (Winarno, 1983).

Amilopektin akan didegradasi oleh enzim  $\alpha$ -amilase membentuk glukosa, maltosa, dan beberapa limit dekstrin, yaitu oligosakarida yang tersusun oleh empat atau lebih residu gula yang semuanya mengandung ikatan  $\alpha$ -1,6-glikosidik (Kulp, 1975).

Produksi enzim  $\alpha$ -amilase secara komersial biasa dilakukan dengan fermentasi media padat pada substrat dedak (Aunstrup, 1979). Enzim ini diproduksi oleh banyak bakteri dan kapang. Bakteri yang memproduksi  $\alpha$ -amilase antara lain adalah *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* dan lain-lain. Dari kelompok kapang,  $\alpha$ -amilase dihasilkan antara lain oleh genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Mucor*, *Candida*, *Neurospora* dan *Rhizopus* (Crueger et al., 1986).

Enzim  $\alpha$ -amilase murni yang berasal dari kapang akan mengalami penurunan aktifitas dengan cepat pada suhu di atas 50°C. Tabel 1 memperlihatkan suhu optimum, pH optimum dan berat molekul enzim  $\alpha$ -amilase dari beberapa jenis kapang.

Tabel 1. Sifat enzim  $\alpha$ -amilase dari beberapa jenis kapang

Organisme	pH opt.	Suhu opt. (°C)	Berat molekul
<i>Aspergillus niger</i>	5,0-6,0	60	-
<i>A. oryzae</i>	5,5-5,9	40	52.600
<i>Mucor pusillus</i>	3,5-4,0	65-70	48.000
<i>Pecilomyces</i>			
<i>subglobusum</i>	4,0	38	-
<i>Lypomyces</i>			
<i>kononenkoase</i>	5,5	40	38.000
<i>Schwanniomyces</i>			
<i>castellii</i>	6,0	60	40.000
<i>Torulopsis ingeniosa</i>	5,5	50	-

## 2. Enzim gluukoamilase

Enzim gluukoamilase (E.C.3.2.1.3) sering pula disebut sebagai enzim amiloglukosidase,  $\alpha$ -1,4-glukan-gluko-hidrolase, dan gamma-amilase (Fogarty, 1983). Enzim ini merupakan eksoenzim yang bekerja pada pati dengan cara memotong unit glukosa dari ujung bukan pereduksi dan menghasilkan  $\alpha$ -D-glukosa (Fogarty, 1983). Enzim ini juga menghidrolis ikatan  $\alpha$ -1,6 dan  $\alpha$ -1,3 (Pazur dan Kleppe, 1962 dalam Fogarty, 1983) dengan laju yang jauh lebih rendah dibanding pada ikatan  $\alpha$ -1,4. Hasil akhir kerja enzim ini adalah glukosa, maltosa, dan limit dekstrin.

Suhu optimum yang diperlukan enzim glukoamilase berkisar antara 40-60°C (Kulp, 1975; Fogarty, 1983). Namun pH optimumnya berkisar antara 4,5-5,0 (Fogarty, 1983) atau 4,0-5,0 (Kulp, 1975).

Berbeda dengan enzim  $\alpha$ -amilase, enzim glukoamilase biasanya diproduksi secara komersial dengan fermentasi media cair (Aunstrup, 1979). Berbagai jenis kapang dapat digunakan sebagai sumber enzim, namun hanya spesies dari genus *Aspergillus*, *Rhizopus* dan *Endomyces* yang telah digunakan dalam produksi secara komersial (Aunstrup, 1979). Beberapa spesies tersebut antara lain adalah *A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *R. niveus*, *R. delemar*, *R. ormosaensis*, dan *R. javanicus* (Crueger et al., 1986). Tabel 2 menunjukkan pH optimum, suhu optimum, dan berat molekul enzim glukoamilase dari berbagai jenis kapang.

Dalam produksi enzim sering ditemukan bahwa beberapa isoenzim glukoamilase dihasilkan oleh satu galur. *A. awamori* var *kawachi* menghasilkan tiga jenis glukoamilase. Salah satu di antaranya mampu menghidrolis pati jagung dalam keadaan mentah (Crueger et al., 1986)

Tabel 2. Sifat enzim glukoamilase dari beberapa kapang

Organisme	pH opt.	Suhu opt. (°C)	Berat molekul
<i>Aspergillus awamori</i>	4,5	60	83.700-88.000
<i>Aspergillus niger</i>	4,5-5,0	-	99.000
<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5	60	76.000
<i>Aspergillus saitoi</i>	4,5	-	90.000
<i>Cephalosporium</i>			
<i>eichhorniae</i>	4,2	45-62	26.850
<i>Lipomyces kononenkoase</i>	4,5	50	81.500
<i>Mucor rouxianus</i>	4,6	55	59.000
<i>Penicillium oxilacum</i>	5,0	55-60	84.000
<i>Rhizopus delemar</i>	4,5	40	100.000

Sumber : Fogarty, 1983

## B. FERMENTASI

Menurut ilmu biokimia, fermentasi adalah suatu proses biokimia yang menghasilkan energi dengan komponen organik bertindak sebagai penerima elektron terakhir. Hal ini berbeda dengan istilah respirasi yang juga menghasilkan energi dengan oksigen sebagai penerima elektron terakhir. Oleh sebab itu proses fermentasi dapat berlangsung dalam keadaan tanpa oksigen (Fardiaz, 1988)

Dilihat dari bahan yang digunakan dan produk yang dihasilkan, fermentasi sering didefinisikan sebagai proses pemecahan bahan-bahan organik oleh mikroorganisme

sehingga diperoleh komponen-komponen yang diinginkan. Dalam proses ini kadang-kadang diperlukan oksigen, misalnya dalam fermentasi asam asetat, dimana terjadi oksidasi etanol menjadi asam asetat. Oleh karena itu definisi bahwa fermentasi adalah proses anaerobik menjadi dipertanyakan (Fardiaz,1988).

Proses fermentasi dapat dibedakan dalam beberapa kelompok berdasarkan bermacam-macam kriteria, seperti jenis substrat yang digunakan, jenis starter atau mikroorganisme, cara inokulasi maupun produk yang dihasilkan. Berdasarkan jenis substrat yang digunakan, proses fermentasi dibedakan atas dua golongan, yakni fermentasi medium padat dan fermentasi medium cair.

#### 1. Fermentasi medium padat

Fermentasi medium padat adalah proses fermentasi yang substratnya tidak mengandung air berlebih (Knap dan Howell,1980),tetapi cukup mengandung air untuk keperluan mikroba (Chalal,1985). Fermentasi medium padat juga dikenal dengan istilah fermentasi koji (Knap dan Howell, 1980).

Dibandingkan dengan fermentasi medium cair, fermentasi ini mempunyai beberapa keuntungan, yakni lebih mendekati kondisi lingkungan alami bagi pertumbuhan kapang (Raimbault dan Alazard, 1980). Moreaux (1974) mendapatkan

adanya perbedaan morfologi dan fisiologi yang nyata antara kapang yang ditumbuhkan pada medium padat dibanding dengan medium cair.

Prescot dan Dunn (1982) menambahkan beberapa keuntungan lain dari penggunaan medium padat, antara lain (1) hasil enzim per unit volume dari inkubator lebih tinggi, (2) tenaga yang dibutuhkan lebih sedikit, (3) kebutuhan pengawasan/kontrol minimum, (4) dari ekstraksi diperoleh larutan enzim berkonsentrasi tinggi, (5) peralatannya lebih sederhana, dan (6) "scale-up" nya lebih mudah.

## 2. Substrat fermentasi

Jenis dan mutu bahan dasar atau substrat merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan suatu proses fermentasi (Fardiaz, 1988). Pada fermentasi medium padat, bahan-bahan seperti dedak padi, dedak gandum, ampas tapioka, ampas tahu dan sebagainya, dapat digunakan sebagai substrat meskipun kadang-kadang masih diperlukan komponen lain seperti nitrogen dan unsur-unsur mineral (Prescot dan Dunn, 1982).

Dedak padi sebagai hasil samping dalam pengolahan beras giling terbukti dapat digunakan sebagai substrat dalam fermentasi medium padat (Hartanto, 1987). Dalam setiap penggilingan dan penyosohan beras akan dihasilkan dedak kira-kira sebanyak 10 % dari total bahan, di samping beras pecah 17 %, sekam 20 %, tepung 3%, dan beras

gilingnya sendiri sebanyak 50 persen. Persentase ini sangat bervariasi tergantung pada varietas dan umur padi, derajat giling serta cara penyosohnya (Grist, 1972).

Sebagai substrat fermentasi, komposisi kimia dedak sangat besar peranannya terhadap mutu dan jumlah enzim yang dihasilkan. Luh (1980) mengatakan bahwa selain lemak, protein dan pati, dedak juga mengandung selulosa, hemiselulosa, lignin, vitamin, dan mineral. Dedak merupakan sumber vitamin B dan E tetapi hanya sedikit mengandung vitamin A, C, dan D (Houston, 1972). Dedak juga mengandung berbagai mineral seperti kalsium, fosfor, kalium, magnesium, silikon, besi, natrium dan sebagainya. Houston dan Kohler (1970) memperlihatkan komposisi kimia dedak seperti pada Tabel 3.

Tabel 3. Komposisi kimia dedak padi

K o m p o n e n	K a d a r
A i r (persen)	9,70
Protein (persen)	13,30
Lemak (persen)	15,80
A b u (persen)	10,40
Karbohidrat : Total (persen)	50,80
Serat (persen)	11,80
Vitamin (mg/100 g) :	
Thiamin	2,26
Riboflavin	0,25
Niacin	29,80
Piridoxin	2,50
Mineral (mg/100 g) :	
Kalsium	76,00
Fosfat	1386,00
B e s i	19,40
Kalium	1495,00

Bagi Indonesia penggunaan dedak sebagai substrat fermentasi dinilai lebih menguntungkan dibandingkan penggunaan pati maupun tepung sereal. Hal ini mengingat bahwa pati maupun tepung sereal merupakan bahan pangan yang dapat langsung dikonsumsi oleh manusia, sedangkan dedak merupakan salah satu limbah dalam pengolahan beras. Penggunaan dedak dalam hal ini akan meningkatkan daya guna dedak. Produksi dedak pada tahun 1988 saja diperkirakan mencapai 1.683.168 ton dedak kasar dan sebanyak 1.132.860 ton dedak halus (Abbas et al., 1985).

### 3. Inokulum dan nutrisi

Selain jenis dan mutu substrat, Fardiaz (1988) menyebutkan tiga faktor lain yang mempengaruhi keberhasilan proses fermentasi. Ketiga faktor tersebut adalah (1) proses persiapan atau perlakuan bahan sebelum fermentasi, (2) mutu starter atau kultur yang digunakan dalam proses fermentasi, dan (3) kondisi lingkungan tempat berlangsungnya fermentasi seperti suhu, kelembaban, keadaan sanitasi dan sebagainya.

Cocker dan Greenshields (1975) menyatakan bahwa inokulum yang berupa spora biasanya merupakan starter yang terbaik untuk memulai fermentasi. Namun lebih jauh diakui bahwa dalam pengembangannya pada proses-proses industri, penggunaan spora agak sulit dilakukan. Mereka menyarankan

agar dalam skala besar digunakan inokulum berupa miselium. Hartanto (1987) menggunakan larutan spora 4 persen untuk menginokulasi substrat dalam percobaannya.

Dalam pertumbuhannya, mikroorganisme membutuhkan unsur-unsur utama seperti karbon, nitrogen, fosfor, sulfur, serta unsur mikro lain yang merupakan logam ber-valensi dua seperti  $Fe^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Zn^{++}$  dan  $Mn^{++}$  serta  $Mg^{++}$  (Frazier dan Westhoff, 1983). Meskipun dedak atau substrat telah memberikan sebagian kebutuhan tersebut, kondisi pertumbuhan belum seluruhnya terpenuhi dan komposisi medium harus dibuat optimum.

Peranan komposisi medium yang optimum ini tampak nyata pada pengamatan pengaruh perbedaan substrat. Upton dan Fogarty (1977) menunjukkan adanya aktifitas enzim yang berbeda jika suatu jenis kapang ditanam pada substrat yang berbeda meskipun dengan komposisi nutrien yang sama. Hasil percobaan ini dapat dilihat pada Tabel 4. Untuk menumbuhkan *A. oryzae*, Crueger et al. (1986) menggunakan substrat pati 8 % dengan larutan mineral yang terdiri atas 1,2%  $NaNO_3$ ; 0,1%  $K_2HPO_4$ ; 0,1%  $MgSO_4$ ; 0,05%  $KCl$ ; 0,003%  $FeSO_4$ ; 0,08%  $Mg(NO_3)_2$ ; 0,05%  $Mg(H_2PO_4)_2$ ; dan 2,0% ekstrak malt. Hartanto (1987) juga menumbuhkan *A. oryzae* tetapi substrat yang digunakan adalah dedak padi dan larutan mineralnya terdiri atas 4,7%  $NaH_2PO_4$ ; 0,1%  $CaCl_2$ ; 0,02%  $KCl$ , serta 0,02%  $MgCl_2$ .

Tabel 4. Pengaruh sumber karbon pada produksi amilase dan protease dari *Trichoderma viride*

Sumber karbon	Amilase (unit/ml)	Protease (unit/ml)
Pati jagung	235	351
Maltosa	179	175
Glukosa	52	243
Sukrosa	17	350
Laktosa	3	175
Kontrol	0	324

#### 4. Ekstraksi enzim

Istilah ekstraksi enzim lebih banyak berkaitan dengan metode pemecahan mikroorganisme dan mengambil cairan enzim kasarnya. Hal ini berbeda dengan istilah isolasi dan purifikasi yang lebih banyak berhubungan dengan teknik yang terlibat untuk mendapatkan enzim yang lebih murni dan spesifik (Melling dan Phillips, 1975).

Ekstraksi enzim dapat dilakukan dengan berbagai cara, namun tak seluruhnya sesuai untuk suatu maksud tertentu, terutama berkaitan dengan tingkat skala ekstraksi. Suatu teknik yang tepat untuk skala laboratorium, belum tentu sesuai untuk skala industri. Beberapa teknik ekstraksi ini dikelompokkan berdasarkan metodenya, yakni ekstraksi dengan cara kimia dan ekstraksi secara fisik.

Ekstraksi secara kimia meliputi penggunaan alkali, lisozim dan EDTA, deterjen, kejutan dingin (cold shock), dan kejutan osmotik (osmotic shock). Sedang teknik ekstraksi secara fisik adalah sonikasi, pembekuan dan penirisan, gesekan padat (solid shear), penggilingan dan agitasi dengan abrasi, dan gesekan cair (liquid shear) (Melling dan Phillips, 1975).

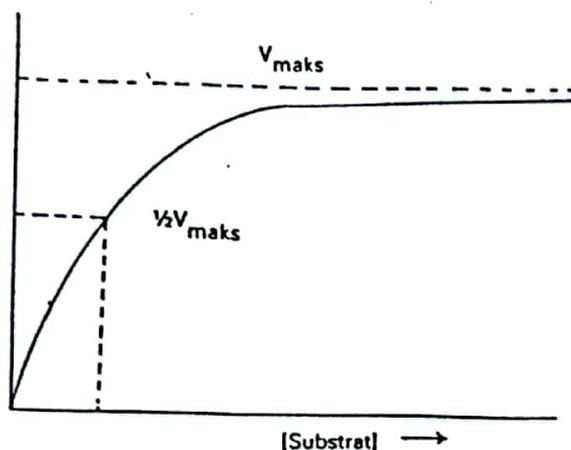
Hartanto (1987) menambahkan Tween 80 yang bersifat sebagai deterjen non-ionik ke dalam air untuk mengekstraksi enzim dari *A.niger* dan *A.oryzae*. Penggunaan Tween 80 ini ternyata cukup berhasil. Sementara itu, Udiyono (1988) menggunakan aquades sebanyak 5 bagian untuk 1 bagian masa terfermentasi dan menambahkan larutan  $\text{CaCl}_2$  20% sebanyak 1 ml per 40 ml ekstrak yang diperoleh.

## C. KINETIKA DAN POLA PROTEIN ENZIM

### 1. Kinetika enzim

Suatu reaksi enzimatik seperti proses hidrolisis, penguraian atau reaksi katalisis lain biasanya berlangsung dengan kecepatan tertentu. Kecepatan reaksi ini dipengaruhi oleh beberapa parameter, salah satu diantaranya adalah konsentrasi substrat. Bila parameter lain seperti konsentrasi enzim dan sebagainya dijaga konstan

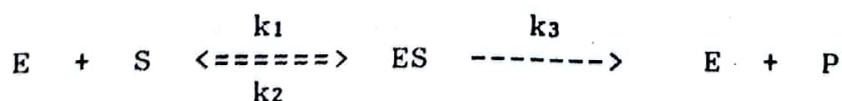
dan konsentrasi awal substrat dibuat bervariasi, maka perbedaan kecepatan dari setiap konsentrasi substrat dapat dilihat seperti pada Gambar 2.



Gambar 2. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi yang dikatalisa enzim (Whitaker, 1982).

Dari Gambar 2 tampak bahwa pada konsentrasi enzim tetap (tertentu), kecepatan reaksi hampir sebanding dengan konsentrasi substrat. Sedang pada konsentrasi substrat yang semakin tinggi, kecepatan reaksi ( $V$ ) akan semakin mendatar dan mencapai kecepatan maksimum yang konstan ( $V_{maks}$ ).

Leonor Michaelis dan Maud Menten (dalam Lehninger, 1982) mengajukan suatu model untuk menerangkan fenomena di atas. Dijelaskan bahwa dalam suatu reaksi enzim selalu terbentuk senyawa peralihan ES. Model tersebut adalah :



Pembentukan senyawa kompleks ES dari E dan S berlangsung dengan konstanta kecepatan  $k_1$ . Komplek ES kemudian mengalami 2 kemungkinan penguraian, yaitu kembali terurai menjadi E dan S dengan konstanta kecepatan  $k_2$ , atau melanjutkan reaksi dengan menghasilkan produk (P) dan E dengan konstanta kecepatan  $k_3$ , dengan asumsi tidak ada P yang dapat diubah lagi menjadi S (Winarno, 1983).

Selanjutnya dengan penjabaran derivatif dapat diterangkan bahwa kecepatan reaksi (V) dipengaruhi oleh nilai  $V_{maks}$ ,  $K_m$  (Konstanta Michaelis-Menten), dan konsentrasi substrat.

$$V = \frac{V_{maks} [S]}{K_m + [S]}$$

Sedang nilai  $K_m$  ternyata sama dengan besar konsentrasi substrat.

Untuk menentukan nilai  $V_{maks}$  dan  $K_m$ , Lineweaver dan Burk mengadakan penyederhanaan terhadap rumus Michaelis. Nilai  $V_{maks}$  dan  $K_m$  dapat ditentukan dengan mengadakan percobaan penentuan kecepatan reaksi V pada berbagai konsentrasi substrat yang berbeda. Winarno (1983) menguraikan kembali penurunan rumus penetapan nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  itu sebagai berikut.

Dari rumus  $V = V_{maks} \frac{[S]}{[S] + K_m}$

bila diambil kebalikannya, maka rumus tersebut menjadi

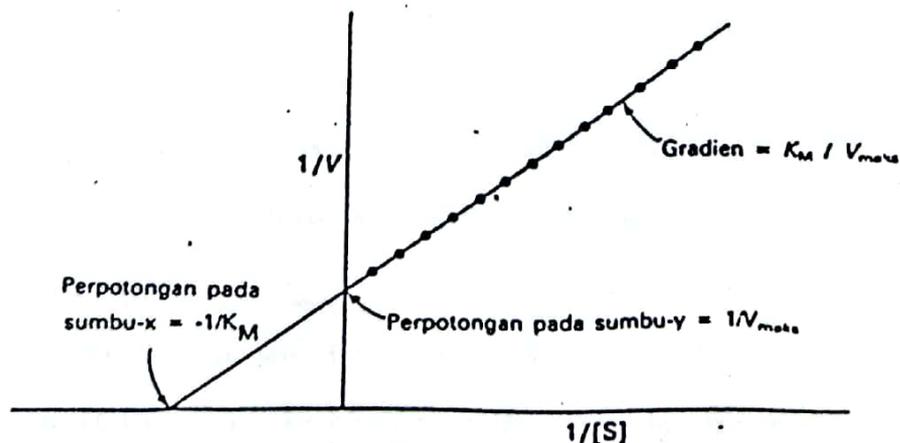
$$\frac{1}{V} = \frac{[S] + K_m}{V_{maks} [S]} = \frac{[S]}{V_{maks} [S]} + \frac{K_m}{V_{maks} [S]}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{maks}} + \frac{K_m}{V_{maks}} \frac{1}{[S]}$$

bila  $\frac{1}{V} = Y$  dan  $\frac{1}{[S]} = X$ ,

maka rumus di atas dapat ditulis sebagai  $Y = a + bX$ , untuk  $a = \frac{1}{V_{maks}}$  dan  $b = \frac{K_m}{V_{maks}}$

Sehingga bila diplotkan  $1/V$  sebagai ordinat dan  $1/[S]$  sebagai absis akan diperoleh suatu garis lurus yang memotong ordinat pada  $1/V_{maks}$  dan memotong absis pada  $a=1/K_m$  dengan "slope" =  $K_m/V_{maks}$  (Gambar 3). Dengan demikian nilai  $V_{maks}$  akan dapat langsung diperoleh dan nilai  $K_m$  dapat ditentukan.



Gambar 3. Kurva Lineweaver-Burk untuk menentukan  $V_{maks}$  dan  $K_m$

Nilai  $K_m$  enzim ternyata sangat beragam, tetapi pada umumnya berkisar dari  $10^{-1}$  sampai  $10^{-6}M$ . Harga  $K_m$  dipengaruhi oleh jenis substrat dan juga keadaan lingkungan seperti suhu dan kekuatan ion (Winarno, 1983).

## 2. Identifikasi pola protein enzim kasar

Enzim kasar hasil ekstraksi umumnya merupakan campuran dari berbagai jenis enzim dan protein. Oleh sebab itu untuk melakukan pemurnian enzim perlu dilakukan identifikasi enzim yang dimaksud dalam enzim kasar. Terdapat beberapa teknik identifikasi, salah satu di antaranya adalah teknik elektroforesis.

Elektroforesis merupakan salah satu teknik yang sangat tajam dan bermanfaat untuk mempelajari protein. Teknik ini dapat menganalisa bahan dalam jumlah yang kecil dengan kepekaan yang tinggi. Biasanya hanya perlu beberapa jam untuk memisahkan berbagai sampel dalam waktu yang bersamaan. Teknik ini dapat menyamai berbagai pemisahan dengan khromatografi.

Pemisahan dengan elektroforesis dapat dikembangkan atas dasar prinsip bahwa setiap ion atau gugus yang bermuatan akan bergerak sesuai dengan muatannya bila kepadanya diberikan medan listrik. Oleh karena protein mempunyai muatan yang berbeda pada setiap pH selain pada titik isoelektriknya, maka protein juga akan bermigrasi dengan kecepatan yang dipengaruhi oleh densitas muatannya

(= nisbah muatan terhadap ukuran protein yang bersangkutan). Semakin tinggi densitas muatannya, akan semakin cepat molekul bermigrasi. Dengan demikian pemberian medan listrik terhadap campuran protein dalam suatu larutan menimbulkan migrasi protein dengan kecepatan yang berbeda-beda terhadap salah satu elektrodanya (Hames, 1985).

Proses elektroforesis yang banyak dikenal selama ini sering pula disebut sebagai Zone Electroforesis, disebabkan oleh terbentuknya zone-zone yang tipis atau pita (band) di akhir proses pemisahan. Berdasarkan medium yang digunakan (supporting medium) dikenal berbagai jenis elektroforesis seperti elektroforesis gel pati, elektroforesis gel poliakrilamid (PAGE) dan sebagainya. Penggunaan medium pendukung ini dimaksudkan untuk mengurangi dua kelemahan yang ada pada teknik Zone elektroforesis yang tidak menggunakan medium pendukung, yaitu terjadinya efek panas selama elektroforesis yang dapat mengganggu cairan dalam kolom dan merusakkan zone protein, serta adanya efek difusi yang dapat memperluas zone protein. Keuntungan lain penggunaan medium pendukung adalah adanya kemungkinan peneliti melakukan fiksasi protein dalam medium tersebut, sehingga tingkat ketajaman pita dapat dipertahankan (Hames, 1985).

Penggunaan elektroforesis untuk studi protein ini telah banyak dilakukan, misalnya pada beras (Damardjati, 1983), penentuan berat molekul protein dengan SDS-PAGE (Shadi dan Djurtoft, 1979), dan juga untuk penandaan genetik padi (Gupta dan Malik, 1978; du Cros et al., 1979).

#### D. MORFOLOGI DAN KOMPOSISI KIMIA BERAS

##### 1. Morfologi

Gabah terdiri dari bagian butir beras dan kulit gabah. Kulit gabah (sekam) yang tersusun atas lapisan lemma dan palea, mempunyai berat sekitar 18 sampai 28 persen dari berat gabah. Sekam juga mengandung serat kasar sebanyak 35-45 persen. Juliano (1972b) mendapatkan bahwa dalam abu sekam terdapat 93-95 persen silika oksida.

Lapisan lemma terletak pada bagian luar gabah, sedang palea berada di bagian dalam. Lemma dan palea tersusun atas empat lapisan struktural, yaitu (1) epidermis luar, yang banyak mengandung silika; (2) sklerenkim atau hipoderma, banyak mengandung lignin; (3) sel parenkim bunga karang; dan (4) epidermis dalam (Juliano dan Bechtel, 1985).

Di antara sekam dan butir beras terdapat tiga lapisan, yakni perikarp, tegmen dan nuselus. Perikarp mempunyai ketebalan 10 mikrometer, tegmen 0,5 mikrometer dan nuselus 2,5 mikrometer (Juliano dan Bechtel, 1985).

