

STUDI AWAL PROSES INAKTIVASI ENZIM LIPOKSIENASE UNTUK PRODUKSI TEPUNG BIJI KECIPIR SEBAGAI BAHAN BAKU TEPUNG KOMPOSIT

M. Endy Y¹, Dwi H¹, Fahmi A¹, Indah H², Erlangga¹, Ndaru Okvitarini dan Fiqih Putri J¹

¹Jurusan Teknik Kimia PSD III Teknik, UNDIP Semarang

²Jurusan Teknik Kimia, UNWAHAS Semarang

Jl. Prof Sudarto SH, Pedalangan Tembalang, Semarang 50239

e-mail : endy_y@yahoo.com

Astract

Soybean is known as source of protein. Soybean is also rich of nutrition such as minerals, vitamin B, complex carbohydrate and food fiber. Nevertheless central java is still lack of soybean. Winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* L) which its nutrition content is similar with soybean, is expected as the substitute of soybean. Winged bean can be used as source of protein by transforming it into composite flour which can be used as food product or edible film in food packaging. The usage of winged bean is limited, such as in tofu production. This is caused by strong bitter beany flavour of winged bean. The beany flavour is caused by the conversion of unsaturated fatty acid especially linoleate that catalyzed by lipoksigenase. In order to avoid the beany flavour, it's urge to find an appropriate method which able to extract the oil of winged bean in the low or zero activity of lipoksigenase. In order to avoid the conversion of hydroperoxide fatty acid, we need to develop an effective extraction method which inactivate the lipoksigenase and also separate the unsaturated fatty acid in winged bean. This research is used to develop process scheme of winged bean's oil thermal extraction, so we can produce flour of winged bean which is free of bitter beany flavour. The research was begins by designing and fabricate the enzymatics inactivation extractio, and followed by study the thermal extraction process parameter. The parameters of enzymatic inactivation extraction were ethanol concentration (75 – 95%) and pH (3-6). The samples of each variable were analyzed by using Ultra Violet Spectrophotometer. The Bio-extractor has been developed with multifunction, which were inactivating the lipoksigenase and extract the oil of winged bean. The higher solvent concentration, the unsaturated fatty acid concentration is lower, but at higher pH, the unsaturated fatty acid concentration is higher also.

Keywords: enzyme, flour, inactivation, winged bean,

PENDAHULUAN

Biji kedelai telah dikenal lama sebagai sumber protein yang kaya gizi antara lain mineral, vitamin B, karbohidrat kompleks dan serat makanan. Namun demikian kebutuhan kedelai di Jawa Tengah pada tahun 2008 sebanyak 351.000 ton belum terpenuhi karena produksinya hanya 126.000 ton sehingga masih ada kekurangan 225.000 ton. Berdasarkan data dari HKTI, impor kedelai untuk memenuhi kebutuhan Indonesia mencapai 45%.

Dari kenyataan tersebut, mengingat bahwa biji kecipir (*Psophocarpus tetragonolobus* L) mempunyai kandungan gizi yang hampir sama dengan kedelai (Tabel 1), maka diharapkan dapat sebagai pengganti untuk pemenuhan kebutuhan kedelai. Biji kecipir dapat dimanfaatkan sebagai sumber protein dengan dibuat tepung komposit yang dapat digunakan sebagai produk pangan maupun *edible film* pengemas makanan (Hastuti, dkk 2001). Namun demikian sampai saat ini pemanfaatan kecipir sangat terbatas misalnya pada pembuatan tahu dari biji kecipir (Ikhsan, 2000). Hal ini terjadi karena adanya **rasa dan bau langu** (*bitter beany flavour*) yang sangat kuat pada biji kecipir. Menurut Hastuti, dkk (2001) rasa langu tersebut disebabkan adanya asam lemak tidak jenuh terutama linoleat yang dikatalisa oleh **enzim lipoksigenase**.

Tabel 1. Perbandingan nilai gizi kecipir dengan kedelai

No.	Macam Zat Gizi	Kecipir	Kedelai
1.	Karbohidrat (gr)	23,9 – 42,0	34,8
2.	Protein (gr)	29,8 – 39,0	34,9
3.	Lemak (gr)	15,0 – 20,4	18,1
4.	Kalori (cal)	405	331
5.	Air (gr)	6,7 – 24,6	7,5

Beberapa metode telah dilakukan untuk menghilangkan rasa dan bau langu, guna menghasilkan produk dengan nilai ekonomis tinggi diantaranya berupa tepung kecipir. Metode yang dilakukan dengan cara mengurangi minyak dalam biji kecipir semaksimal mungkin melalui ekstraksi (Tadera, et al., 1983; Kantha, et al., 1986; Ikhsan, 1990; Hastuti, dkk., 2001). Namun demikian ekstraksi konvensional ini hanya mampu mengambil minyaknya saja. Sementara itu, rasa langu pada tepung kecipir, hanya tereduksi relatif kecil. Hal ini terjadi karena selama proses ekstraksi, dengan rusaknya jaringan, serta adanya asam lemak tidak jenuh terutama linoleat akan teroksidasi yang dikatalisa oleh enzim menjadi komponen-komponen individualnya yaitu asam lemak hidroperoksida (Hamberg, et al., 1967; Kim, et al., 1990; Casey, et al., 1998; Hughes, et al., 1998). Proses oksidasi tersebut diyakini dikatalisasi oleh enzim yang terdapat dalam tanaman itu sendiri yaitu enzim lipoksigenase (Waters, 1931; 1998; Garrote, et al., 2003; Schenk, et al., 2003).

Untuk mengatasi hal ini, perlu dicari metode guna mengekstraksi minyak dari biji kecipir pada kondisi dimana aktivitas enzim lipoksigenase minimal atau bahkan hilang. Dengan demikian reaksi oksidasi asam lemak tidak jenuh menjadi **asam lemak hidroperoksida** yang menyebabkan bau langu tidak akan terjadi. Oleh karenanya perlu pengembangan ekstraksi yang efektif guna menginaktivkan enzim lipoksigenase sekaligus pemisahan asam lemak tidak jenuh yang ada pada biji kecipir. Dengan dipisahkannya asam lemak tidak jenuh yang ada dalam biji kecipir tersebut diharapkan dapat diproduksi tepung kecipir yang terbebas dari rasa dan bau langu sebagai bahan baku tepung komposit. Disamping itu, asam lemak tidak jenuh maupun asam lemak jenuh yang tersingkir dari biji kecipir, dapat dimanfaatkan untuk produksi minyak secara komersial.

Garrote, et al pada tahun 2003 menyatakan bahwa aktivitas enzim lipoksigenase akan terhambat aktivitasnya melalui proses termal. Rangkaian asam amino pada enzim akan membentuk susunan tiga dimensi tertentu yang spesifik (struktur tersier). Bagian dari struktur tersier enzim yang bertanggung jawab terhadap aktivitas katalitik enzim disebut sisi aktif. Jumlah sisi aktif dari suatu enzim mencapai 10-20% dari volume total enzim (Bugg, 2004). Sisi aktif suatu enzim berupa suatu celah hidrofilik yang terdiri dari rangkaian rantai asam amino yang akan mengikat substrat. Diyakini bahwa kondisi proses termal, sisi aktif akan merubah struktur tersier sehingga enzim lipoksigenase mengalami *unfolding*. Yemencioaylu, et al pada tahun 1997 menyatakan bahwa pada kisaran suhu 55 °C, enzim lipoksigenase akan mengalami inaktivasi termal. Penambahan beberapa senyawa kimia juga dapat berakibat sama, diantaranya asam asetilenik mampu menghambat aktivitas enzim lipoksigenase (Hartmut, et al., 2005).

Alternatif yang ditawarkan pada proses produksi tepung kecipir yang terbebas dari rasa dan bau langu adalah dengan teknologi penginaktivan enzim lipoksigenase dan proses ekstraksi menggunakan ekstraktor inaktivasi enzim dengan pelarut alkohol (*alcoholic solvent extraction*). Pelarut polar pada kondisi termal akan berfungsi ganda, menginaktivasi enzim sekaligus mengekstrak minyak. Pelarut polar yang akan

digunakan adalah etanol. **Proses inaktivasi enzim menggunakan ekstraksi termal memiliki keunggulan**, karena dapat meringkas dua tahapan proses sekaligus, yaitu proses inaktivasi enzim lipoksigenase dan proses ekstraksi. Oleh karenanya, perlu pengembangan ekstraksi termal untuk inaktivasi enzim dan pengambilan minyak, sehingga bisa diproduksi tepung kecipir bebas rasa dan bau langu. Oleh karenanya perlu menela'ah rancangan proses dan sistem pemroses yang difokuskan pada aspek kondisi operasi ekstraksi inaktivasi enzimatis, sebelum proses ini diterapkan secara komersial.

Riset ini bertujuan untuk mengembangkan skema proses inaktivasi enzim lipoksigenase ekstraksi termal minyak yang ada dalam biji kecipir sehingga dapat diproduksi tepung kecipir yang terbebas dari rasa langu sebagai bahan baku tepung komposit. Disamping itu, asam lemak yang tersingkir dari biji kecipir, dapat dimanfaatkan untuk produksi minyak secara komersial. Inovasi mendasar pada riset ini adalah menggabungkan dua proses dalam satu tahap, yaitu inaktivasi enzim dan ekstraksi untuk menghasilkan tepung kecipir bebas rasa langu.

METODA PENELITIAN

Penelitian tentang inaktivasi enzim lipoksigenase dan ekstraksi minyak biji kecipir untuk produksi tepung kecipir sebagai tepung komposit diinvestigasi secara eksperimen.

Bahan dan alat percobaan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah: biji kecipir, etanol dan isopropanol dan bahan untuk analisa. Biji kecipir diperoleh dari sentra di Wonogiri Jawa Tengah. Sedangkan bahan-bahan kimia membeli dari PT. Bratachem di Semarang.

Alat utama dalam penelitian ini berupa bioekstraktor inaktivasi enzimatis. Alat yang digunakan untuk analisa meliputi: spektrofotometer ultra violet dan alat-alat analisa kadar air serta kadar protein.

Variabel Percobaan

Variabel-variabel percobaan pada ekstraksi inaktivasi enzimatis menggunakan teknik ekstraksi meliputi: konsentrasi etanol dan pH. Konsentrasi etanol ditetapkan pada rentang 75 – 95%, sedangkan pH ekstraksi ditetapkan pada 3 – 6.

Cara Penelitian

Butiran biji kecipir dimasukkan ke dalam tangki ekstraktor. Pelarut etanol dan isopropanol dengan konsentrasi tertentu diumpankan ke tangki. Pelarut mulai dialirkan dan dicatat sebagai $t = 0$. pH larutan dijaga pada kondisi tertentu dengan menggunakan buffer pH. Pada interval waktu tertentu sampel diambil dan dianalisis kadar minyaknya.

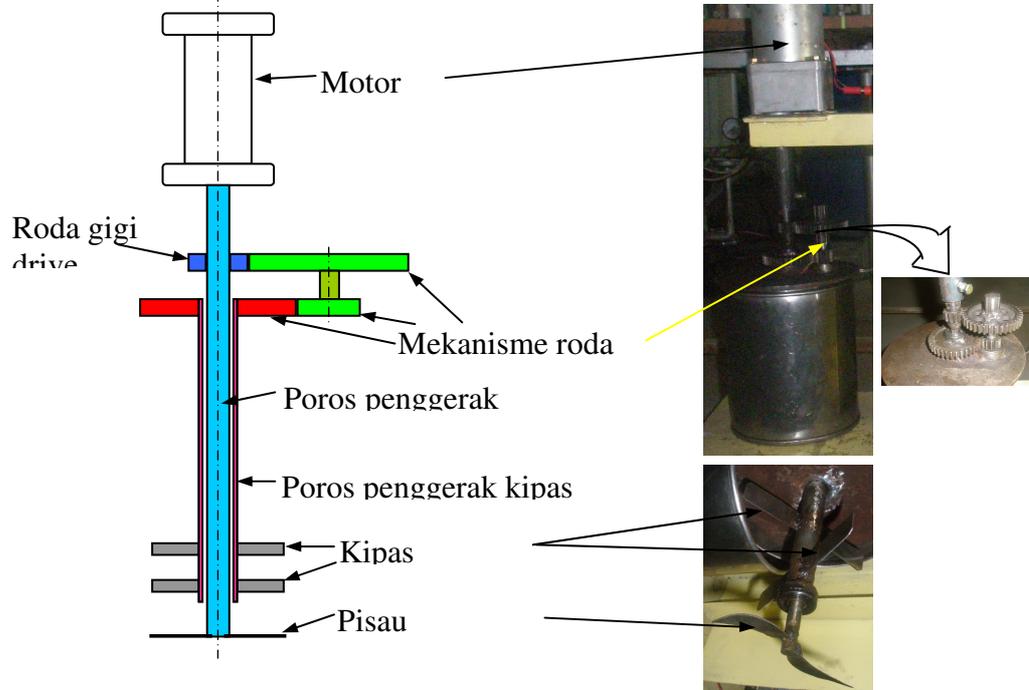
HASIL DAN PEMBAHASAN

Bioekstraktor inaktivasi enzimatis terdiri dari tangki ekstraktor, kolom recovery dan unit pengendali. Tangki ekstraktor terdiri dari motor penggerak, pisau penghancur, dan pengaduk. Kolom recovery untuk memisahkan pelarut, sehingga bisa digunakan lagi. Sedangkan unit pengendali terdiri dari pengatur kecepatan dan termokopel untuk mengukur temperatur.

Motor penggerak dipasang untuk memutar pisau penghancur dan roda gigi kecil secara langsung. Roda gigi kecil ini sebagai roda gigi penggerak pada mekanisme roda gigi sehingga mengakibatkan putaran pengaduk lebih kecil. Mekanisme roda gigi tersaji pada Gambar 1.

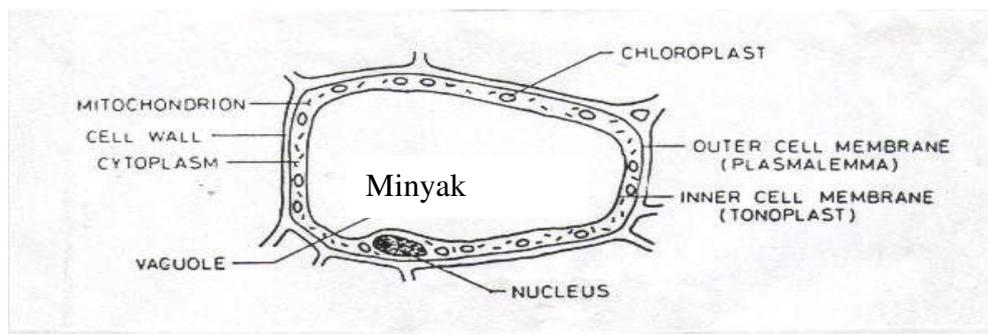
Ekstraksi biji kecipir menggunakan senyawa polar berupa etanol berfungsi ganda, yaitu menginaktivkan enzim lipoksigenase dan mengestrak minyak. Difusi etanol ke dalam biji kecipir (Gambar 2) bertujuan agar enzim lipoksigenase yang berada dalam

sitoplasma bepenetrasi dengan pelarut, sehingga menyebabkan aktivitas enzim terhambat. Pernyataan ini juga diungkapkan oleh Polev dkk bahwa aktivitas lipoksigenase terhambat dengan penambahan senyawa polar. Mekanisme selanjutnya bahwa pelarut etanol akan menyusup menembus dinding membran tonoplast dan terjadi kontak fasa dengan minyak. Pelarut polar tersebut akan mendifusi ke luar sel biji dengan membawa minyak. Hal ini disebabkan oleh perbedaan kelarutan.



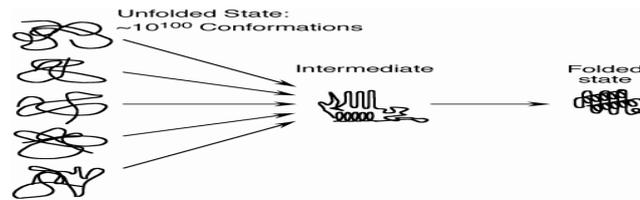
Gambar 1. Skema Penghancur dan Pengaduk pada bioekstraktor

Enzim merupakan suatu molekul raksasa dengan berat molekul yang bervariasi antara 5000 Da-5 juta Da. Enzim termasuk dalam kelompok makromolekul yang lebih besar yakni protein dan terdiri dari rangkaian rantai linear asam-asam amino spesifik.



Gambar 2. Sel biji kecipir

Pada kondisi optimumnya enzim akan mengalami proses folding. Proses terbentuknya susunan folding pada enzim merupakan proses spontan yang terjadi dalam hitungan detik (Bugg, 2004). Oleh karenanya, jika enzim lipoksigenase berada dalam keadaan folding, dan juga terjadi kerusakan pada membran tonoplast, mengakibatkan enzim tersebut mengkatalisis reaksi oksidasi asam lemak tak jenuh menjadi asam lemak hidroperoksida. Lipoksigenase termasuk kedalam sub kelas esterase karena lipoksigenase memecah ikatan ester pada minyak (Ribnicky, 2003). Hal ini yang menyebabkan rasa langu pada tepung biji kecipir.



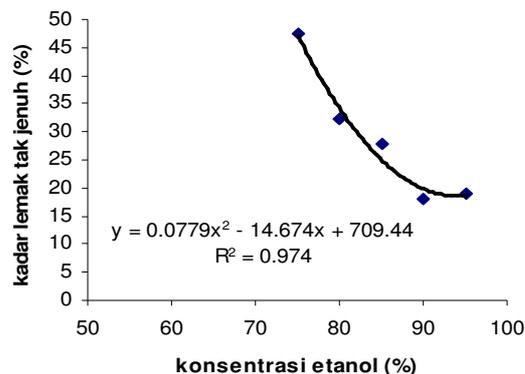
Gambar 3. Proses Folding

Rangkaian asam amino pada enzim akan membentuk susunan tiga dimensi tertentu dan spesifik (struktur tersier). Bagian dari struktur tersier enzim yang bertanggung jawab terhadap aktivitas katalitik enzim disebut sisi aktif. Jumlah sisi aktif dari suatu enzim mencapai 10-20% dari volume total enzim (Bugg 2004). Sisi aktif suatu enzim berupa suatu celah hidrofilik yang terdiri dari rangkaian rantai asam amino yang akan mengikat substrat atau mengikat suatu kofaktor dan mengkatalisis reaksi.

Proses folding (Gambar 3) pada enzim merupakan proses yang melibatkan masuknya rantai asam amino yang bersifat hidrofobik ke sisi bagian dalam enzim dan proses bergesernya rantai asam amino yang bersifat hidrofilik ke bagian luar dari susunan tiga dimensi enzim.

Variasi Pelarut Bioekstraksi Inaktivasi Enzim Lipoksigenase

Gambar 4 menyajikan hubungan antara konsentrasi etanol terhadap kadar lemak tak jenuh di fasa rafinat (tepung kecipir). Semakin besar konsentrasi pelarut, asam lemak tak jenuh yang terdapat pada tepung kecipir semakin menurun.



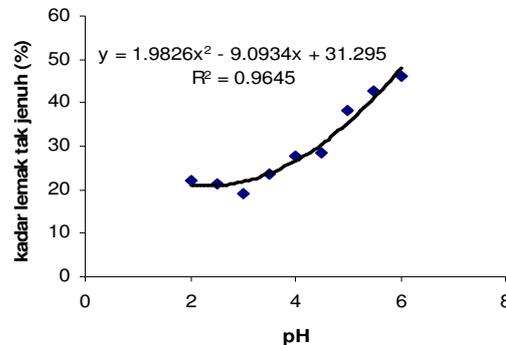
Gambar 4. Grafik hubungan konsentrasi etanol terhadap kadar lemak

Hal ini terjadi karena memperbesar konsentrasi pelarut berarti memperbesar fasa kontinyu, akibatnya fraksi volum fasa cair yang terdispersi semakin kecil dan diameter partikel juga mengecil. Dengan mengecilnya diameter partikel, maka akan memperluas kontak antar fasa yang disebabkan semakin meningkatnya solut yang terseret dalam fasa pelarut. Akan tetapi, peningkatan konsentrasi senyawa polar lebih lanjut menyebabkan perolehan asam lemak tak jenuh menurun. Hal ini dimungkinkan, pada konsentrasi etanol di atas 90%, menyebabkan sebagian diluen terikat ke fasa kontinyu karena terjadi peningkatan kelarutan.

Variasi pH Bioekstraksi Inaktivasi Enzim Lipoksigenase

Gambar 5 menunjukkan bahwa semakin besar pH ekstraksi, perolehan asam lemak tak jenuh pada tepung biji kecipir semakin meningkat. Hal ini bisa dijelaskan bahwa lipoksigenase merupakan jenis enzim oksidase, yang memiliki aktivitas optimum disekitar pH larutan asam lemah. Oleh karenanya, pada kondisi bioekstraksi basa lemah

menyebabkan enzim lipoksigenase mengalami *unfolding*, akibatnya akan mereduksi reaksi oksidasi asam lemak tak jenuh menjadi asam lemak hidroperosida yang dikatalisis oleh enzim lipoksigenase. Cheman dkk, 2006 menyatakan bahwa inaktivasi lipoksigenase pada kedelai adalah pada pH 3 dan dibawahnya.



