

Kapasitas Pengikatan Kolesterol Serat Inulin Hasil Hidrolisis Enzim Inulinase *Acremonium* Sp-CBS₃ dan *Aspergillus* Sp-CBS₅ untuk Pangan Fungsional

Agustine Susilowati^{1*}, Hakiki Melanie¹, Yety M Iskandar¹, Aspiyanto¹ dan Muflih WS²

¹Pusat Penelitian Kimia-LIPI, PUSPIPTEK, Serpong,

²Fakultas Sains & Teknologi-Program Studi Kimia, UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta

*Email: agustine_1408@yahoo.co.id

Abstrak

Telah dilakukan hidrolisis inulin (komersial) secara bertahap pada skala laboratorium (300 mL) menggunakan enzim β -amilase oleh 2 jenis enzim inulinase yaitu dari kapang *Acremonium* sp-CBS₃ dan *Aspergillus* sp-CBS₅ untuk memperoleh serat inulin sebagai fruktooligosakarida (FOS) dalam kapasitasnya sebagai pengikat kolesterol pada sistem pencernaan. Hidrolisis dilakukan pada konsentrasi enzim inulinase 60% (v/b total gula hidrolisat β -Amilase), pH 5, suhu 30 °C selama 0, 24, 48, 72, 96 dan 120 jam. Hasil penelitian menunjukkan semakin lama waktu hidrolisis mampu meningkatkan SDF (*solouble dietary fiber*), total padatan, gula reduksi, total gula dan CBC (*cholesterol binding capacity*) namun menurunkan IDF (*insolouble dietary fiber*) dan inulin. Kapasitas pengikatan kolesterol (CBC) terbaik, waktu proses hidrolisis optimum menggunakan enzim inulinase *Acremonium* sp-CBS₃ dan *Aspergillus* sp-CBS₅ dicapai masing-masing selama 120 jam yang meningkatkan CBC pH 2 masing-masing sebesar 15.6% dan 15.4% dan peningkatan CBC pH 7 masing-masing sebesar 1.4% dan 7.2% sebelum proses hidrolisis dengan komposisi SDF masing-masing sebesar 32.84% dan 33.89% (berat kering), IDF 27.6% dan 28.25% (berat kering), total padatan 42.52% dan 44.2%, gula reduksi 103.32 mg/mL dan 76.659 mg/mL, total gula 334.017 mg/mL dan 327.958 mg/mL, inulin 33.89% dan 39.51% (berat kering).

Kata kunci : *Acremonium* sp-CBS₃, *Aspergillus* sp-CBS₅, CBC, inulinase, Hidrolisat inulin

Abstract

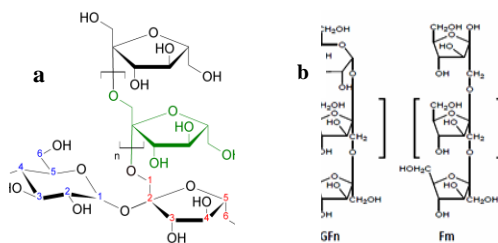
Subsequently, commercial inulin hydrolysis using β -amylase enzyme in laboratory scale (300 mL) followed by adding two kinds of inulinase enzyme from *Acremonium* sp-CBS₃ and *Aspergillus* sp-CBS₅, respectively to get inulin fiber as fructooligosaccharides (FOS) in its capacity to bind cholesterol in digestive syatem has been conducted. Hydrolysis was performed at concentration of inulinase enzyme of 60% (v/w total sugar of hydrolysate of β -Amylase), pH 5 and 30 °C for 0, 24, 48, 72, 96 and 120 hours. The result of experiment showed that long time of hydrolysis would increase soluble dietary fiber (SDF), total solids, reducing sugar, total sugar and cholesterol binding capacity (CBC) and decreased insoluble dietary fiber (IDF) and inulin. Based on the best CBC, optimum time of hydrolysis process using inulinase enzymes of *Acremonium* sp-CBS₃ and *Aspergillus* sp-CBS₅ were reached for 120 hours and 120 hours increasing CBC at pH 2 were 15.6% and 15.4%, and CBC at pH 7 were 1.4% and 7.2% from before hydrolysis process, respectively. In this condition gave compositions of SDF of 32.84% and 33.89% (dry weight), IDF of 27.6% and 28.25% (dry weight), total solids of 42.52% and 44.2%, reducing sugar of 103.323 mg/mL and 76.659 mg/mL, total sugar of 334.017 mg/mL and 327.958 mg/mL, inulin of 33.89% and 39.51% (dry weight).

Keywords : *Acremonium* sp-CBS₃, *Aspergillus* sp-CBS₅, CBC, inulinase, Inulin hydrolysate

1. PENDAHULUAN

Kapasitas pengikatan kolestrol adalah kemampuan serat inulin dalam mengabsorbsi kolesterol sebagai suatu model dalam sistem pencernaan (Susilowati *et al.* 2012). Inulin

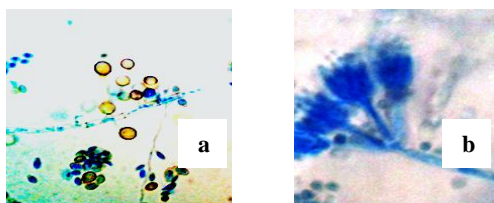
adalah suatu polimer fruktosa yang mengandung sekitar 35 unit fruktosa yang dihubungkan satu sama lain dalam rantai lurus oleh ikatan β -2,1 glikosida (Gambar 1a).



