

## Perbandingan Karakteristik Kimia *Trypsin Inhibitor* Biji dan Kecambah Kedelai

*The Chemical Characteristics Comparison of Seed and Germinated Soybean Trypsin Inhibitor*

Bayu Kanetro<sup>1</sup>, Zuheid Noor<sup>2</sup>, Sutardi<sup>2</sup>, Retno Indrati<sup>2</sup>

### ABSTRACT

*This study investigated the changes in trypsin inhibitor (TI) activity, amino acid composition and protein patterns after 36 hours germination of soybeans. TI was extracted by a combination of pH precipitation and centrifugation. TI activity of seeds and germinated soybean were 1.64 and 1.68 IU/mg seeds (db) respectively. Heating of crude TI decreased heat stability of TI. The decrease of TI activity of germinated soybeans due to heating was lower than seeds. The amino acid composition and protein patterns of soybeans changed after 36 hours germination. Thr, Ala, Trp, Met and Lys decreased significantly, while Asp, Glu, Val, Phe, and Ile increased significantly. The SDS-PAGE analysis showed that the seeds contain high-molecular weight of proteins which were degraded after 36 hours germination result in smaller molecular weight of proteins.*

**Key words:** Chemical characteristics, germinated soybean, trypsin inhibitor

### PENDAHULUAN

Penelitian-penelitian terakhir tentang *trypsin inhibitor* (TI) kedelai menyebutkan bahwa senyawa ini yang sebelumnya merupakan anti gizi dan tidak bermanfaat, ternyata termasuk kelompok *phytochemical* yang merupakan komponen bioaktif dengan kemampuan sebagai *anti-carcinogenic*, yaitu jenis TI *Bowman-Birk* (BBI) (Kennedy, 1998 dalam Losso, 2002). Selain itu TI juga merupakan senyawa yang bersifat hipoglisemik, yaitu memiliki kemampuan menurunkan gula darah (Zuheid Noor dkk., 2000) sehingga dapat dikembangkan sebagai komponen makanan fungsional bagi penderita diabetes khususnya yang tidak tergantung insulin

Selama perkecambahan kedelai akan terjadi modifikasi TI khususnya berat molekulnya, sehingga terbentuk jenis TI baru yang identik dengan KTI (Kunitz Tripsin Inhibitor) (Freed dan Ryan, 1978 dalam Rackis dan Gumbmann, 1981). Pengamatan terhadap perubahan berat molekul (BM) protein selama perkecambahan *V. faba*, *C. arietinum*, dan *L. termis* menggunakan SDS-PAGE menunjukkan bahwa setelah perkecambahan selama 7 hari terjadi penurunan jumlah *band*

(pita/tanda) protein, namun diketahui bahwa ternyata protein TI masih terdeteksi sampai perkecambahan hari ke-7 (BM 20,1 kDa) (Ahmed dkk., 1995).

Menurut Bewly dan Black (1983) fungsi TI dalam biji masih diperdebatkan, namun kemungkinan mencakup tiga fungsi, yaitu sebagai cadangan protein yang larut air, sebagai pengendali aktivitas proteinase endogenous, dan sebagai pelindung protein dari serangan extracelluler proteinase yang kemungkinan berasal dari serangga dan mikrobia. Berdasarkan fungsi TI tersebut, maka kemungkinan TI dapat mengalami perubahan kimia selama perkecambahan biji kedelai. Selain itu selama perkecambahan juga terjadi pemecahan dan sintesis protein, sehingga akan mengubah berat molekul dan komposisi asam amino ekstrak TI yang diperoleh.

Pengamatan perubahan-perubahan kimia ekstrak TI selama perkecambahan tersebut perlu dilakukan untuk menjelaskan kemungkinan adanya perbedaan sifat hipoglisemik TI biji dan kecambah kedelai. Perubahan karakteristik kimia TI selama perkecambahan kedelai diduga

<sup>1</sup> Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Wangsa Manggala Jl. Wates km 10 Yogyakarta, Alamat Email: bayu\_kanetro@yahoo.co.id

<sup>2</sup> Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Sosio Yustisia, Bulaksumur, Yogyakarta 55281.

berpengaruh terhadap sifat hipoglisemiknya. Pada dasarnya penelitian ini merupakan salah satu tahap untuk mengetahui sifat hipoglisemik ekstrak TI kecambah kedelai. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perubahan karakteristik kimia TI kecambah dibandingkan dengan biji kedelai.

