

AKTIVITAS TRIPSIN INHIBITOR SELAMA PROSES PEMBUATAN TEMPE KARA BENGUK (*Mucuna pruriens*), KACANG TOLO (*Vigna unguiculata*), DAN GUDE (*Cajanus cajan*)

Oleh:

Tranggono^{*)}, Sutardi^{*)} dan Bambang Kuswijyanto^{**})

Abstrak

Penelitian aktivitas tripsin inhibitor yang diukur dengan metoda agar dilakukan pada tahapan proses pembuatan tempe kara benguk, tempe kacang tolo dan tempe gude dengan menggunakan inokulum *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 dan inokulum usar.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas tripsin inhibitor pada masing-masing kacang-kacangan tersebut mempunyai kecenderungan pola yang sama. Penurunan aktivitas tripsin inhibitor sebanyak 91 — 97% terjadi selama tahapan proses perendaman, pengupasan kulit dan pengukusan, sedangkan selama fermentasi terjadi peningkatan sebesar 45 — 72% terhadap aktivitas semula. Aktivitas tripsin inhibitor tempe yang dibuat dengan inokulum murni *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 berkisar 1,3 — 3 kali lebih besar daripada tempe dengan inokulum usar.

Pendahuluan

Biji kacang-kacangan seperti kara benguk, kacang tolo, dan gude merupakan hasil tanaman yang mempunyai potensi sebagai sumber protein nabati dan belum banyak dimanfaatkan. Menurut NAS (1975) dan Martin (1978) biji kacang-kacangan mengandung senyawa anti gizi berupa tripsin inhibitor yang apabila dikonsumsi dapat menurunkan ketersediaan protein dari makanan dalam sistem pencernaan. Wolf dan Cowan (1977) melaporkan bahwa tripsin inhibitor dapat menyebabkan pembesaran pankreas pada tikus dan anak ayam. Oleh karena itu tripsin inhibitor harus dikurangi atau dihilang-

kan terlebih dahulu sehingga hasil olahan biji kacang-kacangan itu dapat dikonsumsi secara aman.

Senyawa tripsin inhibitor yang terdapat pada biji kacang-kacangan dapat diinaktivkan dengan cara direbus selama 1 jam setelah direndam dalam air selama 30 menit atau dipanaskan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit (Martin, 1978). Apabila biji kacang-kacangan diolah menjadi tempe, ternyata selama fermentasi aktivitas tripsin inhibitor justru mengalami peningkatan. Menurut Wang *et al.* (1972) kadar tripsin inhibitor pada tempe kedele yang dibuat dengan biakan *Rhizopus oligosporus* lebih tinggi dibanding dengan kedele rebus. Identifikasi lebih lanjut menunjukkan bahwa senyawa non protein yaitu asam lemak yang dibebaskan selama fermentasi tempe ternyata dapat berperilaku sebagai tripsin inhibitor. Menurut Roozen dan de Groot (1984) menunjukkan bahwa ekstrak tripsin inhibitor tempe tidak hanya mengandung asam lemak tetapi juga protein. Tripsin inhibitor yang berupa asam lemak bebas tidaklah begitu penting untuk diperhatikan dan dikhawatirkan, karena di dalam usus manusia juga terdapat asam lemak yang dapat menyebabkan penghambatan pada tripsin namun secara alami sudah dapat dikendalikan oleh tubuh.

Pada penelitian ini dikaji aktivitas tripsin inhibitor dan perbedaan pola aktivitas selama pembuatan tempe kara benguk, kacang tolo, dan gude, menggunakan ino-

^{*)} Staf Pengajar Fak. Teknologi Pertanian UGM.

^{**}) Alumnus Fak. Teknologi Pertanian UGM.

kulum *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 dan inokulum tradisional (usar).

Bahan dan Metoda

Bahan Dasar

Kara benguk (*Mucuna pruriens*) dan kacang gude (*Cajanus cajan*) dibeli di Pasar Wonosari, Wonosari, Gunung Kidul, D.I. Yogyakarta sedangkan kacang tolo (*Vigna unguiculata*) dibeli di Pasar Legi, Solo, kemudian disimpan dalam keadaan kering.

