

ISOLASI DAN KARAKTERISASI PROTEIN SORGUM DAN PENINGKATAN KARAKTER JEJARING PROTEIN SORGUM DENGAN PENAMBAHAN TRANSGLUTAMINASE ATAU GLUKOSA-OKSIDASE

Isolation and Characterization of Sorghum Protein and Increasing the Sorghum Protein Net-work Character by Using Transglutaminase or Glucose-Oxidase

ENDAH WULANDARI

Universitas Padjadjaran

email Korespondensi: en_wln@yahoo.com

Abstrak

Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan fraksionasi protein dari tepung sorgum galur Zh-30 menggunakan lima macam pelarut dan isolasi transglutaminase kasar dari spora *Bacillus subtilis*. Fraksi-fraksi protein tersebut dianalisis kadar protein dan berat molekul fraksi-fraksi protein dengan SDS-PAGE, serta mengevaluasi pembentukan jejaring protein fraksi protein oleh aktivitas TGase kasar atau glukosa-oksidadase murni pada fraksi-fraksi protein tepung sorgum. Hasil penelitian menunjukkan protein tepung sorgum galur Zh-30 terdiri dari 5 golongan protein yaitu albumin, globulin, kafirin 1, glutelin dan kafirin 2 dengan rasio 11:11:42:7:29. Kadar protein kafirin 1 36.01%, kafirin 2 atau cross-linked kafirin 24.79%; glutelin 22.15%; globulin 12.81% dan albumin 4.24% dari total protein. Berat molekul albumin 69.9 kDa; kafirin 1 yang terbagi menjadi α 1-kafirin 22.4 kDa dan α 2-kafirin 23.5 kDa; globulin 121 kDa; glutelin 15,5 kDa dan kafirin 2 yang terbagi menjadi α 1-kafirin 16,2 kDa, α 2-kafirin 23,5 kDa, β -kafirin 24,6 kDa dan γ -kafirin 53,6 kDa. Tidak terbentuk jejaring protein akibat aktivitas TGase dengan BSA ataupun fraksi-fraksi protein tepung sorgum galur Zh-30 namun jejaring protein terbentuk pada glutelin sorgum (berat molekul 69 kDa dari 15.5 kDa) akibat aktivitas glukosa-oksidadase dengan glutelin.

Kata kunci : protein sorgum, jejaring protein, transglutaminase kasar, glukosa-oksidadase.

Abstract

*The objectives were to fractionate protein of the flour of Zh-30 sorghum strain using five types of solvents, isolate crude transglutaminase of *Bacillus subtilis* spores. The protein fractions were analyzed for protein content and molecular weight by SDS-PAGE and evaluated for protein-network formation by crude transglutaminase and glucose-oxidase. The result showed flour protein of the sorghum Zh-30 strain consisted of five classes of proteins with a ratio of albumin, globuline, kafirin 1, gluteline and kafirin 2 or cross-linked kafirin 11:11:42:7:29 respectively. Kafirin 1 content was 36.01%, kafirin 2 24.79%, gluteline 22.15%, globuline 12.81% and albumin 4.24% of total protein. Molecular weight of each protein fraction of the sorghum flour Zh-30 strain was respectively albumin 69.9 kDa, kafirin 1 which consisted α 1-kafirin 22.4 kDa and α 2-kafirin 23.5 kDa, globuline 121 kDa, gluteline 15.5 kDa and kafirin 2 which consisted of α 1-kafirin 16.2 kDa, α 2-kafirin 23.5 kDa, β -kafirin 24.6 kDa and γ -kafirin 53.6 kDa. No protein network was found due to transglutaminase activity on BSA nor sorghum protein fractions; however protein networking was established when the glutelin fraction was treated with glucose-oxidase (MW 69 kDa from 15.5 kDa).*

Keywords: sorghum protein, protein network, crude transglutaminase, glucose-oxidase.

Pendahuluan

Tepung terigu merupakan bahan dasar yang penting dalam pembuatan roti. Keunikan tepung terigu adalah dapat membentuk adonan yang mampu menahan gas-gas yang terbentuk selama fermentasi sehingga menghasilkan roti yang mengembang dan ringan. Keunikan tersebut disebabkan oleh adanya komponen gluten yang memegang peranan penting dan mendasar dalam menentukan kualitas dan struktur roti. Protein tepung terigu terdiri dari empat fraksi berdasarkan kelarutannya, yaitu albumin yang larut dalam air, globulin dan prolamin yang larut dalam larutan garam, gliadin yang larut dalam alkohol 70 % dan glutenin yang larut dalam larutan alkali encer. Glutenin dan gliadin yang dibasahi dan diuleni akan membentuk gluten. Gliadin memberi elastisitas dan glutenin berperan dalam kemampuan adonan untuk menahan gas dalam adonan serta menentukan struktur roti (Sultan, 1986).

Produk rerotian (bakery) yang berkembang saat ini berbasis pada tepung terigu, namun bagi beberapa kelompok masyarakat khususnya yang tidak toleran terhadap gluten, yaitu pengidap penyakit celiac dan autisme disarankan untuk menghindari makanan-makanan yang mengandung gluten. Produk rerotian/bakery dari

tepung sereal non-gluten umumnya memiliki kualitas yang rendah, terutama dalam hal volume pengembangan, karena tidak mampu membentuk jejaring protein mirip gluten (Renzetti et al., 2008). Ikatan kovalen yang terjadi di dalam jaringan gluten merupakan hasil degradasi protein oleh protease. Protease umumnya ditambahkan pada adonan untuk memperpendek waktu pencampuran, mengurangi konsistensi adonan, mengatur kekuatan gluten dalam adonan roti, memastikan keseragaman adonan serta memperbaiki flavor roti (Goesaert et al., 2005).