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Bahan utama penelitian ini adalah biji kedelai varietas lokal yang diperoleh dari Balai benih dengan spesifikasi tertentu dan seragam serta memiliki aktivitas TI tinggi, yaitu Varietas Sinabung, TI kedelai standar/*Soy Bean Trypsin Inhibitor* KTI dan BBI (Sigma). Bahan-bahan kimia PA (Merck/Sigma) untuk pemisahan fraksi TI dan analisis, yaitu HCl, NaOH, fosfat buffer, tripsin, buffer glisin-HCl, dan BAPNA (Na-benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide), asam amino standar, buffer asetat, buffer borat, OPA (ortho phenthaldialdehyde), metanol, acrylamide, bisacrylamide, ammonium persulphate, SDS (sodium dodecyl sulphate), Tris, dan glycine. Selain itu digunakan bahan-bahan kimia untuk pengujian protein total Metode Mikro-Kjeldahl

### Peralatan

Peralatan yang digunakan meliputi peralatan untuk perkecambahan, pembuatan tepung kecambah, ekstraksi *crude* TI, dan analisis kimia, meliputi nampan, kain, penyemprot, inkubator, oven, penangas air, vortex, *magnetic stirrer*, *freeze drier*, pH meter, kertas pH, spektrofotometer, sentrifuse, kromatografi, elektroforesa, dan alat-alat gelas/kaca.

### Cara Penelitian

#### *Perkecambahan dan pembuatan tepung*

Proses perkecambahan diawali dengan perendaman kedelai dalam aquades selama 8 jam. Tahap selanjutnya adalah inkubasi pada suhu kamar dan dalam ruangan gelap, serta dalam wadah tertutup kain dengan RH mendekati 100% selama 36 jam. Kecambah yang diperoleh dikeringkan dengan *freeze drier*, ditimbang dan ditepungkan. Sebagai kontrol dibuat tepung biji kedelai. Data penimbangan digunakan untuk menghitung rendemen perkecambahan, yaitu dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rendemen Perkecambahan} = \frac{\text{berat padatan kecambah}}{\text{berat padatan biji}} \times 100 \%$$

#### *Ekstraksi TI kecambah kedelai.*

Ekstraksi dilakukan dengan cara tepung kecambah kedelai disuspensikan dalam aquades (rasio tepung: aquades = 1: 10), selanjutnya diatur pH 4 dengan HCl 6N. Suspensi disentrifugasi pada 1500 g, 10 menit. Supernatan yang diperoleh diatur pH 3, selanjutnya disentrifugasi pada 1500 g, 15 menit. Residu yang diperoleh merupakan ekstrak kasar TI atau *crude* TI kecambah, selanjutnya dikeringkan dengan *freeze drier* dan ditimbang. Sebagai kontrol dibuat *crude* TI biji dengan prosedur yang sama. Data penimbangan digunakan untuk menghitung rendemen ekstraksi, yaitu:

$$\text{Rendemen ekstraksi terhadap kecambah} = \frac{\text{berat padatan } \textit{crude} \text{ TI}}{\text{berat padatan kecambah}} \times 100 \%$$

$$\text{Rendemen ekstraksi terhadap biji} = \frac{\text{rendemen ekstraksi terhadap kecambah}}{\text{rendemen perkecambahan}} \times 100 \%$$

