

Analisis kandungan asam linoleat dan linolenat tahu kedelai dengan *Rhizopus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* sebagai koagulan

CICIK SUDARYATININGSIH^{1,✉}, SUPYANI²

Sudaryatiningsih C, Supyani. 2010. Linoleic and linolenic acids analysis of soybean tofu with Rhizopus oryzae and Rhizopus oligosporus as coagulant.

The aims of this research are to know the potency of *Rhizopus oligosporus* and *Rhizopus oryzae* as a coagulant in tofu processing for increasing the amount of linoleic and linolenic acids, and to know the time that needed by *R. oligosporus* and *R. oryzae* for increasing the amount of linoleic and linolenic acids. It uses PDA for inoculating fungi, and it is done at Sub-Lab Chemistry, Central Laboratory for Mathematics and Natural Sciences, Sebelas Maret University, Surakarta. The tofu making was done in "Dele Emas" Tofu Factory, Surakarta. Analysis of linoleic and linolenic acids were done by Gas Chromatography, in LPPT-UGM Yogyakarta. The conclusion of this research are *R. oligosporus* dan *R. oryzae* having a potency as a coagulant in tofu processing for increasing the amount of linoleic and linolenic acids. *R. oryzae* needs 18 hours to coagulate the tofu, and *R. oligosporus* needs 12 hours for the same process. The highest amount of linoleic and linolenic acids were obtained by *R. oryzae* at 6 hours of fermentation (0.26% and 0.14%), and 24 hours of fermentation by *R. oligosporus* (0.06% and 0.04%).

Key words: linoleic acid, linolenic acid, tofu, coagulant, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus oligosporus*

♥ Alamat korespondensi:

- ¹ SMA Kristen Kalam Kudus. Jl. Diponegoro, Madegondo, Grogol, Sukoharjo 57552, Central Java, Indonesia. Tel. +92-271-21605
- ² Program Studi Biosains, Program Pascasarjana, Universitas Sebelas Maret, Surakarta 57126, Jawa Tengah, Indonesia

Manuskrip diterima: 14 Juli 2009.
Revisi disetujui: 15 Oktober 2009.

♥♥

Edisi bahasa Indonesia dari:
Sudaryatiningsih C, Supyani. 2009. Linoleic and linolenic acids analysis of soybean tofu with *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus oligosporus* as coagulant. Nusantra Bioscience 1: 110-116

Sudaryatiningsih C, Supiyani. 2010. Analisis kandungan asam linoleat dan linolenat tahu kedelai dengan Rhizopus oryzae dan Rhizopus oligosporus sebagai koagulan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi jamur *R. oligosporus* dan *R. oryzae* sebagai koagulan pada proses pembuatan tahu dalam meningkatkan kadar asam linoleat dan linolenat tahu dan mengetahui waktu yang diperlukan oleh keduanya untuk memfermentasi tahu sehingga menghasilkan asam linoleat dan linolenat yang tinggi. Inokulasi jamur menggunakan PDA, dilakukan di Sub-Lab Kimia, Laboratorium Pusat MIPA, Universitas Sebelas Maret, Surakarta. Pembuatan tahu dilakukan di pabrik tahu Dele Emas Surakarta. Analisis kandungan asam linoleat dan linolenat dilakukan dengan metode kromatografi gas, dan dikerjakan di LPPT-UGM Yogyakarta. Dari hasil penelitian ini diperoleh kesimpulan *R. oryzae* dan *R. oligosporus* memiliki potensi sebagai koagulan dalam pembuatan tahu, dan waktu yang diperlukan untuk melakukan koagulasi *R. oryzae* adalah 18 jam *R. oligosporus* adalah 12 jam. Asam linoleat dan linoleat tertinggi diperoleh. Pada 6 jam fermentasi *R. oryzae* (0,26% dan 0,14%), dan 24 jam fermentasi oleh *R. oligosporus* (0,14% dan 0,08%).

Kata kunci: asam linoleat, asam linolenat, tahu, koagulan, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus oligosporus*

PENDAHULUAN

Lemak adalah zat makanan yang selalu ada dalam menu makanan sehari-hari. Berbagai macam makanan, mulai dari pisang goreng, kentang goreng, ayam goreng, rendang, hingga pizza, tidak terlepas dari lemak. Penambahan lemak dalam bentuk minyak memang berguna bagi makanan untuk memperbaiki cita rasa, tekstur, dan meningkatkan flavor (Muchtadi 2000). Lemak berguna bagi tubuh sebagai sumber energi, dan juga pelarut berbagai vitamin

(Campbell 1987). Sebagai sumber energi, lemak memiliki nilai kalori yang tinggi yaitu sebesar 9,3 kcal/g. Nilai ini lebih tinggi daripada karbohidrat dan protein. Selain itu, pada saat terjadi oksidasi, asam lemak menghasilkan banyak air metabolik, dibanding karbohidrat dan protein (Harper et al. 1979). Hal ini menguntungkan bagi organisme yang hidup di daerah kering.

Mengonsumsi terlalu banyak lemak berbahaya bagi kesehatan jantung (Forman dan Bulwer 2006; Muchtadi 2007), termasuk menyebabkan obesitas (Wilson et al. 2002; Panagiotakos et al. 2004) dan hipertensi (Houston et al. 2005).

Makanan yang memiliki kadar lemak tinggi, dapat mengakibatkan terbentuknya plak pada arteri. Terbentuknya plak akan mengakibatkan dinding bagian dalam arteri menebal, dan menyempitkan luas penampangnya. Penyakit ini disebut arterosklerosis, dan dapat menyebabkan stroke dan serangan jantung (Campbell 1987). Minyak goreng yang digunakan untuk menggoreng lebih dari satu kali juga berbahaya bagi kesehatan, karena dapat menjadi pemicu terjadinya kanker (Nadesul 2007).

