

ISOLASI DAN KARAKTERISASI GLOBULIN 7S DAN GLOBULIN 11S DARI SEPULUH VARIETAS KEDELAI INDONESIA

Sri Widowati¹⁾ dan Sri Kusuma Susi Wijaya²⁾

ABSTRAK

Kedelai merupakan bahan pangan sumber protein yang telah menjadi bagian makanan sehari-hari bangsa Indonesia. Setiap varietas kedelai mempunyai mutu bervariasi, terutama dalam komposisi gizi. Mutu hasil olah kedelai sangat dipengaruhi oleh protein yang merupakan komponen utamanya. Globulin 7S dan globulin 11S adalah protein utama dalam kedelai. Adanya informasi tentang protein globulin kedelai diharapkan varietas unggul dapat dibentuk melalui rekayasa genetika. Karakterisasi protein dari sepuluh varietas/ galur kedelai telah dilakukan dengan elektroforesis dan filtrasi gel. Hasil penelitian akan berguna untuk memantau mutu dan kadar protein dari kedelai serta membentuk varietas-varietas unggul kedelai. Kadar fraksi 7S sepuluh varietas/ galur kedelai berkisar antara 6,40 sampai 9,70% bahan kering, sedangkan kadar fraksi 11S berkisar antara 17,90 sampai 28,20% bahan kering. Perbandingan fraksi 11S dan fraksi 7S untuk sepuluh varietas/ galur tersebut lebih dari satu. Pemurnian masing-masing fraksi tersebut dilakukan dengan kromatografi filtrasi gel Sephadex G-100 dan elektroforesis sodium dodesil sulfat (SDS). Dari Sephadex G-100 diperoleh satu puncak untuk setiap fraksi protein. Hal ini berarti setiap fraksi protein hanya mengandung globulin. Karakterisasi protein globulin 7S dengan elektroforesis SDS diperoleh dua fraksi mayor, sedangkan protein globulin 11S diperoleh satu fraksi mayor.

PENDAHULUAN

Peningkatan laju pembangunan dan jumlah penduduk berdampak terhadap peningkatan kebutuhan pangan. Upaya pemenuhan kebutuhan pangan tidak hanya mencakup segi kuantitas saja, tetapi perlu diimbangi dengan pemenuhan zat gizi dalam pangan. Kebutuhan protein masih memegang peranan dalam penyediaan pangan di Indonesia. Usaha pemenuhan kebutuhan protein dilakukan dengan meningkatkan jumlah ketersediaan sumber protein.

Kedelai merupakan bahan pangan sumber protein yang telah menjadi bagian makanan sehari-hari bangsa Indonesia. Pengolahan kedelai secara tradisional menghasilkan bahan makanan yang bervariasi, antara lain tahu, tauge, susu kedelai, kecap, tempe, dan tauco. Hasil olah kedelai umumnya merupakan makanan bernilai gizi baik dan tidak mahal. Kedelai berperan besar dalam peningkatan kesehatan dan gizi masyarakat. Penggunaan hasil olah

¹⁾Peneliti pada Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan Bogor

²⁾Mahasiswa Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor

Mutu kedelai, terutama kandungan protein belum diperhatikan dalam pembentukan varietas. Adanya informasi tentang protein globulin kedelai ini diharapkan varietas unggul dapat dibentuk melalui rekayasa genetika, dengan memperhatikan mutu proteininya.

Penelitian ini bertujuan untuk memisahkan fraksi globulin 7S dan globulin 11S dari isolat protein kedelai, memurnikan fraksi globulin 7S dan globulin 11S dengan menggunakan metode *salting out*, dan kromatografi filtrasi gel, serta menentukan bobot molekul subunit-subunit globulin 7S dan globulin 11S yang telah dimurnikan.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan Enzimatik, Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan Bogor (Balitbio), dan Laboratorium Biokimia FMIPA IPB. Penelitian ini dilakukan dari bulan Oktober 1996 sampai bulan Juni 1997.

