

## USAHA PENGURANGAN ASAM FITAT KACANG HIJAU DENGAN CARA PEMACUAN FITASE MELALUI PERENDAMAN PADA BERBAGAI SUHU DAN pH

Oleh :

Agus Setyono

Mochamad Adnan

Fakultas Teknologi Pertanian UGM

### Ringkasan

Enzim fitase yang dipersiapkan dari kacang hijau yang telah mengalami perendaman dalam air selama 12 jam pada suhu kamar, diekstraksi dengan 2%  $\text{CaCl}_2$  dan diendapkan dengan menggunakan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Enzim fitase yang terdapat dalam endapan protein tidak dilakukan pemurnian lebih lanjut. Hasil pengujian aktivitas enzim fitase pada suhu  $50^\circ\text{C}$  menunjukkan bahwa pH optimum fitase 5,0. Nilai aktivitas fitase pada kondisi tersebut adalah 0,05 IU dengan substrat 3% larutan tepung kacang hijau dan 0,076 IU dengan substrat 6% larutan tepung kacang hijau.

Dari hasil pengamatan ini, yaitu suhu  $50^\circ\text{C}$  dan pH air perendam 5,0 digunakan untuk merendam kacang hijau dengan tujuan untuk mengurangi kandungan asam fitat dalam kacang hijau tadi oleh fitase yang dikandungnya. Dengan kondisi optimum ini aktivitas fitase akan dipacu sehingga aktivitasnya meningkat.

Perlakuan lama perendaman adalah 1 jam, 3 jam, 9 jam dan 12 jam, masing-masing dilakukan terhadap kacang hijau varietas No. 129 yang berasal dari Demak, Yogyakarta dan Magelang.

Perlakuan perendaman selama 1 jam hanya menyebabkan perubahan sedikit terhadap kandungan asam fitat. Sedangkan perlakuan perendaman selama 3 jam atau lebih menyebabkan perubahan kandungan asam fitat, P anorganik dan inositol dalam kacang hijau secara tajam. Perendaman selama 3 jam dapat mengurangi fitat sebesar 34,607% tetapi kehilangan inositolnya cukup tinggi, yaitu sebesar 47,248 mg/g berat kering.

Mengingat faktor perubahan bentuk, rasa dan pengurangan fitat, maka perendaman selama 3 jam dianggap yang paling optimal.

### PENDAHULUAN

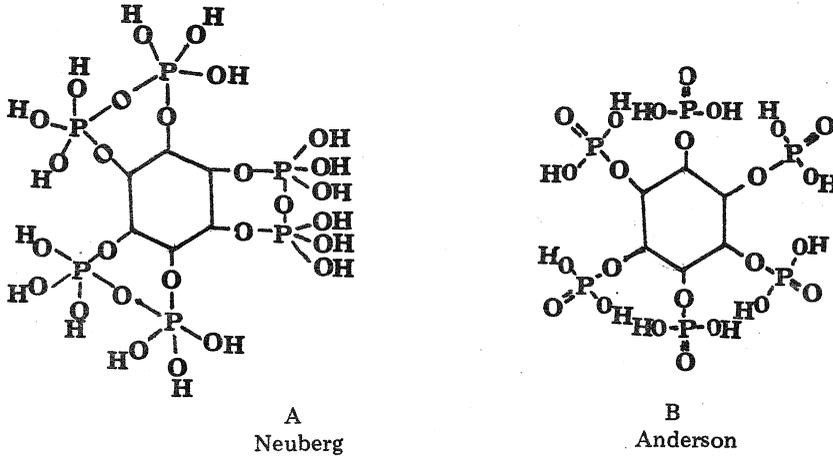
Kacang hijau merupakan salah satu kacang-kacangan yang dapat digunakan sebagai sumber protein, mineral dan vitamin bagi manusia maupun hewan. Akan tetapi kacang-kacangan dan juga sereal mengandung fitat (inositol heksafosfat).

Fitat pertama kali dijumpai oleh Pfeffer awal tahun 1872 (Oberleas, 1971) yang oleh

Anderson (1914) diidentifikasi sebagai inositol heksafosfat. Neuberg, (1908) telah mengusulkan bahwa struktur asam fitat adalah  $\text{C}_6\text{H}_{24}\text{O}_{27}\text{P}_6$ , dengan 18 atom hidrogen di sekitar inti inositol heksafosfat (gambar 1A). Anderson (1914) juga telah mengusulkan bahwa struktur asam fitat mempunyai 12 atom hidrogen di sekitar inti inositol heksafosfat dan dapat ditulis sebagai  $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6$  (gambar 1B). Johnson dan Tate (1969) menunjukkan bahwa asam fitat dalam sereal adalah myo-inositol heksafos-

fat dengan struktur seperti yang diusulkan oleh Anderson (1914), bukan seperti yang diusul-

kan oleh Neuberg (1908), yaitu 1,6 ; 2, 3; 4,5 tripyrofosfat.