Lemak dapat dihidrolisis oleh enzim lipase menjadi asam lemak dan gliserol. Dalam proses metabolisme tubuh, asam lemak dapat membahayakan kesehatan, namun ada pula yang sangat dibutuhkan bagi kesehatan. Asam lemak yang berbahaya adalah asam lemak jenuh, yaitu asam lemak yang tidak memiliki ikatan rangkap pada rantai karbon penyusunnya. Asam lemak jenuh seperti ini banyak terdapat pada lemak hewani, gajih, susu, telur, dan kulit unggas (Nadesul 2007). Sedangkan asam lemak yang tidak berbahaya bagi kesehatan adalah asam lemak tidak jenuh (Sipayung 2003). Asam lemak tak jenuh, adalah asam lemak yang memiliki ikatan rangkap pada rantai karbon penyusunnya. Contoh asam lemak tak jenuh yang penting untuk kesehatan tubuh adalah asam linoleat dan linolenat. Kedua jenis asam lemak ini merupakan asam lemak esensial, yaitu asam lemak yang tidak dapat diproduksi sendiri oleh tubuh (Harper et al. 1979). Karena tidak dapat diproduksi oleh tubuh, maka harus ada dalam makanan yang dikonsumsi. Asam linoleat sangat berperan dalam pencegahan penyakit jantung koroner dan menstabilkan pembuluh darah (Nadesul 2007).

Salah satu sumber asam linoleat dan linolenat adalah biji kedelai (Harper et al. 1979). Masyarakat Indonesia mengkonsumsi kedelai dalam berbagai bentuk olahan makanan, misalnya kecap, tahu, tempe, tauco, susu kedelai, dan lain-lain. Pada beberapa olahan makanan, terjadi perubahan nilai gizi dari kedelai, misalnya pada proses fermentasi kedelai menjadi tempe terjadi kecenderungan peningkatan asam lemak linoleat dan linolenat (Bisping et al. 1993; de Reu 1994; Karyadi dan Hermana 1995). Tahu merupakan salah satu jenis makanan yang berasal dari kedelai yang banyak dikonsumsi masyarakat. Tahu dibuat tanpa melalui proses fermentasi, sehingga kandungan asam linoleat dan linolenat tahu tidak setinggi tempe. Untuk itulah pada penelitian ini peneliti mencoba menganalisis kandungan asam linoleat dan linolenat

pada tahu dengan menggunakan jamur *Rhizopus oligosporus* dan *Rhizopus oryzae* sebagai koagulan.

Penelitian ini bertujuan untuk: (i) Mengetahui potensi jamur *R. oligosporus* dan *R. oryzae* sebagai koagulan pada proses pembuatan tahu. (ii) Mengetahui lama waktu yang diperlukan keduanya untuk melakukan koagulasi pada proses pembuatan tahu. (iii) Mengetahui potensi keduanya dalam meningkatkan kadar asam linoleat dan linolenat pada tahu. (iv) Mengetahui lama waktu yang diperlukan keduanya untuk fermentasi tahu sehingga menghasilkan kadar asam linoleat dan linolenat yang tinggi.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Juni-Juli 2009. Pembuatan inokulum biakan *Rhizopus oligosporus* dan *Rhizopus oryzae* dilakukan di Laboratorium Biologi FMIPA UNS Surakarta. Pembuatan tahu dilakukan di pabrik tahu "Dele Emas", Krajan RT. 02 RW. 01, Debean, Surakarta. Uji asam lemak tak jenuh dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu (LPPT), Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Bahan

Kedelai import dari Amerika (*Glycine max* (L.) Merr.), sebagai bahan untuk membuat tahu, diperoleh dari pengepul kedelai import, di pasar Mojosongo, Surakarta. *Rhizopus oligosporus* dan *Rhizopus oryzae* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Setia Budi, Surakarta. Media *Potato Dextrose Agar* (PDA), diperoleh dari Laboratorium Biologi Universitas Sebelas Maret Surakarta, untuk membiakkan *R. oryzae* dan *R. oligosporus*

Cara kerja

Pembuatan inokulum. Media untuk membuat inokulum biakan murni adalah dengan *Potato Dextrose Agar* (PDA). Dalam aturan pakai untuk membuat 1 liter media agar dibutuhkan 39 g PDA, sehingga untuk membuat inokulum biakan murni sebanyak 4 tabung reaksi, masing-masing 5 mL dibutuhkan $\{(4 \times 5) / 1000\} \times 39 \text{ g} = 0,78 \text{ g}$. Cara untuk membuat biakan tersebut sebagai berikut: sebanyak 20 mL akuades dimasukkan dalam gelas beker, kemudian ditambahkan 0,78 g PDA (E. Merck), ke dalamnya dan diaduk hingga tercampur rata. Larutan PDA dituang ke dalam 4 tabung reaksi, masing-masing 5 mL. Selanjutnya tabung reaksi

disumbat dengan kapas, dan dimasukkan ke dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu diletakkan pada papan miring sampai agar dingin dan padat, dan dibiarkan selama 3 hari. Sebanyak 1 ose biakan murni *R. oligosporus*. Digoreskan pada agar miring, dan dibiarkan selama 48 jam untuk siap digunakan. Hal yang sama juga dilakukan untuk membuat biakan murni *R. oryzae*.

Perhitungan spora *Rhizopus* sp. Permukaan haemasi-tometer dan tutupnya dibersihkan dengan kertas lensa dan akuades. Gelas penutup haemasi-tometer diletakkan di atas permukaan hitung. Sebanyak 5 mL akuades dituang dalam biakan *Rhizopus* sp. Dengan menggunakan jarum ose, *Rhizopus* sp. dikerok agar seluruh spora dapat terangkat. Suspensi jamur dituang kedalam tabung reaksi lain, dan dikocok. Diambil 1 mL suspensi jamur dengan pipet, dan dimasukkan kedalam lekukan berbentuk huruf V yang terletak di tepi penutup haemasi-tometer. Hemasi-tometer diletakkan dibawah mikroskop, dan dihitung sporanya. Hasil yang diperoleh ternyata dalam 1 mL suspensi *R. oryzae* terdapat $8,3 \times 10^6$ spora. Padahal untuk membuat tahu dari 1 liter sari kedelai dibutuhkan 10^7 spora (Purwoko 2001). Sehingga jumlah suspensi yang dibutuhkan adalah: $10^7 / 8,3 \times 10^6 = 1,2048$ mL. Sedangkan dalam 1 mL suspensi *R. oligosporus* diperoleh $10,9 \times 10^6$ spora, sehingga untuk 1 liter bahan diperlukan $10^7 / 10,9 \times 10^6 = 0,9174$ mL

Pembuatan tahu. Satu kilogram kedelai dicuci bersih, lalu direndam selama 6 jam. Selanjutnya digiling hingga halus, disaring diambil sarinya, dibuang ampasnya. Satu liter sari kedelai dimasak hingga mendidih, kemudian didinginkan, dan setelah dingin diinokulasi dengan 10^7 spora *R. oligosporus*. Sari kedelai yang telah diinokulasi dibuat 4 macam perlakuan, yaitu dibiarkan selama 6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam. Endapan yang terbentuk dipisahkan dari cairan dan dikempa dengan alat pengempa yang dilapisi kain belacu. Hal yang sama juga dilakukan pada *R. oryzae*.