Bahan yang digunakan adalah biji kedelai dari sepuluh varietas/ galur Indonesia, yaitu Lumajang, Rinjani, Lokon, Singgalang, 3035/AGS-112-11-4, 85056-9-2-1, 3695 Tabanan, 3586 Nganjuk, 3647 Banyuwangi, dan LB-80 (Gambar 1). Kesepuluh kedelai yang dipilih dari 38 varietas/ galur memiliki perbandingan globulin 11S dengan globulin 7S lebih dari satu. Kedelai yang digunakan berasal dari Balitbio, yang merupakan hasil pemanenan pada umur optimum untuk masing-masing varietas kedelai.

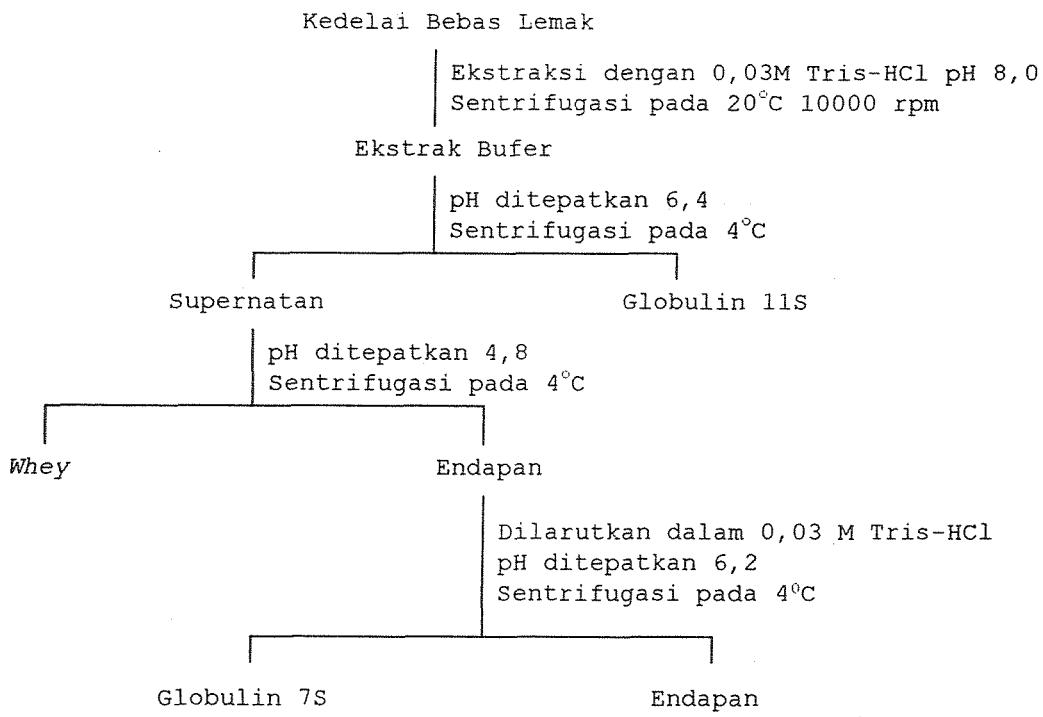
Persiapan Bahan

Biji kedelai sebanyak 200 gram digiling dengan *Hammer-mill* dan disaring dengan saringan berukuran 100 mesh. Tepung kedelai dihilangkan lemaknya dengan metode perkolasai. Tepung kedelai dibungkus dengan kertas saring dan ditutup dengan kapas yang bebas lemak. Bungkusan tersebut dimasukkan ke dalam tabung soklet dan ditetesi dengan n-heksana dari labu pisah. Lemak yang terlarut dalam n-heksana ditampung dalam labu lemak. Tepung kedelai hasil perkolasai yang telah kering dikemas dalam plastik dan disimpan dalam eksikator sampai saat isolasi.

