

AKTIVITAS ENZIM FITASE PADA PERKEMBANGAN KACANG HIJAU (*Phaseolus radiatus L*)

Woro Riyadina *

ABSTRACT

ACTIVITY OF PHYTASE ENZYME ON GERMINATION OF MUNG BEANS (*Phaseolus radiatus L*)

*This is a study on the phytase enzyme activities on germination of Mung Beans (*Phaseolus radiatus L*). The activities and stability of phytase enzyme were observed under influence of various incubation temperature (27°C, 37°C and 55°C), and incubation time (1 hour, 2 hours and 3 hours) of the Mung Beans (*Phaseolus radiatus L*) in germinating for 1 to 5 days.*

The results showed that activities of phytase enzyme at the same temperature and incubation time are the same in Mung Beans seed germinating for 1 to 5 days. Phytase enzyme is one of the thermostabile enzymes with optimal activities at high temperature.

PENDAHULUAN

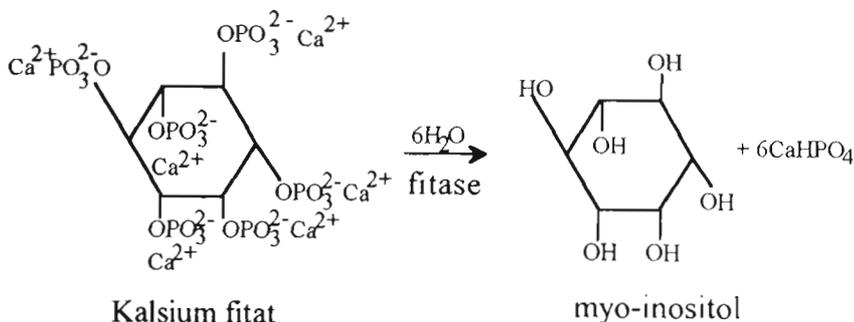
Kacang hijau selain mengandung gizi yang tinggi, ternyata juga mengandung zat antigizi berupa asam fitat yang relatif tinggi¹. Adanya fitat dalam bahan makanan dapat menyebabkan mineral-mineral esensial seperti besi, kalsium, seng, mangan, kobalt atau tembaga dan molibdat membentuk kompleks mineral fitat yang tidak larut, sehingga tidak dapat diserap oleh tubuh dan tubuhpun akan keku-

rangan mineral-mineral esensial tersebut². Dalam keadaan seperti ini di dalam tubuh akan terjadi gangguan keseimbangan jumlah mineral yang dibutuhkan, sehingga pada akhirnya akan menimbulkan gangguan kesehatan. Terjadinya penurunan daya guna mineral karena adanya asam fitat dalam makanan dikarenakan di dalam sistem pencernaan manusia tidak terdapat sistem enzim endogen yang dapat mencegah fitat¹.

* Pusat Penelitian Penyakit Tidak Menular, Badan Litbang Kesehatan Depkes RI.

Nilai gizi makanan yang masuk ke dalam tubuh yang seimbang serta mencukupi kebutuhan menjadikan stamina tubuh tetap sehat yang berarti kesehatan tubuhpun akan tetap terpelihara dan terjaga.

Interaksi antara fitat dengan protein, vitamin dan beberapa mineral yang mempengaruhi pertumbuhan dan kesehatan pada umumnya, dapat merupakan alasan bahwa asam fitat perlu dipertimbangkan sebagai salah satu faktor pembatas nilai gizi pada jenis biji-bijian dan kacang-kacangan³. Masalah ikatan asam fitat dengan mineral dan interaksi dengan protein dapat dipecahkan antara lain dengan jalan menghidrolisis asam fitat menjadi inositol dan asam fosfat oleh aktivitas enzim fitase. Persamaan reaksi adalah sebagai berikut⁴ :



Enzim fitase merupakan salah satu enzim utama yang membebaskan fosfat anorganik dari senyawa fosfat¹. Aktivitas enzim fitase dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain : suhu, pH, konsentrasi substrat (kadar air), konsentrasi enzim, dan ada tidaknya zat penghambat⁵.