Inokulum

Biakan murni (*Rhizopus oligosporus*) NRRL 2710 diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada. Biakan jamur tersebut ditanam pada agar miring MEA (Malt Extract Agar), hingga umur dua hari. Biakan ini selanjutnya dijadikan biakan induk dan disimpan dalam almari pendingin pada suhu 4 derajat Celcius. Apabila digunakan sebagai inokulum tempe, dilakukan inokulasi pada MEA dengan cara yang sama, diinkubasi selama dua hari pada suhu kamar. Dari biakan yang telah dimudahkan ini diinokulasikan lagi ke agar miring MEA yang baru, diinkubasi selama dua hari pada suhu kamar. Biakan inilah yang digunakan sebagai inokulum. Spora dan miselia dari satu agar miring disuspensikan dengan satu ml air suling deionisasi yang telah disterilkan, kemudian digojog kuat. Satu ml suspensi jamur cukup untuk inokulasi 500 gram biji kacang-kacangan yang telah disiapkan. Selain biakan murni sebagai inokulum tempe juga digunakan biakan tradisional (usar) yang diperoleh dari Pasar Kranggan, Yogyakarta. Usar yang digunakan sebanyak 2 — 3 lembar daun untuk inokulasi setiap 500 gram biji kacang-kacangan.

Pembuatan Tempe

Metoda pembuatan tempe yang digunakan merupakan metoda konvensional yang selain menggunakan inokulum tradisional juga menggunakan inokulum *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710. Urutan proses untuk pembuatan tempe kacang tolo sama dengan tempe gude, sedangkan untuk tempe kara benguk agak berbeda seperti disajikan pada Tabel 1.

Preparasi Ekstrak Tripsin Inhibitor

Sampel dihancurkan dalam 50 ml PBS dengan menggunakan blender (merek Nasional). Ekstraksi dilanjutkan dengan menggunakan mortar sehingga diperoleh suspensi yang benar-benar halus dan homogen. Selanjutnya disentrifugasi dengan Manifug Heraeus Sepatech selama 15 menit, dengan kecepatan 4000 rpm pada suhu kamar. Supernatan yang diperoleh digunakan dalam pengujian aktivitas tripsin inhibitor.

Pembuatan Plat Agar

Uji aktivitas tripsin inhibitor dilakukan menggunakan Metode Agar yang dikembangkan oleh Zuheid Noor dan Agus Pamudji Rahardjo (1981). Plat agar dibuat dengan melarutkan dan memanaskan 1,5 g agar dalam 62,5 ml aquades sambil diaduk. Larutan didinginkan sampai suhu 62°C, dan ditambah suspensi susu skim yang terdiri dari 1,25 g susu skim dan 0,1 g sodium azide dalam 62,5 ml PBS pH 7,5 (Phosphate Buffer Saline, kepekatan fosfat 0,012 M, dan NaCl 0,12 M). Campuran hangat dituang pada plat kaca 20 x 20 cm dengan ketebalan lapisan 3 mm. Plat agar yang terbentuk dibiarkan mengeras dalam wadah tertutup dan lembab selama 2 jam. Selanjutnya pada plat agar dibuat lubang-lubang berdiameter 5 mm dengan alat pelubang gabus.

Tabel 1. Urutan proses pembuatan tempe kara benguk, kacang tolo, dan gude

Tahap	Kara Benguk	Kacang Tolo	Gude
1	Perendaman	Perebusan	Perebusan
2	Perebusan	Pengupasan	Pengupasan
3	Pengupasan	Perendaman	Perendaman
4	Perendaman	Pengukusan	Pengukusan
5	Perendaman	Penirisan dan pendinginan	Penirisan dan pendinginan
6	Pengukusan	Inokulasi	Inokulasi
7	Penirisan dan pendinginan	Fermentasi	Fermentasi
8	Inokulasi	—	—
9	Fermentasi	—	—

Keterangan:

Perendaman = kacang : air = 1 : 4, 24 jam

Perebusan = kacang : air = 1 : 4, 30 menit (kara benguk)
15 menit (kacang tolo)
25 menit (gude)

Pengukusan = 25 menit

Inokulasi = 1 tabung biakan murni *Rhizopus oligosporus* untuk setiap 500 g kacang hasil pengukusan, 2 — 3 lembar usar untuk setiap 500 g kacang hasil pengukusan.

Fermentasi = 48 jam dalam kantong plastik berlubang.

*) Hartuti (1990).

