

DISTRIBUSI INOSITOL FOSFAT KEDELAI SELAMA PENGECAMBAHAN DAN FERMENTASI PADA PEMBUATAN TEMPE

Oleh:

Suparmo

Abstrak

Fraksinasi terhadap inositol fosfat hasil hidrolisis asam fitat pada pengecambahan kedelai dan fermentasi pada tempe telah dikerjakan untuk mempelajari distribusi inositol fosfat yang berada dalam bahan pangan tersebut. Fraksinasi menggunakan Dowex 1X8 (Cl^-) yang diilusi menggunakan linier gradien HCl dari 0 sampai 1 N menghasilkan tujuh fraksi yang terpisah dengan baik; fosfat anorganik, inositol mono, di, tri, tetra, penta dan heksa fosfat.

Pada pengecambahan, peningkatan inositol fosfat terjadi dengan sangat cepat selama 24 jam yang diikuti dengan pengurangan fosfat anorganik dan total fosfat pada jam ke 48. Pada fermentasi pembuatan tempe, peningkatan fosfat anorganik tidak secepat pada pengecambahan, lagi pula pengurangan total fosfat atau fosfat anorganik tidak tampak. Pada akhir pengecambahan dan akhir fermentasi pembuatan tempe masih terdapat sekitar 32 dan 37% fosfat yang terdapat pada inositol tetra, penta dan heksa fosfat, yaitu fraksi-fraksi yang mampu mengikat dan mengendapkan mineral bervalensi dua dan tiga.

Pendahuluan

Keberadaan asam fitat (inositol 1,2,3,4, 5,6-heksafosfat) dalam biji-bijian untuk bahan pangan tidak dikehendaki karena dapat mengikat mineral (Fe, Zn dan lain-lain) sehingga mengurangi ketersediaan mineral tersebut bagi tubuh. Faktor ini bersama dengan senyawa aktif lain (lektin, inhibitor tripsin, goitrogen dan lain-lain) dikelompokkan sebagai senyawa anti nutrisi.

Enzim fitase memecah fitat menjadi inositol dan fosfat anorganik (Pa). Kedua senyawa merupakan nutrisi yang diperlukan tubuh; inositol termasuk dalam kelompok vitamin B sedangkan fosfat

merupakan mineral yang penting untuk pertumbuhan tulang dan sebagai pengatur proses enzimatik dan energi dalam tubuh. Enzim fitase dihasilkan oleh biji yang sedang berkecambah (Lolas dan Markakis, 1977) dan juga dihasilkan oleh mikroorganisme selama fermentasi, seperti pada pembuatan tempe (Sudarmadji dan Markakis, 1977), oncom (Fardiaz dan Markakis, 1981) atau fermentasi adonan roti (Nayini dan Markakis, 1983a).

Perubahan dari senyawa anti-gizi menjadi nutrisi yang berguna bagi tubuh terjadi bila defosforilasi berlanjut sampai selesai. Dalam proses penyiapan makanan (misalnya pengecambahan dan fermentasi), selesainya defosforilasi tersebut bukan menjadi kriteria yang menentukan.

Dalam penelitian ini dipelajari pola defosforilasi asam fitat pada kedelai sebagai akibat aktivitas selama pengecambahan dan fermentasi pembuatan tempe, melalui pengamatan pada senyawa antara sebelum semua P terpisah dari inositol. Kemampuan mengikat mineral dari fraksi-fraksi inositol fosfat senyawa antara pemecahan asam fitat juga ditentukan.

Tinjauan Pustaka

Asam fitat (inositol heksafosfat) dalam biji-bijian diperkirakan sebagai bentuk simpanan P dan ion metal yang berupa senyawa kompleks dengan protein. Fungsi utamanya diperkirakan untuk mengatur konsentrasi ion P pada proses fosforilasi dan

defosforilasi dalam tanaman (Saiyo, 1964). Fitat terbentuk selama proses sintesis karbohidrat yang berperan sebagai reseptor P anorganik dalam defosforilasi.

Di dalam diet, asam fitat merupakan faktor yang tidak dikehendaki karena kemampuannya mengikat mineral (Fe, Zn dan lain-lain) selama dalam saluran pencernaan yang akibatnya mengurangi ketersediaan mineral tersebut bagi tubuh. Banyaknya faktor anti nutrisi ini dalam kedelai dan bijian lain mencapai 2 — 3%.