Bagian utama butir beras adalah endosperm (89-94 persen), sisanya adalah perikarp 1-2 persen, aleuron dan testa 4-6 persen serta lembaga 2-3 persen (Juliano, 1972b). Bagian endosperm ini tersusun atas sel parenkim yang berdinding tebal, berbentuk lonjong, berisi padat dengan granula pati dan sebagian kecil butiran protein (protein bodies).

Lapisan aleuron merupakan lapisan terluar dari endosperm. Aleuron terdiri dari satu sampai tujuh sel tebal, dan bagian belakangnya lebih tebal dibandingkan bagian samping maupun depannya. Lapisan ini mengelilingi seluruh butir beras dan lembaga, tetapi bagian yang menyelimuti lembaga mempunyai substansi yang agak berbeda dibandingkan bagian yang lain (Juliano dan Bechtel, 1985).

## 2. Komposisi kimia beras

Bagian utama penyusun butir beras adalah pati, suatu polimer glukosa dengan ikatan glukosida dan berbentuk granula polihedral dengan ukuran 3-9 mikrometer (Juliano, 1972b). Ada dua jenis polimer glukosa membentuk pati, yakni amilosa dan amilopektin. Amilosa merupakan polimer

berantai lurus dengan ikatan 1,4- $\alpha$ -glukosida, sedangkan amilopektin adalah polimer dengan rantai bercabang dan mempunyai ikatan baik 1,4- $\alpha$  maupun 1,6- $\alpha$ -glukosida. Meskipun proporsi amilopektin lebih besar daripada amilosa, namun dalam pengujian mutu beras lebih sering digunakan kadar amilosa sebagai standar.

Berdasarkan kadar amilosanya, beras dapat dikelompokkan sebagai beras "waxy" (1-2 persen amilosa) atau "non-waxy" (lebih dari 2 persen amilosa) (Juliano, 1979). Selanjutnya beras "non-waxy" dapat dibedakan lagi atas (1) beras beramilosa sangat rendah/ketan (2-9 persen), beras beramilosa rendah (9-20 persen), beras beramilosa sedang (20-25 persen), dan beras beramilosa tinggi (25-33 persen) (Damardjati dan Harahap, 1983).

Granula pati yang terdapat dalam endosperm beras bersifat tidak larut dalam air tetapi akan berdispersi. Adanya perlakuan pemanasan akan menyebabkan pati ber-gelatinasi. Suhu pada saat granula pati mulai mengembang di dalam air panas disebut suhu gelatinisasi. Umumnya suhu gelatinisasi pati beras beragam antara 55 sampai 79°C. Berdasarkan sifat fisik ini, beras dapat dibedakan atas bersuhu gelatinasi rendah (kurang dari 70°C), sedang (70-74°C), dan tinggi (lebih dari 74°C) (Juliano, 1972a).

Protein merupakan komponen kedua terbesar setelah pati dalam beras. Kandungannya dalam beras giling dapat bervariasi dari 5 sampai 14 persen (pada kadar air 14%)

tergantung pada varietas dan kondisi lingkungan. Pada varietas yang sama, perbedaan kondisi lingkungan dapat menimbulkan keragaman kadar protein sampai 6 persen (Juliano, 1972b).

Beras pecah kulit mengandung lemak lebih banyak daripada beras giling. Dari lemak yang ada tersebut, 80 persen terdapat pada bagian dedak dan bekatul, sedangkan pada beras giling sebagian besar lemak bersama-sama protein dan pati membentuk butiran protein (Juliano, 1972b). Kandungan asam-asam lemak utama yang menyusun lemak dalam beras pecah kulit adalah asam linoleat (25,1-35,3%), asam oleat (36,0-44,1%) dan asam palmitat (18,4-25,8%) (Juliano, 1972c).

Selain mengandung lemak, beras juga mengandung vitamin dan mineral seperti vitamin B1, B2, dan niasin serta kalsium, fosfor, dan besi. Beras mengandung vitamin A, C, dan D dalam jumlah yang sangat sedikit atau bahkan tidak ada sama sekali (Juliano, 1985).

#### **E. TEPUNG BERAS KAYA PROTEIN (BKP)**

Istilah tepung beras kaya protein atau tepung BKP mulai dipakai oleh para peneliti di Balai Penelitian Tanaman Pangan Sukamandi sejak tahun 1986. Penggunaan istilah ini bertujuan untuk membedakannya dengan tepung beras berprotein tinggi yang dihasilkan dengan cara

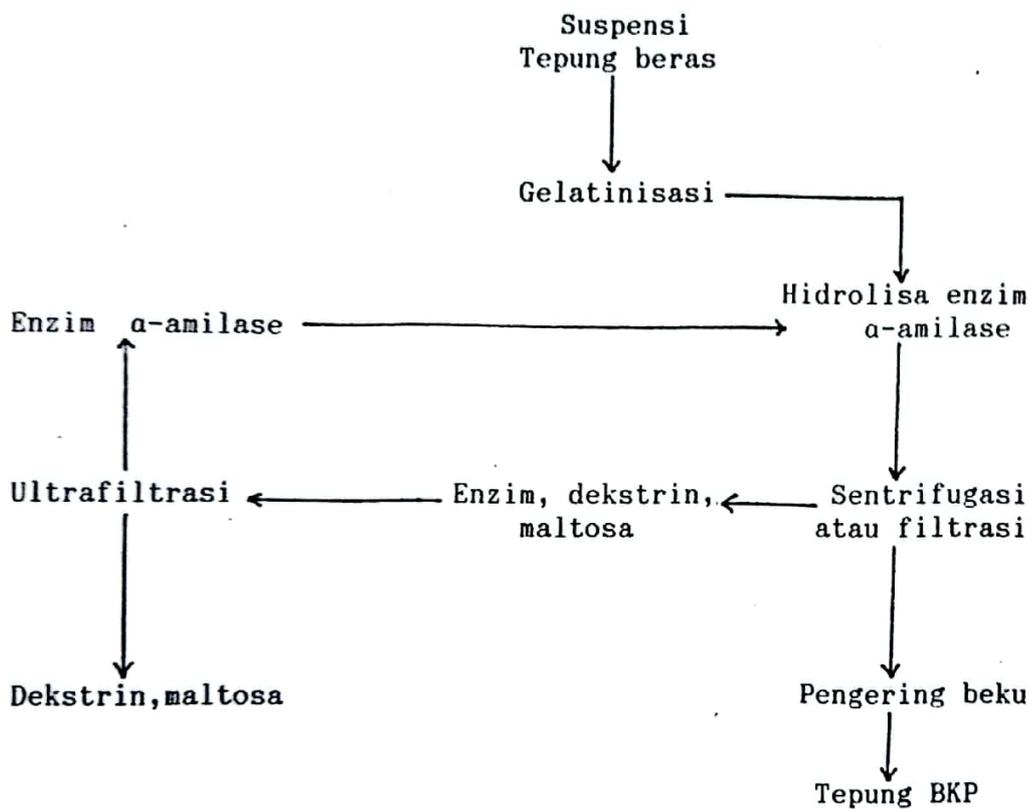
penyosohan abrasi terhadap butir beras. Hansen et al. (1981) mula-mula menggunakan istilah "high-protein rice flour", tetapi kemudian untuk menghindari kerancuan istilah, Hansen (1985) menyebut produk tepung beras ini sebagai "chemically produced high-protein (CHP) rice flour".

#### 1. Pembuatan tepung BKP

Teknologi pembuatan tepung BKP pada awalnya dikembangkan oleh Hansen et al. (1981). Prinsip dari teknologi ini adalah pemanfaatan enzim perombak pati yang diaplikasikan pada tepung beras yang telah tergelatinasi, sehingga kadar pati akan menurun dan proporsi protein dalam tepung menjadi meningkat. Secara skematis cara pembuatan tepung BKP tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.

Berdasarkan urutan kerja seperti terlihat pada Gambar 4, Muchtadi (1986) berpendapat bahwa penggunaan alat ultrafiltrasi dan alat pengering beku merupakan kendala-kendala yang dapat menghambat pengembangan teknologi tepung BKP di Indonesia. Untuk menanggulangi hambatan tersebut lebih jauh disarankan agar proses ultrafiltrasi tidak dilakukan dengan resiko terjadi kehilangan sejumlah enzim, dan alat pengering beku diganti dengan alat pengering yang lain seperti drum dryer dan sebagainya (Muchtadi, 1986).

Untuk membuat tepung BKP ini, Purwani (1987) menggunakan enzim AMG dari *Rhizopus sp* (Sigma Chem. Co., USA) dan alat pengering vakum. Sedangkan Hartanto (1987) menggunakan enzim kasar kering yang dibuatnya sendiri dan oven vakum sebagai alat pengering.



Gambar 4. Skema pembuatan tepung BKP (Hansen et al, 1981)

## 2. Sifat fisik dan kimia tepung BKP

Berbagai penelitian tentang pembuatan tepung BKP ini melaporkan bahwa dengan teknologi ini dapat diperoleh tepung beras dengan kadar protein yang jauh lebih tinggi dibandingkan kadar tepung beras biasa. Hansen dan kawan-kawan (1981) mendapatkan tepung beras dengan kadar protein sebesar 25 persen, sedangkan Purwani (1987) dan Hartanto (1987) berturut-turut mendapatkan kisaran kadar protein 25-35 persen dan 14-32 persen. Perbandingan komposisi kimia tepung beras biasa dengan tepung BKP dapat dilihat pada Tabel 5.

Jika dibandingkan dengan tepung susu sapi penuh (dry whole milk), tepung BKP ternyata memiliki beberapa kelebihan. Selain warnanya yang putih-krem menyerupai warna susu bubuk, tepung BKP juga mengandung protein dengan kadar yang sebanding. Perbedaannya terletak pada kadar lemak, serat dan kadar abu tepung BKP yang lebih rendah (Hansen et al., 1981). Penggunaan alat pengering yang berbeda ternyata menghasilkan warna tepung yang berlainan. Pengeringan dengan oven vakum ternyata menghasilkan tepung yang berwarna lebih suram.

Percobaan secara biologis pada tikus menunjukkan bahwa pertumbuhan tikus yang mengkonsumsi tepung BKP dengan protein sebesar 20 persen ternyata sebanding dengan

pertumbuhan tikus dengan ransum kasein (protein susu sapi) pada kadar protein yang sama (Hansen dan You, 1982).

Tabel 5. Perbandingan komposisi kimia tepung BKP dengan tepung beras biasa

Komponen		Tepung BKP	Tepung beras biasa
A i r	(%)	8,73	11,83
Protein	(%)	20,15	7,98
L e m a k	(%)	0,21	0,61
S e r a t	(%)	1,33	0,63
A b u	(%)	0,82	0,62
Karbohidrat	*(%)	70,09	78,97

Sumber : Susetyono (1989)

\* dengan pengurangan

### III. BAHAN DAN METODE

#### A. BAHAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi biakan murni kapang *Aspergillus niger* L51/NRRL A-11,264 dan *A. awamori* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Pangan, Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi-Fateta, Institut Pertanian Bogor. Dedak padi diperoleh dari Laboratorium Teknologi Balai Penelitian Tanaman Pangan Sukamandi, sedangkan tepung beras varietas IR 42 dan IR 64 diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Pangan Sukamandi. Selain itu juga digunakan berbagai bahan kimia yang disebut lebih terperinci pada prosedur pengamatan.

#### B. METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan rangkaian dari tiga percobaan. Masing-masing percobaan tersebut dapat dijelaskan sebagai berikut :

##### **Percobaan I. Produksi ekstrak amilase dan penentuan kombinasi perlakuan yang terbaik**

Percobaan pertama ini bertujuan mempelajari pengaruh perbedaan nutrien dan cara ekstraksi terhadap aktivitas amilase yang dihasilkan dari kedua kapang di atas. Kom-

posisi larutan nutrisi yang hendak diperbandingkan adalah komposisi I dan komposisi II, sedangkan cara ekstraksi yang diterapkan adalah penggunaan Tween 80 dilengkapi dengan penggunaan ultrafiltrasi (cara 1) dan ekstraksi dengan penambahan larutan  $\text{CaCl}_2$  (cara 2).

Substrat yang digunakan adalah dedak, dan waktu inkubasi yang diterapkan adalah selama 3 hari (Hartanto, 1987; Crueger et al., 1986). Adapun larutan nutrisi I dan II yang ditambahkan terdiri atas berbagai mineral seperti pada Tabel 6 berikut ini.

Tabel 6. Komposisi larutan nutrisi I dan II

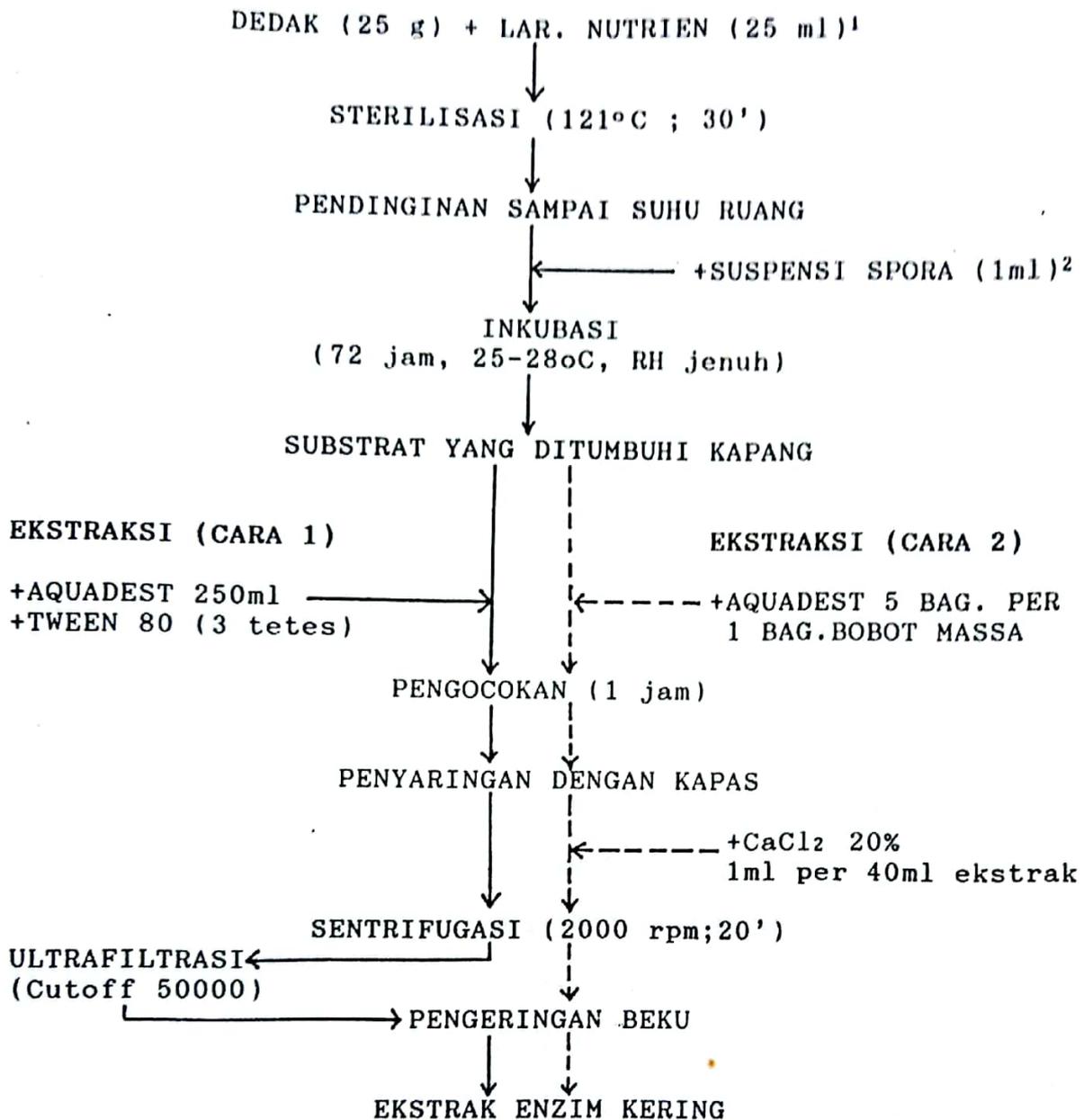
Larutan nutrisi I:

4.7 %  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ;  
 0.1 %  $\text{CaCl}_2$  ;  
 0.02%  $\text{KCl}$  ;  
 0.02%  $\text{MgCl}_2$

Larutan nutrisi II:

1.2%  $\text{NaNO}_3$  ; 0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ;  
 0.1%  $\text{MgSO}_4$  ; 0.05%  $\text{KCl}$  ;  
 0.003%  $\text{FeSO}_4$  ;  
 0.08%  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  ;  
 0.05%  $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$

Percobaan ini dilakukan dengan rancangan acak lengkap faktorial dengan 2 kali ulangan. Pengamatan dilakukan terhadap aktivitas  $\alpha$ -amilase, glukoamilase, protease dan kadar protein terlarut dari setiap ekstrak enzim yang dihasilkan. Secara keseluruhan urutan cara produksi ekstrak amilase dapat dilihat pada Gambar 5.



**Keterangan :**

1. Larutan nutrisi yang digunakan adalah larutan I atau II seperti pada Tabel 6.
2. Spora dipanen dari kultur dalam agar miring yang telah berumur 4 hari dengan menggunakan 10 ml NaCl 0.85%.

Gambar 5. Skema produksi ekstrak amilase

## Percobaan II. Kondisi aktivitas, kinetika dan pola protein ekstrak amilase

Dari sebanyak delapan ekstrak amilase yang diperoleh dari berbagai kombinasi perlakuan dalam percobaan I, dipilih dua ekstrak amilase yang memiliki aktivitas spesifik tertinggi. Kedua ekstrak terpilih ini kemudian diamati sifat aktivitas  $\alpha$ -amilase maupun aktivitas AMG-nya pada berbagai pH dan suhu. Untuk penentuan pH optimum aktivitas  $\alpha$ -amilase, pengamatan aktivitasnya dilakukan pada pH 4,4; 4,8; 5,2; 5,6 dan 6,0. Setelah diperoleh pH optimum, maka pengamatan suhu optimum dilakukan pada kondisi pH optimum tersebut, yakni pada suhu 20, 30, 40, 50, 60 dan 70°C. Penetapan pH optimum aktivitas AMG dilakukan pada kisaran 4,0; 4,5; 5,0 dan 5,5, sedangkan pengamatan suhu optimum dilakukan pada kisaran suhu 40, 50, 60 dan 70°C.

Selanjutnya ditentukan kecepatan hidrolisis kedua ekstrak amilase pada berbagai konsentrasi substrat. Dengan menentukan hubungan antara aktivitas  $\alpha$ -amilase maupun aktivitas AMG dengan konsentrasi substrat, maka akan diperoleh suatu bentuk kurva yang lazim disebut kurva Lineweaver-Burk. Dari kurva ini dan dengan perhitungan sederhana akan dapat diperoleh nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  dari kedua ekstrak amilase (lihat perhitungan di Bab II sub-bab C nomer 1).

Kemudian terhadap kedua ekstrak amilase juga dilakukan identifikasi pola protein. Tujuan dari identifikasi ini adalah untuk melihat kemungkinan adanya berbagai jenis protein dalam setiap ekstrak amilase dan menentukan berat molekul masing-masing protein. Selain kedua ekstrak terpilih, identifikasi pola protein ini juga dilakukan terhadap enzim  $\alpha$ -amilase dan AMG murni (Sigma Chem. Co., USA). Identifikasi pola protein ekstrak enzim ini dilakukan dengan metode elektroforesis Laemmli yang dimodifikasi. Teknik penyiapan sampel maupun cara pelaksanaan elektroforesis selengkapnya disajikan dalam subbab prosedur pengamatan.

### Percobaan III. Pembuatan tepung BKP dan evaluasi sifat fisik, kimia serta sifat fungsionalnya

Selama ini kadar protein tepung BKP hanya dapat diketahui pada akhir proses pembuatannya, karena pengukurannya dilakukan setelah diperoleh tepung BKP tersebut. Hal ini tentu tak dapat dilakukan pada proses pengolahan skala yang lebih besar. Namun mengukur kadar protein dengan metode Kjeldahl di tengah proses pembuatan yang berlangsung juga memerlukan cukup banyak waktu. Pada percobaan III ini dilakukan pendekatan pemecahan

masalah dengan mencari hubungan antara kadar protein dengan kadar glukosa sebagai hasil samping pembuatan tepung BKP dan dengan waktu hidrolisanya.

Pada percobaan ini ekstrak amilase yang digunakan adalah ekstrak amilase dalam keadaan larutan yang belum dikering-bekukan. Sedang tepung beras yang digunakan adalah dari varietas IR42 dan IR64. Pengukuran kadar protein dan kadar glukosa dilakukan pada waktu hidrolisa yang berbeda-beda, yakni 15, 30, 45 dan 60 menit. Dengan demikian akan terdapat 4 jenis hubungan dari penerapan dua ekstrak amilase pada dua varietas beras.

Setelah diperoleh hubungan yang terbaik ( $r^2$  terbesar), maka akan dibuat tepung BKP dari kombinasi ini dengan skala yang lebih besar. Tepung BKP yang dihasilkan selanjutnya diamati sifat fisik, komposisi kimia dan sifat fungsionalnya, serta dibandingkan dengan satu macam tepung komersial (Promina) dan tepung bahan dasarnya sendiri. Sifat fisik yang diamati adalah rendemen hasil, rendemen protein, tingkat warna putih dan densitas kamba. Sifat kimia meliputi kadar air, kadar protein, kadar lemak, kadar abu dan kadar karbohidrat. Sedang sifat fungsional yang diamati mencakup sifat penyerapan air, penyerapan minyak, pembentukan gel dan daya buih. Selain itu juga hendak dicari perbandingan optimum antara tepung

BKP dengan air panas agar diperoleh viskositas yang sama dengan viskositas tepung komersial pada perbandingan yang disarankan dalam labelnya.

### C. PROSEDUR PENGAMATAN

#### 1. Produksi ekstrak enzim

Substrat dedak dicampur dengan larutan nutrien (I atau II), yang berfungsi sebagai nutrien dan mineral tambahan, dengan perbandingan 1 : 1 (25 g : 25 ml). Kemudian campuran ini disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit.

Spora biakan murni dari kapang pada umur optimum diencerkan dengan 10 ml larutan pengencer (NaCl 0,85 persen). Kemudian larutan spora sebanyak 1 ml diinokulasikan ke dalam substrat yang steril dan telah dingin (suhu ruang). Setelah diinokulasi, selanjutnya dilakukan inkubasi dalam inkubator bersuhu 25-28°C dengan kelembaban jenuh.

Ekstraksi enzim dilakukan setelah inkubasi berjalan selama tiga hari. Substrat yang telah ditumbuhi kapang kemudian diekstrak dengan 2 cara yang berbeda. Setelah ditambah larutan pengestrak, campuran ini selanjutnya diaduk dan dikocok dengan alat pengocok (Gerhardt Schut-telmaschine RO 20) selama satu jam, dan disaring dengan kapas. Cairan yang lolos penyaring kemudian di-

sentrifugasi (Sorval RC-3B, Du Pont, USA) dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit, sehingga diperoleh ekstrak enzim (filtrat) yang berupa supernatan. Filtrat enzim ini kemudian dikeringkan dengan pengering beku (Freeze Dryer, Labconco) dan diperoleh ekstrak enzim kering. Pada percobaan III perlakuan ultrafiltrasi dan pengeringan tidak dilakukan. Filtrat yang diperoleh langsung diaplikasikan. Skema pembuatan ekstrak amilase dapat dilihat pada Gambar 5.

## 2. Aktivitas alfa-amilase

Aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase diukur dengan menggunakan metode Bernfeld. Satu ml cairan enzim hasil ekstraksi dicampur dengan 1 ml larutan pati 1,0 persen dalam bufer sitrat 0,05 M pada pH 5,7 (atau pH yang dikehendaki) dan diinkubasi pada suhu 20°C (atau suhu yang dikehendaki) selama 3 menit. Selanjutnya ditambahkan 2 ml pereaksi DNS dan ditempatkan dalam air mendidih selama 5 menit. Kemudian larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm dan ditentukan aktivitasnya dengan membandingkan pada kurva standar. Prosedur pembuatan pereaksi yang digunakan dalam analisa ini disajikan pada Lampiran 1.

### 3. Aktivitas amiloglukosidase

Aktivitas enzim amiloglukosidase diukur dengan menggunakan metode Somogyi-Nelson. Sebanyak 0,5 ml larutan pati dalam air 0,5 persen dicampur dengan 0,4 ml larutan bufer asetat 0,1 M pH 4,0, kemudian ditambahkan larutan enzim sebanyak 0,1 ml. Campuran ini selanjutnya diinkubasi pada suhu 40°C selama 30 menit. Pada akhir inkubasi ditambahkan 1,0 ml pereaksi A sehingga diperoleh larutan contoh.

Analisis dilanjutkan dengan penentuan gula pereduksi metode Somogyi-Nelson. Satu ml larutan contoh ditambah dengan 1,0 ml pereaksi D, kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 20 menit. Setelah itu dilakukan pendinginan selama 5 menit dalam air mengalir, dan ditambahkan 1,0 ml pereaksi C. Campuran ini dikocok sampai tidak terbentuk gelembung, didiamkan selama 20 menit, lalu dencerkan menjadi 25 ml. Larutan yang terakhir ini kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 520 nm dan ditentukan aktivitas amiloglukosidase-nya dengan membandingkan pada kurva standar. Prosedur pembuatan pereaksi yang digunakan untuk analisa ini disajikan pada Lampiran 2.

#### 4. Kandungan protein terlarut dalam filtrat enzim

Analisa ini dilakukan mengikuti metode Lowry. Sebanyak 1,0 ml larutan enzim hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditepatkan volumenya hingga 4 ml, kemudian ditambah dengan 5,5 ml pereaksi C dan didiamkan selama 10 menit setelah dikocok terlebih dahulu. Kemudian ke dalam campuran ini ditambahkan pula 0,5 ml pereaksi E dan kembali didiamkan selama 30 menit. Larutan terakhir ini kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 650 nm. Sebagai larutan standar digunakan Bovine Serum Albumin (BSA) pada konsentrasi 50-300 ug/ml, sedangkan blanko dibuat dari aquadest. Prosedur pembuatan pereaksi yang digunakan untuk analisis ini disajikan pada Lampiran 3.