Enzim fitase menghidrolisa fitat yang terdapat pada beberapa jenis biji-bijian, khususnya pada biji yang berkembang³. Dengan adanya aktivitas enzim fitase selama proses perkecambahan biji kacang hijau, menyebabkan terjadinya penurunan kandungan asam fitat sebagai zat antigizi dalam bahan makanan tersebut.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pola aktivitas enzim fitase dalam biji kacang hijau yang dkecambahkan serta menguji stabilitas enzim fitase terhadap perubahan suhu dan waktu inkubasi. Sehingga dapat diketahui pola aktivitas yang paling optimal serta sifat enzim fitase dalam menghidrolisis asam fitat sebagai zat antigizi dalam kecambah kacang hijau.

Diharapkan dengan diketahuinya pola aktivitas serta sifat enzim fitase, dapat dipergunakan sebagai pedoman dalam upaya atau cara pengolahan kecambah kacang hijau, agar nilai gizi pada kecambah tersebut tidak hilang ataupun berkurang.

BAHAN DAN CARA KERJA**BAHAN**

Bahan	Komposisi
1. Kecambah Kacang hijau varietas Walet	-
2. Dapar maleat 0,01 M Triss,pH 6,5	1,21 g triss hidroksi metil amino-methan dan 1,16 gr asam maleat dilarutkan dengan air suling sampai 1000 ml = a; (500 ml 0,01 M NaoH + 397,5 ml a, diencerkan sampai 2000 ml)
3. Larutan dapar asetat	34,65 ml asam asetat dilarutkan sampai 1000 ml = a 49,20 g natrium asetat dilarutkan sampai 1000 ml = b (a + b, dilarutkan sampai 100 ml)
4. Reagen A	12 g ammonium molibdat dilarutkan sampai 250 ml = a 0,2908 g antimoni kalium tartrat, dilarutkan sampai 1000 ml = b (a + b, dilarutkan sampai 2000 ml)
5. Reagen B	1,056 g asam askorbat dilarutkan dengan 200 ml reagen A.

CARA KERJA

Penelitian ini dilakukan kurang lebih selama 6 bulan, yaitu dari bulan September 1991 sampai dengan bulan Februari 1992, di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Analisis Kimia Pusat Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Penelitian ini dibiayai oleh peneliti sendiri.

Proses ekstraksi

Tahap preparasi enzim fitase dengan mempergunakan metode Lolos dan Markakis

(1977) yang telah dimodifikasi. Enzim yang belum murni dipersiapkan dengan menggunakan larutan CaCl_2 2%. Kecambah kacang hijau ditumbuk halus, selanjutnya ditimbang sebanyak 10 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml. Kemudian ditambahkan 100 ml larutan CaCl_2 2% (ratio sampel : CaCl_2 = 1 : 10) dan dikocok pada suhu kamar selama 30 menit. Selanjutnya disentrifus dengan gaya 15.000 (12.900 rpm) selama 30 menit pada suhu 2°C.

Supernatan ditambah $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sehingga mencapai kejenuhan 35% (tabel Dixon) dan

didiamkan 30 menit pada suhu 2°C. Sentrifus lagi dengan gaya 15.000 (12.900 rpm) selama 20 menit pada suhu 2°C. Supernatan dijenuhkan lagi dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sampai tingkat kejenuhan 80%, dan disentrifus sekali lagi seperti semula. Endapan yang didapat dilarutkan dalam volume kecil dengan dapar maleat 0,01 M Triss, pH 6,5.

Tahap akhir ialah dengan proses dialisis dari enzim yang belum murni dalam dapar maleat selama 40 jam pada suhu 2°C.

Perlakuan pada uji pola aktivitas dan kestabilan enzim fitase

Ekstrak enzim yang belum murni dari kecambah umur 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam, dan 120 jam, diinkubasikan pada berbagai variasi suhu dan waktu. Variasi suhu inkubasi masing-masing untuk suhu 27°C, 37°C dan 55°C. Sedangkan untuk masing-masing suhu tersebut dilakukan inkubasi selama 1 jam, 2 jam dan 3 jam.

