

ANALISA ASAM ORGANIK DAN ASAM AMINO PADA NATTO YANG DIFERMENTASI OLEH 7 STRAIN BACILLUS NATTO

JOKO SULISTYO

Balai Penelitian dan Pengembangan Mikrobiologi, Puslitbang Biologi - LIPI, Bogor.

ABSTRACT

JOKO SUUSTYO. 1986. Analysis of organic acid and amino acid in natto fermented by 7 strains of *Bacillus natto*. *Berita Biologi* 3 (6): 277 - 282. The ability of seven strains of *Bacillus natto* produced a number of organic and amino acid components in natto were investigated. Raw, submerged and autoclaved soybeans for natto contained 1.15%, 0.46% and 0.77% in organic acid and 0.19%, 0.30% and 0.30% in amino acid, while after fermentation those range were 0.36 - 0.90% in organic acid and 2.86 — 6.08% in amino add. During submercing, autoclaving and fermenting, citric acid component decreased down very sharply to about one hundredth of starting level. While acetic, iso-butiric and iso-valeric components increased up to 84.92%, 96.60% and 95.87%, respectively. Meanwhile, glutamic acid, iso-leucine, leucine and phenylalanine components of amino acid increased up to 84.36%, 90.52%, 91.67% and 95.88%, respectively.

Vely)

PENDAHULUAN

Natto adalah makanan tradisional khas Jepang yang seluruhnya terbuat dari kacang kedelai yang difermentasikan oleh *Bacillus natto* (Kanno *et. al.*, 1982, Ichisimaef. *al.*, 1982).

Aioma yang khas dari natto ditimbulkan oleh beberapa komponen asam organik; asam asetat, iso-butirat dan iso-valerat, sedangkan cita-iasa yang spesifik dibentuk oleh komponen asam amino terpenting, yaitu asam poliglutamat yang berasal dari bahan gamma-poliglutamat (PGA), yang merupakan suatu mucin yang sangat lengket dan karakteristik, terdiri dari D— dan L-glutamat dalam berbagai perbandingan (Aumayr *et al.*, 1981; Iso *et al.*, 1976). Beberapa komponen asam amino lainnya seperti iso-leusin, leusin dan fenilalanin menyebabkan rasa getir pada natto. Karbohidrat yang terkandung pada natto dan balian mentahnya adalah dari golongan mono, oligo dan poli-

sakarida (Kawamura *et al.*, • 1977; Kanno *et al.*, 1982, Bianciatal. 1983).

Dari ketujuh strain *Bacillus natto* yang digunakan untuk membuat natto, ternyata strain *B. natto* ONT 1 mampu menghasilkan baik asam organik maupun asam amino dalam jumlah yang paling tinggi dibandingkan strain-strain lainnya. Pada umumnya, natto yang difermentasikan oleh strain-strain yang *di-pmkulturkan* pada media Ekstrak Kedelai, memperlihatkan jumlah total asam organik lebih tinggi dibanding media lainnya, meskipun media Fiton agar mendukung produksi dari total asam amino lebih tinggi, sedangkan media Nutrien agar menunjukkan hasil total baik asam organik maupun asam amino dalam jumlah yang terendah (CTabell).

BAHAN DAN CARA KERJA

Jasad renik

Tujuh strain *Bacillus natto* diisolasi dari 3 jenis ragi yang dijual secara komersial oleh perusahaan-perusahaan pembuat natto. Dalam percobaan ini strain-strain tersebut di-prakulturkan dalam 3 jenis media, Ekstrak Kedelai, Fiton Agar dan Nutrien Agar pada pH 7.0. Tiga strain, Okame Natto Miura (ONM 1, ONM 2 dan ONM 3) diisolasi dari ragi asal Miyagino Company, dua strain Okame Natto Naruse (ONN 1 dan ONN 2) asal Naruse dan Okame Natto Takahashi (ONT 1 dan ONT 2) berasal dari Takahashi Company.

