

STUDI FRAKSI PROTEIN DAN ENSIM PEROKSIDASE KACANG HIJAU DENGAN ANALISIS SODIUM DODESIL SULFAT-POLIAKRILAMID GEL ELEKTROFORESIS

B.A. Susila Santosa* dan
S. Moeljapawiro*

ABSTRAK

Fraksinasi protein kacang hijau dilakukan dengan empat macam pelarut sehingga didapatkan fraksi-fraksi albumin, globulin, prolamin dan glutelin; sedangkan ekstrak enzim peroksidase dilakukan dengan buffer Tris-HCl, pH 8,3. Identifikasi fraksi-fraksi tersebut dianalisis kadar protein dan dengan sodium dodesil sulfat - poliakrilamid gel elektroforesis (SDS-PAGE) dalam 7,5% gel poliakrilamide dengan buffer elektrolit Tris glisin pH 8,9.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi dan mengidentifikasi fraksi protein kacang hijau serta mendapatkan karakteristik kelarutannya. Hal ini dapat dipakai untuk mempersiapkan proses pengolahan pangan lebih lanjut yang berkaitan dengan sifat-sifatnya.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pola fraksi-fraksi protein kacang hijau berbeda satu sama lain, baik dengan varietas maupun suhu ekstraksi. Komponen utama penyusun protein kacang hijau adalah globulin, sebesar 71,0%. Rasio fraksi albumin : globulin : prolamin : glutelin = 30 : 62 : 1 : 4. Enzim peroksidase kacang hijau mempunyai dua isoensim dengan Berat Molekul masing-masing 69.000 dan 42.000.

Pendahuluan

Berat dan ukuran molekul polipeptida dapat ditentukan dengan R_f (mobilitas relatif) elektroforesis

*Masing-masing Staf Peneliti Kimia-Teknologi dan Pemuliaan, Balai Penelitian Tanaman Pangan, Sukamandi.

dalam Sodium Dodesil Sulfat - Poliakrilamide Gel Elektroforesis (SDS-Page). Studi protein dan isoensim dengan elektroforesis telah membuktikan banyak manfaat dan kegunaannya bagi beberapa peneliti. Pemisahan protein dengan poliakrilamide elektroforesis dengan menggunakan detergen anionic SDS dipengaruhi oleh berat molekul rantai polipeptida. SDS-Page ini pertama kali digunakan untuk mempelajari struktur enzim aspartat transcarbamaflase pada bakteri *Escherichia coli* (Shapiro, et al. 1967).

Analisis elektroforesis group varietas gandum menunjukkan bahwa protein pada setiap group memiliki relatif mobilitas serupa. Selama sepuluh tahun terakhir cara analisis komposisi protein gandum telah mengalami perubahan cara yang baru telah memperlihatkan bahwa gliadin, albumin dan globulin dapat dipisahkan, didapatkan oleh Osborne dan Mendel, (1917). Analisis gel elektroforesis telah menegaskan bahwa protein gandum terdiri banyak komponen yang sangat nyata, di antaranya sekitar 3 — 8 sub unit protein.

Enzim merupakan protein yang relatif mudah rusak oleh kondisi pengolahan, pH, suhu, logam dan

lain sebagainya. Pola isoensim pada elektroforesis dapat menunjukkan sifat perubahan yang terjadi atau dipengaruhi oleh tingkat proses pengolahan (Santosa, 1987). Pada kedelai menunjukkan bahwa pemakaian teknologi proses ini dapat menghasilkan sejenis bahan makanan berprotein tinggi.