Gambar 1 Struktur kimia inulin (a) dan fruktooligosakarida (b) (Leenheer and Hoebregs 1994; Roberfroid 2007)

Setiap molekul inulin mempunyai glukosa pada ujung awal rantai. Serat larut air (*soluble dietary fiber*) dan serat tak larut air (*insoluble dietary fiber*) dari inulin diyakini sebagai fruktooligosakarida (Gambar 1b) yang dapat difermentasi secara sempurna oleh enzim ekstraselluler bakteri-bakteri usus dalam sistem pencernaan untuk menghasilkan asam-asam lemak rantai pendek (SCFAs) yang dapat memperlambat laju kolesterol plasma (Franck, 2000).

Hidrolisis inulin akan menghasilkan FOS yang memiliki karakteristik yang berbeda sesuai dengan jenis enzim inulinase yang digunakan. Kapang *Acremonium* sp-CBS₃ dan *Aspergillus* sp-CBS₅ (Gambar 2), diketahui memiliki enzim inulinase yang dapat menghidrolisis inulin membentuk fruktooligosakarida dengan karakteristik yang berbeda berdasarkan berat molekul rata-rata pada spektrum masa melalui analisis LCMS.

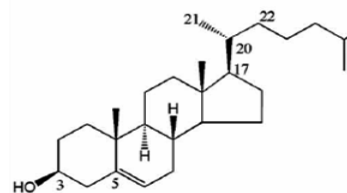


Gambar 2 *Acremonium* sp-CBS₃ (a) dan *Aspergillus* sp-CBS₅ (b) (Susilowati *et al.* 2013)

Hidrolisat inulin *Aspergillus* sp-CBS₅ dengan bahan awal inulin dari umbi dahlia (*Dahlia* sp.) lokal Sukabumi menghasilkan FOS dengan berat molekul rata-rata yang lebih

rendah daripada FOS yang dihasilkan oleh hidrolisat inulin *Acremonium* sp-CBS₃ (Susilowati *et al.* 2013). Perbedaan tersebut menyebabkan kedua jenis hidrolisat memiliki perbedaan kemampuan dalam mengikat kolesterol pada sistem pencernaan. *Acremonium* sp-CBS₃ termasuk dalam divisi *Ascomycota*, sedangkan *Aspergillus* sp-CBS₅ termasuk dalam divisi yang sama namun dari genus *Aspergillus*.

Kolesterol (Gambar 3) adalah suatu molekul lemak di dalam sel, merupakan komponen membran sel dan komponen sel otak maupun saraf yang diperlukan oleh tubuh dalam jumlah sedikit. Kolesterol berlebih di dalam tubuh akan menimbulkan berbagai penyakit degeneratif seperti penyakit jantung koroner, kanker, hipertensi, dan diabetes.



Gambar 3 Struktur kolesterol (Anomin 2013)

Ada beberapa mekanisme pengikatan kolesterol oleh serat pangan, diantaranya adalah melalui peningkatan ekskresi sterol netral dan asam empedu pada *faeces* yang menunjukkan terjadinya degradasi kolesterol dalam hati (*lever*) atau suatu penurunan reabsorpsi dari sistem pencernaan (Eastwood 1984). Hal ini dapat dipicu oleh terjadinya perubahan flora intestinal akibat terjadinya fermentasi bakteri-bakteri usus (*Bifidobacterium*) membentuk asam-asam lemak tak jenuh (asetat, propionat dan butirrat) yang akan mempengaruhi struktur sterol dan asam empedu (Muchtadi 1989; Ooi dan Liong 2010). Asam asetat dipergunakan sebagai sumber energi utama di dalam kolon, propionat dapat menekan sintesis kolesterol, sedangkan butirrat diduga berperan dalam menekan proliferasi sel kanker (Brownlee *et al.* 2006).

Propionat juga efektif menghambat sintesis kolesterol pada sel hati yang telah diisolasi (Demigne *et al.* 1995).

Beberapa alasan lainnya adalah penghambatan emulsifikasi lemak dan kolesterol oleh garam empedu, sehingga kolesterol akan terikat oleh serat yang kemudian akan dikeluarkan melalui ekskreta. Upaya untuk memproduksi kembali asam empedu yang hilang, hati akan menarik kolesterol dari darah, sehingga kadar kolesterol darah akan menurun. Kerja fisiologis serat di dalam usus kecil disebabkan adanya pembentukan gel, daya ikat air, pertukaran kation dan sifat-sifat penyerapan asam empedu (Eastwood 1984). Untuk menguji efek perolehan serat pangan larut air terhadap kolesterol dilakukan analisis kapasitas pengikatan kolesterol (*cholesterol binding capacity/CBC*), yaitu kemampuan hidrolisat inulin dalam mengikat kolesterol.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan pengikatan kolesterol oleh serat inulin sebagai SDF yang dihasilkan dari hidrolisis menggunakan enzim inulinase kapang endofit dengan waktu hidrolisis yang berbeda pada kondisi hidrolisis tetap (konsentrasi enzim inulinase, pH, suhu proses).

2. METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan utama penelitian ini berupa inulin (komersial, Orafiti-Belgia), etanol 30% dan 50%, enzim β -Amilase (NOVO), kultur kapang *Acremonium* sp-CBS₃ dan *Aspergillus* sp-CBS₅ dari Pusat Penelitian Kimia-LIPI, membran mikrofiltrasi 0.15 μ , bahan-bahan kimia untuk proses hidrolisis dan bahan-bahan kimia untuk analisis. Alat yang digunakan adalah *shaker*, sistem sel mikrofiltrasi berpengaduk (Amicon), spektrofotometer UV-VIS dan pH-meter.

Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan inulin (komersial) melalui hidrolisis enzim

inulinase dari kapang *Acremonium* sp-CBS₃ dan *Aspergillus* sp-CBS₅ pada konsentrasi enzim 60% (v/b total gula hidrolisat β -amilase), pH 5, suhu 30 °C selama 0, 24, 48, 56, 72 dan 120 jam. Analisis dilakukan terhadap SDF dan IDF (Modifikasi *Enzymatic-Gravimetric* dan premisahan melalui mikrofiltrasi) (Prosky *et al.* 1988; Susilowati *et al.* 2012), total padatan (metode gravimetri), gula reduksi (metode Somogyi-Nelsen), total gula (metode Fenol-Sulfat) (Anonim 1995), inulin (metoda N. Nelson) (Chaplin dan Kennedy 1994), *Cholesterol Binding Capacity/CBC* (Zhang *et al.* 2011) dan aktivitas inulinase (metode DNS) (Niness 1999).

Pembuatan Enzim Inulinase *Acremonium* sp-CBS₃ dan *Aspergillus* sp-CBS₅

Sejumlah medium selektif steril (25 mL) yang mengandung 0.5% (NH₄)₂PO₄, 0.05% MgSO₄.7 H₂O, 0.015% FeSO₄ dan 1% inulin komersial (Orafiti) pada pH 5, ditambahkan dengan 1–2 ose masing-masing kultur kapang *Acremonium* sp-CBS₃ dan *Aspergillus* sp-CBS₅ dan diinkubasi dalam inkubator goyang pada kecepatan putar 100 rpm, suhu 30 °C selama 5 x 24 jam. Pada proses ini volume medium selektif inulinase dibuat sesuai dengan rancangan penelitian. Perolehan suspensi kultur selanjutnya disentrifugasi pada 4000 rpm selama 15 menit, filtrat yang dihasilkan merupakan enzim inulinase.

Hidrolisis Inulin

Sejumlah inulin (komersial) diatur pada pH 5 dan ditambahkan enzim β -amilase pada konsentrasi 0.08% (volume/berat pati inulin) dan dihidrolisis pada suhu 60 °C selama 120 menit disertai agitasi 140 rpm dan sehingga diperoleh hidrolisat (I). Pada hidrolisat I ditambahkan enzim inulinase *Acremonium* sp-CBS₃ dan *Aspergillus* sp-CBS₅ masing-masing pada konsentrasi 60% (volume/berat total gula), pH 5 dan dihidrolisis kembali pada suhu 30 °C dengan agitasi 140

rpm selama 0, 24, 48, 56, 72 dan 120 jam. Pada setiap selang waktu hidrolisis dilakukan sampling sebagai serat inulin (suspensi hidrolisat II).

Analisis Serat Inulin sebagai SDF dan IDF

Hidrolisat inulin (II) diisikan dalam sistem sel mikro filtrasi berpengaduk menggunakan membran mikro filtrasi 0.15 μm berkapasitas 180 mL, diputar pada kecepatan putar pengaduk 400 rpm dan dengan mengalirkan gas nitrogen pada tekanan 40 psia selama 60 menit. Permeat atau ekstrak yang lolos ditampung sebagai SDF, sedangkan retentat atau pekatan sebagai IDF. Retentat dan permeat selanjutnya di presipitasi dengan penambahan etanol melalui cara melarutkan dalam 4 bagian volume etanol 95%, disaring, dicuci dengan etanol 70% sebanyak 3 kali, etanol 95% sebanyak 2 kali dan aseton sebanyak 2 kali (Prosky *et al.* 1988). Komponen tercuci selanjutnya dikeringkan pada 50 °C selama 24-48 jam sebagai SDF dan IDF murni.

Analisis Kapasitas Pengikatan Kolesterol (Cholesterol Binding Capacity/CBC)

Sejumlah tepung kuning telur (2.5 g) dan 2 g serat inulin terfermentasi dikocok dengan 50 mL air deionisasi, diatur keasamannya masing-masing pada pH 7.0 dan 2.0 (menyerupai kondisi pH masing-masing dalam lambung dan usus kecil), digoyangkan pada kecepatan putar 80 rpm selama 2 jam dalam *water bath* dengan suhu 37 °C. Setelah itu ditambahkan 16 mL etanol absolut dan disentrifugasi pada 4000 rpm selama 20 menit, diambil 1 mL supernatan dan diencerkan 5 kali menggunakan asam asetat 90% dan diuapkan pada suhu 40 °C selama 1 jam. Pada hasil penguapan ini (1 mL) ditambahkan 0.1 mL reagen O-phthaladehid (50 mg dalam 100 mL asam asetat 90%), selanjutnya ditambahkan 2 mL asam sulfat pekat dan dihomogenkan, didiamkan selama 20 menit. Analisis dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-VIS pada

λ 550 nm dan dibandingkan dengan blanko (Zhang *et al.* 2011).

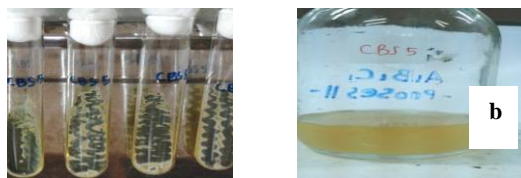
Konsentrasi kolesterol dalam sampel ditentukan dengan membandingkan kurva standar dari larutan standar kolesterol melalui rumus sebagai berikut: $\text{CBC (mg/g)} = [C_1 - (C_2 - C_3) \times F_p] \times 50/w$, dimana, C_1 =Konsentrasi kolesterol pada kuning telur; C_2 =Konsentrasi blanko kuning telur; C_3 = Konsentrasi kuning telur dan sample; F_p =Faktor pengenceran; 50= volume adsorpsi (mL); W = berat sampel sebagai serat pangan (g).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

