

## **Pembuatan keju dengan menggunakan enzim renin *Mucor pusillus* amobil**

**Mustakim<sup>1</sup>, R. F. Muarifah<sup>2</sup>, K.U. Al Awwaly<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Program Studi Teknologi Hasil Ternak <sup>2</sup> Alumni Program Studi Teknologi Hasil Ternak  
Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Jl. Veteran Malang 65145

- Alamat Korespondensi : E-mail : [aak\\_umam@ub.ac.id](mailto:aak_umam@ub.ac.id)

---

**Abstrak** : Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi suhu dan pH yang baik pada pembuatan keju dengan menggunakan enzim rennin *M. pusillus* amobil. Enzim rennin *M. pusillus* diproduksi dengan media dasar tepung jagung, diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 116 jam. Amobilisasi dilakukan dengan metode penjebakan menggunakan matriks alginate. Aktivitas proteolitik dan koagulasi enzim diuji. Selanjutnya enzim amobil digunakan dalam pembuatan keju dengan perlakuan suhu (32, 37 dan 42<sup>0</sup>C) dan pH (5,0; 5,5 dan 6,0) menggunakan rancangan petak terbagi. Dilakukan pengujian pH, keasaman dan tekstur keju yang dihasilkan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa alginate dapat digunakan untuk amobilisasi enzim rennin *M. pusillus*. Enzim rennin yang diamobilkan menggunakan matriks alginate memiliki aktivitas proteolitik sebesar 0,1395 unit/ml/menit dan aktivitas koagulasi sebesar 6090 unit/mg protein/menit. Terjadi penurunan aktivitas proteolitik dan koagulasi masing masing sebesar 22,5% dan 78,445% disbanding enzim rennin tidak amobil. Perlakuan suhu yang digunakan pada pembuatan keju segar menggunakan enzim rennin *M. pusillus* amobil memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap tekstur dan pH keju. Perlakuan pH memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap nilai pH dan keasaman keju.

Disimpulkan bahwa alginate dapat digunakan untuk amobilisasi enzim rennin yang diproduksi dari *Mucor pusillus*. Perlakuan suhu dan pH pada pembuatan keju dengan menggunakan enzim rennin *Mucor pusillus* amobil memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap tekstur, nilai pH, dan nilai keasaman. Suhu 37<sup>0</sup>C dan pH 6,0 dalam pembuatan keju segar menggunakan enzim rennin *M. pusillus* amobil dapat menghasilkan keju segar berkualitas baik dengan memiliki tekstur 1,1866 N, pH 4,94 – 5,21 dan keasaman 1,409% .

**Kata kunci** : enzim amobil, rennin mikrobial, alginate, keju.

---

## Cheese production using immobilized rennin-*Mucor pusillus*

Mustakim<sup>1</sup>, R. F. Muarifah<sup>2</sup>, K. U. Al Awwaly<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Study Program Animal Product Technology 2 Alumni Study Program Animal Product Technology  
Faculty of Animal Husbandry University of Brawijaya Jl. Veteran Malang 65145

• Correspondence address : E-mail:aak\_umam@ub.ac.id

---

**Abstract :** This study was aimed to understand the good condition of temperature and pH in the cheese making with immobilized rennin enzyme from *M. pusillus*. Rennin from *M. pusillus* was produced using corn starch as substrate, incubated at 37°C for 116 hours. Immobilization was conducted with entrapment method using alginate. Proteolytic and milk-clotting activities of enzyme was measured. Furthermore, the immobilized enzyme was used in the cheese production with different temperatures (32, 37 and 42°C) and pH (5.0, 5.5 and 6.0) using Split Plot Design. It was conducted a test of pH, titratable acidity and texture for produced cheese.

The result showed that the alginate matrix can be used to immobilized rennin enzyme from *M. pusillus*. Immobilization of rennin enzyme from *M. pusillus* has proteolytic activity value 0.1395 unit/ml/minute and milk-clotting activity value 6090 unit/mg protein/minute. The temperatures (32, 37 and 42°C) in the cheese making using immobilized rennin enzyme *M. pusillus* gave a highly significant different effect ( $P < 0,01$ ) on texture and pH of fresh cheese. The pH (5.0, 5.5 and 6.0) gave a highly significant different effect ( $P < 0,01$ ) on pH and titratable acidity of fresh cheese.

It is concluded that alginate can be used in the rennin enzyme immobilization. Temperature and pH gave a highly significant different effect on texture, pH and titratable acidity of fresh cheese. The temperature of 37°C and pH 6.0 can be used to make a good quality cheese with immobilized rennin enzyme from *M. pusillus* using alginate with characters as follows : texture 1.1866 N, pH 4.94 – 5.21 and titratable acidity 1.409%.

**Keywords :** immobilized enzyme, microbial rennin, alginate, cheese.

---

### PENDAHULUAN

Enzim adalah suatu protein yang bertindak sebagai katalisator reaksi biologi (biokatalisator). Pemanfaatan enzim saat ini berkembang pesat terutama pada industri pengolahan pangan misalnya penggunaan enzim rennin untuk menggumpalkan susu pada proses pembuatan keju. Menurut Sardinas (1972), penggunaan enzim rennin yang berasal dari lambung anak sapi sangat

mahal, sehingga meningkatkan biaya produksi keju. Penggantian rennin yang berasal dari lambung anak sapi yang masih menyusu dengan rennin mikrobia sebagai enzim penggumpal susu dalam proses pembuatan keju saat ini dirasa sangat diperlukan.