Penentuan kadar asam linoleat dan linoleat. Penentuan kadar asam linoleat dan linoleat dilakukan dengan metode kromatografi gas.

Persiapan bahan. Masing-masing sampel ditimbang sebesar 10 g, kemudian dilumatkan/digerus untuk dihomogenkan. Sampel dimasukkan dalam labu 50 mL lalu ditambahkan 4 mL HCl pekat, dihomogenkan, kemudian ditambahkan 7 mL HCl pekat.

Hidrolisis. Bahan yang sudah homogen dimasukkan ke dalam pemanas air, dipanaskan

pada suhu 70°C, kemudian dilanjutkan sampai mendidih, dan dibiarkan selama 90 menit. Sambil dilakukan pemanasan, wadah ditutup dengan plastik agar bahan tidak menguap.

Ekstraksi. Bahan didinginkan, lalu ditambah 7 mL etanol, digojog, selanjutnya ditambahkan 25 mL dietileter dan digojog. Ke dalam bahan ditambahkan 25 mL Petroleum benzen fraksi 40-60 derajat celcius, kemudian digojog/divortex. Lapisan atas yang terbentuk dipisahkan. Bagian bawah lapisan dilakukan ekstraksi lagi, dengan menggunakan 15 mL dietileter dan 15 mL petroleum benzen. Lapisan atas dipisahkan lagi, kemudian jadikan satu dengan lapisan atas yang pertama. Selanjutnya dilakukan evaporasi pada suhu 50 derajat celcius dengan pertolongan gas N₂, sampai kering.

Saponifikasi. Ke dalam bahan yang telah kering ditambahkan 1 mL larutan 0,5 M NaOH-metanol, dipanaskan sampai mendidih selama 1 menit.

Esterifikasi. Bahan yang telah disaponifikasi ditambah 2 mL larutan BF₃-metanol 20%, dan dipanaskan hingga mendidih, selama 1 menit. Kemudian diekstrak dengan 1 mL n-heptan dan 1 mL NaCl jenuh, hingga terbentuk 2 lapisan, yaitu lapisan atas yang terdiri dari heptan dan metil ester. Lapisan atas diambil kemudian diinjeksikan ke dalam GC. Pada kondisi yang sama, injeksikan pula standar Metil linoleat dan metil linolenat, dengan konsentrasi 0,125%.

Variabel penelitian

Variabel yang diteliti pada penelitian ini antara lain: (i) Morfologi tahu yang difermentasi oleh jamur *R. oligosporus* dan *R. oryzae*. (ii) Perubahan pH tahu selama proses fermentasi (iii) Waktu yang diperlukan jamur *R. oligosporus* dan *R. oryzae* untuk melakukan koagulasi. (iv) Kandungan asam linoleat dan linolenat tertinggi yang terbentuk selama proses fermentasi oleh jamur *R. oligosporus* dan *R. oryzae*. (v) Waktu optimum yang diperlukan oleh *R. oligosporus* dan *R. oryzae* untuk menghasilkan kadar asam linoleat dan linolenat yang tertinggi selama fermentasi

HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi tahu

Pada proses pembuatan tahu ini dilakukan fermentasi dengan waktu yang berbeda, yakni 6 jam, 12 jam 18 jam dan 24 jam. Ternyata dari perlakuan di atas terlihat morfologi tahu yang

berbeda-beda, seperti pada Tabel 4. Dari tersebut terlihat adanya perubahan morfologi tahu dari bentuk awalnya yaitu sari kedelai. Perubahan itu dapat terlihat pada: perubahan warna, terbentuknya rongga-rongga, perubahan bau menjadi asam, kepadatan, dan peningkatan kadar air.

Tabel 4: Morfologi tahu fermentasi.

Lama fermentasi	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Rhizopus oligosporus</i>
6 jam	Warna putih, bau susu kedelai	Warna putih, bau susu kedelai
12 jam	Sari kedelai menjadi padat, warna putih kekuningan bau seperti tempe.	Sari kedelai menjadi padat (terbentuk tahu), Warna kekuningan, bau seperti tempe, timbul rongga-rongga kecil, timbul sedikit air
18 jam	Sari kedelai makin padat (terbentuk tahu), warna kuning, bau tempe bercampur asam, timbul rongga-rongga kecil, timbul sedikit air.	Sari kedelai lebih padat, Warna kuning, bau seperti tempe bercampur sedikit asam, rongga-rongga menjadi besar, air makin bertambah.
24 jam	Sari kedelai padat, warna kuning, bau asam makin terlihat, rongga-rongga bertambah, air bertambah	Sari kedelai padat, Warna kuning kecoklatan, bau asam makin jelas, rongga-rongga besar dan banyak, air bertambah banyak

Perubahan warna tahu

Pada peristiwa fermentasi tahu ini terjadi perubahan warna dari warna putih pada susu kedelai, berubah menjadi kekuningan, dan selanjutnya menjadi kecoklatan. Perubahan ini terjadi secara perlahan-lahan, seiring dengan lama waktu fermentasi. Perubahan warna ini baik pada *Rhizopus oligosporus* maupun *Rhizopus oryzae* dimulai setelah fermentasi berlangsung selama 6 jam. Selanjutnya, warna berubah menjadi kuning pada fermentasi 12 jam, lalu berubah menjadi kuning kecoklatan pada fermentasi 24 jam. Menurut Cook (1994), warna kuning ini disebabkan oleh pigmen karoten yang terdiri dari alfa dan beta karoten. Pigmen ini merupakan zat warna alamiah yang terdapat dalam bahan yang mengandung minyak, atau menghasilkan minyak, contohnya kelompok jamur dari ordo Mucorales. Wiesel et al. (1996), melaporkan warna kuning yang terbentuk

merupakan hasil biosintesis β -carotene oleh *Rhizopus* sp. dan menandakan proses fermentasi berjalan baik. Denter et al. (1998) dan Bisping et al. (1993) menuliskan *Rhizopus* adalah jenis kapang yang mampu membentuk β -carotene.