Peneraan aktivitas enzim fitase dilakukan menggunakan metode asam askorbat (Watanabe dan Olsen, 1965). Pengujian aktivitas enzim fitase dengan mengukur kadar fosfat anorganik yang dibebaskan tiap satuan myu (10^{-6}) berat (gram) per BM (berat molekul) setiap ml enzim per menit (μ mol/ml enzim/per menit).

Percobaan

Percobaan ini dilakukan melalui dua tahap yaitu :

A. Tahap pengujian aktivitas enzim fitase (metode Watanabe dan Olsen, 1965).

Reaksi dilakukan dalam tabung yang mempunyai tutup dengan pemanasan di dalam tangas air dengan suhu $(57 \pm 1)^\circ\text{C}$. Total volume pengujian yang diisikan ke dalam tabung adalah 1,2 ml yang terdiri atas :

- 0,20 ml 0,6 M dapar asetat, pH 7,5 ; 0,60 ml 40 mM (m mol) natrium fitat pH 7,5 ; 0,20 ml enzim fitase; 0,20 ml akuades.

Selanjutnya diinkubasikan selama 30 menit dalam tangas air pada suhu $(57 \pm 1)^\circ\text{C}$, dan dilakukan deproteinisasi dengan menambah larutan asam triklorasetat (TCA) pekat kurang lebih 7,5 ml sehingga konsentrasi sekitar 0,7 M TCA. Proses terakhir disentrifus selama 15 menit dengan gaya 2.500. Supernatan yang diperoleh ditentukan kandungan ortofospat (fosfat anorganik).

Nilai aktivitas enzim fitase dikoreksi dengan menggunakan kontrol. Sebagai kontrol digunakan enzim belum murni yang dididihkan selama 10 menit.

B. Tahap penentuan kandungan fosfat anorganik (metode asam askorbat dari Watanabe dan Olsen, 1965).

Alikuot yang mengandung 1 - 20 μg ortofospat diambil sebanyak 1 ml, dan dimasukkan dalam erlenmeyer 25 ml. Selanjutnya ditambah akuades sampai volume 20 ml dan ditambah dengan reagen B sebanyak 4 ml, kemudian ditambah akuades sampai volume 25 ml.

Langkah selanjutnya adalah menentukan serapannya dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 829,6 nm. Menentukan transmisi dengan faktor koreksi blangko yang menggunakan akuades dengan ditambah 4 ml reagen B. Mempersiapkan kurve kalibrasi dengan cara memipet larutan yang mempunyai kadar fosfat anorganik yang telah diketahui (hasil pengenceran larutan fosfat baku). Spektrum serapan dari larutan baku selanjutnya dibuat grafik, sehingga kandungan fosfat anorganik dari sampel dapat dihitung.

Metode

Penelitian ini menggunakan 3 faktor yang masing-masing bertaraf 5,3 dan 3, sehingga dapat disusun secara faktorial. Faktor bertaraf 5 yaitu umur kecambah selama 24 jam, 48 jam,

72 jam, 96 jam dan 120 jam, sedangkan faktor bertaraf 3 adalah suhu (27°C, 37°C, 55°C) waktu inkubasi (1 jam, 2 jam, 3 jam).

Percobaan dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap (CRD/Complete Randomized Design). Data yang terkumpul diolah menurut analisis variansi (ANOVA), dan pengujian dilakukan dengan uji DMRT (Duncan Multiple Range Test) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

HASIL PENELITIAN

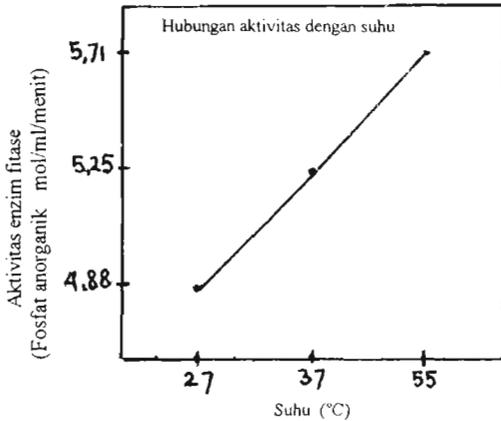
Hasil percobaan untuk penentuan aktivitas enzim fitase dari kecambah kacang hijau yang diperlakukan dengan inkubasi pada berbagai suhu dan waktu inkubasi, diperlihatkan dalam tabel 1.

