

## PENGEMBANGAN METODE PENENTUAN ISOFLAVON KADAR RENDAH DALAM LIMBAH CAIR TAHU MENGGUNAKAN ENZIM NADH OKSIDASE

Purbowatiningrum Ria Sarjono<sup>1</sup>, Hasim<sup>2</sup>, Dyah Iswantini<sup>2</sup>

<sup>1)</sup> Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA UNDIP Semarang 50275

<sup>2)</sup> Fakultas MIPA-KIMIA Institut Pertanian Bogor

### ABSTRAK

Penentuan isoflavon asal limbah tahu telah dilakukan. Ekstrak kasar isoflavon asal limbah tahu diperoleh dengan cara menghidrolisis menggunakan HCl 4 N diperoleh rendemen sebanyak 4,81 g/l. Kadar isoflavon diukur menggunakan metode Graham (1999) yang sebelumnya dilakukan optimasi enzim NADH oksidase diperoleh panjang gelombang optimum pada 327 nm pada suhu 35°C, pH 5, konsentrasi substrat optimum 100 µM, konsentrasi enzim optimum 0,3 U/ml. Kadar isoflavon dalam limbah tahu 0,123x10<sup>3</sup> ppm sedangkan kadar isoflavon kedelai sebesar 0,5921x10<sup>3</sup> ppm. Sehingga kadar isoflavon limbah tahu adalah sebesar 20% dibanding kadar isoflavon kedelai.

**Kata kunci:** isoflavon, limbah tahu, NADH Oksidase

### DETERMINATION OF ISOFLAVONES FROM TOFU WASTE USING NADH OXIDASE ENZYME METHODE

#### ABSTRACT

The research of determination of isoflavones from tofu waste had been done. Isoflavones were hydrolized by HCl 4 N and produced crude extract 4,81 g/l. Content of isoflavones were measured with graham (1999) methode, before this measure was done NADH Oxidase enzyme optimate. Obtained optimum wave length at 327 nm, optimum temperature at 35°C, pH 5, optimum substrat consentration at 100 µM, optimum enzyme consentration at 0,3 U/ml. Content of isoflavones liquid tofu waste 0,123x10<sup>3</sup> ppm and content of isoflavones soybean 0,591 x 10<sup>3</sup> ppm. Content of isoflavones liquid tofu waste is 20% than isoflavones soybean.

**Keywords:** isoflavones, tofu waste, NADH Oxidase

#### PENDAHULUAN

Isoflavon adalah salah satu jenis fitoestrogen yang mempunyai struktur kimia serupa dengan estradiol. Dalam usus halus, isoflavon akan dihidrolisis oleh beta-glukosidase dan menghasilkan aglikones, daidzein, genistein dan glisitein yang selanjutnya akan diabsorpsi dan berikatan dengan asam glukuronik, kemudian mencapai siklus enterohepatik dan disekresikan melalui kantung empedu. Fitoestrogen dapat berkaitan dengan reseptor spesifik estrogen pada nukleus sel dan berdampak menyerupai respon hormon estrogen (Setchell). Kandungan isoflavon banyak terdapat dalam tanaman sayuran, buah-buahan, padi-padian dan kacang-kacangan terutama banyak pada kedelai. Isoflavon yang utama terkandung dalam kedelai adalah genistein dan daidzein. Biochanin A

banyak terdapat pada semanggi (Peterson 1998). Pada dosis 37 µM genistein mampu menghambat tirosin kinase (Messina 1991).

Salah satu produk olahan kedelai yang banyak dikonsumsi masyarakat adalah tahu. Dari data diketahui bahwa isoflavon dalam tahu 336 µg/g protein lebih kecil jika dibanding dengan kedelai yang tidak dimasak 1891 µg/g protein (Anderson 1992). Jadi diperkirakan isoflavon terdapat dalam limbah tahu yang terbuang selama proses pembuatan. Hal ini diperkuat dengan sifat isoflavon yang terikat glukosa (glikon) lebih polar sehingga bersifat larut air (Harborne 1996). Kemungkinan isoflavon banyak terbuang bersama limbah cair tahu. Limbah cair yang dimaksud adalah bagian fraksi susu kedelai yang tidak ikut terkoagulasi pada pembuatan tahu. Taher (2003) melaporkan konsentrasi isoflavon

sekitar 0,2418 g/l terbuang dalam limbah cair dari proses pembuatan tahu, dengan modifikasi metode Nugroho (2004) memperoleh hasil 4,2929 g/l. Setiap harinya volume limbah cair yang terbuang dari pabrik tahu yang berkapasitas mengolah 1 ton kedelai perhari dapat mencapai 5000 liter limbah perhari.

