

PENGEMBANGAN PROSEDUR ANALISIS ZAT ANTITRIPSIN (TRYPSIN INHIBITOR) PADA SUMBER PROTEIN NABATI

Oleh: Uken S.S Soetrisno; dan Suryana P.

ABSTRAK

Prosedur analisis aktifitas dan kandungan zat antitripsin telah dikembangkan dan diuji-coba. Prosedur ini menghasilkan data dengan daya-ulang yang tinggi serta dapat dilakukan menggunakan peralatan yang biasa terdapat di laboratorium kimia makanan.

Pendahuluan

Protein nabati terutama kacang-kacangan semakin ditingkatkan penggunaannya, baik demi alasan kesehatan maupun karena kurang tersedianya sumber protein hewani pada harga yang terjangkau oleh masyarakat berpenghasilan rendah. Hal ini tercermin pada usaha pemerintah dalam peningkatan produksi pangan yang bertujuan untuk memantapkan swasembada pangan yang sekaligus memperbaiki mutu makanan, khususnya dengan memperbesar penyediaan protein nabati dan hewani (Indonesia, 1989).

Seperti diketahui dari penelitian-penelitian terdahulu (Soetrisno, 1981; Whitaker and Feeny, 1973) kacang-kacangan sebagai sumber protein nabati mempunyai beberapa keterbatasan, yaitu adanya zat antigizi, baik yang berupa senyawa protein maupun glukosida, yang merugikan kesehatan. Senyawa antitripsin (trypsin inhibitor = TI) adalah salah satu senyawa protein yang bersifat menghambat kerja enzim tripsin dalam menghidrolisisakan protein, misalnya TI di dalam kacang ikedelai telah dibuktikan menghambat kerja enzim tripsin pada sapi, babi, unggas, dan manusia (Whitaker dan Feeny, 1973). Hasil penelitian terhadap binatang percobaan menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan dan pembesaran kelenjar pankreas.

Senyawa TI dapat dikurangi aktifitasnya melalui pemanasan, terutama pemanasan basah, dengan waktu yang cukup lama, mengingat adanya senyawa TI yang tahan terhadap suhu tinggi, yaitu TI golongan Bowman-Birk (Whitaker and Feeny, 1973). Hal-hal tersebut di atas memungkinkan penilaian dan pengkajian mutu protein kacang-kacangan melalui analisis kandungan TI dan yang tersisa setelah pengolahan.

Beberapa metode analisis TI telah banyak dilaporkan penggunaannya, pada umumnya berdasarkan metode Kakade dkk. (1974). Penyesuaian metoda dilakukan sesuai peralatan dan bahan kimia yang tersedia agar efisien, tanpa mengurangi nilai ketepatan dan daya ulangnya. Mengingat akan sering dilakukan penentuan kandungan TI di dalam kacang-kacangan dan hasil olahannya, di Pusat Penelitian dan Pengembangan Gizi telah diujicoba prosedur analisis TI yang merupakan modifikasi (Soetrisno, 1981) metode Kakade dkk. (1974) dan Hamerstrand dkk.(1981).

Makalah ini menguraikan prosedur penentuan TI yang sudah diujicoba tersebut yang dapat dilaksanakan oleh para laboran dengan peralatan yang tersedia di laboratorium kimia makanan pada umumnya.

Bahan dan Cara

Bahan

Pengujian aktifitas TI dilakukan menggunakan kedelai mentah dan terolah. Bahan-bahan kimia dipesan dari toko bahan kimia di Bogor yang pada umumnya keluaran Sigma Chem. Co., Illinois, USA.

Cara

Prosedur analisis TI yang diuji di atas metode Kakade dkk. (1974) yang sudah dimodifikasikan (Soetrisno, 1981) dan prosedur Hamerstrand dkk. (1981). Uji-coba prosedur dilakukan menggunakan kedelai mentah yang dianalisis sebanyak 16 ulangan, dan disajikan sebagai total TIA per gram bahan contoh. Sebagai data tambahan dianalisis kedelai terolah, dilakukan triplo.

Hasil dan Bahasan

Prosedur analisis TI akan terdiri atas 3 bagian. Bagian I penyediaan larutan contoh dan pereaksi, bagian II reaksi, enzim, dan bagian III uraian cara menghitung dan menyajikan data TI yang diperoleh. Cara pembuatan larutan dapat dilihat pada Lampiran.

Penyediaan larutan contoh dan larutan-larutan pereaksi harus benar-benar memperhatikan batasan pH, suhu, dan kepekatan yang ditentukan, mengingat reaksi yang akan berlangsung adalah reaksi enzim yang mengikuti hukum all or inone (berlangsung atau tidak sama sekali). Data penunjang seperti kadar air dan kadar protein dalam bahan contoh sebaiknya dikumpulkan agar data TI dapat disajikan menurut satuan aktifitas, maupun satuan berat.