Standarisasi Kepekatan Tripsin

Enzim tripsin (Bovine Pancreas, merek SIGMA) dilarutkan dalam PBS hingga diperoleh kepekatan 0,15 mg/ml. Larutan diencerkan menjadi 4X, 16X, 64X, 256X, dan 1024X. Lubang pertama pada plat agar diisi 50 µl larutan tripsin dengan kepekatan 0,15 mg/ml dan lubang lainnya diisi dengan 5 macam pengenceran larutan tripsin masing-masing sebanyak 50 µl. Selanjutnya diinkubasikan selama 20 jam pada wadah tertutup dan lembab pada suhu kamar. Setelah 20 jam diukur diameter lingkaran transparan hasil aksi proteolitik tripsin masing-masing lubang pada plat agar. Kepekatan larutan tripsin standar (larutan tripsin-1) dipilih dari kepekatan tripsin yang memberikan daerah lingkaran jernih yang cukup jelas. Hubungan antara kepekatan tripsin dengan diameter lingkaran digambarkan dalam grafik semilog yang akan memberikan persamaan garis lurus yang

selanjutnya disebut persamaan tripsin standar. Persamaan ini dijadikan sebagai patokan utama dalam penentuan kepekatan tripsin yang masih aktif dari hasil pengukuran diameter lingkaran hasil aktivitas proteolitik tripsin pada plat agar.

Penentuan Kepekatan Sampel

Penentuan kepekatan sampel yang sesuai dalam pengujian aktivitas tripsin inhibitor diperlukan agar kadar tripsin inhibitor pada sampel yang diuji tidak melampaui aktivitas tripsin dalam larutan standard (larutan tripsin-1). Sampel hasil ekstraksi tripsin inhibitor (dari 5 g kara benguk, 1,413 g kacang tolo, dan 0,65 g gude) diencerkan dengan PBS menjadi 7 seri pengenceran yang berbeda untuk masing-masing biji (kara benguk: 4/3X, 2X, 4X, 10X, 20X, dan 40X; kacang tolo 4/3X, 2X, 4X, 6X, 8X, dan 10X; gude: 10/9X, 10/8X, 10/7X, 10/6X, 10/5X, dan 10/4X). Dibuat campuran

dari larutan sampel yang telah diencerkan dengan larutan tripsin-2 (larutan tripsin-1 yang dipekatkan 2 kali), dengan perbandingan 1 : 1 (v/v). Kemudian sebanyak 50 μ l campuran tersebut, masing-masing disuntikkan ke dalam lubang-lubang pada plat agar yang telah disediakan. Pengukuran diameter lingkaran aksi proteolitik tripsin yang terbentuk pada tiap lubang plat agar, dilakukan setelah 20 jam inkubasi menggunakan mikrometer. Selanjutnya dibuat grafik semilog yang menghubungkan antara kepekatan sampel dengan kepekatan tripsin aktif yang masih tersisa (dihitung dari hasil pengukuran hasil aksi proteolitik yang dimasukkan dalam persamaan tripsin standar), sehingga dengan ekstrapolasi dapat diperkirakan kepekatan sampel secara teoritis menghambat 100% aktivitas tripsin dalam larutan standar sebagai kepekatan sampel terpilih.

Pengukuran Aktivitas Tripsin Inhibitor tiap Sampel

Pengukuran aktivitas tripsin inhibitor dilakukan pada kepekatan sampel yang terpilih dari standarisasi kepekatan sampel tiap-tiap biji. Sampel yang diuji diambil dari tiap-tiap tahap selama proses pembuatan tempe yang dibuat dengan inokulum untuk masing-masing biji. Metoda preparasi larutan pengujian sampel yang digunakan sama seperti metoda preparasi dalam penentuan kepekatan sampel. Apabila satu μ g/ml bagian tripsin yang dihambat dinyatakan sebagai satu unit per ml tripsin inhibitor dan maksimum tripsin yang dapat dihambat serta kepekatan sampel diketahui maka unit per berat aktivitas tripsin inhibitor sampel dapat dicari.

Penentuan Kadar Air

Untuk penentuan kadar air digunakan metoda pengeringan dalam oven vakum (AOAC, 1980).