#### 5. Pembuatan tepung beras kaya protein

Tepung beras sebanyak 20 gram disuspensikan ke dalam 400 ml air kemudian digelatinasi pada suhu 95°C selama 4 menit. Suspensi kemudian didinginkan dengan air mengalir hingga suhu suspensi sama dengan suhu kerja optimum amilase. Kondisi ini dipertahankan dengan menggunakan penangas air bergoyang dengan kecepatan 40 skala kecepatan alat (GFL Waterbath) selama 5 menit sebelum dilakukan penambahan ekstrak enzim sebanyak 1,0 ml ekstrak enzim yang telah diukur aktivitasnya dan 2 ml

bufer sitrat dengan pH yang sesuai dengan pH kerja optimum enzim yang bersangkutan. Hidrolisa dilakukan selama waktu hidrolisa optimum.

Suspensi yang telah dihidrolisa kemudian disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 20 menit (Sorval RC5B, rotor SS34 atau GS3). Supernatannya dipisahkan dan endapannya dikeringkan dengan "oven blower" pada suhu 40°C selama 12 jam untuk mendapatkan tepung BKP.

#### 6. Penentuan gula pereduksi (glukosa) metode Somogyi-Nelson

Sebanyak 1 ml contoh ditambah dengan 1 ml pereaksi D, kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 20 menit. Selanjutnya didinginkan dengan air mengalir selama 5 menit. Ke dalam campuran kemudian ditambah 1 ml pereaksi C dan dikocok sampai tidak terdapat gelembung. Campuran didiamkan lagi selama 20 menit sebelum dencerkan menjadi 25 ml untuk seterusnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 520 nm.

Sebagai larutan standar digunakan larutan glukosa pada konsentrasi 75-180 ug/ml, sedangkan blanko dibuat dari aquadest. Prosedur pembuatan pereaksi untuk analisa ini disajikan pada Lampiran 2.

### 7. Rendemen tepung BKP dan rendemen protein

Rendemen tepung BKP yang dihasilkan, dinyatakan dalam persen berat kering dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen tepung (\%)} = \frac{c (1 - d)}{a (1 - b)} \times 100$$

Keterangan :

- a = berat bahan baku (g)
- b = kadar air bahan baku (%)
- c = berat tepung BKP (g)
- d = kadar air tepung BKP (%)

Rendemen protein tepung BKP dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen protein (\%)} = \frac{a \times b}{c \times d} \times 100$$

Keterangan :

- a = kadar protein tepung BKP per 100 g
- b = berat tepung BKP yang dihasilkan (g)
- c = kadar protein tepung beras per 100 g
- d = berat tepung beras (g)

### 8. Tingkat keputihan (Whiteness)

Pengukuran tingkat keputihan dilakukan dengan menggunakan alat Kett Whitenessmeter pada filter biru. Standar warna putih yang digunakan adalah lempeng BaSO<sub>4</sub> dengan tingkat keputihan standar mencapai 87 persen. Sampel dicurahkan ke dalam wadah pengukur dan ditutup dengan kaca penutup hingga sampel tampak cukup padat. Bagian luar kaca penutup kemudian dibersihkan dari kotoran dan debu, selanjutnya ditera dengan memasukkan keseluruhan

wadah berisi sampel ke dalam alat pengukur yang telah dikalibrasi. Tingkat keputihan dapat dibaca langsung pada angka digital.

#### 9. Densitas kamba (Bulk density)

Sampel tepung dicurahkan ke dalam alat penakar ukuran 100 ml dari ketinggian 10 cm di atas literan hingga tepung menumpuk berlebihan. Tepung yang lebih tersebut secara perlahan disingkirkan dengan penggaris, sehingga sampel mengisi literan dengan sempurna. Seluruh isi literan ini kemudian ditimbang beratnya.

Densitas kamba = Berat isi takaran x 10 gram/liter

#### 10. Analisis proksimat

Analisis proksimat dilakukan terhadap tepung beras dan tepung BKP. Analisis ini meliputi kadar air, kadar abu (AOAC, 1984), kadar protein (mikro Kjeldahl), kadar lemak (metode Soxhlet), dan kadar karbohidrat (dengan pengurangan).

#### 11. Penetapan viskositas optimum tepung BKP

Tepung komersial "Promina" digunakan sebagai pembandingan, dengan cara dibuat bubur seperti formula yang terdapat dalam labelnya, yaitu 25 gram dalam 100 ml air panas (20%). Kemudian tepung BKP dibuat bubur dengan ber-

bagai perbandingan, yaitu 25, 26 dan 27,5 persen. Sampel ditambah air panas dengan perbandingan tertentu dan diaduk cepat sehingga terbentuk bubur. Kemudian bubur dituangkan ke dalam tabung viskosimeter "Brookfield" sampai pada batas tertentu (kira-kira 12 ml), kemudian dengan segera spindle nomer 28 dimasukkan ke dalam bubur dan pengukuran pun dimulai. Suhu di sekitar tabung dijaga tetap pada 50°C dengan menggunakan sirkulator. Pembacaan dilakukan setelah spindle berputar pada kecepatan 20 rpm selama 5 menit.

$$\text{Viskositas} = \text{Hasil pembacaan} \times 500 \quad (\text{cpoise})$$

Angka 500 adalah faktor pengali untuk kondisi perlakuan di atas.

## 12. Sifat penyerapan air dan minyak (Sathe et al., 1982)

Sampel sebanyak 1 gram dicampur dan dikocok dengan 10 ml air suling atau minyak jagung selama 30 detik dalam pengocok dengan kecepatan tinggi. Kemudian campuran tersebut dibiarkan di atas meja pada suhu kamar selama 30 menit. Selanjutnya campuran di-sentrifus selama 30 menit pada kecepatan 5000 x g (6700 rpm pada sentrifus Sorval RC5B, rotor SS34). Supernatan yang dihasilkan diukur volumenya dengan gelas ukur 10 ml. Dengan asumsi berat

Jenis air dan minyak jagung ("Mazola") masing-masing adalah 1 dan 0,88 g/ml, maka daya serap air dan minyak dari sampel dapat ditentukan sebagai berikut.

$$\text{Daya serap} = \frac{\text{vol. cairan terserap}}{\text{densitas}} \times \text{berat sampel} \times 100 \%$$

### 13. Sifat pembentukan gel (Sathe et al., 1982)

Sampel ditimbang dengan berat tertentu dan ditambahkan sejumlah air suling sehingga terbentuk suspensi dengan berbagai konsentrasi, yakni 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 dan 16 persen (b/v), masing-masing sebanyak 5 ml dalam tabung reaksi. Kemudian suspensi tersebut dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 1 jam dan didinginkan cepat-cepat dengan air kran di akhir pemanasan. Tabung berisi sampel tersebut kemudian didinginkan pada suhu 4°C selama 2 jam. Konsentrasi pembentukan gel paling rendah dapat ditentukan dengan melihat apakah isi tabung tumpah atau tidak bila tabung dibalik.

### 14. Sifat kapasitas buih (Sathe et al., 1982)

Sebanyak 2 gram sampel dikocok dengan 100 ml air suling selama 5 menit dalam Waring Blendor pada skala kecepatan tertinggi. Kemudian suspensi dituang ke dalam gelas ukur 250 ml. Pembacaan volume total dari suspensi

tersebut dilakukan pada setiap waktu yang ditentukan, yaitu 0, 15, 30, 60, 90 dan 120 menit sesudah pengocokan pada suhu kamar. Kapasitas buih dapat dihitung dengan cara menghitung kenaikan volume sebagai berikut.

$$\text{Kapasitas buih (\%)} = \frac{\text{vol. sesudah kocok} - \text{vol. sebelum kocok}}{\text{vol. sebelum kocok}} \times 100\%$$

#### 15. Penentuan berat molekul ekstrak amilase

Berat molekul ekstrak amilase ditentukan dengan menggunakan elektroforesis metode Laemmli yang dimodifikasi (Damardjati, 1983). Untuk dapat melaksanakan elektroforesis ini terdapat 3 langkah utama yang harus dikerjakan, yaitu preparasi sampel dan pembuatan standar BM, pembuatan gel, serta pengoperasian alat. Secara terinci bahan kimia dan urutan pelaksanaannya disajikan dalam Lampiran 4.

#### IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

##### A. PRODUKSI EKSTRAK AMILASE

###### 1. Faktor-faktor proses produksi

Dari skema produksi ekstrak amilase (Gambar 5), tampak bahwa untuk memproduksi enzim melalui proses fermentasi medium padat terdapat berbagai faktor yang harus diperhatikan. Satiawiharja (1984) menyebutkan bahwa substrat, inokulum, peralatan dan lingkungan merupakan faktor-faktor penting yang sangat menentukan keberhasilan proses fermentasi.

###### S u b s t r a t

Substrat dedak yang digunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu disuplementasi dengan larutan nutrien. Penambahan larutan yang terdiri dari campuran berbagai mineral ini bertujuan untuk memperkaya kadar nutrien substrat dan mendapatkan medium dengan kadar air yang sesuai untuk pertumbuhan kapang. Penambahan larutan nutrien ke dalam dedak dengan perbandingan yang sama (25 ml : 25 g) akan menghasilkan medium dengan kadar air antara 60 - 70 persen. Fennema (1976) menyebutkan bahwa medium dengan kadar air 60 - 70 persen merupakan kondisi kadar air yang tepat untuk pertumbuhan kapang secara umum.

## N u t r i e n

Secara tidak langsung penambahan larutan nutrisi juga akan mempengaruhi tingkat keasaman (pH) substrat. Penambahan larutan nutrisi I akan menghasilkan substrat dengan pH 7,9, sedang larutan II menyebabkan pH dedak menjadi 7,2. Dengan demikian perbedaan komposisi larutan nutrisi I dan II (Tabel 6) akan mempengaruhi lingkungan pertumbuhan kapang, dan kemungkinan menyebabkan terjadinya perbedaan aktivitas ekstrak amilase yang dihasilkan. Udiyono (1988) mendapatkan bahwa pH medium fermentasi yang terbaik adalah 5,5 - 5,7, baik pada dedak beras biasa maupun dedak beras merah. Namun ia tidak menggunakan larutan nutrisi melainkan bufer fosfat.

### Jumlah spora

Banyaknya spora yang diinokulasikan juga dapat mempengaruhi keberhasilan produksi ekstrak amilase. Dalam penelitian ini ke dalam substrat dedak yang telah ditambah larutan nutrisi dan disterilisasi ditanamkan spora sebanyak  $4,4 \times 10^7$  untuk *Aspergillus niger* dan  $5,3 \times 10^7$  untuk *Aspergillus awamori*. Jumlah spora sebanyak ini terdapat dalam 1 ml suspensi spora yang diperoleh dari penambahan 10 ml NaCl 0,85% ke dalam agar miring yang seluruh permukaannya telah ditumbuhi kapang.

Pertumbuhan kapang sampai dapat menutup seluruh permukaan agar miring ini dicapai pada hari ke empat setelah kapang ditanam pada agar miring, baik untuk *A. niger* maupun *A. awamori*. Penggunaan 1 ml suspensi spora didasarkan pada laporan Wardoyo (1985), yang menyebutkan bahwa larutan spora sebaiknya diberikan sebanyak 4 persen dari bobot substrat yang digunakan.

#### Suhu dan waktu inkubasi

Selanjutnya substrat yang sudah diinokulasi dengan kapang diinkubasi pada suhu 28 °C dengan kelembaban jenuh selama 3 hari. Ketentuan ini diperoleh dari berbagai hasil penelitian. Rejeki (1986) menyebutkan bahwa suhu terbaik untuk perlakuan fermentasi seperti ini adalah antara 25 - 28 °C. Sedangkan Udiyono (1988) mendapatkan bahwa inokulasi pada suhu 30 °C merupakan suhu yang paling tepat untuk memperoleh aktivitas enzim optimal. Kemudian waktu inkubasi 3 hari merupakan waktu yang paling tepat dimana enzim dari *A. niger* dan *A. oryzae* mempunyai aktivitas tertinggi (Hartanto, 1987).

#### Cara panen enzim

Faktor lain yang mempengaruhi produksi ekstrak amilase adalah cara memanen enzim. Perbedaan cara panen yang dapat dilakukan dengan berbagai jalan dapat saja menyebabkan perbedaan aktivitas maupun tingkat kemurnian enzim yang diharapkan. Dalam percobaan I

penelitian ini, cara panen merupakan salah satu perlakuan di samping perbedaan-perbedaan jenis kapang dan perbedaan larutan nutrien.

## 2. Penentuan ekstrak amilase terbaik

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketiga faktor secara bersama-sama mempengaruhi aktivitas  $\alpha$ -amilase, aktivitas glucoamilase (AMG) dan kadar protein terlarut yang terdapat pada ekstrak amilase (Tabel 7). Penelusuran lebih lanjut dengan uji perbedaan Duncan pada taraf 5 % menunjukkan bahwa aktivitas  $\alpha$ -amilase tertinggi terdapat pada ekstrak amilase AA-II-1 (2,265 unit/mg padatan), yaitu ekstrak amilase yang diperoleh dari *A. awamori* yang ditanam pada dedak dengan penambahan larutan nutrien II dan dipanen dengan penambahan Tween 80 dan diultrafiltrasi (cara 1). Ekstrak amilase AA-II-1 ini ternyata juga mempunyai aktivitas AMG yang paling tinggi (10362,7 unit/g padatan)(Tabel 8).

Dari Tabel 8 terlihat bahwa kombinasi perlakuan apapun yang diberikan, dedak yang diinokulasi dengan *A. niger* selalu menghasilkan ekstrak amilase dengan aktivitas  $\alpha$ -amilase maupun AMG yang lebih rendah dibandingkan bila perlakuan tersebut dikenakan pada dedak yang diinokulasi dengan *A. awamori*. Dengan kata lain *A. awamori* bersifat lebih responsif untuk memproduksi ekstrak amilase.

Tabel 7. Rekapitulasi F hitung hasil sidik ragam

Sumber	db	Alfa	AMG	Protein
Perlakuan	7	1127,35 **	8706,49 **	553,52 **
A	1	6938,16 **	10481,73 **	83,92 **
B	1	220,98 **	1123,85 **	71,99 **
C	1	118,35 **	42942,02 **	3417,19 **
AB	1	114,76 **	1846,73 **	0,18 ns
AC	1	0,56 ns	102,14 **	129,77 **
BC	1	387,38 **	3223,72 **	107,34 **
ABC	1	111,24 **	1225,24 **	64,26 **

Faktor A : Jenis kapang  
 B : Komposisi larutan mineral  
 C : Cara panen

Tabel 8. Uji Duncan pada taraf 5 % dari setiap pengamatan

Perlakuan	Alfa	AMG	Protein	Alf-spes.	AMG-spes.
AN-I-1	0,480 f	4185,1 d	130,625 d	0,004	32,039
AN-I-2	0,465 f	976,2 g	78,115 e	0,006	12,497
AN-II-1	0,680 e	9311,4 c	179,015 a	0,004	52,015
AN-II-2	0,390 g	510,6 h	59,235 f	0,007	8,620
AA-I-1	1,425 d	9987,2 b	148,605 c	0,010	67,206
AA-I-2	1,705 b	4029,9 e	25,050 h	0,068	160,874
AA-II-1	2,265 a	10362,7 a	169,200 b	0,013	61,245
AA-II-2	1,635 c	3078,8 f	37,065 g	0,044	83,065

AN : A. niger I : Lar. mineral 1 1 : Tween + UF  
 AA : A. awamori II : Lar. mineral 2 2 : + CaCl<sub>2</sub>  
 Alf-spes. = aktivitas spesifik  $\alpha$ -amilase  
 AMG-spes. = aktivitas spesifik AMG

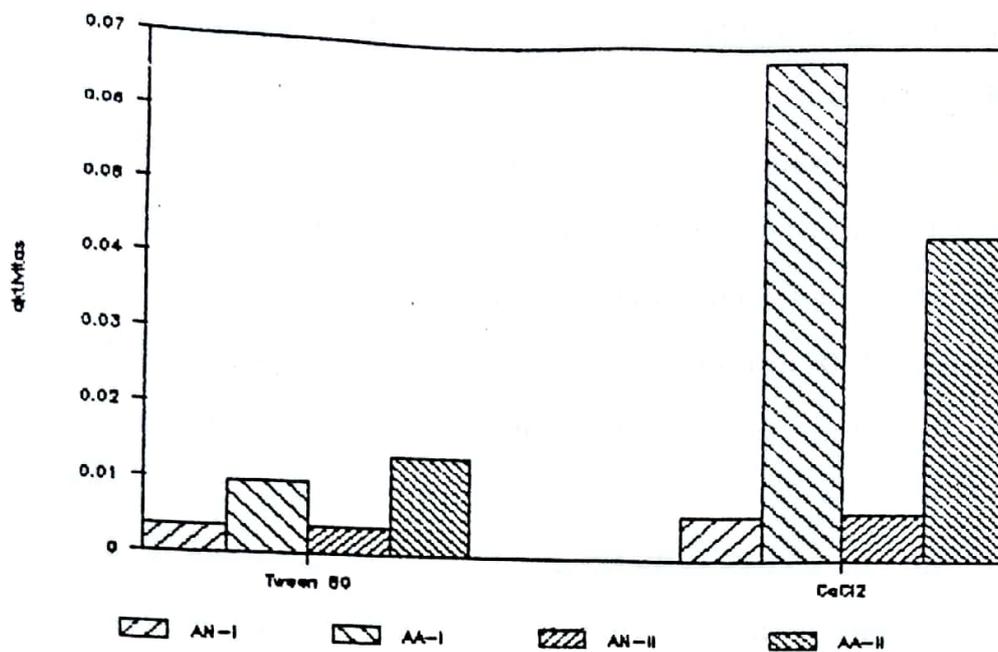
Secara keseluruhan penggunaan larutan nutrisi II ternyata lebih bermanfaat daripada nutrisi I dalam mendapatkan ekstrak dengan aktivitas  $\alpha$ -amilase yang tinggi (rata-rata 1,24 unit/mg padatan dibandingkan

1,01 unit/mg padatan), maupun aktivitas AMG terbaik (5815,9 unit/g padatan dibandingkan 4794,6 unit/g padatan). Demikian halnya dengan cara memanen enzim. Penggunaan Tween 80 untuk memanen (cara 1) ternyata lebih baik dibandingkan penggunaan air dan  $\text{CaCl}_2$  20 % (cara 2).

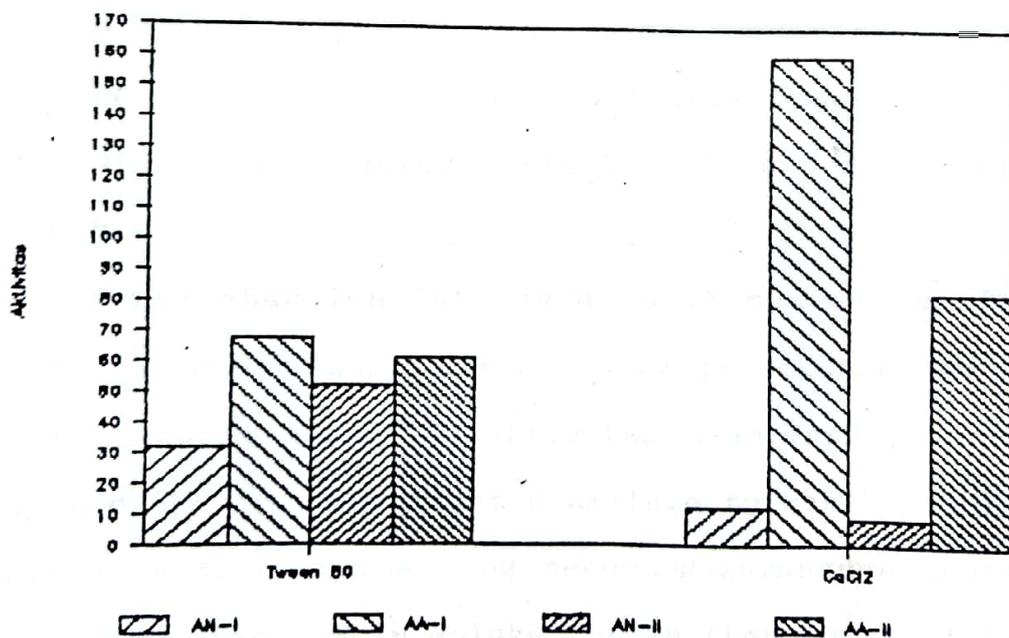
Namun bila dilihat dari kriteria kemurniannya, yaitu aktivitas spesifik  $\alpha$ -amilase dan AMG, terjadi gejala yang sebaliknya. Pada dedak yang diinokulasi dengan *A. awamori*, penggunaan larutan nutrien I ternyata lebih meningkatkan kemurnian  $\alpha$ -amilase maupun glukamilase dibandingkan dengan nutrien II. Sedangkan cara panen 2 terlihat lebih berpengaruh dibandingkan dengan cara panen 1 untuk mendapatkan kemurnian  $\alpha$ -amilase maupun AMG. Gambar 6 dan 7 menunjukkan perbandingan aktivitas spesifik  $\alpha$ -amilase dan AMG dari setiap perlakuan.

#### Pengekstrak $\text{CaCl}_2$ dan peranannya

Udiyono (1988) yang juga menggunakan pengekstrak  $\text{CaCl}_2$  dalam percobaannya, mengatakan bahwa penggunaan 1 ml  $\text{CaCl}_2$  20 % untuk setiap 40 ml ekstrak enzim akan dapat menghilangkan senyawa yang tidak diinginkan termasuk sebagian protein, sehingga ekstrak enzim akan lebih murni. Pengamatan visual yang dilakukan dalam penelitian ini juga menunjukkan adanya endapan hasil



Gambar 6. Perbandingan aktivitas spesifik  $\alpha$ -amilase dari seluruh perlakuan



Gambar 7. Perbandingan aktivitas spesifik AMG dari seluruh perlakuan

sentrifusi yang lebih banyak pada ekstrak amilase yang dipanen dengan pengestrak  $\text{CaCl}_2$  dibandingkan penggunaan pengestrak Tween 80. Kemampuan menurunkan kadar protein dari penggunaan  $\text{CaCl}_2$  ini juga tampak pada Tabel 8. Dari Tabel ini terlihat bahwa seluruh perlakuan yang dipanen dengan penambahan  $\text{CaCl}_2$  (cara 2) mempunyai kadar protein yang lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan tandingannya.

Endapan yang banyak terbentuk akibat penambahan  $\text{CaCl}_2$  ke dalam ekstrak amilase diduga disebabkan oleh terjadinya pengendapan massa sel setelah dinding selnya berinteraksi dengan larutan pengestrak tersebut. Pengendapan massa sel ini otomatis mengurangi jumlah protein yang terdapat dalam supernatan, sehingga kadar protein terlarut dalam ekstrak amilase menjadi lebih rendah.

Penambahan ion  $\text{Ca}^{++}$  juga dapat memberi manfaat lain. Menurut Chang et al. (1986) penambahan larutan  $\text{CaCl}_2$  akan meningkatkan aktivitas  $\alpha$ -amilase. Hal ini dapat dimengerti mengingat  $\alpha$ -amilase termasuk kelompok Calcium metallo-enzyme yang sekurang-kurangnya mengandung satu atom Ca per molekul enzim (Lehninger, 1982). Fogarty (1983) menyatakan bahwa enzim  $\alpha$ -amilase yang mengandung atom Ca bersifat lebih tahan terhadap perubahan suhu, pH dan aktivitas protease daripada en-

zim yang tak mengandung atom Ca. Dengan demikian penambahan  $\text{CaCl}_2$  dapat meningkatkan kestabilan kerja enzim.

Hartanto (1987) yang mengamati pengaruh penambahan  $\text{CaCl}_2$  terhadap aktivitas  $\alpha$ -amilase ternyata mendapatkan bahwa larutan tersebut tidak memberi pengaruh yang nyata terhadap aktivitas  $\alpha$ -amilase. Lebih jauh dilaporkan bahwa keadaan ini disebabkan oleh adanya ion  $\text{Ca}^{++}$  yang telah diberikan pada saat penambahan larutan nutrisi, sehingga penambahan larutan  $\text{CaCl}_2$  di luar larutan nutrisi menjadi kurang bermanfaat.

Larutan nutrisi dan kadar protein amilase

Adapun pengaruh penggunaan larutan nutrisi dapat diterangkan sebagai berikut. Komposisi II yang mengandung mineral dengan jumlah lebih banyak dan beragam sebenarnya merupakan media yang lebih baik bagi kapang. Itulah sebabnya komposisi ini tampak lebih bermanfaat untuk mendapatkan aktivitas  $\alpha$ -amilase maupun AMG yang lebih tinggi. Namun ketersediaan nutrisi yang lebih lengkap juga menyebabkan kapang semakin aktif memproduksi bahan-bahan lain seperti berbagai jenis protein bukan enzim dan sebagainya. Hal inilah yang menyebabkan ekstrak amilase dari kombinasi yang menggunakan larutan nutrisi II mengandung protein yang lebih tinggi dibandingkan tandingannya (Tabel 8).

Seperti yang disebutkan pada metodologi penelitian, dari percobaan tahap I ini diharapkan dapat ditentukan 2 ekstrak amilase yang diamati lebih lanjut pada percobaan-percobaan berikutnya. Dasar penetapannya adalah aktivitas  $\alpha$ -amilase, AMG maupun kemurniannya.