Dalam penelitian ini, perubahan warna yang terjadi menunjukkan adanya aktivitas fermentasi oleh jamur *Rhizopus* sp. Selama proses fermentasi *Rhizopus* sp. mensintesa β -carotene dan dilepaskan ke media, sehingga media berubah warna dari putih menjadi kuning. Peristiwa ini pada *R. oryzae* terjadi terus menerus hingga fermentasi 24 jam. Namun tidak demikian pada fermentasi dengan *R. oligosporus*. Setelah fermentasi berjalan selama 24 jam, tahu yang difermentasi dengan *R. oligosporus* warnanya tidak lagi kuning, tetapi berubah menjadi kecoklatan. Hal ini menunjukkan adanya peristiwa hidrolisis protein menjadi ikatan peptida oleh enzim protease, menghasilkan gugus amina, yang dapat bereaksi dengan gugus aldehid atau keton dan menghasilkan warna kecoklatan. Hal ini sesuai dengan laporan Subagio et al. (2002), yaitu selain adanya β -carotene, proses perubahan warna pada fermentasi oleh *Rhizopus* sp. juga disebabkan adanya proses hidrolisis protein menjadi ikatan peptida oleh enzim protease. Hasil hidrolisis adalah gugus amina, yang selanjutnya bereaksi dengan gugus aldehid atau keton dan menghasilkan warna kecoklatan. Warna kecoklatan nampak pada fermentasi oleh *R. oligosporus* setelah 24 jam, dan belum nampak pada fermentasi dengan *R. oryzae* selama 24 jam. Ini membuktikan bahwa *R. oligosporus* memiliki kemampuan menghidrolisis protein lebih cepat dibanding *R. oryzae*, atau *R. oligosporus* lebih aktif melakukan fermentasi dibanding dengan *R. oryzae*.

Rongga-rongga pada tahu

Selain terjadi perubahan warna, pada proses fermentasi tahu juga timbul adanya rongga-rongga. Pada fermentasi oleh *R. oryzae* rongga-rongga mulai nampak pada saat fermentasi 18 jam, dan bertambah banyak pada fermentasi 24 jam. Sedangkan pada fermentasi oleh *R. oligosporus* rongga-rongga kecil sudah mulai nampak pada fermentasi 12 jam, dan semakin bertambah banyak seiring dengan lama fermentasi. Rongga-rongga ini terbentuk karena protein yang mula-mula tersebar merata pada cairan sari kedelai, mulai menggumpal.

Pada awalnya baru sedikit protein yang terkoagulasi, sehingga memiliki berat molekul

yang ringan, dan masih dapat tersebar pada wadah fermentasi. Akibatnya, terbentuk rongga-rongga yang hanya kecil. Peristiwa ini terjadi pada fermentasi *R. oligosporus* setelah 12 jam fermentasi. Selanjutnya, setelah waktu fermentasi oleh *R. oligosporus* berlangsung selama 18 jam, protein yang terbentuk semakin banyak, protein ini membentuk gumpalan yang lebih besar, dengan berat molekul yang besar, sehingga cenderung mengendap, dan terbentuk rongga-rongga yang lebih besar.

Pada proses produksi tahu yang dilakukan di pabrik tahu, penggumpalan protein yang terjadi disebabkan karena sari kedelai diberi tambahan asam sebagai koagulan. Asam yang diberikan misalnya asam cuka, atau cairan tahu yang telah dieramkan selama semalam. Selanjutnya, asam ini bereaksi dan berikatan dengan protein yang terdapat pada bahan tahu tersebut, dan bersama lipid membentuk gumpalan (Santoso, 1993). Bahan koagulan sangat menentukan kualitas tahu. Semakin bagus koagulan, makin banyak protein yang terikat, sehingga randemen yang dihasilkan juga banyak (Suprapti 2005).

Pada penelitian ini diperoleh hasil koagulasi oleh *R. oligosporus* lebih cepat membentuk tahu padat dibandingkan fermentasi oleh *R. oryzae*. *R. oryzae* membutuhkan waktu 18 jam untuk membentuk tahu, sedangkan *R. oligosporus* hanya membutuhkan waktu 12 jam, untuk menggumpalkan sari kedelai menjadi tahu. Hal ini sesuai dengan laporan Sapuan dan Sutrisno (1997), *R. oligosporus* memiliki kecepatan hidrolisis protein lebih tinggi dibanding *R. oryzae*. Dengan adanya protein hasil hidrolisis ini, maka akan terbentuk gumpalan-gumpalan, dan kemudian gumpalan ini mengendap membentuk tahu.

Peningkatan kadar air dan kepadatan tahu

Akibat gumpalan-gumpalan yang terbentuk selama proses fermentasi terdapat daerah yang tidak berisi massa protein. Daerah ini tidak kosong tetapi berisi air. Adanya air ini tidak hanya dapat dilihat dari rongga-rongga yang muncul, tetapi juga dari adanya pengembunan yang terlihat pada tutup wadah fermentasi. Pada fermentasi dengan *R. oligosporus*, terbentuknya air dan uap air pada tutup wadah fermentasi terjadi pada fermentasi 12 jam, dan kadar air semakin meningkat sampai fermentasi 24 jam. Seiring dengan adanya air dan timbulnya uap air pada tutup wadah, sari kedelai juga berubah menjadi padat. Tetapi tidak demikian dengan fermentasi oleh *R. oryzae*. Pembentukan air yang

terjebak dalam rongga-rongga terlihat pada fermentasi 18 jam, dan terus meningkat hingga 24 jam fermentasi. Terbentuknya padatan sari kedelai juga baru terlihat pada fermentasi 18 jam, menunjukkan *R. oligosporus* melakukan fermentasi tahu lebih cepat dibanding *R. oryzae*. Dalam proses pembuatan tahu yang dilakukan di pabrik, kadar air yang tinggi dapat dihilangkan dengan cara dikempa menggunakan cetakan tahu dari kayu yang dilapisi kain belacu (Suprapti 2005).