Kacang hijau dapat digunakan sebagai alternatif sumber protein dan gizi yang disenangi oleh masyarakat. Di samping itu, kacang hijau mempunyai potensi yang baik untuk dikembangkan, karena mempunyai kadar protein relatif tinggi. Pada umumnya protein nabati mudah difraksinasi dan diklasifikasi menurut sifat kelarutannya (Osborne, 1924; Cherry, et al. 1973). Penelitian pada protein kacang tanah menunjukkan bahwa protein globulin mempunyai berat molekul tinggi dan mudah tidaknya terurai dipengaruhi oleh kondisi ekstraksi, pH, kekuatan ion, konsentrasi protein, suhu dan lain sebagainya. Penerapan dan pengembangan untuk mudahnya fraksinasi protein dapat digunakan metode SDS-Page. Pemakaian SDS-Page tersebut menunjukkan bahwa fraksi arachin pada kacang tanah dapat lebih mudah diisolasi dan dimurnikan (Singh dan Diekert, 1983; Shetty dan Rao, 1974).

Makalah ini menyajikan evaluasi protein kacang hijau berdasarkan SDS-Page, identifikasi fraksi protein albumin, globulin, prolamin, glutelin dan enzim peroksidase yang diperoleh dengan berbagai cara ekstraksi, untuk mendapatkan fraksi yang

kelarutan yang tinggi, sehingga kemungkinan dapat dikembangkan untuk penyiapan dalam pembuatan tepung, konsentrat, isolat yang mempunyai keamanan pangan tinggi.

Bahan dan Metoda

Bahan yang digunakan dalam percobaan ini adalah kacang hijau varietas Bhakti dan No. 129. Kacang hijau ini diperoleh dari Bagian Pemuliaan Kacang-kacangan di Balai Penelitian Tanaman Pangan Sukamandi. Mula-mula kacang hijau dibuat tepung yang lolos mesh 80 Kadar airnya 7,5%. Untuk lebih jelasnya urutan penelitian ini dapat dilihat pada gambar 1.

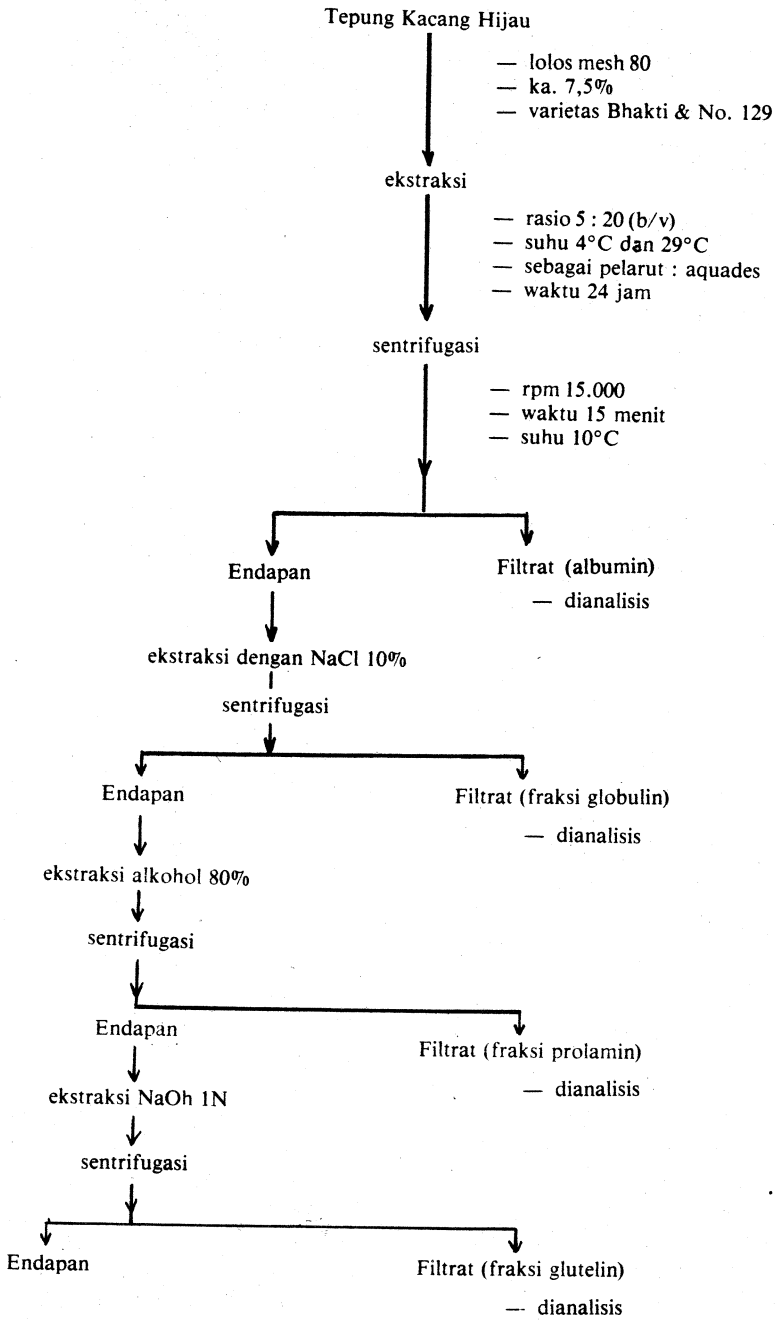
Fraksi-fraksi protein dianalisis kadar air, protein dan pola fraksi protein pada SDS-Page (Laemmli, 1967) dan pola spesifik enzim peroksidase (Moeljopawiro, et al. 1984) dari bahan dasar biji kacang hijau.