Tabel 1. Aktivitas enzim fitase pada berbagai variasi suhu dan waktu inkubasi (fosfat anorganik µ mol/ml enzim/per menit).

Suhu (°C)	Umur kecambah															
	24			48			72			96			120			Rata-rata
	Waktu inkubasi															
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
27	4,97	4,86	4,84	4,50	4,88	4,76	4,84	4,96	5,36	4,90	4,78	5,11	4,91	4,71	4,83	4,88 ^a
37	5,28	5,40	5,70	5,16	4,87	4,92	5,36	5,30	5,50	4,96	4,88	4,86	4,87	5,26	6,34	5,25 ^b
55	5,05	6,45	5,77	4,97	5,39	6,12	5,20	5,69	6,03	5,17	6,24	6,00	5,02	6,28	6,21	5,71 ^c
Rata-rata tiap umur	5,37 ^a			5,07 ^a			5,36 ^a			5,21 ^a			5,38 ^a			
Rata-rata tiap waktu	1 jam			2 jam			3 jam									
	5,01 ^a			5,33 ^{ab}			5,49 ^b									

Keterangan Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf signifikasi 5% dan 1%.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa umur kecambah kacang hijau tidak berpengaruh terhadap aktivitas enzim fitase yang diinkubasikan pada berbagai suhu dan waktu.



Gambar 1. Pola kenaikan aktivitas enzim fitase dengan kenaikan suhu inkubasi.

Aktivitas enzim fitase naik secara linier dari suhu 27°C sampai suhu 55°C. Jadi dengan kenaikan suhu inkubasi tersebut menyebabkan kenaikan aktivitas enzim fitase.

PEMBAHASAN

Pengaruh suhu dan waktu

Umur kecambah kacang hijau tidak berpengaruh terhadap aktivitas enzim fitase. Hal ini karena pada lima macam (tingkat) umur perkecambahan kacang hijau masih merupakan satu sumber yang sama, sehingga enzim fitase yang ada memiliki aktivitas fitase yang sama selama perlakuan pada berbagai suhu waktu

inkubasi. Aktivitas enzim fitase berbeda tergantung pada sumber enzim³. Jadi dapat dikatakan aktivitas enzim fitase akan sama dalam satu jenis atau species tumbuhan, sebagai sumber enzim fitase.

Nilai aktivitas enzim fitase kecambah kacang hijau kecil apabila dibandingkan dengan kandungan asam fitat dalam biji kacang hijau. Hal ini dikarenakan tidak semua enzim fitase dapat aktif melakukan hidrolisa asam fitat selama proses perkecambahan. Ini sesuai dengan pernyataan bahwa asam fitat ada yang tidak menunjukkan adanya aktivitas enzim fitase.⁶ Bentuk asam fitat dalam biji mempengaruhi kemampuan hidrolisis dari enzim fitase, seperti fitase kecambah kacang hijau mempunyai hidrolisis asam fitat paling tinggi terhadap inositol pentafosfat (pH 6.6) dan inositol trifosfat (pH 7.5).⁷

Kebanyakan enzim menunjukkan aktivitas optimal pada kisaran suhu antara 30°C - 40°C⁸. Hasil penelitian menunjukkan adanya penyimpangan terhadap pernyataan tersebut untuk enzim fitase. Enzim fitase pada perlakuan inkubasi sampai dengan suhu 55°C masih menunjukkan aktivitas yang besar. Pada suhu 55°C enzim fitase belum mengalami denaturasi apoenzimnya sehingga suhu optimal untuk aktivitasnya berada di atas suhu tersebut. Hal ini sesuai dengan pernyataan bahwa suhu optimal untuk aktivitas enzim fitase pada kecambah kacang hijau 57°C.⁷ Suhu optimal yang tinggi untuk aktivitas enzim fitase merupakan karakteristik dari enzim ini.

Berdasarkan pada pernyataan tersebut dapat dikaitkan dengan sifat termostabil enzim pada suhu inkubasi yang tinggi. Kestabilan terhadap suhu optimal tinggi untuk aktivitas enzim fitase berkaitan dengan kestabilan protein kecambah kacang hijau terhadap pemanasan tinggi.