Pada fermentasi tahu dengan *R. oligosporus* menghasilkan banyak gumpalan protein, dan terlihat tahu yang lebih padat, dibandingkan fermentasi dengan *R. oryzae*. Hal ini sesuai dengan pendapat Suhaidi (2003), semakin banyak gumpalan yang terbentuk, berarti semakin banyak pula protein yang terjebak didalamnya, sehingga akan menghasilkan randemen yang banyak.

Bau asam

Tahu yang difermentasi oleh *Rhizopus* sp. ini memiliki bau yang asam. Bau asam timbul karena adanya penurunan pH sari kedelai. Bau asam dapat diamati oleh indera pada fermentasi 18 jam, baik oleh *R. oryzae*, maupun *R. oligosporus*. Pengamatan pH sari kedelai dengan menggunakan pH meter terlihat pada Tabel 5 berikut ini

Tabel 5. Derajat keasaman (pH) sari kedelai yang difermentasi *Rhizopus* spp.

Lama fermentasi	pH	
	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Rhizopus oligosporus</i>
6 jam	5,81	5,86
12 jam	5,52	5,61
18 jam	5,31	5,44
24 jam	5,53	5,47

Pada Tabel 5 terlihat fermentasi oleh *Rhizopus* sp akan menghasilkan produk yang memiliki Ph berkisar pada angka 5. Menurut Sapuan dan Sutrisno (1997), penurunan pH pada media fermentasi dapat terjadi hingga pH media mencapai 4,5-5,3 dan perubahan pH ini mengakibatkan kapang tumbuh dengan baik, dan terjadilah proses fermentasi. Hidayat (2009), melaporkan pada proses fermentasi tempe, penurunan pH dimulai pada proses perendaman kedelai. Proses perendaman memberikan kesempatan tumbuh kepada bakteri-bakteri asam laktat sehingga menurunkan pH biji

kedelai. Penurunan pH ini dapat menghambat tumbuhnya bakteri kontaminan yang bersifat pembusuk. Selain itu, penurunan pH mengakibatkan kapang dapat melakukan fermentasi dengan baik.

Selanjutnya pada saat fermentasi berlangsung, *Rhizopus* sp akan menghasilkan asam laktat, dan menyebabkan pH sari kedelai menurun. Penurunan pH ini mengakibatkan protein pada kedelai mengalami penggumpalan atau koagulasi (Gaman 1992). Pada proses fermentasi tahu, penggumpalan ini mengakibatkan protein tahu yang semula tersebar, menjadi saling berikatan satu dengan yang lain sehingga terbentuk tahu. Pada penelitian ini penurunan derajat keasaman paling tajam terjadi pada fermentasi 18 jam. Bau asam dapat diamati bahkan hanya dengan indera penciuman. Ini menunjukkan aktifitas koagulasi optimum pada fermentasi *Rhizopus* sp. 18 jam.

Analisis kromatografi gas

Puncak-puncak kromatogram

Uji kandungan asam linoleat dan linolenat dilakukan dengan metode kromatografi gas, dengan menggunakan etanol sebagai pelarut, dan menggunakan *Flame Ionic Detector* (FID) sebagai detektor. Penggunaan Kromatografi gas dapat dilakukan pada sampel yang membutuhkan suhu tinggi untuk menguap, misalnya asam lemak. Hasil yang diperoleh berupa kromatogram yang memiliki puncak-puncak. Dari pengamatan kromatogram analisis kandungan tahu yang difermentasi *Rhizopus* sp. alat kromatografi gas dapat mendeteksi 3 puncak yang dominan. Berdasarkan perbandingan dengan standart, maka dapat dipastikan puncak pertama adalah asam linoleat, dan puncak yang ke dua adalah asam linolenat. Sedangkan puncak ke tiga adalah suatu senyawa yang terbentuk dari hasil oksidasi asam linolenat. Diduga senyawa ke tiga ini adalah asam arakhidonat. Hal ini sesuai dengan pendapat deMan (1997), asam linoleat akan mengalami oksidasi menjadi asam linolenat, selanjutnya asam linolenat mengalami oksidasi menjadi asam arakhidonat. Proses oksidasi ini sangat dipengaruhi oleh suhu dan intensitas cahaya. Semakin tinggi suhu dan semakin besar intensitas cahaya, semakin cepat terjadi oksidasi.

Tinggi puncak-puncak yang terbentuk pada kromatogram percobaan ini menunjukkan konsentrasi zat yang diuji pada sampel, dalam penelitian ini menunjukkan kadar asam linoleat dan linolenat. Kadar linoleat dan linolenat ini

dapat dilihat dalam Tabel 6. Tinggi puncak dari dasar kromatogram menunjukkan waktu retensi. Menurut Adnan (1997), waktu retensi adalah waktu yang diperlukan untuk memisah, dan kemudian menguap, keluar dari kolom. Waktu retensi yang lama menunjukkan, bahan tersebut membutuhkan suhu yang tinggi untuk memisah. Suhu yang tinggi diperlukan untuk melakukan pemisahan bahan yang memiliki banyak ikatan rantai ganda. Jadi semakin lama waktu retensi menunjukkan bahwa zat tersebut memiliki ikatan rangkap yang lebih banyak.

Waktu retensi juga dapat menunjukkan kecepatan gerak molekul. Dalam percobaan ini waktu retensi digunakan untuk membandingkan kecepatan gerak molekul standard, dengan kecepatan gerak molekul sampel. Pada penelitian ini waktu retensi standard adalah 8,80 menit untuk asam linoleat, dan 11,0 untuk asam linolenat. Sedangkan waktu retensi sample dapat dilihat seperti Tabel 6.

Tabel 6. Waktu retensi (*Rf*) tahu fermentasi *Rhizopus* sp.