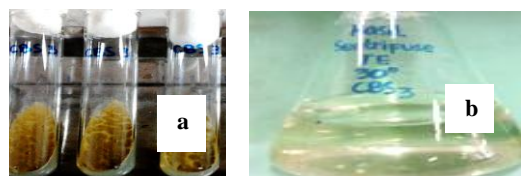
Karakteristik Isolat dan Enzim Inulinase *Acremonium Sp-CBS₃* dan *Aspergillus Sp-CBS₅*

Isolat kapang *Aspergillus sp-CBS₅* dalam media selektif tampak menyerupai beludru (*velvety*), berlipat, berwarna hijau kebiruan yang dengan semakin bertambahnya waktu pertumbuhan menjadi hijau-biru kecoklatan yang spesifik. Dalam produksi enzim inulinase, *Aspergillus sp-CBS₅* menghasilkan suspensi enzim inulinase dengan gradasi warna antara coklat muda sampai kecoklatan dengan aktivitas spesifik inulinase sebesar 0.034 U/mL. Sedangkan isolat kapang *Acremonium sp-CBS₃* tampak sebagai koloni yang halus dengan gradasi warna putih sampai putih kecoklatan. Semakin lama waktu pertumbuhan, tampak gradasi warna pigmen hijau tua, mengerak pada lapisan bawah tabung dan terdapat spora pada permukaan media. *Acremonium sp-CBS₃* menghasilkan suspensi enzim inulinase yang jernih, tak berwarna dengan aktivitas spesifik inulinase sebesar 0.053 U/mL.

Gambar 4 dan 5 masing-masing memperlihatkan Isolat kapang *Aspergillus sp-CBS₅* dan *Acremonium sp-CBS₃* dalam media PDA pada inkubasi 7 hari, suhu 30 °C dan enzim inulinase dari kedua jenis kapang tersebut.



Gambar 4 Isolat kapang *Aspergillus* sp-CBS₅ (a) dalam media PDA pada inkubasi 7 hari, suhu 30 °C dan enzim inulinase dari enzim *Aspergillus* sp-CBS₅ (b)



Gambar 5 Isolat kapang *Acremonium* sp-CBS₃ dalam media PDA pada inkubasi 7 hari, suhu 30 °C (a) dan enzim inulinase dari kapang *Acremonium* sp-CBS₃ (b).

Karakteristik Inulin Komersial dan Hidrolisat Inulin Oleh β -Amilase

Inulin (komersial, orafti, Belgia) berupa serbuk menyerupai tepung (Gambar 6a). Setelah mengalami hidrolisis menggunakan enzim β -amilase pada konsentrasi 0.08% (v/b inulin kering), pada suhu 60 °C selama 2 jam pada pH 5, diperoleh suspensi kental (Gambar 6b).



Gambar 6 Inulin (komersial) dan hidrolisat inulin dari hidrolisis menggunakan enzim β -Amylase sebagai bahan baku dalam perolehan serat inulin untuk pengikat kolesterol

Inulin berasa sedikit manis, tidak beraroma dengan kelarutan dalam air 120 g/L pada 25 °C. Inulin (komersial) memiliki 3 jenis spesifikasi yaitu inulin standar, inulin standar tinggi dan oligofruktosa yang mengandung unit glukosil dan fruktosil

berurut-turut sebesar 2-60 unit (GF_n 2_n≤60), 10-60 unit (GF_n 10_n≤60) dan 2-7 unit (GF_n 2_n≤7). Dengan derajat polimerasi berturut-turut sebesar 12, 25 dan 4 (Franck 2000).

Spesifikasi jenis inulin akan berpengaruh terhadap perolehan serat inulin sebagai FOS. Dalam penelitian ini, jenis inulin yang digunakan adalah jenis standar inulin dimana tingkat kemanisan hanya 10% (terhadap sukrosa = 100%), rasa netral, berupa serbuk putih dengan sifat fungsional sebagai pengikat lemak. Komposisi bahan awal (inulin komersial) dan hidrolisat β -amilase menunjukkan perbedaan seperti ditunjukkan pada tabel 1.

Telah diketahui bahwa enzim inulinase hanya akan memotong gugus polimer fruktosa sebagai fruktooligosakarida (FOS). Penggunaan enzim β -amilase pada hidrolisis I ini dimaksudkan untuk memotong unit glukosil dari ikatan β -(2-1) glikosidik pada rangkaian monomer fruktosa inulin melalui inversi konfigurasi posisi atom C nomor 1 molekul glukosa dari α menjadi β (Anonim 2002), sehingga perlehan glukosa akan berkontribusi terhadap TDF (*total dietary fiber*) yaitu SDF dan IDF, apabila dibandingkan bila hanya menggunakan enzim inulinase saja. Hidrolisis enzim β -amilase (0.08% v/b) menghasilkan peningkatan gula reduksi, SDF dan IDF namun penurunan konsentrasi total padatan, inulin, total gula oleh pengaruh kondisi proses hidrolisis. Terhadap CBC, proses hidrolisis menurunkan CBC baik pada pH 7 maupun pH 2, hal ini kemungkinan disebabkan terjadinya penurunan komponen oleh interaksinya dengan tingkat keasamaan yang secara keseluruhan akan menurunkan CBC, selain dari sifat fungsional masing-masing komponen. Pada saat inulin maupun hidrolisat inulin pada kondisi asam (pH 2, merupakan model kondisi dalam lambung) akan menghasilkan CBC yang lebih rendah dibandingkan dengan CBC pada pH 7 (merupakan model kondisi dalam usus). Hal ini memperlihatkan bahwa inulin maupun hidrolisat inulin diduga lebih efektif dalam

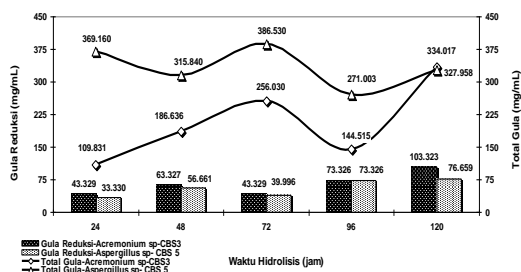
mengikat kolesterol dalam lambung dari pada dalam usus.