Saat ini, tepung sereal non-gluten dapat dimodifikasi sehingga membentuk jejaring protein mirip gluten. Modifikasi tersebut dapat tercapai dengan menggunakan bahan tambahan makanan berupa polimer seperti gum xanthan dan hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) atau enzim. Empat enzim yang umumnya digunakan dalam produk rerotian adalah transglutaminase (TGase), glukosa-oksidadase (GOX), hesose-oksidadase, dan lakase. Ke-empat enzim ini mengkatalisis reaksi perpindahan gugus asil pada protein sehingga menghasilkan ikatan silang dan ikatan kovalen intra-dan inter-molekuler (Joye et al., 2009).

Transglutaminase (EC 2.3.2.13) membentuk ikatan inter-dan intra-molekuler, sehingga degradasi protein dalam proses pembuatan roti tidak terjadi. Enzim ini mengkatalisis reaksi perpindahan gugus asil sehingga menghasilkan ikatan silang dan ikatan kovalen antara residu asam amino L-lisin dan L-glutamin. Fungsi utama dari transglutaminase adalah membentuk ϵ -(γ -glutamyl)-lisin-isopeptida yang berikatan silang (crosslink) secara alami dengan protein atau peptida sehingga terjadi polimerisasi (Moore et al., 2006). TGase terdapat pada jaringan hewan dan tanaman serta mikroorganisme. Produk hasil katalisis TGase berupa ϵ -(γ -glutamyl)-lisin-isopeptida ditemukan pada berbagai protein seperti keratin, elastin dan kolagen. Pada mikroorganisme, ϵ -(γ -glutamyl)-lisin-isopeptida, ditemukan pada spora *Bacillus subtilis* (Suzuki et al., 2000).

Glukosa-oksidadase (GOX, EC 1.1.3.4) mempercepat proses oksidasi pada proses pembuatan adonan produk roti. Enzim ini mengkatalisis reaksi oksidasi dari β -D-glukosa menjadi asam D-glukonat dan hidrogen peroksida. Penambahan glukosa-oksidadase akan mengurangi jumlah ikatan sulfidril (SH) pada fraksi protein, namun meningkatkan pembentukan ikatan disulfida (-S-S-) dan atau ikatan silang ditirosin. GOX terdapat pada berbagai jenis jamur contohnya *Aspergillus niger*. Dalam industri roti, penggunaan transglutaminase dan glukosa oksidase relatif masih baru (Goesaert et al., 2005).

Sorgum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) adalah tanaman sereal penting di dunia karena menempati urutan ke-empat setelah gandum, beras dan jagung. Biji sorgum mengandung sekitar 83% karbohidrat, 3,5 % lemak, dan 10% protein (Suarni, 2004). Dengan demikian biji sorgum dapat berperan sebagai makanan pokok alternatif untuk beras sehingga mengurangi ketergantungan terhadap beras (Mudjishono & Suprpto, 1987). Beberapa negara di Afrika, sorgum juga berperan sebagai sumber protein dan dikonsumsi dengan kombinasi kacang-kacangan untuk melengkapi kebutuhan asam amino esensial karena dibandingkan dengan sereal lainnya, sorgum kekurangan asam amino esensial terutama lisin (Shewry & Halford, 2000).

Protein sorgum terdiri dari albumin (larut air), globulin (larut garam), kafirin 1 (larut alkohol), kafirin 2 atau cross-linked kafirin (larut alkohol dan bahan reduktan), dan glutelin (larut alkohol, detergen dan larutan basa). Kafirin dibedakan atas α , β , dan γ -kafirin berdasarkan perbedaan berat molekul, kemudahan diekstraksi, dan struktur molekulnya, seperti juga berlaku untuk protein jagung. α -kafirin yang berjumlah sekitar 80% dari total kafirin adalah protein utama sorgum, persentase β -kafirin hanya sekitar 5% sedangkan γ -kafirin sekitar 15% dari kadar kafirin biji (Bugusu et al., 2001).

Sifat fungsional protein sorgum dalam pembuatan roti secara umum dibedakan atas, a) kemampuan interaksi antar-protein yang memengaruhi struktur makanan dan b) pengaruh protein terhadap konstituen lain terutama pati. Protein tepung sorgum tidak memiliki kemampuan membentuk struktur roti, karena kafirin terperangkap pada matriks protein dari jaringan corneus endosperm sehingga tidak dapat membentuk adonan yang elastis yang mampu menahan gas-gas

hasil fermentasi ragi, leavening agent ataupun udara (Bugusu et al., 2001).

Penelitian tentang penyosohan biji sorgum diikuti dengan penepungan beras-sorgum menunjukkan bahwa white sorghum yang memiliki biji dengan kandungan tanin rendah lebih disukai untuk pengolahan roti. Tanin memberikan warna merah kecoklatan pada produk dan berinteraksi dengan protein sehingga nilai protein asupan makanan menurun akibat tidak dapat dicerna (Oria et al., 2000).

Sorgum galur Zh-30 termasuk kelompok white sorghum hasil teknik radiasi sinar gamma pada varietas Zhengzu yang berasal dari Cina. Ternyata setelah ditepungkan dapat menggantikan terigu dalam pembuatan muffin (Santosa & Hoeman, 2009).

Berdasarkan karakteristik protein sorgum dan kemampuan TGase dan glukosa-oksidadase dalam membentuk jejaring protein secara alami antar protein atau peptida sehingga terjadi polimerisasi, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai karakterisasi fraksi-fraksi protein tepung sorgum galur Zh-30 dan pembentukan jejaring protein antara fraksi-fraksi protein tepung sorgum dengan penambahan TGase kasar dari spora *B. subtilis* atau glukosa-oksidadase.