Enzim fitase, yaitu enzim yang mampu menghidrolisis fitat, melakukan defosforilasi asam fitat secara bertahap dan akhirnya dihasilkan inositol bebas dan Pa. Keberadaan enzim fitase dalam bijian yang berkecambah dilaporkan oleh Lolos dan Markakis (1977). Keberadaan serta aktivitas enzim serupa juga dihasilkan oleh mikrobia selama fermentasi pembuatan tempe (Sudarmadji dan Markakis, 1977), fermentasi pembuatan oncom (Fardiaz dan Markakis, 1981) dan fermentasi adonan roti atau panary (Nayini dan Markakis, 1983a). Dalam fermentasi oncom dan adonan roti, sebagian asam fitat secara bertahap dihidrolisis menghasilkan senyawa antara berupa inositol penta, tetra, tri, di dan monofosfat. Belum diketahui macam serta jumlah inositol fosfat hasil antara tersebut pada saat fermentasi dihentikan.

Bahan dan Metoda

Kedelai varietas Corsoy diperoleh dari Michigan Crop Improvement Association, East Lansing. Kedelai dibersihkan dan dipilih yang utuh. Sampel kecambah kedelai dibuat dengan cara merendam kedelai dalam larutan kaporit selama 5 menit, dicuci dengan air suling kemudian direndam dalam air suling selama 4 jam, ditiriskan, kedelai rendaman diletakkan di atas kertas saring yang telah dibasahi dengan air suling.

Kedelai tersebut disimpan di tempat gelap dan dibiarkan sampai diambil untuk sampel. Sampel diambil setiap 6 jam mulai jam ke 0 sampai ke 48. Sampel yang dipanen segera dikukus selama 5 menit kemudian dikeringkan dengan freeze-dryer.

Sampel tempe dibuat dengan menggunakan cara Steinkraus (1963). Kedelai rebus yang telah diberi starter (dalam proses fermentasi) dipanen setiap 12 jam mulai jam ke 0 sampai jam ke 48, dikukus selama 5 menit, dibekukan pada suhu -20°C kemudian dikeringkan dengan freeze-dryer. Inokulum tempe yang digunakan ialah *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 yang didapat dari Northern Regional Research Center, Peoria, Illinois.

Pemisahan Inositol Fosfat (Saio, 1964)

Inositol fosfat diekstraksi dari 10 g sampel kering dengan 100 ml TCA 3%. Setelah dilakukan sentrifugasi (12.000 G), 50 ml supernatan dipisahkan dan dipekatkan sampai tinggal 5 ml. Hasil pemekatan diambil 2 ml untuk fraksinasi dalam kolom kromatografi Dowex-1X8 (200—400 mesh, bentuk Cl^{-} , dalam kolom 1×10 cm). Ekstrak yang didapatkan dielusi menggunakan linier gradien 300 ml H_2O dan 300 ml HCl 1,0 N HCl pada kecepatan aliran 2 ml per menit. Hasil elusi ditampung dalam 120 tabung reaksi, masing-masing 5 ml yang dikerjakan menggunakan "fraction collector" (Rinso Instruments Co., Greenville, I11).

Penentuan P pada Fraksi Hasil Kromatografi

Fraksi hasil pemisahan kromatografi yang terkumpul dalam tabung reaksi dikeringkan dengan mengalirkan udara ke permukaan larutan.

Residu kering pada tabung reaksi dilarutkan dalam 1 ml asam perklorat 70%. Tabung dipanaskan selama 1 jam untuk

membebaskan P dari inositol fosfat. Kandungan P pada masing-masing tabung ditentukan menggunakan metoda Allen (1940). Metoda ini berdasar pada pewarnaan fosfomolibdat yang bila direduksi menghasilkan warna biru yang sangat intensif. Penentuan konsentrasi didapatkan dari pembacaan absorbansi pada 675 nm.

Untuk menggambarkan distribusi inositol fosfat, banyaknya P pada masing-masing tabung diplot terhadap nomor fraksi untuk mendapatkan gambaran pemisahan inositol fosfat.

