

## Degradasi Protein Selama Fermentasi Koro Kratok (*Phaseolus lunatus*) menggunakan *Rhizopus oligosporus*

Protein Degradation along Koro Kratok (*Phaseolus lunatus*) Fermentation used *Rhizopus oligosporus*

Marta Tika Handayani<sup>1\*</sup>, Ira Gusti Riani<sup>1</sup>, Aldila Sari Utami<sup>1</sup>, Onne Akbar Nur Ichsan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Teknologi Pangan, Jurusan Teknik Kimia, Politeknik Negeri Sriwijaya Kampus Banyuasin, Jalan Kedondong Raya Banyuasin III, Sumatera Selatan 30913

<sup>2</sup>Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Institut Teknologi Pagar Alam, Jl. Masik Siagim No. 75, Karang Dalo, Kec. Dempo Tengah, Kota Pagar Alam, Sumatera Selatan 31521

\*Email: marta.tika.handayani@polsri.ac.id

Naskah diterima: 29 Mei 2023; Naskah disetujui: 20 Juni 2023

### ABSTRACT

Koro kratok fermented by *Rhizopus oligosporus* was one of Indonesian's traditional methods to consume Koro kratok. *Rhizopus oligosporus* produces proteolytic enzyme which breaking down complex protein to simple protein. Protein degradation was observed based on the fermentation time of koro kratok (0 hours, 12 hours, 24 hours, 36 hours, 48 hours, 72 hours, 96 hours and 120 hours). The research was designed by using Random Design complete (RAL) factorial pattern with 3 replicates. Parameters observed including proteolytic activity, growth of *Rhizopus oligosporus* mycelium, dissolved protein, protein concentration, degree of hydrolysis and protein pattern using SDS PAGE. Result showed that proteolytic activity, *Rhizopus oligosporus* mycelium growth, dissolved protein (3.485,361 µg/ml in 120 hours of fermentation), protein concentration (10,01 mg/ml in 120 hours of fermentation) and degree of hydrolysis (25% in 120 hours of fermentation) were directly proportional to fermentation time. Observation on protein patterns using SDS PAGE showed that the longer the fermentation time, the simpler the protein produced. The longer the fermentation time, the higher protein degradation of koro kratok.

**Keywords:** Koro kratok (*Phaseolus lunatus*), protein degradation, *Rhizopus oligosporus*

### ABSTRAK

Fermentasi koro kratok menggunakan *Rhizopus oligosporus* merupakan salah satu cara masyarakat Indonesia mengonsumsi koro kratok. *Rhizopus oligosporus* menghasilkan enzim proteolitik yang akan memecah protein kompleks menjadi bentuk yang lebih sederhana. Degradasi protein ini diamati berdasarkan lama waktu fermentasi koro kratok. Waktu fermentasi yang digunakan adalah 0 jam, 12 jam, 24 jam, 36 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam dan 120 jam fermentasi. Rancangan yang digunakan adalah RAL dengan pengulangan sebanyak tiga kali. Parameter yang diamati meliputi aktivitas proteolitik, pertumbuhan miselium, protein terlarut, konsentrasi protein dan derajat hidrolisis serta pola protein menggunakan SDS PAGE. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa aktivitas proteolitik, pertumbuhan miselium *Rhizopus oligosporus*, protein terlarut (3.485,361 µg/ml pada 120 jam fermentasi), konsentrasi protein (10,01 mg/ml pada 120 jam

fermentasi) dan derajat hidrolisis (25% pada 120 jam fermentasi) berbanding lurus dengan lama waktu fermentasi. Hasil pengamatan pada pola protein menggunakan SDS PAGE menunjukkan bahwa semakin lama waktu fermentasi, semakin sederhana protein yang dihasilkan (37 kDa pada fermentasi setelah jam 36). Semakin lama waktu fermentasi, semakin besar degradasi protein koro kratok.

**Kata kunci:** degradasi protein, Koro kratok (*Phaseolus lunatus*), *Rhizopus oligosporus*

## PENDAHULUAN

Koro kratok berasal dari neotropik dengan dua daerah domestika yaitu Amerika Tengah untuk yang berbiji kecil dan Amerika selatan untuk yang berbiji besar (Maesen dan Somaatmadja, 1993). Koro kratok sekarang banyak dibudidayakan di Indonesia. Produktivitas koro kratok adalah sebesar 200-600 kg / ha pada tumpangsari, 1-1,5 ton/ha untuk tanam tunggal, 2-4 ton/ha pada tanaman budidaya pada daerah tropis (Baudoin, 2004). Koro kratok banyak ditemukan di pulau Jawa khususnya daerah Jawa Timur dan Madura.