Isoflavon telah dibuktikan sebagai senyawa yang memiliki kemampuan dalam melindungi LDL dari oksidasi yang diinduksi oleh  $\text{Cu}^{2+}$  secara invitro (Taher 2003) dan sebagai penghambat tirosin kinase suatu enzim penyebab kanker (Messina 1991). Karena penggunaan limbah cair tahu selama ini masih sangat terbatas yaitu sebagian kecil digunakan sebagai biang tahu pada pembuatan tahu selanjutnya atau digunakan sebagai media pertumbuhan beberapa jenis bakteri, maka pada penelitian ini mencoba untuk memanfaatkan lebih lanjut isoflavon dari limbah tahu tersebut.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengukur kadar isoflavon asal limbah cair tahu menggunakan metode enzimatik yang dikembangkan oleh Graham (1999). Keuntungan metode enzimatik adalah dapat menentukan kadar isoflavon dalam jumlah relatif rendah (sampai  $\mu\text{M}$ ) dan dapat dipakai sekaligus untuk macam isoflavon dan kadarnya (kualitatif dan kuantitatif).

Aktivitas suatu enzim dipengaruhi oleh faktor suhu, pH, konsentrasi substrat dan konsentrasi enzim (Dixon). Sehingga perlu diketahui kondisi optimum metoda enzimatik ini, yaitu dengan cara menentukan suhu, pH, konsentrasi substrat dan konsentrasi enzim yang dapat menyebabkan aktivitas optimum enzim dengan melakukan percobaan pada berbagai variasi faktor-faktor tersebut.

#### **METODE PENELITIAN**

Berdasarkan tujuan yang ingin dicapai, maka penelitian ini terdiri dari beberapa tahap yaitu tahap ekstraksi limbah cair tahu, optimasi enzim

NADH oksidase, pengukuran kadar isoflavon dari limbah cair tahu.

#### **Ekstraksi Isoflavon Limbah Cair Tahu**

Limbah cair tahu sebanyak 1000 ml dipisahkan dengan rotavapor vakum selama 6 jam, dihidrolisis dengan HCl 4 N selama 2 jam. Hasil hidrolisis kemudian diekstrak dengan etil asetat.

#### **Metode Pengukuran Kadar Isoflavon Limbah Cair Tahu**

Metoda yang digunakan dalam penentuan kadar isoflavon dalam limbah cair tahu adalah metode enzimatik oleh Graham (1999). Pada metoda ini digunakan enzim NADH oksidase. Mula-mula disiapkan larutan stok enzim 2,5 U/ml NADH oksidase + buffer potassium fosfat 30 mM (pH 7,5) mengandung 0,1% bovin serum albumin (BSA). Selanjutnya dilakukan optimasi enzim NADH oksidase untuk memperoleh kondisi suhu, pH, konsentrasi substrat, dan konsentrasi enzim optimum. Optimasi Metoda Enzim. Sebanyak 10  $\mu\text{l}$  enzim 0,2 U/ml diinkubasi selama 5 menit dengan 500  $\mu\text{l}$  buffer fosfat 100 mM, 100  $\mu\text{l}$  sukrosa 3 M, 100  $\mu\text{l}$  Mangan klorida 100 mM dan 100  $\mu\text{l}$  Genistein 100  $\mu\text{M}$  setelah 5 menit ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  NADH 100  $\mu\text{M}$  pada pH 5 dan suhu 25°C. Dengan prosedur tersebut dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum pada 300-500 nm. Penentuan suhu dilakukan sama pada panjang gelombang maksimum dengan variasi suhu 25, 30, 32, 35, 37, 40, 45, 50°C dengan panjang gelombang maksimum yang diperoleh. Prosedur penentuan pH optimum dilakukan sama dengan penentuan suhu, hanya saja suhu yang digunakan adalah suhu optimum yang diperoleh dengan variasi pH pada 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5. selanjutnya optimasi konsentrasi substrat dengan prosedur yang sama dengan variasi substrat pada 0;15;25; 50; 100; 150; 200; 250  $\mu\text{M}$ , dengan konsentrasi enzim tetap. Dengan menggunakan konsentrasi substrat optimum yang diperoleh dan konsentrasi enzim divariasi