#### Penetapan perlakuan optimum

Berdasarkan kriteria aktivitas  $\alpha$ -amilase maupun AMG, maka terpilih ekstrak AA-II-1 karena memiliki nilai yang paling tinggi untuk kedua aktivitas enzim tersebut. Sedangkan ekstrak kedua dipertimbangkan antara AA-I-2 (dari aktivitas  $\alpha$ -amilase) dan AA-I-1 (dari aktivitas AMG). Sebaliknya dari aktivitas spesifiknya, ekstrak AA-I-2 terpilih, karena mempunyai aktivitas spesifik  $\alpha$ -amilase maupun AMG tertinggi (Gambar 6 dan 7), sedangkan ekstrak berikutnya adalah ekstrak AA-II-2 dengan aktivitas spesifik  $\alpha$ -amilase maupun AMG kedua tertinggi. Dengan memperhatikan seluruh kriteria dan untuk mendapatkan perlakuan yang lebih seragam, maka ditetapkan AA-I-2 dan AA-II-1 sebagai 2 ekstrak yang digunakan pada percobaan berikutnya.

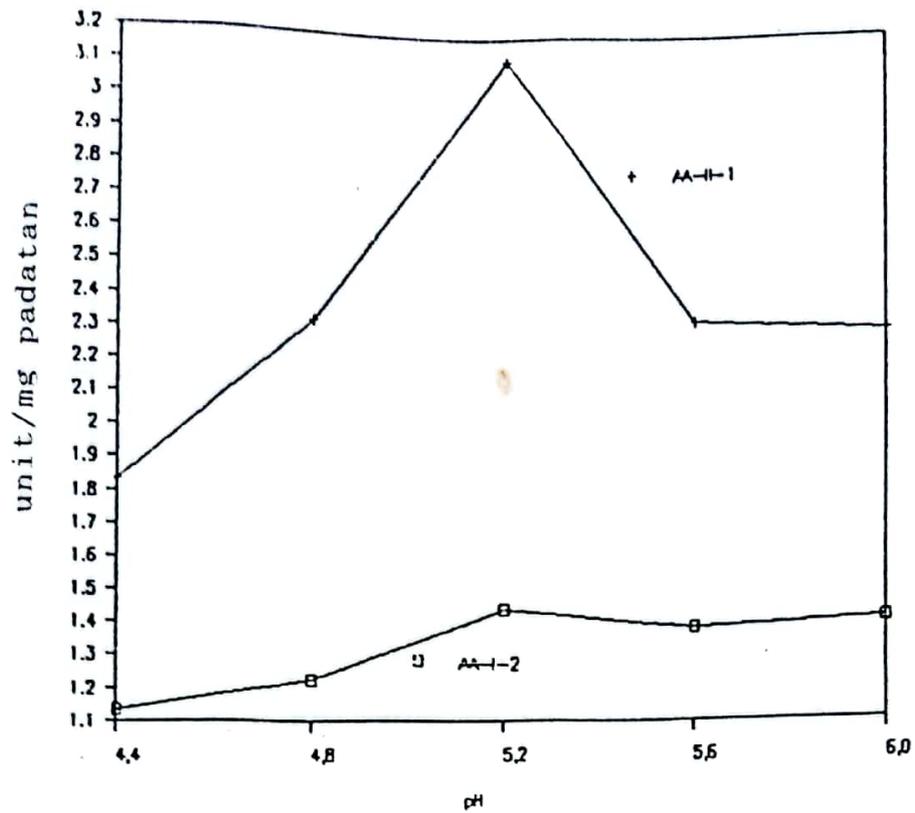
## B. KONDISI AKTIVITAS OPTIMUM, KINETIKA DAN POLA PROTEIN

### 1. pH dan suhu aktivitas optimum

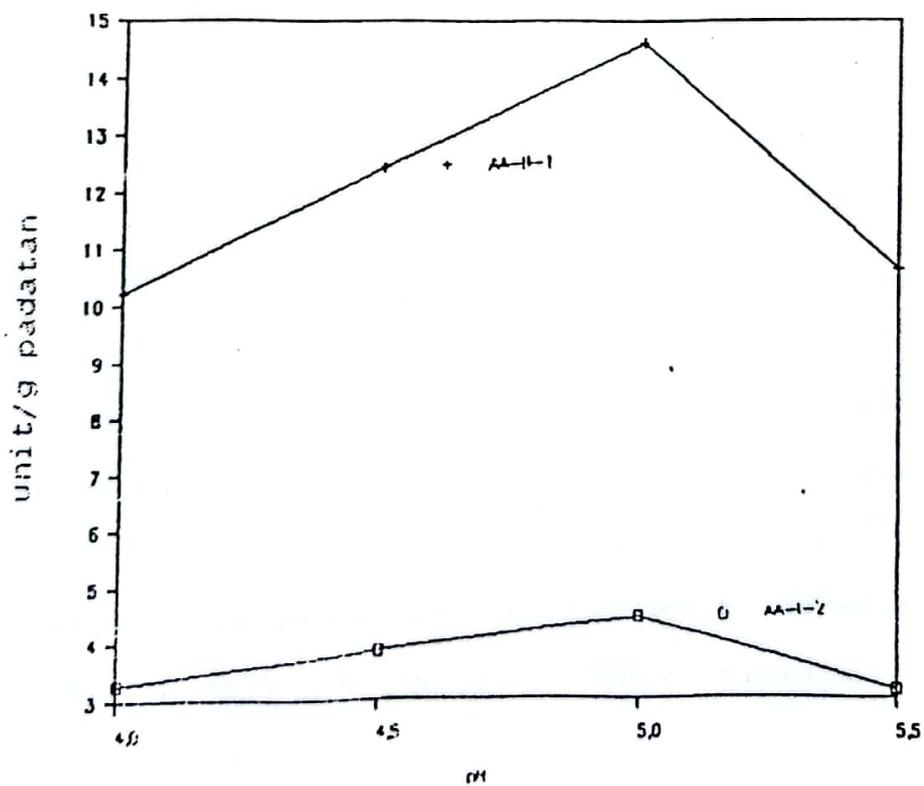
Suatu jenis enzim dapat saja aktif dalam kondisi apapun, namun enzim tersebut akan mempunyai aktivitas yang sangat tinggi pada kondisi yang paling sesuai baginya. Faktor-faktor seperti pH substrat dan suhu lingkungan merupakan faktor yang menentukan tingkat aktivitas tersebut.

Fogarty (1983) menyebutkan bahwa aktivitas optimum enzim  $\alpha$ -amilase dicapai pada kisaran pH 4,5 - 6,5. Sementara itu Hartanto (1987) mendapatkan bahwa pH 5,5 merupakan pH yang tepat bagi  $\alpha$ -amilase dari *A. oryzae* dan pH 6,0 untuk  $\alpha$ -amilase dari *A. niger*. Pada Gambar 8 tampak bahwa aktivitas  $\alpha$ -amilase optimum untuk ekstrak AA-I-2 maupun AA-II-1 terdapat pada pH 5,2.

Untuk aktivitas enzim amiloglukosidase (AMG), Aunstrup (1979) melaporkan bahwa aktivitas optimum dicapai pada kisaran pH 4,0 - 5,0. Hartanto (1987) mendapatkan pH optimum AMG dari *A. oryzae* adalah pH 4,0 dan AMG dari *A. niger* pada pH 4,5. Dalam penelitian dengan *A. awamori* ini terlihat pH 5,0 merupakan pH yang paling tepat untuk aktivitas AMG dari AA-I-2 maupun AA-II-1 (Gambar 9).



Gambar 8. Penetapan pH optimum aktivitas  $\alpha$ -amilase



Gambar 9. Penetapan pH optimum aktivitas AMG

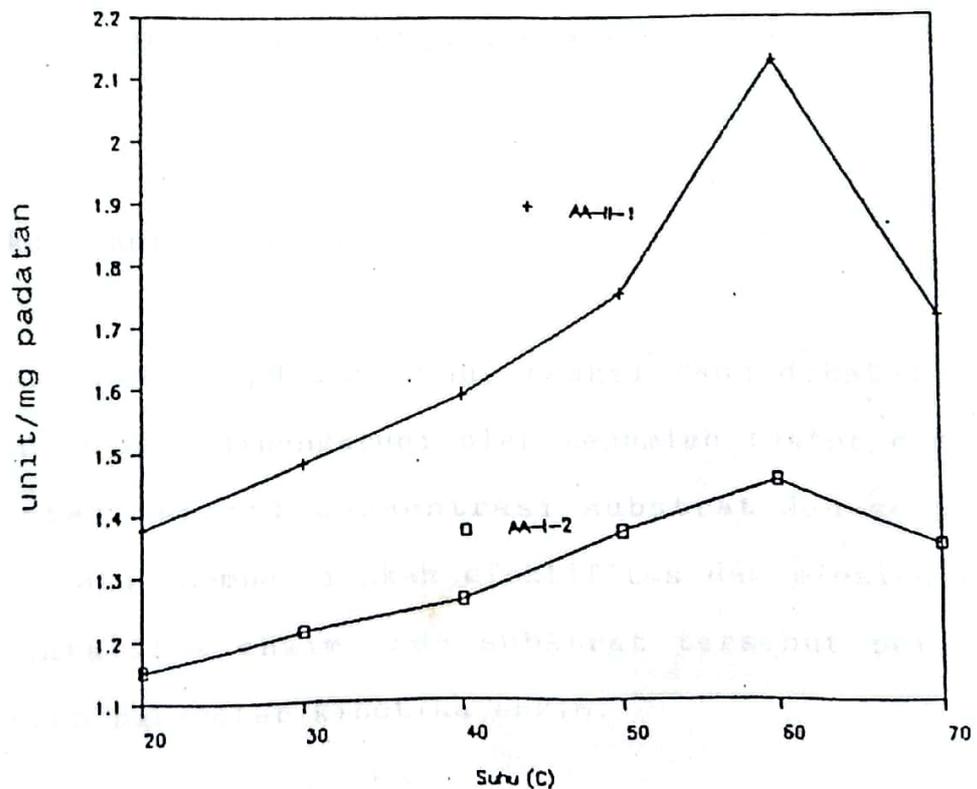
Jika dilihat dari tingginya aktivitas yang dicapai pada berbagai pH, maka ekstrak AA-II-1 tampak lebih aktif daripada ekstrak AA-I-2. Hasil ini sesuai dengan hasil percobaan I (Tabel 8). Faktor-faktor yang mempengaruhi pun telah dijelaskan pada pembahasan terdahulu. Namun jika dibandingkan antara aktivitas  $\alpha$ -amilase dengan AMG dari kedua ekstrak (Gambar 8 vs Gambar 9), terlihat adanya kecenderungan kedua ekstrak lebih bersifat sebagai AMG daripada  $\alpha$ -amilase.

Selanjutnya pengamatan terhadap suhu aktivitas optimum  $\alpha$ -amilase menunjukkan bahwa suhu 60°C adalah suhu yang paling sesuai untuk ekstrak AA-I-2 maupun AA-II-1 (Gambar 10). Kisaran suhu aktivitas  $\alpha$ -amilase optimum ini dilaporkan berkisar antara 40-60°C (Aunstrup, 1979 ; Fogarty, 1983). Seperti hasil di atas, Hartanto (1987) maupun Wardoyo (1985) juga mendapatkan aktivitas optimum  $\alpha$ -amilase terdapat pada suhu 60°C.

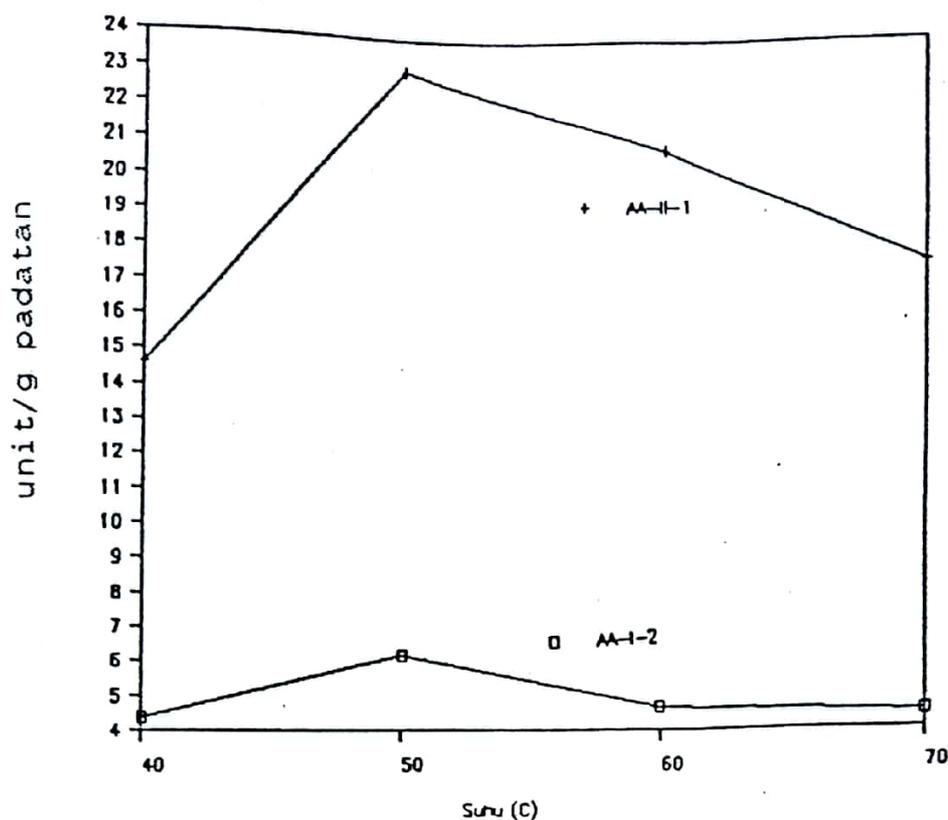
Pengamatan terhadap aktivitas AMG menunjukkan bahwa aktivitas AMG tertinggi dicapai pada suhu 50°C (Gambar 11). Hasil ini bertentangan dengan laporan Fogarty (1983), bahwa suhu optimum untuk aktivitas AMG dari *A. awamori* adalah 60°C. Namun Winarno (1983)

menyebutkan bahwa suhu optimum AMG adalah  $50^{\circ}\text{C}$ . Demikian halnya dengan Purwani (1987) yang menggunakan suhu  $50^{\circ}\text{C}$  sebagai suhu optimum aktivitas AMG.

Perbedaan suhu optimum ini menunjukkan bahwa ekstrak AA-I-2 maupun AA-II-1 dapat saja dianggap sebagai  $\alpha$ -amilase maupun AMG. Namun karena dari aspek pH optimum tampak keduanya lebih bersifat AMG dan demikian halnya dari aspek tinggi aktivitas AMG pada berbagai suhu (Gambar 9 vs 11), maka pada penggunaannya sebagai enzim perombak pati, ekstrak AA-I-2 maupun AA-II-1 akan diperlakukan sebagai AMG.



Gambar 10. Penetapan suhu optimum aktivitas  $\alpha$ -amilase



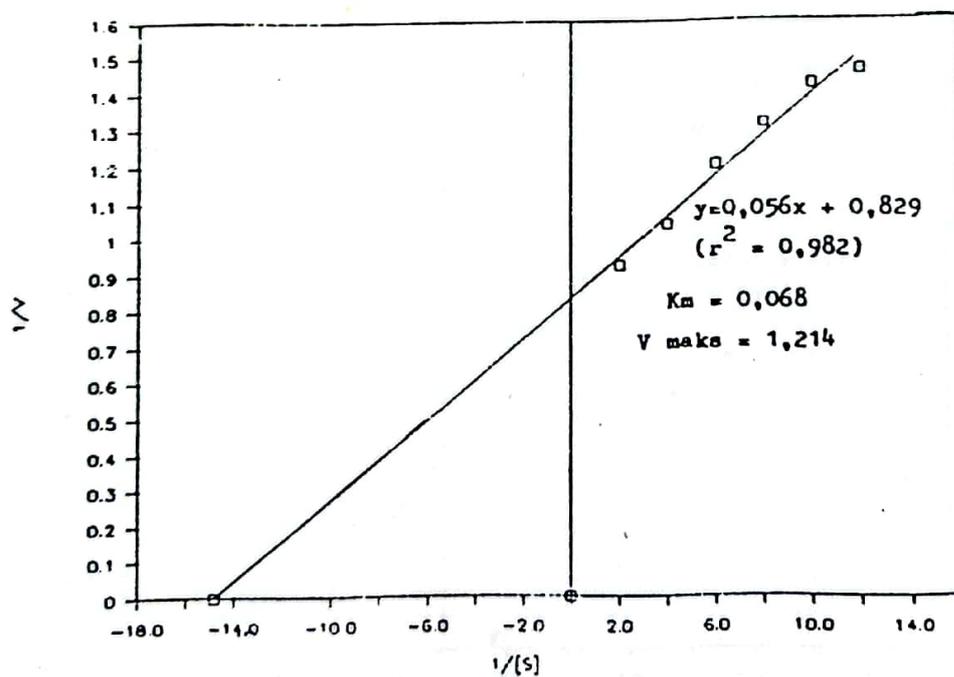
Gambar 11. Penetapan suhu optimum aktivitas AMG

## 2. Kinetika ekstrak amilase

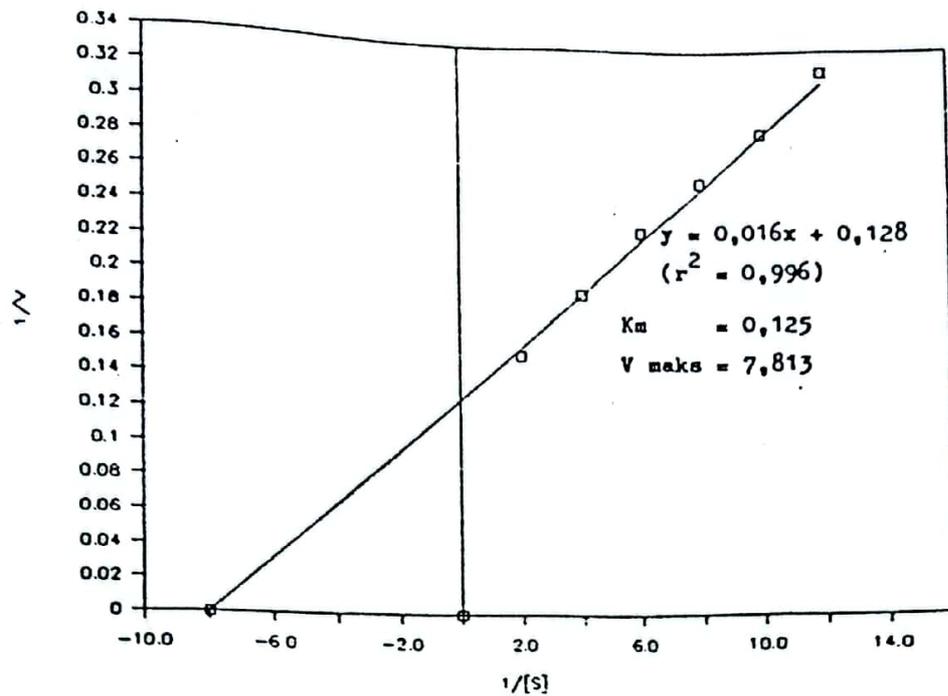
Selain oleh pH dan suhu, reaksi yang dikatalis oleh enzim juga dipengaruhi oleh sejumlah faktor eksperimental seperti konsentrasi substrat dan sebagainya. Untuk memperkirakan efektifitas dan efisiensi kerja katalitik enzim pada substrat tersebut perlu ditetapkan parameter kinetika enzim.

Metode Lineweaver-Burk yang digunakan untuk menetapkan parameter tersebut merupakan metode yang lazim digunakan. Dengan metode ini dapat ditetapkan nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  sekaligus dengan data yang tidak terlalu banyak (Bergmeyer, 1983).

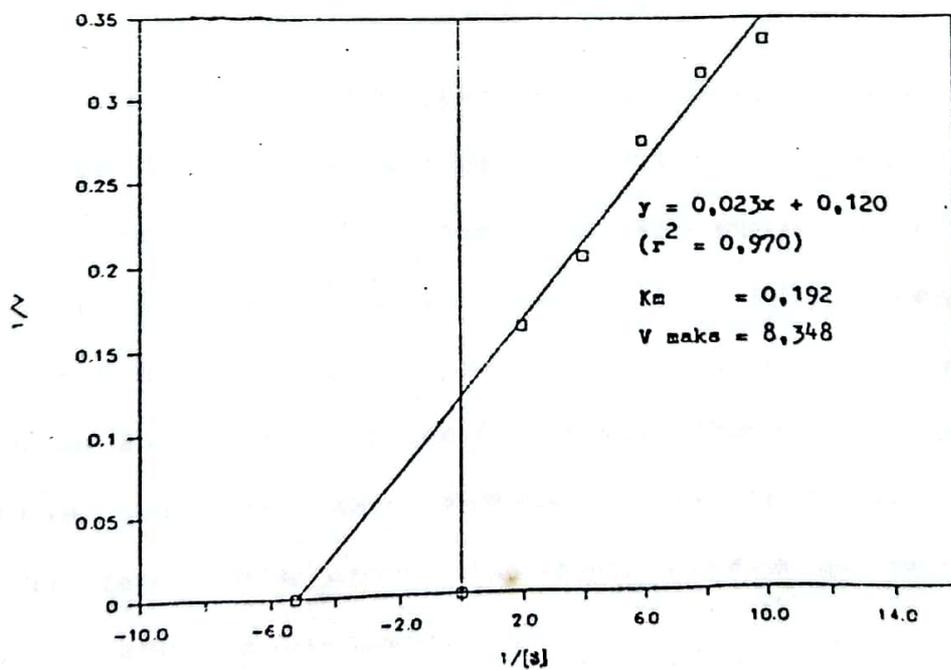
Hasil pengamatan parameter kinetika enzim  $\alpha$ -amilase dari ekstrak AA-I-2 dan AA-II-1 disajikan pada Gambar 12 dan 13. Sementara itu plot Lineweaver-Burk untuk AMG dari kedua ekstrak dapat dilihat pada Gambar 14 dan 15, sedang Tabel 9 memuat nilai-nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  untuk  $\alpha$ -amilase dan AMG dari kedua ekstrak.



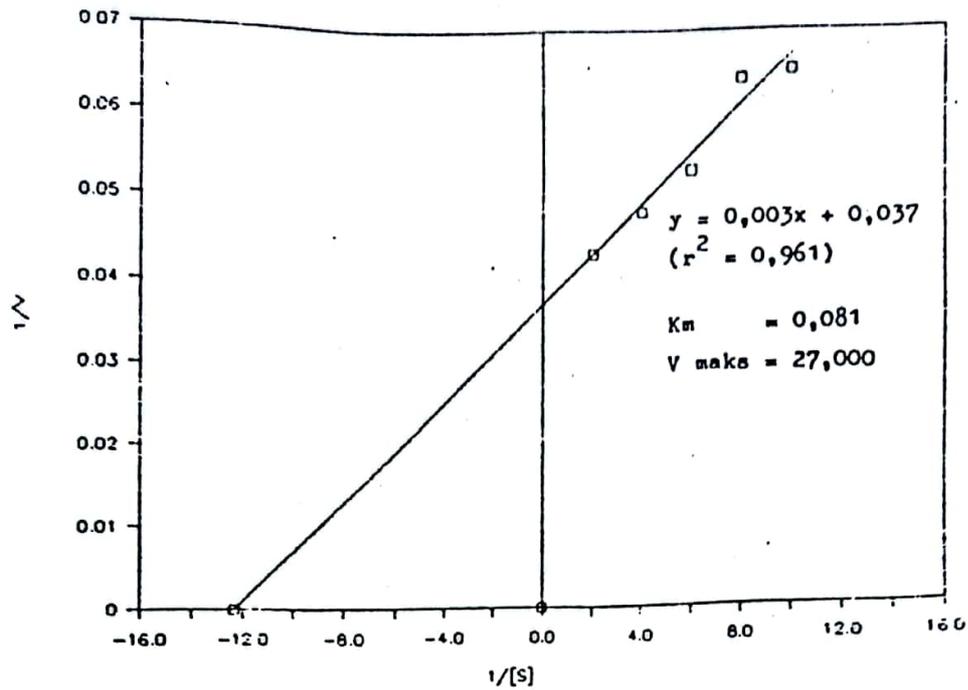
Gambar 12. Kurva Lineweaver-Burk aktivitas  $\alpha$ -amilase dari ekstrak AA-I-2



Gambar 13. Kurva Lineweaver-Burk aktivitas  $\alpha$ -amilase dari ekstrak AA-II-1



Gambar 14. Kurva Lineweaver-Burk aktivitas AMG dari ekstrak AA-I-2



Gambar 15. Kurva Lineweaver-Burk aktivitas AMG dari ekstrak AA-II-1

Bergmeyer (1983) menyatakan bahwa konstanta Michaelis-Menten ( $K_m$ ) merupakan indikasi afinitas sisi aktif enzim terhadap substrat. Semakin rendah nilai  $K_m$  suatu enzim, akan semakin tinggi afinitasnya. Dengan kata lain enzim dengan nilai  $K_m$  yang lebih rendah membutuhkan substrat yang lebih sedikit. Peningkatan konsentrasi substrat akan membuatnya lebih cepat terjenuhi dan lebih cepat mencapai kecepatan reaksi stabil (fase steady-state).

Tabel 9. Nilai Km dan V maks untuk  $\alpha$ -amilase dan AMG dari ekstrak AA-I-2 dan AA-II-1

	Km (mg/ml)	V maks (unit/mg)
$\alpha$ -amilase		
AA-I-2	0,068	1,214
AA-II-1	0,125	7,813
AMG		
AA-I-2	0,192	8,348
AA-II-1	0,081	27,000

Dari segi besarnya nilai Km, tampak bahwa sebagai  $\alpha$ -amilase ekstrak AA-I-2 memiliki Km yang lebih kecil dibandingkan ekstrak AA-II-1. Namun sebagai AMG terjadi kecenderungan yang sebaliknya (Tabel 9). Fenomena ini belum dapat dijelaskan. Beberapa literatur yang dijumpai tidak menjelaskan adanya fenomena semacam ini, dan menyatakan bahwa nilai Km semata-mata menunjukkan tingkat konsentrasi substrat dimana kecepatan reaksi mencapai setengah dari kecepatan maksimumnya (Lehninger, 1982; Winarno, 1983).