Tabel 1 Komposisi inulin dan hidrolisat inulin hasil hidrolisis menggunakan enzim β-amilase

Jenis Komponen	Inulin Komersial	Hidrolisat Inulin
Gula reduksi (mg/mL)	22.25	34.56
Total gula (mg/mL)	137.43	95.76
Inulin (% berat kering)	68.2	59.1
Total padatan (%)	97.98	40.14
IDF (% berat kering)	21.33	43.78
SDF (% berat kering)	15.74	29.75
CBC pH 2 (mg/g)	78.40	76.09
CBC pH 7 (mg/g)	84.19	78.92

Total Gula (mg/mL) dan Gula Reduksi (mg/mL)

Peningkatan waktu hidrolisis telah meningkatkan gula reduksi pada hidrolisat baik pada penggunaan enzim inulinase kapang *Acremonium* sp-CBS₃ maupun *Aspergillus* sp-CBS₅. Meskipun kenaikan tersebut fluktuatif namun optimisasi terjadi pada waktu 120 jam hidrolisis dengan menghasilkan gula reduksi masing-masing sebesar 103.323 mg/mL dan 76.659 mg/mL (Gambar 7).



Gambar 7 Hubungan antara waktu hidrolisis dan jenis enzim inulinase terhadap gula reduksi dan total gula pada perolehan serat inulin sebagai anti kolesterol

Secara keseluruhan enzim inulinase kapang *Acremonium* sp-CBS₃ menghasilkan

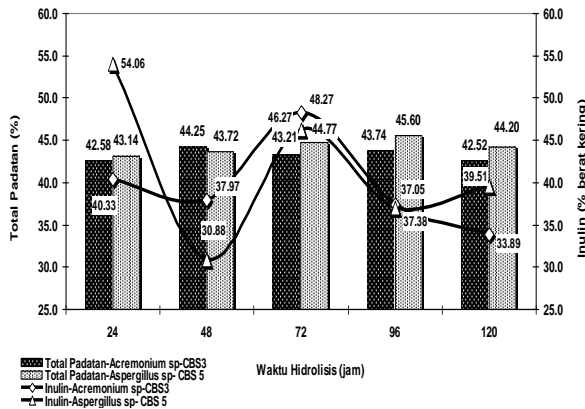
gula reduksi yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan enzim inulinase kapang *Aspergillus* sp-CBS₅ pada seluruh perlakuan proses. Hal ini diduga selain dari aktifitas inulinase kapang *Acremonium* sp-CBS₃ yang lebih tinggi (0.053 U/mL) dibandingkan dengan aktivitas enzim inulinase *Aspergillus* sp-CBS₅ (0.034 U/mL), juga oleh kondisi proses hidrolisis dan faktor interent kapang.

Gula reduksi merupakan parameter hidrolisis dimana enzim inulinase akan menghidrolisis polimer fruktosa membentuk unit-unit fruktosa yang lebih kecil yaitu sebagai fruktooligosakarida (FOS). Hidrolisis inulin menggunakan *Acremonium* sp CBS₃ dan *Aspergillus* sp CBS₅ meningkatkan gula reduksi masing-masing sebesar 67.2% dan 54.92% bila dibandingkan sebelum proses (34.56 mg/mL) menjadi 103.32 mg/mL dan 76.66 mg/mL. Kenaikan total gula juga tampak pada perlakuan proses menggunakan *Acremonium* sp-CBS₃ dimana optimisasi dicapai pada 120 jam dengan menghasilkan total gula total gula sebesar 334.02 mg/mL, namun menurun pada penggunaan enzim inulinase *Aspergillus* sp-CBS₅ meskipun secara keseluruhan terjadi peningkatan total gula dibandingkan sebelum proses hidrolisis.

Hidrolisis inulin menggunakan *Acremonium* sp-CBS₃ dan *Aspergillus* sp-CBS₅ mampu meningkatkan total gula masing-masing sebesar 77.33% dan 70.8% bila dibandingkan sebelum proses (95.76 mg/mL) menjadi 334.02 mg/mL dan 327.96 mg/mL pada 120 jam hidrolisis. Kenaikan total gula diduga disebabkan oleh lebih terakumulasinya fruktosa dan glukosa oleh pengurangan air selama proses hidrolisis.

Total Padatan (%) dan Inulin (%berat kering)

Proses hidrolisis menggunakan enzim inulinase kapang *Acremonium* sp-CBS₃ dan *Aspergillus* sp-CBS₅ menghasilkan peningkatan total padatan namun menurunkan konsentrasi inulin sejalan dengan meningkatnya waktu hidrolisis (Gambar 8).