Gambar 1. Struktur asam fitat menurut Neuberg dan Anderson

Fitat merupakan suatu senyawa yang terdapat di dalam biji-bijian yang berfungsi untuk menyimpan fosfor dan inositol, dan biasanya bergabung dengan logam, misalnya Ca, Mg, dan Zn membentuk suatu garam yang disebut fitin (Anderson, 1914; Averill and King, 1926; Farley and Turk, 1944; Makower, 1969; Smith and Rackis, 1957; Sobolev, 1963). Garam fitat ini tidak dapat digunakan oleh hewan dan manusia (McCance and Widdowson, 1944) oleh karena manusia tidak mempunyai sistem enzim endogen yang dapat mengkatalisa hidrolisa molekul fitat tersebut (Rapaport, Leva and Guest, 1941). Asam fitat menunjukkan sifat rachitogenik (menyebabkan penyakit rakitis) karena sifatnya yang dapat membentuk garam kalsium yang tidak larut, sehingga tidak dapat diserap melalui dinding usus (Harrison and Mellanby, 1939; Krebs and Mellanby, 1943; Kunits, 1946). Pada suatu kondisi tertentu aktivitas rachitogenik ini dapat dirusak atau dihilangkan oleh enzim fitase yang terdapat di dalam biji-bijian (McCance and Widdowson, 1944). Prasad dan

Oberleas (1973) juga melaporkan bahwa adanya asam fitat akan mengikat unsur-unsur mineral esensial seperti Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, dan Cu, sehingga sulit diabsorpsi. Dengan demikian menyebabkan penurunan tersedianya seng (O'Dell, 1969; Davies and Nightingale, 1975), kalsium (Harrison and Mellanby, 1939) dan magnesium (Robert and Judkin, 1960; Reddy *et al.*, 1978). Jelaslah di sini bahwa asam fitat sangat menarik perhatian bagi para ahli kimia, ahli kimia dan ahli gizi.

Selain asam fitat mengikat logam, asam fitat juga membentuk senyawa kompleks dengan protein (O'Dell and Savage, 1957; O'Dell and deBoland, 1976). Kemampuan asam fitat untuk mengikat protein, vitamin dan beberapa mineral merupakan salah satu faktor pembatas nilai gizi kacang (Chang *et al.*, 1977). Fontain *et al.* (1946) Cit. Zuheid Noor (1980) melaporkan bahwa antara pH 1,5– 3,5, jumlah kelarutan P total tergantung pada jumlah kelarutan N yang ada dalam bungkil kacang yang menunjukkan bahwa sebagian besar P (85% total P) berikatan

dengan protein. Hal ini disebabkan karena protein pada pH tersebut mempunyai muatan positif, sehingga protein dapat bereaksi atau mengikat asam fitat. Tetapi pada kondisi antara pH 3,5–6,5, jumlah P yang larut meningkat lebih cepat dari pada jumlah N yang larut, dan menunjukkan bahwa protein melewati titik isoelektrisnya, sehingga senyawa protein-fitat mengalami disoniasi.

Fitase mengkatalisa hidrolisa asam fitat (inositol heksafosfat) menjadi inositol dan orthofosfat bebas (Peer, 1953; Chong, 1967; Gibbin and Norris, 1963; Mandal *et al.*, 1972; Slamet Sudarmadji and Markakis, 1977). Fitase merupakan salah satu enzim utama yang membebaskan P anorganik dari senyawa fosfat (Suzuki *et al.*, 1907); Pada prinsipnya fitase yang ada dalam biji-bijian diperlukan untuk memecah fitat menjadi P anorganik dan inositol pada tingkat perkecambahannya. Suhu optimum dan pH optimum untuk aktivitas enzim fitase tiap-tiap jenis tanaman bervariasi (Peers, 1953; Chong, 1967; Gibbin and Norris, 1963; Mandal *et al.*, 1972; Slamet Sudarmadji and Markakis, 1977). Enzim fitase dalam biji tahan pemanasan kering sampai suhu 80° C selama 10 menit tetapi aktivitasnya menurun sebesar 40% bila dipanaskan sampai 90° C selama 10 menit. Enzim fitase dalam larutan menjadi tidak aktif apabila dipanaskan sampai 70° C selama 10 menit (Peers, 1953). Enzim fitase dapat lebih aktif dengan CaCl<sub>2</sub> (Chong, 1967) dan stabil pada suhu 0° C (Mandal *et al.*, 1972).

Dalam usaha untuk mengurangi kandungan asam fitat dalam bahan telah dilakukan berbagai cara. Averill dan King (1926) berusaha untuk mengurangi asam fitat dalam berbagai tanaman dengan perlakuan pemanasan pada suhu 105° C selama 2 jam, perendaman selama 10 jam dan pengukusan selama ½ jam. Smith Rakis (1957) melaporkan bahwa fitin dalam ekstrak bungkil kedele pada pH 7,0 dapat dikurangi dengan cara dialisa dan perlakuan dengan anion exchanger Dowex - 1 - X10. Kon *et al.*

(1973) telah berusaha untuk mengurangi kandungan asam fitat yang ada dalam kacang buncis (*Phaseolus vulgaris*) dengan cara merendam (menginkubasikan) kacang tersebut selama 20 jam, pada suhu 55° C dengan pH 5,2.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengurangi kandungan asam fitat di dalam kacang hijau dengan cara memacu aktivitas enzim fitase yang berada dalam kacang hijau tersebut melalui perendaman pada suhu dan pH optimum. Selain itu untuk mengetahui lama waktu perendaman yang paling efektif.