Koro kratok diketahui memiliki kandungan protein yang cukup tinggi sekitar 18-35% (Magana et al., 2015). Penelitian lain menyebutkan bahwa koro kratok memiliki kandungan protein yang cukup tinggi sebesar 20,66% (Handayani, 2019), dan 20% (Maesen dan Somaatmadja, 1993). Masyarakat biasa mengonsumsi koro kratok rebus dengan parutan kelapa ataupun diolah menjadi tempe.

*Rhizopus oligosporus* tumbuh maksimal pada suhu 45 °C, aw yang relatif tinggi (1-0,99), dan pH 3,0-9,0 (Owens dan Nuraida, 2014). *Rhizopus oligosporus* memiliki pertumbuhan miselia sangat cepat berkisar antara 18-20 jam. Jamur memasuki fase lag antara jam ke 0-18 dan mulai naik fase log setelah jam ke 18. Pada jam ke 32 pertumbuhan jamur terhenti dan memasuki fase stationer hingga jam ke 192.

Kapang *Rhizopus oligosporus* memproduksi enzim pendegradasi karbohidrat seperti amilase, selulase, xilanase. Enzim lain yang juga diproduksi oleh kapang *Rhizopus oligosporus* adalah enzim fitase dan juga enzim proteolitik. Enzim proteolitik yang dihasilkan dari jamur atau kapang bersifat asam (Abirami et al., 2011). Menurut Hardiany (2013), protease adalah enzim yang mengkatalisis pemecahan protein melalui hidrolisis ikatan peptida. Degradasi protein oleh enzim protease ini dipengaruhi oleh aktivitas proteolitiknya. Menurut Rauf et al. (2010) menyatakan bahwa enzim protease yang dihasilkan oleh *R. oligosporus* memiliki aktivitas proteolitik yang tinggi.

Aktivitas enzim yang tinggi ini akan menghasilkan degradasi protein yang tinggi pula. Hasil degradasi ini merupakan protein sederhana yang larut air sehingga bisa diukur protein terlarutnya. Penelitian mengenai protein terlarut pada tempe koro pedang yang difermentasi menggunakan *Rhizopus oligosporus* meningkat dari 0,24 mg/g pada fermentasi 12 jam menjadi 2,60 mg/g pada fermentasi 48 jam (Widaningrum et al., 2015). Sedangkan pada tempe koro benguk terjadi peningkatan kadar protein terlarut secara signifikan dari 7,32 mg/g menjadi 24,78 mg/g setelah fermentasi 48 jam (Rokhmah, 2008). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui degradasi protein selama proses fermentasi koro kratok (*Phaseolus lunatus*) menggunakan inokulum *Rhizopus oligosporus*.

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Bahan baku penelitian yang digunakan adalah koro kratok (*P. lunatus*) yang dibeli di pengrajin tempe koro kratok di Wates, inokulum tempe merek Raprima. Bahan kimia: TCA, aquadest, larutan casein, sodium carbonat, folin, protease, Sodium tetra borat (Borax, 25 ml 100mM), sodium dodesil sulfat (SDS), OPA, Methanol,  $\beta$ -mercaptoethanol, H<sub>2</sub>O, resolving gel, stacking gel, Tris HCl, gliserol, bromophenol blue, akuabides, marker protein, commasie blue.

### Alat

Peralatan penelitian yang digunakan terdiri atas spektrofotometer UV-Vis, alat-alat gelas merk pyrex, timbangan analitik, waterbath shaker, timbangan digital C-309, Eppendorf centrifuge 5424 R, (Hamburg, Germany), Electrophoresis Bio-Rad PowerPac™ Basic Mini Electrophoresis System (California, UK), Spectrophotometer UV-VIS (Dynamica Scientific Halo SB-10, Livingston, UK).

### Proses Fermentasi Koro Kratok

Koro kratok di fermentasi dengan menggunakan inokulum *Rhizopus oligosporus*. Sebelum difermentasi koro kratok diberikan pre-treatment terlebih dahulu. Koro kratok yang telah dibersihkan kemudian direbus pada air mendidih selama 15 menit, setelah itu koro direndam ke dalam air selama 12 jam. Setelah itu, biji koro dilepaskan dari kulit luarnya. Setelah pengupasan kulit, koro direndam kembali selama 24 jam dengan pergantian air setiap 12 jam. Kemudian koro direbus selama 30 menit pada air mendidih. Koro yang telah direbus, ditiriskan hingga dingin. Koro tersebut kemudian diinokulasikan

dengan *Rhizopus oligosporus* sebanyak sebanyak 2%/kg. Koro yang telah diinokulasikan kemudian difermentasikan sesuai perlakuan.

