

KAJIAN MODEL MATEMATIS KINETIKA INAKTIVASI ENZIM LIPOKSIENASE UNTUK PRODUKSI TEPUNG BIJI KECIPIR SEBAGAI TEPUNG KOMPOSIT

**Deddy kurniawan
wikanta¹, Mohamad
Endy Yulianto¹,
Indah Hartati²**

¹Jurusan Teknik Kimia PSD III
Teknik, UNDIP Semarang

²Jurusan Teknik Kimia Universitas
Wahid Hasyim Semarang
E-mail : deddy_k@yahoo.com

*Winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* L) which its nutrition content is similar to 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 utilization of winged bean is limited caused by its strong bitter beany flavour. 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. The purpose of the present study is to develop the kinetics models of the lipoxygenation enzyme inactivation in winged bean flour production. The kinetics models can be described as first orde reaction and it is depends on pressure, temperature and water concentration.*

Keywords: enzyme, 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, maka diharapkan dapat sebagai pengganti untuk pemenuhan kebutuhan kedelai. The Winged Bean, A High Protein Crop for the Tropic 2ndEd.Washington D.C.1981, menyatakan bahwa nilai gizi kecipir dibanding dengan kedelai dalam 100 gr biji tersaji pada Tabel 1. Sedangkan dari Direktorat Gizi Depkes RI (2008), kandungan gizi kecipir bila dibandingkan dengan daging sapi dan domba terlihat di Tabel 2.

Mengingat hal tersebut maka 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; Shibata, et al., 1995; 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; Shibata, et al., 1995; Casey, et al., 1998; Garrote, et al., 2003; Schenk, et al., 2003).

Tabel 2. Perbandingan nilai gizi kecipir dengan daging

No	Kandung an	Kecipir	Dagin g Sapi	Daging Domba
1.	Kalori (kal)	405,00	190,00	206,00
2.	Protein (gr)	32,80	27,00	17,00
3.	Lemak (gr)	17,00	10,00	14,80
4.	Karbohidrat (gr)	36,50	0,00	0,00

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.

Proses ekstraksi minyak pada biji kecipir disamping untuk mengurangi rasa langu juga berpengaruh terhadap kadar protein serta asam amino sulfurnya. Sedangkan jika dibandingkan dengan isolat protein kedelai (yang banyak digunakan sebagai bahan dasar pembuatan *edible film*) asam amino sulfur (sistin dan sistein) pada tepung biji kecipir rendah lemak lebih tinggi yaitu 2,37 g/16 g N untuk tepung biji kecipir rendah lemak dan 2,30 g/16 g N untuk isolat protein kedelai (Hastuti, dkk., 2001).

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 pada masing-masing jenis enzim (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 biasanya berupa suatu celah hidrofilik yang terdiri dari rangkaian rantai asam amino yang akan mengikat substrat. Diyakini bahwa kondisi proses termal, menyebabkan sisi aktif akan merubah struktur tersier sehingga enzim lipoksigenase mengalami *unfolding*. Pernyataan ini juga dikemukakan oleh yemenicioaylu, et al 1997, bahwa pada kisaran suhu 55 °C, enzim lipoksigenase akan mengalami inaktivasi termal. Penambahan beberapa jenis senyawa kimia juga dapat menimbulkan akibat yang sama, yaitu enzim lipoksigenase akan terhambat aktivitasnya, yaitu dengan penambahan asam lemak asetlenik (Hartmut, et al., 2005).

Oleh karenanya, alternatif yang ditawarkan pada proses produksi tepung kecipir yang terbebas dari rasa dan bau langu (*bitter beany flavour*) adalah dengan teknologi penginaktifan 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. Meskipun demikian, pencapaian keunggulan diatas masih bergantung pada laju inaktivasi enzimatis, perancangan ekstraktor enzimatis dan kondisi operasi optimum dalam ekstraktor. Oleh karenanya, perlu dikaji pengembangan proses inaktivasi enzim lipoksigenase dengan menggunakan ekstraktor inaktivasi enzimatis (alcoholic solvent), sehingga bisa diproduksi tepung kecipir bebas rasa dan bau langu. Untuk itu, makalah ini menelaah laju inaktivasi enzim lipoksigenase yang sangat penting peranannya guna menentukan dimensi alat proses.