Gambar 5. Grafik hubungan pH ekstraksi terhadap kadar lemak

SIMPULAN

Bioekstraktor inaktivasi enzimatik telah dikembangkan dengan fungsi ganda, yaitu menginaktivkan enzim lipoksigenase dan mengestrak minyak, sehingga dapat diproduksi tepung kecipir bebas rasa langu. Semakin besar konsentrasi pelarut pada proses ekstraksi, asam lemak tak jenuh yang terdapat pada tepung kecipir semakin menurun. Semakin besar pH ekstraksi, perolehan asam lemak tak jenuh biji kecipir semakin meningkat.

Saran

Produksi tepung biji kecipir melalui proses inaktivasi enzimatik sangat prospektif dan menjanjikan. Oleh karenanya, perlu studi lebih lanjut guna mendapatkan data-data teknis yang diperlukan untuk produksi tepung kecipir sebagai produk pangan secara komersial. Mengingat belum banyaknya produk biji kecipir dari petani, maka perlu adanya budidaya tanaman dan sosialisasi pemanfaatannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Bean, G.; Fernando, T., 1985, "Winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC) as a substrate for growth and aflatoxin production by aflatoxigenic strains of *aspergillus* spp", *Mycopathologia*, 90, 141-145.
- Cuddihy, A.E.; Bottino, P.J., 1982, "Winged-bean protoplasts: isolation and culture to callus", *Plant cell tissue organ culture* 1, 201-209.
- Ekpenyong, T.E.; Borchers, R.L., 1980, "The fatty acid composition of the oil of the winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* L.) seeds", *JAOCS*, 147-149.
- Garcia, V.V.; Palmer, J.K., 1979, "Fatty acid composition of the oil of winged beans, *psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC", *JAOCS*, Vol.56, 931-932.
- Gnoatto, S.C.B., Schenkel, E.P., and Bassani, V.L., 2005. HPLC Method to Assay Total Saponins in *Ilex Paraguariensis* Aqueous Extract. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. Vol. 16. no. 4. p. 1-9.
- Gupta, S.D.; Ahmed, R.; De, D.N.; 1997, "Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from seeding leaves of winged bean, *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC" *Plant cell Report*, 16, 628-631.
- Hanson, C., 1971. *Recent Advances in Liquid-Liquid Extraction*. Pergamon Press.
- Hughes, R.K.; Wu, Z.; Robinson, D.S.; Hardy, D; West, S.I.; Fairhurst, S.A.; Casey, R., 1998, "Characterization of authentic recombinant pea-seed lipoxygenases with distinct properties and reaction mechanism", *Biochem. J.*, 333, 33-43.

- Kantha, S.S.; Erdman, J.W., 1984, "The winged bean as an oil and protein source", *JAOCS*, Vol. 61, No.3, 515-525.
- Kim, M.R.; Sok, D.E, 1990, "Involvement of the unstable elcosanoids in self-inactivation of soybean lipoxygenase during incubation with arachidonic acid", *Korean Biochem. J.*, Vol.23, No.4, 478-485.
- Kuhn, H.; Holzhutter, H.G.; Schewe, T.; Hiebsch, C.; Rapoport, S.M., 2005, "The mechanism of inactivation of lipoxygenase by acetylenic acid fatty acids" *European journal of biochemistry*, Vol.139, Issue 3, 577-583.
- Schenk, G.; Neidig, M.L.; Zhou, J.; Holman, T.R., Solomon, E.I., 2003, "Spectroscopic characterization of soybean lipoxygenase-1 mutants: the role of second coordination sphere residues in the regulation of enzyme activity", *Biochemistry*, 42, 7294-7302.
- Tadera, K.; Taniguchi, T.; Teramoto, M.; Arima, M.; Yagi, F.; Kobayashi, A.; Nagahama, T., 1984, "Protein and starch in tubers of winged beans, *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC., and yam bean, *pachyrhizus erosus* (L.) urban" *Mem. Fac. Agr. Kogoshima Univ.*, 20, 73-81.
- www.freepatentsonline.com/4613672.
- www.freepatentsonline.com/7012149.
- Yemenicioaylu, A.; Azkan, M.; Velioaylu, S.; Cemeroaylu, B., 1998, "Thermal inactivation kinetics of peroxidase and lipoxygenase from fresh pinto beans (*Phaseolus vulgaris*)", *European food research and technology*, Vol. 206, 4, 294-296.