## BAHAN DAN METODA PENELITIAN

### Bahan

Kacang hijau (*Phaseolus aureus*), varietas 129, berasal dari a) kebun bibit Diperta di Kecamatan Gajah Kabupaten Demak, b) Sub Balitan Yogyakarta dan c) Mertoyudan, Magelang.

### Preparasi enzim fitase

Enzim fitase kasar (*crude enzyme*) dipersiapkan dari kacang hijau yang telah mengalami perendaman dan diekstraksi dengan 2% CaCl<sub>2</sub>, menggunakan metoda Lolos dan Markakis (1977). Rendam kacang hijau seberat 150 gram dalam 400 ml air pada suhu kamar selama 12 jam. Kemudian ditiriskan dan ditepungkan atau dihancurkan dengan menggunakan blender selama 2 menit. Timbang pasta yang diperoleh sebanyak 10 gram dan masukkan dalam erlenmeyer 250 ml. Tambahkan 50 ml 2% CaCl<sub>2</sub> dan digojog pada suhu kamar secara mekanis selama 40 menit. Seterusnya dipusingkan dengan gaya 20.000 G selama 30 menit pada suhu 2° C. (Hitachi Model RPRS 15 Swing Rotor High Speed Refrigerated Centrifuge). Setelah mengalami pemusingan, kemudian ditambah (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sehingga kandungan sulfat ini antara 25%–35%. Diamkan selama 30 menit pada suhu 2° C. Pusingkan lagi dengan gaya 20.000 G selama 20 menit pada suhu 2° C. Residu dibuang, supernatan dibuat 80% jenuh dengan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Dinginkan dan pusingkan seperti semula. Bagi-

an yang mengendap ini mempunyai kepekatan antara 35% – 80% mengandung enzim fitase yang aktif. Endapan ini kemudian dipisahkan, dan dilarutkan dalam volume kecil 0,01 M Tris-Hol buffer, pH 6,5. Endapan enzim fitase yang didapat ini seterusnya didialisa dalam buffer yang sama selama 48 jam pada suhu 2°C. Enzim fitase yang diperoleh ini digunakan untuk penelitian dan pengujian lebih lanjut.

#### *Pengujian aktivitas enzim fitase*

Enzim fitase yang diuji adalah hasil preparasi seperti tersebut di atas. Maksud dari pengujian ini adalah untuk mengetahui pada pH berapa, enzim fitase ini mempunyai aktivitas yang optimal. Aktivitas fitase diuji dengan mengukur kecepatan pertambahan jumlah P anorganik (Watanabe and Olsen, 1965).

Reaksi dilakukan dalam erlenmeyer 50 ml yang tertutup, dalam waterbath yang mempunyai suhu  $(50 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ . Total volume pengujian 12 ml yang terdiri atas 2 ml 1 N buffer sodium acetat + HCl, pH 3,0 ; 2 ml enzim fitase; 2 ml 8 mM sodium fitat dan 6 ml aquadest. Campuran diinkubasikan selama 30 menit pada suhu  $(50 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ . Kemudian dilakukan deproteinasi dengan menambah Trichloroacetic acid (TCA), kira-kira 0,75 ml TCA pekat, sehingga mempunyai konsentrasi terakhir 0,70 M TCA. Selanjutnya dipusingkan, supernatan yang diperoleh ditentukan kandungan orthofosfatnya (P anorganik) dengan metoda Pons dan Guthrie (1946)

Nilai aktivitas enzim yang diperoleh dikoreksi dengan menggunakan kontrol yang mengandung enzim yang dididihkan. Aktivitas enzim ini dinyatakan dalam satuan internasional (IU = *international Unit*), aktivitas enzim yang menghasilkan 1 umol P anorga per menit pada kondisi tertentu.

Pengujian aktivitas ini juga dilakukan pada pH 5,0 ; pH 7,0 dan pH 9,0 berturut-turut dengan menggunakan :

- 2 ml 0,2 N buffer sodium acetat + asam acetat, pH 5,0

- 2 ml aquades netral pH 7,0
- 2 ml 0,2 N buffer  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  dalam  $\text{H}_3\text{BO}_4$  pH 9,0.

Tepung kacang hijau dipakai sebagai substrat dengan konsentrasi masing-masing 3% dan 6%. Hal ini dilakukan untuk mengganti natrium fitat yang tidak ada dalam persediaan sebagai substrat.

#### *Perlakuan perendaman*

Variasi lamanya waktu perendaman adalah 1 jam; 3 jam; 6 jam; 9 jam dan 12 jam; pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$ . Contoh a). b) dan c) masing-masing contoh sebanyak 150 gram direndam dalam 400 ml air suhu  $50^{\circ}\text{C}$ .