Metode

Bahan: Bahan-bahan yang digunakan dalam percobaan ini antara lain adalah tepung sorgum dari galur Zh-30, yang bijinya diperoleh dari Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran, n-heksan, t-butanol dari Merck, aseton, buffer Na-Phosphat 0,5M, 2-merkaptotanol, NaCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, SDS, Na_2CO_3 , NaOH, bahan-bahan kimia untuk analisis elektroforesis, crude transglutaminase dari *B. subtilis*, glukosa-oksidadase. Bahan-bahan untuk analisis kimia antara lain H_2SO_4 , NaOH, HCl, K_2SO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Indikator metilen-blue dan metilen-red, petroleum-eter, alkohol, akuades, asbes dan batu didih.

Alat: Alat-alat yang digunakan adalah stirrer, refrigerated centrifuge, seperangkat alat SDS-PAGE, tabung reaksi, penjepit, desikator, cawan porselen, gelas ukur 500 ml, labu Erlenmeyer 100 ml, labu Kjeldahl 150 ml, labu ukur 100 ml, alat ekstraksi Soxhlet, alat destilasi, pompa vakum, kertas saring, kertas lakmus dan kamera digital.

Metode: Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen dengan analisis deskriptif dengan tahapan-tahapan penelitian yang dilakukan adalah Ekstraksi dan karakterisasi fraksi-fraksi protein tepung sorgum galur Zh-30, isolasi dan karakterisasi TGase kasar dari *B. subtilis*, menguji terjadinya jejaring protein fraksi protein sorgum oleh TGase kasar dari spora *B. subtilis* dan menguji terjadinya jejaring protein sorgum oleh glukosa-oksidadase (GOX).

Hasil Dan Pembahasan

Fraksi Protein dan Kadar Protein Fraksi Protein Tepung Sorgum Galur Zh-30

Hasil analisis proksimat tepung sorgum galur Zh-30 pada Tabel 1, menunjukkan bahwa tepung sorgum dari galur Zh-30 tersebut ternyata mengandung kadar protein dan lemak masing-masing 12,4% dan 5,5%.

Tabel 1
Komposisi Kimia Tepung Sorgum Galur Zh-30

No	Komponen	Jumlah (% bb)
1	Kadar air (%)	14,75
2	Kadar abu (%)	0,30
3	Kadar protein (%)	12,40
4	Kadar lemak (%)	5,50
5	Karbohidrat	67,05

Kadar protein dan lemak tepung sorgum Zh-30 tersebut lebih tinggi bila dibandingkan dengan kadar protein dan lemak yang dilaporkan sebelumnya oleh Frederick (2009), yaitu 9.19 % dan 2.22 %. Menurut Singh et al., 2006, komposisi kimia tepung sorgum bervariasi tergantung dari kultivar dan iklim serta kondisi tanah selama pertumbuhan tanaman.

Protein sorgum terdiri atas 4 fraksi menurut kelarutan dalam berbagai pelarut yaitu albumin (protein larut air), globulin (protein larut dalam larutan garam), kafirin 1 (protein larut alkohol) dan glutelin (protein larut larutan alkali encer). Ekstraksi protein dengan metode Nour (1998) dilakukan secara bertingkat dengan menggunakan larutan garam, larutan t-butanol 60%, bufer Na-fosfat pH 9 yang mengandung SDS 2% dan t-butanol 60% yang mengandung 5% β -merkaptotanol. Hasil ekstraksi dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Fraksi Protein (mg/g)
dan Kadar Fraksi Protein Tepung Sorgum Galur Zh-30

Pelarut	Fraksi Protein	Hasil Pengendapan*) (g)	Total Protein **) (mg/g)	Kadar Protein (%)
Akuades	Albumin	1,08 $\pm$ 0,13	6,00 $\pm$ 0,07	4.24
NaCl 0,5M	Globulin	1,17 $\pm$ 0,12	18,14 $\pm$ 0,17	12.81
t-Butanol 60%	Kafirin 1	4,28 $\pm$ 0,34	51,00 $\pm$ 0,07	36.01
Bufer Na-fosfat	Glutelin	0,75 $\pm$ 0,58	31,36 $\pm$ 0,04	22.15z

Keterangan:

Hasil pengukuran merupakan rata-rata dari triplo

*) Pengendapan fraksi protein dengan aseton dingin (1:9)

**) Total protein = N-Lowry x mL hasil ekstraksi

Pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa berdasarkan hasil pengendapan fraksi protein dengan aseton dingin dengan perbandingan 1:9, maka fraksi protein kafirin 1 merupakan komponen yang terbanyak diikuti selanjutnya oleh fraksi kafirin 2, globulin, albumin dan glutelin. Rasio albumin : globulin : kafirin 1 : glutelin : kafirin 2 adalah rata-rata 11:11:42:7:29. Rasio tersebut lebih rendah dari rasio fraksi yang dilaporkan oleh Boulter & Derbyshire (1978) dikutip Santosa & Moeljapawiro (1990) yaitu rasio albumin: globulin: prolamin: glutelin sorgum adalah 8:8:52:32.