Lebih lanjut Bergmeyer (1983) menyatakan bahwa nilai V maks merupakan petunjuk jumlah enzim yang tersedia serta kesiapannya untuk mengkatalis suatu reaksi. Nilai V maks yang lebih besar mengisyaratkan lebih tingginya ketersediaan enzim tersebut untuk

mengkatalis reaksi yang bersangkutan. Nilai ini juga mencerminkan laju pemecahan kompleks enzim-substrat menjadi produk dan enzim bebas.

Berdasarkan pengertian  $V_{\text{maks}}$  di atas, maka sekali lagi tampak bahwa ekstrak AA-I-2 maupun AA-II-1 lebih bersifat sebagai AMG daripada  $\alpha$ -amilase, karena nilai  $V_{\text{maks}}$  AMG lebih besar daripada  $\alpha$ -amilase (Tabel 9).

Meskipun sebagai AMG, ekstrak AA-I-2 membutuhkan konsentrasi substrat tiga kali lebih besar bila dibandingkan sebagai  $\alpha$ -amilase untuk mencapai kecepatan reaksi setengah dari kecepatan maksimumnya (0,192 dibandingkan 0,068 mg/ml), namun aktivitasnya sebagai AMG juga tersedia delapan kali lebih besar. Dengan demikian penggunaan ekstrak AA-I-2 sebaiknya dilakukan sebagaimana penggunaan AMG.

Di lain pihak pola kecepatan reaksi ekstrak AA-II-1 sebagai AMG merupakan pola yang paling baik bila dibandingkan dengan ketiga pola yang lain. Dengan konsentrasi substrat yang kecil saja (0,081 mg/ml), ekstrak ini sudah dapat mencapai kecepatan reaksi sebesar setengah dari kecepatan maksimum. Selain itu enzim AMG dalam ekstrak ini tersedia paling banyak (27.000 unit/g ekstrak kering), sehingga dengan pola yang tajam semacam ini proses penguraian substrat dapat lebih cepat dilakukan.

### 3. Pola protein ekstrak enzim

Pada percobaan ini ekstrak amilase AA-I-2 dan AA-II-1 bersama-sama dengan enzim  $\alpha$ -amilase, AMG murni dan standar BM diidentifikasi pola proteinnnya dengan menggunakan elektroforesis SDS-Poliakrilamid (SDS-PAGE) metode Laemmli yang dimodifikasi. Enzim  $\alpha$ -amilase murni yang digunakan adalah  $\alpha$ -amilase tipe X-A (Sigma, USA) dari kapang *A. oryzae*, sedang AMG murni adalah enzim AMG dari kapang *Rhizopus* (Sigma, USA). Adapaun standar BM yang digunakan adalah albumin telur, albumin bovin, tripsinogen, laktoglobulin dan lisozim.

Tujuan percobaan ini adalah menentukan berat molekul dari berbagai protein yang ada pada ekstrak amilase dan enzim murni. Hasil pengamatan mobilitas relatif (Rf) dari berbagai pita yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 10. Sebaran pola protein dari masing-masing contoh disajikan pada Gambar 16.

Dari data standar BM dibuat hubungan antara Rf dan BM pada kertas semilog. Nilai Log (BM) sebagai sumbu Y dan Rf sebagai sumbu X. Hasil plotting dari data ini diperoleh hubungan  $\text{Log}(\text{BM}) = 5,0789 - 0,0983\text{Rf}$  dengan koefisien regresi (r) sebesar - 0,99. Kemudian dengan memasukkan nilai Rf dari setiap contoh ke dalam persamaan ini, dapat ditentukan besarnya BM contoh yang bersangkutan (Tabel 10).

Tabel 10. Hasil pengukuran mobilitas relatif (Rf) dan berat molekul dari berbagai contoh

Jenis contoh	Berat molekul	Rf	BM-hitung *
<b>Standar BM</b>			
Lisozim	14.300	9,50	-
Laktoglobulin	18.400	8,50	-
Tripsinogen	24.000	6,50	-
Albumin telur	45.000	4,50	-
Albumin bovin	66.000	2,75	-
<b>Contoh</b>			
$\alpha$ -amilase murni	-	3,50	54.300
AMG murni	1	2,25	72.000
	2	2,75	64.350
	3	3,75	51.300
AA-I-2	1	1,25	90.400
	2	2,25	72.000
	3	3,50	54.300
AA-II-1	1	0,75	101.200
	2	2,25	72.000
	3	3,25	57.500

\* ) Ditentukan dari persamaan kurva standar

Fogarty (1983) melaporkan bahwa enzim  $\alpha$ -amilase yang diperoleh dari *A. oryzae* mempunyai berat molekul 52.600 dalton. Pada percobaan ini enzim  $\alpha$ -amilase dari *A.oryzae* (Sigma, USA) ternyata mempunyai BM 54.300 dalton. Meskipun tidak tepat benar, hasil ini dinilai cukup baik karena perbedaannya tak terlalu besar disamping adanya kemungkinan perbedaan proses ekstraksi enzimnya.

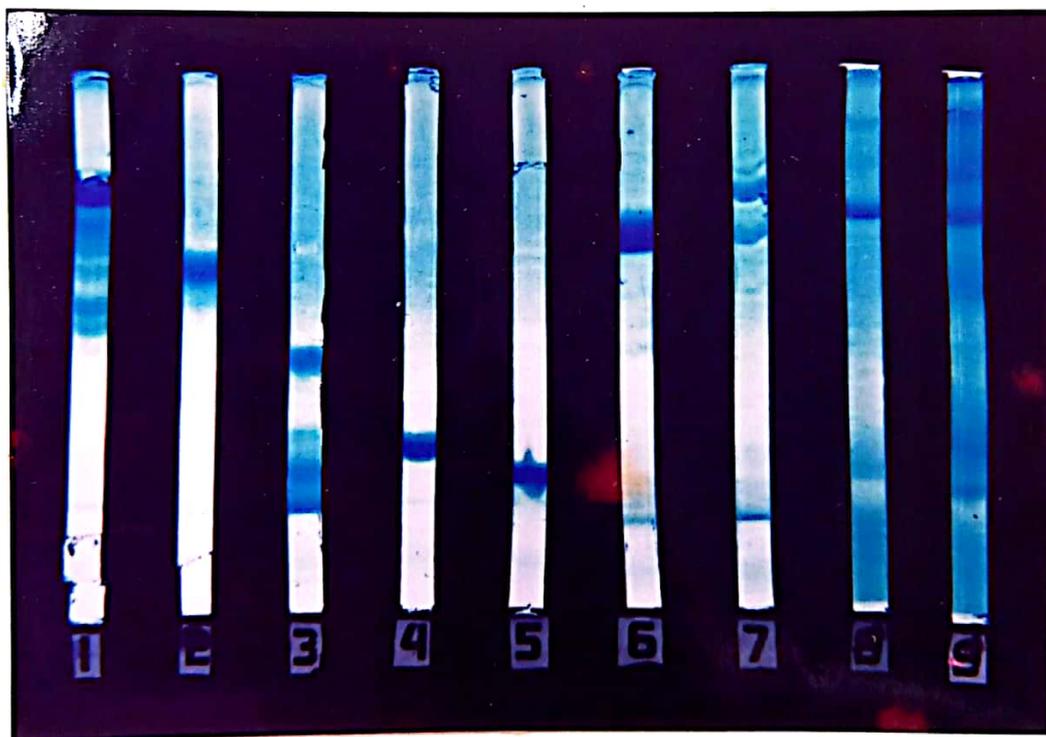
Ekstrak amilase AA-I-2 ternyata memiliki satu pita yang mobilitas relatifnya sama dengan mobilitas relatif  $\alpha$ -amilase murni (Pita 3). Pita ke tiga dari AA-I-2 ini merupakan pita utama, dalam arti intensitasnya tertinggi, sehingga dapat ditetapkan bahwa kemungkinan besar pita ini adalah pita  $\alpha$ -amilase (BM 54.300 ). Kepastiannya masih diperlukan uji identifikasi dengan pewarnaan khusus.

Hasil elektroforesis AMG murni (Sigma, USA) ternyata memiliki tiga buah pita dengan BM masing-masing 51.300, 64.350, dan 72.000 Dalton. Pita protein pertama dari ekstrak AA-I-2 yang mempunyai BM 90.370 dalton belum dapat dipastikan apakah termasuk AMG atau bukan. Namun pita ke dua mempunyai BM yang sama dengan AMG (72.000 dalton). Jadi ada kemungkinan bahwa pita ini adalah pita AMG. Fogarty (1983) melaporkan bahwa BM AMG dari *A. awamori* berkisar antara 83.700-88.000 dalton.

Sementara itu ekstrak AA-II-1 yang mempunyai tiga buah pita, ternyata salah satunya (pita ke dua) memiliki BM yang sama dengan pita ke satu dari AMG murni (72.000 dalton). Dengan demikian ada kemungkinan bahwa pita ke dua ekstrak AA-II-1 adalah AMG.

Adanya tiga pita pada ekstrak AA-I-2 maupun AA-II-1 mungkin pula ada kaitannya dengan adanya tiga jenis isoenzim AMG yang dihasilkan *A. awamori* (Crueger et al., 1986). Salah satu isoenzim ini dilaporkan mampu menghidrolisa pati mentah (Crueger et al., 1986).

Dari seluruh kemungkinan di atas, maka upaya penetapan apakah ke tiga atau beberapa jenis protein yang terdapat pada ekstrak AA-I-2 maupun AA-II-1 adalah AMG, masih perlu dilakukan.



Keterangan :

1 = Albumin bovin	6 = Alfa amilase
2 = Albumin telur	7 = AMG murni
3 = Tripsinogen	8 = AA-I-2
4 = Laktoglobulin	9 = AA-II-1
5 = Lisozim	

Gambar 16. Pola protein standar BM, enzim murni dan ekstrak amilase AA-I-2 dan AA-II-1

## C. SIFAT BAHAN DAN PRODUKSI TEPUNG BKP

### 1. Sifat tepung beras sebagai bahan dasar

Sifat bahan dasar, sedikit banyak berpengaruh terhadap proses pengolahan maupun mutu produk yang dihasilkan. Tepung beras yang dipakai pada percobaan ini berasal dari varietas IR64 dan IR42. Tepung beras dibuat melalui perendaman dalam air selama 15 menit (Setiadi, 1987) dan digiling pada unit penggiling komersial di desa Sukamandi Jaya. Hasil analisis proksimat kedua jenis tepung tersebut disajikan pada Tabel 11.

Dalam Tabel 11 tersebut, tampak bahwa kedua jenis tepung hampir tidak memiliki perbedaan komposisi yang menyolok. Kandungan karbohidrat yang diperoleh dengan pengurangan tampak merupakan komponen utama. Hal ini sesuai dengan fungsi beras sebagai sumber enersi.

Meskipun hampir sama komposisi kimianya, kedua tepung dapat saja menghasilkan mutu produk yang berbeda disebabkan sifat fisikokimianya yang berbeda. Karbohidrat yang berperan penting dalam pembuatan tepung BKP perlu diamati sifat fisikokimianya. Hasil pengamatan tersebut dapat dilihat pada Tabel 12, dan pola amilografinya terdapat pada Gambar 17.

Kadar amilosa tepung beras IR64 (22,60%) ternyata sangat berbeda dengan kadar amilosa tepung beras IR 42 (27,50%). Berdasarkan pengelompokan yang dilakukan Damardjati dan Harahap (1973), maka beras IR64 termasuk kelompok beras beramilosa sedang dan beras IR42 adalah beras beramilosa tinggi. Tingginya kadar amilosa yang dimiliki IR42 maupun IR64 ini akan lebih menguntungkan dalam proses pembuatan tepung BKP. Polimer glukosa yang tidak memiliki ikatan  $\alpha$ -1,6 glikosida ini lebih mudah dipecah oleh enzim amilolitik menjadi unit-unit yang lebih sederhana.

Bila diperhatikan suhu gelatinisasinya, keduanya juga terlihat cukup berbeda. Meskipun demikian tidak terdapat hubungan bahwa beras dengan amilosa lebih tinggi selalu mempunyai suhu gelatinisasi yang lebih rendah atau sebaliknya. Damardjati (1983) mendapatkan bahwa varietas indika dengan kadar amilosa sedang memiliki suhu gelatinisasi sedang ( $70-74^{\circ}\text{C}$ ), kecuali galur B2791 ( $>74^{\circ}\text{C}$ ), sedangkan yang beramilosa tinggi terbagi dalam tiga kelompok, yaitu rendah ( $<70^{\circ}\text{C}$ ), sedang dan tinggi.

Tabel 11. Komposisi kimia tepung beras IR64 dan IR42 (berat basah).

Komponen (%)	IR64	IR42
Air	13,03	12,97
Protein	7,21	6,89
Lemak	0,37	0,37
Abu	0,32	0,32
Karbohidrat*)	79,07	79,45

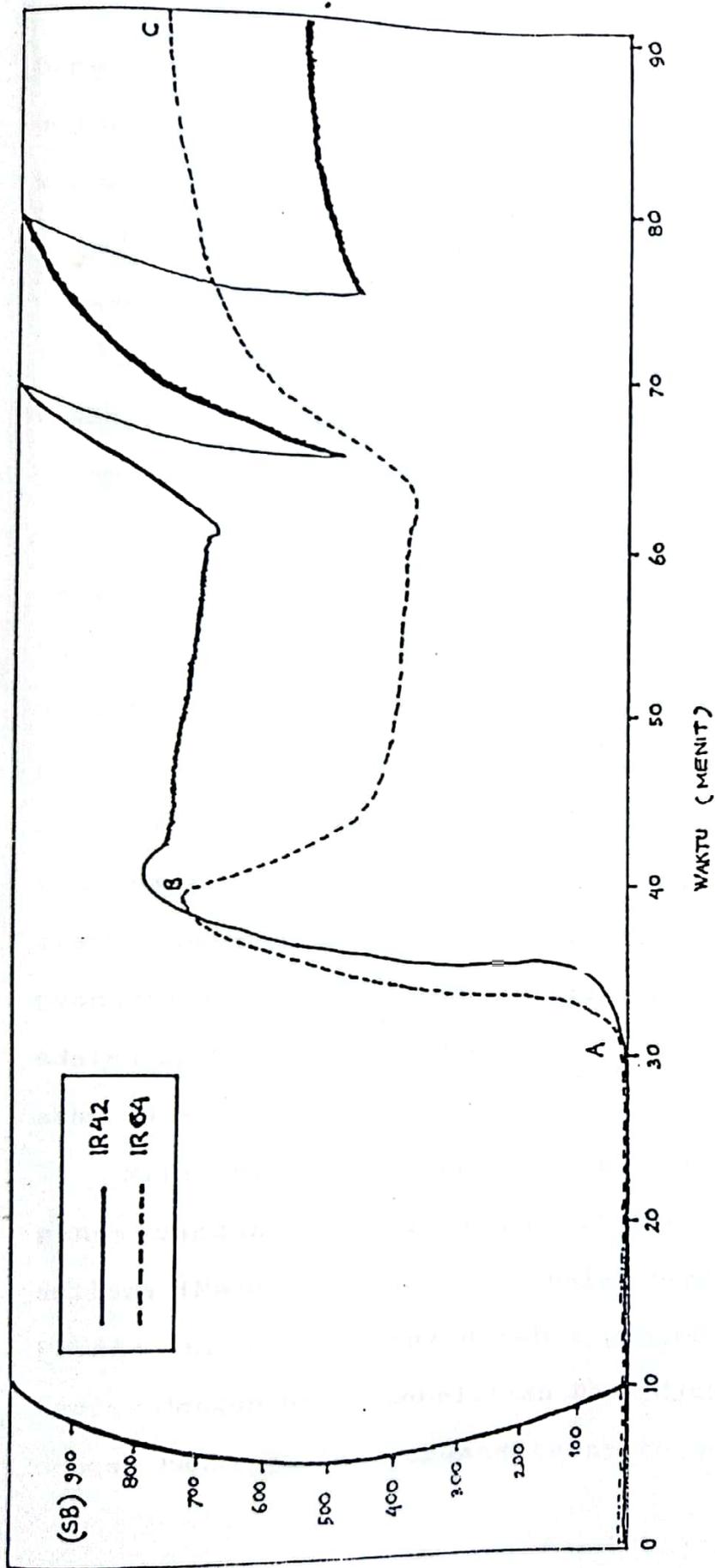
\*) ditentukan dengan pengurangan.

Tabel 12. Sifat amilografi tepung beras IR64 dan IR42.

Parameter	IR64	IR42
Kadar amilosa (%)	22,60	27,50
Waktu gelatinisasi (menit)	31,00	28,00
Suhu gelatinisasi (°C)	76,50	72,00
Waktu viskositas puncak (menit)	42,50	43,50
Suhu viskositas puncak (°C)	93,75	95,25
Viskositas puncak (SB*)	740,00	780,00
Viskositas 50°C (SB)	745,00	1540,00
Viskositas balik (SB)	5,00	760,00

\* SB = Satuan Barbender

Suhu viskositas puncak pada varietas IR64 ternyata lebih rendah daripada IR42 (93,75 banding 95,25°C). Padahal suhu gelatinisasi IR64 lebih tinggi dari IR42 (Tabel 12). Jadi tampak adanya hubungan yang terbalik antara suhu gelatinisasi dengan suhu viskositas puncak. Hasil ini sesuai dengan penemuan Hallick dan Kelly (1959), bahwa beras asal Amerika dengan suhu gelatinisasi tinggi (75,5 - 79,5°C) ternyata mempunyai suhu viskositas puncak yang rendah. Namun



Keterangan:  
 A : Waktu gelatinisasi  
 B : Viskositas puncak  
 C : Waktu gelatinisasi pada 50°C  
 C-B= Viskositas balik  
 Suhu awal = 30°C, setiap peningkatan waktu 1 menit setara dengan peningkatan 1,5 C.

Gambar 17. Amilogram tepung beras IR64 dan IR42.

Damardjati (1983) mendapatkan bahwa suhu viskositas puncak varietas beras Indonesia lebih berkaitan dengan waktu gelatinisasi daripada dengan suhu gelatinisasi.

Besarnya viskositas puncak tampaknya berkaitan dengan kadar amilosa beras yang bersangkutan (Tabel 12). Namun demikian keterkaitan tersebut sebenarnya tidak terbukti (Damardjati, 1983; Juliano et al., 1964 dalam Damardjati, 1983).

Nilai viskositas puncak sebenarnya menggambarkan kerapuhan (fragility) dari granula pati yang mengembang. Pada tingkat ini adanya sedikit gaya mekanis akibat pengaduk Brabender akan menyebabkan granula pati yang mengembang tersebut menjadi pecah (Mazurs et al., 1957 dalam Damardjati 1983). Oleh sebab itulah suhu pada viskositas puncak ini digunakan sebagai standar bahwa granula pati telah tergelatinisasi. Pada produksi tepung BKP suhu gelatinisasi yang digunakan adalah 95°C. Sedangkan Hansen et.al (1981) menggunakan suhu 95 - 100°C.

Nilai viskositas pada 50°C menggambarkan tingkat penggabungan kembali (reassociation) dari molekul amilosa (Mazurs et al., 1957 dalam Damardjati, 1983). Proses ini juga sering disebut proses retrogradasi. Sesuai dengan hasil penelitian Damardjati (1983), IR64 dengan kadar amilosa sedang ternyata memiliki visko-

sitas pada 50°C yang rendah (< 800 SB), sedang beras IR42 (kadar amilosa tinggi) mempunyai nilai viskositas yang tinggi (>800 SB).

Pengurangan nilai viskositas pada 50°C terhadap nilai viskositas puncak menghasilkan nilai viskositas balik (Setback Viscosity). Pada percobaan ini beras dengan amilosa sedang memiliki viskositas balik yang lebih rendah dibanding pada beras beramilosa tinggi. Damardjati (1983) mendapatkan bahwa semakin rendah kadar amilosa suatu beras, semakin rendah pula nilai viskositas baliknya.

## 2. Produksi tepung BKP

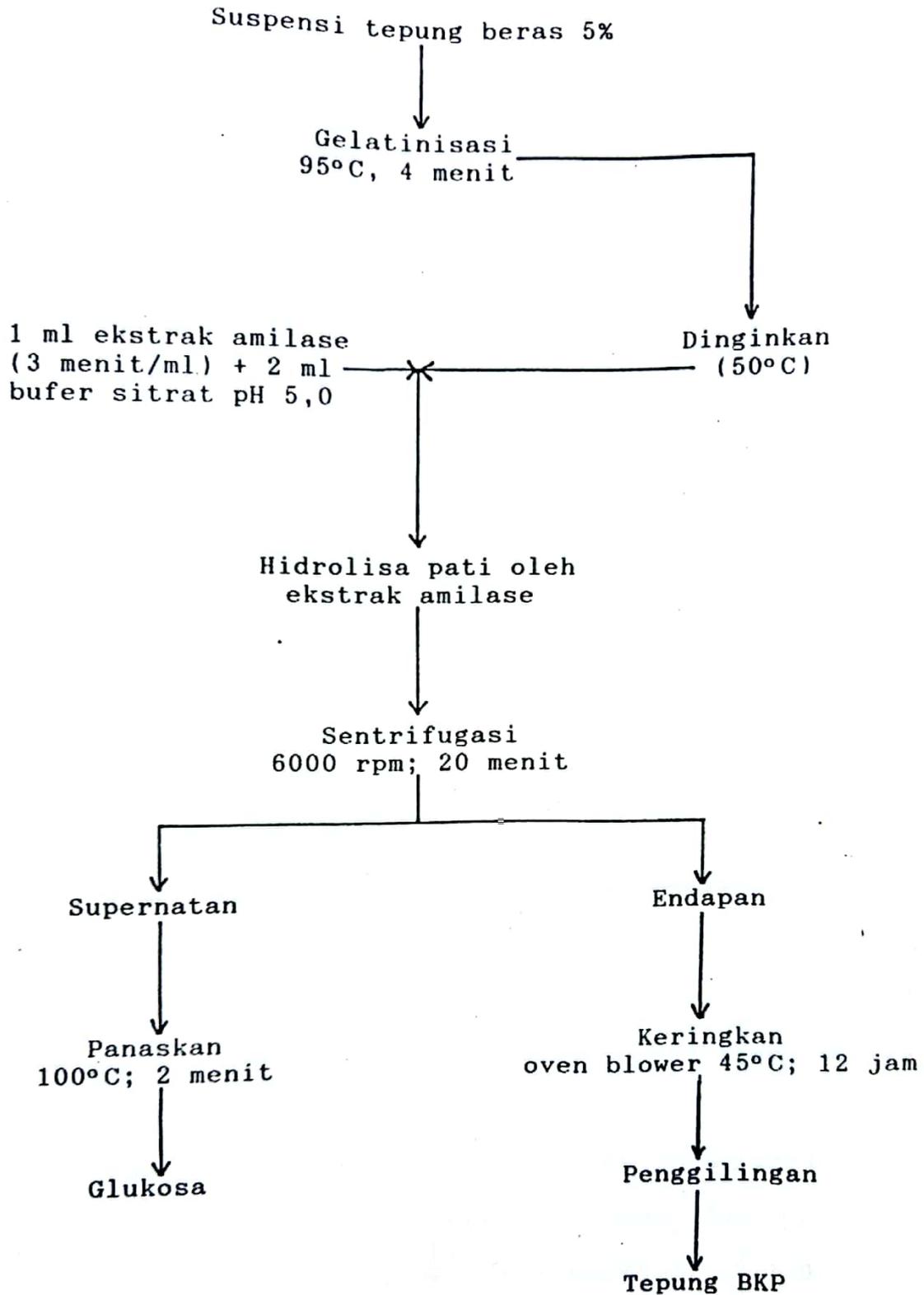
Kadar glukosa sebagai penduga kadar protein

Pada tahap ini, percobaan lebih ditekankan untuk mendapatkan data tingkat hubungan antara kadar glukosa dalam supernatan dan kadar protein dari endapan yang dihasilkan dalam proses pembuatan tepung BKP pada berbagai lama waktu hidrolisis. Dasar pemikiran yang melandasi perlunya diketahui hubungan tersebut yakni (1) asumsi bahwa peningkatan kadar protein tepung BKP dengan waktu hidrolisis tertentu adalah proporsional dengan peningkatan kadar glukosa yang dihasilkan; (2) pengukuran kadar glukosa relatif lebih mudah dan cepat daripada pengukuran kadar protein tepung; dan (3)

pengukuran kadar protein biasanya dilakukan pada akhir proses, sehingga tidak dapat dilakukan pengaturan proses sesuai dengan kadar protein yang dikehendaki. Diharapkan hubungan yang diperoleh dapat dipakai dalam proses yang lebih besar dan bersifat kontinyu.

Pembuatan tepung BKP pada tahap ini dilakukan sesuai dengan data yang diperoleh sebelumnya. Suspensi tepung beras 5 % dibuat dari 20 gram tepung beras (IR64 dan IR42) dalam 400 ml air. Gelatinisasi dilakukan pada suhu 95°C (Amilografi) selama 4 menit (Purwani, 1987). Hidrolisis dilakukan pada suhu 50°C (suhu optimum AMG) dan ditambahkan 2 ml bufer sitrat pH 5,0 (pH optimum AMG). Lama waktu hidrolisis beragam dari 0, 15, 30, 45 dan 60 menit. Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 6000 rpm selama 20 menit (Purwani, 1987). Endapan yang diperoleh dikeringkan pada oven blower 45°C selama 12 jam dan diukur kadar proteinnya, sedangkan supernatannya dipanaskan selama 2 menit di dalam air mendidih sebelum diukur kadar glukosanya. Secara skematis proses ini disajikan dalam Gambar 18.

Enzim yang digunakan pada percobaan ini adalah ekstrak basah AA-I-2 dan AA-II-1 hasil ekstraksi langsung dari substrat yang telah ditumbuhi kapang. Ekstrak AA-II-1 yang dipakai di sini tidak mengalami proses ultrafiltrasi sebagaimana AA-II-1 dalam perco-



Gambar 18. Skema pembuatan tepung BKP.

baan-percobaan sebelumnya. Aktifitas masing-masing ekstrak basah adalah 4,34 unit/ ml untuk AA-I-2 dan 6,43 unit/ml untuk AA-II-1. Kedua ekstrak ini kemudian diencerkan untuk mendapatkan aktivitas yang sama, yakni 3,0 unit/ml. Ekstrak terakhir inilah yang diaplikasikan untuk pembuatan tepung BKP di atas.