Setelah mengalami perendaman, kemudian ditiriskan dan ditimbang. Seterusnya dikeringkan dalam oven pada suhu tidak lebih dari  $70^{\circ}\text{C}$ , sampai kering, dengan kadar air antara 12% – 14% dan ditimbang. Kemudian kacang hijau ini dianalisa mengenai kadar air; kandungan asam fitat; kandungan inositol dan kandungan P anorganiknya berturut-turut dengan metoda Winton dan Winton (1947); Wheeler dan Fenel (1971), Larnitzo (1968) dan Pons dan Cuthrie (1946).

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

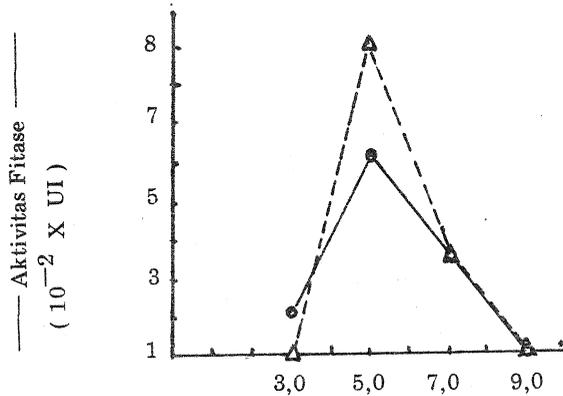
#### *Pengaruh pH dan suhu inkubasi terhadap aktivitas enzim fitase*

pH dan suhu inkubasi mempengaruhi aktivitas enzim. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas enzim fitase dalam larutan mulai menurun pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$  (Peers, 1953; Chong, 1967; Nandal *et al.*, 1972; Lolos and Markakis, 1977). Suhu optimum enzim fitase setiap jenis biji-bijian mempunyai sedikit perbedaan. Misalnya enzim fitase yang berasal dari jagung mempunyai suhu optimum  $50^{\circ}\text{C}$  (Chong, 1967); fitase dari gandum mempunyai suhu optimum  $55^{\circ}\text{C}$  (Peers, 1953); fitase dari

kecambah kacang hijau 57° C (Mandal *et al.*, 1972); dan fitase dari kacang buncis mempunyai suhu optimum 50° C (Lolas and Markakis, 1977). Dengan demikian aktivitas optimum enzim fitase terletak antara suhu 50° C – 57° C.

Menurut Chong (1967) bahwa enzim fitase menjadi tidak aktif pada suhu di atas 50° C. Selain itu pada suhu 25° C fitase belum menjadi aktif sampai inkubasi selama 40 menit dan juga

belum menjadi aktif pada suhu 37° C sampai inkubasi selama 20 menit. Lolas dan Markakis (1977) menyatakan bahwa pemanasan pada suhu 50° C selama 10 menit tidak mengurangi aktivitas enzim fitase, sedangkan pemanasan pada suhu 65° C selama 10 menit mengurangi aktivitas enzim fitase sebesar 45%; dan pemanasan pada suhu 80° C enzim ini hampir menjadi tidak aktif.



Gambar 2. Hubungan antara aktivitas fitase ( P inorganik hasil hidrolisa fitat oleh fitase ) dengan pH.  
 — larutan kacang hijau 3% sebagai substrat  
 - - - larutan kacang hijau 6% sebagai substrat

Berdasarkan data tersebut di atas maka suhu 50° C digunakan untuk menguji pengaruh pH terhadap aktivitas enzim fitase yang diperoleh dari kacang hijau.

Hasil pengujian aktivitas enzim fitase menunjukkan bahwa fitase dari kacang hijau mempunyai pH optimum 5,0 (gambar 2). pH optimum ini tidak jauh berbeda bila dibandingkan dengan hasil-hasil penelitian terdahulu. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa pH optimum aktivitas enzim fitase berbagai tanaman sedikit bervariasi (Peers, 1953; Mayer, 1958; Nagai and Funahashi, 1962; Gibbin and Morris, 1963; Mandal *et al.*, 1972; Lolas and Markakis,

1977). Aktivitas tertinggi fitase gandum dicapai pada pH 5,15 (Peers, 1953), dedak gandum pH 5,0 (Nagai and Funahashi, 1962); kacang buncis pH 5,3 (Gibbin and Morris, 1963); kecambah kacang hijau pH 5,6 (Mandal *et al.*, 1972); dari kecambah biji slada pH 5,0 dan pH 7,0 (Mayer, 1958).

Hasil pengujian yang diperoleh (Gambar 2) menunjukkan adanya perbedaan yang menyolok pengaruh pH terhadap aktivitas enzim fitase. Hasil percobaan ini menunjukkan bahwa pH 5,0 merupakan yang optimum dengan aktivitas 0,076 ug mol P anorganik per menit dan 0,05 ug mol/menit dengan substrat larutan kacang hijau 6% dan 3%.

Sebenarnya hidrolisa enzimatis fitin dilakukan oleh dua enzim fosfatase, yang pertama adalah fitase yang menghidrolisa fitin. Pada tingkat permulaan sampai tingkat pembentukan inositol trifosfat dan inositol difosfat; enzim kedua adalah fosfatase yang melakukan defosforilasi, menjadi inositol dan fosfat (orthofosfat) yang merupakan lanjutan aktivitas enzim fitase (Sobolev, 1963).