Enzim yang dihasilkan oleh mikrobia tersebut merupakan enzim protease asam yang dikenal dengan nama rennin

mikrobia. Beberapa mikrobia penghasil rennin adalah kapang dan bakteri, seperti spesies *Mucor* yaitu *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*, *Mucor heimalis*, dan *Mucor rouxii*. Bakteri yang mampu menghasilkan rennin diantaranya *Endothia parasitica*, *Bacillus subtilis*, dan *Bacillus polymyxa*. Penggunaan *Mucor* dan *Endothia* untuk produksi rennin adalah yang terbanyak dilakukan (Muchtadi dkk., 1992).

Renin mikrobia mampu menggumpalkan susu seperti enzim rennin sapi. Fedrich dan Fuller (1988) mengatakan bahwa tidak ada perbedaan yang nyata dalam proses pematangan dan produk akhir keju, yang dihasilkan melalui penggumpalan dengan enzim rennin mikrobia maupun rennin dari lambung anak sapi. Enzim telah nyata berjasa dan membuktikan kemampuannya dalam dunia industry, yaitu memperbaiki mutu produk dan enzim mampu menghemat biaya produksi melalui substitusi bahan dasar fermentasi. Penggunaan bahan sisa industry pertanian yang masih mengandung zat gizi yang diperlukan untuk pertumbuhan mikrobia sebagai media fermentasi mampu menurunkan biaya produksi enzim.

Namun demikian, penggunaan enzim dalam proses fermentasi yang demikian hanya dapat dilakukan sekali saja. Dewasa ini telah dilakukan upaya untuk dapat menggunakan enzim dalam proses fermentasi secara berulang-ulang. Salah satu caranya adalah amobilisasi enzim. Amobilisasi enzim adalah enzim yang secara fisik terlokalisasi dalam ruang dengan aktivitas katalitik yang dapat digunakan secara cepat dan kontinyu (Sasmito, 1990). Menurut Said (1987), amobilisasi biasanya dapat dianggap sebagai perubahan enzim dari yang larut dalam air pada keadaan 'bergerak' menjadim keadaan 'tidak bergerak' yang tidak larut dalam air. Amobilisasi enzim juga dapat meningkatkan

stabilitas dan daya tahan enzim terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim seperti pH dan suhu tinggi.

Metode yang digunakan dalam menghasilkan enzim ini adalah penjebakan enzim didalam matriks. Menurut Bucke (1982), Penjebakan adalah metode yang telah terbukti sangat memuaskan untuk amobilisasi enzim. Terutama karena kesederhanaan dan penahanan enzim yang cukup baik sehingga metode penjebakan untuk amobilisasi enzim banyak digunakan untuk penelitian. Djaafar (2006) berhasil meningkatkan stabilitas enzim dengan teknik amobilisasi enzim penisilin asilase yang dihasilkan oleh *Escherichia coli* B-130 dengan menggunakan berbagai bahan pendukung polimer untuk menghasilkan reaksi hidrolisis benzyl penisilin menjadi asam 6-amino penisilat dan asam fenil asetat. El-katatny et al (2003) juga menjebak konidia didalam matriks alginate dan menunjukkan produktivitas yang tinggi terhadap enzim, meskipun sudah diulang 4 kali. Dalam penelitian ini digunakan matriks alginate karena memiliki banyak keuntungan diantaranya bersifat aman pada bahan pangan, kekuatan gelnya baik, tidak memerlukan panas dalam pembentukan gel sehingga resiko kerusakan enzim dapat dihindari, serta dapat mempertahankan stabilitas enzim selama dalam keadaan amobil. Menurut Sheu dan Marshall (1993), amobilisasi dengan gel alginate bersifat aman, cepat, murah, ringan, sederhana dan dapat digunakan untuk hampir semua jenis biokatalisator.

Suhu dan pH merupakan factor yang mempengaruhi aktivitas enzim rennin mikrobia. Oleh karena itu, perlu dikaji penggunaan enzim amobil dengan matriks alginate terhadap lingkungan suhu dan pH yang berbeda sehingga diperoleh kondisi yang optimum bagi enzim amobil untuk melaksanakan reaksi katalitik. Proses

koagulasi susu dengan penambahan enzim rennin mikrobia pada saat pembuatan keju memiliki suhu optimum sekitar 30 – 40<sup>0</sup>C, sedangkan pada suhu 15<sup>0</sup>C tidak akan terjadi koagulasi susu dan bila suhu 60<sup>0</sup>C enzim rennin mikrobia menjadi inaktif (Winarno, 1983). Menurut Radiati dan Fardiaz (1991) enzim rennin stabil dalam menggumpalkan susu pada pH 4 – 6.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penggunaan matriks alginate untuk amobilisasi enzim rennin *M. pusillus* serta mengetahui kondisi suhu dan pH yang

baik pada pembuatan keju dengan enzim rennin *M. pusillus* amobil. Diduga perbedaan perlakuan suhu dan pH pada pembuatan keju menggunakan enzim rennin *M. pusillus* akan memberikan pengaruh terhadap kualitas keju yang dihasilkan. Diharapkan dapat menggunakan secara berulang-ulang enzim rennin *M. pusillus* amobil dalam pembuatan keju dengan suhu dan pH yang sesuai dapat menghasilkan keju berstandar kualitas baik.