Kadar fraksi-fraksi protein tepung sorgum galur Zh-30 pada Tabel 5 menunjukkan bahwa fraksi kafirin 1 merupakan penyusun utama protein tepung sorgum dengan persentasenya sekitar 36.01%, kafirin 2 atau cross-linked kafirin 24.79%; glutelin 22.15%; globulin 12.81% dan albumin 4.24% dari total protein. Persentase kadar protein tepung sorgum galur Zh-30 ini sedikit berbeda dengan yang dilaporkan sebelumnya oleh FAO (1995) yang melaporkan kadar kafirin saja yang berkisar antara 27%-43,1%, glutelin 26,1%-39,6%, globulin 12,9%-16%, dan albumin 2%-9%. Perbedaan perbandingan kadar protein antar-fraksi ini

dipengaruhi oleh kultivar yaitu faktor genetik serta faktor lingkungan dan kesuburan tanah (Rooney dan Saldivar, 2005 dikutip Kebakile, 2008).

Berat Molekul Fraksi Protein Tepung Sorgum Galur Zh-30

Pada penelitian ini digunakan tujuh protein standar yang telah diketahui berat molekulnya (BM), yaitu β -galactosidase, BSA, ovalbumin, lactate dehydrogenase, Rease Bsp981, β -lactoglobulin dan lisozim. BM masing-masing marker protein ini dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Jarak Migrasi dari Marker Beserta Nilai Rf dan Berat Molekul dari Masing-Masing Pita.

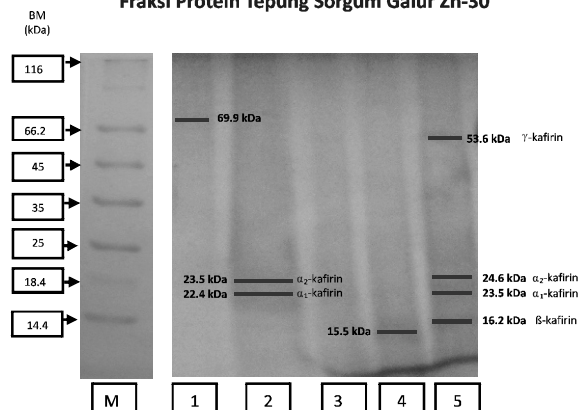
Jenis Protein Marker	Jarak Marker (cm)	Rf Marker	BM Marker (kDa)	Log BM
β -galactosidase	0.2	0.03	116	2.06
BSA	1.2	0.20	66.2	1.82
Ovalbumin	2	0.33	45	1.65
Lactate dehydrogenase	2.7	0.45	35	1.54
Rease Bsp981	3.5	0.58	25	1.40
β -lactoglobulin	4	0.67	18.4	1.26
lysozyme	4.5	0.75	14.4	1.16

Elektroforesis menghasilkan pita-pita pola elektroforesis (Gambar 1) sedangkan jarak migrasi pita fraksi protein tepung sorgum dapat dilihat pada Tabel 4.

Dari kurva standar BM protein maka didapat BM masing-masing pita pada kafirin 1 adalah 22.4 kDa dan 23.5 kDa, kafirin 2 adalah 16.2 kDa, 23.5 kDa, 24.6 kDa dan 53.6 kDa sedangkan BM albumin, globulin dan glutelin adalah 69.9 kDa, 121 kDa dan 15.5 kDa.

Hasil elektroforesis globulin tidak menghasilkan pita yang jelas, karena BM globulin mungkin terlalu besar sehingga tidak dapat masuk dalam gel. Rooney & Saldivar (2000) menyatakan bahwa protein sorgum sebagian besar berupa kafirin (protein larut alkohol) dan glutelin. Glutelin merupakan fraksi protein kedua terbesar dari protein sorgum. Wall et al., (1988) menyatakan bahwa glutelin merupakan fraksi protein dengan low molecular weight yaitu 10 kDa - 27 kDa.

Gambar 1. Pola SDS-PAGE
Fraksi Protein Tepung Sorgum Galur Zh-30



Keterangan:

M : Marker protein

1: Albumin
2: Kafirin 1
3: Globulin

4: Glutelin
5: Kafirin 2

Tabel 4. Jarak Migrasi Pita Fraksi Protein Tepung Sorgum Galur Zh-30

Fraksi Protein	Jarak Sampel (cm)	Rf sampel	Log BM sampel (kDa)	BM sampel (kDa)
Albumin	1.2	0.20	1.84	69.9
Kafirin 1	3.5	0.58	1.37	23.5
	3.6	0.60	1.35	22.4
Globulin	0	0.00	2.08	121
Glutelin	4.4	0.73	1.19	15.5
Kafirin 2	1.7	0.28	1.73	53.6
	3.4	0.57	1.39	24.6
	3.5	0.58	1.37	23.5
	4.3	0.72	1.21	16.2

Penggunaan bahan reduktan β -merkaptotanol dalam ekstraksi kafirin 2 untuk mengurangi ikatan disulfida sehingga kafirin 2 atau cross-linked kafirin dapat terekstrak dengan baik. Hal ini berdasarkan penelitian Shewry & Halford, (2000) yang menyebutkan bahwa kafirin 2 lebih bersifat hidrofobik sehingga lebih baik jika diekstraksi dengan larutan alkohol yang mengandung bahan reduktan seperti ditiotritol atau β -merkaptotanol.

Berdasarkan data BM tersebut, maka terdapat tiga tipe kafirin pada protein tepung sorgum galur Zh-30 yaitu α -kafirin, β -kafirin dan γ -kafirin. Menurut Musigakun & Thongngam (2007) menyebutkan bahwa α -kafirin mempunyai BM antara 20 kDa–24 kDa, β -kafirin mempunyai BM antara 14 kDa–19 kDa sedangkan γ -kafirin mempunyai BM sekitar 36 kDa. Demikian juga Nour et al., (1997) menyebutkan bahwa α -kafirin umumnya mempunyai 2 sub-unit polipeptida yang disebut sebagai α 1-kafirin dan α 2-kafirin dengan BM sekitar 24 kDa–26.6 kDa, β -kafirin mempunyai BM sekitar 18 kDa sedangkan γ -kafirin mempunyai BM dari 29 kDa.

