

MONITORING HIDROLISIS PROTEIN KECAMBAH KACANG TUNGGAK (*Vigna unguiculata* L.) OLEH ENZIM ALKALASE PADA VARIASI WAKTU DAN RASIO ENZIM-SUBSTRAT

K. Ratnayani*, N. K. L. Listiyanti, N. K. Ariati, dan A. A. I. A. M. Laksmiwati

Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Jimbaran-Bali, Indonesia

**Email: ketut_ratnayani@unud.ac.id*

ABSTRAK

Kacang tunggak dengan kandungan protein 18,3-35% berpotensi digunakan sebagai substrat protein dalam pembuatan hidrolisat protein nabati. Kecambah kacang tunggak cukup mudah diperoleh di pasaran (khususnya di wilayah Bali) yang lebih dikenal sebagai kacang mentik. Penelitian ini bertujuan melakukan monitoring berjalannya reaksi hidrolisis konsentrat protein kecambah kacang tunggak yang dikatalisis oleh enzim alkalase, dengan perlakuan variasi waktu hidrolisis dan variasi rasio enzim-substrat (rasio E/S). Penelitian diawali dengan tahap ekstraksi protein dari tepung kecambah kacang tunggak sehingga diperoleh konsentrat protein. Selanjutnya dilakukan proses hidrolisis terhadap substrat konsentrat protein dengan enzim alkalase menggunakan variasi waktu hidrolisis 0, 1, 2 dan 3 jam serta variasi rasio (E/S) yaitu 0,1%, 1,0%, 2,0% dan 3,0%. Masing-masing hidrolisat protein yang diperoleh dimonitor keberhasilannya dalam hidrolisis berdasarkan parameter kadar kadar α -amino bebas, nilai derajat hidrolisis dan kadar protein terlarutnya. Hasil ekstraksi protein mampu menghasilkan konsentrat protein kacang tunggak dengan kadar protein total mencapai 68,11%. Hasil monitoring terhadap perlakuan hidrolisis menunjukkan bahwa peningkatan rasio E/S dan lama waktu hidrolisis mampu meningkatkan kadar α -amino bebas, kadar protein terlarut, dan nilai derajat hidrolisis (DH%) dari produk hidrolisat protein kecambah kacang tunggak (pada batas variasi perlakuan yang diberikan). Kadar α -amino bebas tertinggi sebesar 3,9573 mg/mL, kadar protein terlarut tertinggi sebesar 20,9972 mg/mL, dan nilai DH% tertinggi sebesar 93,80% diperoleh menggunakan perlakuan rasio E/S 3% dan waktu hidrolisis selama 3 jam.

Kata kunci: alkalase, hidrolisis, kacang tunggak, kecambah, protein

ABSTRACT

Cowpea usually contains 18.3-35% protein and is potentially used as a protein substrate for preparing vegetable protein hydrolysates. Cowpea sprouts, available in the market (especially in Bali), are known as "kacang mentik". This study aimed to monitor the progress of the hydrolysis of the cowpea sprout protein concentrate, catalyzed by alkalase enzyme, with the variations of hydrolysis time and enzyme-substrate ratio (E/S ratio). The research began with the protein extraction stage from cowpea sprout flour to obtain the protein concentrate. Furthermore, the hydrolysis was carried out on the protein concentrate substrate with alkalase enzyme using the variations of hydrolysis time of 0, 1, 2, and 3 hours and the E/S ratio of 0.1, 1.0, 2.0, and 3.0%. Each protein hydrolysate obtained was monitored for its success in hydrolysis based on the parameters of soluble protein content, free α -amino content, and the degree of hydrolysis. The result showed that the protein extraction produced cowpea protein concentrate with a total protein content reaching 68.11%. The monitoring results of the hydrolysis treatment showed that increasing the E/S ratio and the length of hydrolysis time were able to increase the free α -amino content, soluble protein content, and the degree of hydrolysis (DH%) value of the cowpea sprout protein hydrolysate product (at the limit of the treatment variations given). The highest value of the free α -amino content of 3.9573 mg/mL, the soluble protein content of 20.9972 mg/mL, and the DH of 93.80% was obtained when using the 3% E/S ratio treatment and 3 hours of hydrolysis time.

Keywords: alkalase, cowpea, hydrolysis, protein, sprout

PENDAHULUAN

Salah satu jenis kacang-kacangan yang cukup mudah diperoleh di pasaran namun belum optimal pemanfaatannya adalah kacang

tunggak (*Vigna unguiculata* L.). Kecambah kacang tunggak lebih dikenal dengan nama "kacang mentik" biasa digunakan sebagai pelengkap upacara di daerah Bali. Kandungan protein dalam kacang tunggak cukup tinggi

yaitu sekitar 18,3-35% sehingga berpotensi digunakan sebagai sumber protein nabati. Kacang tunggak juga mengandung berbagai jenis asam amino esensial yang tidak dapat dibiosintesis oleh tubuh sehingga harus tersedia dari bahan makanan serta memiliki banyak manfaat bagi kesehatan manusia (Chavan dkk., 1989).