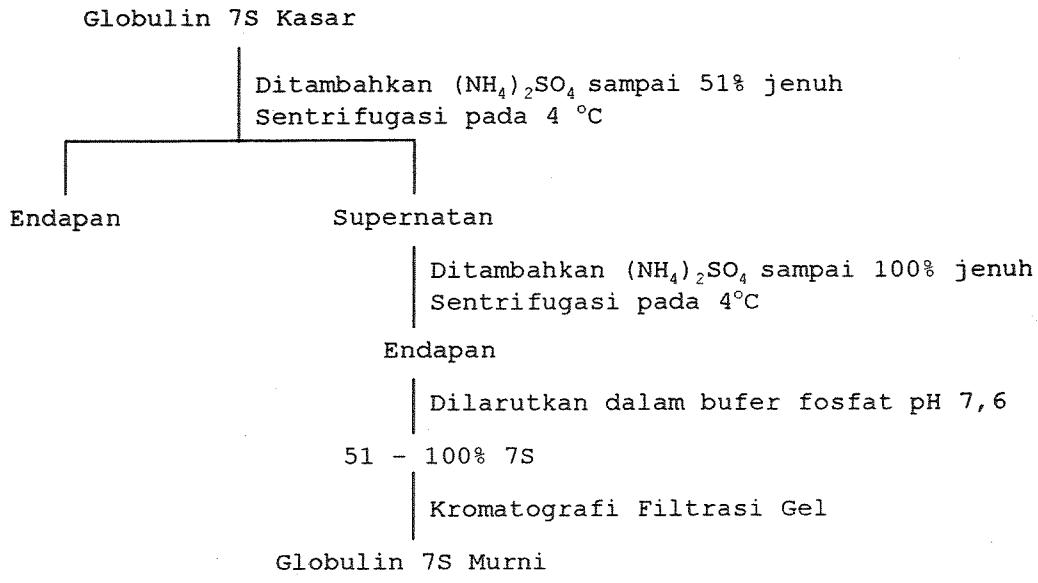
Gambar 1. Biji kedelai dari delapan varietas/ galur Indonesia yang diuji

Globulin 7S dan Globulin 11S

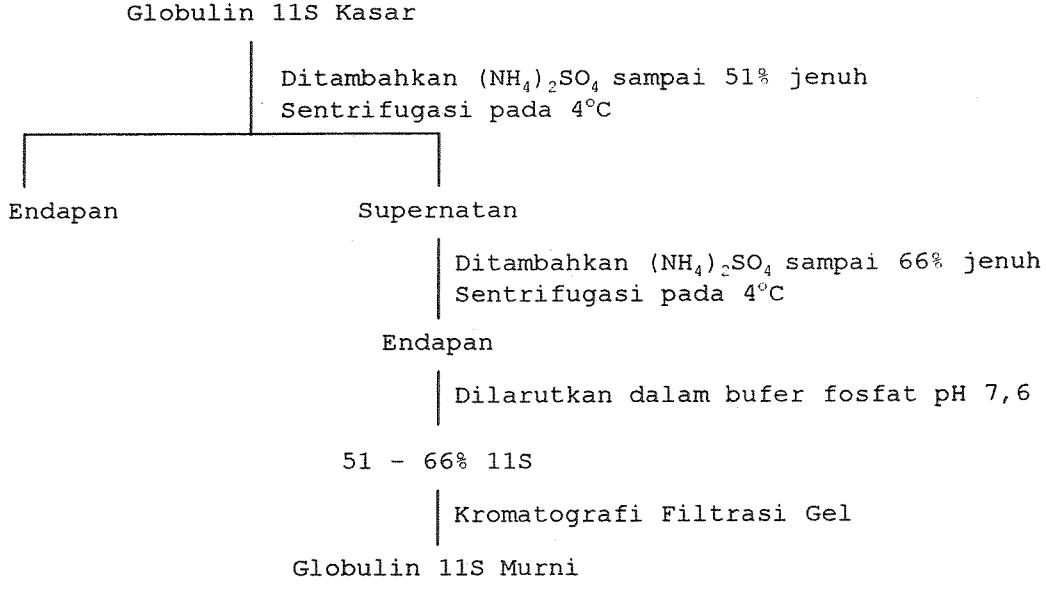
Protein utama kedelai, yaitu globulin 7S dan globulin 11S diperoleh dengan menggunakan metode yang dikemukakan oleh Tanh dan Shibasaki (1976) dengan modifikasi yang dikembangkan oleh Iwabuchi dan Yamauchi (1987). Kedelai bebas lemak disuspensikan dalam 0,03M bufer Tris HCl yang mengandung 10 mM 2-merkaptoetanol pada pH 8,0 dan suhu ruang. Fraksi 7S dan 11S kasar diperoleh dengan pengendapan pada pH 6,4 dan 4,8 (Gambar 2). Kedua fraksi difraksinasi dengan menggunakan amonium sulfat. Fraksi 11S diendapkan pada 51-66% jenuh (Gambar 3), sedangkan fraksi 7S diendapkan pada 51-100% jenuh (Gambar 4). Kedua fraksi tersebut dimurnikan dengan kromatografi filtrasi gel Sephadex G-100 (2,0 x 100 cm). Fraksi dielusi dengan bufer fosfat pH 7,6 yang mengandung 10 mM 2-merkaptoetanol.