Penggunaan enzim dalam bentuk ekstrak basah ini dinilai lebih menguntungkan sebab ekstrak basah ternyata mempunyai aktivitas yang cukup tinggi, tidak memerlukan proses pengeringan dan sebagainya sehingga lebih cepat dapat diaplikasikan dan lebih sederhana. Sedang pemakaian ekstrak kering memerlukan pelarutan kembali sebelum diaplikasikan. Dengan sifat yang lebih sederhana tersebut juga membuka peluang untuk melakukan pengembangan teknologi pembuatan tepung BKP.

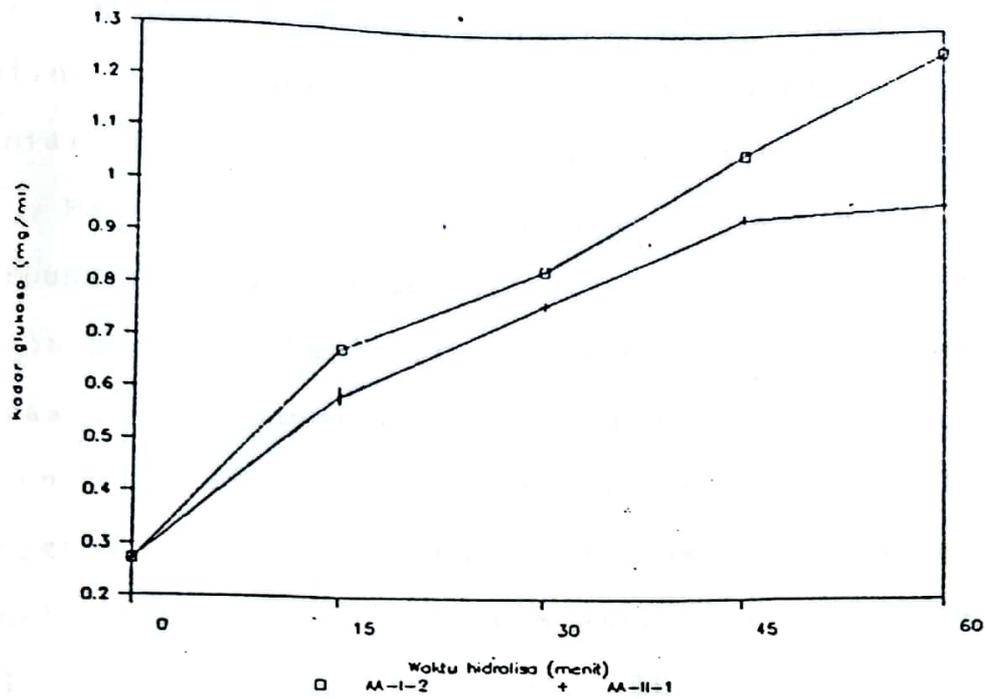
Pada Gambar 19 ditunjukkan hasil pengamatan kadar glukosa yang dihasilkan akibat kerja ekstrak AA-II-1 terhadap tepung beras IR42 pada berbagai waktu hidrolisa. Sedang Gambar 20 merupakan hasil pengamatan yang sama pada tepung beras IR64.

Proses gelatinisasi saja (waktu hidrolisa 0 menit) sebenarnya sudah dapat menghasilkan glukosa, yakni sebesar 0,270 mg/ml (pada IR42) dan 0,139 mg/ml (pada IR64). Hal ini dapat terjadi karena adanya proses pemanasan menyebabkan terjadinya proses degra-

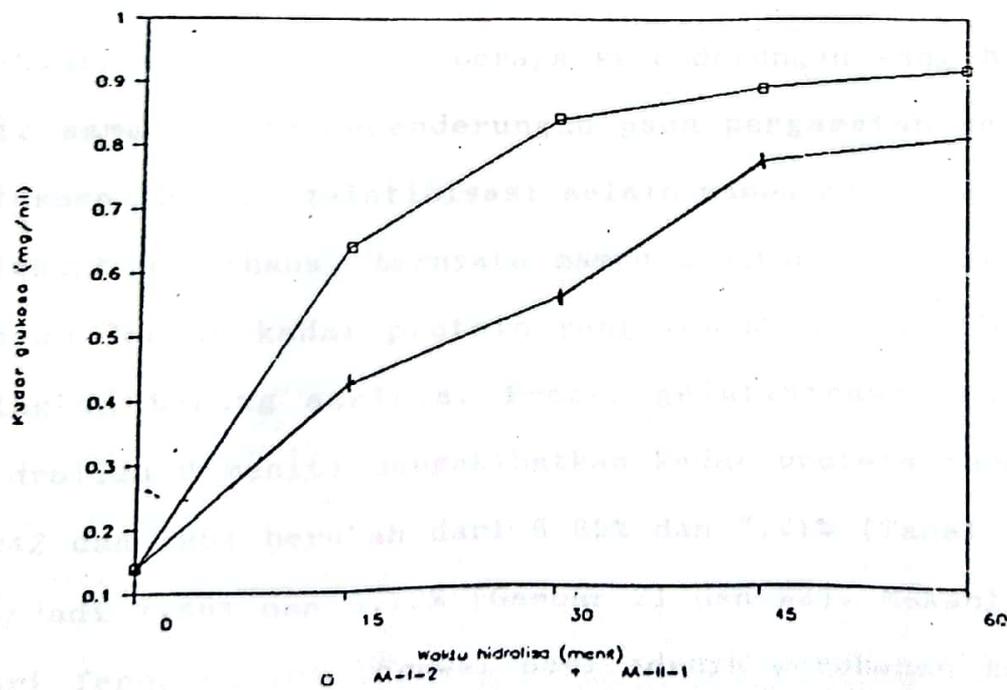
dasi dari molekul pati menjadi bentuk-bentuk yang lebih sederhana (Greenwood dan Munro, dalam Priestley, ed. 1979).

Semakin lama kesempatan diberikan kepada enzim untuk kontak dengan tepung beras, maka semakin banyak glukosa yang dihasilkan. Dari Gambar 19 dan 20 tampak kadar glukosa tersebut terus meningkat sampai menit ke 45 hidrolisis. Setelah itu ada kecenderungan kadar glukosa menjadi tetap (perbedaan peningkatannya tidak nyata), kecuali akibat kerja ekstrak AA-I-2 pada tepung beras IR42 (Gambar 19). Kecenderungan ini mungkin disebabkan oleh terpenuhinya kapasitas kerja enzim, sehingga kecepatan katalisisnya menjadi menurun.

Selanjutnya dari Gambar 19 dan 20 juga terlihat bahwa ekstrak AA-1-2 selalu menghasilkan glukosa lebih tinggi daripada AA-II-1 pada berbagai waktu hidrolisis, sehingga dapat diartikan bahwa ekstrak AA-I-2 lebih aktif daripada AA-II-1, padahal kedua ekstrak basah ini telah diencerkan sebelumnya untuk mencapai aktifitas yang sama (3 unit/ml). Hal semacam ini mungkin tidak saja dipengaruhi oleh aktivitas ekstrak basah, tetapi faktor lain seperti aktivitas spesifik atau kemurnian enzim dapat juga berpengaruh. Seperti telah dijelaskan pada Tabel 8 di depan,



Gambar 19. Kadar glukosa supernatan hasil aktivitas ekstrak amilase pada tepung IR42



Gambar 20. Kadar glukosa supernatan hasil aktivitas ekstrak amilase pada tepung IR64

ekstrak AA-II-1 memang mempunyai aktivitas AMG yang paling besar namun ekstrak AA-I-2 justru yang mempunyai aktivitas spesifik AMG yang tertinggi.

Perbedaan kadar amilosa tepung beras juga tampak berpengaruh dalam proses hidrolisis ini. Kedua ekstrak basah menghasilkan glukosa lebih tinggi pada tepung beras IR42 dibandingkan IR64. Dalam Tabel 12 telah ditunjukkan bahwa beras IR42 mengandung amilosa lebih tinggi daripada IR64. Dengan sifat amilosa yang lebih mudah didegradasi oleh enzim amilolitik, maka wajar bila kadar glukosa yang dihasilkan dari IR42 akan lebih banyak dibandingkan IR64 dalam selang waktu hidrolisis yang sama.

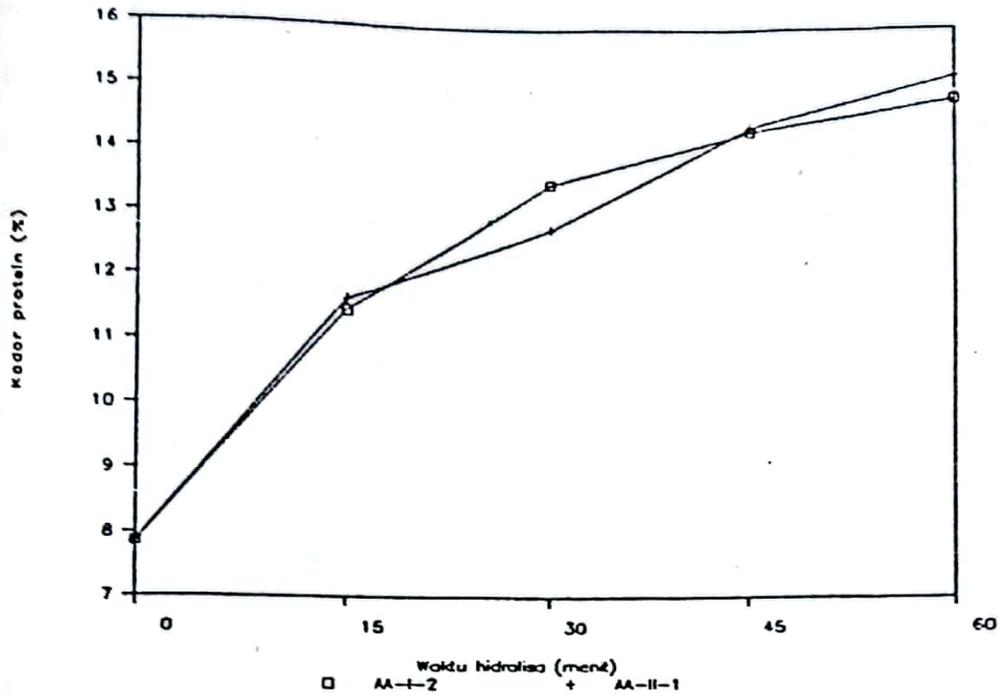
Dilihat dari kadar protein tepung BKP yang dihasilkan, terdapat beberapa kecenderungan yang hampir sama dengan kecenderungan pada pengamatan kadar glukosa. Proses gelatinisasi selain mampu menghasilkan glukosa sederhana, ternyata mampu menghasilkan tepung beras dengan kadar protein yang lebih tinggi dibandingkan tepung asalnya. Proses gelatinisasi (waktu hidrolisa 0 menit) mengakibatkan kadar protein tepung IR42 dan IR64 berubah dari 6,89% dan 7,21% (Tabel 11) menjadi 7,86% dan 9,12% (Gambar 21 dan 22). Mekanisme dari fenomena ini berawal dari adanya perubahan kom-

posisi kimia bahan terutama pati yang tergradasi oleh panas, sehingga proporsi protein terhadap komponen kimia yang lain menjadi lebih besar.

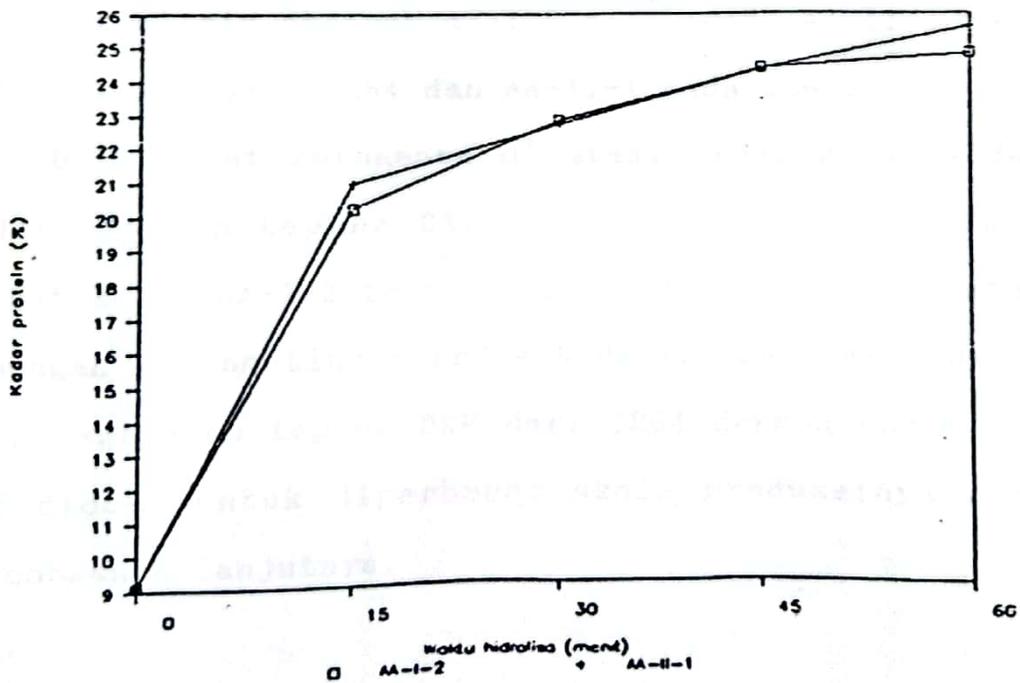
Selanjutnya perubahan ekstrak amilase dan peningkatan waktu hidrolisis menyebabkan lebih banyaknya pati yang terhidrolisis, sehingga proporsi protein menjadi semakin tinggi. Seperti halnya pada pengamatan kadar glukosa, peningkatan kadar protein tepung BKP pada awal hidrolisis terlihat sangat nyata. Namun ketika hidrolisis mencapai lebih dari 45 menit, perubahan tersebut menjadi kurang berarti. Hal ini disebabkan oleh semakin rendahnya kapasitas kerja ekstrak amilase seiring dengan semakin meningkatnya waktu hidrolisa.

Pada satu jenis beras tertentu (IR42 dan IR62), kedua ekstrak amilase tampak memiliki pola kerja yang sama yakni kadar protein tepung BKP yang dihasilkan dari masing-masing ekstrak amilase tidak terlalu berbeda pada setiap waktu hidrolisa tertentu. Hal ini sesuai dengan aktivitas kedua ekstrak amilase yang terlebih dahulu telah disamakan sebelum diaplikasikan.

Meskipun kedua ekstrak amilase mempunyai pola kerja yang sama, namun nilai kadar protein tepung BKP dari IR42 ternyata selalu lebih rendah daripada tepung



Gambar 21. Kadar protein tepung BKP hasil aktivitas ekstrak amilase pada tepung IR42



Gambar 22. Kadar protein tepung BKP hasil aktivitas ekstrak amilase pada tepung IR64

BKP dari IR64 pada setiap waktu hidrolisa yang sama (Gambar 21 dibandingkan Gambar 22). Perbedaan ini disebabkan oleh perbedaan komposisi kimia awal dari masing-masing varietas. Pada Tabel 11 tampak bahwa kadar protein IR42 lebih rendah daripada IR64.

Adanya berbagai kecenderungan yang sama pada pengamatan kadar glukosa maupun protein tepung BKP, maka pendugaan kadar protein tepung BKP dapat diduga dengan mengukur kadar glukosa dalam supernatan yang dihasilkan. Pengamatan dengan regresi linear menunjukkan adanya keamatan hubungan antara kadar glukosa dan kadar protein dengan tingkat yang beragam. Gambar 23, 24, 25 dan 26 berturut menunjukkan hubungan kadar glukosa ( $y$ ) dengan kadar protein ( $x$ ) yang diperoleh dari hidrolisis ekstrak AA-I-2 pada IR42, AA-II-1 pada IR42, AA-I-2 pada IR64 dan AA-II-1 pada IR64.

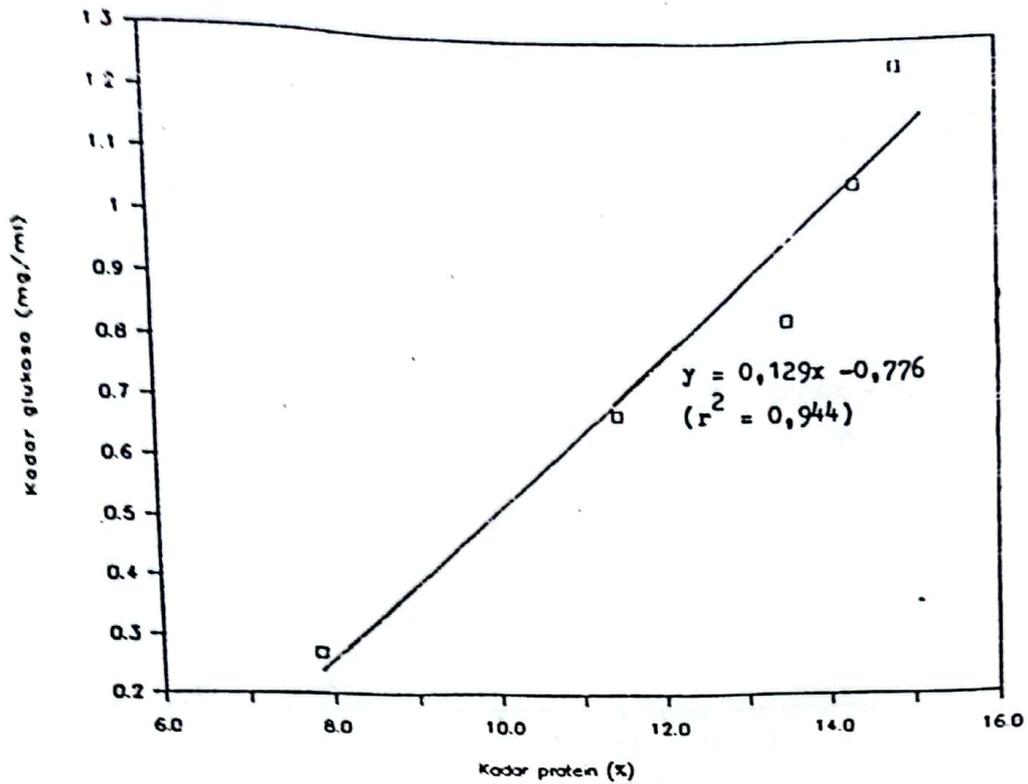
Dari empat persamaan di atas, kadar glukosa dan kadar protein tepung BKP yang diperoleh dari IR64 akibat kerja AA-I-2 ternyata memiliki tingkat keamatan hubungan paling tinggi ( $r^2 = 0,994$ ). Atas dasar hasil ini, pembuatan tepung BKP dari IR64 dengan enzim AA-I-2 dicoba untuk diperbesar skala produksinya pada percobaan selanjutnya.

### Peningkatan skala produksi

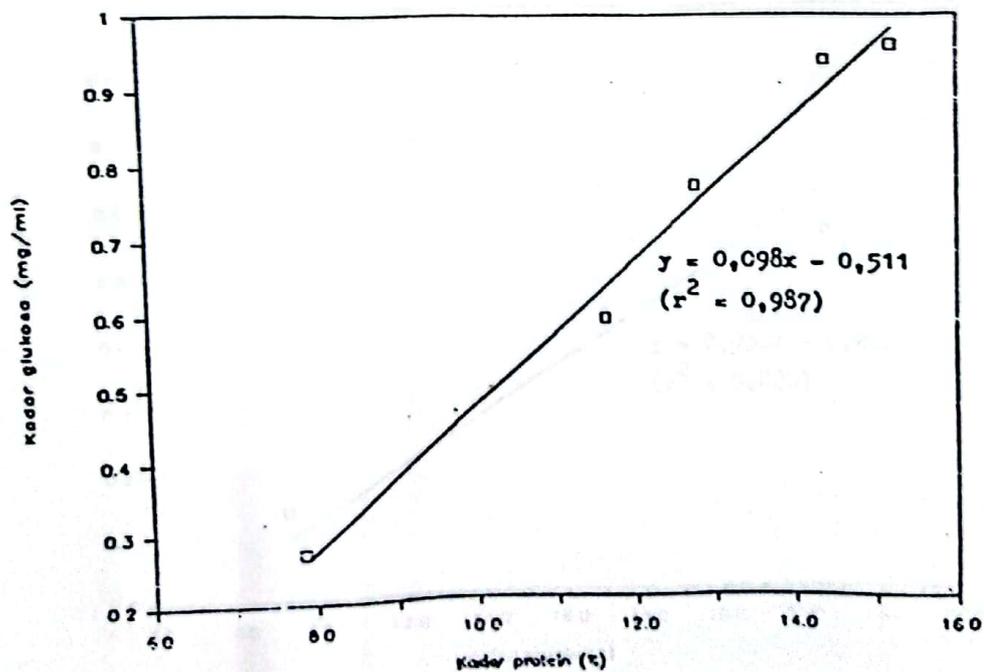
Pada tahap ini pembuatan tepung BKP dari IR64 dengan enzim AA-1-2 dilakukan dengan memperbesar ukuran skala laboratorium tanpa mengubah perbandingan dari setiap parameter. Sebagai contoh pada Gambar 18 suspensi tepung 5% dibuat dari 20 gram tepung beras dalam 400 ml air, sedangkan pada percobaan ini suspensi 5% tersebut diperoleh dari 150 gram tepung dalam 3 liter air. Tujuan percobaan ini adalah untuk menguji coba pembuatan tepung BKP dalam skala yang lebih besar. Hal ini dilakukan mengingat seluruh penelitian yang ada (Hansen et al., 1981; Hartanto, 1987; Purwani, 1987 dan Susetyono, 1989) masih membahas dalam skala kecil.

Untuk memperoleh hasil yang sama seperti pada produksi skala kecil, proses "scaling up" tampaknya tidak cukup hanya dengan meningkatkan ukurannya saja. Hal ini ditunjukkan dengan adanya hasil yang berbeda. Pada percobaan skala kecil, dengan waktu hidrolisis 30 menit akan dihasilkan tepung BKP dengan kadar protein 20,18%, namun pada percobaan skala yang lebih besar ini diperoleh tepung BKP berkadar protein 15,35%.

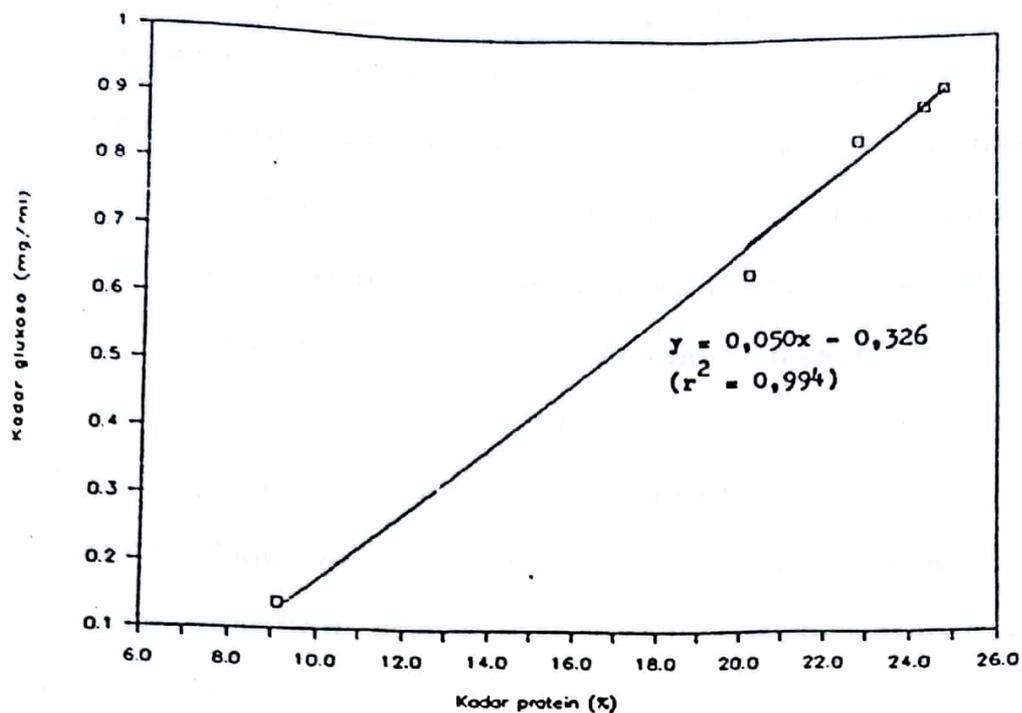
Perbedaan hasil ini terutama disebabkan oleh masalah teknis pelaksanaan dalam produksi tepung BKP. Dengan peralatan yang tersedia proses hidrolisis dari satu formula skala besar ini terpaksa dibagi dalam 2



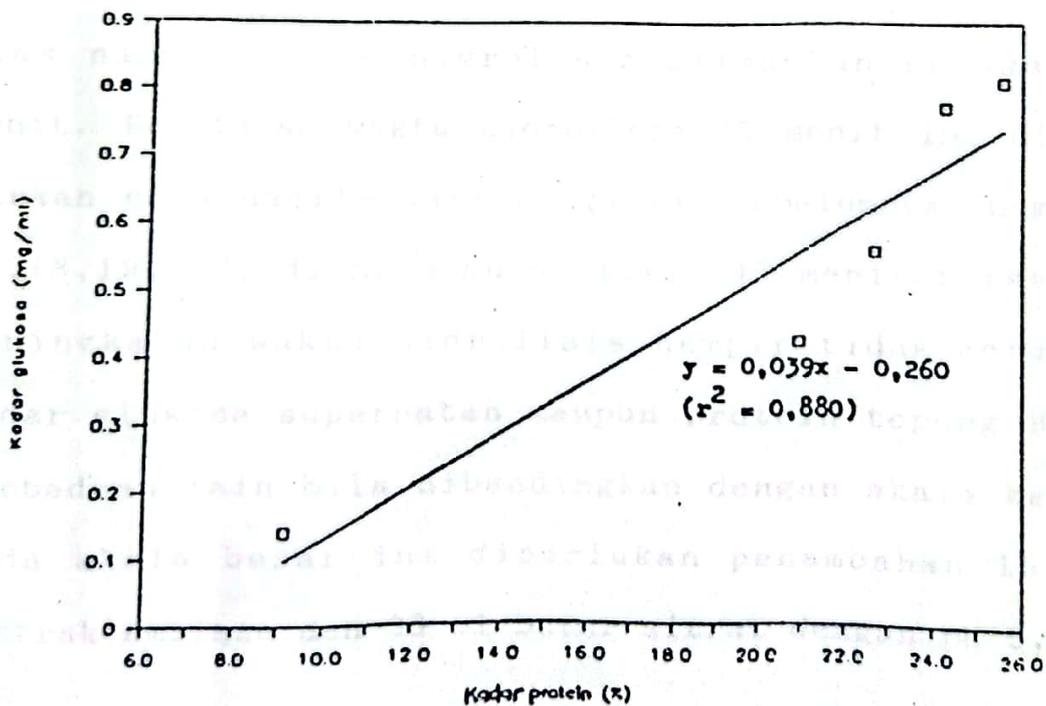
Gambar 23. Kurva hubungan kadar protein dan glukosa hasil aktivitas AA-I-2 pada tepung IR42



Gambar 24. Kurva hubungan kadar protein dan glukosa hasil aktivitas AA-II-1 pada tepung IR42



Gambar 25. Kurva hubungan kadar protein dan glukosa hasil aktivitas AA-I-2 pada tepung IR64



Gambar 26. Kurva hubungan kadar protein dan glukosa hasil aktivitas AA-II-1 pada tepung IR64

wadah mengingat kapasitas "waterbath" yang tak mampu menampung 3 liter gel beras. Selain itu proses sentrifugasi juga masih menjadi masalah. Proses sentrifugasi pada skala besar menghasilkan supernatan yang kurang jernih dibandingkan pada skala kecil. Kejernihan supernatan ini memang mungkin dapat dipengaruhi oleh kerja enzim yang rendah, namun juga tak tertutup kemungkinan oleh proses sentrifugasi yang kurang sempurna. Dengan hasil seperti di atas, maka untuk mendapatkan kecenderungan yang sama dengan skala kecil, peningkatan skala produksi masih memerlukan penelitian tersendiri.