Proses perkecambahan pada kacang-kacangan telah dibuktikan mampu meningkatkan kadar protein terlarutnya sehingga meningkatkan potensi protein kacang tunggak jika digunakan sebagai substrat dalam pembuatan hidrolisat protein. Penelitian Elvira et al (2019) menunjukkan bahwa tepung kacang tunggak (tidak dikecambahkan) memiliki kadar protein sebesar 26,41%, sedangkan jika dilakukan proses perkecambahan kadar proteinnya meningkat menjadi 28,18%. Penelitian Martianingsih dkk. (2016) menunjukkan bahwa hidrolisat protein kecambah kacang hijau menghasilkan kadar protein terlarut sebesar 15,85%, sedangkan hidrolisat protein kacang hijau yang tidak dikecambahkan menghasilkan kadar protein terlarut sebesar 12,04%. Peningkatan kadar protein ini kemungkinan diakibatkan karena terjadinya aktivasi proses degradasi protein cadangan dalam biji oleh protease selama proses perkecambahan dan melepaskan protein dengan rantai lebih pendek sehingga meningkatkan kadar protein terlarut (Bau dkk., 2000).

Salah satu strategi untuk meningkatkan fungsionalitas dan bioaktivitas protein adalah melalui proses hidrolisis enzimatis. Proses ini dilakukan dengan cara menambahkan enzim protease ke dalam substrat protein untuk memutus ikatan peptida penghubung antar asam amino di dalam protein (Deleu dkk., 2019). Protein apabila dihidrolisis akan menghasilkan produk hidrolisat protein yang di dalamnya mengandung campuran berbagai polipeptida pendek dan asam amino bebas. Hidrolisat protein ini dapat dimanfaatkan sebagai sumber peptida bioaktif yang dapat diterapkan terutama di bidang kesehatan dan pangan dan gizi (Ratnayani dkk., 2017).

Penggunaan teknologi enzim untuk pemulihan dan modifikasi protein telah diterapkan semakin meluas dalam produk pangan dan produk industri lainnya. Hidrolisis biasanya dimanipulasi dengan menggunakan protease dari sumber yang berbeda karena kekhususannya untuk ikatan peptida yang

berdekatan dengan asam amino tertentu. Salah satu jenis enzim protease komersial yang sering digunakan untuk produksi hidrolisat protein dan memiliki kemampuan hidrolisis cukup tinggi dibandingkan enzim protease lainnya adalah enzim alkalase. Penelitian Segura-Campos dkk. (2012) yang melakukan hidrolisis protein kacang tunggak (tanpa perkecambahan) dengan enzim alkalase mampu memperoleh derajat hidrolisis lebih tinggi yaitu sebesar 23,6%, sedangkan hidrolisis menggunakan flavourzyme menghasilkan derajat hidrolisis sebesar 7,27%. Hal ini menunjukkan kemampuan hidrolisis protein kacang tunggak dengan alkalase lebih optimal dibandingkan dengan flavourzyme. Hal ini diperkuat oleh penelitian dari Liu dkk. (2022) yang melakukan hidrolisis kacang hijau menggunakan enzim alkalase, neutrase, flavourzyme dan papain, dimana alkalase menghasilkan DH% tertinggi dibandingkan enzim lainnya.

Keberhasilan berlangsungnya proses hidrolisis protein dapat dimonitor melalui analisis beberapa jenis parameter hidrolisis di antaranya: kadar protein terlarut, nilai derajat hidrolisis (%DH), dan kadar α -amino bebas. Derajat hidrolisis merupakan parameter persentase ikatan peptida (penghubung antar asam amino) yang terputus akibat reaksi hidrolisis. Derajat hidrolisis (DH%) dipengaruhi oleh beberapa faktor perlakuan selama hidrolisis seperti pH, suhu, rasio enzim substrat (rasio E/S), waktu hidrolisis, jenis enzim, dan substrat yang digunakan. Faktor lainnya yaitu karakteristik enzim yang digunakan seperti jenis enzim dan spesifisitasnya, karakteristik enzim yang digunakan berpengaruh pada derajat hidrolisis serta peptida yang dihasilkan (Daliri dkk., 2021).