Gambar 2. Fraksinasi Globulin 7S dan globulin 11S (Tanh dan Shibasaki, 1976).



Gambar 3. Pemurnian Globulin 7S (Iwabuchi dan Yamauchi, 1987).



Gambar 4. Pemurnian Globulin 11S (Iwabuchi dan Yamauchi, 1987).

Elektroforesis SDS

Globulin 7S dan 11S murni dimasukkan ke dalam gel poliakrilamida 10%, lalu dielektroforesis pada 30 mA selama 3 jam. Pita protein diwarnai dengan 0,2% *Coomassie*

Blue dan penghilangan warna dengan metanol-asam asetat-air (10:7:83). Pita protein yang tampak menandakan subunit-subunit protein (Laemmli, 1970).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fraksinasi Globulin 7S dan Globulin 11S

Globulin 7S dan globulin 11S diisolasi berdasarkan perbedaan titik isoelektriknya dengan menggunakan metode Tanh dan Shibasaki (1976). Protein memiliki kelarutan terkecil pada titik isoelektriknya, sehingga akan mudah mengendap pada pH tersebut. Fraksi 7S mempunyai titik isoelektrik sebesar 4,8 dan fraksi 11S sebesar 6,4. Tabel 1 menunjukkan rata-rata kadar protein fraksi 7S dan fraksi 11S untuk sepuluh varietas kedelai.

Tabel 1. Hasil fraksinasi Globulin 7S dan Globulin 11S dari sepuluh varietas kedelai

Varietas	Fraksi 7S(%)*	Fraksi 11S(%)*	$\frac{11S}{7S}$
Lumajang	7,20	19,50	2,71
Rinjani	8,60	28,20	3,28
Lokon	8,70	21,90	2,51
Singgalang	6,40	17,90	2,79
3035/AGS-112-11-4	8,70	19,70	2,26
85056-9-2-1	9,40	19,70	2,09
3695 Tabanan	9,50	18,70	1,97
3586 Nganjuk	9,70	20,60	2,12
3647 Banyuwangi	7,90	20,70	2,62
LB-80	9,20	21,90	2,38

Keterangan : * dihitung terhadap bobot kering kedelai

Sepuluh varietas kedelai mengandung fraksi 7S sebesar 6,40-9,70% bahan kering dan fraksi 11S sebesar 17,90-28,20% bahan kering. Fraksi 7S ini sebagian besar adalah globulin, sedangkan fraksi 11S seluruhnya merupakan globulin. Perbandingan antara fraksi 11S dengan 7S berkisar 1,97 sampai 3,28. Varietas yang memiliki perbandingan antara fraksi 11S dengan 7S tertinggi adalah Rinjani, sedangkan perbandingan terendah adalah 3695 Tabanan.

Kedelai yang mempunyai protein pembentuk tahu yang tinggi, terutama fraksi 7S dan fraksi 11S cenderung menghasilkan rendemen tahu yang tinggi (Damardjati dan Indrasari,

1990). Varietas Rinjani akan menghasilkan rendemen tahu tertinggi, karena memiliki protein pembentuk tahu yang paling tinggi. Selain itu, tahu tersebut akan memiliki tekstur yang keras, karena varietas tersebut mengandung fraksi 11S paling tinggi. Varietas Singgalang akan menghasilkan rendemen tahu terendah di antara sepuluh varietas yang diuji, karena memiliki fraksi 7S dan fraksi 11S yang rendah. Selain itu, tahu tersebut akan memiliki tekstur yang lunak, karena varietas tersebut mengandung fraksi 11S paling rendah. Berdasarkan hasil penelitian, disarankan untuk menggunakan kedelai varietas Rinjani jika ingin menghasilkan tahu bertekstur keras dengan rendemen tinggi.