Gambar 8 Hubungan antara waktu hidrolisis dan jenis enzim inulinase terhadap total padatan dan inulin pada perolehan serat inulin sebagai anti kolesterol

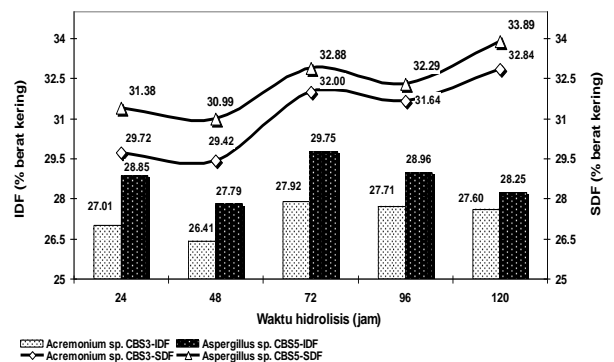
Total padatan adalah akumulasi seluruh komponen pada hidrolisat, baik terlarut maupun tak terlarut yang memperlihatkan keseluruhan hasil proses hidrolisis. Konsentrasi inulin semakin menurun dengan bertambahnya waktu hidrolisis baik pada penggunaan enzim inulinase dari *Aspergillus* sp-CBS₅ maupun dari *Acremonium* sp-CBS₃ meskipun penurunan ini berlangsung secara fluktuatif. Diduga hal ini disebabkan dengan semakin lamanya hidrolisis akan menyebabkan semakin larutnya inulin oleh aktivitas enzim inulinase membentuk fruktooligosakarida. Hal ini menyebabkan penurunan konsentrasi inulin, namun meningkatkan total padatan pada seluruh perlakuan.

Aktivitas enzim inulinase *Acremonium* sp-CBS₃ yang lebih tinggi (0.053 U/mL) menyebabkan perolehan FOS sebagai gula reduksi yang lebih tinggi sehingga lebih banyak fruktooligosakarida terlarut sehingga total padatnya lebih rendah dibandingkan dengan hidrolisat menggunakan enzim *Aspergillus* sp-CBS₅ yang memiliki aktivitas inulinase yang lebih rendah (0.034 U/mL) sehingga menghasilkan total padatan yang lebih tinggi pada seluruh perlakuan proses. Secara keseluruhan hidrolisis inulin menggunakan *Acremonium* sp-CBS₃ dan *Aspergillus* sp-CBS₅ mampu meningkatkan total padatan masing-masing sebesar 5.6% dan

18% bila dibandingkan sebelum proses (40.14%) masing-masing menjadi 42.52% dan 44.2% pada 120 jam hidrolisis. Proses hidrolisis menggunakan *Acremonium* sp-CBS₃ dan *Aspergillus* sp-CBS₅ juga mampu menurunkan konsentrasi inulin masing-masing sebesar 42.67% dan 33.15% dari sebelum proses (59.1%) masing-masing menjadi 33.88% dan 39.51% pada 120 jam hidrolisis.

SDF dan IDF (% berat kering)

Proses hidrolisis menghasilkan hidrolisat inulin dengan SDF dan IDF yang cenderung meningkat, sejalan dengan meningkatnya waktu hidrolisis (Gambar 9).



Gambar 9 Hubungan antara waktu hidrolisis dan jenis enzim inulinase terhadap SDF dan IDF perolehan serat inulin sebagai anti kolesterol

Kadar IDF memperlihatkan hasil yang fluktuatif dimana tampak terjadinya penurunan kadar IDF pada 48 jam hidrolisis selanjutnya optimum pada 72 jam dan kembali menurun pada 120 jam proses hidrolisis baik pada penggunaan enzim inulinase *Acremonium* sp-CBS₃ maupun *Aspergillus* sp-CBS₅.

Hidrolisis menggunakan enzim inulinase *Aspergillus* sp-CBS₅ menghasilkan kadar IDF yang lebih tinggi dibandingkan dengan penggunaan enzim inulinase *Acremonium* sp-CBS₃ pada seluruh perlakuan waktu hidrolisis, masing-masing optimal pada 72 jam hidrolisis dengan menghasilkan kadar IDF masing-masing sebesar 29.75% dan

27.92% (berat kering). Meskipun demikian secara keseluruhan proses ini menurunkan IDF dibandingkan sebelum proses (29.75% berat kering) masing-masing sebesar 7.23% dan 5% dari masing-masing sebesar 27.6% dan 28.25 % pada 120 jam hidrolisis. Diyakini bahwa IDF merupakan bagian dari inulin yang tak terdegradasi oleh enzim inulinase dimana sebagian telah menjadi fruktooligosakarida sebagai SDF sehingga konsentrasi SDF akan berbanding terbalik dengan IDF oleh karena *total dietary fiber* (TDF) adalah penjumlahan dari konsentrasi IDF dan SDF (Bennik 1994).

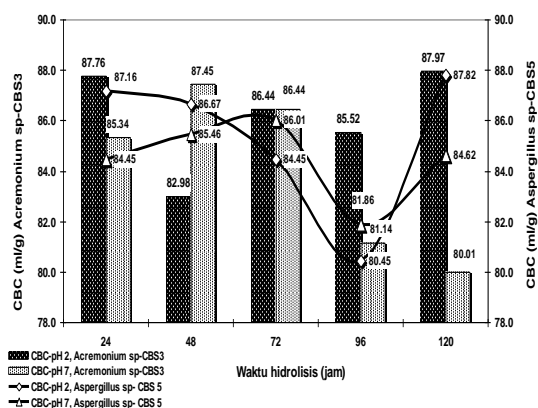
Peningkatan SDF tampak pada kedua jenis hidrolisat inulin dimana penggunaan enzim inulinase *Aspergillus* sp-CBS₅ menghasilkan SDF yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan penggunaan enzim inulinase *Acremonium* sp-CBS₃ pada seluruh perlakuan waktu hidrolisis. Semakin lama waktu hidrolisis SDF makin meningkat dimana optimum pada 120 jam hidrolisis dimana hidrolisis menggunakan enzim inulinase *Acremonium* sp-CBS₃ dan *Aspergillus* sp-CBS₅ menghasilkan SDF masing masing sebesar 32.84% dan 33.89%. Pada kondisi ini terjadi peningkatan SDF masing-masing sebesar 14.19% dan 17.84% dari SDF bahan awal proses tanpa proses hidrolisis sebesar 28.76%. SDF adalah serat pangan tak larut dalam air yang tak tercernakan oleh enzim-enzim pencernaan, dalam hal ini teridensifikasi sebagai fruktooligosakarida dan turunan-turunannya sebagai komponen berberat molekul rendah melalui LCMS (Susilowati *et al.* 2012).