Sejauh ini, belum banyak penelitian yang mengkaji mengenai pengaruh variasi rasio enzim substrat dan waktu hidrolisis dalam hidrolisis protein kecambah kacang-kacangan khususnya kecambah kacang tunggak. Penelitian diawali dengan ekstraksi protein dari tepung kecambah kacang tunggak dengan metode ekstraksi alkalik-presipitasi isoelektrik sehingga akan diperoleh konsentrat protein yang dijadikan sebagai substrat dalam reaksi hidrolisis protein. Dalam penelitian ini dilakukan monitoring berjalannya reaksi hidrolisis konsentrat protein kecambah kacang tunggak oleh enzim alkalase pada perlakuan variasi rasio enzim substrat (rasio E/S) dan

waktu hidrolisis. Monitoring dilakukan menggunakan parameter nilai derajat hidrolisis (dengan metode SN-TCA), kadar α -amino bebas dan kadar protein terlarut.

MATERI DAN METODE

Bahan

Kacang tunggak (diperoleh dari pasar tradisional daerah Jimbaran, Badung, Bali), HCl, NaOH, Ninhidrin, CuSO₄, NaKTartrat, enzim alkalase (Sunson Industry Group), akuades, kasein, natrium hipoklorit (NaClO) teknis, buffer fosfat pH 8, H₂SO₄, asam borat (H₃BO₃). Semua bahan kimia yang digunakan memiliki spesifikasi pro analisa kecuali disebutkan lain.

Peralatan

Peralatan gelas, *waterbath-shaker*, oven, ayakan 60 mesh, *magnetic-stirrer*, alat sentrifugasi, spektrofotometer UV-Vis merk Shimadzu.

Cara Kerja

Perkecambahan kacang tunggak dan pembuatan tepung kecambah kacang tunggak

Sebanyak 1 kg kacang tunggak yang telah disortir lalu dicuci kemudian kacang diimbibisi selama \pm 5 jam menggunakan air hangat suhu 50°C sebanyak 3 liter. Kacang kemudian dikecambahkan dalam keranjang plastik beralaskan daun pisang dan ditutup daun pisang. Kacang tunggak kemudian dikecambahkan pada suhu ruang dan disemprot dengan aquades setiap 12 jam untuk menjaga kelembabannya. Waktu perkecambahan dilakukan selama 2 hari. Kacang tunggak yang telah selesai dikecambahkan disimpan pada freezer minimal selama 4 jam. Selanjutnya kecambah kacang tunggak dikupas kulitnya lalu digeprek dan dikeringkan dalam oven selama 24 jam pada suhu 50°C. Kecambah kering selanjutnya ditepungkan dengan cara diblender dan diayak (ukuran 60 mesh).

Ekstraksi protein kecambah kacang tunggak

Sebanyak 20 g tepung kecambah ditambahkan NaOH 0,01% sebanyak 200 mL kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada kecepatan 500 rpm selama 60 menit. Selanjutnya campuran disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 40°C

selama 15 menit. Supernatan hasil sentrifugasi ditampung, sedangkan pelet diekstraksi kembali menggunakan NaOH 0,01% dengan jumlah setengah dari volume awal (dengan prosedur yang sama seperti ekstraksi pertama), sehingga diperoleh supernatan kedua. Kedua supernatan kemudian digabungkan menjadi satu dan disebut sebagai ekstrak protein. Ekstrak protein tersebut selanjutnya diatur pHnya menjadi 4,5 dengan penambahan HCl 2N sehingga protein akan mengendap. Campuran selanjutnya disentrifugasi pada 5000 rpm (15 menit) lalu diambil pelletnya. Langkah selanjutnya yaitu pellet protein yang dihasilkan dicuci dengan aquades untuk menghilangkan kotoran yang mungkin masih terbawa saat sentrifugasi. Selanjutnya dilakukan pengaturan pH 4,5 lalu disentrifugasi kembali, komponen protein yang telah terendapkan akan berada pada pelet. Pelet protein yang dihasilkan disimpan pada suhu -20°C dan ditentukan kadar protein totalnya dengan metode Kjehdahl.

Hidrolisis protein kecambah kacang tunggak dengan enzim alkalase

Larutan substrat protein (dibuat dari konsentrat protein kecambah kacang tunggak (4,5% dalam buffer fosfat pH 8,0) dihidrolisis dengan enzim alkalase dengan kondisi perlakuan sebagai berikut: variasi rasio E/S 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 dan 3,0%, serta variasi waktu hidrolisis yaitu: 0 jam (T0), 1 jam (T1), 2 jam (T2), dan 3 jam (T3). Proses hidrolisis dilakukan di atas *waterbath-shaker* pada suhu 50°C. Setelah hidrolisis, proses inaktivasi enzim dilakukan dengan cara memanaskan larutan pada suhu 100°C selama 10 menit. Kemudian, masing-masing larutan disentrifugasi selama 10 menit pada 4000 rpm. Supernatan yang diperoleh merupakan sampel hidrolisat protein yang kemudian disimpan di dalam freezer pada suhu -20°C sebelum dilakukan analisis lebih lanjut.