Lama fermentasi	Puncak ke	<i>Rhizopus oryzae</i>		<i>Rhizopus oligoorus</i>	
		<i>Rf</i> (menit)	Tinggi puncak	<i>Rf</i> (menit)	Tinggi puncak
6 jam	1	8,998	1487980	8,983	8681484
	2	10,873	3561719	10,847	2593481
	3	11,029	604055	10,907	708088
12 jam	1	8,996	1513297	8,987	1077314
	2	10,885	4157405	10,862	3169875
	3	11,031	646773	11,022	466356
18 jam	1	8,990	1390400	9,009	2175045
	2	10,873	3711272	10,928	5733475
	3	11,027	619996	11,051	1090065
24 jam	1	8,991	1283842	9,014	2484471
	2	10,873	3582183	10,941	6473468
	3	11,026	573739	11,060	1268570

Dari Tabel 6 di atas menunjukkan analisis dengan kromatografi gas ini berjalan baik, yang ditunjukkan dengan waktu retensi yang mendekati standard, dan jarak waktu satu dengan yang lain terlihat perbedaan.

Kandungan asam linoleat dan linolenat

Hasil analisis kandungan asam linoleat dan linolenat dengan menggunakan kromatografi gas diperlihatkan pada Tabel 7, dimana terlihat tahu kontrol, yang dibuat dengan menggunakan asam cuka sebagai koagulan, memiliki kandungan asam linoleat dan linolenat masing-masing sebesar 0,05% dan 0,03%. Sedangkan kandungan asam linoleat dan linolenat pada tahu dengan

koagulan *Rhizopus* sp. lebih tinggi. Diduga asam linoleat dan linolenat yang ada pada tahu ini merupakan asam linolenat dan linoleat yang sudah ada pada kedelai. Ini sesuai dengan laporan Iskandar (2004), kedelai merupakan sumber asam linoleat.

Tabel 7. Kandungan asam linoleat dan linolenat pada tahu.

Nama sample	Kandungan (%)	
	Asam linoleat	Asam linolenat
Tahu kontrol	0,05	0,03
<i>R. oryzae</i> 6 jam	0,26	0,14
<i>R. oryzae</i> 12 jam	0,10	0,05
<i>R. oryzae</i> 18 jam	0,09	0,06
<i>R. oryzae</i> 24 jam	0,07	0,04
<i>R. oligosporus</i> 6 jam	0,06	0,04
<i>R. oligosporus</i> 12 jam	0,07	0,05
<i>R. oligosporus</i> 18 jam	0,12	0,07
<i>R. oligosporus</i> 24 jam	0,14	0,08

Proses pembuatan tahu yang beredar di pasaran, biasanya menggunakan asam cuka, atau sisa air tahu kemarin yang dieramkan semalam, dan tanpa mengalami fermentasi. Asam cuka akan bereaksi dengan protein, mengakibatkan terjadinya penggumpalan protein, dan terbentuk tahu. Perubahan dari sari kedelai menjadi tahu ini berlangsung kira-kira selama 90 menit. Sedangkan pada pembuatan tahu yang menggunakan *Rhizopus* sp. terjadi perubahan sari kedelai menjadi tahu yang padat secara perlahan-lahan. Perubahan ini terjadi secara enzimatik, sehingga terbentuk zat baru. Misalnya perubahan dengan enzim lipase, mengakibatkan terbentuknya asam lemak linoleat dan linolenat (Pawiroharsono 1997).

Fermentasi tahu oleh *Rhizopus oryzae*

Pada 6 jam pertama fermentasi dengan *R. oryzae*, tahu memiliki kandungan asam linoleat dan linolenat yang paling tinggi, setelah itu terjadi kecenderungan menurun. Hal ini terjadi karena pada awal fermentasi *R. oryzae* akan mensintesis asam linoleat yang tinggi, setelah itu asam lemak ini diubah menjadi asam linolenat. Asam linoleat berasal dari asam oleat yang merupakan hasil hidrolisis lemak oleh enzim lipase pada saat proses fermentasi. Hal ini sesuai dengan teori Teng et al. (2008), bahwa *Rhizopus* memproduksi lipase, selama proses fermentasi berlangsung. Lipase ini berfungsi melakukan aktivitas hidrolisis, namun sekaligus juga

mensintesis. Pada mulanya asam lemak yang terbentuk adalah asam oleat, namun selanjutnya asam ini akan mengalami desaturasi menjadi asam linoleat, dan diubah lagi menjadi asam linolenat (Styme and Stobart 1986).

Jamur dari kelas Zigomycetes memiliki enzim desaturase, yaitu enzim yang mampu mengubah asam oleat hasil hidrolisis lemak oleh lipase, menjadi asam linoleat dan linolenat (Suharyanto et al. 2006). Pada awal tahap hidrolisis lemak terbentuk asam linoleat, selanjutnya asam ini mengalami penambahan ikatan rangkap, menjadi asam linolenat (Harper et al. 1979). Reaksi desaturasi asam lemak merupakan reaksi berantai. Asam oleat diubah menjadi asam linoleat dengan bantuan enzim Δ^{12} desaturase, selanjutnya asam linoleat diubah menjadi asam linolenat dengan bantuan enzim Δ^6 desaturase (Suharyanto et al. 2006). Secara ringkas perubahan asam linoleat menjadi linolenat dapat dituliskan sebagai berikut:



Asam oleat \rightarrow asam linoleat \rightarrow asam linolenat

Pada fermentasi *R. oryzae* 12 jam dan seterusnya, asam linoleat tidak terbentuk lagi tetapi telah diubah menjadi asam linolenat, sehingga jumlah linoleat berangsur-angsur menurun, diikuti dengan penurunan kadar asam linolenat. Kecenderungan menurunnya asam linoleat dan linolenat ini berlangsung terus menerus, pada fermentasi 18 jam, hingga fermentasi 24 jam. Ini menunjukkan waktu optimum pembentukan asam linoleat dan linolenat pada tahu yang difermentasi dengan *R. oryzae* adalah 6 jam, dan selanjutnya pembentukan asam linoleat berhenti, dan asam linoleat mengalami hidrolisis menjadi asam linolenat. Pembentukan asam linoleat, diduga disebabkan beberapa faktor, antara lain: suhu, kadar air, dan oksigen.