Enzim Lipoksigenase

Enzim yang berperan dalam proses oksidasi minyak menjadi asam lemak hidroperoksida adalah lipoksigenase. Lipoksigenase merupakan enzim oksidase yang terdapat pada tanaman kecipir. Enzim oksidase diklasifikasikan menjadi beberapa subkelas menurut jenis ikatan yang dipecah oleh enzim oksidase tersebut.

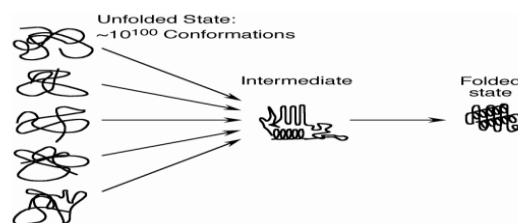
Lipoksigenase mengkatalisis reaksi oksidasi asam lemak tak jenuh menjadi asam lemak hidroperoksida. Lipoksigenase termasuk kedalam sub kelas esterase karena lipoksigenase memecah ikatan ester pada minyak (Ribnicky, 2003).

Aktivitas beberapa enzim diketahui terhambat bila berada dalam lingkungan solvent organik. Hal tersebut juga terjadi pada enzim lipoksigenase. Dalam senyawa polar, aktivitas enzim terhambat karena terjadi penurunan jumlah sisi aktif dari enzim gaultherase. Berkurangnya jumlah sisi aktif enzim disebabkan terjadi proses unfolding pada struktur tersier enzim.

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. Enzim terdiri dari rangkaian rantai linear asam-asam amino spesifik. Pada kondisi optimumnya enzim akan mengalami proses folding (Gambar 1). Proses terbentuknya susunan folding pada enzim merupakan proses spontan yang terjadi dalam hitungan detik (Bugg, 2004).

Rangkaian asam amino pada enzim akan membentuk susunan tiga dimensi tertentu yang spesifik pada masing-masing jenis enzim (struktur tersier). Bagian dari struktur tersier

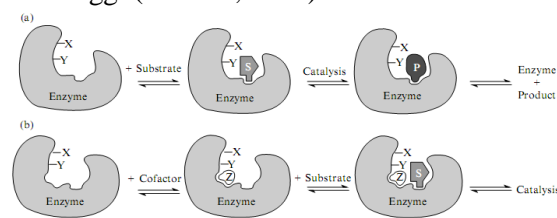
enzim yang bertanggung jawab terhadap aktivitas katalitik enzim disebut sisi aktif. Jumlah sisi aktif dari suatu enzim mencapai 10-20% dari volume total enzim (Bugg 2004). Sisi aktif suatu enzim biasanya berupa suatu celah hidrofilik yang terdiri dari rangkaian rantai asam amino yang akan mengikat substrat (Gambar 2.a) atau mengikat suatu kofaktor (Gambar 2.b) dan mengkatalisis reaksi.



Gambar 1. Proses Folding

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

Dalam lingkungan yang bersifat hidrofobik seperti dalam pelarut organik, proses folding pada enzim lipoksigenase akan terhambat. Hal tersebut diakibatkan pada lingkungan yang bersifat hidrofobik, lipoksigenase akan mengekspos rantai asam yang bersifat hidrofobik sehingga enzim lipoksigenase akan berada pada kondisi *unfolded* atau inaktif (Garrido 2003). Inaktivasi suatu enzim dalam solvent organik sangat tergantung pada *hydrophobicity* atau kehidrofobikan solvent yang digunakan dan keefektifan proses inaktivasi berkurang pada suhu tinggi (Garrido, 2003).



Gambar 2. Sisi aktif enzim

Model Matematis Kinetika Inaktivasi Enzim Lipoksigenase

Model paling sederhana, molekul enzim aktif (E_a) mengalami suatu perubahan kimia atau kimia irreversibel menjadi suatu bentuk inaktif (E_i), (Bailey dan Ollis, 1986; Martens *et al.*, 2001).



