

BEBERAPA SIFAT ANTI-TRIP SIN BIJI KECIP IR

Oleh:

Zuheid Noor*)

Ringkasan

Untuk mempelajari sifat anti-tripsin biji kecipir, khususnya sifat inaktivasi pada beberapa pH, biji kecipir utuh direndam pada berbagai kombinasi kondisi pH (3, 5, dan 9), suhu (suhu kamar dan 60°C), dan lama perendaman (4, 8, dan 24 jam). Setelah perendaman, biji ditiriskan, dan air rendaman ditampung.

Hasil pengukuran aktivitas anti-tripsin pada biji dan air rendaman menunjukkan bahwa perendaman pH 3 suhu kamar meningkatkan aktivitas anti-tripsin dari 64,00 unit/mg menjadi 94,10; 72,28 dan 82,29 unit/mg berturut-turut pada lama perendaman 4, 8 dan 24 jam. Pemanasan 60°C sedikit menurunkan aktivitas anti-tripsin; penurunan aktivitas semakin besar dengan semakin lama waktu perendaman. Perendaman pH 5 pada semua kombinasi perlakuan mengakibatkan inaktivasi total aktivitas anti-tripsin, sedang perendaman pH 9 tidak menghasilkan inaktivasi sebagaimana diharapkan, menunjukkan bahwa anti-tripsin biji kecipir tahan terhadap perlakuan pH 9. Perembesan anti-tripsin kedalam air rendaman sedikit membantu penurunan aktivitas anti-tripsin dalam biji kecipir.

Uji biologikal menggunakan tikus putih memperkuat hasil pengamatan percobaan inaktivasi anti-tripsin biji kecipir ditinjau dari penurunan berat tikus, namun tidak diamati adanya kelainan pada pankreasnya, tetapi teramati adanya penurunan berat hati oleh sebab yang belum diketahui.

Pendahuluan

Penghambat protease yang telah diisolasi dari legum masuk kedalam dua kategori utama, kelompok pertama mempunyai berat molekul 20.000 sampai 25.000 dengan relatif sedikit ikatan disulfida dan spesifitas ditujukan terutama terhadap

tripsin-sapi (bovine tripsin), dikenal sebagai penghambat Kunitz, dan kelompok kedua mempunyai berat molekul hanya 6.000 sampai 8.000 dengan proporsi tinggi ikatan disulfida, dan mampu menghambat tripsin maupun khimotripsin (berkepala ganda) pada sisi terpisah, dikenal sebagai penghambat Bowman-Birk.

Anti-tripsin yang merupakan senyawa anti-gizi, banyak terdapat dalam kacang-kacangan (Borchers dkk. 1947, Borchers dan Ackerson 1950, Anantharaman 1969, Anantharaman dan Carpenter 1969, neucere 1972, de Lumon dan Salamat 1980), termasuk kecipir. Senyawa ini dapat mempengaruhi penggunaan protein dan metabolisme; pada ayam, anti-tripsin dapat menghambat proteolisis dalam usus karena terbentuknya kompleks tripsin-antitripsin yang tidak aktif, sehingga mengurangi level tripsin aktif. Sedang pada tikus, anti-tripsin dapat menaikkan kebutuhan asam amino yang mengandung sulfur (Kakade, 1974). Cama dan Morton (1950) melaporkan adanya senyawa anti-tripsin pada kacang tanah yang mengakibatkan kurangnya efisien penggunaan nitrogen yang telah diserap tubuh. Anson (1939-39), Lord dan Wakelam (1950) mendapatkan bahwa anti-tripsin kecele mempunyai efek menekan pertumbuhan tikus, sedang Anantharaman dan Carpenter (1969) menunjukkan bahwa anti-tripsin kacang tanah dapat mengakibatkan pembengkakan pankreas tikus.

Penghambat tripsin kecele Kunitz dan Bowman-Birk murni yang menghambat

*) Staf Pengajar Fakultas Teknologi Pertanian UGM.

khimotripsin lebih besar dari tripsin, juga memacu sekresi enzim pankreatik, memperbesar pankreas, dan menghambat pertumbuhan, tapi tidak separah bungkil kedele mentah. Penghambat tripsin dan khimotripsin lain menstimulasi pankreas dan menghambat pertumbuhan, termasuk lima beans, kidney beans, field beans, kentang, putih telur, dan penghambat tripsin buatan p-amino benzanat. Penghambat tripsin kacang tanah menghambat pertumbuhan tikus dan menyebabkan pankreatik hipertropi, sedang hyacinth beans dan jagung Opaque-2 tidak. Penghambat tripsin setengah murni telah diisolasi dari alfalfa, namun pengaruh nutrisi pada hewan belum diketahui. Jagung opaque-2, kulit beras, dan alfalfa secara relatif mengandung level tinggi anti-tripsin ditinjau dari kandungan proteinnya. Pada kentang yang dapat larut, dapat menghambat pertumbuhan ayam dan mengandung 58 unit penghambat tripsin per mg sampel, sedang tepung kedele bebas lemak mengandung 72 — 100 unit. Kolsistokinin (CCK), suatu hormon dalam mukosa usus duabelas jari yang mengatur digesti protein dan aktivitas pankreatik, juga mengakibatkan hipertropi pankreatik, menghambat pertumbuhan, dan menghambat tripsin. Penghambatan pertumbuhan hewan muda terjadi akibat kehilangan berlebihan protein yang disekresikan pankreas dalam feses. Karena enzim pankreatik kaya akan asam amino yang mengandung sulfur, kehilangan protein endogenous tidak dapat dikompensasikan oleh protein diet. Suplementasi diet bungkil kedele mentah dengan asam amino esensial akan menanggulangi penghambatan pertumbuhan, tapi tidak menghentikan hipertropi pankreatiknya.