Purwoko et al. (2001) melaporkan terjadinya peningkatan suhu pada fermentasi tempe kedelai oleh kapang *Rhizopus* sp. Menurut Suharyanto et al. (2006), peningkatan suhu pada proses fermentasi dapat menghambat aktivitas enzim desaturase, sehingga pembentukan asam lemak tak jenuh menurun. de Man (1997) melaporkan bahwa proses oksidasi asam linoleat dan linolenat sangat dipengaruhi oleh suhu dan intensitas cahaya. Semakin tinggi suhu, proses pembentukan asam lemak akan semakin menurun. Pada penelitian ini, fermentasi oleh *R. oryzae* dilakukan pada suhu kamar (25-26°C).

Pada suhu ini pembentukan asam lemak terjadi secara normal. Selanjutnya, seiring dengan terjadinya fermentasi terjadi pula peningkatan suhu. Akibatnya, proses pembentukan asam linoleat semakin menurun, dan diikuti pula penurunan asam linolenat.

Kadar air akan mempengaruhi kerja enzim lipase. Kadar air yang tinggi, enzim lipase akan menghidrolisis lemak menjadi gliserol dan asam lemak. Sedangkan pada kadar air yang rendah, akan terbentuk alkohol atau ester lainnya. Pada penelitian ini media yang digunakan adalah sari kedelai yang berbentuk cair, sehingga kadar air cukup tinggi, dan mengakibatkan aktivitas enzim lipase menghidrolisis lemak dapat berjalan baik. Suharyanto et al. (2006), juga melaporkan, kadar air yang terlalu tinggi akan mempengaruhi kelarutan oksigen. Pada awal proses fermentasi air yang tersedia adalah air yang terdapat dalam media. Air ini mempercepat pembentukan asam lemak linoleat, dan linolenat. Selanjutnya, media mendapatkan tambahan air dari proses fermentasi (Purwoko 2004). Meningkatnya kadar air pada tahu dapat dilihat dari munculnya rongga-rongga pada tahu, dan juga dari adanya uap air pada tutup wadah fermentasi. Akibatnya kelarutan oksigen menjadi berkurang, dan pembentukan asam linoleat juga menurun.

Mikroorganisme aerob dan anaerob fakultatif membutuhkan oksigen pada proses desaturasi asam lemak. Aerasi dapat meningkatkan kelarutan oksigen sehingga meningkatkan derajat ketidakjenuhan asam lemak yang diproduksi (Suharyanto et al. 2006). Pada penelitian ini, pada awal fermentasi kandungan oksigen dalam media tinggi, tetapi setelah beberapa saat terjadi fermentasi, maka kandungan oksigen semakin menurun, sehingga pembentukan asam linoleat juga menurun.

Fermentasi tahu oleh *Rhizopus oligosporus*

Pada fermentasi tahu yang menggunakan *R. oligosporus*, terjadi kecenderungan yang berbeda dengan fermentasi yang menggunakan *R. oryzae*. Pada fermentasi selama 6 jam, terbentuk asam linoleat dan linolenat yang paling kecil jumlahnya. Ini menunjukkan fermentasi sudah mulai aktif, *R. oligosporus* sudah mulai mengeluarkan enzim lipase pada 6 jam fermentasi. Selanjutnya, pada fermentasi 12 jam, kandungan asam linoleat mengalami peningkatan, dan diikuti dengan asam linolenat. Ini membuktikan, pada fermentasi 12 jam, enzim lipase masih aktif bekerja menghasilkan asam linoleat. Selain

terjadi pembentukan asam linoleat, juga terjadi hidrolisis asam linoleat menjadi linolenat. Sifat ini sangat berbeda dengan fermentasi jamur *R.oryzae*, karena aktivitas enzim lipase pada fermentasi *R. oryzae* 12 jam sudah tidak lagi menghasilkan asam linoleat.

Jika diperhatikan pada Tabel 7, fermentasi oleh *R. oligosporus* selama 18 jam, aktivitas fermentasi terlihat semakin kuat, produksi asam linoleat semakin banyak. Kecepatan reaksi dari asam linoleat menjadi linolenat, lebih kecil dibanding kecepatan reaksi pembentukan asam linoleat. Akibatnya kandungan asam linoleat terjadi peningkatan yang lebih besar dibanding asam linolenat. Tetapi hal ini tidak berlangsung lama, karena pada aktivitas fermentasi jam ke 24, pembentukan asam linoleat meskipun mengalami peningkatan, tapi tidak sebanyak pada fermentasi 18 jam.

Peningkatan asam linoleat dan linolenat yang terjadi terus menerus seiring dengan waktu fermentasi. Hal ini sesuai dengan pendapat Sapuan dan Sutrisno (1997), *R. oligosporus* memiliki aktivitas enzim lipase yang lebih tinggi dibanding *R. oryzae*, sehingga mampu menghasilkan asam lemak yang lebih banyak. Selain itu *R. oligosporus* dapat melakukan fermentasi kedelai dan menghasilkan tempe yang sempurna dalam waktu yang lebih singkat. Steinkrauss et al. (1983) melaporkan *R. oryzae* membutuhkan waktu 48 jam untuk menghasilkan tempe yang sempurna, sedangkan *R. oligosporus* hanya membutuhkan waktu 24-36 jam untuk menghasilkan tempe yang sempurna. Sementara itu, Ariani (2003) melaporkan *R. oligosporus* aktif melakukan fermentasi hingga jam ke-48.

Dengan kemampuannya melakukan aktivitas fermentasi yang lama, maka *R. oligosporus* mampu melakukan metabolisme terhadap berbagai zat, di antaranya asam linoleat, sehingga terbentuk asam linoleat yang tinggi. Selanjutnya ketika masih aktif melakukan fermentasi, asam linoleat sebagian telah diubah menjadi asam linolenat. Akibatnya, pada fermentasi menggunakan *Rhizopus oligosporus* kandungan asam linoleat cenderung meningkat, sementara asam linolenat juga meningkat.