Hasil dan Pembahasan

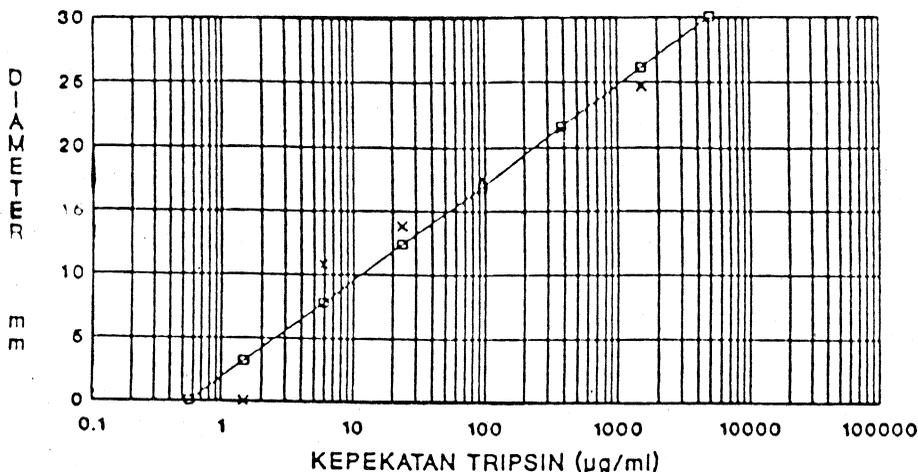
Hasil standarisasi kepekatan tripsin memberikan persamaan garis $Y = 7,60 \log X + 1,92$ seperti terlihat pada Gambar 1.

Kepekatan sampel yang terpilih sehingga kadar tripsin inhibitor tepat menghambat secara teoritis 100% aktivitas tripsin dalam larutan standar untuk kara benguk, kacang tolo dan gude, berturut-turut sebesar 56.901,29 μ g/ml, 11.754,57 μ g/ml dan 12.291,80 μ g/ml.

Hasil pengujian aktivitas tripsin inhibitor biji kara benguk, kacang tolo dan gude selama proses pembuatan tempe, baik yang menggunakan inokulum murni maupun tradisional, disajikan pada Gambar 2, 3, dan 4.

Seperti terlihat pada Gambar 2, 3, dan 4 nampak terdapat kecenderungan aktivitas tripsin inhibitor yang menurun pada masing-masing biji selama proses pengolahan tempe sebelum tahap fermentasi (perendaman, perebusan, pengupasan dan pengukusan). Penurunan yang terjadi pada biji kara benguk berkisar antara 91 — 95%, biji kacang tolo berkisar antara 96 — 97%, sedang pada biji gude berkisar antara 92 — 94%. Penurunan aktivitas tripsin inhibitor terjadi setelah masing-masing biji diberi perlakuan perendaman dalam air lebih dari 12 jam, direbus pada keadaan mendidih 15 — 30 menit, serta dikupas kulitnya. Penurunan aktivitas tripsin inhibitor paling tajam terjadi setelah proses perebusan.

Penurunan aktivitas tripsin setelah perendaman dan pengupasan kulit disebabkan oleh salah satu sifat tripsin inhibitor yang mudah larut dalam air, sehingga selama perendaman terjadi perembesan senyawa tripsin inhibitor keluar dari biji, kemudian terbuang bersama-sama dengan terbuangnya air rendaman dan kulit ari biji. Senyawa tripsin inhibitor yang mudah hilang akibat perendaman dan pengupasan kulit



Keterangan

—□— HASIL PERHITUNGAN 1) × HASIL PENGUKURAN

$$1) Y = 7,60 \log X + 1,92$$

Gambar 1. Hubungan kepekatan tripsin dengan diameter lingkaran hasil aktivitas proteolitik tripsin

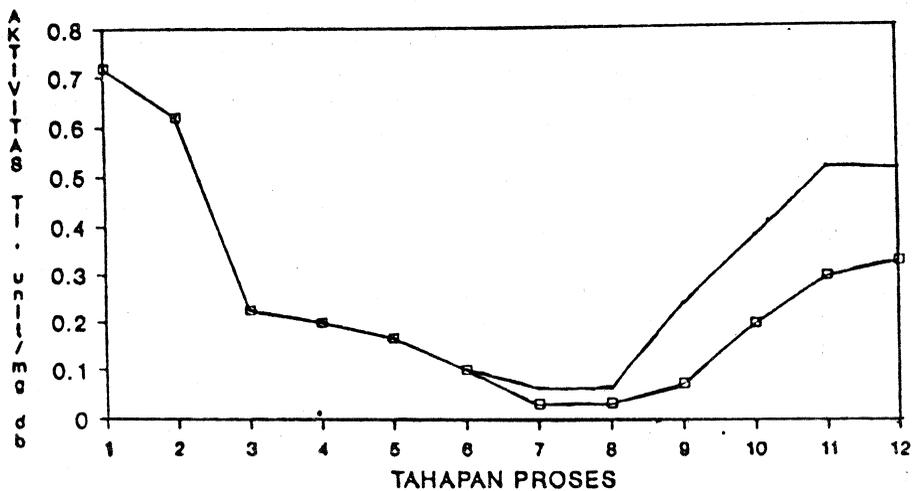
kemungkinan yang mempunyai berat molekul rendah seperti yang pernah dilaporkan oleh Roozen de Groot (1984).