Bagian I.1. Larutan contoh

Tujuan pelarutan bahan contoh adalah untuk melarutkan senyawa protein termasuk senyawa TI, sehingga dapat bebas bereaksi dengan substrat Bapna. Bahan contoh dihaluskan (+ 100 mesh) untuk memperbanyak kontak dengan pelarut dalam suasana basa, pH 8,4 sampai pH 10,0 (menggunakan NaOH 0,01N atau HCl 0,1N sebagai pengatur pH). Diusahakan agar pH tidak terlalu jauh bergeser dari yang ditentukan, untuk mencegah kerusakan senyawa TI akibat proses asosiasi-reasosiasi protein yang berulang-ulang (Fenemma, 1985), yang pada akhirnya dapat mengganggu aktifitas penghambatan yang sedang diukur. Larutan contoh ini harus diencerkan sehingga mempunyai aktifitas penghambatan sebesar 40-60% agar jelas dalam pembacaan absorbansi warna hasil reaksi

enzim. Pengenceran pertama sebanyak 500 kali, dapat ditingkatkan jika aktifitas TI masih terlalu tinggi.

Bagian I.2. Larutan pereaksi, enzim, dan substrat

Larutan Tris (Tris-hydroxymethyl-aminomethane) adalah larutan penyangga (buffer) untuk melarutkan enzim tripsin. Pengaturan pH larutan Tris harus benar-benar diperhatikan agar tidak merusak senyawa tripsin.

Larutan Bapna (Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide. HCl) adalah larutan substrat protein sintetik yang akan dihidrolisiskan oleh enzim tripsin. Penambahan DMSO (Dimethyl sulfoxide) pekat dimaksudkan untuk melarutkan Bapna dengan sempurna. Larutan ini akan menghasilkan warna kuning dari senyawa asam amino arginin yang dibebaskan sebagai hasil reaksi enzim tripsin, dan akan dibaca absorbansinya.

Larutan asam cuka 30% ditambahkan untuk menghentikan reaksi enzim yang sedang berlangsung. Kepekatan yang tinggi ini diperlukan agar senyawa TI dan enzim tripsin, yang merupakan senyawa protein, segera menggumpal serta kehilangan aktifitas biokimianya.

Tahap II. Reaksi enzim

Untuk mempermudah pelaksanaan reaksi dibuat urutan-urutan penambahan larutan dan hal-hal yang perlu dilakukan. Sebaiknya digunakan pipet otomatis agar pengukuran dan pengambilan larutan tepat dan langsung langsung disemprotkan kedalam tabung reaksi sehingga waktu reaksi lebih terkontrol. Urut-urutan dan jumlah penambahan larutan dapat dilihat di dalam Tabel 1. Setelah penambahan asam cuka larutan dikocok lalu disentrifusi (3000 rpm, 10 menit). Larutan bening dibaca absorbansinya (410 nm).

Tabel 1. Urutan penambahan larutan dalam reaksi enzim tripsin

Larutan yang ditambahkan	T abung sentrifusi untuk:			
	Contoh	Blanko	Standar	Blanko
1. Contoh	2,0 ml	2,0 ml	-	-
2. H ₂ O	-	-	2,0 ml	2,0 ml
3. Tripsin	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml
4. Bapna	5,0 ml	5,0 ml(*)	5,0 ml	5,0 ml(*)
5. Dikocok	10 menit	10 menit	10 menit	10 menit
6. Cuka	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

*Ditambahkan setelah penambahan asam cuka

Penambahan larutan Bapna pada tabung blanko contoh dan blanko standar dengan tanda (*) dilakukan setelah penambahan larutan asam cuka, dengan maksud agar enzim tripsin maupun senyawa TI dirusak strukturnya sehingga tidak turut bereaksi. Waktu reaksi harus tepat 10 menit (gunakan timer) dari sejak penambahan larutan Bapna, kecuali untuk tabung-tabung blanko, sehingga warna yang dihasilkan benar-benar menggambarkan jumlah senyawa arginin yang dibebaskan. Pada saat pembacaan absorbansi larutan, sebaiknya digunakan pipet penyedot untuk memindahkannya ke dalam kufet pembaca, agar tidak terambil bagian yang terendapkan ataupun bagian permukaan yang berupa komponen lemak.

Bagian III. Penghitungan aktifitas dan kandungan TI

1. Satuan tripsin = TU (tripsin unit)

Satuan tripsin dihitung berdasarkan absorbansi larutan setelah dikoreksi dengan larutan blanko, dengan ketentuan bahwa setiap satu satuan tripsin (1 TU) akan menaikkan 0,01 skala absorbansi; dirumuskan sebagai berikut:

$$TU = \frac{\text{Absorbansi}}{0,01}$$

2. Satuan penghambat tripsin = TIU (tripsin inhibitor unit)

Satuan penghambat tripsin dihitung sebagai selisih TU standar (TU₀, yaitu reaksi tanpa larutan contoh), dengan TU contoh (TU_x); dirumuskan sebagai berikut:

$$TIU = TU_0 - TU_x$$

3. Hambatan (%)

Hitungan ini diperlukan untuk memperkirakan % hambatan larutan contoh agar dapat diketahui pengenceran yang seharusnya dilakukan, yaitu antara 40% sampai 60%.

Rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Hambatan} = \frac{TIU}{TU} \times 100\%$$

4. Aktifitas penghambatan tripsin = TIA (tripsin inhibitor activity)

Aktifitas penghambatan tripsin dihitung sebagai total satuan penghambat tripsin untuk setiap gram bahan contoh; dirumuskan sebagai berikut:

$$TIA = TIU / \text{ml} \times \text{Faktor pengenceran}$$

5. Kandungan zat penghambat tripsin (TI = tripsin inhibitor)

Kandungan zat penghambat tripsin dapat dihitung per gram berat bahan contoh ataupun berdasarkan per gram protein bahan tersebut, dengan menyertakan total pengenceran serta masa jenis TI yang sudah ditentukan = 0,019; dirumuskan sebagai berikut:

$$TI \text{ mg/g bahan} = \frac{\text{Absorbansi} \times \text{faktor pengenceran}}{2 \text{ ml} \times 1000 \times 0,019}$$

atau :

$$TI \text{ mg/g protein} = \frac{TI \text{ mg/g bahan} \times 100}{\text{Kadar protein}}$$

Pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa simpang baku 16 pengulangan analisis TIA kedelai mentah adalah kurang dari 3% dari nilai rata-rata. Ini membuktikan bahwa prosedur analisis yang dilakukan di Puslitbang Gizi, Bogor, mempunyai daya ulang tinggi, dan menurut Prof, DR. Darwin Karyadi (6) telah diakui oleh sebuah perusahaan swasta setelah membandingkan hasil analisis di Puslitbang Gizi dengan hasil analisis di induk perusahaan mereka di luar negeri.

Tabel 2. Aktifitas dan kadar zat penghambat tripsin* dari tepung kedelai mentah dan terolah			
Bahan contoh	TIA	TI	
		mg/g bahan	mg/g prot.
Kedelai mentah	39002 ± 1148		
Kedelai terolah**	2405	0,85	2,31
*Dihitung berdasarkan berat kering			
**Kadar protein = 36,5%			
Kadar air = 5,6%			

Rujukan

1. Fenemma, O.R. Food Chemistry. 2nd ed., Marcel Dekker. New York, 1985, p. 246-349, 817-825.
2. Hamerstrand, G.E. et al. Trypsin inhibitors in soyproducts: Modification of the standard analytical procedure. *Cereal-Chem.* 58(1): 42, 1981

3. Kakade, M. L. et al. *Determination of trypsin inhibitor activity of soyproducts: collaborative analysis of an improved procedure.* Cereal Chem. 51:376, 1974.
4. Karyadi, D. Pembicaraan langsung dengan Kepala Divisi R & D, PT. Sanmaru-Indofood, Jakarta, 1986.
5. Republik Indonesia. 1989. Rencana Pembangunan Lima Tahun Kelima. Bab 10. Departemen Penerangan RI.
6. Soetrisno, U. S. S. Effect of heating on soybean on vitamin B6 and folacin retention, trypsin inhibitor activity, and microstructure changes. MS Thesis, Oregon State University. Corvallis, OR 97331 1981.
7. Whitaker, J. R. dan Feeny, R. E. Enzyme inhibitors in foods dalam *Toxicants Occuring Naturally in Foods.* National Academy of Sciences. 2nd ed. Washington, D.C. Hal. 276-283, 1973

Lampiran

Pembuatan Larutan-larutan Pereaksi:

1. Larutan Tris: dibuat dari 6,05 g Tris-hydroxymethyl- aminomethane dan 2,94 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yang dilarutkan dalam 800 ml akuades. Atur sampai pH 8,2 dengan menambahkan NaOH 0,1 N atau HCl 0,1N. Volume total dijadikan 1000 ml dalam labu ukur. Dapat disimpan dalam lemari es selama 2 bulan.
2. Larutan Tripsin: dibuat dari 4,0 g tripsin bubuk yang dilarutkan dengan penambahan 150 ml HCl 0,001N hangat (370C), sedikit demi sedikit agar terlarut, lalu dijadikan 200 ml dalam labu ukur. Dapat disimpan dalam lemari es selama 3 iminggu.
3. Larutan Bapna: dibuat dari 40,0 mg Bapna.HCl yang ditetesi 1,0 ml DMSO pekat, agar terlarut sempurna, diatas penangas air (370C). Volume dijadikan 100 ml dengan menambahkan larutan Tris dalam labu ukur. Dibuat setiap akan digunakan.