Media prakultur

Komposisi dari medium Ekstrak Kedelai adalah terdiri dari 1% Ekstrak Kedelai, 1% sakharosa, 0.5% NaCl dan 1.5% agar. Medium Fiton Agar terdiri dari 1% Phytone (Lab. Lamco), 1% sakharosa, 0.5% NaCl dan 1.5% Bacto Agar. Sedangkan medium Nutrien Agar adalah sebagaimana yang tercantum pada buku *Oxoid Manual of Culture Media (1967)*.

Tabel 1. Persentase total asam organik dan asam amino pada natto.

STRAIN	ASAM ORGANIK (%)				ASAM AMINO (%)			
	EJC.	F.A.	NA.	TOTAL	E.K.	F.A.	N.A.	TOTAL
ONM 1	0.3213	0.2986	0.1098	0.7297	1.1751	1.1932	1.0208	3.3891
ONM 2	0.3647	0.1681	0.1964	0.7292	1.2370	1.2857	1.6671	4.1898
ONM 3	0.1742	0.1204	0.1262	0.4208	1.2641	0.9298	0.7455	2.9394
ONN 1	0.2626	0.2063	0.1159	0.5848	1.1070	0.9544	0.8033	2.8647
ONN 2	0.2870	0.1685	0.0905	0.5460	0.8952	1.6709	0.2944	2.8605
ONT 1	0.4554	0.3186	0.1287	0.9027	1.6930	1.5663	2.8228	6.0819
ONT 2	0.1614	0.1126	0.0886	0.3626	1.4088	2.6012	0.3773	4.3873
TOTAL	2.0266	1.3931	0.8561	—	8.7202	10.2015	7.7310	—

E.K.: Ekstrak Kedelai

F.A.: Fiton Agar

N.A.: Nutrien Agar

Cora membuat natto

Untuk membuat 10 pak natto berukuran 10 x 10 x 3 cm, diperlukan kacang kedelai yang sudah dikuliti sebanyak 1 kg. Ditendam dalam sebuah bejana selama 18 jam atau sampai volumenya dua kali volume semula. Kedelai yang telah direndam tersebut diautoklaf pada suhu 121°C (15 psi) selama 30 menit atau sampai matang betul. Setiap 100 gram kedelai matang, diinokulasi dengan 10 ml larutan ragi yang sudah diencerkan 10⁴ dan setelah dipak, dieramkan pada inkubator pada suhu 37°C selama 18 - 20 jam. Pematangan natto dilakukan dengan menyimpannya pada suhu ± 5°C selama 24 — 48 jam.

Penyiapan sampel untuk analisa asam amino, caranya hampir sama dengan penyiapan sampel asam organik sebagaimana tertulis di atas. Jumlah sampel yang dibutuhkan sebanyak 1 gram, kemudian disuspensikan dan dibilas 3 kali dengan 10 ml dan 4 ml C₂H₅OH 70% (180 menit) Filtrat yang terkumpul diencerkan 10 kali dengan akuades dan diletakkan pada alat penyuntik otomatis dari alat HPLC. Analisa memerlukan waktu 3 jam/sampel.

Menyiapkan sampel untuk analisa asam organik.

Natto (±5 gram), dilumatkan dengan mortar

Suspensikan dengan 10 ml 0.1 N HCl dan dikocok selama 30 menit

4

Sentrifus (3.000 rpm selama 10 menit)

4

Bilas 3 kali dengan 4 ml 0.1 N HCl

Supernatan

Residu

4 ← Tambah dengan 0.5 ml 20% asam sulfosalisilat.

Tampung di gelas volumetris (25 ml) sampai sebatas volume dengan menambahkan akuades.