Pada saat hidrolisis berlangsung, interaksi aktivitas inulinase, jenis substrat dan kondisi operasi (suhu, pH) diduga berpengaruh pada perolehan SDF. Pemotongan gugus-gugus fruktosa oleh inulinase bersifat spesifik sesuai dengan jenis inulinase masing-masing kapang, meskipun aktifitas inulinase kapang *Acremonium* sp-CBS₃ lebih tinggi (0.053 U/mL) dari pada aktifitas enzim inulinase *Aspergillus* sp-CBS₅ (0.034 U/mL) hal ini tidak selalu berkontribusi terhadap perolehan SDF. Proses hidrolisis juga memungkinkan

terjadinya proses pencoklatan (*browning*) oleh adanya reaksi maillard yang menyebabkan terbentuknya komponen melanoidin yang tak larut dalam air sehingga menurunkan SDF (Belitz 1999).

Kapasitas Pengikatan Kolesterol (CBC)

Proses hidrolisis menghasilkan hidrolisat inulin dengan CBC yang berfluktuatif baik pada pH 2 (sesuai dengan pH lambung) maupun pada pH 7 (sesuai dengan pH usus) seperti ditunjukkan pada gambar 10.



Gambar 10 Hubungan antara waktu hidrolisis dan jenis enzim inulinase terhadap CBC pH 2 dan CBC pH 7 perolehan serat inulin sebagai anti kolesterol

Hidrolisat inulin hasil hidrolisis enzim inulinase *Acremonium* sp-CBS₃ menghasilkan optimisasi CBC pH 2 pada 120 jam sebesar 87.97 mg/g, lebih tinggi bila dibandingkan dengan CBC pH 7 yang maksimal dicapai pada 48 jam proses (87.45 mg/g). Hal ini menunjukkan bahwa pada tingkat keasaman yang lebih tinggi, akan membutuhkan waktu hidrolisis yang semakin lama untuk memperoleh CBC terbaik, sedangkan pada pH 7 akan memerlukan waktu hidrolisis yang lebih pendek. Perbedaan ini diduga disebabkan fluktuatifnya total padatan, yaitu seluruh komponen hidrolisat selama proses berlangsung yang memungkinkan berpengaruh dalam sifat absorpsi kolesterol.

Kecenderungan yang sedikit berbeda tampak pada proses hidrolisis menggunakan

enzim inulinase *Aspergillus* sp CBS₅ dimana optimisasi CBC pH 2 sebesar 87.82 mg/g dicapai selama 120 jam proses, lebih tinggi dibandingkan dengan CBC pH 7 sebesar 86.01 mg/g yang dicapai dengan waktu hidrolisis 72 jam. Perbedaan perolehan CBC ini dimungkinkan terjadi karena aktivitas enzim inulinase *Aspergillus* sp-CBS₅ yang lebih rendah (0.034 U/mL) dibandingkan dengan *Acremonium* sp-CBS₃ (0.053 U/mL) sehingga memerlukan waktu yang lebih lama untuk mengakumulasi seluruh komponen hidrolisat yang diduga berpengaruh terhadap absorpsi kolesterol. Secara keseluruhan tampak bahwa perolehan hidrolisat menggunakan enzim inulinase *Acremonium* sp-CBS₃ dan *Aspergillus* sp-CBS₅ tersebut menghasilkan CBC pH 2 optimum yang dicapai pada 120 jam proses hidrolisis, masing-masing meningkatkan CBC pH 2 sebesar 15.6% dan 15.4% dari 76.09 mg/g menjadi masing-masing sebesar 87.97 mg/g dan 87.82 mg/g. Sedangkan pada CBC pH 7 optimisasi dicapai oleh hidrolisat menggunakan enzim inulinase *Aspergillus* sp CBS₅ pada 48 jam proses yang meningkatkan CBC sebesar 10.8% dari sebesar 78.92 mg/g menjadi 87.45 mg/g, sedangkan optimisasi CBC pH 7 menggunakan enzim inulinase *Acremonium* sp-CBS₃ dicapai pada 72 jam hidrolisis sebesar 86.01 mg/g yang meningkatkan CBC pH 7 sebesar 9% dari sebesar 78.92 mg/g menjadi 86 mg/g.

Secara keseluruhan tampak bahwa perolehan hidrolisat menggunakan kedua jenis enzim inulinase tersebut menghasilkan CBC pH 2 yang lebih baik dari pada CBC pH 7 yang dicapai pada 120 jam proses hidrolisis, dengan kata lain kemampuan mengikat kolesterol hidrolisat inulin akan lebih efektif dalam usus (pH 2) dibandingkan dalam lambung (pH 7).



Gambar 11 Hidrolisat inulin hasil hidrolisis enzim inulinase *Acremonium* sp-CBS₃ (a) dan *Aspergillus* sp-CBS₅ (b) pada pada konsentrasi 60% (volume/berat total gula), pH 5, suhu 30 °C selama 120 jam dengan agitasi 140 rpm

Gambar 11 memperlihatkan hidrolisat inulin masing-masing menggunakan enzim inulinase *Acremonium* sp-CBS₃ dan *Aspergillus* sp-CBS₅ dari proses hidrolisis selama 120 jam pada CBC pH 2.