Monitoring berjalannya reaksi hidrolisis protein

Keberhasilan berlangsungnya proses hidrolisis protein dimonitor dilakukan terhadap sampel hidrolisat protein yang dihasilkan dari masing-masing perlakuan melalui analisis tiga parameter hidrolisis yaitu: kadar α -amino bebas, kadar protein terlarut dan nilai Derajat Hidrolisis. Analisis kadar α -amino bebas ditentukan dengan secara spektrofotometri-

visible dengan metode Ninhydrin menggunakan standar asam amino leusin. Analisis kadar protein terlarut dilakukan secara spektrofotometri-visible dengan metode Biuret menggunakan larutan standar kasein (Layne, 1957). Analisis Derajat Hidrolisis (DH%) dilakukan dengan metode SN-TCA (Soluble Nitrogen-TriChloroAcetic Acid) (AOAC, 1995).

Analisis kadar α -amino bebas secara spektrofotometri-visible metode Ninhydrin

Larutan stok standar asam amino (diwakili oleh leusin) 5,0 mg/mL diencerkan dalam pembuatan serangkaian larutan standar. Sebanyak 1,0 mL sampel dicampur dengan 0,6 mL reagen ninhidrin dan dihomogenkan. Campuran selanjutnya dipanaskan pada suhu 85°C selama 8 menit. Semua campuran selanjutnya dibaca absorbansinya pada 570 nm. Kadar α -amino bebas diperoleh dengan cara memplot nilai absorbansi sampel pada kurva standar leusin .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil tahap ekstraksi protein kecambah kacang tunggak.

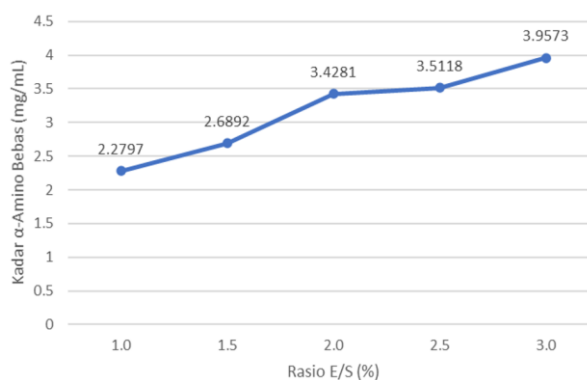
Tahap ekstraksi protein terhadap tepung kecambah kacang tunggak menghasilkan endapan protein berwarna putih susu yang merupakan konsentrat protein. Konsentrat protein yang berhasil diperoleh mencapai 61 gram dari 120 g sampel tepung kecambah kacang tunggak yang diisolasi, sehingga diperoleh nilai rendemen sebesar 51,42%.

Untuk mengetahui tingkat kemurnian dari ekstrak protein kecambah kacang tunggak yang telah diperoleh tersebut, maka dilakukan analisis kadar protein total dengan metode Kjeldahl. Hasil analisis dengan metode Kjeldahl tersebut memperoleh nilai %N sebesar 10,89%, yang kemudian dikalikan dengan faktor konversi 6,25 maka diperoleh nilai kadar protein total yaitu sebesar 68,11%. Nilai kadar protein total yang diperoleh tersebut berada dalam kisaran 50-70%, sehingga memenuhi kriteria sebagai konsentrat protein. Jika dibandingkan dengan hasil penelitian sejenis menggunakan sampel kacang yang berbeda, maka hasil ekstraksi yang dilakukan dalam penelitian ini telah mampu menghasilkan konsentrat protein dengan tingkat kemurnian yang lebih tinggi (kadar protein total mencapai 68,11%). Penelitian Gomez *et al.* (2021)

melaporkan kadar protein total dari konsentrat protein kacang tunggak (yang tidak dikecambahkan) sebesar 58%, sedangkan penelitian Qayyum dkk. (2012) melaporkan bahwa kadar protein total konsentrat protein kacang merah sebesar 52,83%.

Monitoring kadar α -amino bebas pada perlakuan variasi rasio E/S.

Berdasarkan hasil absorbansi larutan standar leusin diperoleh persamaan regresi linier $y = 1,7630x + 0,0208$ serta nilai koefisien korelasi (r) mencapai 0,9963. Hasil analisis kadar α -amino bebas sampel hidrolisat protein kecambah kacang tunggak dengan variasi rasio E/S dapat dilihat pada Gambar 1.