pada 0;0,05; 0,1; 0,3; 0,4; 0,5 unit/ml akan diperoleh konsentrasi enzim maksimum.

Setelah diperoleh kondisi optimum enzim NADH oksidase dilanjutkan dengan pembuatan kurva standar genistein. Dengan cara dengan optimasi enzim dengan suhu, pH, konsentrasi enzim yang optimum dengan variasi genistein 0; 15; 25; 50; 100; 150; 200; 250; 500; 700; 1100; 1200; 1500  $\mu\text{M}$  sebanyak 100  $\mu\text{l}$ . kemudian diukur pada absorbansi maksimum. Setelah itu penentuan kadar isoflavon dilakukan dengan langkah sama pada pembuatan kurva standar di mana genistein diganti dengan limbah tahu.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Hasil Ekstraksi.** Hasil ekstraksi awal dari kedelai dan limbah cair tahu merupakan ekstrak kasar berbentuk pasta terdapat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil ekstraksi isoflavon dari kedelai dan limbah cair tahu

Sampel	Bobot/ volume Awal	Bobot Ekstrak (g)	Kadar (%)	Warna
Kedelai	100 g	13,3893	13.39	Coklat Hitam
Limbah cair tahu	1000 mL	4,81	481	Coklat Hitam

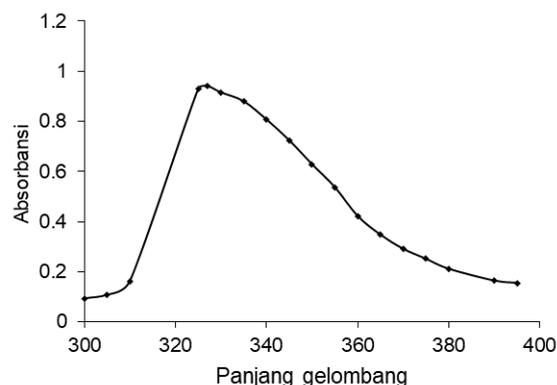
Pada Tabel tampak bahwa kadar ekstrak kedelai adalah 13,39% (b/b) sedang ekstrak isoflavon dari limbah cair tahu adalah 0,481% (b/v). Dari Nugroho (2004) diperoleh hasil pada ekstrak kedelai diperoleh hasil 5.5% (b/b). Perbedaan hasil ini karena pada penelitian Nugroho hidrolisis yang dilakukan menggunakan campuran etanol teknis dan HCl 4 N teknis, sedangkan pada penelitian ini hidrolisis menggunakan campuran 500 ml air dan 500 ml HCl 4 N p.a (pro analyst). Penggunaan air dan HCl p.a 4 N ternyata lebih efisien pada hasil kadar ekstrak, karena isoflavon dalam kedelai berada dalam bentuk terikat dengan glukosa (glikon) sehingga mudah larut dalam air yang lebih polar dibanding etanol. Untuk melepaskan

ikatan dengan glukosa digunakan HCl. Kemurnian HCl pada ekstraksi kedelai ini berpengaruh pada besarnya rendemen. Pada ekstrak isoflavon dari kedelai diperoleh hasil yang besar karena pada kedelai belum ada proses pengolahan lebih lanjut.