#### *Analisis kimia*

*Crude* TI biji dan kecambah kedelai diuji karakteristik kimiawinya, yaitu aktivitas TI Metode Kakade (Alonso dkk., 2000), dan aktivitas TI pada berbagai lama pemanasan (dengan oven suhu 100 °C atau dengan blanching dalam air suhu 80 °C) untuk menentukan stabilitas panas TI. Stabilitas panas TI dinyatakan sebagai persentase sisa aktivitas TI sesudah pemanasan terhadap aktivitas awal (sebelum pemanasan). Selain itu juga dianalisis kadar air metode pemanasan dalam oven, kadar protein total Metode Mikro Kjeldahl, komposisi asam amino Metode OPA dengan HPLC, dan BM dengan elektroforesis (SDS-PAGE).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Rendemen, kadar protein dan aktivitas TI

Rendemen (*yield*) proses perkecambahan biji kedelai selama 36 jam yang diperoleh adalah sebesar 89,89 mg padatan kecambah/100 mg padatan biji. Sedangkan rendemen proses ekstraksi *crude* TI dari biji adalah 0,73 mg *crude* TI/100 mg padatan biji, dan dari kecambah adalah 0,88 mg *crude* TI/100 mg padatan kecambah. Jika satuan rendemen dari kecambah dinyatakan terhadap biji, maka rendemen ekstraksi *crude* TI kecambah adalah 0,79 mg *crude* TI/100 mg padatan biji. Data rendemen pada Tabel 1 menunjukkan bahwa TI yang dapat diekstrak masih sedikit. Menurut Saini (1989) kadar TI dalam kedelai 15,77 mg/g bahan atau 1,577 %.

Tabel 1. Yield, kadar protein, aktivitas TI biji dan kecambah kedelai

Crude TI	Yield mg/100 mg seeds db	Total protein % db	TI activity IU (Inhibitor Unit)	TI activity IU/mg crude TI db	TI activity IU/mg biji db
Seeds	0,73	53,94	3,60	225,00	1,64
Germinated soybean	0,79	62,78	3,40	212,50	1,68

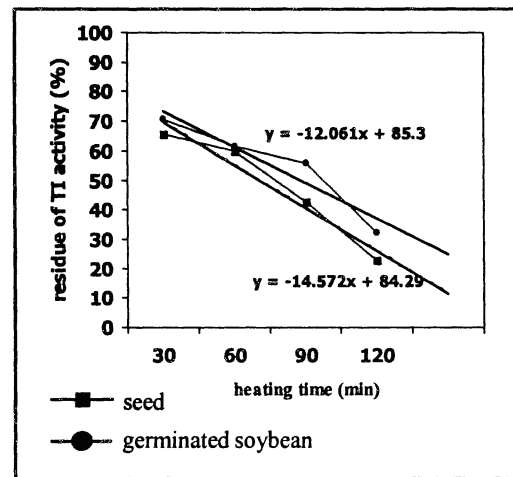
Perkecambahan biji kedelai meningkatkan jumlah protein yang terekstrak atau kadar protein *crude* TI. Peningkatan kadar protein tersebut menyebabkan rendemen *crude* TI kecambah lebih banyak dibandingkan *crude* TI biji. Hal ini kemungkinan berkaitan dengan proses hidrolisis protein yang terjadi selama perkecambahan. Hidrolisis protein tentunya mengakibatkan perubahan BM protein dan komposisi asam amino, sehingga akan mengubah titik isoelektris, sifat kelarutan dan sedimentasi.

Perkecambahan selama 36 jam ternyata menurunkan aktivitas penghambatan *crude* TI terhadap enzim tripsin dalam menghidrolisis substrat (BAPNA), seperti terlihat pada Tabel 1. Namun aktivitas TI tersebut sedikit meningkat selama perkecambahan 36 jam jika diperhitungkan terhadap biji sebelum dikecambahkan karena rendemen pemisahan *crude* TI kecambah lebih besar dibandingkan biji.