#### **Analisa Aktivitas Protease**

Aktivitas protease dianalisa dengan metode Cupp-Enyard, C. (2008) yang sedikit modifikasi. 5 ml 0,65% larutan casein diinkubasi 5 menit dalam waterbath 37 °C, kemudian ditambahkan 1 ml ekstrak enzim protease (10% w/v) dan diinkubasikan dengan suhu 37 °C selama 10 menit. Setelah inkubasi selama 10 menit, 5 ml reagen TCA ditambahkan pada masing-masing tube untuk menghentikan reaksi. Larutan kemudian disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. 2 ml supernatan kemudian diambil dan ditambahkan 5 ml sodium carbonat dan 1 ml folin. Sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang 660 nm. 1 unit protease diartikan sebagai banyaknya enzim yang melepaskan 1 µmol tirosin per menit pada kondisi pengujian.

#### **Pertumbuhan miselium *Rhizopus oligosporus***

Gambar diambil pada fermentasi koro kratok sesuai dengan perlakuan (0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 dan 120 jam fermentasi). Fermentasi koro kratok diletakkan pada meja yang telah disesuaikan tempatnya. Gambar diambil menggunakan kamera canon EOS 4000D Lensa 18-55MM. Gambar yang diambil merupakan gambar permukaan koro kratok yang telah ditumbuhi oleh miselium *Rhizopus oligosporus* untuk melihat pertumbuhannya sesuai lama waktu fermentasi yang ditentukan.

#### **Analisa Protein Terlarut**

Konsentrasi protein terlarut dari peptida koro kratok selama fermentasi dianalisis dengan spektrofotometer dengan Metode Lowry (AOAC, 2005). Sebanyak 0,4 ml sampel dimasukkan ke dalam gelas beaker lalu ditambahkan 0,4 ml 2N NaOH, kemudian dipanaskan pada suhu 100 °C selama 10 menit. Setelah itu, didinginkan di suhu ruang. Setelah dingin, ditambahkan 4 ml complex forming reagen dan didiamkan di suhu ruang selama 10 menit. 0,4 ml folin ditambahkan lalu di vortex dan diinkubasikan selama 30 hingga 60 menit. Kemudian dibaca absorbansinya pada 750 nm dan 550 nm.

#### **Analisa Konsentrasi Peptida dan Derajat Hidrolisis**

Perhitungan konsentrasi peptide menggunakan metode Church et al. (1985). Sodium tetra borat (Borax, 25 ml 100mM), 2,5 ml 20 % (g/g) sodium dodecyl sulfat (SDS) dan 1,1 ml OPA (40 mg OPA dilarutkan dalam 1 ml methanol dan 100 ml β-mercaptoethanol) dicampur dengan 21,4 ml H<sub>2</sub>O. Ekstrak peptida koro kratok (20µl) ditambahkan secara langsung pada 1 ml reagen OPA dalam cuvette 1,5 ml. larutan dicampurkan secara cepat dengan pembalikan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2

menit. Panjang gelombang yang digunakan 340nm. Peptida dihitung menggunakan kurva regresi linear dengan standar dipeptida Trypton,

$$\text{Konsentrasi Peptida} = (\text{absorbansi} + 0,0053) / 0,1244.$$

Perhitungan Degree of hydrolysis (DH) menggunakan metode OPA menggunakan rumus :

$$\% \text{ DH} = \text{B} - \text{AN} \text{ tot} - \text{A}$$

B adalah konsentrasi peptida sesuai perlakuan, A adalah konsentrasi peptida awal dan N ialah jumlah total ikatan peptide per molekul protein (Benjakul and Morrissey, 1997).

### **Penentuan Berat Molekul**

Penentuan berat molekul dengan SDS PAGE (Laemmli,1970) dengan resolving gel 13% dan stacking gel 5%. Ekstral peptide diencerkan dengan buffer pada rasio 1:2. Bufer sampel terdiri atas Tris HCl 0,5 M pH 6,8; gliserol; SDS 10 % (w/v); 0,5% bromphenol blue (w/v) dan akuabides. Sampel dipanaskan pada suhu 100 °C selama 4 menit. 20 µl sampel dan 5µl marker protein diinjeksikan ke dalam sumur. Gel kemudian dialiri arus listrik 220 volt selama ± 60 menit. Gel direndam akuades selama 30 menit lalu diwarnai dengan commasie blue dan dishaker selama 1 jam. Setelah itu, destaining pada gel.