Inaktivasi enzim lipoksigenase dapat digambarkan sebagai reaksi orde satu (Kerkhof dan Schober, 1974; Wijlhuizen *et al.*, 1979; Liou, 1982; Luyben *et al.*, 1982; Saguy, 1983; Bailey dan Ollis, 1986; Ganthavorn *et al.*, 1991; Meerdink dan Riet, 1991; Yamamoto dan Sano, 1992; Lievense *et al.*, 1992; Owusu dan Makhzoum, 1992; Bhirud dan Sosulski, 1993; Meerdink, 1993; Nunes *et al.*, 1993; Owusu, 1993; Campos *et al.*, 1996; Ariaahu, 1997; Kieviet, 1997; Busto *et al.*, 1999; Cunha dan Oliveira, 2000; Sriwatanapongse *et al.*, 2000; dan Martens *et al.*, 2001). Proses inaktivasi enzim lipoksigenase dapat dinyatakan dengan persamaan dibawah ini.

$$\frac{dE_p}{dt} = -k_p \cdot E_p \quad (1)$$

Dengan menggunakan bentuk integrasi dan pemisahan variabel, dan menganggap kondisi batas $E_p(t)$ sampai $E_p(0)$ pada $t = 0$, maka Persamaan 1 dapat diselesaikan menjadi:

$$\int_{E_p(0)}^{E_p(t)} \frac{dE_p}{E_p} = - \int_{t_0}^t k_p \cdot dt \quad (2)$$

$$\ln \left[\frac{E_p(t)}{E_p(0)} \right] = -k_p t \quad (3)$$

dengan, E_p adalah aktivitas enzim, t adalah waktu reaksi, dan k_p adalah konstanta inaktivasi.

Konstanta inaktivasi enzim k_p tergantung pada temperatur, tekanan, dan konsentrasi air (Kerkhof dan Schober, 1974; Wijlhuizen *et al.*, 1979; Luyben *et al.*, 1982; Liou, 1982; Bailey dan Ollis, 1986; Ganthavorn *et al.*, 1991; Meerdink dan Riet, 1991; Yamamoto dan Sano, 1992; Lievense *et al.*, 1992; Owusu dan Makhzoum, 1992; Bhirud dan Sosulski, 1993; Meerdink, 1993; Nunes *et al.*, 1993; Owusu, 1993; Campos *et al.*, 1996; Ariaahu, 1997; Kieviet, 1997; Busto *et al.*, 1999; Cunha dan Oliveira, 2000; Erkmen, 2000; Sriwatanapongse *et al.*, 2000; Indrawati *et al.*, 2001; dan Martens *et al.*, 2001). Dalam makalah beberapa model digunakan untuk menggambarkan ketergantungan tersebut. Model ketergantungan terhadap suhu berdasarkan persamaan tipe Arrhenius (Persamaan 4) sedangkan ketergantungan terhadap tekanan berdasarkan pada persamaan Eyring (Persamaan 5).

$$k_p = k_\infty \exp \left(- \frac{E_a}{R_t T} \right) \quad (4)$$

$$k_p = k_\infty \exp \left(\frac{V_a P}{R_p T} \right) \quad (5)$$

dengan, k_∞ adalah faktor frekuensi, E_a adalah energi aktivasi, V_a adalah volume aktivasi, P adalah $R_{t,p}$ adalah konstanta umum gas, T adalah suhu mutlak, dan P adalah tekanan.

Persamaan Arrhenius dan Eyring dapat ditransformasikan ke dalam bentuk yang lebih mudah dipahami (Saguy, 1983; Yamamoto dan Sano, 1992; Nunes *et al.*, 1993; Cunha dan Oliveira, 2000; Indrawati *et al.*, 2001; dan Martens *et al.*, 2001).

$$k_p = k_{p,Tref} \exp \left[- \left(\frac{E_a}{R} \right) \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] \quad (6)$$

$$k_p = k_{p,Pref} \exp \left[\left(\frac{V_a}{R_p T} \right) \left(P - P_{ref} \right) \right] \quad (7)$$

dengan, $k_{p,Tref}$ adalah konstanta laju pada suatu suhu referensi yang ditentukan sebelumnya, $k_{p,Pref}$ adalah konstanta laju pada suatu tekanan referensi yang ditentukan sebelumnya, T_{ref} adalah suhu referensi, dan P_{ref} adalah tekanan referensi.