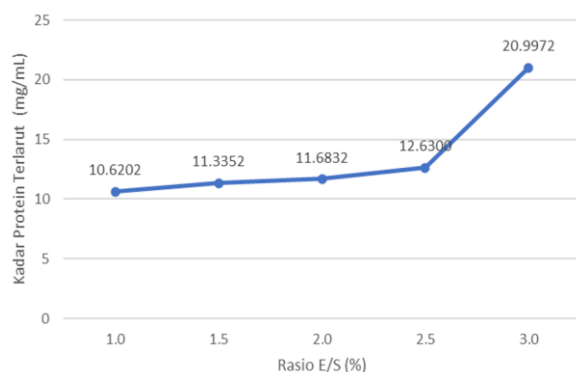


Gambar 1. Grafik kadar kadar α -amino bebas pada perlakuan variasi rasio E/S

Grafik pada Gambar 1 menunjukkan kadar α -amino bebas tertinggi diperoleh pada variasi rasio E/S 3% yaitu sebesar 3,9573 mg/mL. Semakin tinggi jumlah enzim pada rentang tertentu dengan jumlah substrat yang dibuat tetap, maka semakin banyak enzim yang dapat berinteraksi dengan substrat untuk mengkatalisis reaksi hidrolisis. Hal ini berdampak pada ikatan peptida yang terputus melepaskan gugus α -amino bebas juga semakin banyak. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Cho dkk. (2014) bahwa semakin banyak ikatan peptida yang terputus maka komponen dengan gugus α -amino bebas yang terlepas akan semakin banyak sehingga kadar α -amino bebas pada sampel semakin meningkat. Kadar α -amino bebas terendah terjadi pada perlakuan rasio E/S 1%. Rendahnya kadar α -amino bebas disebabkan oleh sedikitnya jumlah enzim yang dapat kontak dengan substrat sehingga ikatan peptida yang terputus melepaskan komponen senyawa dengan gugus α -amino bebas juga sedikit.

Kadar protein terlarut pada perlakuan variasi rasio E/S

Kadar protein terlarut ditentukan dengan biuret karena reagen biuret dapat mendeteksi adanya ikatan peptida pada rantai protein atau polipeptida. Penelitian ini menggunakan kasein sebagai larutan standar protein dan didapatkan persamaan regresi linier $y=0,0345x + 0,0298$ dengan nilai koefisien korelasi (r) mencapai 0,9969. Kadar protein terlarut sampel hidrolisat protein kecambah kacang tunggak ditampilkan pada Gambar 2.



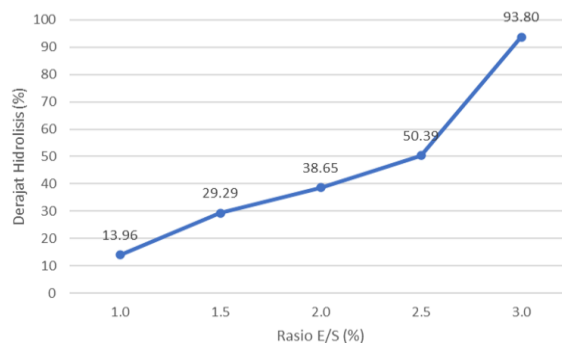
Gambar 2. Grafik kadar protein terlarut sampel pada perlakuan variasi rasio E/S

Grafik pada Gambar 2 menunjukkan bahwa kadar protein terlarut tertinggi (pada batas variasi rasio E/S 1%; 1,5%; 2%; 2,5%; dan 3%) diperoleh pada variasi rasio E/S 3% sebesar 20,9972 mg/mL. Hal ini terjadi karena semakin banyak jumlah enzim yang ditambahkan dapat meningkatkan jumlah ikatan peptida yang terputus melepaskan polipeptida pendek yang bersifat lebih larut dalam air atau protein terlarut. Dengan demikian terdapat lebih banyak polipeptida dengan berat molekul rendah yang terbentuk dan bersifat lebih mudah larut. Banyaknya peptida pendek ini yang diukur sebagai kadar protein terlarut dalam sampel hidrolisat protein kecambah kacang tunggak dan membentuk kompleks berwarna ungu dengan reagen biuret.

Nilai derajat hidrolisis (DH%) perlakuan variasi rasio E/S

Derajat hidrolisis menunjukkan persentase jumlah ikatan peptida yang terputus akibat reaksi hidrolisis. Derajat hidrolisis dalam penelitian ini dianalisis dengan metode SN-TCA dengan prinsip penentuan jumlah nitrogen yang terlarut dalam larutan TCA. Hasil perhitungan derajat hidrolisis pada masing-

masing sampel hidrolisat protein dengan variasi E/S disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Grafik nilai DH% sampel perlakuan variasi rasio E/S

Grafik pada Gambar 3 menunjukkan nilai DH% tertinggi diperoleh pada perlakuan rasio E/S 3,0% yaitu sebesar 93,80%. Nilai derajat hidrolisis suatu hidrolisat protein dipengaruhi oleh jumlah ikatan peptida yang terputus sebagai hasil hidrolisis ikatan peptida pada protein oleh aktivitas enzim alkalase. Semakin banyak jumlah enzim yang kontak dengan substrat protein menyebabkan aktivitas pemutusan ikatan peptida oleh enzim alkalase juga semakin tinggi. Nilai derajat hidrolisis yang meningkat menunjukkan bahwa proses hidrolisis yang berlangsung semakin efektif (Cahyaningati, 2019). Demikian juga pada rasio E/S 1,0% menghasilkan DH% yang paling rendah yaitu sebesar 13,96%. Rendahnya nilai DH% ini disebabkan karena jumlah enzim yang telah habis bereaksi dengan substrat, menyebabkan reaksi hidrolisis tidak dapat berlangsung. Hasil penelitian sejenis pada protein kedelai memperoleh nilai DH% tertinggi pada rasio E/S 2,5% (Islam dkk., 2022).