4

Saring menembus membran filter 0.45 /µm - 0.22 µm

4

Filtrat yang terkumpul, dengan alat syringe (10 µl) disuntikkan ke lubang penyuntikan dari alat HPLC

Analisa secara otomatis selama 20 menit/sampel

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Kandungan asam organik

Spektra asam organik natto yang difermentasi oleh strain *B. natto* menunjukkan bahwa asam asetat dan malat yang dibentuk oleh semua strain pada natto dari 3 macam media prakultur menunjukkan jumlah proporsi yang lebih banyak (0.55 dan 0.28%). Asam sitrat yang sangat banyak dijumpai pada bahan mentahnya, setelah mengalami reduksi sewaktu perendaman dan pemasakan, ternyata telah sempurna dikonsumsi oleh *B. natto*. Asam laktat yang tidak dibentuk pada natto dari media prakultur Fiton Agar, hanya dijumpai dari media Ekstrak Kedelai dan Nutrien Agar (0.01%), sedangkan asam piroglutamat dibentuk pada natto dari media prakultur Nutrien Agar (0.01%) walaupun hanya sedikit sekali dijumpai pada natto dari media Fiton Agar maupun bahan mentahnya. Asam suksinat dan propionat serta n-butirat dan n-valerat terdapat dalam jumlah yang hampir sebanding (0.00 - 0.03%). Asam asetat, iso-butirat dan iso-valerat yang memberi aroma khas pada natto, dibentuk oleh hampir semua strain (0.55%,

0.23% dan 0.26%), kecuali iso-butirat pada natto dari Nutrien Agar oleh ONN 2 dan iso-valerat pada natto dari Fiton Agar oleh ONT 2.

Total produksi asam organik yang dibentuk oleh ONT 1 pada 3 macam media adalah yang tertinggi (0.30%), ONM 1 dan ONM 2 (0.24%), ONN1 (0.19%), ONN 2 (0.18%), ONM 3 (0.14%) dan yang terendah adalah ONT 2 (0.12%).

Iso-butirat dan iso-valerat yang merupakan ciri spesifik asam organik dari natto, berasal dari intermedia dalam sintesa dari tiga cabang rantai asam amino alifatik, yaitu leusin, iso-leusin dan valin, Umbreit (1963). Gambar 1 menunjukkan grafik tipikal khromatogram cair dari komponen asam organik pada natto dari hasil fermentasi *B. natto* ONT 1 pada Ekstrak Kedelai media, sebagai media prakultur untuk membuat larutan ragi.

Dari hasil analisa uji jarak nyata berganda, terlihat bahwa jumlah total asam organik yang dibentuk oleh strain ONT 1 berbeda nyata pada taraf nyata 5% dibandingkan strain-strain ONT 2 dan ONM 3, akan tetapi tidak berbeda nyata dibandingkan dengan strain-strain ONN 2, ONN 1, ONM 1 dan ONM 2 (Tabel 2).

Tabel 2. Uji harga rata-rata asam organik natto oleh 7 strain.

STRAIN - STRAIN	ASAM ORGANIK (%)		LSR5%	LSR1%
	(X)	tr f ^		
ONT 2	0.12	1.97 a ⁺		
ONM 3	0.14	2.14 ab	0.78	1.14
ONN 2	0.24	2.39 abc	0.81	1.20
ONN 1	0.19	2.51 abc	0.83	1.23
ONM 1	0.24	2.76 abc	0.84	1.25
ONM 2	0.24	2.79 abc	0.85	1.28
ONT 1	0.30	3.07 c	0.85	1.30

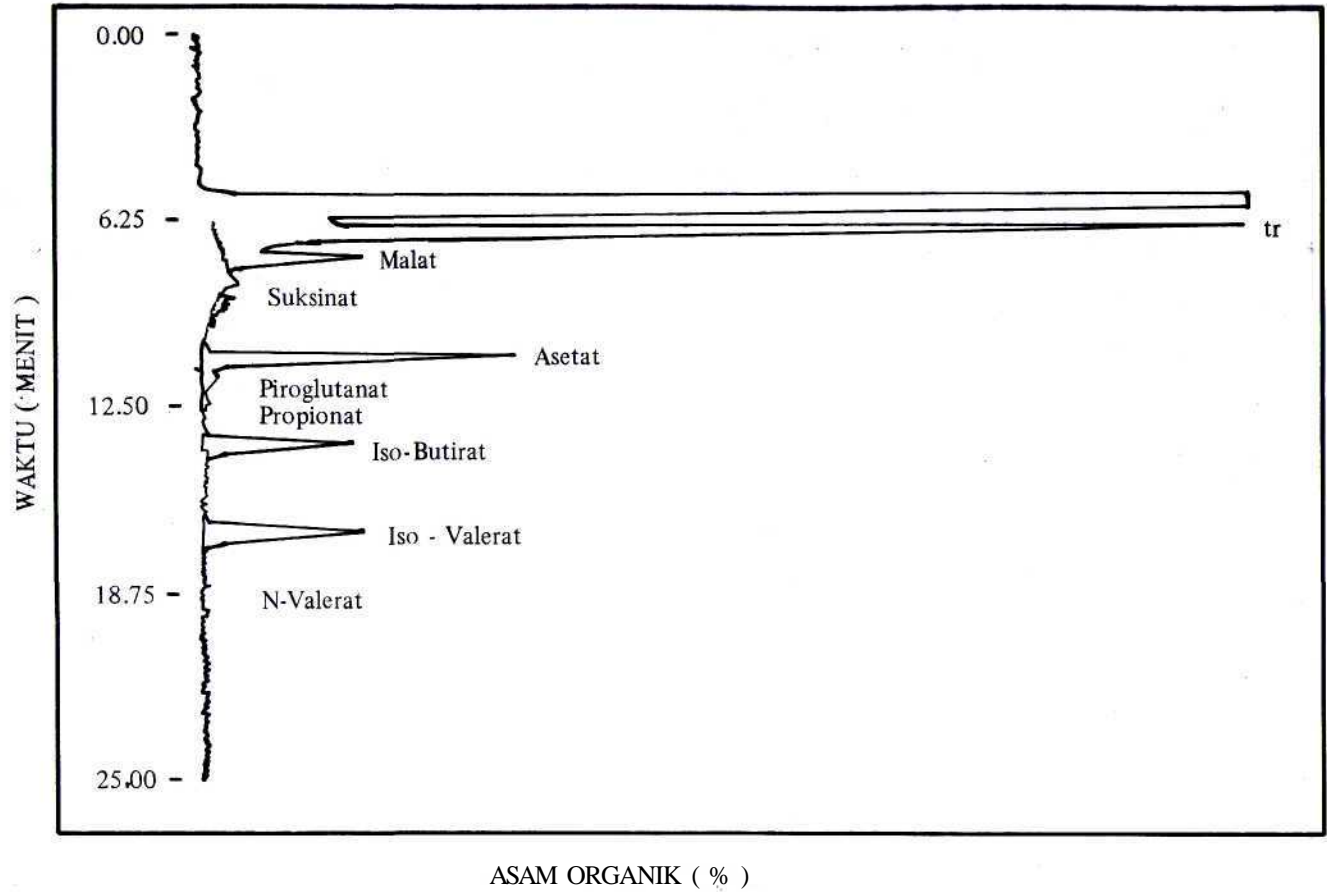
+) Perlakuan dengan huruf yang sama, tidak berbeda nyata pada taraf nyata 5%.

++) Trf, transformasi ke Arcsin- y/x.

2.< Kandungan asam amino.

Dibandingkan dengan bahan mentah dan yang telah dimasak dengan autoklaf selama 30 menit pada suhu 121°C, maka jumlah total asam amino pada natto meningkat hingga 68.72 - 85.36% dan

80.03 - 90.65%, masing-masing (Tabel 3). Produksi total ini tergantung dari kondisi media prakultur dan kemampuan strain dalam mensintesa bahan dasar pada substratnya, meskipun harga rata-rata dari analisis keragaman tidak berbeda nyata pada



Gambar 1. Tipikal khromatogram cair asam organik pada natto.

taraf nyata 5% sehingga tidak perlu diuji menuiut uji jarak nyata berganda.