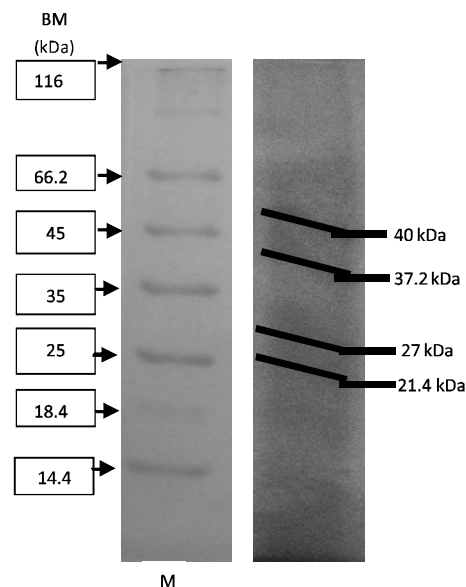
Hasil penelitian menunjukkan kafirin 1 (jalur 2, Gambar 1) menghasilkan 2 pita. Pita pertama merupakan α 1-kafirin dengan BM 22.4 kDa dan pita kedua merupakan α 2-kafirin 23.5 kDa. Kafirin 2 (Jalur 5, Gambar 1) menghasilkan 4 pita. Pita pertama merupakan β -kafirin dengan BM 16.2 kDa dan pita keempat merupakan γ -kafirin dengan BM 53.6 kDa. Pita kedua dan ketiga merupakan α 1 dan α 2-kafirin dengan BM 23.5 kDa dan 24.6 kDa. Hasil ekstraksi ini tidak terlalu berbeda dengan yang dilaporkan sebelumnya oleh Nour et al., (1997) dimana penggunaan bahan reduktan seperti β -merkaptotanol akan membuat β -kafirin dan γ -kafirin lebih banyak terekstrak sehingga akan membentuk pola pita elektroforesis yang lebih jelas dibandingkan jika hanya diekstraksi dengan 60% t-butanol. Hal ini juga mengindikasikan bahwa kafirin 2 merupakan polipeptida dengan ikatan intermolekul disulfida (-S-S-).

Berat Molekul TGase Kasar dari Spora B.subtilis

SDS-PAGE dilakukan terhadap ekstrak TGase kasar dan menghasilkan 2 pola pita elektroforesis yang jelas dan 2 pola pita yang kurang jelas. Dengan menggunakan kurva standar berat molekul maka

didapat berat molekul masing-masing pita yaitu 21.4 kDa, 27 kDa, 37.2 kDa dan 40 kDa.

Gambar 2. Hasil SDS-PAGE Enzim Kasar spora B.subtilis pada Fasa Log 10 Jam



Berdasarkan data berat molekul, diduga kuat kedua enzim yaitu TGase dan protease didapatkan dari ekstrak Tgase kasar. Sesuai dengan yang dilaporkan oleh Kobayashi et al., (1997) bahwa berat molekul TGase adalah 23 kDa, sedangkan Motoki & Kumazawa, (2000) dan Kashiwagi et al., (2002) menyatakan MTGase mempunyai berat molekul 37.9 kDa - 40 kDa sedangkan protease B.subtilis mempunyai berat molekul sekitar 35 kDa (Gamble et al, 2011).

Berat Molekul Jejaring Protein Hasil Reaksi Fraksi Protein Tepung Sorgum Dengan Transglutaminase Kasar Spora B.Subtilis.

Untuk mengetahui ada atau tidaknya aktivitas polimerisasi dari TGase kasar maka dilakukan uji polimerisasi antara TGase kasar dengan BSA dan TGase kasar dengan fraksi protein tepung sorgum galur Zh-30.

Gambar 3. Hasil Polimerisasi TGaseKasar dengan Fraksi Protein Tepung Sorgum Galur Zh-30 atau BSA



Keterangan :

M : Marker protein

1 : Albumin + TGase kasar 7 : BSA

2 : Kafirin 1 + TGase kasar 8 : BSA + TGase kasar nonaktif

3 : Globulin + TGase kasar

4 : Glutelin + TGase kasar

5 : Kafirin 2 + TGase kasar

6 : BSA + TGase kasar

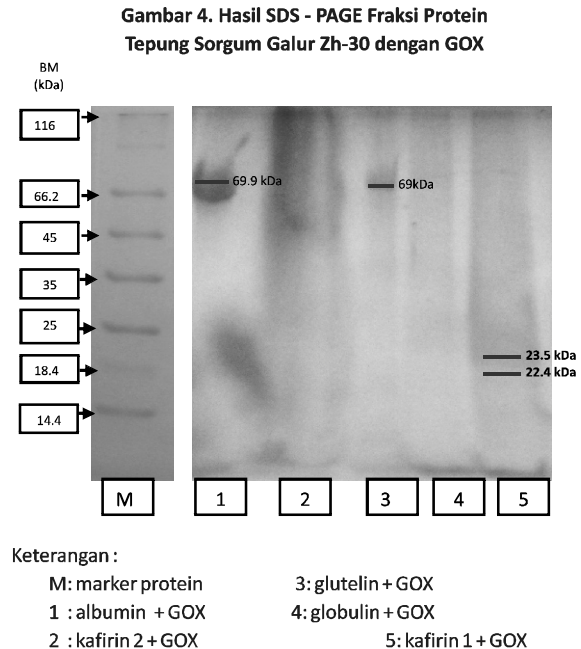
Pada jalur 7 (Gambar 3) dilakukan elektroforesis dengan sampel BSA dan didapat pola pita elektroforesis dengan berat molekul 66.2 kDa dan pada jalur 8 (Gambar 3) dilakukan elektroforesis dengan ekstrak TGase kasar yang diduga TGase yang sudah dinonaktifkan dengan memanaskan sampel enzim selama 10 menit pada suhu 100°C kemudian ditambahkan BSA, ternyata menghasilkan pola pita elektroforesis yang sama dengan jalur 7. Namun ekstrak TGase kasar yang tidak dinonaktifkan setelah diinkubasi dengan BSA serta fraksi protein tepung sorgum galur Zh-30 tidak menghasilkan berat molekul yang lebih besar bahkan samasekali tidak terbentuk pita, hal ini menunjukkan bahwa ekstrak TGase kasar tidak melakukan reaksi cross-linking dengan polipeptida BSA maupun dengan peptide-peptida dari fraksi protein tepung sorgum malah diduga dengan kuat terjadi reaksi pemotongan polipeptida (aktivitas proteolitik) sehingga menghasilkan peptida rantai pendek yang tidak dapat dideteksi dengan SDS-PAGE.