Hasil dan Pembahasan

Fraksi protein kacang hijau

Kelarutan protein kacang hijau dilakukan berdasarkan cara Osborne (1924). Protein dibagi atas 4 fraksi kelarutan yaitu albumin (protein larut air), globulin (protein larut dalam garam), prolamin (protein larut alkohol) dan glutelin (protein larut alkali).

Pada tabel 1 dapat dilihat bahwa fraksi protein globulin kacang hijau merupakan komponen yang tertinggi



Gambar 1. Diagram Alir Fraksinasi Protein Kacang Hijau

Tabel 1. Fraksi Protein (g/12,5 g sampel) : albumin, Globulin, Prolamin dan Glutelin Kacang Hijau

Fraksi Protein	Kacang Hijau Varietas pada Suhu Ekstraksi			
	Bhakti		No. 129	
	29°C	4°C	29°C	4°C
Albumin	0,50	1,22	0,23	1,20
Globulin	2,06	2,17	2,34	1,88
Prolamin	0,01	0,01	0,05	0,01
Glutelin	0,11	0,14	0,15	0,29
Protein terkaver	2,23	3,54	2,77	3,38
Protein ter-ekstrak	82,6%	89,0%	84,4%	86,3%

Data rata-rata 3 ulangan perlakuan dan analisis.

dibanding fraksi-fraksi lain, kemudian fraksi albumin, glutein dan prolamin, hal ini terjadi baik pada ekstraksi suhu 29°C dan suhu 4°C. Ekstrakabilitas protein yang terbaik pada kondisi suhu ekstraksi 4°C, dan ekstrakabilitas yang tertinggi terdapat pada varietas Bhakti sebesar 89,0%.

Tabel 2 menunjukkan persentase fraksi-fraksi protein kacang hijau. Hasil perhitungan dari fraksinasi protein menunjukkan bahwa fraksi globulin merupakan penyusun utama protein kacang hijau, persentasenya sekitar 73,3% pada varietas Bhakti dan 68,6% pada varietas No. 129. Sedangkan rasio fraksi-fraksi albumin : globulin : prolamin : glutelin adalah rata-rata 30 : 62 : 1 : 4. Apabila dilihat secara tabulasi menunjukkan bahwa rasio fraksi-fraksi protein tersebut berbeda antara kondisi ekstraksi pada suhu 4°C terhadap rasio yang diperoleh pada

29°C dan antar varietas itu sendiri. Banyaknya protein yang terekstrak sangat dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan, suhu, waktu, rasio bahan dengan pelarutnya, ukuran partikel sampel dan lain sebagainya (Bietz, 1979; Santosa dan Setiowati, 1988). Boulter dan Derbyshire, (1978) melaporkan rasio albumin : globulin : prolamin : glutelin = 5 : 10 : 45 : 40 untuk gandum; 5 : 5 : 50 : 40 untuk jagung; 8 : 8 : 52 : 32 untuk sorghum dan 1 : 13 : 18 : 68 untuk oat. Dua fraksi prolamin dan globulin merupakan penyusun utama pada sereal, tetapi perbandingan tersebut berbeda satu dengan yang lain. Sedangkan protein pada beras, penyusun yang utama adalah glutelin sebesar 75 — 80% (Damardjati, 1983). Ekstrakabilitas akan menunjukkan nilai lebih tinggi bila partikelnya mempunyai tingkat kehalusan yang tinggi atau tingkat mesh yang lebih

tinggi (Santosa dan Setiowati, 1988).