**Optimasi NADH Oksidase.** Sebelum digunakan dalam analisis kuantitatif kadar isoflavon asal limbah cair tahu terlebih dahulu ditentukan kondisi optimum dari enzim NADH oksidase. Adapun kondisi optimum yang dilakukan meliputi panjang gelombang maksimum, suhu optimum, pH, konsentrasi substrat NADH, dan optimasi konsentrasi enzim.

### Penentuan panjang gelombang maksimum.

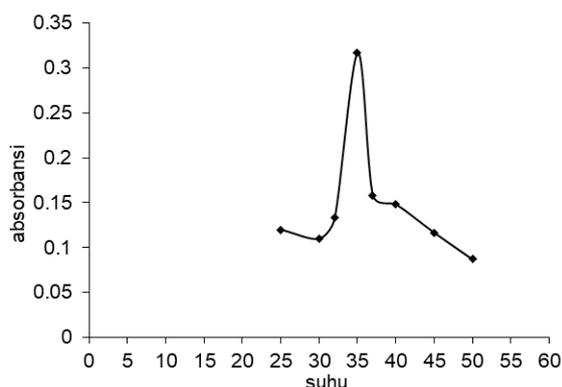
Hasil optimasi panjang gelombang maksimum terlihat pada Gambar 1. Pada optimasi ini dilakukan pada kisaran panjang gelombang 300-400 nm. Hasil yang diperoleh menunjukkan serapan maksimum terjadi pada panjang gelombang 327 nm, pada literatur serapan maksimum pada panjang gelombang 340 nm dan 360 nm. Terdapat perbedaan panjang gelombang maksimum karena buffer yang digunakan adalah buffer fosfat sedang pada metode Graham digunakan buffer MES. Dengan menggunakan buffer yang berbeda maka kerja NADH Oksidase akan optimum pada panjang gelombang 327 nm. Hasil tersebut digunakan pada pengukuran tahap selanjutnya.



Gambar 1. Optimasi panjang gelombang untuk analisis kuantitatif isoflavon.

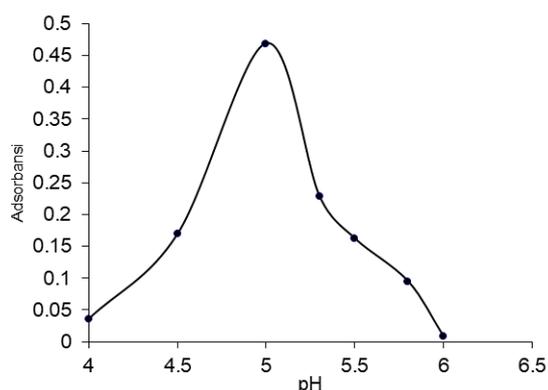
**Optimasi suhu.** Hasil optimasi suhu terdapat pada Gambar 2. Suhu optimum pada 35° C. Pada

pengukuran optimasi suhu ini digunakan panjang gelombang 327 nm dengan range suhu 25, 30, 32, 35, 37, 40, 45, 50°C. Suhu mempunyai dua pengaruh yang saling bertentangan. Disatu sisi suhu dapat meningkatkan aktivitas enzim, disisi lain laju denaturasi protein enzim juga naik. Suhu optimum merupakan titik kompromi kedua jenis pengaruh tersebut (Dixon 1979).



Gambar 2. Optimasi suhu untuk analisis kuantitatif isoflavon.

**Optimasi pH.** Pada penentuan pH optimum ini digunakan panjang gelombang 327 nm suhu inkubasi 35°C, kondisi yang lain sama pada saat penentuan panjang gelombang maksimum. Pada hasil optimasi pH pada Gambar 3, dan terlihat pH isoflavon optimum dengan buffer fosfat yang digunakan pada pH 5.

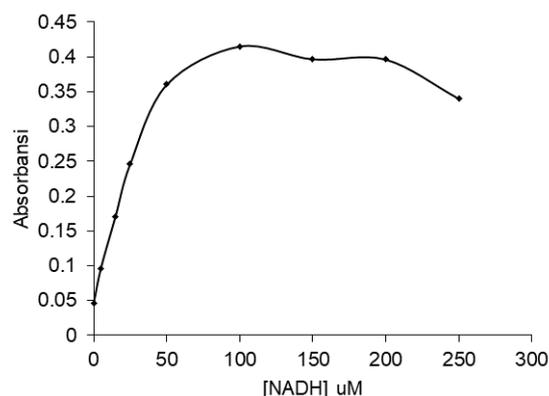


Gambar 2. Optimasi pH untuk analisis kuantitatif.