Selanjutnya untuk keperluan pengujian sifat fisik, kimia dan sifat fungsional tepung BKP, pada percobaan ini dibuat tepung BKP dengan cara seperti di atas namun proses hidrolisis dilakukan selama 45 menit. Penetapan waktu hidrolisis 45 menit ini didasarkan pada hasil-hasil pengujian sebelumnya (Gambar 17,18,19,20), di mana mulai titik 45 menit tersebut peningkatan waktu hidrolisis hampir tidak merubah kadar glukosa supernatan maupun protein tepung BKP. Perbedaan lain bila dibandingkan dengan skala kecil pada skala besar ini diperlukan penambahan 15 ml ekstrak amilase dan 30 ml bufer sitrat dengan pH 5,0.

Dengan proses seperti di atas, dihasilkan tepung BKP dengan rendemen rata-rata 29,30 persen. Angka ini tidak berbeda jauh dengan hasil penelitian yang lain. Hansen et.al (1981) memperoleh rendemen tepung sebesar 31 persen, sedangkan Purwani (1987) dan Susetyono (1989) berturut-turut mendapatkan kisaran rendemen antara 25-35 persen dan 27,40-33,19 persen.

Namun untuk rendemen protein, percobaan ini menghasilkan angka yang lebih rendah, yakni 68,86 persen. Percobaan-percobaan lain mampu menghasilkan rendemen protein tinggi, yaitu 74,53-80,59 persen (Susetyono, 1989); 93,4 persen (Hansen et al., 1981); dan 99 persen (Chang et al., 1986), sedangkan Purwani (1989) menghasilkan kisaran 65,05-89,44 persen.

Lebih rendahnya rendemen protein yang dihasilkan pada percobaan ini mungkin disebabkan oleh perbedaan skala produksi tepung BKP. Peneliti-peneliti tersebut di atas umumnya menggunakan suspensi tepung beras yang dibuat dari 20 gram tepung beras dalam 400 ml air, sedangkan pada percobaan ini suspensi tersebut dibuat dari 150 gram tepung dalam 3 liter air. Kemungkinan lain adalah aktivitas protease dalam amilase yang digunakan meskipun hal ini belum dapat dibuktikan.

#### D. SIFAT FISIK, KIMIA, FUNGSIONAL DAN APLIKASI TEPUNG BKP

Tepung BKP yang dihasilkan pada proses skala besar di atas selanjutnya dievaluasi sifat fisik, kimia maupun fungsionalnya. Evaluasi yang sama juga dilakukan terhadap tepung beras IR64 dan tepung bubur bayi komersial ( dalam hal ini tepung beras merah PROMINA). Dengan demikian dapat ditunjukkan kelebihan maupun kekurangan tepung BKP dibandingkan tepung beras biasa maupun tepung komersial.

##### 1. Sifat fisik

###### Derajat putih

Hansen et al. (1981) menyatakan bahwa tepung BKP berwarna putih krem menyerupai warna susu bubuk. Namun pada penelitian ini dihasilkan tepung BKP yang berwarna suram. Perbedaan ini disebabkan penggunaan alat pengering yang berbeda. Hansen et al. (1981) menggunakan pengering beku, sedang di sini digunakan oven blower. Hartanto (1987) dan Purwani (1987) juga mendapatkan warna suram dengan alat pengering vakum. Tepung bubur bayi komersial ternyata mempunyai tingkat keputihan yang paling rendah (Tabel 13). Hal ini lebih banyak disebabkan oleh warna bahan dasarnya seperti beras merah dan kacang merah.

Tabel 13. Perbandingan sifat fisik tepung BKP

	Keputihan (%)	Densitas (g/l)
Tepung komersial	27,0 c	327,68 c
Tepung BKP	47,2 b	673,05 b
Tepung IR64	69,5 a	694,98 a

#### Densitas kamba

Pada Tabel 13 juga dapat dilihat bahwa tepung BKP ternyata memiliki densitas kamba yang lebih besar daripada tepung bubur bayi komersial dan lebih kecil dibandingkan tepung beras IR64. Perbedaan nilai densitas kamba tersebut tampak sangat nyata pada tepung bubur bayi komersial dibandingkan tepung BKP maupun tepung IR64. Berbagai faktor dapat mempengaruhi perbedaan densitas kamba suatu bahan. Faktor tersebut antara lain ukuran, bentuk geometri dan sifat partikel, serta sifat fisikokimia bahan.

Di antara faktor-faktor tersebut, ukuran partikel tampaknya merupakan penyebab utama timbulnya perbedaan yang menyolok antara tepung bubur bayi komersial dengan dua jenis tepung lainnya di atas. Proses pengkabutan yang dilakukan di akhir tahap pengeringan

(spray drying) untuk mendapatkan sifat instant pada pembuatan tepung komersial, akan menyebabkan terjadinya aglomerasi partikel tepung sehingga terbentuk partikel yang bergerombol dan berukuran lebih besar.

Di lain pihak tepung BKP cukup digiling dengan penggiling tepung beras biasa. Perbedaan densitas kamba antara tepung BKP dengan tepung beras IR64 disebabkan oleh perbedaan sebaran ukuran partikel tepungnya saja. Struktur bahan yang lebih lunak pada beras IR64 menghasilkan tepung yang lebih lembut dibandingkan endapan BKP dengan struktur gel kering yang lebih keras.

Semakin besar ukuran partikel tepung akan semakin banyak rongga yang dibentuk dalam suatu wadah (volume) tertentu, sehingga semakin kecil densitas kambanya. Dengan partikel yang teraglomerasi dan berukuran lebih besar, maka wajarlah bila tepung bubur bayi komersial memiliki densitas kamba paling rendah.

Nilai densitas kamba yang cukup besar pada tepung BKP juga mempunyai keuntungan tersendiri. Sebab pemberian bubur BKP dengan volume yang sama akan lebih banyak memberikan zat gizi dibandingkan pemberian bubur bayi komersial, dengan asumsi komposisi kedua tepung beras relatif sama. Demikian halnya bila dibandingkan dengan tepung beras biasa. Meskipun dalam jum-

lah yang sama telah sama mengenyangkan namun jumlah protein yang dikonsumsi dari tepung BKP akan lebih banyak.

#### Viskositas bubur

Seperti halnya yang dilaporkan Hansen et al (1981), tepung BKP yang dihasilkan ternyata bersifat instant. Dengan penambahan air panas ke dalamnya diikuti dengan pengadukan akan segera terbentuk bubur. Sifat ini diperoleh dari adanya sifat gelatinisasi dalam prosedur pembuatannya. Namun jumlah air yang harus ditambahkan agar bubur sesuai untuk konsumsi bayi, masih perlu ditentukan.

Tepung bubur bayi komersial (PROMINA) menetapkan bahwa konsentrasi bubur 25% (25 gram tepung ditambah 100 ml air hangat) adalah konsentrasi yang tepat untuk mendapatkan bubur dengan kekentalan yang memenuhi syarat pengujian. Penetapan ini tentunya telah mempertimbangkan faktor kemudahan dalam penyajian, sifat gigi, pencernaan konsumen dan sebagainya.

Tabel 14 merangkum rata-rata hasil pengukuran kekentalan bubur dari tepung bubur bayi komersial dan tepung BKP pada berbagai konsentrasi. Dari Tabel ini terlihat bahwa bubur BKP dengan konsentrasi 26% mempunyai kekentalan yang mendekati kekentalan bubur bayi

komersial 25%. Oleh sebab itu penyajian tepung BKP sebaiknya dilakukan dengan mencampur 26 gram tepung dengan 100 ml air panas.

Tabel 14. Kekentalan rata-rata bubur bayi komersial dan bubur BKP pada berbagai konsentrasi.

Perlakuan	Kekentalan (cp)
Tepung komersial	23.750 b
Tepung BKP - 25%	17.250 c
26%	24.350 b
27,5%	50.000 a

## 2. Sifat kimia

### Protein

Pengamatan terhadap sifat kimia menunjukkan bahwa tepung BKP mempunyai kadar protein yang hampir 3 kali lebih besar dibandingkan tepung beras asalnya (IR64) (Tabel 15). Di samping itu tepung BKP ternyata mengandung karbohidrat yang lebih rendah. Dua gejala ini sekali lagi membuktikan adanya aktivitas enzim perombak pati dalam proses pembuatan tepung BKP.

Dari Tabel 15 terlihat bahwa tepung BKP mengandung protein lebih tinggi dibandingkan tepung bubur bayi komersial. Dengan demikian untuk tujuan sebagai makanan bayi, proses pembuatan tepung BKP sebenarnya dapat dipersingkat sampai diperoleh kadar protein sekitar 15% saja. Pengurangan waktu hidrolisis ini selain menghemat waktu dan tenaga, juga meningkatkan rendemen tepungnya.

Tabel 15. Komposisi kimia tepung bubur bayi komersial tepung BKP dan tepung IR64 (berat kering)

	Komersial	BKP	IR64
Protein (%)	16,00	22,52	8,29
Lemak (%)	1,12	0,13	0,44
Abu (%)	2,64	1,11	0,37
Karbohidrat *(%)	80,24	76,24	90,90

\* ditentukan dengan pengurangan

#### Lemak

Tepung BKP ternyata mempunyai kadar lemak yang paling rendah. Dibandingkan tepung beras asalnya (IR64), tampak bahwa proses pembuatan tepung BKP dapat menurunkan kadar lemak beras. Gejala yang sama juga terjadi pada penelitian lain. Susetyono (1989) mendapatkan penurunan kadar lemak dari 0,61 % menjadi

0,23% pada tepung BKP. Penyebabnya belum diketahui secara pasti, namun dapat diduga akibat hilangnya partikel lemak akibat proses gelatinisasi dan sentrifugasi selama pembuatan tepung BKP.

Sebaliknya tepung bubur bayi komersial mengandung lemak yang cukup tinggi. Hal ini disebabkan oleh adanya penambahan minyak nabati, kacang merah, kedelai dan susu skim selama proses produksi. Selain meningkatkan lemak, bahan-bahan inilah yang menjadi sumber protein dalam tepung bubur bayi komersial tersebut.

Menilik adanya kemungkinan pengaturan kadar protein tepung BKP dan rendahnya lemak yang dikandung diakitkan dengan penerimaan konsumen, (palatabilitas), maka pada pengembangan selanjutnya dapat dibuat berbagai tepung BKP dengan spesifikasi yang berbeda. Penggunaan bahan lain seperti kacang merah, minyak nabati dan sebagainya akan meningkatkan kadar lemak sekaligus protein tepung. Peningkatan kadar protein akibat penggunaan bahan tambahan tersebut tidak mengurangi arti peningkatan protein akibat proses pembuatan tepung BKP. Alasannya adalah proses pembuatan tepung BKP tidak hanya berdampak pada peningkatan kadar protein, tetapi juga menghasilkan sirup glukosa, maltosa dan sebagainya yang mempunyai nilai tambah tersendiri.

### 3. Sifat fungsional, daya cerna protein dan aplikasi tepung BKP

Protein merupakan komponen kimia bahan pangan yang sangat berpengaruh dalam pengolahan makanan karena sifat fungsionalnya yang berbeda-beda. Oleh karena itu sifat fungsional protein ini banyak diteliti dan dikembangkan terutama dalam industri pangan dan pakan.

Kinsella (1976) menyatakan beberapa sifat fungsional protein yang penting, antara lain daya serap air, daya serap minyak, daya pembentukan gel, daya pembentukan buih dan sebagainya. Sifat-sifat inilah yang diamati pada percobaan ini serta dilengkapi dengan pengamatan daya cerna protein sebagai salah satu sifat gizi.

Sifat fungsional protein sangat dipengaruhi oleh komposisi kimia bahan, komposisi asam amino, ukuran molekul, struktur dan konfirmasi partikel serta ikatan-ikatan yang ada (Pour El, 1981). Selain itu berbagai perlakuan pengolahan juga dapat mempengaruhi sifat fungsional tersebut, seperti bahan dasar, varietas, ekstraksi, suhu, pengeringan, kekuatan ion, kemurnian dan penyimpanan (Pour El, 1981).

### Daya serap air

Hasil pengamatan terhadap sifat penyerapan air menunjukkan bahwa daya serap tertinggi dimiliki oleh tepung bubur bayi komersial (520%) diikuti tepung BKP (420%) dan tepung IR64 (80%)(Tabel 16). Dengan hasil ini tampak bahwa proses pembuatan tepung BKP merubah sifat penyerapan air bahan dasarnya.

Berbagai faktor dapat mempengaruhi daya serap air suatu bahan. Faktor-faktor tersebut antara lain komposisi bahan, sifat partikel bahan seperti porositas, polaritas dan sebagainya yang secara bersama-sama mempengaruhi sifat penyerapan air tersebut.

Sifat penyerapan air suatu jenis bahan mungkin lebih banyak dipengaruhi oleh suatu faktor tertentu, sedangkan bahan yang lain lebih ditentukan oleh faktor yang lain. Wolf dan Cowan (1975) mendapatkan bahwa daya serap air pada tepung kedelai lebih dipengaruhi oleh kadar proteinnya. Namun pada penelitian ini faktor-faktor kadar air, struktur dan konformasi partikel tepung tampak lebih berperan.

Tepung bubur bayi komersial sebenarnya mengandung air yang jauh lebih rendah dibandingkan kadar air tepung BKP (1,67% berbanding 6,50%). Dengan keadaan yang lebih kering tersebut wajarlah tepung bubur bayi komersial mampu menyerap air lebih banyak. Struktur partikel tepung komersial yang "porous" juga memberi

peluang kepada air untuk lebih banyak mengisi rongga-rongga. Sebaliknya partikel tepung BKP yang lebih keras akan menghambat air untuk masuk ke dalamnya.

Meskipun demikian, bila dibandingkan dengan tepung beras asalnya, tepung BKP masih mempunyai daya serap air yang jauh lebih tinggi (5 kali lebih besar). Hal ini disebabkan oleh adanya proses gelatinisasi dalam pembuatannya, pati yang telah tergelatinisasi cenderung menyerap air lebih banyak daripada pati mentah seperti yang terdapat pada tepung beras biasa.

Tabel 16. Daya serap air, minyak, pembentukan gel dan daya cerna protein pada berbagai tepung.

	Serap air (%)	Serap minyak (%)	Gel* (%)	Daya cerna** (%)
Tepung komersial	520 a	250 a	16	86,01 b
Tepung BKP	420 b	113,6 b	6	87,82 b
Tepung IR64	80 c	90,9 c	4	90,53 a

\*) Konsentrasi terendah pembentukan gel

\*\*\*) in vitro (multi enzim)

### **Daya serap minyak**

Hasil dengan kecenderungan yang sama juga terjadi pada pengamatan daya serap minyak (Tabel 16). Dengan hasil semacam ini, permasalahan yang timbul tidak berbeda dengan daya serap air. Seperti halnya pada sifat penyerapan air, daya serap minyak juga dipengaruhi oleh berbagai faktor yang sama. Mekanisme kerja berbagai faktor tersebut sangat kompleks sehingga memerlukan kajian khusus untuk dapat menetapkan faktor mana yang paling dominan.

Sathe et al. (1982) menyebutkan bahwa daya serap air lebih banyak ditentukan oleh banyaknya asam amino polar, sedang daya serap minyak ditentukan oleh kandungan asam amino non polar. Sebagai contoh, daya serap minyak biji bunga matahari lebih besar dibandingkan kedelai karena kandungan asam amino non polar biji bunga matahari lebih besar daripada kedelai. Meskipun demikian pernyataan ini belum tentu berlaku pada kasus yang lain.

### **Pembentukan gel dan daya buih**

Pembentukan gel yang stabil dapat terjadi oleh adanya interaksi antar protein dan pemberian panas. Namun gel juga dapat terbentuk akibat adanya proses gelatinisasi pati. Pembentukan gel dengan gejala per-

tama dapat dilihat terutama pada konsentrat maupun isolat protein serta pada pembuatan "Kamaboko" dari daging ikan.

Untuk bahan yang mengandung pati tinggi, seperti tepung IR64, terjadinya gel pada konsentrasi 4% (Tabel 16) tersebut dapat dimengerti. Pemanasan terhadap suspensi tepung ini akan menyebabkan terjadinya gelatinisasi pada pati beras.

Sebaliknya pada tepung bubur bayi komersial, meskipun kadar karbohidratnya cukup tinggi ternyata memerlukan konsentrasi suspensi yang paling besar (16%). Hal ini disebabkan oleh adanya kemungkinan bahwa sebagian besar karbohidrat yang dikandung sudah tidak dapat membentuk gel seperti dekstrin, gula-gula sederhana dan jenis karbohidrat lain. Perbedaan jenis protein dari susu skim, kacang merah, kedelai dan beras merah yang terdapat dalam tepung komersial mungkin juga merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi sifat pembentukan gel tersebut.

Sedang pengamatan pada tepung BKP ternyata mendapatkan angka yang lebih mendekati angka tepung IR64. Proses gelatinisasi yang dilakukan pada pembuatan tepung BKP tampaknya membantu tepung BKP untuk kembali membentuk gel.

Pengamatan terhadap sifat daya buih menunjukkan bahwa ketiga jenis tepung yang diamati tidak membentuk buih. Pembentukan buih merupakan sifat fungsional protein akibat adanya interaksi protein berbentuk serat (fibrous) dengan air. Dengan adanya pengocokan dapat menyebabkan udara terperangkap dalam struktur jala yang dibentuk protein dan air tersebut.

Telur mengandung ovomucin, salah satu protein telur yang bersifat fibrous. Oleh sebab itu pengocokan pada telur menyebabkan terbentuknya buih. Sebaliknya beras dan produk-produknya lebih banyak mengandung protein globular. Faktor inilah yang menyebabkan tidak terbentuknya buih seperti di atas.

#### Daya cerna protein

Proses pengolahan tampaknya dapat menurunkan daya cerna protein. Tabel 16 menunjukkan bahwa protein tepung beras IR64 cenderung lebih mudah dicerna daripada protein tepung BKP maupun tepung bubur bayi komersial. Penurunan daya cerna protein akibat proses pembuatan tepung BKP juga terjadi pada penelitian lain. Purwani (1987) mencatat penurunan dari 73-79 persen pada tepung beras menjadi 54-66 persen pada tepung BKP. Demikian halnya Susetyono (1989) melaporkan perubahan dari 84,60 persen menjadi 56,38 persen.

Damardjati (1983) juga mendapatkan bahwa proses pemasakan beras menjadi nasi dapat menurunkan daya cerna proteinnya. Disebutkan pula bahwa mekanisme penurunan daya cerna protein ini belum diketahui dengan pasti. Namun demikian dilaporkan lebih lanjut bahwa penurunan tersebut disebabkan oleh adanya interaksi lipid-pati-protein selama proses gelatinisasi, sehingga terbentuk kompleks yang sulit dicerna oleh enzim (Damardjati, 1983).

#### Aplikasi tepung BKP

Sebagai tepung yang bersifat instant, tepung BKP dapat digunakan sebagai bahan pembuat bubur bayi. Penambahan 100 ml air panas ke dalam 26 g tepung BKP menghasilkan bubur bayi yang siap dikonsumsi.

Mengingat sifat penyerapan air dan minyaknya yang cukup tinggi, tepung BKP dapat digunakan sebagai bahan dalam pengolahan makanan yang menggunakan air maupun minyak. Tepung BKP juga dapat berfungsi sebagai bahan pembuat pudding dan berbagai kue basah mengingat sifatnya yang mudah membentuk gel. Namun tepung BKP tidak tepat sebagai bahan pengembang, "whipping" dan sebagainya mengingat ketidak-mampuannya membentuk buih.

Sebagai produk yang dihasilkan akibat penambahan ekstrak yang berasal dari kapang *Aspergillus*, tepung BKP sering dipertanyakan segi keamanan pangannya. Hal ini berhubungan dengan kemampuan *Aspergillus* dalam memproduksi aflatoksin.

Pertanyaan di atas dapat dijelaskan sebagai berikut. Kapang yang digunakan sebagai sumber ekstrak amilase memang juga dapat menghasilkan aflatoksin. Namun kondisi yang diterapkan untuk produksi amilase tampaknya kurang sesuai untuk produksi aflatoksin, sehingga lebih banyak amilase daripada aflatoksin yang terdapat dalam ekstraknya.

Penggunaan ekstrak amilase pada pembuatan tepung BKP juga relatif kecil (15 ml ekstrak dalam 3 liter suspensi beras). Dengan demikian keberadaan aflatoksin dalam tepung BKP tampaknya relatif sangat kecil. Selain itu konsumsi tepung BKP yang dilakukan oleh beberapa orang di laboratorium, ternyata tidak menunjukkan adanya gejala keracunan.

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### A. KESIMPULAN

1. Kapang *Aspergillus awamori* ternyata lebih berpotensi dalam menghasilkan amilase dengan aktivitas maupun kemurnian yang lebih tinggi dibandingkan kapang *Aspergillus niger*. Namun demikian tinggi rendahnya aktivitas maupun kemurnian amilase tersebut sangat dipengaruhi oleh komposisi larutan mineral dan cara ekstraksinya.
2. Penambahan larutan mineral yang terdiri dari 4,7%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 0,1%  $\text{CaCl}_2$ ; 0,02%  $\text{KCl}$ ; dan 0,02%  $\text{MgCl}_2$  ke dalam dedak cenderung meningkatkan kemurnian amilase yang dihasilkan.
3. Ekstraksi amilase sebaiknya dilakukan dengan menambahkan 5 bagian air untuk 1 bagian bobot massa yang dihasilkan pada fermentasi media dedak, dan ditambahkan pula 1 ml larutan  $\text{CaCl}_2$  20% untuk setiap 40 ml ekstrak yang diperoleh.

4. Ekstrak amilase yang diperoleh pada penelitian ini dapat bersifat sebagai  $\alpha$ -amilase maupun amiloglukosidase (AMG). Namun demikian sifat sebagai AMG tampak lebih dominan. Sebagai  $\alpha$ -amilase kedua jenis amilase (AA-1-2 dan AA-11-1) mempunyai pH aktivitas optimum 5,2 dan suhu optimum 60°C, sedangkan sebagai AMG, pH optimumnya adalah 5,0 dengan suhu optimum 50°C.
5. Cairan amilase hasil ekstraksi yang diperoleh pada penelitian ini mempunyai aktivitas di atas 3 unit/ml. Cairan amilase ini dapat langsung digunakan dalam proses pembuatan tepung beras kaya protein (tepung BKP). Dengan demikian untuk tujuan pembuatan tepung BKP, proses pengeringan terhadap amilase tidak perlu dilakukan.
6. Dalam pembuatan tepung BKP dari 150 g tepung beras dalam 3 liter air, gelatinisasi dapat dilakukan selama 4 menit pada suhu 95°C. Kemudian ditambahkan cairan amilase sebanyak 15 ml dengan aktivitas 3 unit/ml dan hidrolisa dilakukan selama 45 menit pada suhu dan pH optimum amilase yang bersangkutan (50°C dan pH 5,0). Pada penelitian ini, proses di atas dapat menghasilkan tepung BKP dengan rendemen padatan 29,30 persen dan

rendemen protein 68,86 persen. Tepung BKP ini mengandung protein sebanyak 3 kali lebih besar dibandingkan kadar protein tepung asalnya (IR64).

7. Penggunaan tepung BKP sebagai bubur bayi sebaiknya disajikan dengan cara menambahkan 100 ml air panas ke dalam 26 g tepung BKP dan diaduk sehingga terbentuk bubur dengan kekentalan yang baik
8. Proses pembuatan tepung BKP mampu merubah sifat penyerapan air bahan dari 80% (pada tepung beras biasa) menjadi 420% (pada tepung BKP). Selain itu juga merubah sifat penyerapan air dari 90,9% (tepung beras) menjadi 113,6% (tepung BKP) dan terjadi sedikit perubahan pada sifat pembentukan gel (4% berbanding 6%).