KESIMPULAN

R. oryzae dan *R. oligosporus* memiliki potensi untuk dipergunakan sebagai koagulan dalam pembuatan tahu. Waktu optimum untuk

melakukan koagulasi *R. oryzae* adalah 18 jam *R. oligosporus* adalah 12 jam. Tahu yang dibuat dengan menggunakan *R. oryzae* dan *R. oligosporus* sebagai koagulan memiliki kandungan asam linoleat dan linoleat yang lebih tinggi dari pada tahu yang menggunakan asam cuka sebagai koagulan. Asam linoleat dan linolenat tertinggi diperoleh: (i) *R. oryzae* pada fermentasi 6 jam (0,26% dan 0,14%), setelah itu asam linoleat dan linolenat cenderung mengalami penurunan, seiring dengan lama fermentasi. (ii) *R. oligosporus* pada fermentasi 24 jam (0,14% dan 0,08%)

DAFTAR PUSTAKA

- Adnan M. 1997. Teknik kromatografi untuk analisa bahan makanan. Penerbit Andi. Yogyakarta.
- Ariani SRD. 2003. Pembuatan keju kedelai yang mengandung senyawa faktor-2 hasil biokonversi isoflavon pada tahu oleh *Rhizopus oligosporus* (L.41). Biosmart 5 (1): 8-12.
- Bisping B, Hering L, Baumann U, Denter J, Keuth S, Rehm HJ. 1993. Tempe fermentation: Some aspects of formation of γ -linolenic acid, proteases and vitamins. Biotechnol Adv 11 (3): 481-493.
- Campbell NA. 1987. Biology. Benjamin/Cummings. California
- Cook PE. 1994. Fermented foods as biotechnological resources Food Res Intl 27 (3): 309-316
- De Man JM. 1997. Kimia makanan. Penerbit ITB. Bandung.
- de Reu JC, Ramdaras D, Rombouts FM, Nout MJR. 1994. Changes in soya bean lipids during tempe fermentation. Food Chem 50 (2): 171-175.
- Denter J, Rehm H, Bisping B. 1998. Changes in the contents of fat-soluble vitamins and provitamins during tempe fermentation. Intl J Food Microbiol 45: 129-134
- Forman D, Bulwer BE. 2006. Cardiovascular disease: optimal approaches to risk factor modification of diet and lifestyle. Curr Treat Options Cardiovasc Med 8 (1): 47-57.
- Gaman PM, Sherrington KB. 1992. Pengantar ilmu pangan nutrisi dan mikrobiologi. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Harper HA, Rodwell VW, Mayes PA. 1979. Biokimia. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Hidayat N. 2009. Tahapan proses pembuatan tempe. Universitas Brawijaya. Malang.
- Houston MC, Basile J, Bestermann WH, Egan B, Lackland D, Hawkins RG, Moore MA, Reed J, Rogers P, Wise D, Ferrario CM. 2005. Addressing the global cardiovascular risk of hypertension, dyslipidemia, and insulin resistance in the southeastern United States. Am J Med Sci 329 (6): 276-291.
- Iskandar Y. 2004. Penentuan kadar asam linoleat pada tempe secara kromatografi gas. Fakultas MIPA Universitas Padjajaran. Jatinangor, Sumedang.
- Karyadi D, Hermana H. 1995. Potensi tempe untuk gizi dan kesehatan. Prosiding Simposium Nasional Pengembangan Tempe dalam Industri Pangan Modern. Penerbit Yayasan Tempe Indonesia. Jakarta.
- Muchtadi TR. 2000. Asam lemak omega 9 dan manfaatnya bagi kesehatan. Media Indonesia, 29 November 2000.
- Nadesul H 2007. Sehat itu murah. Penerbit Buku Kompas, Jakarta
- Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Rivas G, Koutogianni MD, Zampelas A, Stefanadis C. 2004. Epidemiology of overweight and obesity in a Greek adult population: the ATTICA Study. Obes Res 12 (12): 1914-1920.
- Pawiroharsono S 1997. Aspek mikrobiologi tempe. Dalam: Sapuan, Sutrisno (ed). Bunga rampai tempe Indonesia. Yayasan Tempe Indonesia. Jakarta.
- Purwoko T, Gandjar I, Pawiroharsono S. 2001. Biotransformasi isoflavon oleh *Rhizopus oryzae* UICC 524. Biosmart 3 (2): 7-12.
- Purwoko T, Nurkayati, Arumsari R. 2003. Aktivitas antioksidasi ampas tahu terfermentasi terhadap oksidasi minyak kedelai. Biosmart 5 (1): 12-16.
- Purwoko T. 2004. Kandungan isoflavon aglikon pada tempe hasil fermentasi *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*: pengaruh perendaman. Biosmart 6 (2): 85-87.
- Santoso HB. 1993. Pembuatan tempe dan tahu kedelai bahan makanan bergizi. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Sapuan, Sutrisno. 1997. Bunga rampai tempe Indonesia. Yayasan Tempe Indonesia. Jakarta.
- Sipayung R. 2003. Biosintesis asam lemak pada tanaman. Jurusan Budi-daya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Steinkraus KH, Cullen RE, Pederson CS, Nellis LF, Gavitt BK. 1983. Indonesian tempeh and related fermentations. In: Steinkraus KH (ed). Handbook of indigenous fermented foods. 1st ed. Marcel Dekker. New York.
- Stymie S, Stobart AK. 1986. Biosynthesis of gamma-linolenic acid in cotyledons and microsomal preparations of the developing seeds of common borage (*Borago officinalis*). Biochem J 240 (2): 385-393.
- Subagio A, Hartanti S, Windrati WS, Unus, Fauzi M, Herry B. 2002. Kajian sifat fisikokimia dan organoleptik hidrolisat tempe hasil hidrolisis protease. J Teknologi Industri Pangan 13 (3): 204-210.
- Suhaidi I. 2003. Pengaruh lama perendaman kedelai dan jenis zat penggumpal terhadap mutu tahu. Fakultas Pertanian Jurusan Teknologi Pertanian, Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Suharyanto, Tripanji, Abdullah MI, Syamsu K. 2006. Biokonversi CPO dengan desaturase amobil sistem kontinu pada skala semipilot untuk produksi minyak mengandung GLA. Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia. Bogor.
- Suprapti L. 2005. Pembuatan tahu. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Teng Y, Xu Y, Wang D. 2008. Production and regulation of different lipase activities from *Rhizopus chinensis* in submerged fermentation by lipids. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, PR China.
- Wiesel I, Rehm HJ, Bisping B. 1996. Improvement of tempe fermentations by application of mixed cultures consisting of *Rhizopus* sp. and bacterial strains. Appl Microbiol Biotechnol 47 (3): 218-225.
- Wilson PW, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise H, Kannel WB. 2002. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. Arch Intl Med 162 (16):1867-72.