Jumlah total asam amino tertinggi terdapat pada natto dari media piakultur Fiton Agar, sedangkan jumlah terendah pada natto dari media ptakultur Nutrien Agar. 10 komponen asam amino terbesar berturut-turut adalah sistin, asam glutamat fenilalanin, tirosin, leusin, lisin, iso-leusin, valin, histidin dan alanin. Hampir semua jumlah total

asam amino tertinggi dibentuk oleh 5. *natto* ONT 1, kecuali glutamin yang tidak terbentuk dan triptopan yang didapat dalam jumlah yang sedikit. Sistin tidak terdeteksi pada natto dari media prakultur Ekstrak Kedelai dan Fiton Agar, akan tetapi banyak didapat pada natto dari Nutrien Agar. Hal tersebut menunjukkan bahwa komposisi dari media dan kemampuan strain mempengaruhi pembentukan komponen asam amino pada natto.

Tabel 3. Kandungan asam amino pada natto dan bahan mentahnya I(%).

ASAM AMINO	KEDELAI MENTAH	KEDELAI RENDAM	KEDELAI AUTOKLAF	NATTO
Asam aspartat	0.0387	0.0048	0.0149	0.0456
Threonin	0.0012	0.0054	0.0032	0.0634
Serin	0.0031	0.0086	0.0046	0.0741
Asparagin	0.0054	0.0100	0.0112	0.0441
Asam glutamat	0.0326	0.0183	0.0442	0.2178
Glutamin	-	0.0110	-	-
Glisin	0.0026	0.0062	0.0041	0.0718
Alanin	0.0141	0.0353	0.0344	0.0653
Valin	0.0269	0.0326	0.0171	0.1280
Sistin	-	0.0059	0.0034	-
Methionin	0.0006	0.0016	0.0015	0.0645
Iso-leusin	0.0086	0.0242	0.0180	0.1040
Leusin	0.0091	0.0285	0.0176	0.1063
Tirosin	0.0080	0.0336	0.0305	0.1498
Fenilalanin	0.0085	0.0258	0.0244	0.2021
Triptopan	-	-	-	0.0165
Omitin	-	0.0040	0.0044	0.0578
Lisin	0.0013	0.0040	0.0032	0.1559
Histidin	0.0024	0.0046	0.0056	0.1121
Arginin	0.0266	0.0336	0.0549	0.0131
TOTAL	0.1897	0.2983	0.2972	1.6930

DAFTAR PUSTAKA

- AUMYR, A., HARA, T. & UEDA, S. 1981. Transformation of *Bacillus subtilis* In Polyglutamate Production by Deoxyribonucleic Acid From *B. natto*, *J. Gen. Appl. Microbiol* (27): 115-123
- BIANCI, M.L.Pi, SILVA, H.C. & CAMPOS, M.A.P. 1983. Effect of Several Treatments on the Oligosaccharide Content of a Brazilian Soybean Variety (*Glycine max.* (L.) Merrill). *J. Agric. FoodChem.*, (31): 1364-1366.
- ICFFISIMA, E., KATO, M., WADA, Y., KAKIUCHI, H., TAKEUCHI, M., TAKESHI, TAKIMAMI, K. & HIROSE, Y. 1982. Spore Fatty Acid Composition in *Bacillus natto*, A Food Microorganism. *Food Chemistry* (8): 1-9.
- ISO, N., MIZUNO, H. SAITO, T., TAKEUCHI, H., SUYAMA, Y, KAWAMURA, S. & OGAWA, H. 1976. The Viscometric Behavior of a Natto Mucin in Solution. *Agr. Biol. Chem.* 40 (9): 1871-1875.
- KANNO, A., TAKAMATSU, H. TAKANO, N. & AKIMOTO, T. 1982. Change of Saccharides in Soybeans during Manufacturing of Natto. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 29 (2): 105-110.
- KAWAMURA, S., NAGAO, K. & KASAI, T. 1977. Determination of Free Monosaccharides and Detection of Sugar Alcohols in Mature Soybean Seed. *Nutr. Sci. Vitamimol.* (23): 249-255.
- UMBREIT, W.W. 1963. *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, New York and London. (5): 338-348.