Dari lima fraksi protein dalam pronase yang memiliki aktivitas proteolitik, hanya satu yang mempunyai aktivitas serupa tripsin dan

dapat dihambat penghambat Kunitz dan Bowman-Birk (Rackis 1972). Lebih lanjut dikatakan bahwa proteinase lain yang dapat dihambat penghambat Kunitz, antara lain kallikrein, faktor Xa esterase, kokoonase, tripsin udang, tripsin serum dan plasma manusia, sedang tripsin pankreas tidak dihambat. Penghambat tripsin juga tidak dapat menghambat tripsin "sea pansy", proteinase serupa tripsin bintang laut, esterase thrombin, dan aktivitas proteolitik larva *Tribolium*.

Pengaruh pH pada anti tripsin kedele, telah dilaporkan oleh Wallace *et al.* (1971), yang menunjukkan bahwa waktu yang diperlukan untuk menghancurkan secara sempurna anti tripsin pada suhu 98°C dalam susu kedele, berkurang dari 76 menjadi 11 menit, dengan cara menaikkan pH dari 6,8 ke 9,9. Baker dan Mustakas (1975) melaporkan, bahwa dengan penambahan NaOH, penonaktifan total anti tripsin diperoleh dalam waktu 15 menit pada suhu 195°F. Sedang apabila tanpa penambahan NaOH, diperlukan suhu 215°F. Lebih jauh mereka mengemukakan, bahwa dengan penambahan asam, pemanasan selama 15 menit pada suhu 180°F atau lebih, tidak mempengaruhi aktivitas anti tripsin. Penelitian Noor (1980) pada kacang tanah, juga menunjukkan ketahanan anti tripsin pada pH rendah. Pemanasan pada suhu 60°C selama 30 menit, aktivitas anti tripsin pada pH 6 ke bawah, sedikit lebih tinggi dibandingkan pada sampel yang tidak dipanaskan. Hal ini mungkin disebabkan karena pemanasan 60°C selama 30 menit pada pH 6 kebawah, mengakibatkan anti tripsin lebih mudah terekstraksi, atau kemungkinan dibebaskannya anti tripsin dari bentuk terikat yang tidak aktif, sebagaimana dilaporkan oleh Wang *et al.* (1972). Pemanasan 60°C selama 30 menit di atas pH 6, menurunkan aktivitas anti tripsin kacang tanah; ketidak-stabilan anti tripsin

terhadap pemanasan pada keadaan alkalis mungkin disebabkan karena adanya ikatan disulfida yang mudah dihidrolisis pada keadaan alkalis (Di Bella dan Liener 1968, Obara dan Watanabe, 1971; Rackis, 1972 dan Steiner, 1965).

Obara dkk. (1970) menyatakan bahwa anti-tripsin kedele sangat heterogen, terdiri atas paling sedikit sepuluh komponen. Fraksinasi menggunakan DEAE-Cellulosa Khromatografi, Obara dan Watanabe (1971) melaporkan bahwa berbagai fraksi anti-tripsin kedele mempunyai perbedaan kepekaan terhadap panas. Fraksi V paling tidak stabil, identik dengan penghambat Kunitz (Kunitz, 1946) dan anti-tripsin kedele A2 (SBTIA2) dari Rackis dan Anderson (1964). Fraksi IV1 dan IV2, keduanya adalah anti-tripsin kaya sistin, memiliki ketahanan sedang seperti halnya SBTIA1 dan SBTIB2 dari Rackis dan Anderson (1964). Fraksi II dan III adalah anti-tripsin miskin sistin, keduanya sangat stabil pada larutan asam. Obara dan Watanabe (1971) lebih lanjut menyatakan, walaupun berbagai fraksi anti-tripsin menunjukkan perbedaan kestabilan terhadap perlakuan panas pada berbagai keadaan asam, tapi umumnya semua tidak stabil pada suhu 70°C dalam larutan 0,1 NaOH.

Dari semua penghambat protease alami, anti-tripsin kedele merupakan yang paling intensif dipelajari dan merupakan protein yang secara biologikal aktif pertama yang diisolasi dari sumber nabati, sedang anti-tripsin lain belum banyak dipelajari, terutama anti-tripsin biji kecipir. Dalam penelitian ini telah dipelajari inaktivasi panas anti-tripsin biji kecipir pada berbagai pH, dan pengaruhnya pada tikus percobaan.

Bahan dan Cara Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan biji kecipir lokal yang dibeli dari pasar

Magelang, Jawa Tengah, di samping bahan-bahan kimia, antara lain: kasein (Art. 2241), agar murni (Art. 1613), sodium azide (Art. 6688) dari pabrik E. Merck Darmstadt Jerman, tripsin (Bovine Pancreas)-0346 p-L Biochemicals Inc., serta alat bantu lain.