Susanti (2003) menyatakan bahwa protease B.subtilis hanya dapat dihambat oleh PMSF dan tidak oleh EDTA. Hal ini menunjukkan bahwa protease tersebut termasuk golongan protease serin, sehingga dengan tidak adanya PMSF maka kemungkinan besar protease ikut terekstraksi sehingga masih ada aktivitas proteolitik. Dengan demikian pada saat BSA atau fraksi protein tepung sorgum galur Zh-30 diinkubasikan dengan ekstrak TGase kasar, maka diduga kuat terjadi aktivitas proteolitik polipeptida menjadi peptide rantai pendek dan asam amino yang tidak dapat di SDS-PAGE karena mempunyai berat molekul yang kecil (<10 kDa). Dalam penelitian ini digunakan gel acrylamid dengan running gel sebesar 12% dan stacking gel yang mengandung 0,1% SDS sebesar 3% , sehingga peptida yang lebih kecil dari 10 kDa tidak dapat masuk dalam gel untuk di elektroforesis.

Karena diduga kuat terjadi aktivitas proteolitik saat inkubasi enzim dengan fraksi protein tepung sorgum galur Zh-30 maka dilakukan pengujian aktivitas protease dengan menggunakan metode Reimerdes & Klostermeyer (1976) dalam Penuntun Praktikum Biokimia, Lab Biokimia, FMIPA-UNPAD (2002). Sampel enzim akan menghidrolisis kasein untuk menghasilkan asam amino. Besarnya aktivitas protease ditentukan berdasarkan jumlah tirosin yang dihasilkan dari hidrolisis kasein, dan dilakukan dengan mengukur serapan pada panjang gelombang 275 nm. Panjang gelombang 275 nm ini merupakan panjang gelombang maksimum untuk penyerapan sinar UV oleh protein yang mengandung residu aromatik (misalnya tirosin dan triptofan). 1 unit aktivitas protease dinyatakan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan material yang larut dalam campuran TCA yang ekuivalen dengan 1 μ mol tirosin dari larutan kasein 1% (b/v) per menit pada pH 8,0 suhu 37 °C. Dari hasil pengukuran diperoleh data bahwa ekstrak TGase kasar memiliki aktivitas protease 77 U/mL.

Berat Molekul Jejaring Protein Hasil Reaksi Fraksi Protein Tepung Sorgum dengan Glukosa-Oksidase.

Dari analisis data ternyata diketahui bahwa berat molekul albumin, globulin dan glutelin adalah 69.9 kDa, 121 kDa dan 15.5 kDa. Hasil elektroforesis fraksi protein tepung sorgum yang diberi 2 U/ml glukosa-oksidadase dapat dilihat pada Gambar 4.



Dari pola pita elektroforesis ternyata pada albumin dan kafirin 2 (jalur 1 dan jalur 5, Gambar 4) tidak terdapat perubahan berat molekul, pada globulin dan kafirin 2 (jalur 2 dan jalur 4, Gambar 4) tidak terdapat pola pita elektroforesis, namun pada glutelin (jalur 3, Gambar 4) ada pola pita elektroforesis yang menunjukkan kenaikan berat molekul yang cukup besar yaitu dari 15.5 kDa menjadi sekitar 69 kDa. Hal ini mengindikasikan bahwa glutelin menjadi substrat bagi glukosa-oksidadase, sehingga reaksi ikatan silang dapat terbentuk, namun menurut Rasiah et al., (2009) pembentukan ikatan silang pada fraksi glutelin tidak diketahui dengan pasti.

Simpulan

Dari hasil analisis, dapat disimpulkan :

1. Protein tepung sorgum galur Zh-30 terdiri dari 5 golongan protein yaitu albumin, globulin, kafirin 1, glutelin dan kafirin 2 dengan rasio 11:11:42:7:29
2. Kadar protein kafirin 1 36.01%, kafirin 2 atau cross-linked kafirin 24.79%; glutelin 22.15% ; globulin 12.81% dan albumin 4.24% dari total protein.
3. Berat molekul fraksi-fraksi protein tepung sorgum galur Zh-30 adalah BM albumin 69.9 kDa; kafirin 1 yang terbagi menjadi α 1-kafirin 22.4 kDa dan α 2-kafirin 23.5 kDa; globulin 121 kDa; glutelin 15,5 kDa dan kafirin 2 yang terbagi menjadi α 1-kafirin 16,2 kDa, α 2-kafirin 23,5 kDa, β -kafirin 24,6 kDa dan γ -

kafirin 53,6 kDa.