Tabel 1 dan 2 menunjukkan bahwa rasio fraksi protein hasil fraksinasi kacang hijau berbeda satu sama lain, baik pada varietas maupun pada suhu ekstraksinya. Sifat kelarutan protein kacang hijau sangat dipengaruhi oleh larutan garamnya, hal ini ditunjukkan oleh adanya komponen yang utama dan terbesar. Globulin tidak mudah larut dalam isoelektrik pada konsentrasi garam yang rendah (Wolf, 1978).

Pola Fraksi Protein pada SDS-Page

Protein globulin kacang tanah sangat kompleks, mengandung sebanyak 9 sub-unit polipeptida yang mempunyai berat molekul sekitar 10.000 — 71.000, tetapi menurut Shetty dan Rao (1974), globulin ini mempunyai 4 atau 6 sub-unit polipeptida. Data yang berbeda ini menunjukkan bahwa arachin sangat mudah berubah karena perbedaan cara yang digunakan untuk isolasi dan disosiasi, adanya detergent dan

Tabel 2. Persentase Fraksi Protein Kacang Hijau yang Terekstrak

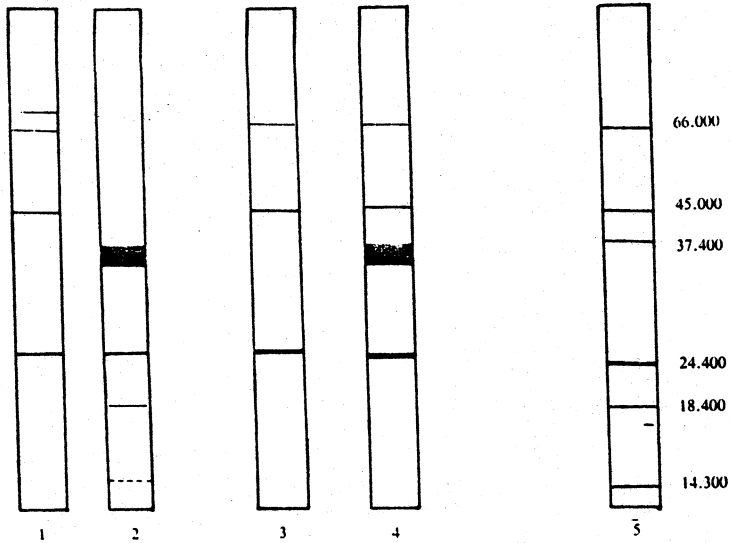
Fraksi Protein (%)	Kacang Hijau Varietas				
	Bhakti		No. 129		
	Suhu	4°C	29°C	4°C	39°C
Albumin		30,5	29,4	31,1	30,2
Globulin		60,1	59,3	63,8	60,6
Prolamin		0,5	0,3	0,7	0,3
Glutelin		4,9	4,0	5,8	4,6

Data rata-rata 3 ulangan perlakuan dan analisis.