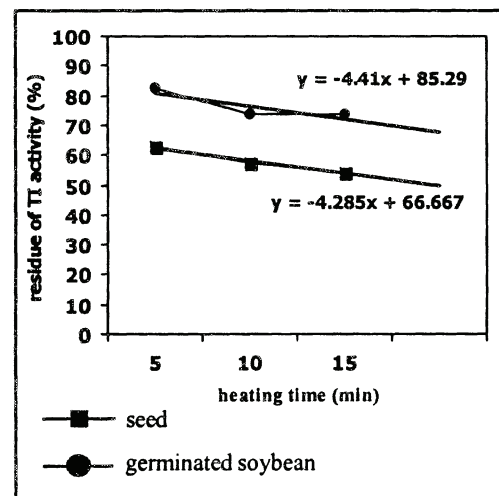
**Stabilitas panas *crude* TI pada berbagai lama pemanasan**

Hasil pengujian stabilitas panas terlihat pada Gambar 1 dan 2 yang menunjukkan bahwa pemanasan dengan oven dan blanching menyebabkan penurunan aktivitas TI biji maupun kecambah kedelai. TI kedelai sebagian besar adalah jenis KTI (*Kunitz Trypsin Inhibitor*) yang sensitif terhadap pemanasan sedangkan kandungan jenis TI BBI (*Bowman Birk Inhibitor*) yang lebih stabil terhadap pemanasan lebih sedikit (Frokier dkk., 1997) sehingga aktivitas TI sesudah pemanasan dengan oven selama 120 menit hanya tersisa sekitar 20 %.

Aktivitas TI yang tersisa sesudah pemanasan dengan blanching lebih tinggi dibandingkan pemanasan dengan oven. Suhu dan waktu pemanasan dengan oven lebih tinggi dibandingkan pemanasan dengan blanching sehingga tingkat denaturasi protein TI yang terjadi juga lebih tinggi. Pada pemanasan dengan blanching, aktivitas TI jenis BBI kemungkinan masih tetap ada karena BBI stabil terhadap pemanasan (Frokier dkk., 1997). Konformasi BBI distabilkan oleh 7 ikatan kovalen disulfida sehingga tetap stabil selama pemanasan (Birk, 1989), dan perubahan struktur yang terjadi pada pemanasan suhu 80 C selama 1 jam bersifat reversibel (Wu dan Sessa, 1994). Sedangkan konformasi KTI hanya distabilkan oleh 2 ikatan disulfida sehingga sensitif terhadap panas (Birk, 1989).



Gambar 1. Pengaruh waktu pemanasan pada aktivitas TI biji dan kecambah kedelai



Gambar 2. Pengaruh waktu pemanasan pada aktivitas TI biji dan kecambah kedelai

Aktivitas TI yang tersisa sesudah pemanasan pada *crude* TI biji lebih sedikit dibandingkan kecambah kedelai baik pada pemanasan dengan oven maupun blanching. Hal ini menunjukkan bahwa *crude* TI kecambah memiliki stabilitas panas yang lebih tinggi dibandingkan biji kedelai. Dari persamaan garis lurus terlihat bahwa kecepatan penurunan aktivitas TI selama pemanasan *crude* TI kecambah lebih lambat dibandingkan *crude* TI biji khususnya pada pemanasan dengan oven. Perbedaan stabilitas panas ini kemungkinan disebabkan oleh adanya perbedaan sifat sedimentasi protein biji dan kecambah kedelai, sehingga berpengaruh terhadap jumlah dan jenis asam amino penyusun protein (*crude* TI) yang diperoleh dari ekstraksi dengan cara pengendapan pH 3, seperti terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2 menunjukkan bahwa kandungan asam amino hidrofobik *crude* TI kecambah lebih tinggi dibandingkan biji, yaitu Val, Phe, dan Ile. Peningkatan asam amino hidrofobik pada *crude* TI kecambah kemungkinan akan meningkatkan kestabilan panas TI khususnya pemanasan dalam air, karena protein-protein yang terkandung dalam *crude* TI kemungkinan akan saling berasosiasi pada sistem larutan dengan pH tertentu. Keberadaan asam amino hidrofobik akan meningkatkan asosiasi antar molekul protein termasuk dengan protein TI dan meningkatkan stabilitasnya terhadap panas. Asam-asam amino hidrofobik akan saling mengadakan interaksi hidrofobik yang mengakibatkan struktur protein menjadi tersembunyi (*buried*) dan melipat (*folded*) untuk mengurangi kontak dengan lingkungan yang berair, sehingga meningkatkan stabilitas protein (Janecek, 1993).