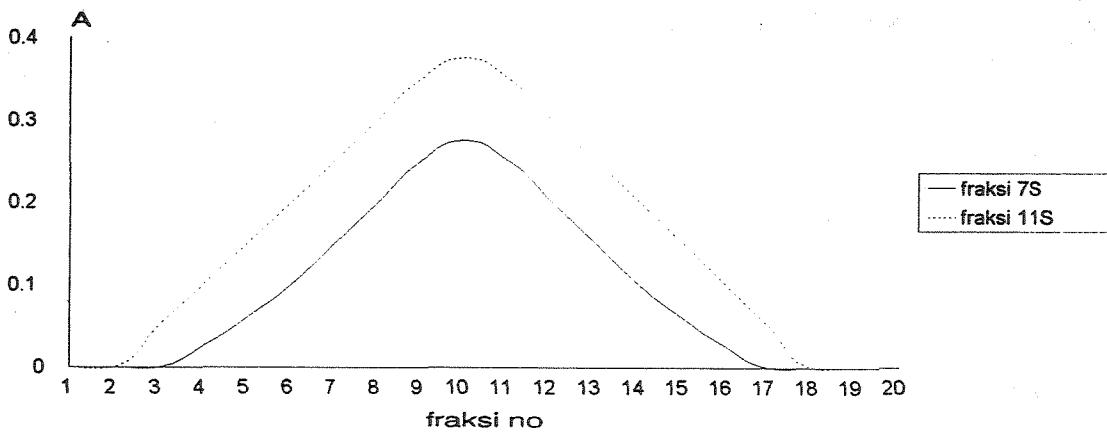
Salting Out

Penambahan larutan jenuh amonium sulfat ke dalam larutan protein merupakan tahap awal dari pemurnian globulin 7S dan globulin 11S. Pemurnian ini bertujuan untuk membebaskan molekul air dari permukaan molekul protein serta mengendapkan globulin dari fraksi 7S dan fraksi 11S. Pengendapan globulin terjadi karena adanya persaingan antara protein dan garam untuk berikatan hidrogen dengan air, sehingga pada konsentrasi garam tinggi tidak tersedia cukup air untuk melarutkan protein. Endapan yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifugasi dan disuspensikan dalam bufer fosfat untuk mengurangi ion-ion sulfat yang terikat pada molekul globulin.

Suspensi yang dihasilkan belum dalam keadaan murni, karena pengaruh ion sulfat masih dominan. Untuk itu dilakukan pemurnian selanjutnya agar diperoleh globulin murni dari fraksi 7S dan fraksi 11S.

Kromatografi Filtrasi Gel

Suspensi hasil *salting out* dialirkan ke dalam kolom dan dicuci dengan bufer fosfat untuk menghilangkan pengaruh ion sulfat dari suspensi protein. Dalam pencucian molekul protein akan menembus butiran gel berpori secara berbeda dan mengalir keluar kolom dengan kecepatan berbeda pula. Molekul protein yang ukurannya melebihi ukuran pori maksimal butiran gel akan keluar pertama dari kolom. Molekul protein yang berukuran lebih kecil dari pori butiran dekstran akan bergerak lebih lambat di dalam kolom dan akan dikeluarkan terakhir.



Gambar 5. Grafik hubungan antara Absorbansi dengan nomor fraksi 7S dan 11S

Gambar 5 memperlihatkan bahwa hasil kromatografi filtrasi gel memiliki satu puncak yang berarti fraksi 7S dan fraksi 11S hasil salting out hanya mengandung globulin. Dalam kromatografi filtrasi gel ini sebagian besar fraksi hasil pemurnian dibuang (fraksi yang berisi protein pencemar relatif lebih banyak) untuk meningkatkan kemurnian. Fraksi yang dikumpulkan adalah fraksi yang banyak mengandung protein. Besarnya kandungan protein dari setiap fraksi dapat diketahui dengan metode Bradford (1976). Semakin besar nilai absorbansi, semakin tinggi kadar protein dari setiap fraksi.