Percobaan Inaktivasi anti-tripsin

Pertama-tama biji kecipir dibersihkan, kemudian dibagi menjadi sembilan belas kelompok, masing-masing sebanyak 100 g; dari delapan belas kelompok masing-masing direndam dalam kurang lebih 500 ml air, dengan kombinasi pH (3,5 dan 9) x suhu (suhu kamar dan 60°C) x waktu perendaman (4,8 dan 24 jam), sedang satu kelompok tanpa perlakuan. Percobaan dilakukan tiga kali ulangan. Masing-masing kelompok perlakuan seterusnya ditiriskan (air tirsan ditampung), dan dicuci sampai netral, dan dikering-anginkan, selanjutnya dianalisis kadar air (metode oven) dan aktivitas anti-tripsinnya (metode agar).

Hasil analisis aktivitas anti-tripsin kemudian ditabulasi dan dilakukan analisis variansi, dan apabila bermakna, diteruskan dengan uji DMRT (Duncan Multiple Range Test).

Hasil percobaan inaktivasi anti-tripsin akhirnya dievaluasi, untuk ditentukan perlakuan yang akan diuji lebih lanjut dengan uji biologikal (Bioassay) menggunakan tikus percobaan untuk konfirmasi hasil percobaan inaktivasi anti-tripsin biji kecipir.

Perlakuan yang dipilih adalah perlakuan moderat yang menghasilkan inaktivasi cukup besar dan perlakuan setaranya, di samping tanpa perlakuan sebagai kontrol.

Uji Biologikal (Bioassay)

Biji kecipir dari kelompok perlakuan ter-

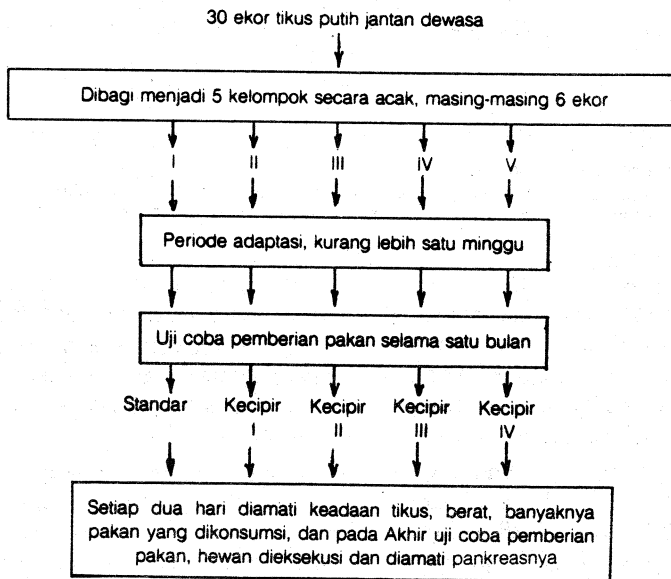
pilih, diambil untuk dianalisis komposisi kimia: protein (metode Kjeldahl), lemak (metode ekstraksi Soxhlet), dan abu (metode ignisi muffle furnace), untuk digunakan sebagai dasar penyusunan pakan percobaan setelah dikeringkan dan digiling (AOAC, 1970 dan Pellet *et al.*, 1980).

Setelah diperoleh campuran pakan, seterusnya dilakukan uji coba pemberian pakan pada 30 ekor tikus putih jantan dewasa jenis Wistar dengan berat sekitar 200 g, yang dibagi menjadi lima kelompok masing-masing 6 ekor tikus (gambar 1). Pemberian pakan dilakukan secara paksa (*force feeding*), karena tikus tidak mau makan secara sukarela.

Hasil dan Pembahasan

Dari percobaan inaktivasi anti-tripsin biji kecipir, diperoleh data seperti tertera pada Tabel 1.

Dari tabel 1, terlihat bahwa pH 5 merupakan pH perendaman yang efektif untuk menonaktifkan anti tripsin biji kecipir. Perendaman selama 4 jam pada suhu kamar sudah cukup menonaktifkan total kandungan anti tripsin biji kecipir. Pemanasan pada suhu 60°C dan perendaman yang lebih lama, mengakibatkan sedikit perembesan anti tripsin keluar dari kecipir (0,10 — 0,15 unit per mg. D.B. biji kecipir).



Gambar 1. Skema percobaan pemberian pakan

Perendaman pH 3 pada suhu kamar, mengakibatkan kenaikan aktivitas anti-tripsin dari 64,00 unit/mg. D.B. kecipir segar menjadi berturut-turut 94,10 unit/mg. D.B., 72,28 unit/mg. D.B., dan 82,34 unit/mg. D.B. pada

lama perendaman 4, 8, dan 24 jam. Kenaikan aktivitas anti tripsin biji kecipir ini mungkin akibat adanya pembebasan anti-tripsin terikat yang tidak aktif akibat perendaman pH 3. Keadaan serupa, telah pula

Tabel 1. Pengaruh perendaman pada aktivitas anti-tripsin biji kecspir dan air tirisannya

Perendaman			Kadar Air (%)	Aktivitas Anti-tripsin ^{*)}	
pH	Suhu	Waktu, jam		Biji	Air Tirisan
	Tanpa Perendaman		11,90	64,00 ^{h)}	—
3	SK	4	38,15	94,10 ^{k)}	t.t.
3	60°C	4	48,27	82,35 ^{l)}	0,29
3	SK	8	48,81	72,28 ^{m)}	t.t.
3	60°C	8	53,34	58,29 ⁿ⁾	0,29
3	SK	24	51,18	82,29 ^{g)}	0,27
3	60°C	24	55,45	32,77 ^{d)}	0,17
5	SK	4	28,02	t.t.a)	0,28
5	60°C	4	51,21	t.t.a)	0,10
5	SK	8	47,70	t.t.a)	t.t.
5	60°C	8	52,72	ta)	0,15
5	SK	24	53,31	t.ta)	0,10
5	60°C	24	56,18	t.ta)	0,10
9	SK	4	22,29	36,03 ^{e)}	t.t.
9	60°C	4	43,20	41,55 ^{f)}	0,44
9	SK	8	26,04	35,42 ^{e)}	0,44
9	60°C	8	53,22	14,96 ^{c)}	0,17
3	SK	24	46,15	31,57 ^{d)}	t.t.
3	60°C	24	55,82	11,32 ^{d)}	0,15

*) Unit tripsin yang dihambat/mg biji kecspir (DB)

SK = suhu kamar; t.t. = tidak terdeteksi; angka yang mempunyai huruf sama tidak berbeda nyata.

dilaporkan oleh Wang *et al.* (1972) pada kedele, dan Noor (1980) pada kacang tanah. Perendaman yang lebih lama, tidak menaikkan banyaknya anti-tripsin yang dibebaskan. Sedang pemanasan 60°C selama perendaman pada pH 3, hanya sedikit menurunkan aktivitas anti-tripsin, yaitu dari 94,10 menjadi 82,35 unit/mg. D.B. pada lama perendaman 4 jam, dari 72,28 menjadi 58,29 unit/mg. D.B. pada lama perendaman 8 jam, dan dari 83,34 menjadi 32,77 unit/mg. D.B. pada lama perendaman 24 jam, di samping adanya sedikit perembesan anti-tripsin keluar biji, berturut-turut sebesar 0,29; 0,27; dan 0,28 unit/mg. D.B. pada lama perendaman 4, 8, dan 24 jam.

Perendaman pH 9, tidak menghasilkan penonaktifan anti-tripsin yang memuaskan.

Kestabilan anti-tripsin biji kecspir pada pH 9 adalah diluar dugaan, mengingat umumnya anti-tripsin tidak stabil pada perlakuan alkalis karena adanya ikatan disulfida yang mudah dihidrolisis pada keadaan alkalis (Obara dan Watanabe, 1971).

Karena perendaman biji kecspir pH 5 selama 4 jam pada suhu kamar dapat menonaktifkan total aktivitas anti-tripsin, maka kondisi ini dipilih untuk diuji lebih lanjut dengan uji biologikal. Dan perlakuan setaranya kamar.

Dari analisis proksimat dan anti-tripsin biji kecspir dengan berbagai perlakuan, diperoleh data seperti terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. **Komposisi kimia biji kecipir**

Komponen	Biji Kecipir			
	Tanpa Perlakuan	pH 3	pH 5	pH 9
Air, %	12,72	12,02	12,69	12,29
Protein, R db	33,96	32,37	32,59	33,30
Lemak, % db	16,11	17,54	16,31	16,77
Karbohidrat, % db	32,98	33,67	34,46	33,51
Abu, % db	4,24	4,10	3,95	4,14
Anti-tripsin, * unit/mg DB.	64,00	94,10	t.t	36,03

*) Dari Tabel 1.

Tabel 3. **Susunan untuk setiap 6000 g pakan tikus**

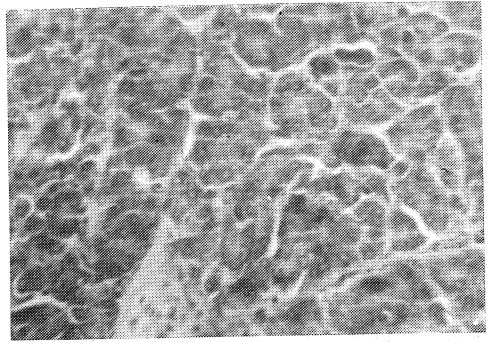
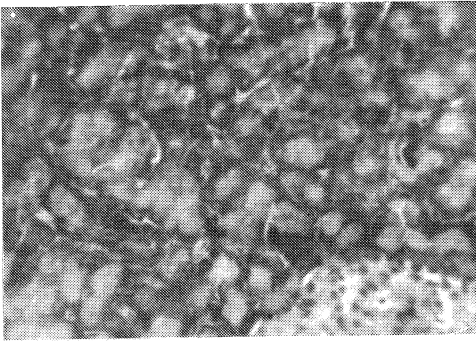
Unsur	Standar	Pakan (6000 g)			
		Tanpa Perlakuan	Kecipir		
			pH 3	pH 5	pH 9
Kecipir, g	—	3.533	3.533	3.533	3.533
Kasein, gg	1.200	—	57	49	24
+ Minyak, g	620	51	—	44	28
+ Air, g	450	—	25	2	16
+ Camp. garam, g	300	151	155	160	154
+ Camp. Vitamin, g	60	60	60	60	60
+ Karbohidrat, g	3.370	2.205	2.170	2.152	2.185

Dari hasil analisis biji kecipir ini, kemudian diformulasikan berbagai pakan dengan susunan seperti terlihat pada Tabel 3.

Beberapa peneliti telah melaporkan bahwa adanya anti-tripsin dalam pakan dapat mengakibatkan pembengkakan pankreas tikus. Oleh sebab itu, dalam penelitian ini telah diamati pankreas tikus pada akhir uji coba pemberian pakan, sebagai salah satu tolok ukur ada tidaknya anti-tripsin dalam pakan percobaan. Karena sulitnya memisahkan keseluruhan pankreas tikus dari

jaringan lain, maka, pengukuran berat, panjang, lebar, serta tebal pankreas tikus terpaksa tidak jadi dilaksanakan. Sebagai ganti, dilakukan pengamatan histologis pankreas tikus, dengan hasil seperti terdapat pada Gambar 2 dan Gambar 3.

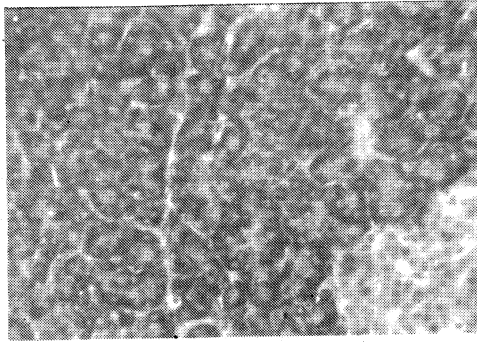
Setelah dikonsultasikan dengan ahli dari Fakultas Kedokteran Hewan UGM, diperoleh keterangan bahwa tidak ditemukan adanya kelainan pada jaringan dari semua preparat pankreas yang dibuat dari tikus yang diberi pakan standar, kecipir tanpa perlakuan,



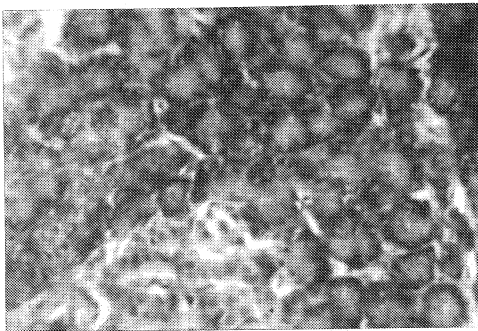
(A)

Gambar 2. Gambar foto histologis pankreas tikus yang diberi pakan standar (A); pakan biji kecspir tanpa perlakuan (B)

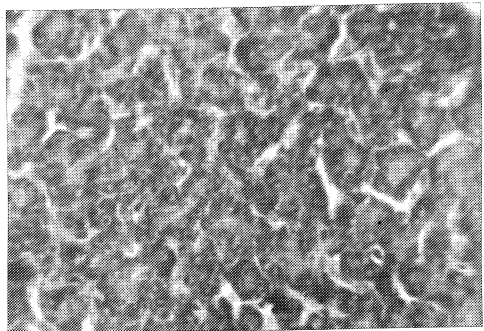
(B)



pH 3 (A)



pH 5 (B)



pH 9 (C)

Gambar 3. Gambar foto histologis pankreas tikus yang diberi pakan biji kecspir pH 3 (A); pH 5 (B); pH 9 (C)

kecipir pH 3, kecipir pH 5, maupun kecipir pH 9, sampai dengan hari ke 28. Keadaan ini mungkin disebabkan karena periode uji coba pemberian pakan selama 28 hari tidak cukup lama untuk memberi pengaruh pankreas hipertropi, baik karena rendahnya level anti-tripsin yang ada dalam pakan, maupun karena pendeknya waktu uji coba. Beberapa pakar menyatakan, bahwa paling sedikit diperlukan waktu tiga bulan dengan level anti-tripsin cukup untuk menghasilkan pankreas hipertropi; tidak disebutkan berapa level anti-tripsin yang dianggap cukup dalam hal ini. Namun demikian, dalam penelitian ini, nampaknya tidak mungkin dilakukan uji coba pemberian pakan lebih dari 28 hari, karena sebagian besar tikus percobaan telah mati (Tabel 2).

Indikasi kematian akibat langsung pemberian pakan secara paksa, nampaknya tidak ada, karena kematian demikian akan dengan segera dapat diketahui, dengan matinya hewan percobaan segera setelah pemberian pakan. Namun demikian, tidak boleh dikesampingkan kemungkinan kematian akibat tidak langsung pemberian pakan secara paksa; antara lain, stress dan iritasi berlebihan yang berkelanjutan.

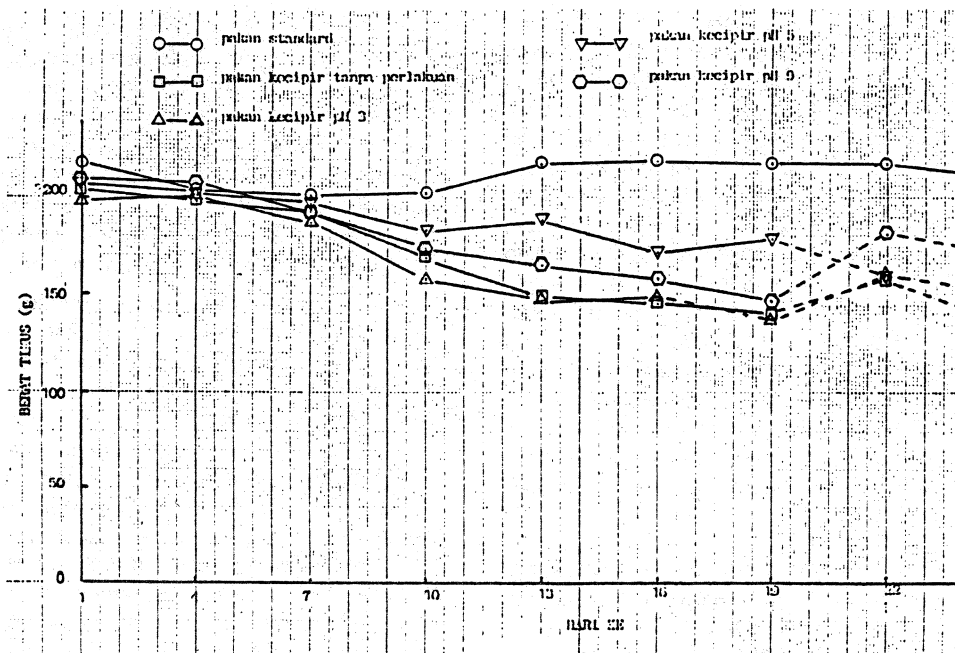
Ti adanya kelainan histologis pada pankreas tikus, mungkin juga disebabkan karena anti-tripsin kecipir tidak menghambat tripsin pankreas tikus sebagaimana dinyatakan oleh Rackis (1972) yang mengemukakan, bahwa tidak semua anti-protease menghambat tripsin pankreas. Namun demikian, hal ini masih perlu dikonfirmasi lebih lanjut, meskipun tidak boleh dikesampingkan.

Data berat badan selama periode uji coba pemberian pakan, merupakan salah satu indikasi dapat tidaknya pakan tersebut memenuhi kebutuhan hidup hewan percobaan. Banyak peneliti menyatakan bahwa adanya anti-tripsin dalam pakan dapat mempengaruhi penggunaan protein dan metabolisme tubuh. Pada tikus, anti-tripsin dapat menaikkan kebutuhan asam amino yang mengandung sulfur (Kakade, 1974), menekan pertumbuhan (Anantharaman dan Carpenter, 1969). Data berat badan tikus yang diberi berbagai pakan, tertera pada Tabel 4 dan Gambar 4.

Dari Tabel 4 dan Gambar 4 terlihat bahwa tikus yang diberi pakan standar, meskipun mengalami sedikit penurunan berat badan, khususnya pada awal periode uji coba pemberian pakan, ternyata masih di

Tabel 4. Rata-rata berat badan tikus yang diberi pakan selama periode uji coba pemberian pakan (28 hari)

Pakan	Berat (g), pada hari ke									
	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28
1. Standar	219	205	202	203	218	219	218	218	210	216
2. Kecipir tanpa perlakuan	204	199	193	169	149	145	139	—	—	—
3. Kecipir pH 3	199	201	186	158	148	—	—	—	—	—
4. Kecipir pH 5	206	202	197	183	188	171	—	—	—	—
5. Kecipir	209	208	192	173	165	158	146	—	—	—



Gambar 4. Berat tikus selama uji coba pemberian pakan

atas tikus yang diberi pakan biji kecipir. Penurunan berat badan tikus yang diberi pakan standar ini, mungkin akibat sedikitnya konsumsi pakan. Hal ini adalah akibat terbatasnya kemampuan tikus untuk diberi pakan secara paksa. Pemberian pakan secara paksa lebih sering dari tiga kali sehari, dapat mengakibatkan iritasi dan stress berlebihan.

Penurunan berat yang lebih banyak pada tikus yang diberi pakan biji kecipir dibandingkan dengan tikus yang diberi pakan standar, menunjukkan bahwa kualitas pakan biji kecipir lebih rendah dari pakan standar. Keadaan ini dapat dimengerti, mengingat kecipir merupakan bahan nabati, lebih-lebih apabila bahan tersebut mengandung senyawa anti-gizi seperti anti-tripsin, sebagaimana dilaporkan banyak peneliti, yang menyatakan bahwa anti-tripsin

dapat menurunkan efisiensi penggunaan protein serta menekan pertumbuhan.

Pengamatan lebih seksama pada penurunan berat tikus yang diberi pakan biji kecipir yang telah diperlakukan pada berbagai pH, menunjukkan kesesuaian dengan data inaktivasi anti-tripsin biji kecipir (Tabel 1), meskipun tidak terlalu tegas. Dari Gambar 4, dapat diantisipasi bahwa pakan biji kecipir pH 5, sedikit lebih baik apabila dibandingkan dengan pakan biji kecipir tanpa perlakuan dan pH 3, sedang pakan biji kecipir pH 9 terletak antara pakan biji kecipir pH 5 dan pakan biji kecipir tanpa perlakuan. Pakan biji kecipir tanpa perlakuan dan pakan biji kecipir pH 3 sangat mirip satu sama lain. Yang menjadi pertanyaan sekarang, mengapa tikus yang diberi pakan kecipir, khususnya kecipir tanpa perlakuan, pH 3, dan pH 9, tidak menunjukkan pembengkakan

an pankreas, namun terjadi penurunan berat badan dan seterusnya mati. Demikian juga tikus yang diberi pakan kecipir pH 5 yang seharusnya bebas anti-tripsin.