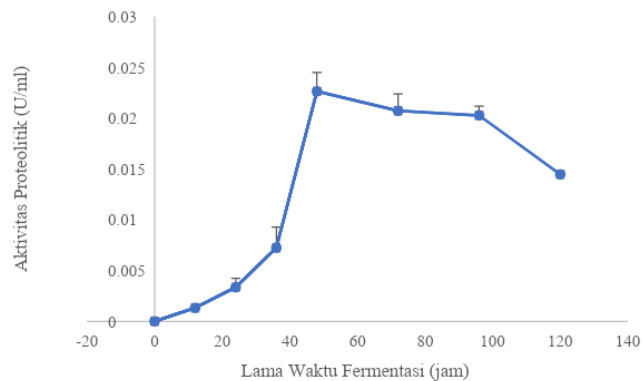
### **Analisis Data**

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga kali ulangan perlakuan. Data yang diperoleh kemudian ditabulasi dan dianalisa menggunakan mikrosoft Excel dan dilanjutkan uji lanjut Duncan.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Aktivitas Enzim Protease**

Protease merupakan enzim hidrolitik yang paling berperan dalam fermentasi tempe. Beberapa macam protease yang dihasilkan oleh mikroba diproduksi pada permulaan fermentasi tempe (Gibbs, 2004). Telah dilaporkan bahwa protease asam dan netral ditemukan selama fermentasi tempe kedelai (Elegado & Fujio, 1993). Aktivitas proteolitik tempe koro kratok dapat dilihat pada Grafik 1.

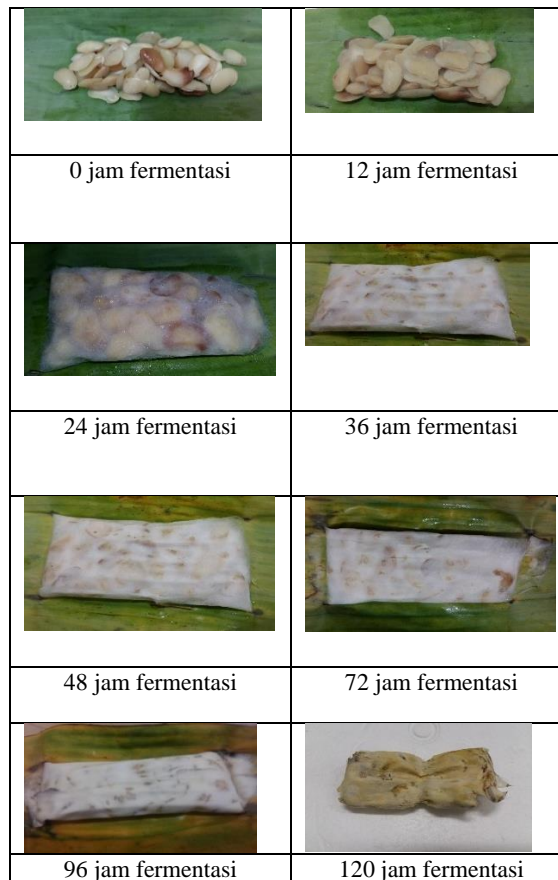


**Grafik 1. Pola aktivitas protease koro kratok selama waktu fermentasi**

Grafik 1. menunjukkan bahwa aktivitas protease pada fermentasi koro kratok mulai terdeteksi setelah 12 jam fermentasi. Pola aktivitas protease pada fermentasi koro kratok menunjukkan nilai optimum pada 48 jam fermentasi. Menurut Hidayat (2008) menyatakan bahwa fermentasi jam ke 30 hingga 50 merupakan lama waktu fermentasi optimum tempe. Pola menunjukkan bahwa aktivitas proteolitik pada fermentasi koro kratok mengalami penurunan setelah fermentasi jam ke 48. Aktivitas proteolitik pada fermentasi koro kratok fermentasi jam ke 96 mengalami peningkatan, tetapi aktivitas proteolitik kembali mengalami penurunan hingga fermentasi jam ke 120. Penelitian yang di lakukan oleh Sulistyowati et al. (2004) menunjukkan bahwa aktivitas tripsin tertinggi terdapat pada tempe yang di fermentasi selama 48 jam.

#### **Pertumbuhan miselium *Rhizopus oligosporus***

Pertumbuhan miselium pada koro kratok merupakan salah satu indicator bahwa proses fermentasi telah terjadi. Pertumbuhan miselium ini dipengaruhi oleh salah satunya adalah lama waktu fermentasi. Lama waktu fermentasi mempengaruhi pertumbuhan miseliumnya. Pertumbuhan miselium *Rhizopus oligosporus* terhadap koro kratok dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1. Pertumbuhan miselium kapang *Rhizopus oligosporus***

Sumber: Dokumen Pribadi

Gambar pertumbuhan miselium diatas menunjukkan bahwa pada 0 jam fermentasi belum terlihat adanya pertumbuhan miselium. Gambar fermentasi koro kratok pada 12 jam fermentasi terlihat ada pertumbuhan miselium dan mulai banyak tumbuh pada 24 jam fermentasi. Menurut Purwoko (2007), pada awal fermentasi atau 0-12 jam merupakan fase adaptasi dan waktu fermentasi 12 sampai 24 jam merupakan fase akselerasi. Pada akselerasi ini sel-sel mulai membelah dan fase lag menjadi fase aktif.