4. SIMPULAN

Kondisi proses hidrolisis berpengaruh terhadap komposisi dan kapasitas pengikatan kolesterol hidrolisat. Semakin lama waktu hidrolisat mampu meningkatkan total gula, gula reduksi, total padatan, SDF dan CBC pH 2 dan CBC pH 7, namun menurunkan inulin dan IDF dibandingkan dengan sebelum proses hidrolisis. Kapasitas pengikatan kolesterol (CBC) terbaik diperoleh pada waktu proses hidrolisis optimum menggunakan enzim inulinase *Acremonium* sp-CBS₃ dan *Aspergillus* sp-CBS₅ dicapai masing-masing selama 120 jam yang meningkatkan CBC pH 2 masing-masing sebesar 15.6% dan 15.4 % dari 76.09 mg/g menjadi sebesar 87.97 mg/g dan 87.82 mg/g. Pada kondisi ini dihasilkan peningkatan CBC pH 7 masing-masing sebesar 1.4% dan 7.2 % dari sebelum proses hidrolisis sebesar 78.92 mg/g menjadi sebesar 80 mg/g dan 84.62 mg/g. Komposisi hidrolisat menggunakan enzim inulinase *Acremonium* sp-CBS₃ dan *Aspergillus* sp-CBS₅ masing-masing menunjukkan SDF sebesar 32.84% dan 33.89%, IDF 27.6% dan 28.25%, total padatan 42.52% dan 44.2%, gula reduksi 103.32 mg/mL dan 76.659 mg/mL, total gula 334.017

mg/mL dan 327.958 mg/mL; inulin 33.89% dan 39.51% .

Daftar Pustaka

- Anonymous. 1995. Official Methods of Association of Analytical Chemistry. Whasington DC (USA): AOAC Inc.
- Anonymous. 2013. Kolesterol. [Internet]. [diunduh 2013 Mei 23]. Tersedia pada: http://farmasiku.com/index.php?Target=categories&category_id=194.
- Anonim. 2002. Amylase. [Internet]. EN [diunduh 2013 Mei 23]. Tersedia pada: <http://en.wikipedia.org/wiki/Amylases>.
- Belitz HD, Grosch W. 1999. Food Chemistry. Second Edition. Berlin: Springer-Verlag Heidelberg.
- Bennik. 1994. Fiber Analysis. Di dalam: Nielsen SS. Introduction to The Chemical Analysis of Foods. London (UK): Jones and Bartletr Publisher.
- Brownlee IA, Dettmar PW, Strugala V, Pearson JP. 2006. The interaction of dietary fibres with the colon. *Current Nutrition and Food Science*. 2: 243-246.
- Chaplin MF, JF Kennedy. 1994. Carbohydrat Analysis: A Practical Approach. 2nd Edition. Oxford (UK): Oxford University Press.
- Demigne C, Morand C, Levrat MA, Besson C, Moundras C, Remesy C. 1995. Effect of propionat on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *British Journal of Nutrition*. 74: 209-219.
- Eastwood MA. 1984. Present Knowledge in Nutrition. Fifth Edition. London (UK): The Nutrition Foundation Inc.
- Franck AME. 2000. Inulin and Oligofruktose, ORAFTI Active Food Ingredients. Di dalam: Lfra Ingredients Handbook. Prebiotics and Probiotics, Glen Gibson & Fiona Angus, LFRA Limited Randalls Roads, Leatherhead, Surrey KT22 7RY
- Leenheer D, Hoebregs H. 1994. Progress in evolucidation of composition of chicory inulin starch. 46(5): 193–196. Di dalam Anne ME, Frank. 2000. Inulin and Oligofruktose, ORAFTI Active Food Ingredients. Research and Development. Belgium (kode negara): LFRA Ingredients Handbook, Prebiotics and Probiotics, Glen Gibson & Fiona Angus, LFRA Limited Randalls Roads, Leatherhead, Surrey KT22 7RY.
- Muchtadi D. 1989 Evaluasi Nilai Gizi Pangan. Departemen Pendidikan & Kebudayaan, Dirjen Perguruan Tinggi, PAU, IPB. Bogor (ID): IPB Press.
- Niness KR. 1999. Inulin and oligofruktose: what are they?. *Journal of Nutrition*. 129: 1402S-14604S.
- Ooi LG, Liong MT. 2010. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *Int. J. Mol. Sci*. 11: 2499-2522.
- Proscky L, Asp NG, Schweizer TF, Devries JW, Furda I. 1988. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products. Interlaboratory study. *Journal Association Official Analytical Chemists*. 71: 1017-1023.
- Roberfroid. 2007. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *J. Nutr*. 137: 2493-502S.
- Susilowati A, Melanie H, Aspiyanto, Maryati Y. 2012. Pengembangan pangan fungsional berbasis inulin dari umbi dahlia (*Dahlia* spp.) Sebagai serat pangan larut air (SDF) untuk anti kolesterol. Makalah Hasil Penelitian, Program Tematik, Kedepatian IPT, Tahun Anggaran 2012, Pusat Penelitian Kimia-LIPI, Kawasan PUSPIPTEK, Serpong, Tangerang.
- Susilowati A, Lotulung PD, Aristiawan Y. 2013. Potensi umbi dahlia merah (*Dahlia* spp.) Lokal dalam perolehan serat inulin sebagai pangan fungsional melalui hidrolisis enzimatik. Prosiding Seminar Nasional XX Jaringan Kerjasama Kimia Indonesia (JASAKIAI); 03 November; Yogyakarta, Indonesia.
- Zhang N, Huang C, Ou S. 2011. In vitro binding capacities of three dietary fibers and their mixture for four toxic elements, cholesterol and bile acid. *Journal of Hazardous Materials*. 186: 236-239.