Nampaknya, penyebab utama penurunan berat dan kematian tikus adalah rendahnya intake pakan dan cara pemberian pakan secara paksa; kedua hal ini saling berkaitan satu sama lain. Pendapat ini didukung oleh kenyataan, bahwa tikus yang diberi pakan standar juga mengalami penurunan berat. Gambar 4 mengisyaratkan, bahwa sampai hari ke 10, terjadi penurunan berat tikus cukup tajam, namun setelah hari ke 10, tikus mulai dapat menyesuaikan diri dengan cara pemberian pakan secara paksa yang digunakan, ditunjukkan oleh mulai pulihnya kembali berat tikus kearah berat badan semula pada tikus yang diberi pakan standar. Namun demikian, rendahnya kuantitas pakan yang dapat diberikan dengan cara ini, tidak dapat menunjang tuntutan kebutuhan unsur gizi tubuh tikus, lebih-lebih apabila kuantitas pakannya rendah, ditambah adanya zat anti-gizi pada pakan kecipir yang tidak diperlakukan, pH 3, dan pH 9.

Sedang tidak terdapatnya pembengkakan atau kelainan pankreas, pada tikus yang diberi beberapa pakan kecipir, mungkin disebabkan oleh rendahnya level anti-tripsin dalam pakan, dan atau singkatnya waktu uji coba pemberian pakan. Kemungkinan lain, anti-tripsin biji kecipir tidak berinteraksi dengan tripsin pankreas tikus, meskipun mungkin dapat berinteraksi dengan tripsin lain, sebagaimana dikemukakan oleh Rackis (1972) pada berbagai anti-tripsin dan hewan percobaan lain. Di samping itu, tidak boleh dikesampingkan kemungkinan efek merugikan unsur lain dalam biji kecipir yang belum diketahui, yang memberikan pengaruh pengecilan hati yang dapat diamati pada Tabel 5.

Tabel 5. Berat hati tikus (g) yang diberi berbagai pakan

Pakan	Berat Hati, g
Standar	8,14
Kecipir tanpa perlakuan	3,71
Kecipir pH 3	5,39
Kecipir pH 5	5,65
Kecipir pH 9	5,70

Dari data berat hati tikus, terlihat adanya kecenderungan pengecilan hati tikus yang diberi pakan kecipir. Penyebab kecenderungan ini, serta kemungkinan penyebab kematian, belum diketahui, mengingat eksplorasi lebih lanjut kearah ini diluar lingkup penelitian ini.

Kesimpulan dan Saran

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa perendaman biji kecipir utuh pada pH 3, suhu kamar, meningkatkan aktivitas anti-tripsin, namun pemanasan 60°C dapat sedikit menurunkan; penurunan aktivitas anti-tripsin semakin besar dengan semakin lama waktu perendaman. Perendaman dalam pH 5 pada semua kombinasi perlakuan, mengakibatkan inaktivasi total aktivitas anti-tripsin biji kecipir, sedang perendaman pada pH 9 tidak menghasilkan total inaktivasi sebagaimana diharapkan, namun masih terdapat aktivitas anti-tripsin cukup berarti, yang menunjukkan anti-tripsin biji kecipir tahan terhadap perlakuan pH 9. Penurunan aktivitas anti-tripsin biji kecipir selama perendaman di samping akibat inaktivasi, juga disebabkan oleh perembesan keluar sebagian kecil anti-tripsin. Ditinjau dari pola inaktivasi anti-tripsin biji kecipir pada berbagai pH yang diukur dengan metode agar, nampak bahwa anti-tripsin biji kecipir berbeda dengan sifat umum anti-tripsin yang telah dilaporkan oleh peneliti terdahulu.

Pengamatan ini diperkuat oleh uji biologikal menggunakan tikus percobaan meskipun tidak begitu tegas, namun kecenderungan penurunan berat tikus sesuai dengan kecenderungan inaktivasi anti-tripsin pada pH yang digunakan. Di lain pihak, tidak diamati adanya kelainan pankreas tikus yang diberi pakan biji kecipir, akan tetapi teramati adanya penurunan berat hati. Karena penurunan berat hati ini juga diamati pada tikus yang diberi pakan biji kecipir pH 5, maka penurunan berat hati ini diduga bukan disebabkan oleh adanya anti-tripsin, akan tetapi disebabkan oleh faktor lain selain anti-tripsin yang belum diketahui.

Dari pengamatan ini, perlu dikaji lebih mendalam anti-tripsin biji kecipir, antara lain pemetaan urutan asam aminonya dan uji biologikal anti-tripsin yang telah dimurnikan, untuk menghindari komplikasi, agar dapat dipastikan apakah anti-tripsin biji kecipir tersebut benar-benar berbeda dari anti-tripsin Kunitz dan Bowman-Birk apa tidak.