Gambar pertumbuhan miselium *Rhizopus oligosporus* terlihat pada 24 jam hingga 48 jam fermentasi miselium sudah terlihat kompak dan menutupi koro kratok. Waktu fermentasi 24 sampai 36 jam merupakan fase perbanyakan atau eksponensial (Purwoko, 2007). Waktu fermentasi 36 sampai 48 jam merupakan fase deselerasi atau fase perlambatan pertumbuhan (Gandjar, I. 2006) dan proses fermentasi pada tempe berlangsung selama 40-48 jam (Koswara, 2009; Widowati, 2016).

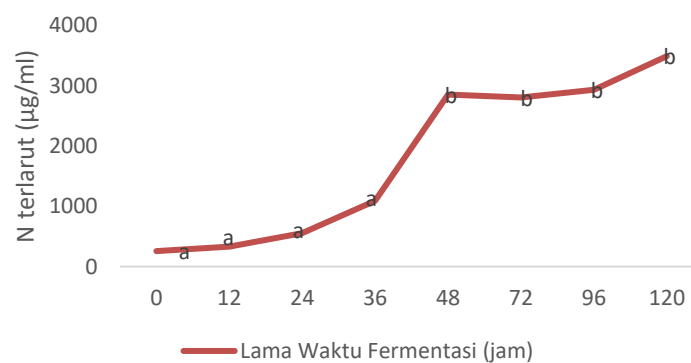
Gambar pertumbuhan miselium *Rhizopus oligosporus* pada 72 – 120 jam fermentasi tidak jauh berbeda dengan gambar pada 48 jam fermentasi. Miselium terlihat

sangat kompak dan menutupi koro secara sempurna. Hal ini dikarenakan pertumbuhan miselium yang telah memasuki fase kematian. Menurut Purwoko (2007), waktu fermentasi 60 sampai 72 jam pertumbuhan jamur memasuki fase kematian. Fase kematian miselium ditunjukkan dari penurunan jumlah koloni dari 69 koloni menurun sampai 40 koloni (Wahyudi, 2018).

### Protein Terlarut

Protein total merupakan pengukuran kandungan nitrogen (N) dalam sampel dengan menggunakan metode Lowry. Metode Lowry hanya dapat mengukur molekul peptida pendek dan tidak dapat mengukur molekul peptida panjang (Alexander dan Griffiths, 1992). Prinsip kerja metode Lowry adalah reduksi  $\text{Cu}^{2+}$  (reagen Lowry B) menjadi  $\text{Cu}^{+}$  oleh tirosin, triptofan, dan sistein yang terdapat dalam protein. Ion  $\text{Cu}^{+}$  bersama dengan fosfotungstat dan fosfomolibdat (reagen Lowry E) membentuk warna biru, sehingga dapat menyerap cahaya.

N terlarut fermentasi koro kratok dengan inokulum Raprima dapat dilihat pada Gambar 3. N terlarut fermentasi koro kratok dengan inokulum Raprima cenderung meningkat selama lama waktu fermentasi. N terlarut fermentasi koro kratok fermentasi jam ke 48 mengalami peningkatan yang sangat tajam. Hal ini berbanding lurus dengan aktivitas proteolitik fermentasi koro kratok waktu fermentasi jam ke 48 yang memiliki aktivitas paling tinggi dibandingkan lainnya.



Grafik 2. Pola protein terlarut koro kratok selama waktu fermentasi

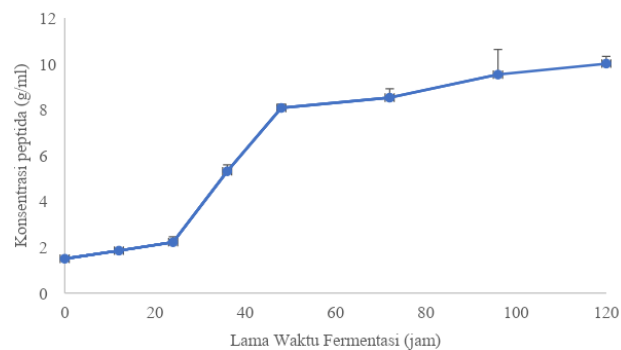
Grafik 2 menunjukkan bahwa protein terlarut koro kratok jam fermentasi ke 0 berbeda tidak nyata dengan tempe fermentasi jam ke 12, 24 dan 36 tetapi berbeda nyata dengan sampel lainnya berdasarkan perhitungan statistik. Peningkatan tajam terjadi pada fermentasi koro kratok jam ke 48, hal ini berbanding lurus dengan aktivitas proteolitik dimana pada fermentasi koro kratok jam ke 48 memiliki aktivitas proteolitik tertinggi. Aktivitas proteolitik yang tinggi menunjukkan banyaknya enzim protease yang



diekskresikan ke media yang menyebabkan pemotongan protein menjadi peptida-peptida pendek juga semakin meningkat. Hasil penelitian Sulistyowati et al. (2004) menunjukkan bahwa lama fermentasi berpengaruh terhadap kadar protein terlarut dalam tempe dengan kadar protein terlarut tertinggi dan aktivitas tripsin tertinggi adalah pada lama fermentasi 48 jam. Semakin lama waktu fermentasi, semakin rendah berat molekul peptida atau fragment protein yang dihasilkan (Rahayu et al., 2019).