## MATERI DAN METODE

### Bahan dan Alat Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah susu segar dari KUD Dau Malang; alginate (*alginate acid sodium salt medium viscosity*) (MP Biomedical inc. Perancis); jagung pop corn (FINNA, PT Sekar Alam, Surabaya); *potato dextrose agar* (PDA) (Bacton Bikinson and Company, USA); kalsium klorida, kalium klorida, dan magnesium sulfat (Merk KgaA Darmstadt, Jerman); kasein, buffer fosfat, *Trichloro Acetic acid* (TCA) dan akuades (PT Panadia Corporation, Indonesia); pepton (Oxoid LTD Basingstoke, Hampshire, Inggris) dan susu skim yang dibeli dari took AVIA Malang. Starter yang digunakan adalah *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* yang dibeli dari PT IMDI Pasuruan dan kultur mikrobia penghasil rennin *M. pusillus*. Bahan-bahan

untuk analisis kualitas keju menggunakan menggunakan bahan kimia dengan pro analisis.

Alat-alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah : incubator dan oven (type E 53, WF Binder, Jerman); timbangan analitik (type AJ150L, Mettler Instrumente AG, Switzerland); pH meter (Hanna Instrument); *refrigerator* (Model MR 173 PG, Mitsubishi Electric Corporation, Jepang); *hot plate stirrer* (type IKAMAG RED, Junke and Kunkel); *autoclave* (Model HL 36AE, Tokyo Hirayama Manufacturing Corporation, Jepang); *centrifuge* (Digisystem Laboratory instruments Inc); spektrofotometer (Spectronic<sup>R</sup>20, Genesys<sup>TM</sup>, USA); *vortex* (Model VM 2000, D.S Instruments Inc, Taipei-Taiwan) dan *waterbath* (type 1003, made in fed Rep, Jerman).

### Metode Penelitian

Metode penelitian adalah percobaan dengan Rancangan Petak Terbagi yang terdiri dari dua factor yaitu factor suhu yang terdiri tiga level (sebagai petak utama) 32, 37 dan 42<sup>0</sup>C. Faktor pH yang terdiri tiga level (sebagai anak petak) : 5,0; 5,5 dan 6,0. Kedua factor

yang terlibat adalah factor tetap, sehingga model yang dipilih adalah model tetap. Anak petak dipilih perlakuan pH. Rancangan dasarnya adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan tiga kelompok yang didasarkan pada kualitas bahan baku

susu yang digunakan karena perbedaan hari

pembuatan keju.

## Jalan Penelitian

### Penyimpanan Kultur Spora (Purnomo dkk., 1996)

Potato Dextrose Agar (PDA) sebanyak 3,9 g dilarutkan dengan 100 ml akuades. Setelah larutan homogeny, 7 ml larutan PDA dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian disterilisasi pada suhu

121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Tabung reaksi yang berisi PDA steril kemudian dimiringkan dan ditunggu hingga padat. Kultur *M. pusillus* dibiakkan pada PDA miring yang telah padat dan diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 7 hari.

### Produksi Enzim Rennin (Purnomo dkk., 1996)

Rennin *M. pussillus* disiapkan dengan cara menginokulasikan spora *M. pusillus* kedalam media fermentasi tepung jagung (*pop corn*) dengan perbandingan tepung jagung : larutan mineral (1 : 1), dengan pH media 4,0. Larutan mineral terdiri dari akuades, 0,1% urea; 2,0% pepton; 0,05% CaCl<sub>2</sub>; 0,02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,05% MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O;; 0,05% KCl. Media disterilisasi pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Selanjutnya pada suhu kamar, media

fermentasi diinokulasi spora sebanyak 5 ml, diinkubasi suhu 37<sup>0</sup>Cselama 116 jam. Media fermentasi yang berwarna abu-abu, kemudian diekstraksi menggunakan blender dengan pengenceran akuades steril 1000 ml per 100 g dan ditambah tween 80 sebanyak 0,05%. Supernatan disaring dan kemudian disentrifugasi berkecepatan 4000 rpm selama 20 menit pada suhu 4<sup>0</sup>C sehingga diperoleh filtrate ekstrak kasar enzim reinnin *M. puaillus*.

### Pembuatan Enzim Rennin *M. pusillus* Amobil (Wang, 2006)

Matriks Ca-alginat dengan perbandingan Na-alginat 1% dan enzim yaitu 4 : 1 yakni 4 ml Na-alginat dan 1 ml filtrate enzim (perbandingan ini dianggap 1 bagian),

diteteskan dalam CaCl<sub>2</sub> 2%. Enzim amobil disimpan dalam media pepton 0,1% pada suhu ± 4<sup>0</sup>C.

### Aplikasi Enzim Rennin *M. pusillus* Amobil dalam Pembuatan Keju

Proses pembuatan keju menurut Radiati dan Fardiaz (1991) sebagai berikut : Susu dipasteurisasi pada suhu 72 – 73<sup>0</sup>C selama 15 menit, didinginkan sampai 40<sup>0</sup>C dan diberi starter *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* (2 : 1) sebanyak 5% (v/v), diinkubasi suhu 43<sup>0</sup>C selama 1 – 2 jam dalam *waterbath*. Suhu diatur sesuai perlakuan (32, 37 dan 42<sup>0</sup>C) dan dibiarkan hingga tercapai pH sesuai

perlakuan (5,0; 5,5 dan 6,0). Larutan CaCl<sub>2</sub> 25% kemudian ditambahkan sebanyak 0,1% (v/v) dan enzim rennin amobil sebanyak 2,5% (b/v), dibiarkan hingga susu membentuk *curd*. *Curd* dipotong kecil-kecil dan ditiriskan untuk memisahkan whey, kemudian *curd* dipanaskan pada suhu 50<sup>0</sup>C, dan dipres selama 2 – 3 jam. Tidak lupa pada tahap ini, enzim amobil dipisahkan dengan penyaringan. Koagulum direndam

dalam larutan garam 2% selama 2 jam, ditiriskan selama 1 jam dan dibungkus dengan *aluminium foil* dan disimpan dalam

lemari pendingin sampai digunakan untuk tahap selanjutnya.

### **Pengamatan dan Analisis**

#### **Uji Aktivitas Proteolitik (Khan et al., 1979)**

Uji aktivitas proteolitik dilakukan dengan mencampur 2 ml kasein 0,5%; 0,5 ml buffer fosfat (pH 4,0) dan 1,0 ml enzim, diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 1`0 menit. Larutan TCA 5% kemudian ditambahkan sebanyak 2,5 ml dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, disentrifugasi berkecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh diambil 1 ml dan ditambah akuades sebanyak 5 ml kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 275 nm. Blanko dibuat dengan cara sama seperti diatas, tetapi enzimnya diinaktifkan terlebih dahulu pada suhu 100<sup>0</sup>C selama 10 menit.

Pengukuran aktivitas proteolitik enzim dilakukan dengan mengubah nilai serapan menjadi konsentrasi tirosin (µg/ml) dengan kurva standar tirosin. Aktivitas proteolitik dihitung dengan rumus :

$$AP = [\text{tirosin}] \times \frac{v}{p \times q} \times fp$$

Dimana : [tirosin] = konsentrasi tirosin yang terbentuk

v = volume total sampel pada tiap tabung

q = waktu inkubasi

p = jumlah enzim (ml)

fp = factor pengenceran

#### **Uji Aktivitas Koagulasi (Khan et al., 1979)**

Aktivitas koagulasi ditentukan dengan metode Berridge yang ditulis kembali oleh Khan et al. (1979), yaitu berdasarkan pada waktu yang diperlukan untuk membentuk koagulum tahap awal. Substrat uji digunakan 10 ml susu skim 12% dalam CaCl<sub>2</sub> 0,05 M. Susu skim diinkubasi suhu 40<sup>0</sup>C selama 30 menit. Kemudian diambil 1

ml enzim yang telah diaktifkan pada suhu 40<sup>0</sup>C selama 5 menit. Waktu yang dicapai untuk membentuk koagulum tahap awal digunakan untuk memperkirakan aktivitas koagulasi. Unit aktivitas koagulasi didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang mampu mengkoagulasi 10 ml susu skim selama 1 menit memiliki aktivitas 10<sup>4</sup> unit.

### **Pengujian Kualitas Keju**

Pengamatan terhadap kualitas keju yang dihasilkan menggunakan enzim rennin *M. pusillus* melptu tekstur (Carballo et al.,

1996), nilai pH (Sudarmadji dkk., 1997) dan nilai keasaman (AOAC, 1990).

### **Analisa Data**

Data dianalisis menggunakan bantuan *software* SPSS 11.0 dan bila ada perbedaan pengaruh diantara perlakuan

dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) (Pramoedyo, 2004).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Produksi Rennin *M. pusillus*

Produksi rennin *M. pusillus* dilakukan pada suhu 37<sup>0</sup>C. Pemilihan suhu fermentasi berpedoman pada suhu optimum pertumbuhan kapang *M. pusillus*. Menurut Somkuti dan Babel (1968), fermentasi pada suhu 28<sup>0</sup>C dan 45<sup>0</sup>C pada medium yang sama *M. pusillus* menghasilkan karakteristik enzim yang sama. Enzim ekstraseluler pada umumnya disintesis di membrane sel dalam bentuk precursor (Ward, 1983) akan menjadi bentuk proteinase aktif, jika peptide tersedia dalam medium dan mendukung enzim keluar membrane.

Suhu lingkungan merupakan factor penting bagi pertumbuhan mikroba dan sintesis produk metabolisme. Pada suhu optimum mikroba dapat tumbuh dan melakukan metabolisme sebaik-baiknya. Suhu optimum pertumbuhan belum tentu

merupakan suhu optimum untuk pembentukan enzim. Suhu adalah salah satu factor penting yang mempengaruhi pertumbuhan mikroba dan produksi metabolit, mengingat suhu mempengaruhi kecepatan reaksi kimia, konfigurasi tiga dimensi protein dan kecepatan aktivitas enzim. Suhu yang terlalu rendah menyebabkan reaksi metabolisme relative rendah karena tidak cukup energy untuk mencapai suatu reaksi. Pada suhu yang lebih tinggi molekul enzim yang terproduksi lebih aktif dan terjadi tumbukan molekul, dapat memulai suatu reaksi selama protein enzim tidak terdenaturasi. Optimal produksi enzim didefinisikan sebagai maksimum produk, pada kondisi ini enzim diproduksi terus-menerus.

### Amobilisasi Enzim Rennin *M. pusillus*

Tujuan amobilisasi enzim adalah untuk meningkatkan aktivitas enzim dan menggunakan enzim amobil tersebut untuk fermentasi ulang secara *bacth* maupun fermentasi kontinyu (Panji, 1998). Amobilisasi enzim rennin yang diproduksi dari *M. pusillus* dengan menggunakan matriks alginate berhasil dengan baik. Manik-manik yang terbentuk mempunyai bentuk dan kekenyalan yang baik serta cukup stabil dalam media cair selama dalam penyimpanan larutan pepton 0,1%. Manik-manik yang terbentuk dalam 4 ml alginate 1% dan 1 ml enzim memiliki berat 3,5 g. Kekuatan gel akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi dari alginate dan CaCl<sub>2</sub>.

Na-alginat termasuk bahan makanan, memiliki kekuatan gel yang baik, mampu mempertahankan aktivitas enzim dan mampu menjaga stabilitas aktivitas biokimia (Bucke, 1982). Gel alginate dapat dibentuk dari pembentukan jaringan ionic dengan adanya ion kalsium (Ca<sup>2+</sup>). Secara kimia, alginate sangat stabil pada pH 5 – 10. Pada konsentrasi asam tinggi dan suhu tinggi dapat menyebabkan proses dekarboksilat alginate (Rahayu, 1990; Chaves et al., 1994). Terbentuknya matriks Ca-alginat disebabkan oleh Ca bivalen bereaksi dengan monovalen anion karboksilat alginate membentuk jaringan tiga dimensi (Bucke, 1982).

### Aktivitas Proteolitik dan Koagulasi Enzim Rennin *M. pusillus*

Aktivitas proteolitik enzim rennin *M. pusillus* ekstrak kasar dan enzim rennin *M. pusillus* amobil diperoleh 0,18 dan 0,1395 unit/ml/menit. Terjadi penurunan aktivitas proteolitik enzim rennin *M. pusillus* ekstrak kasar dengan enzim rennin *M. pusillus* amobil sebesar 22,5%. Aktivitas koagulasi enzim rennin *M. pusillus* ekstrak kasar dan enzim rennin *M. pusillus* amobil diperoleh 28250 dan 6090 unit/mg protein/menit. Terjadi penurunan aktivitas koagulasi enzim rennin *M. pusillus* ekstrak kasar dengan enzim rennin *M. pusillus* amobil sebesar 78,445%.

Penurunan aktivitas enzim ekstrak kasar dengan enzim amobil karena kemampuan enzim yang terjebak dalam matriks membutuhkan waktu yang lebih lama untuk kontak dengan substrat dalam menghasilkan produk. Menurut Sasmito (1990), efek dari pembatasan difusi memberikan pengaruh yang besar terhadap kerja enzim dalam berikatan dengan substrat. Dalam amobilisasi enzim, enzim terjebak dalam matriks sehingga pori-pori dari matriks akan mempengaruhi substrat berdifusi ke dalam matriks untuk berikatan dengan enzim. Menurut Fardiaz (1988) enzim yang diamobilisasi dapat kehilangan aktivitasnya karena beberapa hal, yaitu : 1) beberapa enzim mungkin dismobilisasi pada

matriks dengan konfigurasi sedemikian rupa sehingga menghambat kontak antara substrat dengan sisi aktif enzim, 2) gugus reaktif pada sisi enzim mungkin ikut terikat pada matriks. Perlindungan sisi aktif oleh inhibitor reversible selama pengikatan akan mempertahankan aktivitasnya, 3) molekul enzim selama pengikatan mungkin berubah menjadi konfigurasi inaktif, 4) kondisi reaksi selama pengikatan mungkin menyebabkan denaturasi atau inaktivasi enzim.

Menurut Radiati dan Fardiaz (1991), standarisasi aktivitas enzim rennin *M. pusillus* yang digunakan dalam pembuatan keju memiliki aktivitas proteolitik sebesar 12 unit/ml/menit dan aktivitas koagulasi sebesar 3020 unit/mg protein/menit. Penurunan aktivitas pada enzim rennin *M. pusillus* amobil masih dapat digunakan untuk membuat keju karena masih memiliki aktivitas koagulasi dan aktivitas proteolitik. Brock (1984) menyatakan bahwa rennin dari kapang memenuhi syarat untuk pembuatan keju yaitu : 1) baik untuk koagulasi, tanpa adanya hidrolisis lanjut dari kasein, 2) menghasilkan keju dengan bau dan struktur yang baik, 3) tidak beracun, dan 4) daya proteoliticnya rendah, sehingga produk yang dihasilkan tidak pahit.

### Pengaruh Enzim Rennin Amobil terhadap Tekstur Keju

Perbedaan kelompok tidak memberikan pengaruh terhadap tekstur karena bahan baku susu segar yang digunakan rata-rata memiliki kadar air yang sama. Perbedaan pH tidak memberikan pengaruh terhadap tekstur karena pH yang digunakan merupakan kisaran pH optimum kerja enzim rennin *M. pusillus* yaitu antara 5,0; 5,5 dan 6,0. Tidak terdapat interaksi antara suhu dan

pH dalam mempengaruhi tekstur keju, kemungkinan karena interaksi antara suhu dan pH yang digunakan pada penelitian ini merupakan kisaran pH dan suhu optimum kerja enzim rennin *M. pusillus*. Perlakuan suhu memberikan pengaruh yang sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap tekstur keju segar yang dihasilkan oleh rennin *M. pusillus* amobil, karena kemungkinan variasi suhu

32, 37 dan 42<sup>0</sup>C sebagai petak utama memberikan pengaruh terhadap masing-masing anak petak. Nilai tekstur keju yang dihasilkan menggunakan enzim rennin *M. pusillus* amobil seperti pada Tabel 1.

Perlakuan suhu 32<sup>0</sup>C berbeda sangat nyata dengan suhu 37<sup>0</sup>C dan 42<sup>0</sup>C dalam mempengaruhi tekstur. Semakin besar nilai tekstur maka semakin tinggi kekerasannya. Meningkatnya kekerasan tekstur pada peningkatan perlakuan suhu karena kecepatan reaksi enzimatik pada umumnya meningkat dengan bertambahnya suhu yang

semakin tinggi akan meningkatkan gerakan molekul-molekul reaktan sehingga tumbukan antar molekul akan meningkat (Lehninger, 1988). Pada suhu 42<sup>0</sup>C kekerasan keju yang dihasilkan oleh enzim rennin *M. pusillus* amobil memiliki nilai kekerasan tertinggi menurut Garnot dan Olson (1986), suhu 40<sup>0</sup>C merupakan suhu optimum proses terjadinya koagulasi. Suhu koagulasi yang optimum akan meningkatkan proses koagulasi, sehingga pengeluaran *whey* akan lebih besar dan air yang terikat dalam *curd* lebih sehingga keju yang dihasilkan juga semakin keras.

Tabel 1 : Kenaikan Nilai Tekstur Keju pada Peningkatan Perlakuan Suhu

Suhu	Rata-Rata Nilai Tekstur (N)	Notasi
32 <sup>0</sup> C	0,7628	a
37 <sup>0</sup> C	1,1866	b
42 <sup>0</sup> C	1,5719	c

Superskrip (a,b dan c) yang berbeda pada kolom menunjukkan perbedaan yang sangat nyata

### Pengaruh Enzim Rennin Amobil Terhadap Nilai pH Keju

Suhu dan pH memberikan pengaruh yang sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap nilai pH. Nilai pH keju dapat dilihat pada Tabel 2 dan 3.

Perlakuan suhu 42<sup>0</sup>C berbeda sangat nyata dengan suhu 37<sup>0</sup>C dan suhu 32<sup>0</sup>C dalam mempengaruhi nilai pH, sedangkan suhu 37<sup>0</sup>C dan suhu 32<sup>0</sup>C tidak berbeda nyata dalam mempengaruhi nilai pH. Menurunnya nilai pH karena meningkatnya perlakuan suhu disebabkan oleh aktivitas starter (*Lactobacillus bulgaricus* dan

*Streptococcus thermophilus*) yang digunakan dalam proses pembuatan keju. Menurut Idris (2002) suhu 43<sup>0</sup>C akan menyebabkan pertumbuhan starter sangat cepat. Sehingga semakin cepat pertumbuhan starter maka akan semakin menurunkan nilai pH, sedangkan perlakuan suhu 37<sup>0</sup>C dan suhu 32<sup>0</sup>C tidak berbeda nyata dalam mempengaruhi nilai pH kemungkinan karena aktivitas starter pada suhu 37<sup>0</sup>C dan suhu 32<sup>0</sup>C tumbuh lebih lambat dibandingkan pada suhu 42<sup>0</sup>C.

