

## ASAM PHITAT DAN PHITASE DALAM FERMENTASI TEMPE KEDELE

Oleh : Slamet Sudarmadji \*)

---

### Ringkasan

Jamur tempe, Rhizopus oligosporus, ternyata menghasilkan enzim phitase yang dapat mengurai asam phitat menjadi inositol dan fosfor-anorganik. Asam phitat dalam tempe berkurang sebanyak 30% dari kadarnya dalam kedele sebelum fermentasi.

Enzim phitase dari jamur tempe ini mempunyai aktivitas optimum pada pH 5.6 dan mempunyai Konstanta Michaelis sebesar  $0.28 \times 10^{-3} M$  dengan substrat Na-phitat.

Na-phitat sendiri kemungkinan sebagai penghambat pembentukan enzim phitase dari jamur tempe.

Asam phitat (phytic acid) atau asam inositol hexafosfat terdapat dalam banyak jenis padi-padian dan biji-bijian yang banyak mengandung minyak misalnya gandum, jagung, kelapa, biji bunga matahari kacang tanah dan kedele. Asam phitat ini merupakan bahan persediaan asam fosfat yang akan terhidrolisa pada waktu perkecambahan biji untuk selanjutnya disintesisakan menjadi sumber tenaga dalam bentuk ATP. Pada sayur-sayuran sedikit sekali dijumpai asam phitat ini.

Pemecahan asam phitat ini didalam biji-bijian dilakukan oleh enzim spesifik yang disebut phitase dan sedikit banyak dilakukan oleh fosfatase yang lain. Pada umumnya tidak ada aktifitas phitase pada biji-bijian yang sedang istirahat atau dalam keadaan dormansi. Enzim phitase ini akan terbentuk pada waktu biji berkecambah. Beberapa penyelidik diluar negeri melaporkan pada biji-biji gandum

\*) . Dosen Fakultas Teknologi Pertanian

rye, barley dan buck-wheat terdapat aktifitas phitase meskipun biji-biji itu sedang istirahat.

Menurut penyelidikan Møllfard dan kawan-kawannya (1946) 60% fosfat yang terdapat dalam biji kedele terikat sebagai asam phitat. Dan juga telah dibuktikan bahwa dalam keadaan istirahat, biji kedele sama sekali tidak memiliki aktivitas enzim phitase.

#### Bahaya-bahaya asam phitase pada makanan

Harrison dan Mellanby (2) telah mengamati dan membuktikan bahwa penyakit rakhitis dapat ditimbulkan oleh makanan dari tepung-terigu atau oatmeal pada pasien mereka yang kemudian diketahui bahwa kalsium berada dalam keadaan terikat dengan asam phitat sebagai kalsium-phitat yang tidak larut dalam suasana asam dalam perut sehingga tubuh tidak dapat menggunakan kalsium ini. Asam phitat ternyata dapat mengakibatkan defisiensi fosfat dan kalsium

Kemudian juga Widdowson dan McCance (3) menemukan hubungan yang positif antara banyaknya asam phitat dalam makanan dan pengurangan penyerapan zat besi pada manusia.

Fosfat yang terandung dalam asam phitat juga tidak akan dapat diserap dan ikut dalam metabolisme tubuh kecuali apabila asam phitat ini diurai menjadi asam fosfat dan inositol oleh enzim phitase lebih dulu didalam perut. Akan tetapi aktifitas phitase ini tidak dijumpai pada hewan-hewan tinggi termasuk manusia. Pada hewan-hewan pemakan tumbuh-tumbuhan, aktivitas phitase dapat dijumpai didalam perut besar yang berasal dari bahan tumbuh-tumbuhan dan mikrobial. Bahaya defisiensi mineral pada manusia akan bertambah besar apabila makanan banyak mengandung asam phitat dan phitase telah rusak karena pematangan atau pemanasan.

Zn yang dalam jumlah sedikit sangat diperlukan untuk pertumbuhan.

anak-anak akan terpengaruh penyerapannya oleh pengikatan dengan asam phitat ini. Oleh sebab itu penguraian asam phitat menjadi inositol dan asam fosfat dalam makanan disamping mengurangi bahaya defisiensi mineral-mineral, akan juga menaikkan nilai makanan itu sebagai sumber fosfat dan inositol.