#### *Kandungan asam fitat, P anorganik dan inositol*

Hasil analisa asam fitat, P anorganik dan inositol untuk masing-masing contoh disajikan dalam tabel 1. Asam fitat pada prinsipnya merupakan senyawa fosfor yang berfungsi sebagai sumber P bagi suatu tanaman. Enzim fitase menjadi aktif pada saat perendaman atau perkecambahan, yang akan mengkatalisa hidrolisa asam fitat menjadi inositol fosfat, inositol dan orthofosfat. Pada tabel 1 menunjukkan bahwa kandungan asam fitat dalam kacang hijau kering tanpa perlakuan ( $T_0$ ) adalah 21,877 mg per gram berat kering. Dan terlihat bahwa setelah mengalami perlakuan perendaman, kandungan asam fitat menurun. Ternyata lamanya waktu perendaman mempengaruhi kandungan asam fitat. Makin lama waktu perendaman makin rendah kandungan asam fitat. Hal ini disebabkan karena dengan makin panjangnya waktu perendaman, makin besar pula waktu yang tersedia bagi enzim untuk menghidrolisa asam fitat tersebut. Daya larut fitat yang ada dalam tiap-tiap biji (tanaman) berlain-lainan. Chang *et al.*, (1977) melaporkan bahwa kacang tholo (*Vigna unguiculata*) mengandung 1% fitat, yang dapat larut dalam air sebesar 70%. Tetapi hasil penelitian Lolos dan Markakis (1975) menyatakan bahwa asam fitat yang ada dalam kacang-kacangan sebagian besar mudah larut dalam air dari pada yang tidak larut, yaitu kira-kira yang larut sebesar 99,6% dari total asam fitat. Perbedaan daya larut ini kemungkinan disebabkan oleh adanya ion logam,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,

$Fe^{+++}$ , dan juga protein yang ada dalam kacang hijau serta kondisi perendamannya. Di dalam penelitian ini kandungan asam fitat dalam air rendaman tidak diamati.

Hasil perhitungan secara statistik menyatakan bahwa perlakuan perendaman terhadap kandungan asam fitat ada perbedaan nyata (tabel 1). Perlakuan  $T_1$  (lama perendaman 1 jam) berbeda nyata dengan perlakuan  $T_3$ ,  $T_6$ ,  $T_9$  dan  $T_{12}$ . Tetapi perlakuan  $T_6$  berbeda tidak nyata dengan perlakuan  $T_9$  dan  $T_{12}$ .

Kandungan P anorganik dalam kacang hijau kering yang tidak mengalami perlakuan ( $T_0$ ) sebesar 0,312 mg/gram berat kering. Kandungan P anorganik total hasil hidrolisa asam fitat (P anorganik dalam kacang hijau ditambah P anorganik dalam sisa air rendaman) dipengaruhi oleh lama waktu perendaman. Seperti halnya penelitian yang dilakukan oleh Lolos dan Markakis (1977) terhadap aktivitas fitase kacang buncis, menyatakan bahwa perkecambahan meningkatkan aktivitas fitase yang dapat menghidrolisa asam fitat dan meningkatkan jumlah orthofosfat. Dan ini terlihat pada tabel 1, bahwa jumlah P anorganik dalam kacang hijau dan sisa air rendaman makin meningkat dengan makin lamanya waktu perendaman. Perlakuan  $T_1$ , berbeda nyata dengan perlakuan  $T_3$ ,  $T_6$ ,  $T_9$ ,  $T_{12}$  dan  $T_0$ . Tetapi perlakuan  $T_9$  dan  $T_{12}$  terhadap kandungan P anorganik berbeda tidak nyata.

Kandungan inositol dalam kacang hijau yang tidak mengalami perlakuan ( $T_0$ ) adalah cukup tinggi, yaitu 59,120 mg/gram berat kering. Dari tabel 1 menunjukkan bahwa inositol total (jumlah inositol dalam kacang hijau ditambah dengan inositol dalam air rendaman) makin meningkat dengan makin lamanya waktu perendaman. Apabila dihubungkan dengan kandungan asam fitat dan P anorganik, penambahan inositol tersebut merupakan hasil hidrolisa asam fitat oleh aktivitas fitase. Tetapi kandung-

TABEL 1.: PENGARUH LAMA WAKTU PERENDAMAN TERHADAP KANDUNGAN ASAM FITAT, P ANORGANIK DAN INOSITOL PADA KACANG HIJAU, SISA AIR RENDAMAN DAN TOTAL (DALAM KACANG HIJAU + SISA AIR RENDAMAN) +)