Analisis inositol tidak dikerjakan karena jumlah puncak pada plot tersebut sesuai dengan yang dihasilkan oleh Saio (1964) sehingga dianggap bahwa puncak pertama ialah fosfat anorganik (Pa), sedangkan selanjutnya ialah inositol monofosfat (IP1), inositol difosfat (IP2), inositol trifosfat (IP3), inositol tetrafosfat (IP4), inositol pentafosfat (IP5) dan inositol heksa fosfat atau asam fitat (IP6).

Hasil dan Pembahasan

Hasil berupa pola ilusi fraksi inositol fosfat sampel kecambah kedelai dan tempe kedelai pada kolom Dowex 1X8 (Cl⁻) disajikan pada Gambar 1 dan 2 (Supaya tidak mengganggu penggambaran dan memenuhi tabel, hanya data dari 6 variasi waktu pengecambahan dan 5 variasi waktu fermentasi tempe yang disajikan). Penghitungan kadar masing-masing fraksi dari Gambar 1 dan 2 disajikan secara rinci pada Tabel 1 yang memungkinkan melihat semua perubahan dalam bentuk persentase.

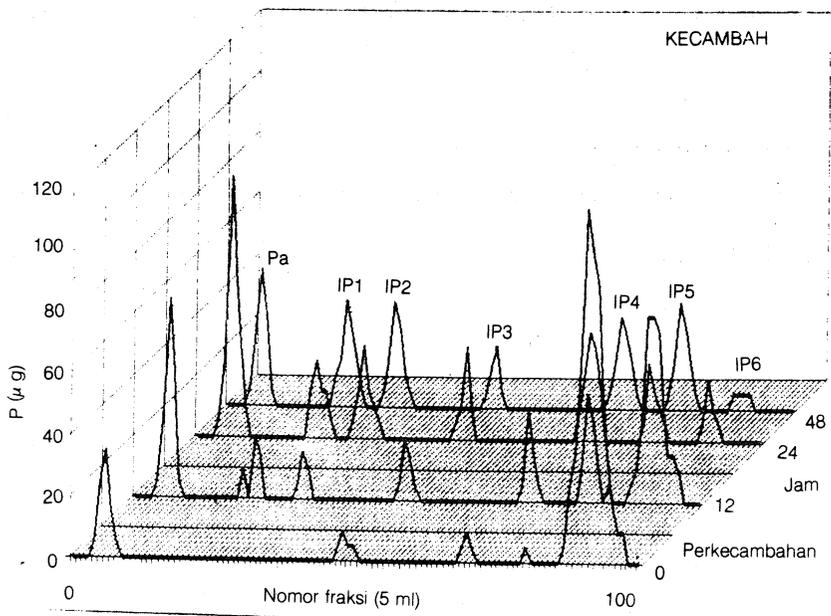
Dalam biji yang sedang dorman diharapkan P yang bisa terekstrak berupa Pa dan asam fitat (IP6). Dari Gambar 1 pada sampel kedelai sebelum dikecambahkan (telah mengalami perendaman) terlihat ada tiga puncak kecil selain puncak dari Pa dan asam fitat. Untuk mengkaji hal ini dilakukan

pengujian pada sampel segar tanpa direndam (data tidak disajikan). Ternyata puncak-puncak tersebut masih tetap ada yang menandakan keberadaannya bukan merupakan akibat proses perendaman. Hal ini menunjukkan bahwa inositol fosfat dalam kedelai pada saat dormansi, yang biasanya digunakan sebagai bahan pangan, tidak semuanya berada dalam bentuk asam fitat. Puncak-puncak tersebut kemungkinan bisa juga terjadi akibat defosforilasi asam fitat selama proses penyimpanan atau penggudangan bila pernah mengalami kondisi kelembaban yang memungkinkan pengecambahan.