Pemilihan fraksi yang dikumpulkan berdasarkan pada kandungan protein yang relatif tinggi dari fraksi tersebut dibandingkan dengan fraksi-fraksi lainnya. Dari kedua grafik pada Gambar 5 dapat diketahui bahwa puncak grafik adalah fraksi nomor 10. Hal ini berarti fraksi yang mengandung globulin tinggi mulai terlihat pada fraksi tersebut. Fraksi yang dikumpulkan ada lima fraksi, yaitu fraksi dengan nilai absorbansi terbesar (puncak), dua fraksi sebelum puncak, dan dua fraksi setelah puncak. Gambar 5 juga memperlihatkan puncak grafik fraksi 11S lebih tinggi daripada fraksi 7S yang berarti bahwa konsentrasi protein globulin 11S lebih tinggi daripada globulin 7S.

Elektroforesis SDS

Penggunaan SDS dan 2-merkaptoetanol disertai pemanasan akan memecah struktur tiga dimensi dari protein, terutama ikatan disulfida menjadi subunit-subunit polipeptida secara individual. SDS juga membungkus rantai protein yang tidak terikat dengan muatan negatif yang sama membentuk kompleks SDS-protein. Kompleks SDS-protein mempunyai densitas

muatan yang identik dan bergerak pada gel hanya berdasarkan ukuran protein. Kompleks SDS-protein yang lebih besar mempunyai mobilitas yang lebih rendah dibandingkan dengan kompleks yang lebih kecil.

Tabel 2. Nilai Bobot molekul dan Rf dari kit penciri protein BM rendah

Protein	Bobot molekul	Rf
Bovine serum albumin	66000	0,3652
Fumarase	48500	0,4697
Carbonic anhydrase	29000	0,5830
b-lactoglobulin	18400	0,7789
a-lactoglobulin	14200	0,9186

Persamaan antara Rf dengan log BM:

$$\text{Log BM} = -1,2398 \text{ Rf} + 5,2620 \quad r = 0,9965$$

Tabel 3 menunjukkan fraksi globulin 7S hasil elektroforesis SDS memiliki bobot molekul (BM) berkisar 17375 sampai 73601, sedangkan fraksi globulin 11S memiliki BM berkisar 18803 sampai 53095. Pada globulin 7S terdapat enam fraksi protein, sedangkan pada globulin 11S terdapat empat fraksi protein. Semua varietas/ galur kedelai yang diuji menunjukkan pola penyebaran fraksi globulin 7S dan globulin 11S yang serupa. Setiap varietas memiliki jumlah fraksi yang sama untuk globulin 7S dan globulin 11S. Perbedaan yang tampak adalah konsentrasi dari setiap fraksi globulin 7S dan globulin 11S jika dilihat dari ketebalan dan intensitas warna hasil elektroforesis.

Tabel 3. Nilai Bobot molekul dan Rf dari fraksi globulin 7S dan globulin 11S

No fraksi	Globulin 7S		Globulin 11S	
	Rf	BM	Rf	BM
1	0,8043	17375	0,7967	18803
2	0,6367	24767	0,5370	39467
3	0,5885	28229	0,5016	43664
4	0,4718	42596	0,4331	53095
5	0,4477	47604	-	-
6	0,3753	73601	-	-