Konstanta laju k_p untuk inaktivasi enzim diestimasi dari suatu plot logaritma % aktivitas enzim terhadap waktu. Nilai E_a atau $\Delta E^\#$ dan k_∞ dapat dicapai dengan regresi linier dari $\ln k_p$ terhadap sepersuhu mutlak ($1/T$). Parameter kondisi transisi seperti halnya entalpi aktivasi ($\Delta H^\#$) ditentukan menurut persamaan berikut (Owusu *et al.*, 1992; Owusu dan Berthalon, 1993; Ariaahu *et al.*, 1997; dan Busto *et al.*, 1999):

$$\Delta H^\# = \Delta E^\# - RT \quad (8)$$

dengan, T adalah suhu absolut. Untuk energi bebas aktivasi ditentukan menggunakan hubungan,

$$\Delta G^\# = -RT \ln \left(\frac{kh}{KT} \right) \quad (9)$$

dengan, h adalah konstanta Planck ($=6.6262 \times 10^{-34}$ Js), K adalah konstanta Boltzmann ($=1.3806 \times 10^{-23}$ JK⁻¹). Dari Persamaan 8 dan 9 dihitung entropi aktivasi ($\Delta S^\#$) untuk inaktivasi enzim dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\Delta S^\# = \frac{\Delta H^\# - \Delta G^\#}{T} \quad (10)$$

Untuk menggambarkan kombinasi ketergantungan suhu-tekanan dari konstanta laju inaktivasi enzim lipoksigenase, suatu model berdasarkan pada suatu persamaan termodinamika dimodifikasi (Hawley, 1971) dikembangkan sebagai berikut:

$$\ln k_p = \ln k_o - \frac{\Delta V_o^\#}{R_T T} e^{-P_o} - \frac{\Delta S_o^\#}{R_T T} (T - T_o) - \frac{1}{2} \frac{\Delta k^\#}{R_T T} e^{-P_o} \left[\frac{(n-1) \left(1 - \frac{SSQ_{regresion}}{SSQ_{total}} \right)}{(n-j)} \right] \quad (12)$$

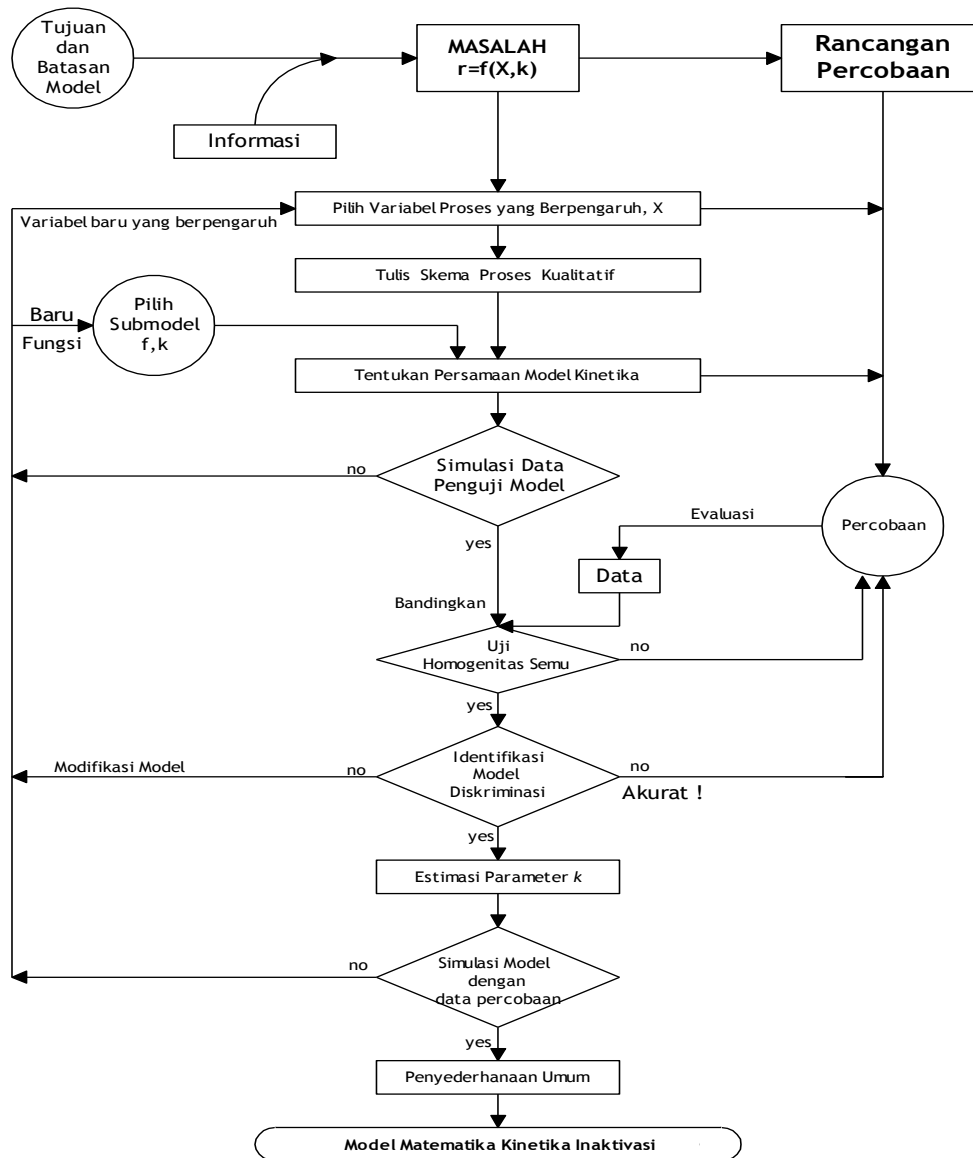
$$- \frac{\Delta \zeta^\#}{R_T T} e^{-P_o} (T - T_o) + \frac{\Delta C_p^\#}{R_T T} \left[T \left(\ln \frac{T}{T_o} - 1 \right) + T_o \right] \quad (11)$$

$$Standar\ deviasi\ dari\ model = \sqrt{\frac{SSQ_{residual}}{(n-j)}} \quad (13)$$

$$RSE (\%) = \frac{\text{asimtot (SE)}}{\text{estimasi - nilai}} \times 100 \quad (14)$$

Suatu analisis regresi linier digunakan termasuk suatu prosedur numerik iteratif berdasarkan pada jumlah kuadrat terkecil, untuk mengestimasi parameter model (k_o , $\Delta V_o^\#$, $\Delta S_o^\#$, $\Delta k_o^\#$, $\Delta \zeta_o^\#$, dan $\Delta C_p^\#$). Akurasi model dievaluasi dengan perhitungan koreksi r^2 , standar deviasi, dan standar error residu (SE) untuk masing-masing parameter model yang diestimasi.

Prosedur penyusunan model matematis kinetika inaktivasi enzim lipoksigenase ditunjukkan pada Gambar 3. Dari data-data yang telah diukur, digunakan sebagai input untuk membangun model dalam bentuk persamaan empiris dengan menggunakan program *Matlab*.



Gambar 3. Prosedur penyusunan model matematika kinetika inaktivasi enzim lipoksigenase

Kesimpulan

Laju inaktivasi enzim lipoksigenase untuk produksi tepung kecipir bebas rasa langu sebagai tepung komposit menggunakan solvent beralkohol (etanol) dapat mewakili dalam penentuan dimensi bioekstraktor inaktivasi enzimatis. Meskipun demikian, masih perlu kajian *transfer massa* guna melengkapi data-data teknis perancangan alat proses.

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.
- Bhirud, P. R., & Sosulski, F. W. 1993. *Thermal inactivation kinetics of wheat germ Lipoxigenase*. *Journal of Food Science*, 58, 1095-1098.
- 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.
- 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.
- 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 lipoxigenases 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.
- Kuhn, H.; Holzhutter, H.G.; Schewe, T.; Hiebsch, C.; Rapoport, S.M., 2005, "The mechanism of inactivation of lipoxigenase 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 lipoxigenase-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, *pachyrrhizus 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 lipoxigenase from fresh pinto beans (*phaseolus vulgaris*)", *European food research and technology*, Vol. 206, 4, 294-296.