4. Tidak terbentuk jejaring protein akibat aktivitas TGase dengan BSA ataupun fraksi-fraksi protein tepung sorgum galur Zh-30.
5. Terbentuk jejaring protein akibat aktivitas glukosa-oksidadase dengan fraksi glutelin sorgum (berat molekul 69 kDa dari 15.5 kDa).

Daftar Pustaka

- Ahza, A. B. 1983. *Substitusi Parsial Tepung Gandum (Triticum aestivum L.) dengan Tepung Sorgum (Sorghum bicolor (L.) Moench.) & Tepung Kacang Tunggak (Vigna unguiculata (L.) Walp.) pada Pembuatan Roti*. Skripsi S2. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Babiker, E.E & A. Kato. 1998. *Improvement of The Functional Properties of Sorghum Protein by Protein-Polysaccharide and Protein-Protein Complexes*. J.Nahrung 42 (5):286-289.
- Belton, P.S., I. Delgadillo., N.G. Halford & P.R. Shewry. 2006. *Kafirin Structure and Functionality*. J.Cereal Science. 44:272-286
- Bugusu, B. A., O. Campanella., & B. R. Hamaker. 2001 *Improvement of Sorghum-Wheat Composite Dough Rheological Properties and Breadmaking Quality Through Zein Addition*. J. Cereal Chem. 78(1):31-35.
- Caballero, P.A., M. Gomez & C.M. Rosell. 2007. *Improvement of Dough Rheology, Bread Quality and Bread Shelf-Life by Enzymes Combination*. J. Engineering 81:42-53.
- Duodu, K.G., A. Nunes., I. Delgadillo & P.S. Belton. 2002. *Low Protein Digestibility of Cooked Sorghum-Causes Needs for Further Research*. J. Cereal Sci. 35 (2):161-174.
- Firman, A.P. & I.N.P. Aryantha. 2003. *Eksplorasi & Isolasi Enzim Glukosa Oksidase dari Fungi Inperfekti (Genus Penicillium & Aspergillus) Indigenus*. Prosiding Pertemuan Ilmiah Tahunan (PIT) Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia. 29-30 Agustus 2003. Bandung.
- Folk, J.E. 1980. *Transglutaminases*. Annual Review of Biochemistry 49:517-531.
- Frederick, E.J. 2009. *Effect of Sorghum Flour Composition & Particle Size on Quality of Gluten-Free Bread*. Thesis. Kansas State University, Manhattan, Kansas.
- Gamble, M., G. Kunze., E.J. Dodson., K.S. Wilson & D.D. Jones. 2011. *Regulation of Intracellular Subtilisin Protease Activity by a Short Propeptide Sequence through an Original Combined Dual Mechanism*.
- Greenberg, C.S., P.J. Birckbichler., & R.H. Rice. 1991. *Transglutaminases: Multifunctional Cross-Linking Enzymes that Stabilize Tissues*. The FASEB J. 5:3071-3077.
- Goesaert, H., K. Brijs., W.S. Veraverbeke., C.M. Courtin., K. Gebruers & J.A. Delcour. 2005. *Wheat Flour Constituents : How They Impact Bread Quality, & How to Impact Their Functionality*. Trends In Food Science & Technology. 16:12-30
- Hastuti, S. 2003. *Perendaman Dalam Larutan NaOH Untuk Meningkatkan Derajat Sosos dan Sifat-Sifat Beras Sorgum*. Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia, Yogyakarta.
- Hulse, J. H., E. N. Laing & O.E. Pearson. 1980. *Sorghum and Millets : Their Composition And Nutrition Value*. Academic Press, London.
- Joye, I.J., B. Lagrain & J.A. Delcour. 2009. *Use of Chemical Redox Agents and Exogenous Enzymes To Modify The Protein Network During Breadmaking- A Review*. J. Cereal Sci. 50:11-21
- Kashiwagi, T., K. Yokohama., K. Ishikawa., K. Ono., D. Ejima., H. Matsui & E. Suzuki. 2002. *Crystal Structure of Microbial Transglutaminase from Streptovorticillum mobaraense*. J. Biological Chemistry. 277:44252-44260
- Kebakile, M. M. 2008. *Sorghum Dry Milling Processes and their Influence on Meal and Porridge Quality*. Department of Food Science, Faculty of Natural and Agriculture Science, University of Pretoria, Pretoria, Republic of South Africa.
- Kopkar, S.M. 1990. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Alih Bahasa : Saptohardjo, A. UI Press, Jakarta.
- Kobayashi, K., S. Suzuki., Y. Izawa., K. Yokozeki., K. Miwa & S. Yamanaka. 1998. *Transglutaminase in Sporulating Cells of Bacillus Subtilis*. J. Gen. Appl. Microbiol. 44 : 85-91.
- Laimheheriwa, J. 1990. *Teknologi Budidaya Sorgum*. Balai Informasi Pertanian Irian Jaya, Departemen Pertanian, Jakarta.
- Lehninger, A.L., 1993. *Dasar-Dasar Biokimia*, Jilid 2, Alih Bahasa: Maggy, T., Erlangga, Jakarta.
- Metzler, D. E. 1977. *Biochemistry: The Chemical Reaction of Living Cells*. Academic Press. New York.
- Moore, M. M., M. L. Heinbockel., P. Dockery., H.M. Ulmer., & E.K. Arendt . 2006. *Network Formation in Gluten-Free Bread with Application of Transglutaminase*. J. Cereal Chem. 83(1):28-36.
- Morris, P. C. & J. H. Bryce. 2000. *Cereal Biotechnology*. Woodhead Publishing Limited. London.
- Motoki, M. & Y. Kumazawa. 2000. *Recent Research Trends in Transglutaminase Technology for Food Processing*. Food Sci. Technol. Res. 6(3):151-160.