## B. S A R A N

1. Amilase yang dihasilkan ternyata mengandung beberapa jenis protein. Karena amilase ini diperoleh dari *A. awamori* dan mengingat adanya 3 jenis AMG yang dapat dihasilkan oleh kapang tersebut, maka perlu dilakukan pengamatan lanjut untuk menentukan jenis protein (enzim) yang dapat merombak pati mentah. Ditemukannya enzim perombak pati mentah ini dapat mengurangi jumlah

energi yang biasa digunakan dalam proses hidrolisis biasa karena dengan enzim ini tidak diperlukan proses gelatinisasi sebelum tepung beras dihidrolisis.

2. Pembuatan tepung BKP dengan skala yang lebih besar perlu terus diteliti terutama dalam hal perancangan alat dan proses. Lama waktu gelatinisasi dan hidrolisa perlu ditentukan kembali pada proses skala besar ini. Tahap sentrifugasi mungkin perlu dilengkapi dengan tahap pencucian. Tahap ini dimaksudkan agar endapan bebas dari gula sederhana dan reaksi pencoklatan dapat dihindari dan diperoleh tepung BKP dengan warna yang lebih putih. Pada skala ini juga perlu dikembangkan metode prakiraan kadar protein dengan parameter lain seperti kadar glukosa, maltosa dan sebagainya.
3. Proses pembuatan tepung BKP sebaiknya diatur agar menghasilkan produk dengan kadar protein di bawah 20 persen. Untuk memenuhi rekomendasi FAO, WHO dan UNICEF bahwa makanan sapihan minimal mengandung 20 persen protein, dapat dipenuhi dari bahan lain seperti susu skim, kacang merah dan sebagainya. Dengan cara ini dapat diperoleh beberapa keuntungan, antara lain rendemen padatan menjadi lebih tinggi, aspek gizi tetap terpenuhi dan dapat diperoleh produk dengan komposisi kimia yang seimbang.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, S., A. Halim dan S.T. Amidarmo. 1985 Limbah pertanian tanaman padi. In. F.G. Winarno, A.F.S. Boediman, T. Silitonga, B. Soewardi (eds.). Limbah Pertanian. Kantor Menteri Muda Urusan Peningkatan Produksi Pangan. Jakarta.
- A.O.A.C. 1984. Official Methods Of Analysis. Assoc. Official Analytical Chemists. 14th ed. Washington, D.C.
- Aunstrup, K. 1979. Production, isolation and economic of extracellular enzymes. In. L.B. Wingard, E.K. Kartiz and L. Goldstein (eds.). Applied Biochemistry And Bioengineering-enzyme Technology. Academic Press. New York.
- Balai Penelitian Tanaman Pangan Sukamandi. 1988. Tinjauan Pengelompokan Mutu Dan Metoda Analisa Gabah MT 1987/1988. Laporan Penelitian. Balittan Sukamandi. Sukamandi.
- Bergmeyer, H.U. 1983. Methods Of Enzymatic Analysis. 3rd edition. Vol I: Fundamental. Verlag Chemie. Weinheim, Deerfield Beach, Florida.
- Chalal, D.S. 1985. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. Appl. Environm. Microbiol. 49 : 205-210.
- Chang, K.C., C.C. Lee dan G. Brown. 1986. Production and nutritional evaluation of high protein rice flour. J. Food Sci. 51(2): 464-467.
- Cocker, R. dan R.N. Greenshields. 1975. Fermenter cultivation of *Aspergillus*. In. J.E. Smith and J.A. Pateman (eds.). Genetics And Physiology Of *Aspergillus*. Academic Press. New York.
- Crueger, W. dan A. Crueger. 1986. Biotechnology :A Textbook Of Industrial Microbiology. Science Tech, Inc. Madison, WI.
- Damardjati, D.S. 1983. Physical And Chemical Properties And Protein Characteristics Of Some Indonesian Rice Varieties. Thesis. Graduate School. Bogor Agricultural University.

- \_\_\_\_\_ dan Z. Harahap. 1983. Penelitian dan pengembangan mutu beras di Indonesia. p. 143-156. In. S.O. Manurung, M. Syam dan A. Widjono (eds.). Masalah Dan Hasil Penelitian Padi. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Bogor
- du Cros, D.L. dan C.W. Wrigley. 1979. Improved electrophoretic methods for identifying cereal varieties. *J.Sci. Food Agric.* 30 : 785-794.
- Fardiaz, S. 1988. Teknologi fermentasi. Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi. Fakultas Teknologi Pertanian - IPB. Bogor.
- Fennema, R.O. 1976. Water and ice. In. R.O. Fennema (Ed.). Principles Of Food Science I. Marcell Dekker Inc. New York.
- Fogarty, W.M. 1983. Microbial amylases. In. W.M. Fogarty (ed.). Microbial Enzymes And Biotechnology. Appl.Sci. Publ. London.
- Frazier, W.C. dan D.C. Westhoff. 1983. Food Microbiology. Tata-McGraw-Hill Publ. Co.Ltd. New Delhi.
- Grist, D.H. 1972. Rice. 4th ed. Lowe and Brydine Ltd. London.
- Gupta, V.K. dan S.S. Malik. 1978. Electrophoretic patterns among seed protein from different varieties of rice. *Patnagar J. Res.* 3 : 1 - 3.
- Halick, J.V. dan V.J. Kelly. 1959. Gelatinization and pasting characteristics of rice varieties related to cooking behavior. *Cereal Chem.* 36: 91-98.
- Hames, B.D. dan D. Rickwood. 1985. Gel Electrophoresis Of Protein, A Practical Approach. IRL Press. Washington, D.C.
- Hansen, L.P., R. Hosek, M. Callan dan F.T. Jones. 1981. The development of high-protein rice flour for early childhood feeding. *Food Tech.* 35 (11) : 38-42.
- \_\_\_\_\_ dan G. You. 1982. A biological evaluation of high protein rice flour for infant and young children. *Nutr. Rep. Inter.* 26 (6) : 1087-1094. .
- \_\_\_\_\_. 1985. The potensial of rice yeast in aiding the hunger problems of young children. *Cereal Food World* 30 (2):182-185.

- Hartanto, T.M. 1987. Pemanfaatan Enzim Dalam Bioteknologi Beras, Studi Kasus : Pembuatan Tepung Beras Berkon-  
- sentrat Protein. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian  
- IPB. Bogor.
- Houston, D.F. 1972. Rice bran. In. D.F. Houston (ed.). Rice:  
Chemistry And Technology. AVI Publ. Co. Westport, Con-  
necticut.
- \_\_\_\_\_ dan G.O. Kohler. 1970. Nutritional Properties  
Of Rice. National Academic of Science. Washington, D.C.
- Juliano, B.O. 1972a. Quality of rice. *Il Riso*, 22 : 171-184.
- \_\_\_\_\_. 1972b. The rice caryopsis and its composition.  
p.16 - 74. In. D.F. Houston (ed.). Rice : Chemistry And  
Technology. Amer. Assoc.Cereal Chemists. Inc. St-Paul,  
MN.
- \_\_\_\_\_. 1972c. Studies on protein quality and quan-  
tity of rice. p. 114-125. In. G.E. Inglett (ed.). Sym-  
posium : Seed Proteins. AVI Publ. Co. Westport, Connec-  
ticut.
- \_\_\_\_\_. 1985. Production and utilization of rice. p.  
1-16. In. B. O. Juliano (ed.). Rice : Chemistry And  
Technology. AACC. St-Paul, MN.
- \_\_\_\_\_ dan D.B. Bechtel. 1985. The rice grain and its  
gross composition. p. 17 - 58. In. B.O. Juliano (ed.).  
Rice : Chemistry And Technology. AACC. St-Paul, MN.
- Kinsella, J.E. 1976. Functional properties of proteins in  
foods. *CRC Crit. Review In Food Science And Nutrition*  
7(3): 219.
- Knap, J.S. dan J.A. Howell. 1980. Solid substrat ferment-  
tation. In. A. Wiseman (ed.). Topics In Enzymes And Fer-  
mentation Biotechnology.
- Kulp, K. 1975. Carbohydrases. In. G. Reed (ed.). Enzymes In  
Food Processing. Academic Press. New York.
- Lehninger, A.L. 1982. Principles Of Biochemistry. Worth  
Publ. Inc. New York.
- Luh, B. S. 1980. Rice Production And Utilization. AVI Publ.  
Co. Westport, Connecticut.
- Melling, J. dan B.W. Phillips. 1975. Large scale extraction  
and purification of enzymes. p. 58-88. In. A.  
Wiseman (ed.). Handbook Of Enzyme Biotechnology. John  
Wiley and Sons. Inc. New York.

- Moreaux, C. 1974. Moisissures Toxiques dans l'Alimentation. Masson and Co. Paris.
- Muchtadi, D. 1986. Pengembangan industri tepung beras berprotein tinggi. Konsultasi Teknis Pengembangan Industri Pengolahan Beras Non Nasi. Balitbang Industri. Jakarta.
- Prescot, S.C. dan C.G. Dunn. 1982. Industrial Microbiology. AVI Publ. Co. Inc. Westport, Connecticut.
- Priestley, R.J. 1979. Effects Of Heating On Foodstuffs. Applied Sci. Publ. Ltd. London.
- Pour El, A. 1981. Protein functionality, classification, definition and methodology. In. J.P. Cherry (ed.). Protein Functionality In Foods. ACS. Syamseries.
- Purwani, E.Y. 1987. Pembuatan Tepung Beras Berkonsentrat Protein Serta Analisa Beberapa Sifat Fisikokimia Dan Sifat Proteinnya. Skripsi. Fateta - IPB. Bogor.
- Raimbault, M. dan D. Alazard. 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. European J. Appl. Microbiol And Biotechnology 9 : 199-209.
- Redjeki, S. 1986. Pemanfaatan Limbah Ampas Tapioka Untuk Produksi  $\alpha$ -amilase, Amiloglukosidase Dan Selulase Dari *Aspergillus niger* L 51/NRRL A-11, 264. Skripsi. Fateta-IPB. Bogor.
- Sathe, S.K., S.S. Despandhe dan D.K. Salunkhe. 1982. Functional properties of wingedbean (*Posphocarpus tetragonolobus* L. DC) proteins. J. Food Sci. 47: 503-509.
- Satiawiharja, B. 1984. Fermentasi Media Padat Dan Manfaatnya. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Indonesia.
- Setiadi, E. 1987. Mempelajari Beberapa Perubahan Sifat Kimia Dan Fisikokimia Tepung Beras Berprotein Tinggi Selama Penyimpanan. Skripsi. Fateta-IPB. Bogor.
- Shadi, A.I. dan R. Djurtoft. 1979. Studies of rice protein by crossed immunoelectrophoresis, gel electrophoresis and isoelectric focusing. Cereal Chemistry. 56 : 402-406.
- Susetyono, E. 1989. Pembuatan Tepung Serealia Berkonsentrat Protein Dengan Amilase Dari *Aspergillus niger* Dan *Aspergillus oryzae*. Skripsi. Fateta-IPB. Bogor.

- Udiyono. 1988. Kemungkinan penggunaan dedak beras sebagai bahan pembuat enzim. Lanjuran Simposium Bioproses Dalam Industri Pangan. PAU Pangan dan Gizi UGM. Liberty. Yogyakarta.
- Upton, M.E. dan W.M. Fogarty. 1977. Production and purification of thermostable amylase and protease of *Thermomonospora viridis*. Appl. Environm. Microbiol. 33 : 59-64.
- Wardojo, R. 1985. Produksi Enzim Amiloglukosidase Dari Kapang *Aspergillus niger* L 51/NRRL A-11,264. Skripsi. Fateta-IPB. Bogor.
- Whitaker, J.R. 1972. Principles Of Enzimology For The Food Science. Marcell Dekker Inc. New York.
- Winarno, F.G. 1983. Enzim Pangan. Gramedia. Jakarta.
- . 1986. Pemanfaatan dan pengolahan beras non nasi. Konsultasi Teknis Pengembangan Industri Pengolahan Beras Non Nasi. Balitbang Industri. Jakarta.
- Wolf, W.J. dan J.C. Cowan. 1975. Soybean As Food Source. 2nd edition. CRC Press. London.

L A M P I R A N

Lampiran 1. Prosedur pembuatan pereaksi untuk analisa' aktivitas alfa-amilase

Larutan pati :

Pati terlarut sebanyak 1 gram dilarutkan dalam 100 ml bufer sitrat 0,05 M, pH 5,7

Larutan DNS :

Satu gram DNS (3,5-dinitro salicylic acid) dilarutkan dalam 20 ml larutan NaOH 2 N, ditambah 50 ml air, kemudian ditambahkan 30 gram garam Rochelle dan volume ditepatkan menjadi 100 ml.

Lampiran 2. Prosedur pembuatan pereaksi untuk analisa aktivitas amiloglukosidase (metode Nelson-Somogyi)

Pereaksi A :

Sebanyak 25 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidrat, 25 g Na,K-tartarat, 20 g  $\text{NaHCO}_3$  dan 200 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat dilarutkan dalam 800 ml aquadest, kemudian diencerkan menjadi 1000 ml.

Pereaksi B :

Sebanyak 30 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dalam 200 ml aquadest yang mengandung 4 tetes asam sulfat pekat.

Pereaksi C :

Sebanyak 25 g amonium molibdat dilarutkan dalam 450 ml aquadest yang mengandung 21 ml asam sulfat pekat. Kemudian 3 g  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dalam 25 ml aquadest. Selanjutnya kedua larutan tersebut dicampur dengan pengadukan perlahan, dan ditepatkan volumenya menjadi 500 ml. Kemudian pereaksi tersebut diinkubasi pada suhu  $37-40^\circ\text{C}$  selama semalam dan disimpan pada botol coklat (gelap).

Pereaksi D :

Campuran 25 ml pereaksi A dan 1 ml pereaksi B. Pereaksi D dibuat hanya jika akan digunakan.

Lampiran 3. Prosedur pembuatan pereaksi untuk analisa protein terlarut

Pereaksi A :

2 persen natrium karbonat anhidrat dalam larutan NaOH 0,1 N.

Pereaksi B :

0,5 persen  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dalam larutan Na,K-tartarat 1 persen.

Larutan ini dibuat hanya pada saat akan digunakan.

Pereaksi C :

Larutan segar yang dibuat dari 50 ml pereaksi A dengan 1 ml pereaksi B, disebut juga larutan Copper alkaline.

Pereaksi E :

Pereaksi Folin Ciocalteau biasanya tersedia dalam bentuk jadi di pasaran. Pereaksi E dibuat dengan mencampur Folin dengan air dengan perbandingan yang sama.

Lampiran 4. Bahan kimia dan teknik penentuan BM ekstrak amilase

**Bahan kimia**

- a. Acrylamide (BDH Chemicals, England)
- b. BIS = N,N'- Methylene bis acrylamide (BDH Chem., England)
- c. TRIS = Trishydroxymethyl ethylene diamine (Sigma Chem.Co,USA)
- d. TEMED = N,N,N',N'- Tetramethyl ethylene diamine (Sigma Chem.)
- e. SDS = Sodium Dodecyl Sulphate (Sigma Chem.Co., USA)
- f. Ammonium persulfat (BDH Chem.,England)
- g. Sucrose (Sigma Chem. Co., USA)
- h. Glycine (Sigma Chem. Co., USA)
- i. HCl (BDH Chem., England)
- j. Beta Mercaptoethanol (E.Merck Darmstadts)
- k. Coomassie Brilliant Blue G250 (Sigma Chem.Co.,USA)
- l. Asam asetat glacial (E.Merck Darmstadts)
- m. Methanol (E.Merck Darmstadts)



Larutan A, B dan C disimpan dalam botol coklat (gelap) dan dalam suhu rendah agar dapat bertahan selama 3 bulan.

b. Bufer "Running"

Larutan stok : Tris	24,0 g
Glycine	115,2 g
SDS	8,0 g

dilarutkan dengan aquades dan ditepatkan volumenya hingga 2 liter, lalu disimpan dalam suhu rendah.

Bufer "Running" diperoleh dengan mencampurkan larutan stok dengan aquades (1 bagian : 3 bagian) dan diaduk sampai homogen serta diatur pH nya menjadi 8,3.

c. Larutan fiksasi

Larutan fiksasi dibuat dengan cara mencampurkan 40 ml methanol dengan 7 ml asam asetat glacial dan menepatkan volumenya hingga 100 ml dengan aquades.

d. Larutan pewarna

Sebanyak 1,25 g Commasie Brilliant Blue G<sub>250</sub> dicampur dengan methanol 50% sebanyak 454 ml dan ditepatkan volumenya hingga 500 ml dengan menambahkan asam asetat glacial, kemudian dikocok dan disaring.

e. Larutan pencuci

Sebanyak 50 ml methanol 99,5% dan 75 ml asam asetat glacial dicampur dan ditepatkan volumenya hingga 1 liter dengan aquades, kemudian dikocok sampai homogen.

f. Larutan pengekstrak protein (Bufer Tris-HCl)

Sebanyak 0,8114 g Tris dicampur dengan 3 ml HCl 1N, 0,5g SDS dan 0,6 ml Beta-Merkaptoetanol dan ditepatkan volumenya hingga 100 ml dengan aquades.

**Preparasi sampel dan standar BM**

Sampel (ekstrak amilase) ditimbang dengan bobot tertentu sehingga jika dilarutkan dalam larutan pengekstrak akan terdapat sekitar 100 ug protein per 25 ul larutan (atau 4 mg protein per ml larutan). Enzim amilase komersial yaitu

alfa-amilase type X-A dari *A. oryzae* dan AMG dari *Rhizopus* (Sigma Chem.Co.) juga diamati sebagai pembanding. Baik ekstrak amilase maupun enzim pembanding setelah dicampur dengan larutan pengestrak kemudian dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 5 menit. Setelah dingin ditambahkan beberapa butir sukrosa dan setetes bromophenol blue 0,05% serta dikocok sampai homogen. Persiapan standar BM dilakukan seperti persiapan sampel. Standar yang digunakan adalah sesuai dengan petunjuk dari Sigma Chemicals Company, yaitu :

Protein	BM stand	Kons.opt.(mg/ml)	Juml.bufer (ml)
Albumin bovin	66.000	1,5 - 3,0	8,5-17,0
Albumin telur	45.000	1,5	17,0
Tripsinogen	24.000	2,0	12,5
Laktoglobulin	18.000	1,0	25,0
Lisozym	14.300	1,0	25,0
Enzim pembanding		15,15 mg/ml larutan pengestrak	

Tabung-tabung pencetak gel yang akan dipakai terlebih dahulu direndam dalam larutan pembersih (asam bichromat) selama sehari. Kemudian tabung dibilas dengan aquades dan direndam kembali dalam larutan photoflo 0,5% selama 15 menit serta dikeringkan dalam oven.

Untuk keperluan 18 tabung gel, maka dibuat larutan pembentuk gel yang terdiri dari 15 ml larutan A; 5,63 ml larutan B; 5,63 ml larutan C; 7,5 ml aquades dan 9 ml larutan D. Campuran ini dikocok dan diletakkan dalam ice-bath. Tabung gel yang sudah bersih dan ditutup bagian dasarnya dengan parafilm, diisi dengan campuran di atas sebanyak kira-kira 2,15 ml sehingga akan dihasilkan gel dengan panjang sekitar 9 cm. Setelah campuran diisikan, permukaan cairan ditetesi dengan aquades dan lampu TL dinyalakan agar gel cepat terbentuk. Setelah 20 menit penyinaran, maka akan tampak batas antara gel yang telah padat dengan aquades. Sisa aquades dihilangkan dengan kertas tissue dan kertas parafilm dibuka, sehingga diperoleh gel yang siap digunakan dalam elektroforesis.

#### Pelaksanaan elektroforesis

Sel elektroforesis, circulator pendingin, magnetic stirer dan power supply disusun membentuk satu rangkaian yang siap digunakan. Bak bagian bawah diisi dengan bufer "running" sebanyak 1 liter dan gel yang telah tersedia

dipasang pada bak gel bagian atas. Kemudian bak bagian atas pun diisi dengan bufer "running" yang sama sebanyak 500 ml sehingga ujung-ujung gel tercelup dalam bufer yang sama. Gelembung udara yang terdapat di ujung tabung gel harus dihilangkan.

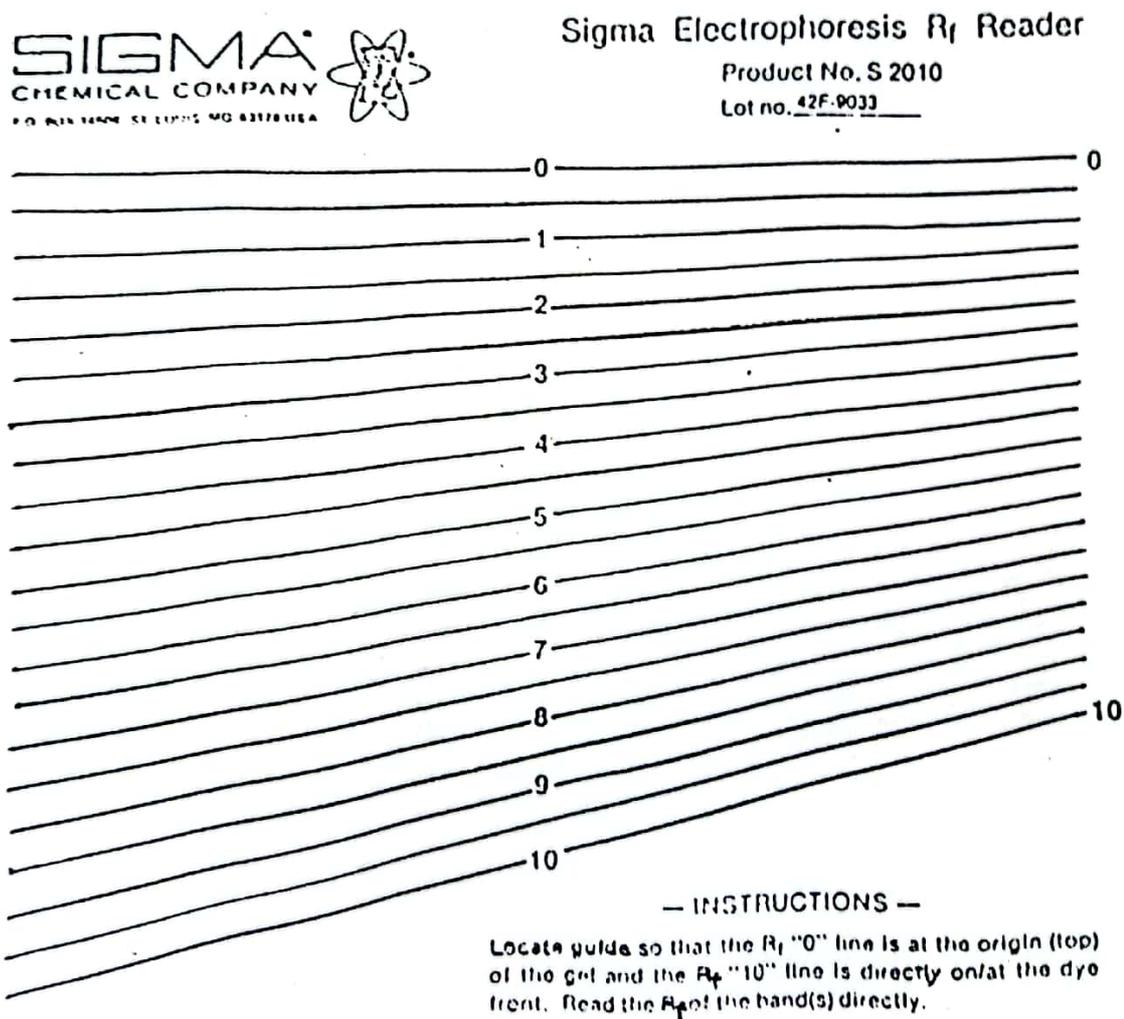
Sampel dan standar BM yang telah tersedia diambil sebanyak 25-35  $\mu$ l dan disuntikkan di ujung atas gel. Sel elektroforesis ditutup, pendingin dihubungkan dan stirer dinyalakan. Sumber listrik dihidupkan dan diatur tegangannya pada 3 mA per tabung dan proses dibiarkan berlangsung sampai ada salah satu tabung yang batas birunya (tracking dye) telah mencapai kira-kira 0,5 cm di atas ujung bawah tabung.

Selanjutnya tabung gel dilepaskan dan gel dikeluarkan dari tabung dengan menyuntikkan air pada dinding bagian dalam tabung dan memompanya dengan rubber bulb. Gel yang telah keluar dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi larutan fiksasi dan telah diberi label yang sesuai.

Setelah proses fiksasi berlangsung selama sekitar 1 jam, larutan fiksasi dituangkan dan ke dalam tabung diberikan larutan pewarna. Biarkan pewarnaan berjalan selama 5 jam. Ketika proses ini berakhir, larutan pewarna dikeluarkan dan gel dibilas dengan aquades sebelum dilakukan proses pencucian sisa pewarna. Proses pencucian ini dilakukan dengan larutan pencuci dan dikocok terus sampai pita protein yang terwarnai mulai tampak jelas dan gel yang tak mengandung protein tampak semakin jernih.

### penetapan BM protein

Standar BM, enzim pembanding dan protein dalam sampel diukur nilai  $R_f$ -nya masing-masing dengan menggunakan lembar pembaca  $R_f$  yang diterbitkan oleh Sigma Chemicals Company (Gambar 27). Nilai  $R_f$  dari standar BM diplotkan melawan BM yang bersangkutan di atas kertas semilog. BM molekul protein yang hendak ditetapkan dapat ditentukan dengan melakukan intrapolasi pada kurva standar.



Gambar 27. Standar pembacaan  $R_f$  (Sigma Chemicals Company)