Dari Gambar 6 dapat dilihat bahwa fraksi globulin 7S memiliki dua fraksi mayor, yaitu fraksi 1 dengan BM 18400 dan fraksi 5 dengan BM 47604. Sedangkan fraksi 11S hanya memiliki satu fraksi mayor yaitu fraksi 1 dengan BM 18803. Fraksi mayor ini memiliki ketebalan dan intensitas warna yang lebih besar dibandingkan fraksi-fraksi lainnya. Selain fraksi mayor, pada globulin 7S terdapat empat fraksi minor, sedangkan pada globulin 11S terdapat tiga fraksi minor yang merupakan subunit-subunit protein. Dalam globulin 7S terdapat dua subunit protein mayor dan empat subunit protein minor, sedangkan dalam globulin 11S terdapat satu subunit protein mayor dan tiga subunit protein minor. Subunit protein mayor merupakan fraksi yang selalu ada pada setiap varietas dan memiliki konsentrasi yang tinggi dibandingkan dengan fraksi-fraksi lainnya. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengetahui komposisi dan urutan asam amino subunit mayor agar informasi ini dapat digunakan untuk membentuk varietas unggul melalui rekayasa genetika.

1. Lumajang
 2. Rinjani
 3. Lokon
 4. Singgalang
 5. 3035/AGS-112-11-4
 6. 85056-9-2-1
 7. 3695 Tabanan
 8. 3586 Nganjuk
 9. 3647 Banyuwangi
 10. LB-80
- A. Kit penciri protein

Gambar 6. Hasil elektroforesis SDS globulin 7S (A) dan globulin 11S (B)

KESIMPULAN

Sepuluh varietas kedelai yang diuji mengandung fraksi globulin 7S sebesar 6,40-9,70% bahan kering dan globulin 11S sebesar 17,90-28,20% bahan kering. Perbandingan antara 11S dengan 7S berkisar 1,97 (3695 Tabanan) - 3,28 (Rinjani).

Pemurnian fraksi 7S dan fraksi 11S dengan *salting out* dan kromatografi filtrasi gel diperoleh satu puncak untuk masing-masing fraksi. Puncak fraksi 11S lebih tinggi daripada fraksi 7S, yang berarti konsentrasi protein globulin 7S lebih rendah daripada globulin 11S.

Karakterisasi protein globulin 7S dengan elektroforesis SDS diperoleh dua fraksi mayor dengan BM 18400 dan 47604, serta empat fraksi minor. Sedangkan protein globulin 11S diperoleh satu fraksi mayor dengan BM 18803 dan tiga fraksi minor. Dalam globulin 7S terdapat dua subunit mayor dan empat subunit minor, serta dalam globulin 11S terdapat satu subunit mayor dan tiga subunit minor.

DAFTAR PUSTAKA

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of proteins-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248.
- Damardjati, D.S. dan S.D. Indrasari. 1991. Sifat fisik dan kimia varietas kedelai dan hubungannya dengan rendemen dan mutu tahu. *Media Penelitian Sukamandi*. 9:43.
- Hermana. 1985. Pengolahan kedelai menjadi berbagai bahan makanan. Di dalam *Kedelai*. Badan Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Bogor.
- Iwabuchi, S. dan F. Yamauchi. 1987. Determination of glycinin and β -conglycinin in soybean proteins by immunological methods. *J. Agr. Food Chem.* 35: 200.
- Juliano, B.O. 1980. *Rice Chemistry and Technology*. The American Association of Cereal Chemistry, Minnesota.
- Kinsella, J.E. 1979. Functional properties of soybean protein. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56: 242.
- Laemmli, V.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680.
- Saio, K., M. Kamiya, dan T. Watanabe. 1969. Food processing characteristics of soybean 11S and 7S proteins. Effect of difference of protein components among soybean varieties on formation of tofu gel. *Agric. Biol. Chem.* 33:1301.

Somaatmadja, S. 1985. Peningkatan produksi kedelai melalui perakitan varietas. Di dalam Kedelai. Badan Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Bogor.

Thanh, V.H. dan K. Shibasaki. 1976. Major proteins of soybean seeds straightforward fractionation and their characterization. *J. Agr. Food Chem.* 24: 1117.

Utsumi, S. dan J.E. Kinsella. 1985. Structure-function relationships in food proteins. Subunit interaction in heat-induced gelation of 7S, 11S and soy isolate proteins. *J. Agric. Food Chem.* 33:297.

Wolf, J.W. 1978. Chemistry and technology of soybean. Di dalam Pomeranz, Y (Ed). Advances in cereal science and technology. American Association of Cereal Chemists, St. Paul.