#### Asam phitat dan kedele

Menurut penyelidikan Mollgard ( 4 ) kandungan fosfor dalam tepung kedele adalah 0,629% dan yang berasal dari asam phitat sebanyak 0,426%. Dengan demikian fosfor yang terdapat didalam tepung kedele sebanyak 68% terikat sebagai asam phitat. Sedangkan aktivitas phitase tidak dijumpai sama sekali didalam kedel kering.

Selanjutnya dari penyelidikan, kami ketahui bahwa asam phitat tidak terpengaruh oleh perendaman semalam dan penggodokan selama 30 menit pada biji kedele. Sedangkan pada fermentasi tempe terdapat pengurangan kadar asam phitat dalam jumlah yang cukup besar, yang ditunjukkan oleh tabel 1 berikut :

Tabel 1. Kadar asam phitat pada kedele dan tempe

Sample	% asam phitat (dari bahan bebas air)
1. kedele tanpa kulit	1.40
2. kedele direndam 24 jam	1.40
3. kedele direbus 30 menit	1.25
4. tempe kedele	1.00

Pada waktu perendaman kedele tentunya terjadi taraf permulaan dari perkecambahan. Dalam air perendaman ternyata terdapat juga asam phitat sebanyak 1.6 ppm. Pengurangan kadar asam phitat dalam kedele setelah penggodokan kemungkinan besar disebabkan oleh larutnya sebagian asam phitat dalam air dan juga banyaknya lembaga yang kaya akan asam phitat ini terlepas dan tidak tercakup dalam

analisa. Akan tetapi pengurangan kadar phitase ini lebih berarti pada kedele setelah menjadi tempe sebagai akibat proses fermentasi selama 36 jam.

#### Pengaruh fermentasi tempe pada asam phitat

Kedele jenis Harosey 63 dijadikan tempe dalam laboratorium menurut cara Hesseltine ( 3 ) dengan menggunakan jamur tempe jenis *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710. Analisa asam phitat dikerjakan menurut metode Makower ( 4 ) dan Wheeler dan Ferrel ( 6 ). Sedangkan penentuan fosfor anorganik dilakukan dengan cara Murphy dan Riley ( 5 ). Dalam tabel 1 telah ditunjukkan pengurangan kadar asam phitat dalam kedele setelah dijadikan tempe. Pengurangan ini disamping disebabkan oleh penambahan berat mycelium jamur tempe disebabkan juga oleh kemungkinan penguraian asam phitat menjadi inositol dan fosfor anorganis. Dan perkiraan ini ternyata benar dengan ditunjukkannya kenaikan kadar fosfor anorganik pada tempe sebanyak 5 kali lipat dari kadar fosfor anorganik dalam kedele yang sudah digodog. Tabel 2 menunjukkan kenaikan kadar fosfor dalam tempe ini.

Tabel 2. Kandungan fosfor anorganik pada kedele rebus tanpa kulit dan tempe (dinyatakan dalam ug P tiap g sampel kering)

Sampel	P
Kedele rebus	167,5
Tempe	884,0

Dengan perhitungan keseimbangan reaksi kimia ternyata bahwa fosfor yang dilepaskan sesuai dengan jumlah pengurangan asam phitat. Dengan pengamatan ini besar dugaan bahwa asam phitat tersebut memang terurai. Dan penguraian ini kemungkinan besar dilakukan oleh enzim phitase.

Kemungkinan phitase yang berasal dari kedele sangat kecil dengan memperhatikan laporan-laporan literatur yang menyebutkan bahwa aktivitas phitase dalam kedele kering sama sekali tidak ada dan juga mengingat bahwa kedele telah direbus selama 30 menit. Salah satu kemungkinan ialah bahwa aktivitas phitase berasal dari jamur Rhizopus oligosporus yang digunakan sebagai jamur tempe.