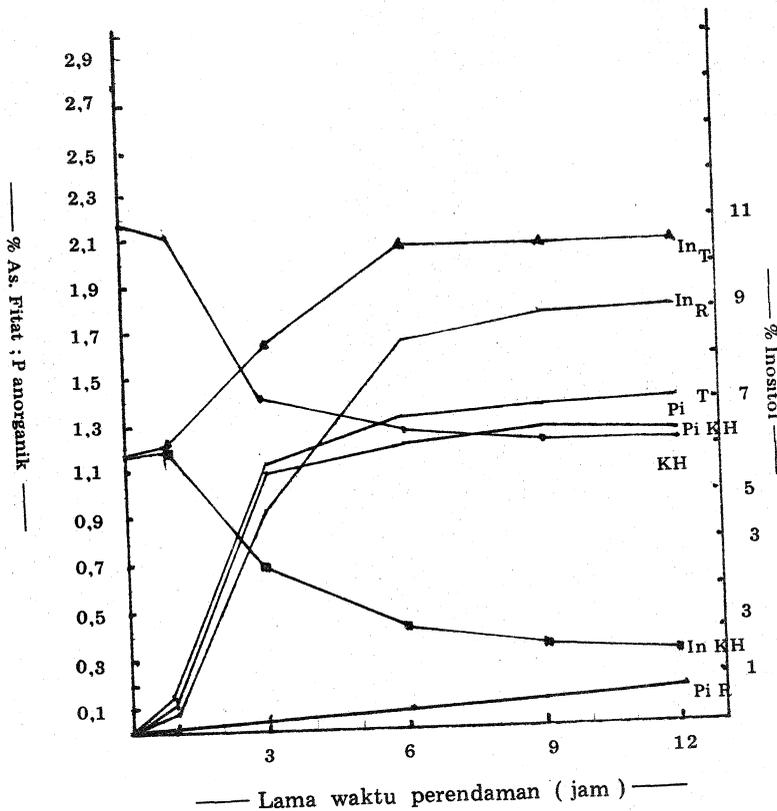
Perlakuan	Bagian yang di-analisa	Asam fitat (mg/g)	P anorg. (mg/g)	Inositol (mg/g)
Tanpa perlakuan (kontrol = T <sub>0</sub> )		21,877 <sup>a</sup>	0,312 <sup>a</sup>	659,120 <sup>a</sup>
Perendaman 1 jam (R(T <sub>1</sub> ))	Kacang hijau	21,405 <sup>b</sup>	1,192	59,690
	Sisa air rendaman	-	0,080	0,672
	Total	21,405 <sup>b</sup>	1,272 <sup>b</sup>	60,361 <sup>a</sup>
Perendaman 3 jam (T <sub>3</sub> )	Kacang hijau	14,306 <sup>c</sup>	11,197	36,748
	Sisa air rendaman	-	0,350	47,248 <sup>b</sup>
	Total	14,306 <sup>c</sup>	11,547 <sup>c</sup>	83,996 <sup>b</sup>
Perendaman 6 jam	Kacang hijau	12,548 <sup>d</sup>	12,207	18,975
	Sisa air rendaman	-	0,845 <sup>d</sup>	83,321
	Total	12,548 <sup>d</sup>	13,052 <sup>d</sup>	102,296 <sup>c</sup>
Perendaman 9 jam	Kacang hijau	12,286 <sup>d</sup>	12,533	16,490
	Sisa air rendaman	-	1,069	87,157 <sup>e</sup>
	Total	12,286 <sup>d</sup>	13,602 <sup>e</sup>	103,647 <sup>e</sup>
Perendaman 12 jam	Kacang hijau	12,101 <sup>d</sup>	12,424	14,115
	Sisa air rendaman	-	1,428	90,722 <sup>e</sup>
	Total	12,101 <sup>d</sup>	13,852 <sup>e</sup>	104,836 <sup>e</sup>
	Coefficien of variance (C.V)	1,64%	1,93 %	9,36 %

+ ) merupakan harga rata-rata dari tiga contoh.

i-  
)  
g-  
at  
P  
ga-  
al-  
lan  
ka-  
ah-  
pat  
kan  
ta-  
ka-  
ing-  
nan.  
kuan  
n T<sub>0</sub>  
ber-  
hijau  
dalam  
at ke-  
ositol  
au di-  
aman)  
waktu  
in kan-  
ambah-  
hidrolisa  
andung

an inositol dalam kacang hijau makin menurun dengan semakin lamanya waktu perendaman. Sebaliknya kandungan inositol dalam air rendaman makin meningkat. Hal ini menunjukkan bahwa hasil hidrolisa asam fitat sebagian besar mengalami difusi ke dalam air rendaman. Makin lama waktu perendaman makin besar inositol yang mengalami difusi. Pada waktu perendaman selama 1 jam ( $T_1$ ) kandungan inositol dalam kacang hijau naik dari 59,120 mg per gram berat kering ( $T_0$ ) menjadi 59,690 mg/g berat kering ( $T_1$ ). Hal ini disebabkan karena inositol yang terbentuk belum ada kesempatan

untuk melakukan difusi. Tetapi setelah itu kandungan inositol dalam kacang hijau menurun secara tajam. Ini terlihat jelas pada gambar 3. Mulai perendaman selama 6 jam penurunan kandungan inositol dalam kacang hijau tidak begitu menyolok (gambar 3). Hasil perhitungan secara statistik menunjukkan bahwa perlakuan  $T_1$  berbeda tidak nyata dengan  $T_0$  tetapi  $T_1$  berbeda nyata dengan  $T_3$ ,  $T_6$ ,  $T_9$  dan  $T_{12}$ . Sedangkan  $T_6$  berbeda tidak nyata dengan  $T_9$  dan  $T_{12}$ . Melihat kandungan p anorganik dan inositol dalam air rendaman (tabel 2; gambar 3) menunjukkan bahwa air rendaman perlu men-