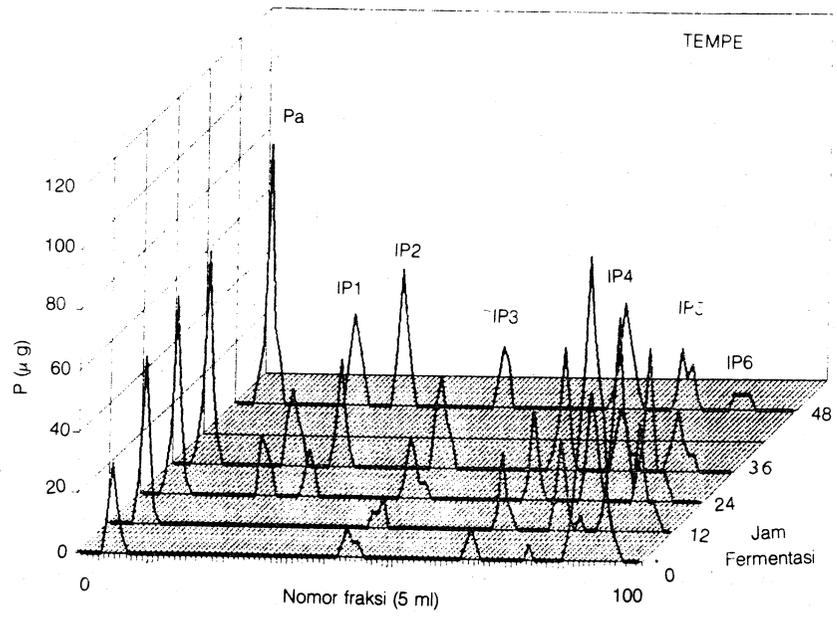
Puncak asam fitat (IP6) yang sangat besar dan penurunan kadarnya setelah terjadi pengecambahan menunjukkan bahwa asam fitat berperan sebagai simpanan P yang digunakan untuk pertumbuhan tanaman. Hal ini nampak jelas lagi dari puncak Pa yang semula naik ternyata kemudian menurun tajam pada jam ke 48. Kemungkinan bahwa P tersebut terikat oleh senyawa lain, mungkin protein atau enzim, yang tidak tereskrak oleh larutan TCA 3% karena membentuk endapan. Penggunaan P oleh protein atau enzim juga terlihat pada penurunan total P pada Tabel 1 sebanyak 19% selama 48 jam pengecambahan.

Berbeda dengan sampel kecambah yang hidup, maka kedelai yang difermentasi menunjukkan peningkatan Pa yang tetap. Tidak terlihat penggunaan Pa yang nyata dari pola perkembangan puncak Pa maupun total P pada Tabel 1 pada fermentasi pada pembuatan tempe.

Baik pada proses pengecambahan maupun proses fermentasi tempe, keduanya menunjukkan penurunan asam fitat yang menerus, meskipun pada awalnya pengecambahan memecah fitat dan menghasilkan Pa jauh lebih cepat dibandingkan dari fermentasi pada pembuatan tempe.



Gambar 1. Pola ilusi inositol fosfat kecambah pada kolom Dowex 1X8 (Cl^-)



Gambar 2. Pola ilusi inositol fosfat tempe pada kolom Dowex 1X8 (Cl^-)

Tabel 1. Distribusi fosfor pada fraksi inositol fosfat kecambah kedelai dan tempe kedelai yang dipisahkan dengan kolom Dowex 1X8 (Cl⁻)

	Kecambah						Tempe				
	Lama Perkecambahan						Lama Fermentasi				
	0	6	12	18	24	48	0	12	24	36	48
Pa	85	120	140	170	200	110	60	100	120	130	155
IP1	0	0	45	65	75	105	0	0	45	65	75
IP2	0	0	30	95	80	95	0	0	30	65	95
IP3	25	30	45	100	55	45	25	20	50	75	45
IP4	20	45	55	10	110	95	20	45	55	90	100
IP5	5	55	80	60	60	100	5	70	80	55	55
IP6	570	435	285	90	40	20	430	290	135	55	20
Total P	705	690	685	690	630	570	540	525	515	535	545
Persentase terhadap kandungan total fosfor											
%Pa	12	17	20	25	32	19	11	19	23	25	28
%IP1	0	0	7	9	12	18	0	0	9	12	14
%IP2	0	0	4	14	13	17	0	0	6	12	17
%IP3	4	4	7	14	9	8	5	4	10	14	8
%IP4	3	7	8	16	17	17	4	9	11	17	18
%IP5	1	8	12	9	10	18	1	13	16	10	10
%IP6	81	63	42	13	6	4	80	55	26	10	4

Pengecambahan dan fermentasi pembuatan tempe sampai 48 jam masih menunjukkan peningkatan IP1 dan IP2, sedangkan IP3, IP4 dan IP5 menunjukkan peningkatan sampai 24 jam dan pada 48 jam sudah mengalami penurunan. Kecambah yang dimakan biasanya telah mengalami pengecambahan selama 2 sampai 4 hari, sehingga diperkirakan semua inositol fosfat tinggal sangat sedikit. Tempe biasanya dikonsumsi pada umur 36 jam dan 2 hari. Pada kondisi ini asam fitat tinggal sangat sedikit meskipun masih terdapat cukup banyak senyawa antara inositol fosfat.