Daftar Acuan

- Anantharaman, K. (1969). Trypsin-Inhibitory and Growth Depressing Activities of Groundnut Skins. *Proc. Nutr. Sec.*, 28 (2): 46A.
- Anantharaman, K., and Carpenter, K. J. (1969). Effect of heat processing on the Nutritional Value of Groundnut Products. I. Protein Quality of Groundnut Cotyledons for Rat. *J. Sci. Food Agr.*, 20(12): 703.
- Anson, M. L. (1936—39). The Estimation of Pepsin, Trypsin, Papain, and Cathepsin with Hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 22(1): 703.
- AOAC (1970). Official Method of Analysis of Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- Baker, E. C., and Mustakas, G. C. (1973). Heat Inactivation of Trypsin Inhibitor, Lipoxygenase, and Urease in Soybeans: Effect of Acid and Base additives. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 50(5): 137.
- Borchers, R., and Ackerson, C. W. (1950). The Nutritive Value of Legume Seeds. X. Effect of Autoclaving and the Trypsin Inhibitor Test for 17 Species. *J. Nutr.*, 41(2): 339.
- Borchers, R., Ackerson, C. W., and Kimmett, L. (1947). Trypsin Inhibitor. IV. Occurrence in Seeds of the Leguminosae and Other Seeds. *Arch. Biochem.*, 13(2): 291.
- Brown, J. R., Lerman, N., and Bohak, Z. (1966). The Amino Acid Sequences around the disulfide bonds of soybean trypsin inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 23(4): 561.
- Cama, H. R., and Morton, R. A. (1950). Changes occurring in the proteins as a result of processing groundnuts under selected industrial conditions. 2. Nutritional changes. *Brit. J. Nutr.*, 4(4): 297.
- de Lumon, B. O., and Salamat, L. A., (1980). Trypsin Inhibitor activity in Winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) and the possible role of tannin. *J. Agr. Food Chem.*, 28(3): 533.
- Dibella, F. P., and Liener, I. E., (1969). Soybean trypsin inhibitor. Cleavage and identification of a disulfide bridge not essential for activity. *J. Biol. Chem.*, 244(11): 2824.
- Kakade, M. L., (1974). Biochemical basis for the differences in plant protein utilization. *J. Agr. Food Chem.*, 22(4): 550.
- Kunitz, M. (1946). Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor. I. Methode of Isolation. *J. Gen. Physiol.*, 29(3): 149.

- Kakade, M. L. (1974). Biochemical Basis for the Differences in Plant Protein Utilization. *J. Agr. Food Chem.*, 22(4): 550.
- Kunitz M. (1946). Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor. I. Method of Isolation. *J. Gen. Physiol.*, 29(3): 149.
- Lord, J. W. and Wakelam, J. A. (1950). Changes Occuring in The Protein As A Result of Processing Groundnuts Under Selected Industrial Conditions. 1. Physical and Chemical Changes. *Brit. J. Nutr.*, 4(2 & 3): 154.
- Neucere, N. J., Conkerton, E. J. and Booth, A. N. (1972). Effect of Heat on Peanut Proteins. II. Variations in Nutritional Quality of the Meals. *J. Agr. Food Chem.*, 20(2): 256.
- Noor, Z. (1980). Effect of pH Manipulation During Aqueous Extraction of Peanut Protein. Ph. D. Thesis. University of Illinois at Urbana Champaign.
- Obara. T., Kimura-Kobayashi, M., Kobayashi, T., and Watanabe, Y. (1970). Heterogeneity of Soybean Trypsin Inhibitor. I. Chromatographic Fractionation and Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Cereal Chem.*, 47(5): 597.
- Obara, T. and Watanabe, Y. (1971). Heterogeneity of Soybean Trypsin Inhibitors. II. heat Inactivation *Cereal Chem* 48(5): 523.
- Ozawa, K., and Laskowski, M., Jr., (1966). The reactive site of trypsin inhibitors. *J. Biol. Chem.*, 241(17): 3955.
- Pellet, P. L. and Young, V. R. (1980). Nutrition evaluation of Protein Foods. The United Nations University, Japan.
- Rackis, J. J. (1972). Biologically Active Components in Soybean: Chemistry and Technology, Vol. 1, A. K. Smith and S. J. Circle, eds. Westport, Connecticut: The AVI Publishing Co., Inc.
- Rachis, J. J. and Anderson, R. L. (1964). Isolation of Four Soybean Trypsin Inhibitors by DEAE - Cellulose Chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 15(3): 230.
- Steiner, R. F. (1965). The Reduction and Reoxidation of the Disulfide Bonds of Soybean Trypsin Inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta* 100(1): 2877.
- Wallace, G. M., Bannatyne, W. R., and Khaleque, A. (1971). Studies on the Processing and Properties of Soymilk. II. Effect of Processing Conditions the Trypsin Inhibitor Activity and Digestibility in vitro of Proteins in Various Soymilk Preparations. *J. Sci. Food Agr.*, 22(10): 526.
- Wang, H. L., Vespa, J. B., and Hesseltine, C. W. (1972). Release of Bound Trypsin Inhibitors in Soybeans by *Rhizopus oligosporus*. *J. Nurt.*, 102(11): 1495.