Gambar 3. Hubungan antara kandungan beberapa komponen dalam kacang hijau dan sisa air rendaman dengan lama waktu perendaman. F = asam fitat; In = inositol; P = fosfor anorganik; KH = kacang hijau; R = sisa air rendaman; T = total dalam kacang hijau + sisa air rendaman.

dapat perhatian ditinjau dari kehilangan nilai gizi. Kandungan inositol dalam air perendaman cukup tinggi berkisar antara 0,067% berat kering ( $T_1$ ) sampai 9,072% berat kering ( $T_{12}$ ) (gambar 3). Dengan demikian jelas perendaman juga mempengaruhi nilai gizi dan kandungan unsur-unsur yang lain.

Apabila dilihat ketiga jenis hasil analisa tersebut di atas, yaitu asam fitat, P anorganik dan inositol, perlakuan  $T_1$  (perendaman selama 1 jam) hanya menyebabkan perubahan yang kecil terhadap kandungan asam fitat, P anorganik, walaupun secara statistik ada perbedaan yang nyata. Sedangkan perlakuan tersebut pengaruhnya terhadap kandungan inositol berbeda tidak nyata bila dibandingkan dengan kontrol. Pada perlakuan ini pengaruhnya terhadap perubahan berat belum begitu besar dan bentuk kacang hijau setelah perendaman belum banyak berubah. Perlakuan  $T_3$  (perendaman selama 3 jam) menyebabkan perubahan kandungan asam fitat, P inorganik dan inositol cukup besar bila dibandingkan dengan kontrol (tanpa perlakuan). Sedangkan perendaman selama 6 jam atau lebih, bentuk kacang hijau sudah berubah menjadi berkerut-kerut setelah mengalami pengeringan.

Akibat perendaman selama 3 jam, persentase kandungan asam fitat turun dari 2,188% menjadi 1,431%, sehingga terjadi penurunan sebesar 34,607%. Tetapi perlakuan ini juga menyebabkan penurunan kandungan inositol dalam kacang hijau dari 5,912% menjadi 3,675%, kira-kira sebesar 37,078%. Perendaman selama 6 jam menyebabkan penurunan kandungan asam fitat sebesar 42,643% tetapi penurunan kandungan inositol juga lebih besar dari 5,912% menjadi 1,898%, kira-kira sebesar 67,90%. Selain itu terjadi pula perubahan bentuk kacang hijau menjadi berkerut-kerut. Oleh karena itu untuk menghindari perubahan bentuk yang berkerut-kerut dan kehilangan inositol akibat difusi ke dalam air perendaman, maka perlakuan

perendaman selama 3 jam adalah yang paling efektif untuk mengurangi asam fitat.

### *Kesimpulan*

Enzim fitase kasar yang diperoleh dengan cara ekstraksi tepung kacang hijau dengan 2%  $\text{CaCl}_2$ , dan diendapkan dengan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , mempunyai pH optimum 5,0.

Perlakuan lama perendaman mempunyai pengaruh yang nyata terhadap kandungan asam fitat, P anorganik dan inositol. Perendaman selama 3 jam dapat mengurangi asam fitat sebesar 34,607% tetapi juga mengalami kehilangan inositol sebanyak 37,078%. Perubahan bentuk kacang hijau akibat perendaman selama 3 jam belum menyolok. Dengan demikian apabila ditinjau dari perubahan bentuknya dan pengurangan asam fitat maka perlakuan selama 3 jam adalah yang paling optimal.

### *Daftar Pustaka*

- Anderson, R.J. 1914. Concerning the organic phosphoric acid of cottonseed Meal II. *J. Biol. Chem.* 17 : 141.
- Averill, H.P., and C.G. King, 1926. The phytin content of Foodstuffs. *J. Am. Chem. Soc.* 548, (3); 724.
- Chang, R., S Schwimmer and H.K. Burr, 1977. Phytate; Removal from whole dry beans by enzymatic hydrolysis and diffusion. *J. Food Sci.* 42 : 1098;
- Chong, W.C., 1967. Study of phytase and fluoride effect in germinating seeds, *Cereal Chemistry*, 44 (2) : 129.