Penurunan aktivitas tripsin inhibitor setelah proses perebusan biji kemungkinan disebabkan oleh rusaknya senyawa tripsin inhibitor akibat pemanasan. Peristiwa pemanasan pada suhu tinggi dapat menyebabkan terdenaturasinya senyawa tripsin inhibitor yang dapat terus berlanjut akibat pemanasan dalam waktu yang cukup lama, sehingga denaturasi bersifat irreversibel.

Pola aktivitas tripsin inhibitor selama fermentasi dari masing-masing biji memperlihatkan adanya kenaikan sejalan dengan bertambahnya waktu fermentasi hingga aktivitas tripsin inhibitor pada akhir fermentasi mencapai sekitar 45 — 72% dari semula. Kecenderungan kenaikan aktivitas tripsin in-

hibitor selama waktu fermentasi tampak berbeda-beda, umumnya pada fermentasi sampai 36 jam terjadi kenaikan yang tajam, sedangkan pada fermentasi 36 jam hingga 48 jam relatif mendatar.

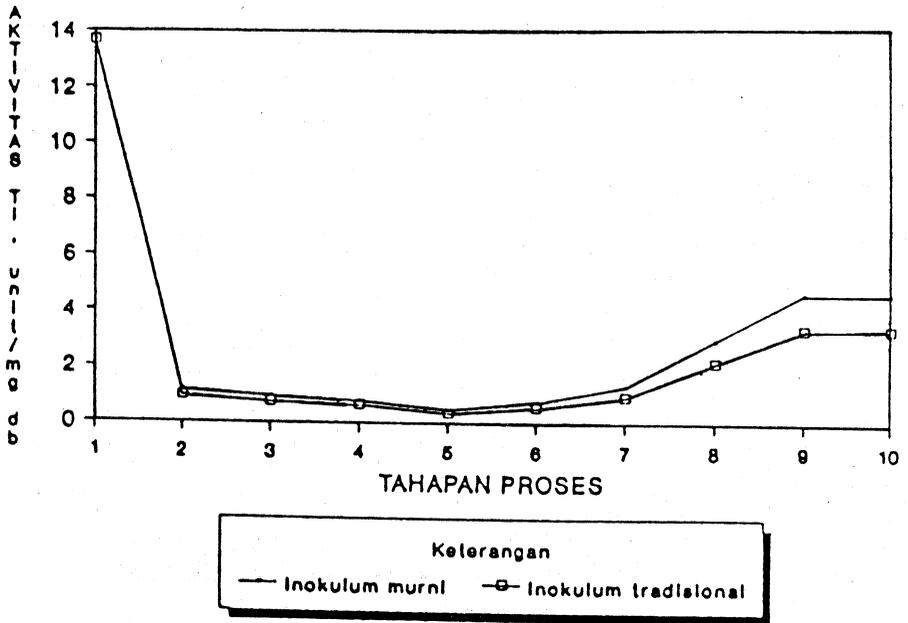
Kenaikan aktivitas tripsin inhibitor yang terjadi disebabkan karena dua hal, pertama karena terbebaskannya senyawa tripsin yang semula bersifat tahan panas (tidak terdenaturasi akibat pemanasan) dan inaktif pada bahan dasar akibat aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh *R. oligosporus* sesuai dengan pendapat Wang *et al.*, (1972). Penyebab yang kedua adalah terdapatnya asam-asam lemak bebas, yang dapat berperilaku sebagai tripsin inhibitor, yang dibebaskan selama proses fermentasi akibat aktivitas enzim lipase yang diproduksi oleh *R. oligosporus* sesuai dengan laporan Wang *et al.*, (1975). Namun demikian yang memiliki



Gambar 2. Aktivitas tripsin inhibitor selama pembuatan tempe kara benguk dengan inokulum *R. oligosporus* dan inokulum tradisional