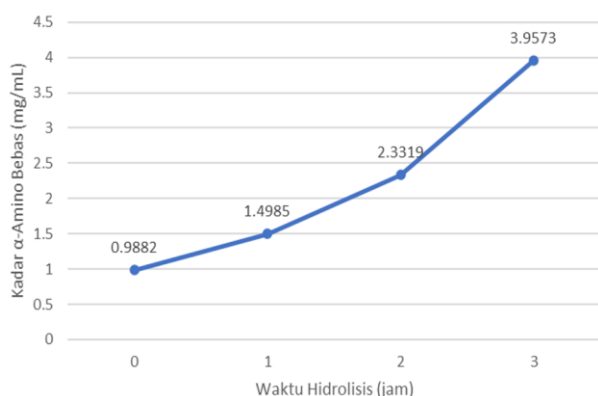
Monitoring Kadar α -Amino Bebas, Kadar Protein Terlarut, dan Derajat Hidrolisis Pada Perlakuan Variasi Waktu Hidrolisis

Lamanya waktu hidrolisis juga mempengaruhi kadar α -amino bebas, kadar protein terlarut dan derajat hidrolisis dari hidrolisat protein yang dihasilkan selama proses hidrolisis protein. Pengaruh waktu ini disebabkan karena dengan peningkatan waktu hidrolisis maka semakin meningkat jumlah interaksi antara enzim dengan substrat dalam mengkatalisis reaksi hidrolisis sehingga semakin banyak juga ikatan peptida yang terputus menghasilkan α -amino bebas dan

protein terlarut. Pengaruh variasi waktu hidrolisis terhadap kadar α -amino bebas, protein terlarut, dan derajat hidrolisis ditentukan menggunakan variasi waktu hidrolisis selama 0, 1, 2, dan 3 jam pada rasio E/S yang memberikan nilai DH% tertinggi yaitu rasio E/S 3%.

Kadar α -amino bebas pada perlakuan variasi waktu hidrolisis

Kadar α -amino bebas dari sampel hidrolisat protein kacang tunggak pada variasi waktu hidrolisis ditampilkan pada Gambar 4.

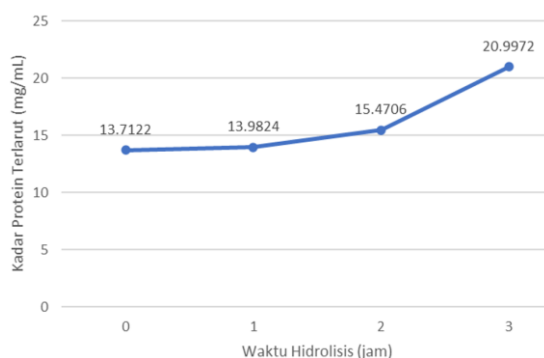


Gambar 4. Kadar α -amino bebas sampel perlakuan variasi waktu hidrolisis

Gambar 4. menunjukkan kadar α -amino bebas tertinggi (pada batas variasi waktu hidrolisis selama 0, 1, 2, dan 3 jam) diperoleh pada perlakuan hidrolisis selama 3 jam sebesar 3,9573 mg/mL. Perubahan ini menunjukkan bahwa dengan peningkatan waktu hidrolisis, maka semakin meningkat peluang enzim untuk dapat berinteraksi dengan substrat mengkatalisis reaksi hidrolisis yang mengakibatkan semakin banyaknya ikatan peptida yang terputus dan melepaskan komponen senyawa yang membawa gugus α -amino bebas. Pernyataan ini diperkuat oleh penelitian Prastika dkk. (2019) di mana variasi waktu hidrolisis mempengaruhi pemutusan ikatan peptida dimana semakin meningkat waktu hidrolisis menyebabkan kadar α -amino bebas juga semakin meningkat. Kadar α -amino bebas terendah dihasilkan pada perlakuan waktu hidrolisis 0 jam sebesar 0,9882 mg/mL. Cho dkk (2014) menemukan bahwa pada hidrolisis protein putih telur, penggunaan enzim alkalase mampu menghasilkan kadar α -amino bebas lebih tinggi daripada enzim flavourzyme dan enzim neutrase mampu menghasilkan kadar tertinggi.