#### Komposisi asam amino

Perkecambahan kedelai selama 36 jam menyebabkan perubahan komposisi asam amino *crude* TI, seperti terlihat pada Tabel 2. Jenis asam amino yang mengalami penurunan secara nyata selama perkecambahan 36 jam adalah Thr, Ala, Trp, Met, dan Lys. Sedangkan yang mengalami kenaikan adalah Asp, Glu, Val, Phe, dan Ile. Asam amino Ser, His, Arg, Gly, dan Leu tidak menunjukkan perubahan yang nyata selama perkecambahan 36 jam. Selama perkecambahan terjadi pembongkaran dan sintesis protein, sehingga menyebabkan perubahan komposisi asam amino. Perubahan komposisi asam amino ini kemungkinan akan berpengaruh terhadap sifat hipoglisemik *crude* TI.

#### Berat molekul protein

Perkecambahan selama 36 jam mengakibatkan perubahan distribusi berat molekul protein *crude* TI biji maupun kecambah, seperti terlihat pada Gambar 3. Hasil pengujian ini

menunjukkan bahwa ekstraksi TI dengan cara pengaturan pH yang dilakukan pada penelitian ini menghasilkan ekstrak kasar TI, karena masih banyak tercampur dengan jenis protein lain.

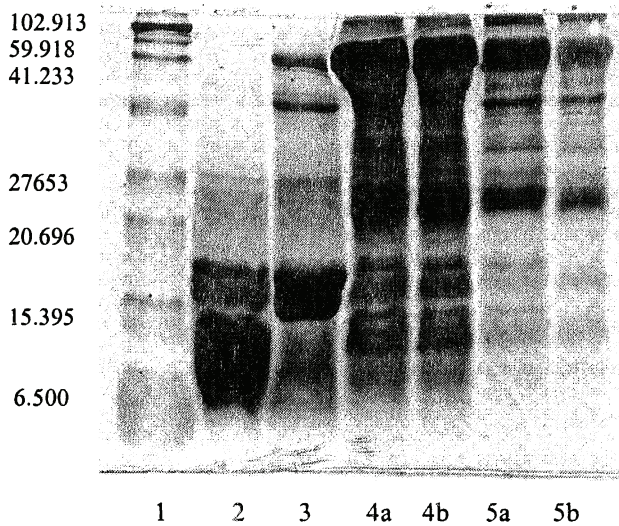
Tabel 2. Komposisi asam amino biji dan kecambah kedelai (g/ 100g db)

Amino acids	Crude TI	
	Seeds	Germinated soybean
Asp	7,27	9,13
Glu	8,80	10,81
Ser	2,61	3,18
His	1,75	2,10
Arg	3,58	4,16
Gly	0,66	0,82
Thr	2,92	2,79
Ala	11,76	12,69
Tyr	0,43	0,21
Trp	2,73	0,90
Met	1,60	2,96
Val	1,53	2,77
Phe	0,27	0,85
Ile	2,57	3,46
Leu	2,51	3,01
Lys	2,96	2,94

Protein TI pada *crude* TI kecambah masih terdeteksi seperti pada biji. Kedua jenis TI, yaitu KTI dan BBI ternyata terdapat dalam *crude* TI kecambah maupun biji. Pita protein TI kecambah lebih tebal dibandingkan biji, karena aktivitas protein TI per satuan berat padatan biji pada *crude* TI kecambah lebih banyak dibandingkan *crude* TI biji (Tabel 1). Selain itu kemungkinan juga disebabkan adanya hidrolisis protein BM besar selama perkecambahan.

Pada Gambar tersebut terlihat bahwa protein kecambah menjadi lebih terkonsentrasi ke protein dengan BM lebih rendah dibandingkan dengan protein biji. BM Protein biji yang terdeteksi pada BM > 190.000 Da memiliki pita yang lebih tebal dibandingkan kecambah, sedangkan BM protein biji yang terdeteksi pada BM < 100.000 Da memiliki pita yang lebih tipis. Hal ini menunjukkan bahwa selama perkecambahan 36 jam telah terjadi hidrolisis protein.

193.054



Gambar 3. Berat molekul protein TI kasar biji dan kecambah kedelai

1. Marker protein kecambah kedelai
2. Standar BBI
3. Standar KTI
- 4a dan 4b. TI kasar kecambah kedelai
- 5a dan 5b. TI kasar biji kedelai

#### KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa perkecambahan selama 36 jam menyebabkan penurunan aktivitas TI pada *crude* TI, namun aktivitasnya sedikit meningkat jika diperhitungkan terhadap total padatan biji. Pemanasan dengan oven maupun blanching akan menurunkan stabilitas panas TI, persentase penurunan aktivitas TI pada *crude* TI kecambah lebih rendah dibandingkan biji kedelai. Perkecambahan selama 36 jam akan mengakibatkan perubahan komposisi asam amino dan pola distribusi protein berdasarkan berat molekulnya. Adanya perubahan karakteristik kimia *crude* TI sesudah perkecambahan selama 36 jam tersebut kemungkinan berpengaruh terhadap sifat hipoglisemiknya, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada PT Indofood Sukses Makmur *bogasari flour mills* yang telah memberikan bantuan dana penelitian ini yang merupakan bagian dari penelitian untuk pengembangan tepung terigu bagi penderita diabetes dengan memanfaatkan *trypsin inhibitor*.

#### DAFTAR PUSTAKA

Ahmed, F.A.D, E.A.M.A Rahim, O.M.A. Fatah, V.A. Erdmann, and C. Lippmann, 1995. The changes of protein pattern

during one week of germination of some legumes seeds and roots. *Food Chem.* 52: 433-437.

Alonso, R., A. Aguirre, and F. Marzo, 2000. Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chem.* 68:159-165.

Bewley, J.D. and M. Black, 1983. *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination* Vol 1. Springer-verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Birk, Y, 1989. Protein protease inhibitors of plant origin and their significance in nutrition. Dalam *Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds*, Huisman, j., van der Poel, T.F.B., dan Liener, I.E. (eds). Pudoc Wageningen

Frokier, H., T.M.R. Jorgensen, A. Rosendal, M.C. Tonsgaard, and V. Barkholt, 1997. Antinutritional and allergenic proteins. Dalam *Antinutrient and phytochemical in food*, Shahidi, F. (ed). American Chemical Society, Washington DC.

Janecek, S., 1993. Strategies for obtaining stable enzymes. *Process Biochem.* 28:435-445  
Aspen Publ. Inc., Gaithersburg, Maryland.

Kaplan, A. and L.L. Szabo, 1989. *Clinical chemistry: interpretation and techniques*. Lea & Febiger, Philadelphia.

Losso, J.N., 2002. Preventing degenerative diseases by anti-angiogenic functional foods. *Food Tech.* Vol. 56, No. 6: 78-88.

Rackis, J.J. and M.R. Gumbmann, 1981. Protease inhibitors: Physiological properties and nutritional significance. Dalam *Antinutrients and natural toxicants in foods*, Ory, R.L. (ed). Food and Nutrition Press, Inc., Westport, Connecticut.

Saini, H.S., 1989. Activity and thermal inactivation of protease inhibitors in grain legumes. Dalam *Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds*, Huisman, j., van der Poel, T.F.B., dan Liener, I.E. (eds). Pudoc Wageningen

Wu, Y.V. and D. J. Sessa, 1994. Conformation of Bowman-Birk inhibitor. *J. Agric. Food Chem* 42: 2136 – 2138

Zuheid Noor, Y. Marsono, dan Mary Astuti, 2000. Sifat hipoglisemik komponen kedelai. *Prosiding Seminar Nasional Industri Pangan Vol II PATPI*, Surabaya.