Dari tabel 1 terlihat bahwa pada waktu 0 jam, sampel tempe mempunyai kandungan asam fitat maupun total P yang lebih rendah daripada sampel kecambah. Perbedaan sampel terjadi akibat perlakuan peng-

godogan yang merupakan bagian proses penempaan. Penggodogan tersebut melarutkan asam fitat sebanyak 23%. Pengurangan kandungan fitat pada kedelai akibat penggodogan juga dilaporkan oleh Sudarmadji dan Markakis (1977). Perbedaan persentase kehilangan asam fitat selama penggodogan kemungkinan terjadi akibat perbedaan lama penggodogan.

Dari perhitungan persentase P dalam inositol fosfat terhadap total P terlihat distribusi masing-masing fraksi inositol fosfat pada masing-masing saat pengecambahan atau fermentasi tempe. Penurunan persentase P pada asam fitat mengakibatkan P pada inositol fosfat lainnya mengalami peningkatan. Penyimpangan perilaku senyawa antara inositol fosfat terlihat pada IP3 yang semula berada dalam kadar relatif tinggi, ter-

nyata tidak mampu mencapai kadar sebesar inositol fosfat lainnya.

Sampel kecambah dan tempe yang mengalami defosforilasi cukup lama terlihat menunjukkan distribusi inositol fosfat yang merata. Sampel-sampel ini kemudian dicampur, dipekatkan dan diilusi beberapa kali. Fraksi eluen yang didapatkan masing-masing dikumpulkan untuk mendapatkan keenam fraksi inositol fosfat murni dalam jumlah yang memadai.

Terhadap fraksi-fraksi ini dilakukan test untuk melihat apakah mampu mengikat Fe dan membentuk kompleks yang mengendap. Hasil yang didapatkan diketahui bahwa IP1, IP2 dan IP3 tidak menghasilkan endapan dengan Fe, sedangkan IP4 dan IP5 mampu mengendapkan Fe seperti halnya IP6 atau asam fitat, Meskipun diketahui IP4 dan IP5 mampu mengendapkan Fe seperti asam fitat, penghitungan molar ratio antara P inositol fosfat dengan Fe yang diendapkan tidak memberikan hasil yang konstan. Karena dianggap tidak konklusif, maka hasilnya tidak disajikan. Ketidak-konstan pengendapan Fe oleh kedua inositol fosfat tersebut diperkirakan dipengaruhi oleh konfigurasi geometrisnya.

Daftar Pustaka

- Allen, R.J.L. 1940. The estimation of phosphorus. *Biochem. J.* 34B: 538.
- Fardiaz, D. dan Markakis, P. 1981. Degradation of phytic acid in oncom. (fermented peanut presscake). *J. Food Sci.* 46: 523.
- Lolas,, G.M., dan Markakis, P. 1977. The phytase of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Sci.* 42: 1094.
- Nayini, N.R. dan Markakis, P. 1983a. Effect of fermentation time on the inositol phosphates of bread. *J. Food Sci.* 48: 262.
- Nayini, N.R. dan Markakis, P. 1983b. Effect of milling extraction on the inositol phosphates of wheat flour and bread. *J. Food Sci.* 48: 1384.
- Saio, J. 1964. The change in inositol phosphates during the ripening of rice grains. *Plant & Cell Physiol.*, 5: 393.
- Steinkraus, K.H., Hand, D.B., van Buren, J.P., dan Hackler, L.R., 1961. Pilot plant studies on tempe. "Proc. Conference on Soybean Products for Protein in Human Foods," p 83. USDA, Peoria, I1.
- Sudarmadji, S., dan Markakis, P. 1977. Phytate and phytase of soybean tempeh. *J. Sci. Food Agric.* 28: 381.
- Suparmo dan Markakis, P. 1987. Tempeh prepared from germinated soybeans. *J. Food Sci.* 52: 1726.