Tabel 2 : Kenaikan Nilai pH Keju pada Penurunan Perlakuan Suhu

Suhu	Rata-Rata Nilai pH	Notasi
42 <sup>0</sup> C	4,77	a
37 <sup>0</sup> C	4,94	b
32 <sup>0</sup> C	4,99	b

Superskrip (a dan b) yang berbeda pada kolom menunjukkan perbedaan yang sangat nyata

Berdasarkan Tabel 3 dibawah, perlakuan pH 5,0; pH 5,5 dan pH 6,0 berbeda sangat nyata dalam mempengaruhi nilai pH. Semakin rendah perlakuan pH yang diberikan juga menunjukkan pengaruh penurunan terhadap hasil akhir nilai pH keju yang dihasilkan, hal yang mungkin terjadi adalah aktivitas starter dari *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*

masih berlanjut dalam menghasilkan asam laktat sehingga menurunkan nilai pH. Menurut Purnomo, dkk. (1996), pH keju yang dihasilkan menggunakan starter memiliki pH yang lebih rendah ini menandakan starter tersebut memiliki kemampuan mengubah laktosa menjadi asam laktat.

Tabel 3 : Kenaikan Nilai pH Keju pada Peningkatan Perlakuan pH

pH	Rata-Rata Nilai pH	Notasi
5,0	4,62	a
5,5	4,87	b
6,0	5,21	c

Superskrip (a, b dan c) yang berbeda pada kolom menunjukkan perbedaan yang sangat nyata

Kemampuan enzim rennin *M. pusillus* amobil dalam mengkatalisis substrat membutuhkan waktu yang lebih lama daripada enzim rennin tanpa amobilisasi karena menurut Sasmito (1990), enzim amobil membutuhkan waktu untuk berdifusi kedalam matriks agar dapat berikatan dengan enzim dalam menghasilkan produk. Hal ini juga mampu menurunkan nilai pH karena waktu yang dibutuhkan untuk

berkoagulasi juga dimanfaatkan oleh starter dalam memecah komponen susu menjadi komponen-komponen lain. Menurut Scott (1986), perbedaan nilai pH yang terjadi disebabkan oleh produksi asam laktat yang banyak karena aktivitas starter dan adanya aktivitas enzim rennin. Asam laktat yang banyak mengakibatkan ion hydrogen mengalami disosiasi, sehingga menurunkan pH.

### Pengaruh Enzim Rennin Amobil Terhadap Nilai Keasaman Keju

Perbedaan kelompok, suhu dan interaksiantara suhu dan pH tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap nilai keasaman karena kisaran interaksi suhu dan pH yang digunakan dalam perlakuan merupakan kisaran suhu dan pH optimum

kerja enzim rennin *M. pusillus*. Perlakuan pH memberikan perbedaan pengaruh yang sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap nilai keasaman keju. Nilai keasaman keju disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4 : Kenaikan Nilai Keasaman Keju pada Penurunan Perlakuan pH

pH	Rata-Rata Nilai Keasaman	Notasi
6,0	1,409	a
5,5	1,596	b
5,0	1,822	c

Superskrip (a, b dan c) yang berbeda pada kolom menunjukkan perbedaan yang sangat nyata

Dari Tabel 4 dapat dilihat bahwa semakin rendah perlakuan pH yang diberikan semakin meningkatkan nilai keasaman keju segar yang dihasilkan dengan menggunakan enzim rennin *M. pusillus* amobil karena pada saat pembuatan keju pencapaian perlakuan pH dilakukan dengan menggunakan starter untuk memperoleh kondisi asam yang dibutuhkan untuk membantu kerja enzim dalam menggumpalkan susu. Aktivitas proteolitik starter dari *Lactobacillus bulgaricus* dan

*Streptococcus thermophilus* juga masih berlanjut dalam menghasilkan asam laktat sehingga menurunkan nilai pH dan meningkatkan nilai keasaman. Waktu yang dibutuhkan enzim untuk mengkoagulasi susu ternyata digunakan pula untuk aktivitas metabolisme starter dalam mengubah laktosa menjadi asam laktat. Menurut Scott (1986), aktivitas proteolitik dapat mengakibatkan nilai pH rendah dan nilai keasaman menjadi lebih tinggi.

### KESIMPULAN

Alginat dapat digunakan untuk amobilisasi enzim rennin yang diproduksi dari *Mucor pusillus*. Perlakuan suhu dan pH pada pembuatan keju dengan menggunakan enzim rennin *Mucor pusillus* amobil memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap tekstur, nilai pH

dan nilai keasaman. Suhu 37<sup>0</sup>C dan pH 6,0 dalam pembuatan keju segar menggunakan enzim rennin *Mucor pusillus* amobil dapat menghasilkan keju segar berkualitas baik dengan memiliki tekstur 1,1866 N, pH 4,94 – 5,21 dan keasaman 1,409%.

### UCAPAN TERMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ditjen Dikti melalui DP2M yang telah memberikan dana untuk penelitian

melalui program penelitian Dosen Muda tahun 2005.

### DAFTAR PUSTAKA

- A.O.A.C. 1990. Official Method of Analysis of Chemist. Association of Official Analytical Chemist. Woshington, D.C.
- Bouzas, J., Kantt, C.A., Felt, B.F.W and Torres, J.A. 1993. Time and Temperature influence on Chemical Aging Indicators for a Commercial Cheddar Cheese. J. Food Sci. 58 (6):1307-1312.
- Brock, T.D. 1984. Biotechnology : A Textbook of Industrial Microbiology. Science Tech. Inc. Madison.
- Bucke, C. 1982. Industrial Use of Immobilized Enzymes and Cells. Immobilized Microbial Enzymes and Cells. Proceeding of Regional Workshop. Mahidol University. Bangkok.