Pada perlakuan dengan pengaruh variasi inkubasi, tidak menurunkan aktivitas enzim. Hal tersebut karena reaksi enzimatik belum dihambat aktivitasnya oleh produk hasil hidrolisis asam fitat sehingga aktivitas enzim akan tetap tinggi mendekati maksimumnya, sebab substrat yang ada masih memungkinkan untuk diubah menjadi produk.

Pemanasan enzim fitase sampai dengan suhu 55°C belum menyebabkan inaktivasi enzim tersebut. Enzim fitase stabil pada suhu tinggi karena ikatan antara komponen penyusun enzim fitase yang ada terikat kuat dibanding ikatan pada enzim yang lain.

Berdasar pada hasil penelitian ini dapat diambil manfaat penting, yaitu mengetahui aktivitas serta sifat enzim fitase yang terdapat di dalam kecambah kacang hijau. Hal ini akan memberikan suatu masukan berupa pedoman dalam cara-cara pengolahan/memasak kecambah kacang hijau maupun kecambah yang lain sesuai dengan sifat biokimianya, menjadikan aktivitas enzim fitase tetap terjaga. Sehingga cara tersebut merupakan suatu upaya untuk mempertahankan nilai gizi dalam kecambah kacang hijau meskipun telah dilakukan berbagai perlakuan.

KESIMPULAN

Aktivitas enzim fitase dari berbagai umur kecambah kacang hijau dengan perlakuan inkubasi pada berbagai suhu dan waktu inkubasi yang sama menunjukkan pola aktivitas yang sama pula. Kenaikan suhu dan waktu inkubasi akan meningkatkan aktivitas enzim fitase kecambah kacang hijau. Aktivitas enzim fitase meningkat secara linier terhadap kenaikan suhu inkubasi dari suhu 27°C, 37°C sampai 55°C.

Enzim fitase merupakan salah satu enzim termostabil yang mempunyai aktivitas optimal pada suhu yang tinggi. Stabilitas enzim fitase tetap terjaga pada suhu inkubasi sampai 55°C selama waktu inkubasi 1 hingga 3 jam pada ekstrak kecambah kacang hijau.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada DR. Hari Hartiko, MSc. yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian ini. Demikian juga kepada Kepala Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran dan Kepala Laboratorium Analisis Kimia Pusat Universitas Gajah Mada Yogyakarta yang telah memberi ijin demi terselenggaranya penelitian ini.

DAFTAR RUJUKAN

- 1 Setyono, A. (1982). Aspek Pengurangan Fitat Dalam Kacang Hijau selama Pra Perkecambahan, Thesis Program S2 dalam Ilmu dan Teknologi Pangan UGM. Yogyakarta.

2. Evans, WJ, Dierce, AG. (1981). Calcium-phytate Complex Formation Studies. *J. Am. Oil. Chem Soc.* (58); 850.
3. Lolas, GM, Markakis, P. (1977). The Phytase of Navy Bean (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food. Sci.* 42 (10) : 94.
4. Chang, RS, Schimmer HK Buur (1977). Phytat : Removal From Whole Dry Beans by Enzymatic Hidrolisis and Diffusion. *J. Food. Sci.* 42 (4) : 1099.
5. Setyono, A. (1987). Perilaku asam Fitat Dalam Kedelai Pada Waktu Diolah. Disertasi Doktor dalam Ilmu dan Teknologi Pangan UGM. Yogyakarta.
6. Sutardi. (1988). Phytase Activity During Tempeh Production, Thesis Submitted for The Degree of Doctor of Phylosophy. Dept. of Food Science and Tecnology Science School. The University of New South Wales.
7. Mandal, NC, BB Wiswas. (1970). Metabolism of Inositol Phosphates, I Phytase Synthesis During Germination in Cotyledones of Mung Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant. Physiol.* (45) : 4-7.
8. Sutardi (1989). Bahan Pengajaran Biokimia Pangan. PAU Pangan Gizi UGM. Yogyakarta. hlm : 148-158.