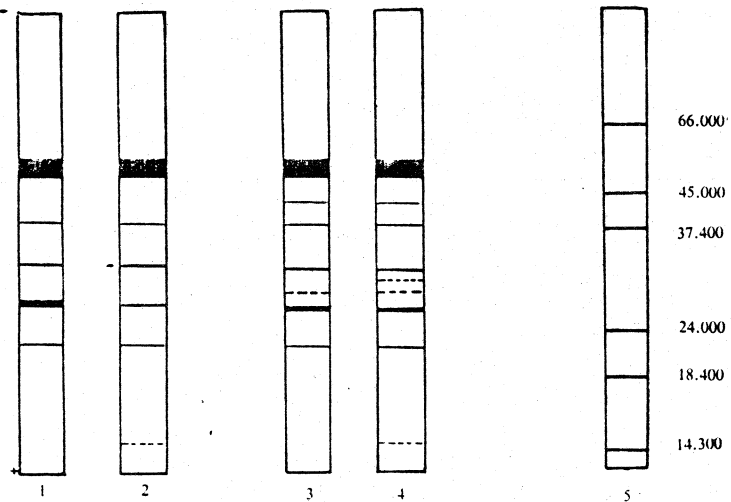
bahan reduksi. Pemakaian SDS-Page dapat menentukan struktur sub unit proteinnya. Fraksi protein kacang hijau ditekankan pada poliakrilamide gel elektroforesis dengan adanya sodium dodecil sulfat. Pemisahan protein berdasarkan ukuran dan berat molekul karena penambahan detergent SDS. muatan, dan pH larutan serta gel sebagai media pemisah protein (Bietz, 1979). Dengan teknik elektroforesis ini dapat ditentukan berat molekul rantai polipeptida dengan selang keper-

cayaan 10% (Weber dan Osborne, 1969); sedangkan dengan metode Laemmli (1967) dan Juliano dan Boulter, (1976) dapat juga untuk menentukan berat molekul.

Dalam penelitian ini, standard yang dipakai untuk menentukan berat molekul fraksi protein kacang hijau adalah albumin bovin, BM 66.000; albumin eggs, BM 45.000; pepsin, BM 37.400; trypsinogen, BM 24.000; bethalactoglobulin, BM 18.400; dan lysozyme, BM 14.300. Dengan analisis SDS-Page,



Gambar 2. Pola Zymogram Protein Albumin dari Dua Varietas Kacang Hijau
 Varietas No. 129 : 1. Suhu Ekstraksi 29°C
 2. Suhu Ekstraksi 4°C
 Varietas Bhakti : 3. Suhu Ekstraksi 29°C
 4. Suhu Ekstraksi 4°C
 5. Berat Molekul Standard



Gambar 3. Pola Zymogram Protein Globulin dari Dua Varietas Kacang Hijau
 Varietas No. 129 : 1. Suhu Ekstraksi 29°C
 2. Suhu Ekstraksi 4°C
 Varietas Bhakti : 3. Suhu Ekstraksi 29°C
 4. Suhu Ekstraksi 4°C
 5. Berat Molekul Standard.

standar protein dan fraksi protein kacang hijau relatif mobilitas (Rf) dapat dibaca dengan Rf reader (Sigma Electrophoresis Rf reader). Dengan kertas grafis semi logaritmik dapat digambarkan hubungan antara berat molekul dengan relatif mobilitas, sehingga berat molekul fraksi kacang hijau dapat dibaca dari kurve standar tersebut (gambar 2 dan 3).

Perbedaan suhu ekstraksi menunjukkan pola kedua fraksi protein berbeda, ada pita yang hilang pada suhu ekstraksi yang lebih tinggi, kemungkinan hal ini disebabkan kerusakan protein sewaktu ekstraksi. Pola protein albumin dan globulin dari kedua varietas kacang hijau

berbeda satu sama lain; jadi dengan cara analisis SDS-Page dapat untuk karakterisasi atau membedakan varietas yang ada, sedangkan pola protein prolamine dan glutelin belum dapat menunjukkan band atau pita. Hal ini kemungkinan kadar proteinnya terlalu sedikit dalam fraksi tersebut. Cara untuk mengatasinya, larutan fraksi tersebut perlu dipekatkan atau dikeringkan secara freeze drying.

Pola protein albumin dan globulin digambarkan secara diagramatis. Pengamatan dilakukan pada relatif mobilitas dari fraksi protein yang nampak pada gel dan hanya pita-pita pada ulangan yang mewakili saja yang diamati.

Tabel 3. Intensitas Warna Fraksi Albumin dari Dua Varietas Kacang Hijau pada SDS-Page

Sub Unit	Relatif Mobilitas	Varietas	
		Bhakti	No. 129
1	3,0	—	+
2	3,5	+	+
3	6,0	+	+
4	6,5	+++	+++
5	7,8	++	++
6	8,0	—	+
7	8,5	—	+

+ : Intensitas warna rendah; ++ : Intensitas warna medium
+++ : Intensitas warna sangat tinggi; — : tidak ada warna.

Jumlah fraksi albumin dan globulin yang nampak pada gel terhitung 12 pita, yang masing-masing mempunyai berat molekul berbeda (gambar 2 dan 3). Pada varietas Bhakti, protein albumin

mempunyai 2 komponen utama sebagai struktur sub unit protein dan 2 sub unit protein minornya dan globulin mempunyai 3 komponen protein utama dan 6 sub unit protein minornya (tabel 3 dan 4), sedangkan

Tabel 4. Intensitas Warna Fraksi Globulin dari dua Varietas Kacang Hijau pada SDS-Page

Sub Unit	Relatif Mobilitas	Varietas	
		Bhakti	No. 129
1	6,0	+++	+++
2	6,3	+	—
3	6,5	+	+
4	7,0	++	++
5	7,3	+	—
6	7,4	+	—
7	7,5	++	++
8	7,8	+	+
9	8,5	+	+

- + : Intensitas warna rendah
 ++ : Intensitas warna medium
 +++ : Intensitas warna sangat tinggi
 — : tidak ada warna

varietas No. 129 menunjukkan lebih besar 2 — 3 sub unit protein minor-nya. Fullington, et al (1980) mengidentifikasi pola protein total dari varietas gandum yang berbeda. Pergerakan atau mobilitas yang sama pada protein yang spesifik membuktikan struktur molekul yang homolog dan fungsinya yang sama. Analisis elektroforesis dapat digunakan oleh peneliti sebagai identifikasi varietas dan perbedaan pengolahan yang dapat mempengaruhi karakteristik protein yang ada. Protein kacang hijau ini mempunyai berat molekul antara 14.700 — 72.000.

Pola Isoensim Peroksidase

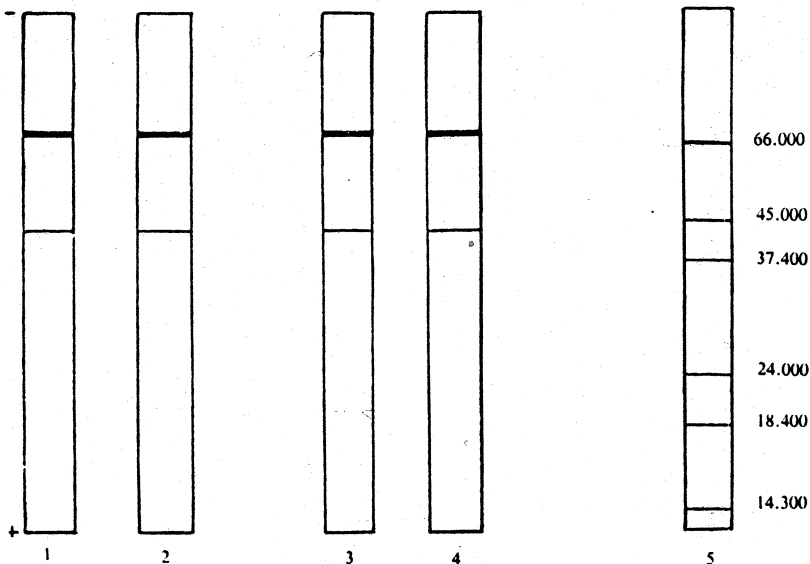
Pada gambar 4 menunjukkan bahwa isoensim peroksidase kacang hijau mempunyai mobilitas yang sama, baik pada varietas Bhakti maupun varietas No. 129 dan ensim

ini terdapat di kedua fraksi protein tersebut. Ensim peroksidase kacang hijau mempunyai 2 isoensim, masing-masing pada relatif mobilitas 3,5 dan 6,2 dengan berat molekul 69.000 dan 42.000. Kedua ekstraksi tidak mempengaruhi pola ensim peroksidase pada gelnya.

Kesimpulan dan Saran

Dari hasil dan pembahasan penelitian tersebut, dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Perbedaan pola protein dipengaruhi oleh suhu ekstraksi dan varietas kacang hijau.
2. Protein kacang hijau mempunyai perbandingan fraksi-fraksi albumin : globulin : prolamin : glutelin = 30 : 62 : 1 : 4, sedangkan fraksi globulin merupakan komponen utama.



Gambar 4. Pola Zymogram Isoensim Peroksidase dari Dua Varietas Kacang Hijau

Varietas No. 129 : 1. Suhu Ekstraksi 29°C

2. Suhu Ekstraksi 4°C

Varietas Bhakti : 3. Suhu Ekstraksi 29°C

4. Suhu Ekstraksi 4°C

5. Berat Molekul Standard.

3. Ensim peroksidase terdapat pada fraksi albumin dan globulin.
4. Ensim peroksidase kacang hijau mempunyai 2 isoensim, masing-masing Berat Molekulnya 69.000 dan 42.000.

Daftar Pustaka

- Bietz, J.A. 1979. Recent Advances in the Isolation and Characterization of Cereal Proteins. *Cereal Foods World*. 24 : 199 — 207.
- Boulter, D and E. Derbyshire. 1978. The General Properties Classification and Distribution of Plant Proteins. p.3 — 24. In, Norton, G (Ed) *Plant Protein*. Butterworth and Co (Pubs) Inc. London.
- Cherry, J.P., Dechary, J.M. and Ory, R.L. 1973. *J. Agric. Food Chem.* 21 : 652.
- Damardjati, D.S. 1983. Physical and Chemical Properties and Protein Characteristics of Some Indonesian Rice Varieties. Ph.D Thesis. Bogor Agricultural University, Bogor.
- Gottschalk and H.P. Muller. 1983. Seed Proteins Biochemistry Genetics Nutritive Value. Institute of Genetics. University of Bonn.
- Juliano, B.O. and D. Boulter. 1976. Extraction and Composition of Rice Endosperm Glutelin. *Phytochem.* 15. 16. 1 : 1606.

- Laemmli, 1967. SDS-Molecular Weight Marker. Technical Bull. No. 877. Sigma Chem. Co. St. Louis. 4p.
- Lee, J.W. 1963. Zone Electrophoresis of Wheat Gluten on Poly acrylamide Gels. Biochem. Biophys. Acta. 69 : 159.
- Moeljopawiro, S., F.H. Huang and R.H. Dilday. 1984. Use of Peroxydase Isozymes for Rice Variety Identification. Arkansas Farm Research. 33 : 7.
- Santosa, B.A.S. 1987. Analisa Protein dengan Elektroforesis Latihan Pengelolaan dan Aplikasi Peralatan Laboratorium III. Badan Litbang Pertanian. hal. 16.
- _____ dan Y. Setiowati. 1988. Profil Protein, Lipoksigenase dan Antitripsin Kedelai dalam Beberapa Cara Ekstraksi. Proceedings Seminar Penel. Pasca Panen Pertanian, Tanggal 1 — 2 Februari. Badan Litbang Pertanian.
- Shapiro, A.L., Vinuela, E. and Maizel, J.V. 1967. Biochem. Biophys. Res. Commun., 28: 815.
- Osborne, T.B. and Mendel, L.B. 1917. The Use of Soy Bean as Food. J. Biol. Chem. 32(3): 369.
- Osborne, T.B. 1924. The Vegetables Proteine (2 nd ed). Longmas, green London.
- Weber and Osborn. 1969. Reability of Molecular Weight Determination by Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis. J. Biol. Chem. 244 : 4406.
- Wolf, W.J. 1978. Purification and Properties of the Proteins Di dalam : Soybeans Chemistry and Technology. Vol. I Proteins, A.K. Smith (ed). AVI Publishing Co. Inc. Connecticut.