Kadar protein terlarut pada perlakuan variasi waktu hidrolisis

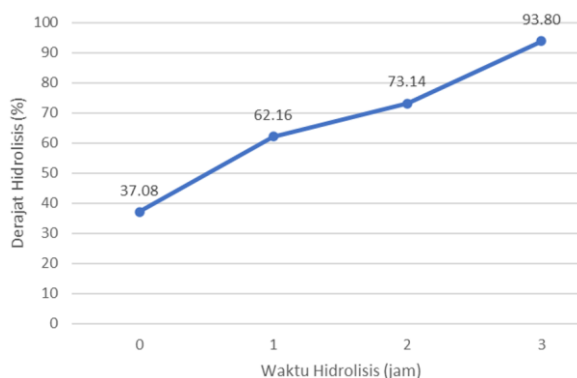
Kadar protein terlarut hidrolisat protein kacang tunggak pada perlakuan variasi waktu hidrolisis ditampilkan pada Gambar 5. Gambar 5 menunjukkan kadar protein terlarut tertinggi (pada batas variasi waktu hidrolisis selama 0, 1, 2, dan 3 jam) diperoleh pada perlakuan hidrolisis selama 3 jam sebesar 20,9972 mg/mL. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Kurniawan dkk. (2014) dimana peningkatan waktu hidrolisis mampu meningkatkan kadar protein terlarut dalam produk hidrolisat protein. Semakin meningkat waktu hidrolisis maka semakin meningkat jumlah ikatan peptida yang terputus menjadi polipeptida rantai pendek yang bersifat lebih mudah larut atau yang disebut sebagai protein terlarut.



Gambar 5. Kadar protein terlarut sampel perlakuan variasi waktu hidrolisis

Nilai derajat hidrolisis pada perlakuan variasi waktu hidrolisis

Semakin lama waktu hidrolisis juga memengaruhi hasil derajat hidrolisis sampel hidrolisat protein kacang tunggak. Hal ini ditampilkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Grafik nilai DH% sampel perlakuan variasi waktu hidrolisis

Semakin lama proses hidrolisis maka aktivitas pemotongan ikatan peptida oleh enzim alkalase semakin meningkat. Gambar 6. menunjukkan nilai DH% tertinggi pada batas variasi waktu hidrolisis selama 0, 1, 2, dan 3 jam diperoleh pada perlakuan hidrolisis selama 3 jam sebesar 93,80%. Peningkatan nilai derajat hidrolisis ini karena peningkatan waktu hidrolisis dapat meningkatkan peluang bagi molekul enzim untuk dapat berinteraksi dengan molekul substrat sehingga proses katalisis lebih efektif. Hal ini menyebabkan ikatan peptida yang terputus juga semakin banyak dan menghasilkan nilai DH% yang semakin tinggi. Hasil penelitian Ma dkk. (2015) pada hidrolisis protein kacang kedelai menggunakan enzim alkalase memperoleh waktu hidrolisis optimum yang mampu menghasilkan nilai DH% tertinggi yaitu selama 2 jam.

SIMPULAN

Hasil tahap ekstraksi protein dari tepung kecambah kacang tunggak mampu menghasilkan konsentrat protein dengan rendemen sebesar 51,42%. Tingkat kemurnian dari konsentrat protein tersebut cukup tinggi yang ditunjukkan melalui hasil analisis kadar protein total (Metode Kjeldahl) yang mencapai 68,11%. Hasil monitoring reaksi hidrolisis menunjukkan terjadinya peningkatan kadar α -amino bebas, nilai derajat hidrolisis dan kadar protein terlarut seiring bertambahnya variasi rasio E/S dan waktu hidrolisis. Kadar α -amino bebas tertinggi diperoleh pada perlakuan rasio E/S 3% dan waktu hidrolisis 3 jam yaitu sebesar 3,9573 mg/mL. Kadar protein terlarut tertinggi diperoleh pada perlakuan rasio E/S 3% dan waktu hidrolisis 3 jam yaitu sebesar 20,9972 mg/mL. Nilai DH% tertinggi diperoleh pada perlakuan rasio E/S 3% dan waktu hidrolisis 3 jam yaitu sebesar 93,80%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Dalam kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada LPPM Universitas Udayana atas dukungan dana dalam pelaksanaan penelitian ini melalui hibah DIPA PNPB Universitas Udayana TA-2023, skema Penelitian Unggulan Program Studi (PUPS) Universitas Udayana Tahun 2023 dengan Surat Perjanjian Penugasan Pelaksanaan Penelitian

Nomor: B/1.822/UN14.4.A/PT.01.03/2023
tanggal 02 Mei 2023.