### Konsentrasi Peptida dan Derajat Hidrolisis

Konsentrasi peptida dan derajat hidrolisis protein selama fermentasi tempe koro kratok ditunjukkan pada Grafik 3 dan 4. Konsentrasi peptida meningkat seiring dengan bertambahnya waktu fermentasi dan berbanding lurus dengan peningkatan derajat hidrolisis.

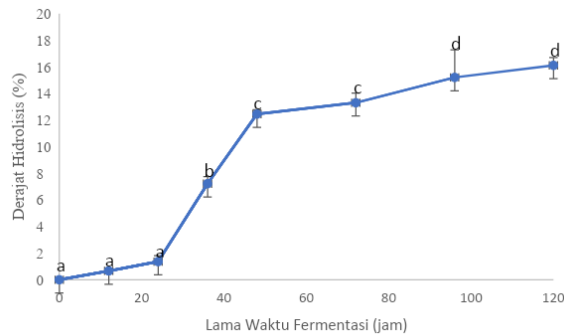


**Grafik 3. Konsentrasi peptida koro kratok selama waktu fermentasi**

Grafik 3 menunjukkan konsentrasi peptida tempe koro kratok yang difermentasi menggunakan inokulum Raprima mengalami peningkatan selama waktu fermentasi. Grafik 3. juga menunjukkan bahwa konsentrasi peptida pada koro kratok non fermentasi atau fermentasi jam ke 0 berbeda tidak nyata dengan koro kratok dengan lama waktu fermentasi 12, dan 24 jam tetapi berbeda nyata dengan tempe lainnya. Hal ini diakibatkan oleh pada koro kratok yang di fermentasi pada jam ke 0, 12 dan 24 aktivitas enzim proteolitik tempe belum besar sehingga peptida yang terbentuk belum banyak. Sedangkan untuk fermentasi setelah jam ke 24 aktivitas proteolitik sudah besar sehingga peptide yang terbentuk sudah banyak dan relatif stabil terutama setelah jam fermentasi ke 48.

Grafik 4 menunjukkan bahwa semakin lama waktu fermentasi, semakin besar derajat hidrolisis tempe koro kratok. Derajat hidrolisis tertinggi terdapat pada tempe dengan lama fermentasi 48 jam. Derajat hidrolisis berbanding lurus dengan hasil analisa protein terlarut (Grafik 2) dan konsentrasi peptida (Grafik 3) yang menunjukkan bahwa pada tempe fermentasi jam ke 48 nilai protein terlarut dan konsentrasi peptida paling tinggi

peningkatannya. Grafik 4. juga menunjukkan bahwa derajat hidrolisis koro kratok non fermentasi atau fermentasi jam ke 0 berbeda tidak nyata dengan tempe fermentasi jam ke 12 dan 24 menurut perhitungan statistik.

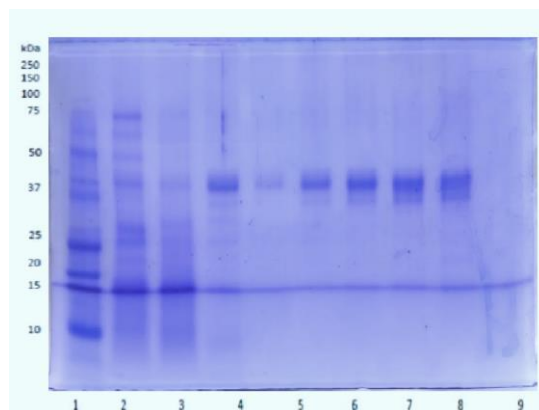


**Gambar 4. Derajat hidrolisis koro kratok selama waktu fermentasi**

Derajat hidrolisis (DH) yang terjadi pada tempe koro kratok adalah sebesar 25 % menggunakan inokulum *Rhizopus oligosporus*. Menurut Weng dan Chen, 2011 menyatakan bahwa derajat hidrolisis kedelai yang difermentasi dengan *Rhizopus oligosporus* dan *Bacillus subtilis* yaitu sebesar 20% setelah 48 jam fermentasi pada tempe. de Rauw et al. (1995) melaporkan bahwa DH kedelai yang di fermentasi dengan *Rhizopus oligosporus* meningkat hingga 46% selama fermentasi 48 jam menggunakan *rotating drum drier* (RDR).