- Carballo, J., Fernandez, G>P., Barreto, M., Solas, T., and Colmenero, F.J. 1996. Morphology and Texture of Bologna Sausage as Related to Content of Fat, Starch and Egg White. *J. Food Sci.* 61 (3):652-655.
- Chavez, M.S., Julia, A.L and Garrote, R.L. 1994. Crosslinking Kinetics of Thermally Preset Alginate Gels. *J. Food Sci.* 59 (5):1108.
- Djaafar, I.R. 2004. Penggunaan Teknik Amobilisasi pada Peningkatan Kestabilan Enzim Penisilin Asilase dengan Berbagai Bahan Pendukung. <http://digilib.si.itb.ac.id/go.php?id=jbptitbpp-gdl-s2-1991-irzanrosni-1746>.
- El-Katany, M.H., Hetta, M.A., Shaban, M.G and El-komy, M.H. 2003. Improvement of cell Wall Degrading Enzymes Production byn Alginate Encapsulated *Trichoderma spp.* *Food Technol.* 41 (3):219-225.
- Fardiaz, S. 1988. Fisiologi Fermentasi. PAU IPB. Bogor.
- Fedrich, I.A and Fuller, S.C. 1988. Comparison of Calf Rennet and Modified *Mucor miehei* Coagulant in Cheddar Cheese. *J. Dairy Technol.* 41 (1):12-15.
- Garnot, P. and Olson, N.F. 1986. Use of Oscilatory Deformation Technique to Determine Coting Time and Rigidities of Milk Clotted with Different Concentration of Rennet. *J. Food Sci.* 47: 1467-1471.
- Idris, S. 2002. Pengantar Teknologi Pengolahan Susu. Program Studi Teknologi Hasil Ternak. LUW-Universitas Brawijaya. Malang.
- Khan, M.R., Blain, J.A and Patterson, J.D.E. 1979. Extracellular Protease of *Mucor pucillus*. *J. Applied and Env. Microbiology.* 17 (4):719-724.
- Lehninger, A.L. 1995. Dasar-Dasar Biokimia. Jilid 1. Erlangga. Jakarta.
- Muchtadi, D., Palupi, S.R. dan Astawan, M. 1992. Enzim dalam Industri Pangan. PAU Pangan dan Gizi. IPB. Bogor.
- Panji, T. 1998. Fermentasi Kontinyu Lendir Biji Kakao Menggunakan *Trichoderma harziznum*. *J. Bioteknologi Pertanian.* Vol. 3 No. 2.
- Pramoedyo, H. 2004. Biometri Lanjutan. Program Studi Statistika. Jurusan Matematika. Fakultas MIPA. UNIBRAW. Malang.
- Purnomo, H., Lilik, E.R. Made, S.W. 1996. Rekayasa Paket Produksi Starter dan Enzim mikrobial dan Paket Aplikasinya pada Pengolahan Susu. UMM Press. Malang.
- Rahayu, K., Naruki, S dan Kanoni, S. 1990. Pemanfaatan Beberapa Bahan Sisa yang Berkadar Selulosa Tinggi untuk Pembuatan Gula (Glukosa). Lembaga Penelitian UGM. Yogyakarta.
- Radiati, L.E. dan Fardiaz, D. 1990. Laporan Penelitian Produksi Rennin *Mucor pusillus* pada Substrat Sisa Industri Minyak Jagung. PAU Pangan dan Gizi. IPB. Bogor.
- Said, G.E. 1987. Bioindustri : Penerapan Teknologi Fermentasi, PT Mediyatama Sarana Perkasa. Jakarta. Hal. 83-86.

- Sardinas, J.I. 1972. Microbial Rennet. L. Applied Microbiol. 15: 39-66.
- Sasmito. 1990. Enzim Amobil. PAU Bioteknologi UGM. Yogyakarta.
- Scott, R.M. 1986. Cheese Making Practice. 2<sup>nd</sup> ED. Elsevier Applied Sci. Publ. London.
- Sheu, T.Y. and Marshall, R.T. 1993. Microentrapment of *Lactobacilli* in Ca-Alginat Gel. J. Food Sci. 54: 557-561.
- Somkuti, G.A and Babel. 1968. Acid Protease Synthetis by *Mucor pucillus* in Chemically Defined Media. J. Bact. 95:1407-1412.
- Sudarmadji, S., Haryono, B dan Suhardi. 1997. Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Liberty. Yogyakarta.
- Wang, N.S. 2006. Enzyme Immobilization Protocol Entrapment in Alginate Gel. <http://www.glue.umd.edu/~nsw/ENCH485/lab7b.htm>
- Ward, O.P. 1983. Proteinase. In Forgoty, W.M. (ed). Microbial Enzyme and Biotechnology. Appl. Sci. Publisher. London.
- Winarno, F.G. 1984. Enzim Pangan. Gramedia. Jakarta.