#### Ekstraksi enzim phitase dari tempe dan jamur tempe

Sampel tempe dihancurkan dalam Waring-blender dalam larutan 2%  $\text{CaCl}_2$ . Dengan sentrifugasi dan penyaringan, larutan jernih dipisahkan dari bahan-bahan yang tidak larut. Kemudian dengan dialisa dalam larutan buffer, kita mendapatkan larutan enzim-enzim. Substrat untuk menguji enzim phitase ini disiapkan dari larutan Na-phitat yang pH nya diatur menjadi 6.

#### Pengujian enzim phitase

Kemudian dengan cara standar pengujian aktivitas enzim, tiap-tiap larutan enzim diuji aktivitas enzimnya dalam larutan substrat dengan pH berbeda-beda dari 3.9 sampai 6.9. Tabel 3 menunjukkan aktivitas phitase yang disiapkan dari tempe kedele pada pH yang berbeda-beda.

Ternyata enzim phitase ini mempunyai aktivitas maksimum pada pH 5.6. Secara grafis, aktivitas enzim ini ini digambarkan pada Gambar 1.

Aktivitas optimum tetap pada pH 5.6. meskipun buffer yang dipakai berbeda.

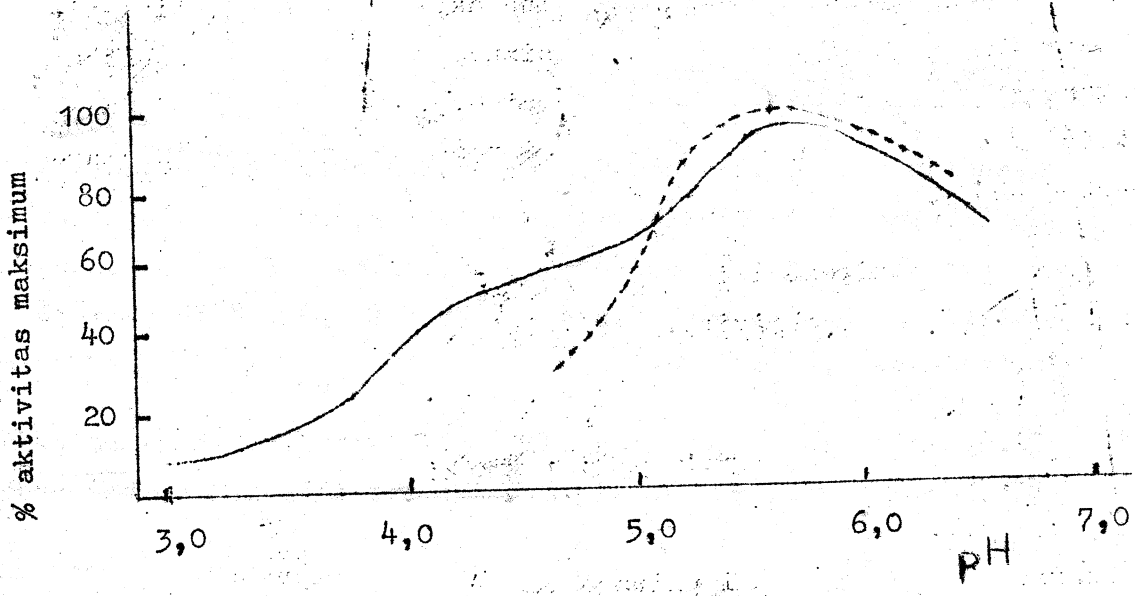
#### Penentuan $V_{max}$ dan $K_m$ dari phitase tempe

Untuk menentukan  $V_{max}$  dan  $K_m$  dari phitase digunakan cara penentu-

Tabel 3. Pengaruh pH pada aktivitas phitase tempe

pH *	aktivitas phitase (ug P/ml enzim jam.)	% dari aktivitas maximum
3.9	2.98	50.68
4.2	2.65	45.07
4.6	1.04	17.69
4.8	1.85	31.46
4.9	3.30	56.12
5.0	4.14	69.90
5.3	5.33	90.57
5.6	5.88	100.00
6.0	5.24	89.12
6.6	3.62	61.56
6.9	2.82	47.96

\* pH 3.9 - 5.3 ; buffer asetat  
 pH 5.6 - 6.9 : buffer meleat



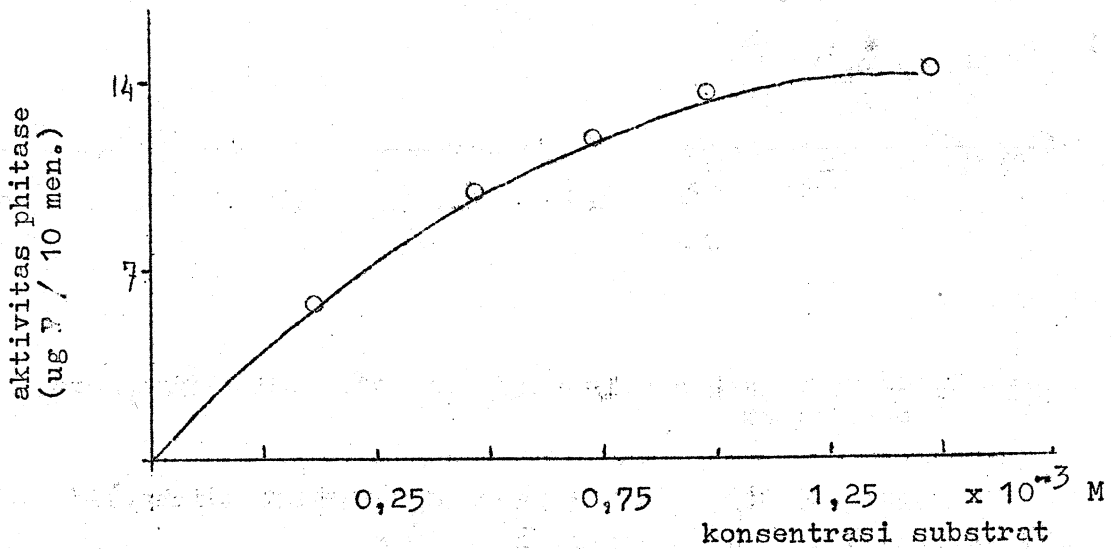
Gambar 1. Kurva aktivitas phitase tempe kedele dan pH  
 1. Dari tabel 3                      2. Dari penelitian lain

... dari Lineweaver-Burk. Dengan menyubah-ubah konsentrasi substrat ditentukan kecepatan reaksi dari enzim ini pada tiap-tiap konsentrasi substrat yang dipakai. Tabel 4 dibawah ini menunjukkan hubungan antara konsentrasi substrat dengan kecepatan reaksi.

Tabel 4. Pengaruh konsentrasi substrat pada kecepatan reaksi dini- (first degree) dari campuran phitat-phitase

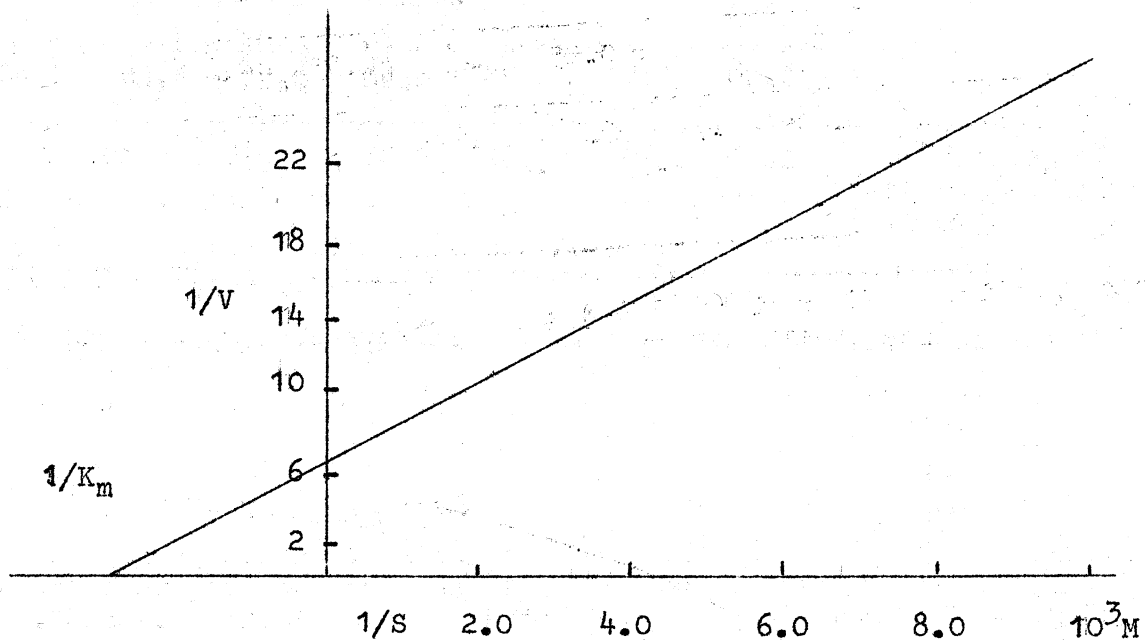
	konsentrasi substrat; $10^{-3}$ M						
	0.00	0.10	0.25	0.50	0.75	1.00	1.50
Kecepatan reaksi (ug P/10 menit)	0.00	3.77	6.62	9.38	10.28	10.98	11.80

Secara grafis, hasil dari tabel 4 ini digambarkan pada gambar 2.



Gambar 2. Pengaruh konsentrasi substrat pada aktivitas phitase.

Kemudian dengan menghitung harga-harga  $1/v$  (atau  $1/\text{aktivitas reaksi}$ ) dan  $1/s$  (atau  $1/\text{konsentrasi substrat}$ ) dan kemudian meletakkan tiap angka-angka tersebut masing-masing pada ordinat dan absis dari sebuah kurva, Gambar 3 berikut ini akan diperoleh.



Gambar 3. Hubungan antara harga  $1/v$  dan  $1/s$  dari phitase dan lattu phitat

Dari penentuan diatas, didapat harga  $K_m$  atau Konstanta Michaelis dari phitase tempe sebesar  $0.28 \times 10^{-3} M$

Dugaan pertama ternyata benar bahwa phitase pada tempe dihasilkan oleh jamur tempe Rhizopus oligosporus, Tabel 5 berikut ini menunjukkan aktivitas phitase yang sangat kuat yang diekstraksi dari jamur tersebut yang ditumbuhkan pada media sintesis.



Tabel 5. Aktivitas phitase dari jamur Rhizopus yang ditumbuhkan pada/bermacam-macam media

Media	aktivitas phitase (ug P/10 men/ml)
PDA	0.0
PDA-phitat	0.0
PDA-kedele	3.23
PDA-pepton-phitat	3.95
PDA-pepton	21.94

Dari percobaan diatas ternyata bahwa jamur tempe membutuhkan protein, baik yang berasal dari kedele atau dari pepton untuk kesuburan pertumbuhannya. Dan ternyata ada hubungan positif antara kesuburan pertumbuhan jamur tempe dengan aktivitas phitase. Garam phitat sendiri tidak memacu produksi atau keaktifan phitase. Garam phitat yang ditambahkan dan juga yang alami didalam kedele kemungkinan besar justru bertindak sebagai inhibitor dalam produksi phitase ini.

#### Daftar pustaka

- Møllgard, H.K. Lorenzen; I.G. Hansen dan P.E. Christensen. 1946.- on phytic acid, its importance in metabolism and its enzymatic cleavage in bread supplemented with calcium. *Biochem. J.* 40:589.
- Harrison, D.C dan E. Mellanby. 1939. *Biochem. J.* 33:1660
- Hesseltine, C.W. 1965. A millenium of fungi, food and fermentation *Mycologia* 57:149
- Makower, R.U. 1970. Extraction and determination of phytic acid in beans (*Phaseolus vulgaris*). *Cereal chem*, 47 : 288
- Murphy, J; and J.P. Riley, 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chem. Acta* 27:31
- Wheeler, E.I. dan R.E. Ferrel. 1971. A method for phytic acid determination in wheat and wheat fractions. *Cereal Chem.* 48:312
- Widdowson, E.M. dan K.A. McCance. 1942. *Lancet* 1:588