#### **Pola Protein selama Fermentasi Koro Kratok**

Pola protein selama fermentasi koro kratok ditunjukkan pada Gambar 2. Terdapat pita protein dengan berat molekul 15 kDa dari awal hingga akhir fermentasi.



**Gambar 4. Pola protein koro kratok selama waktu fermentasi**

Sumber: Dokumen Pribadi

Lane 1 : marker protein ; Lane 2-9 : protein koro kratok terfermentasi dengan fermentasi 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 dan 120 jam

Dari hasil SDS page protein koro kratok mulai terdegradasi setelah fermentasi jam

ke- 12. Protein dengan berat molekul 38 kDa mulai terdegradasi pada fermentasi jam ke-12 diikuti dengan terbentuknya protein dengan berat molekul 41 kDa pada fermentasi jam ke-12. Protein tersebut konsentrasinya semakin meningkat seiring dengan bertambahnya waktu fermentasi hal ini ditunjukkan dengan semakin meningkatnya ketebalan pita pada Gambar 4.

Gambar 4 menunjukkan bahwa setelah jam ke 24 pita protein pada 37 kDa semakin tebal hal ini menunjukkan semakin banyak protein dengan berat molekul sebesar 37 kDa terbentuk. Fermentasi koro kratok setelah fermentasi jam ke 36 menunjukkan pita protein dengan ukuran yang lebih kecil lebih banyak terbentuk. Hal ini terlihat dari makin tebalnya pita protein pada berat molekul protein dibawah 37 kDa setelah fermentasi koro kratok jam ke 36. Pada fermentasi koro kratok setelah jam ke 36 tidak terlihat pita protein yang berukuran 75 kDa. Gambar 4 juga menunjukkan bahwa semakin lama waktu fermentasi, semakin tebal pita protein pada berat molekul kecil terbentuk.

Dari hasil SDS page protein koro kratok yang di fermentasi selama 0 hingga 120 jam diketahui bahwa semakin lama waktu fermentasi, semakin tebal pita protein dengan berat molekul kecil dihasilkan. Hal ini disebabkan oleh semakin lama waktu fermentasi, semakin banyak protein yang di potong menjadi peptida – peptida pendek ataupun asam amino. Hal ini berbanding lurus dengan hasil N total (Grafik 2), konsentrasi peptida (Grafik 3) dan derajat hidrolisis (Grafik 4) yang semakin lama waktu fermentasi semakin besar nilai N terlarut, konsentrasi peptida dan derajat hidrolisis. Derajat hidrolisis ini menunjukkan seberapa banyak protein yang terdegradasi menjadi peptida-peptida ataupun asam amino.

## **KESIMPULAN**

Dapat disimpulkan bahwa degradasi protein selama proses fermentasi koro kratok (*Phaseolus lunatus*) menggunakan *Rhizopus oligosporus* berbanding lurus dengan lama waktu fermentasi dimana semakin lama waktu fermentasi, semakin besar degradasi protein koro kratok.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih terutama ditujukan kepada Ibu Retno Indrati Universitas Gadjah Mada yang telah memberikan masukan serta bimbingan atas penelitian yang telah dilakukan. Penelitian ini dibiayai oleh Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi, Tahun Anggaran 2018 melalui skema Penelitian Tim Pascasarjana (No. Kontrak 1778/ UN1/DITLIT/DIT-LIT/LT/2018). Untuk itu peneliti mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abirami, V., S. A. Meenakshi, K. Kanthymathy, R. Bharathidasan, R. Mahalingam and A. Panneerselvam. 2011. Partial purification and characterization of an extracellular protease from *penicillium janthinellum* and *neurospora crassa*. *European Journal of Experimental Biology*. 1(3) :114-123.
- Alexander R.R. dan J.M. Griffiths, 1992, ed ke-2, *Basic Biochemical Methods*, Wiley-Liss, New York.
- AOAC. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 16th Ed. Washington DC : AOAC 2005.
- Cupp-Enyard, C. (2008). Sigma's non-specific protease activity assay - casein as a substrate. *Journal of Visualized Experiment*, 19, 1-2.
- Elegado, FB.,Fuji Y. 1993. Growth of *Rhizopus* Strains on Soybean and Their Protease Formation. *Journal of faculty of agriculture, Kyushu-Univ*, 37:315-324.
- Hardiany, N. S. 2013. Cathepsin dan Calpain: Enzim Pemecah Protein dalam Sel. *eJKI*. 1 (1): 75 – 81.
- Baudoin JP, Rocha O, Degreef J, Maquet A, Guarino L. 2004. Ecogeography, Demography, Diversity and Conservation of *Phaseolus lunatus* L. In the Central Valley of Costa Rica. In: *Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genepools* 12. International Plant Genetic Resource Institute [IPGRI], Roma, Italy.
- Church, F. C., Harold E Swaisgood, D. H. P. and G. L. C. 1983. Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins z, 66.
- de Reu, J.C., R.M. ten Wolde, J. de Groot, M. J. R. Nout, F. M. Rombouts, dan H. Gruppen. (1995). Protein Hydrolysis during Soybean Tempe Fermentation with *Rhizopus oligosporus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(8), 2235–