DAFTAR PUSTAKA

- Bau, H.M., Vilaume, C., and Mejean, L. 2000. Effects of soybean (*Glycine max*) germination on biologically active components, nutritional values of seeds and biologically characteristics. *Nahrung Food Journal*. 22(3): 2-6.
- Cahyaningati, K. 2019. Aktivitas Antioksidan Hasil Hidrolisis Enzimatis Protein Ikan Wader (*Rasbora jacobsoni*) Menggunakan Kombinasi Calotropin dan Papain. *Disertasi*. Universitas Jember.
- Chavan, J. K., Kadam, S.S., and Salunkhe, D.K. 1989. Cowpea. (ed) *CRC Handbook of World Food Legumes*. 2nd Eds. CRC Press. Florida.
- Cho, Y.D., Jo, K., Cho, Y.S, Kim, M.J., Lim K., Suh, J.H., Oh, S. 2014. Antioxidant effect and functional properties of hydrolysates derived from egg-white protein. *Korean J Food Sci Anim Res*. 34:362–371. doi: 10.5851/kosfa.2014.34.3.362.
- Daliri, H., Ahmadi R., Pezeshki, A., Hamishehkar, H., Mohammadi, M., Beyrami, H., Khakbaz Heshmati, M., Ghorbani, M. 2021. Quinoa bioactive protein hydrolysate produced by pancreatin enzyme-functional and antioxidant properties, *LWT*. 150:111853.
- Deleu, Lomme, Lambrecht, Marlies, Van De Vondel, Julie, Delcour, Jan., 2019, The impact alkaline conditions on storage proteins of cereals and pseudo-cereals, *Current Opinion in Food Science*. 25: 98-103. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.02.017>
- Elvira, N., Wisaniyasa, N. W., & A, N. M. I. H. 2019. Studi Sifat Kimia, Fungsional, dan Daya Cerna Protein Tepung Kecambah Kacang Tunggak (*Vigna Unguiculata* L. Walp). *Scientific Journal of Food Technology*, 6(1), 43–53.
- Gomez, A., Gay, C., Tironi, V., & Avanza, M. V. 2021. Structural and antioxidant properties of cowpea protein

- hydrolysates. *Food Bioscience*. 41: 101074
- Islam, M., Huang, Y., Islam, S., Fan, B., Tong, L., Wang, F. 2022. Influence of the degree of hydrolysis on functional properties and antioxidant activity of enzymatic soybean protein hydrolysates, *Molecules*. 27: 6110. <https://doi.org/10.3390/molecules27186110>
- Kurniawan, K., Lestari, S., & R. J., S. 2014. Hidrolisis protein tinta cumi-cumi (*Loligo* sp) dengan enzim papain. *Jurnal Fishtech*. I(01): 11-13.
- Layne, E., 1957, Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins, *Methods in Enzymology*. 3:447-455.
- Liu, F. F., Li, Y. Q., Wang, C. Y., Liang, Y., Zhao, X. Z., He, J. X., & Mo, H. Z. 2022. Physicochemical, functional and antioxidant properties of mung bean protein enzymatic hydrolysates. *Food Chemistry*. 13(3): 3-97.
- Martianingsih, N., Sudrajat, H.W., dan Darlian, L. 2016. Analisis Kandungan Protein Kecambah Kacang Hijau (*Phaseolus Radiatus* L.) terhadap Variasi Waktu Perkecambahan. *Jurnal AMPIBI*. 1(2): 38-42
- Ma, Y. S., Sun, X. H., and Wang, L. T. 2015. Study on optimal conditions of alcalase enzymatic hydrolysis of soybean protein isolate. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 9(2):54-58.
- Prastika, H. H., Ratnayani, K., Puspawati, N. M., & Laksmiwati, A. A. I. A. M., 2019. Penggunaan enzim pepsin untuk produksi hidrolisat protein kacang gude (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) yang aktif antioksidan. *Cakra Kimia*. 7(2): 80-88.
- Ratnayani, K., Panjaitan, I.W.S., Puspawati, N.M. 2017, Screening potential antioxidant and antibacterial activities of protein hydrolysates derived from germinated lablab bean, pigeon pea and kidney bean. *Journal of Health Science and Medicine*. 1 (1): 24-27
- Segura-Campos, M.R., Espinosa-García, L., Chel-Guerrero, L.A., and Betancur-Ancona, D.A., 2012, Effect of enzymatic hydrolysis on solubility, hydrophobicity, and in vivo digestibility in cowpea (*Vigna unguiculata*), *International Journal of Food Properties*, 15:770-780, DOI: 10.1080/10942912.2010.501469
- Qayyum, M. M. N., Butt, M. S., Anjum, F. M., Nawaz, H. 2012. Composition analysis of some selected legumes for protein isolates recovery. *The journal of Animal and plant sciences*. 22(4): 1156-1162.