- Davies, N.T., and R. Nightingale, 1975. The effect of phytate on intestinal absorption and secretion of zinc, copper, iron and manganese in rats. *Br. J. Nutr.*, 34 : 243.
- Earley, E.B., and E.E. de Turk, 1944. Time and rate of synthesis of phytin in corn grain during the reproductive period. *J. Amer. Soc. Agron.* 36 (10) : 803.
- Gibbin, L.N., and F.W. Norris, 1963. Phytase and acid phosphatase in Dwarf Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Biochem. J.* 86 : 67.
- Harrison, D.C., and E. Mellanby, 1939. CCVIII, Phytic acid and the rickets producing action of cereals. *Biochem. J.* 33 (10) : 1660.
- Johson, L.F., and M.E. Tate, 1969. Structure of phytic acids. *Can. J. Chem.* 47 (1) : 63.
- Kon, S., A.C. Olson, D.P. Frederick, S.B. Egging and J.R. Wagner, 1973. Effect of different treatments of phytate and soluble sugars in California Small White Beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Sci.* 38 (2) : 215.
- Kunitz, M.m. 1946. Crystalline soybean trypsin inhibitor. I. Method of isolation. *J. Gen. Physiol.*, 29 (3) : 149.
- Krebs, H.A., and K. Mellanby, 1943. The effect of national wheatmeal on the absorption of calcium. *Biochem. J.* 37 (4) : 466.
- Lolas, G.M., and P. Markakis, 1975. Phytic acid and other phosphorus compounds of beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Agr. Food Chem.* 23 (1) : 13.
- Lornitzo, F.A., 1968. A method for colorimetric assay of inositol and some of its phosphate derivatives. *Anal. Biochem.* 25 (1-3) : 396.
- Makower, R.U., 1970. Extraction and determination of phytic acid in beans (*Phaseolus vulgaris*). *Cereal Chemistry.* 47 (3) : 288.
- Makower, R.Y., 1969. Changes in phytic acid and acid-soluble phosphorus in maturing Pinto beans. *J. Sci. Food Agr.* 20 (2) : 82.
- Mandal, N.C., S. Burman, and B.B. Biswas, 1972. Isolation, purification and characterization of fitase from germinating mung beans. *Phytochemistry.* 11 : 495.
- McCance, R.A., and E. M. Widdowson, 1944. Activity of the phytase in difference cereals and its resistance to dry heat. *Nature*, 153 (3891) : 650.
- Mayer, A.M., 1956. The breakdown of phytin and phytase activity in germinating lettuce seeds. *Enzymologia.* 19 : 1.
- Nagai, Y. and S.\* Funahashi, 1962. Phytase (myo-inositol hexaphosphates phosphohydrolase) from wheat bran. Part 1. Purification and substrate Specificity *Agr. Biol. Chem.* 26 : 794.
- Neuberg, C., 1908. *Biochem. z.* 9<sup>o</sup> 557.
- Oberleas, D., 1971. Phytates. In toxicants occurring naturally in Food Ch. 17 : 363. National academic of Science, Washington, D.C.
- O'Dell, B.L., 1969. Effect of dietary components upon zinc availability. *Am. J. Clin. Nutr.* 22 : 417.

- O'Dell, B.L., and J.E. Savage, 1957. Effect of phytic acid on zinc availability. *Proc. Sec. Exp. Biol. Med.* 103 : 304.
- O'Dell, B.L., and de Boland, A., 1976. Complexation of phytate with proteins and cations in corn germ and oilseed meal. *J. Agric. Food Chem.* 24 : 4.
- Peers, F.G., 1953. The phytase of wheat. *Biochem. J.* 53 : 102.
- Prasad, A.S., and D. Oberleas, 1973. Zinc deficiency in Man. *Lancet*, I (7818) : 1520.
- Pons Jr, W.A., and J.D. Guthrie, 1946. Determination of inorganic phosphorus in plant materials. *Journal Industrial and Engineering Chemistry* 18 (3) : 184.
- Rapaport, S., E. Leva and G.M. Guest, 1941. Phytase in plasma and Erythrocytes of varicous species of vertebrates. *J. Biol. Chem.* 139 (2) : 621.
- Robert, A.H., and J. Judkin, 1960. Dietary phytate as a possible cause of magnesium deficiency. *Nature*, 185 : 823.
- Reddy, N.R., C.V. Balakrishnan, D.K. Salunkhi, 1978. Phytate phosphorus and mineral changes during germination and cooking of black gram (*Phaseolus mungo*) seeds. *J. Food Sci.* 42 (2) : 540.
- Slamet Sudarmadji and P. Markakis, 1977. The phytate and phytase of soybean tempah. *J. Sci. Food Agric.* 28 : 381.
- Smith, A.K., and J.J. Rackis, 1957. Phytin elimination in soybean protein isolation. *J. Amer. Chem. Soc.* 79. (3) : 633.
- Sobolev, A.M., 1963. Enzymatic hydrolysis of phytin in vivo and in germinating seeds. *Soviet Plant Physiol.* 9 : 263.
- Suzuki, V.K. Yoshimura and M. Takaishi, 1907. *Bull.-Call. Agric. Tokyo*, 7, 503.
- Wheeler, E.L., and R.E. Ferrel, 1971. A method for phytic acid determination in wheat and wheat fractions. *Cereal Chem.* 48 (3) : 312.
- Winton. A.L., and K.B. Winton, 1958. *The analysis of Foods.* John Wiley & Sons, Inc. London.
- Watanabe, F.S. and S.R. Olsen, 1965. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and  $\text{NaCHO}_3$  extracts from soil. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 29 : 677
- Zuheid Noor, 1980. Effect of pH manipulation during aqueous extraction of peanut proteins. Thesis. University of Illinois. Urbana. 192 p.