Keterangan:

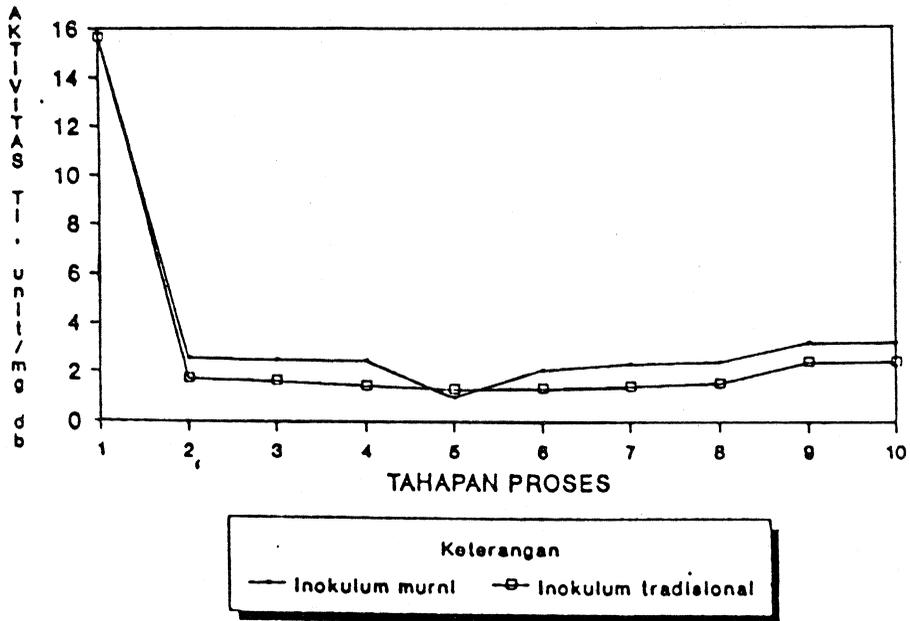
1. Bahan dasar (biji kara benguk)
2. Perendaman 1
3. Perebusan
4. Pengupasan
5. Perendaman 2
6. Perendaman 3
7. Pengukusan
8. Fermentasi 0 jam
9. Fermentasi 12 jam
10. Fermentasi 24 jam
11. Fermentasi 36 jam
12. Fermentasi 48 jam.



Gambar 3. Aktivitas tripsin inhibitor selama pembuatan tempe kacang tolo dengan inokulum *R. oligosporus* dan inokulum tradisional

Keterangan:

1. Bahan dasar (biji kacang tolo)
2. Perebusan
3. Pengupasan
4. Perendaman
5. Pengukusan
6. Fermentasi 0 jam
7. Fermentasi 12 jam
8. Fermentasi 24 jam
9. Fermentasi 36 jam
10. Fermentasi 48 jam



Gambar 4. Aktivitas tripsin inhibitor selama pembuatan tempe gude dengan inokulum *R. oligosporus* dan inokulum tradisional

Keterangan:

1. Bahan dasar (biji gude)
2. Perebusan
3. Pengupasan
4. Perendaman
5. Pengukusan
6. Fermentasi 0 jam
7. Fermentasi 12 jam
8. Fermentasi 24 jam
9. Fermentasi 36 jam
10. Fermentasi 48 jam

aktivitas tripsin inhibitor kemungkinan adalah asam lemak yang dalam bentuk radikal karena reaktivitas yang begitu tinggi terhadap berbagai macam senyawa.

Kenaikan aktivitas tripsin inhibitor selama fermentasi pada tempe yang dibuat dengan inokulum murni *R. oligosporus* NRRL 2710, maupun yang dibuat dengan usar menunjukkan pola yang cenderung sama. Namun bila dibandingkan, terlihat pada tempe yang dibuat dengan usar mempunyai aktivitas tripsin inhibitor yang lebih rendah. Aktivitas tripsin inhibitor pada tempe yang dibuat dengan inokulum *R. oligosporus* NRRL 2710 mencapai 1,33 — 3 kali lebih besar dibandingkan dengan aktivitas tripsin inhibitor yang dibuat dengan usar.

Aktivitas tripsin inhibitor yang lebih rendah pada tempe yang dibuat dengan usar mungkin disebabkan enzim protease dan lipase (yang menyebabkan terbebaskannya senyawa tripsin inhibitor dan asam lemak) yang diproduksi *R. oligosporus* biakan ini lebih sedikit. Hal ini dapat terjadi karena usar merupakan biakan campuran yang mengandung berbagai macam mikrobia seperti *Rhizopus spp.*, khamir, dan bakteri aerobik, sehingga selama fermentasi tempe terjadi persaingan yang kompetitif antar masing-masing mikrobia dalam penggunaan substrat untuk mempertahankan hidup, yang berakibat kemampuan *R. oligosporus* dalam biakan ini untuk menghasilkan enzim lipase menjadi berkurang.

Meskipun aktivitas tripsin inhibitor selama fermentasi tempe kara benguk, kacang tolo, dan gude mengalami kenaikan, namun kemungkinan dapat diinaktifkan dengan cara perebusan atau penggorengan sebelum dikonsumsi.

Penutup

Aktivitas tripsin inhibitor selama proses pembuatan tempe dengan inokulum murni

R. oligosporus dan inokulum tradisional (usar) pada biji kara benguk, kacang tolo dan gude mempunyai kecenderungan pola yang sama. Selama periode prafermentasi aktivitas tripsin inhibitor mengalami penurunan sebesar 91 — 97%, sedangkan selama periode fermentasi mengalami kenaikan sebesar 45 — 75% dari aktivitas semula.

Aktivitas tripsin inhibitor pada biji kara benguk, kacang tolo, dan gude berturut-turut adalah 0,72; 13,64; dan 15,77 unit/mg bahan kering, sedangkan aktivitas tripsin inhibitor selama fermentasi tempe kara benguk, kacang tolo dan gude yang menggunakan inokulum murni *R. oligosporus* NRRL 2710, mengalami kenaikan berturut-turut dari 0,06; 0,48; dan 0,97 unit/mg bahan kering menjadi 0,52; 4,60 dan 3,20 unit/mg bahan kering. Aktivitas tripsin inhibitor pada tempe hasil fermentasi 48 jam yang menggunakan inokulum tradisional (usar) juga mengalami kenaikan dari 0,03; 0,35; dan 1,28 unit/mg bahan kering menjadi 0,33; 3,34; dan 2,41 unit/mg bahan kering.

Aktivitas tripsin inhibitor pada tempe yang dibuat dengan inokulum *R. oligosporus* NRRL 2710 mencapai 1,33 — 3 kali lebih besar dibandingkan dengan tempe yang dibuat dengan inokulum tradisional (usar).

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada The Hitachi Scholarship Foundation, Tokyo yang telah memberikan bantuan dana pada penelitian ini.

Daftar Pustaka

AOAC, 1980. Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists, 13th edition, Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.

- Hartuti, 1990. Aktivitas Fitase Selama Proses Pembuatan Tempe Kara Benguk, Kara Putih & Gude Menggunakan Inokulum Murni *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710, Skripsi S1, Fak. Teknologi Pertanian, UGM, Yogyakarta.
- Martin, F.W., 1978. Observation and Experiment with Winged Bean in Puerto Rico, Paper in Workshop on the Development of the Potential of the Winged Beans, Los Banos, Phillipines.
- NAS, 1979. The Winged Bean a High Protein Crop for the Tropics, National Academy of Sciences, Washington, D.C.
- Roozen, J.P. and J. de Groot, 1984. Electrophoresis and Assay of Trypsin Inhibitors in Different Stages of Tempe Production, J. Food Biochem. 9: 37 — 48.
- Wang, H.L., W.W. Swain, L.L. Wallen, and C.W. Hesseltine, 1975. Free Fatty Acids Identified as Antitryptic Factor in Soybeans Fermented with *Rhizopus oligosporus*, In: Shurtleff, W. and Aoyagi, A., 1979. The Book of Tempeh, Harper and Row Publisher, New York.
- Wang, H.L., J.P. Vespa, and C.W. Hesseltine, 1972. Release of Bound Trypsin Inhibitors in Soybeans by *Rhizopus oligosporus*, J. Nut. 102: 1495 — 1500.
- Wolf, W.J. and J.C. Cowan, 1977. Soybean as a Food Source. 2nd ed. CRC Press Inc. Cleveland, Ohio.
- Zuheid Noor dan Agus Pamudji Rahardjo, 1981. Pengaruh pH dan panas pada Tripsin Inhibitor Biji Kecapir. Laporan Penelitian pada Lembaga Pengabdian pada Masyarakat, UGM, Yogyakarta.