- Mudjishono & H. S. Suprpto. 1987. *Budidaya dan Pengolahan Sorgum*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Musigakun, P. & M. Thongngam. 2007. *Characteristics & Functional Properties of Sorghum Protein (Kafirin)*. J. Kasetsart 41: 313-318
- Nour, I.N.A. El, A.D.B. Peruffo and A. Curioni. 1998. *Characterisation of Sorghum Kafirins in Relation to their Cross-linking Behaviour*. J. Cereal Sci 28:197-207.
- Nurmala, T. & A. W. Irawan. 2007. *Pangan Alternatif Berbasis Serealia Minor (Gandum, Sorgum, Hanjeli, Jawawut, dan Soba)*. Pustaka Giratuna, Bandung.
- Oria, M.P, B.R. Hamaker, J.D. Axtell, & C.P. Huang. 2000. *A Highly Digestible Sorghum Mutant Cultivar Exhibits a Unique Folded Structure of Endosperm Protein Bodies*. Department of Food Science Purdue University, West Lafayette, IN 47907-1160. Available at www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.080076297 (diakses Januari 2010)
- Peckham, G. B. 1964. *Foundations of Food Preparation*. The MacMillan Company, New York, NY.
- Rasiah, I.A., K.H. Sutton., F.L. Low., H-M Lin & J.A. Gerrard. 2005. *Crosslinking of Wheat Dough Proteins by Glucose Oxidase and The Resulting Effects on Bread and Croissants*. J. Food Chemistry 89:325-332
- Ragkousi, K. & P. Setlow. 2004. *Transglutaminase-Mediated Cross-Linking of GerQ in The Coats of Bacillus subtilis Spores*. J. of Bacteriology 186 (17):5567-5575.
- Renzetti, S., J. Behr., R.F. Vogel & E.K. Arendt. 2008. *Transglutaminase Polymerization of Buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) Protein*. J. Cereal Sci. 48:747-754
- Rismunandar. 1986. *Sorghum Tanaman Serbaguna*. Sinar Baru. Bandung.
- Rooney, L.W. & R. D. Sullins. 1977. *The Structure of Sorghum and Its Relation to Processing and Nutritional Value*. Proceeding of a Symposium on Sorghum and Millets for Human Food. Tropical Product Institute, London.
- Rooney, L.W. & F.R. Miller. 1982. *Variation in the Structure and Kernel Characteristics of Sorghum*. Dalam: Proceedings of the International Symposium on Sorghum Grain Quality, Oct. 28-31, 1981. Rooney, L.W. and Murty, D.S. (Eds.). International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru, A.P., India.
- Rooney, L. W. & S. Saldivar. 2000. *Sorghum. Dalam Handbook of Cereal Science and Technology*. Kulp, K. & J. G. Ponte (Editor). Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
- Santosa, B.A.S. & S. Moeljapawiro. 1990. *Studi Fraksi Protein dan Enzim Peroksidase Kacang hijau dengan Analisis Sodium Dodesil Sulfat-Poliakrilamid Gel Elektroforesis*. Badan Litbang Pertanian : 16
- Santosa, D.D.S. & S. Hoeman. 2009. *Modified Starch of Sorghum Mutant Line Zh-30 for High Fiber Muffin Products*. J. Atom Indonesia 35 (1):1-9.
- Sewry, P.R. & N.G. Halford. 2000. *The Prolamine Storage Proteins of Sorghum and Millets*. Long Ashton Reseach, Long Ashton, Bristol UK
- Shiringani, A. L. 2005. *Evaluation for Hard Endosperm, Bird-Proof Sorghum (Sorghum bicolor (L.) Moench) and Its Effect on Food Quality*. Thesis. Faculty of Natural and Agriculture Sciences, University of the Free State, Bloemfontein.
- Shull, J.M., J.J. Watterson, & A.W. Kirleis. 1991. *Proposed Nomenclature for The Alcohol-Soluble Protein (Kafirins) of "Sorghum bicolor (L.) Moench" Based on Molecular Weight, Solubility, and Structure*. J. Agric. Food Chem. 39: 83-87
- Singh, N., L. Kaur & K. Singh Sandhu. 2006. *Relationships Between Physical, Morphological, Thermal, Rheological Properties of Rice Starches*. Food Hydrocolloids. 20:532-542
- Sirappa. 2003. *Prospek Pengembangan Sorgum di Indonesia*

Sebagai Komoditas Alternatif Untuk Pangan, Pakan, dan Industri.
Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Sulawesi Selatan, Makassar.
Available at: <http://www.pustaka-deptan.go.id>. (diakses 7 November 2008)

- Sultan, W.J. 1986. *Practical Baking*. Van Nostrand Reinhold, New York, NY.
- Susanti, E. 2003. *Isolasi dan Karakterisasi Protease dari Bacillus subtilis 1012M15*. J.Biodiversitas. 4(1):12-17
- Suzuki, S., Y.Izawa., K.Kobayashi., Y.Eto., S.Yamanaka., K.Kubota & K.Yokozei. 2000. *Purification & Characterization of Novel Transglutaminase From Bacillus subtilis Spores*. J.Biochem. 64(11):2344-2351
- Wall, J.S., L.A Cooker & J.A.Bietz. 1988. *Structure and Origin of Maize Endosperm Alcohol-Insoluble Glutelin*. J. Agric & Food Chemistry. 36(4):722-728
- Watterson, J.J., J.M. Shull, & A.W. Kirleis. 1993. *Quantitation of Alpha, Beta and Gamma Kafirin in Vitreous and Opaque Endosperm of Sorghum bicolor*. J. Cereal Chem. 70:452-457.