2239. DOI:10.1021/jf00056a050

- Gandjar, I. dkk. 2006. Mikologi Dasar dan Terapan. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia
- Handayani, M.T., Retno I., Muhammad N.C. 2019. Chemical Characteristics and Activity of ACE Inhibitors on Fractionation of Tempeh Koro Kratok (*Phaseolus lunatus*) Peptide. Indonesian Food and Nutrition Progress 16(2). DOI: <https://doi.org/10.22146/ifnp.46733>
- Hidayat, N., Padaga, Masdiana C., and Suhartini S. 2008. Mikrobiologi Industri. Jakarta: Penerbit Andi.
- Karmini, M., Sutopo, D., dan Hermana. 1996. Aktivitas Enzim Hidrolik Kapang *Rhizopus* sp pada Proses Fermentasi Tempe. Penelitian Gizi dan Makanan 19:93-102.
- Koswara, S. 2009. Teknologi Pengolahan Kedelai (Teori dan Praktek). <http://tekpan.unimus.ac.id/wp-content/uploads/sites/1208/2013/07/Teknologi-Pengolahan-Kedelai-Teori-dan-Praktek.pdf> . Diakses tanggal 11 Oktober 2018
- Laemmli UK. 1970. Cleavage on Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227(5259): 680- 685.
- Maesan, V. D dan Somaatmadja S. 1993. Proses Sumber Daya Nabati Asia Tenggara. Jakarta : Penerbit Gramedia Pustaka Utama.
- Magana, M.D., Maira S.C., Gloróa D.O., David B.A., Luis C.G. 2015. ACE-I Inhibitory Properties of Hydrolysates from Germinated and Ungerminated *Phaseolus lunatus* Proteins. Food Science and Technology 35(1): 167-174.
- Owens JD., Nuraida L. 2014. Sweet, Sour, Alcoholic, Solid Substrate Fungal Fermentations. Di dalam: Owens JD, editor. Indigenous Fermented Food and Nutrition Progress. 3(2) : 21-28.
- Purwoko, T. 2007. Fisiologi Mikroba. Jakarta: Bumi Aksara.
- Starzyńska-Janiszewska, A., B. Stodolak, dan A. Wikiera, (2015). Proteolysis in tempeh-type products obtained with *Rhizopus* and *Aspergillus* strains from grass pea (*Lathyrus Sativus*) seeds. Acta Sci. Pol. Technol. Aliment., 14, 125-132. DOI: 10.17306/J.AFS.2015.2.14
- Rahayu, N A., Muhammad N. C., Retno I., 2019. Pola Perubahan Protein Koro Benguk (*Mucuna pruriens*) Selama Fermentasi Tempe Menggunakan Inokulum Raprima. Agritech, 39 (2): 128-135. DOI: <http://doi.org/10.22146/agritech.41736>
- Rokhmah, L. N. 2008. Kajian Kadar Asam Fitat dan Kadar Protein selama Pembuatan Tempe koro Benguk (*Mucuna pruriens*) dengan variasi pengecilan ukuran dan lama fermentasi. Skripsi. Fakultas Pertanian UNS. Surakarta.
- Sulistyowati, E., Retno A., Das S. 2004. Studi Pengaruh Lama Fermentasi Tempe Kedelai

Terhadap Aktivitas Tripsin. Laporan Penelitian. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Yogyakarta.

Wahyudi, A. 2018. Pengaruh Variasi Suhu Ruang Inkubasi Terhadap Waktu Pertumbuhan *Rhizopus Oligosporus* pada Pembuatan Tempe Kedelai. *Jurnal Universitas PGRI Palembang*, Vol 3(1): 37-44.

Weng, T. M., and Chen M. T. 2011. Effect of Two-Steps Fermentation by *Rhizopus oligosporus* and *Bacillus subtilis* on Protein of Fermented Soybean. *Food Science and Technology Research*, 17, 393-400.

Widaningrum., Widowati S., Soekarto S.T. 2005. Pengayaan Tepung Kedelai Pada Pembuatan Mie Basah Dengan Bahan Tepung Terigu yang Disubstitusi Tepung Garut. *Jurnal Pascapanen*, 2(1): 41-48.

Widowati, S. 2016. *Teknologi Pengolahan Kedelai*. Bogor: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian.