

hasil penelitian

KERENTANAN TRIPSIK-INHIBITOR BIJI TURI TERHADAP PANAS

Oleh :

Hilyati* dan Sri Benti Etika**

Abstrak

Aktivitas tripsin-inhibitor pada biji turi lebih besar daripada aktivitas inhibitor kedelai dan koro; masing-masing adalah 6,06, 4,31 dan 2,41 TIU/gr bahan kering.

Pemanasan selama 1 jam, pada suhu 120°C dan tekanan 1 kg/cm³ dapat menurunkan aktivitas tripsin-inhibitor sebesar 74%, sedangkan 1 jam perebusan menurunkan sebesar 47%.

Isolasi tripsin-inhibitor secara kromatografis menghasilkan isolat sekitar 20% berat-kering. Pemanasan pada suhu 100°C selama 5 jam menurunkan aktivitas tripsin-inhibitor hasil isolasi sebesar 70%.

Pendahuluan

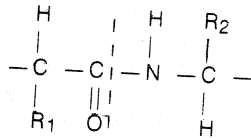
Turi (*Sesbania grandiflora*) termasuk satu jenis tanaman yang bersifat multi fungsional. Daunnya merupakan pakan yang tinggi nilainya, karena mengandung protein sekitar 27 sampai 35%, juga mengandung karbohidrat, mineral dan zat lainnya.¹⁾ Biji turi mengandung senyawa anti nutrisi, yaitu tripsin-inhibitor.

* = Staf Peneliti Puslitbang Kimia Terapan — LIPI PUSPIPTEK — Serpong — Tangerang.

** = Staf Dosen IKIP — Padang

Senyawa ini mempunyai aktifitas fisiologis yang dapat menghalangi pertumbuhan ternak karena dapat menghambat metabolisme energi dan penyerapan lemak serta mengganggu stimulasi dan hiposekresi enzim-enzim pankreas.^{2,3)} Umumnya dipisahkan secara Chromatography".

Tripsin-inhibitor (Gambar 1) merupakan derivat protein atau protease yang mempunyai berat molekul besar (8000 — 24000) dengan titik isoelektrik antara pH 3,5 — 8,5 dan bersifat amfoter karena mengandung gugus NH₂ dan COOH yang dapat bereaksi dengan asam atau basa. Senyawa ini larut dalam air dan NaOH tetapi tidak larut dalam pelarut organik.⁴⁾



Gambar 1. Struktur tripsin-inhibitor

R₁ terdiri dari lisin dan arginin. R₂ terdiri dari fenil alanin, triptofan, tirosin, leusin, asam aspartat dan asam glutamat.

Aktivitas tripsin-inhibitor berkurang akibat pemanasan (Tabel 1). Sedangkan penelitian ini mengkaji kerentanan tripsin-

1. Pengaruh Inhibitor	Cara Pemanasan
Kedelai	Autoclaving
Turi	Perebusan
Koro	Perebusan
	Perebusan
	Perebusan
	Perebusan
	Perebusan
Koro	Autoclaving

Penurunan aktivitas

Bahan dan Percobaan

1. Bahan-bahan

Bahan yang digunakan adalah biji turi giling halus yang diperoleh dari Ciawi, Bogor.

2. Alat-alat

- Pengering bejana (FDA/3RH)
- Alat pemusinan Universal)
- Kolom gelas yang dihubungkan dengan pelarut (

3. Perekasi

Dalam percobaan ini dilakukan uji pereaksi bermutu

inhibitor terhadap panas.

1. Pengaruh pemanasan terhadap aktivitas tripsin-inhibitor

Jenis	Cara Pemanasan	Lama (Menit)	PA TI (%)	Sumber
Jel	Autoclaving	15	5 - 9	5
	Perebusan	15	20	6
	Perebusan	30	31,3	7
	Perebusan	45	30 - 50	8
	Perebusan	60	60,4	9
	Perebusan	75	90	10
Koro	Autoclaving	15	80	11

Penurunan aktivitas

aktivitas fisiologis. Umumnya tripsin-inhibitor dapat dipisahkan secara bertahap meliputi "Affinity Chromatography", Kromatografi ion dan "Gel Filtration Chromatography".

Bahan dan Percobaan

1. Bahan-bahan

Bahan yang digunakan adalah biji juri giling hasil pengeringan beku, diperoleh dari Balai Penelitian Ternak Ciawi, Bogor.

2. Alat-alat

- Pengering beku (Dynavac, Model No. FDA/3RH)
- Alat pemusing (Elements, Model B Universal)
- Kolom gelas berukuran 300 x 12 mm yang dihubungkan dengan penampung pelarut (Pharmacia).

3. Pereaksi

Dalam percobaan ini digunakan pereaksi bermutu "Analytical Reagent".

3.1. Pereaksi untuk penetapan aktivitas tripsin-inhibitor

- Larutan NaOH 0,01 M
- Larutan tris buffer 0,05 N, pH 8,2
- Larutan substrat (larutan BAPA)
Larutan ini dibuat dengan melarutkan 40 mg benzil DL arginil-p-nitro analit (BAPA) dalam 1 ml dimetil sulfoksida (DMSO) dan 100 ml larutan tris buffer.
- Larutan tripsin yang berisi 4 mg tripsin sebagai garam bebas dalam 200 ml HCl 0,001 M.
- Larutan asam asetat 30 ml dalam 70 ml air.

3.2. Pereaksi untuk isolasi

- Larutan tris buffer 0,05 N, pH 7,5
- Gel tripsin-sehparose 4B
- Larutan urea 8 N, pH 2
- Larutan NaCl 0,1 M dan 0,2 M
- Larutan Na Asetat 0,1 M, pH 5,4

4. Metoda Penelitian

4.1. Penetapan aktivitas tripsin-inhibitor¹²⁾

- Timbang 1 gr contoh berukuran 100 sampai 200 mesh dan diekstraksi dengan 50 ml NaOH 0,01 M selama 3 jam, sehingga pH suspensi akan mencapai 9,5 sampai 9,8.
- Pipet cairan contoh 0, 0,6, 1,0, 1,4 dan 1,8 ml ke dalam tabung reaksi dan volumenya dijadikan 2 ml dengan air.
- Tambahkan 2 ml larutan tripsin pada setiap tabung dan panaskan di atas penangas air pada suhu 37°C, kemudian tambahkan 5 ml larutan BAPA dan panaskan. Hentikan reaksi dengan cepat paling lambat 10 menit dengan menambahkan 1 ml larutan asam asetat dan kocok.

- Saring larutan dengan kertas saring Whatman No. 2 dan 3 dan ukur absorbansi pada panjang gelombang 410 nm.

Perhitungan :

Plot TIU/ml (sebagai koordinat) terhadap ml volume ekstraksi yang digunakan sebagai absis pada kertas grafik dan ekstrapolasi ke koordinat. TIU/gr bahan kering = ukuran ekstrapolasi X faktor pengenceran. Bila plot TIU/ml ekstrak terhadap volume tidak memberikan korelasi yang linier, maka aktivitas TIU/ml dihitung dengan cara mengukur harga rata-rata yang dicapai untuk tiap volume. TIU/gr bahan kering = ukuran rata-rata X faktor pengenceran.

4.2. Isolasi tripsin-inhibitor

Tahap 1

- Sebanyak 1 gr contoh diekstraksi dengan 15 ml tris buffer 0,05 N, pH 7,5 selama 1 jam, kemudian dipusingkan pada 7000 rpm selama 30 menit, contoh yang sudah disiapkan dimasukkan kedalam kolom yang berisi trypsin-sepharose 4B dan dicuci dengan larutan tris buffer 0,05 N, pH 7,5.
- Tripsin-inhibitor tertahan pada kolom, sedangkan protein terelusi keluar kolom. Tripsin-inhibitor dielusi dengan 75 ml urea 8 M, pH 2 dan dideteksi dengan cara mengumpulkan sejumlah fraksi tertentu yang ditetapkan aktivitas tripsin-inhibitornya secara spektrofotometri.

Tahap 2.

- Fraksi-fraksi aktif pada tahap 1 dipekatkan dan disuntikkan ke dalam kolom berisi DEAE-cellulosa. Tripsin inhibitor dielusi dengan larutan NaCl 0,1 M dan 0,2 M masing-masing

sebanyak 200 ml. Fraksi aktif dikumpulkan, ditetapkan dan dipekatkan seperti di atas.

Tahap 3.

- Fraksi aktif pada tahap 2, diinjeksikan ke dalam kolom sephadex G-50 dan dielusi dengan larutan Na asetat 0,1 M pH 5,4. Fraksi-fraksi yang aktif kemudian dikumpulkan, dipekatkan dan akhirnya dikeringkan beku.
- #### 4.3. Pengaruh pemanasan terhadap tripsin-inhibitor biji turi
- Biji turi dipanaskan dengan autoclave pada suhu 120°C selama 10, 30, dan 60 menit.
 - Biji turi direndam dengan air semalam, kemudian direbus pada suhu 100°C selama 10, 20, 30, 45, dan 60 menit.
 - Hasil isolasi tripsin-inhibitor dipanaskan dengan autoclave pada suhu 120°C selama 10, 30 dan 60 menit dan pemanasan dengan oven pada 100°C selama 1, 2, 3, 4 dan 5 jam.

Hasil dan Pembahasan

1. Penjatidirian

Tripsin-inhibitor dari biji turi dengan mudah dapat dikenali dengan cara menetapkan aktivitasnya terhadap tripsin sebagai aktivator. Makin besar volume sampel yang dipakai, makin banyak tripsin yang bergabung dengan tripsin-inhibitor dan makin besar penyerapan (Lampiran 1 dan 2).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas tripsin-inhibitor biji turi lebih tinggi daripada tripsin-inhibitor biji kedelai dan koro, dengan harga rata-rata masing-masing adalah 6,061, 4,315 dan 2,412

kum-
tkan

kan
dan
etat
aktif
kan

ip-

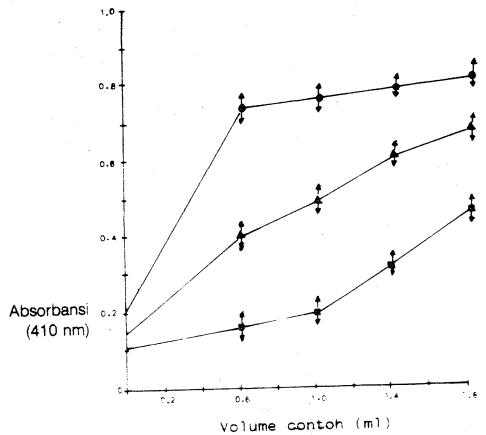
ve
an

ir
a
,

TIU/gr bahan kering (Gambar 2). Dari perbandingan harga tersebut dapat diduga bahwa biji turi akan memberikan pengaruh yang lebih buruk terhadap pertumbuhan ternak dibandingkan dengan kedelai atau koro.

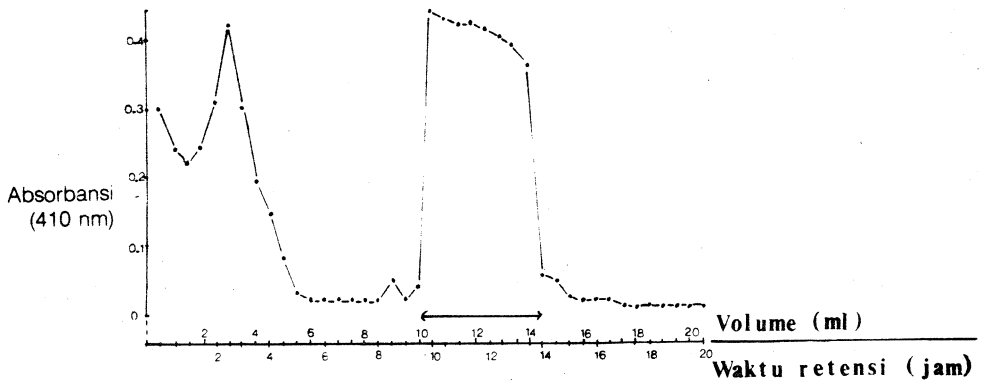
2. Isolasi

Dari hasil pemisahan tahap 1 dengan tripsin-sepharose 4B (Gambar 3), terlihat bahwa ekstraksi biji turi mengandung dua bagian besar fraksi yang mempunyai aktivitas berbeda terhadap tripsin, sehingga keduanya terpisah satu sama lain. Dalam hal ini, fraksi yang dikumpulkan untuk tahap pemurnian berikutnya adalah fraksi yang menunjukkan frekuensi aktivitas tripsin-inhibitor yang lebih baik, yaitu fraksi yang terelusi mulai dari 100 ml (waktu retensi 9,5 jam) sampai 146 ml (waktu retensi 14 jam).



Gambar 2. Grafik hubungan antara penyerapan dengan volume sampel pada penentuan aktivitas tripsin-inhibitor

- —• biji turi segar
- ▲ —▲ biji kedelai
- —■ biji koro

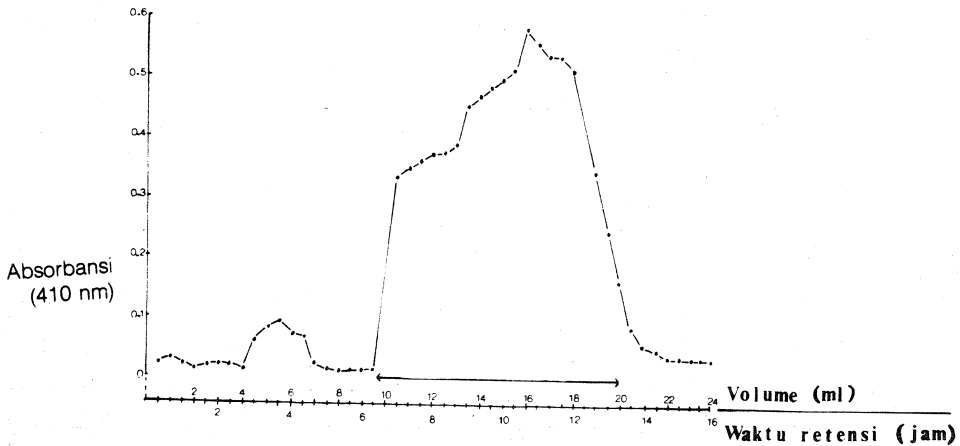


Gambar 3. Pemisahan tripsin-inhibitor dengan kolom trypsin-sepharose 4B. Fraksi aktif yang dikumpulkan dinyatakan dengan garis panah

Fraksi aktif yang diperoleh dari kolom tripsin-sepharose 4B, dimurnikan dengan kolom DEAE-celulose (Gambar 4), fraksi yang dikumpulkan adalah larutan yang menunjukkan aktivitas tripsin-inhibitor mulai dari 95 sampai 200 ml (6,3 sampai 13,3 jam). Pada tahap terakhir (Gambar 5), tripsin-inhibitor dimurnikan lebih lanjut berdasarkan ukuran partikelnya dengan kolom sephadex G-50 yang mempunyai skala pemisahan efektif untuk pemisahan komponen dengan bobot molekul 1500 sampai 30000. Pada Gambar 5 nampak bahwa pada tahap terakhir ini diperoleh berbagai fraksi yaitu fraksi dengan bobot molekul paling tinggi (0 sampai 6 jam), tetapi sebagian besar lainnya (kira-kira 44%, berdasarkan volume yang dikumpulkan) dielusi antara 6,6 sampai 15 jam. Dari sini

diduga bahwa tripsin-inhibitor dari biji turi mempunyai bobot molekul sekitar 30000 atau < 30000.

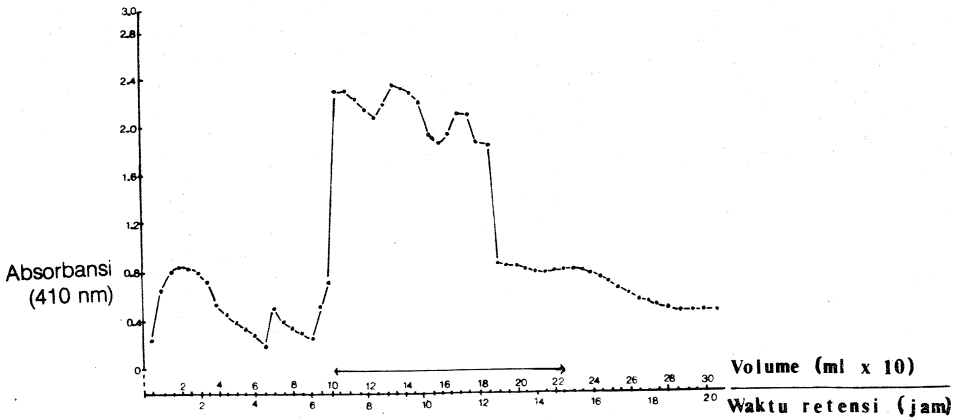
Dari ketiga tahap isolasi, masing-masing diperoleh jumlah volume sebesar 45, 105 dan 125 ml, sedangkan aktivitas rata-rata masing-masing fraksi yang dikumpulkan menunjukkan kenaikan sebagai berikut: 1,037, 1,379 dan 7,340 TIU/gr. Ini menunjukkan bahwa kemurnian tripsin-inhibitor yang dielusi dari kolom sephadex G-50 sudah cukup murni. Sebagai tambahan, dari 3 gr bahan kering yang diproses untuk diisolasi, jumlah tripsin-inhibitor yang dikumpulkan dari kolom sephadex G-50 sebanyak 0,5877 gr dan 0,5923 gr, sehingga diperoleh gambaran bahwa biji turi mengandung tripsin-inhibitor kira-kira 20% bahan kering.



Gambar 4. Pemisahan tripsin-inhibitor dengan kolom DEAE cellulosa. Fraksi aktif yang dikumpulkan dinyatakan dengan garis panah

biji turi
30000

asing-
besar
ktivitas
yang
aikan
7,340
emur-
dari
mur-
lahan
olasi,
ulkan
nyak
nyga
turi
i-kira



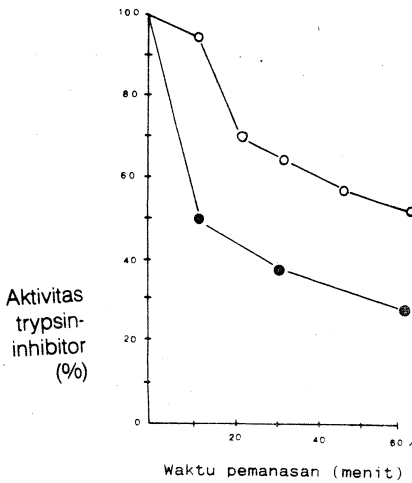
Gambar 5. Pemisahan tripsin-inhibitor dengan kolom sephadex G-50. Fraksi aktif yang dikumpulkan dinyatakan dengan garis panah

3. Kerentanan tripsin-inhibitor biji turi terhadap panas

Salah satu cara yang umum digunakan untuk mengurangi aktivitas tripsin-inhibitor adalah dengan cara pemanasan. Pemanasan biji turi dengan autoclave pada suhu 120°C dan tekanan 1 kg/cm³ selama 10, 30 dan 60 menit, menyebabkan bahwa aktivitas tripsin-inhibitor berkurang sebesar 50, 66 dan 74%. Sedangkan pemanasan dengan perebusan 100°C selama 10, 20, 30, 45 dan 60 menit menyebabkan aktivitas tripsin-inhibitor berkurang sebesar 6,33, 36, 45 dan 47% (Gambar 6). Dari kedua perlakuan tersebut terlihat bahwa pemanasan dengan autoclave memberikan pengaruh yang lebih efektif dibandingkan dengan yang direbus. Ini disebabkan temperatur autoclave lebih besar daripada temperatur air mendidih, juga karena pengaruh tekanan, yang dalam hal ini uap panas akan lebih mudah menembus partikel-parikel biji turi,

sehingga diperoleh efek pemanasan yang lebih sempurna. Walaupun demikian, cara dengan merebus dalam air mendidih akan lebih mudah dilakukan karena tidak memerlukan peralatan khusus.

Efek pemanasan terhadap kestabilan tripsin-inhibitor pada turi yang belum dan sudah isolasi adalah serupa terlihat sampai batas waktu 1 jam, tetapi pemanasan yang lebih lama nampak bahwa tripsin-inhibitor biji turi merupakan senyawa yang relatif stabil terhadap panas. Pemanasan selama 5 jam hanya menurunkan aktivitas 70% (Gambar 6). Salah satu faktor kemungkinan yang menyebabkan senyawa ini tahan terhadap panas adalah bentuk struktur yang banyak terdiri dari ikatan polipeptida yang dihubungkan satu sama lain oleh ikatan silang molekul protein yang mengandung sulfida (ikatan S-S). Tripsin-inhibitor biji turi bersifat lebih stabil terhadap panas dibandingkan senyawa serupa yang terdapat dalam kedelai (Tabel 2).

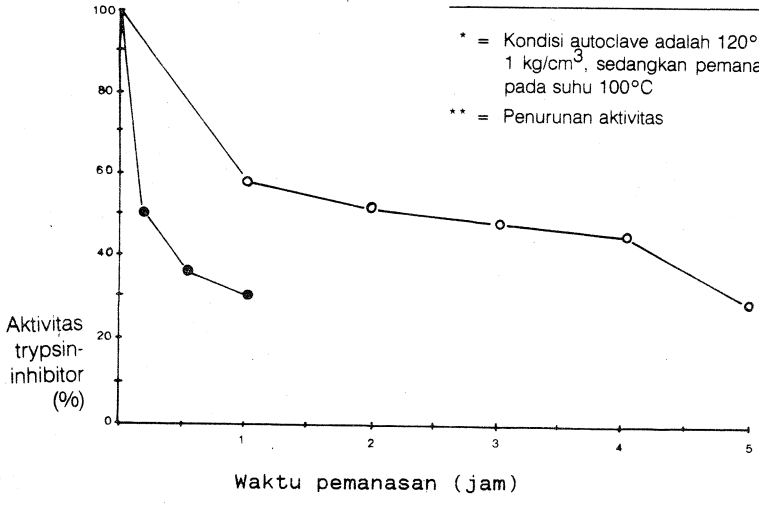


Gambar 6. Pengaruh pemanasan biji turi terhadap kestabilan tripsin-inhibitor
 • —•—• pemanasan dengan autoclave 120°C, 1 kg/cm³
 o —o—o pemanasan dengan direbus pada 100°C

Tabel 2. Turunnya aktivitas tripsin-inhibitor dengan pemanasan

Bahan	Perlakuan*	Menit	PA** TI(%)
Turi	Autoclaving	10	50,49
	Autoclaving	30	60,18
	Autoclaving	60	74,43
	Pemanasan	10	6,24
	Pemanasan	20	32,69
	Pemanasan	30	36,42
	Pemanasan	45	44,85
	Pemanasan	60	47,08
Kedelai	Pemanasan	15	20,00
	Pemanasan	30	31,30
	Pemanasan	45	40,00
	Pemanasan	60	60,40
	Pemanasan	75	90,00
Tripsin-Inhibitor isolat	Autoclaving	10	48,11
	Autoclaving	30	63,93
	Autoclaving	60	70,00
	Pemanasan	60	41,78
	Pemanasan	120	46,21
	Pemanasan	180	51,90
	Pemanasan	240	54,44
	Pemanasan	300	71,21

* = Kondisi autoclave adalah 120°C dan tekanan 1 kg/cm³, sedangkan pemanasan dilakukan pada suhu 100°C
 ** = Penurunan aktivitas



Gambar 7. Pengaruh pemanasan terhadap kestabilan tripsin-inhibitor yang ditolsi dari biji turi
 • —•—• pemanasan dengan autoclave 120°C, 1 kg/cm³
 o —o—o pemanasan dengan oven pada 100°C

Kesimpulan

Berdasarkan data yang diperoleh, maka dapat diambil beberapa kesimpulan :

1. Aktivitas tripsin-inhibitor pada biji turi lebih besar daripada kedelai dan koro, masing-masing 6,06, 4,31 dan 2,41 TIU/gr bahan kering.
2. Penjatidirian tripsin-inhibitor dapat dilakukan dengan cara menentukan aktivitasnya menggunakan tripsin sebagai aktivator dan akhirnya dengan pengukuran spektrofotometri.
3. Tripsin-inhibitor biji turi dapat diisolasi dengan teknik "Affinity Chromatografi" menggunakan tripsin sebagai pengikat, kromatografi penukar ion dan isolasi dapat dimurnikan lebih jauh dengan teknik kromatografi gel, menghasilkan sekitar 20% bahan kering.
4. Makin lama pemanasan, makin menurunkan aktivitas tripsin-inhibitor, dengan autoclaving pada suhu 120°C sebesar 74% dan dengan perebusan 1 jam sebesar 47%.

Daftar Pustaka

- Dike, A.J. 1981. Handbook of legumes of world economic importance. *Sesbania Sp*, Plenum Press, NY; 216—218.
- Anonim. 1979. Tropical legume. National Academic of Science; 195 — 192.
- Rosenthal, A.G. 1979. Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites. Academic Press, NY; 599.
- Liener, E.I. 1969. Toxic constituents of plant foodstuffs. Academic Press. NY; 14 — 16.

Balls, A.K, and Ryan, 1963. C.A. J. Bio. Chem., 238, 2976 — 2983.

Hochstrasser, K. 1976. *Physiol. Chem.*, 348, 1337 — 1340.

Sohonie, K, Joshi, M.R. 1959. *J.Sci. Ind. Res. (India)*, 18c, 95 — 98.

Jamin. J.L. 1973. Protease inhibitor, Bayer Symmp., 5 th, 513 — 520.

Smith, A.K. 1964. *Foodstuffs*, 36, 46—47.

Reckis, J.J. 1966. *Food Technol.*, 20, 102 — 104.

Marguard, R.R. and Ward. T. J. 1976. *Nutr*, 106, 275 — 284.

Kakade, M.L, Rackis, J.J and Puski, G. 1974. *AACC*. 51, 376.

Lampiran 1. Pengaruh pemanasan biji turi dengan autoclave terhadap kestabilan tripsin-inhibitor

Perilaku-an ,	Menit	Vol Contoh (ml)	Absorban (duplo)	TIU/gr Contoh (duplo)
Autoclave	10	0	0,265	3,000 3,002
			0,260	
		0,6	0,291	
			0,297	
		1,0	0,310	
			0,309	
Autoclave	30	0	0,125	2,076 2,024
			0,120	
		0,6	0,200	
			0,192	
		1,0	0,215	
			0,210	
1,4	0,238			
	0,234			
Autoclave	60	0	0,106	1,540 1,560
			0,105	
		0,6	0,142	
			0,149	
		1,0	0,154	
			0,159	
1,4	0,176			
	0,175			
		1,8	0,192	
			0,192	

* Kondisi autoclave 120°C dengan tekanan 1 kg/cm³

Lampiran 2. Pengaruh pemanasan biji turi dengan direbus terhadap kestabilan tripsin-inhibitor

Perisku-an*,	Menit	Vol Contoh (ml)	Absorben (duplo)	TIU/gr Contoh (duplo)
Pemanasan	10	0	0,100	5,652 5,714
			0,120	
		0,6	0,482	
			0,468	
		1,0	0,600	
			0,600	
Autoclave	20	0	0,132	4,026 4,134
			0,128	
		0,6	0,300	
			0,301	
		1,0	0,404	
			0,420	
1,4	0,526			
	0,570			
Pemanasan	30	0	0,130	3,902 3,806
			0,128	
		0,6	0,270	
			0,265	
		1,0	0,400	
			0,367	
1,8	0,620			
	0,610			
Pemanasan	45	0	0,150	3,346 3,400
			0,146	
		0,6	0,205	
			0,203	
		1,0	0,348	
			0,350	
1,4	0,462			
	0,461			
Pemanasan	60	0	0,121	3,212 3,204
			0,122	
		0,6	0,220	
			0,207	
		1,0	0,320	
			0,320	
1,4	0,396			
	0,401			
		1,8	0,549	
			0,550	

* Pemanasan dilakukan pada 100°C.