Enzim memiliki pH optimum yang khas, yaitu pH yang menyebabkan aktivitas enzim maksimal. pH optimum menggambarkan pH pada saat gugus pemberi atau penerima proton

yang penting pada sisi aktif enzim berada pada kondisi ionisasi yang diinginkan (Lehninger 1993). Holme (1983) menyatakan bahwa perubahan keadaan ionik dari residu asam amino dari molekul enzim dan substrat oleh pH akan menyebabkan perubahan efisiensi ikatan substrat.

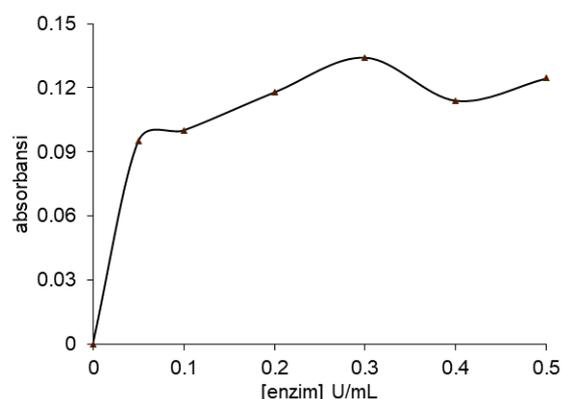
**Optimasi konsentrasi substrat.** Pada penentuan konsentrasi NADH optimum menggunakan panjang gelombang 327 nm, ada suhu 35°C, pH 5 dan kondisi lainnya sama pada penentuan panjang gelombang maksimum. Dari Gambar 4 dapat dilihat bahwa konsentrasi optimum substrat NADH pada 100 µM. Sesuai dengan kaidah Michaelis-Menten, maka peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan laju reaksi katalitik enzim, hingga pada konsentrasi substrat tertentu enzim menjadi jenuh oleh substrat dan tidak dapat berfungsi lebih cepat lagi. Laju reaksi pada saat itu dikatakan sebagai laju aktivitas maksimum enzim. Pada saat itu enzim berada dalam bentuk kompleks enzim-substrat (Lehninger 1993; Dixon 1979).



Gambar 4. Optimasi konsentrasi NADH untuk analisis kuantitatif isoflavon.

**Penentuan konsentrasi optimum enzim NADH Oksidase.** Pada penentuan konsentrasi optimum enzim digunakan kondisi seperti pada penentuan konsentrasi optimum substrat dengan konsentrasi substrat 100 µM. Pada Gambar 5 dapat terlihat bahwa konsentrasi optimum dari enzim NADH oksidase adalah pada 0.3 U/ml. Konsentrasi optimum dari enzim menunjukkan

konsentrasi yang sesuai untuk membentuk kompleks enzim substrat.



Gambar 5. Optimasi konsentrasi enzim NADH oksidase untuk analisis kuantitatif isoflavon.

Penentuan Kadar Isoflavon. Berdasarkan hasil optimasi yang diperoleh digunakan untuk mencari kurva standar genestein. Fungsi dari kurva standar genestein ini adalah untuk menentukan kadar genestein dalam kedelai dan limbah cair tahu, dengan mengukur absorbansi dari ekstrak kemudian diplotkan ke kurva standar genestein. Dari kurva tersebut dapat dihitung kadar genestein dari limbah cair tahu. Dari hasil perhitungan diperoleh kadar genestein dalam 1 L limbah tahu adalah  $0,123 \times 10^3$  ppm. Dengan menggunakan metode enzimatik dalam mengukur kadar isoflavon dalam limbah tahu yaitu dalam sekali percobaan dapat ditentukan sekaligus macam isoflavon dan kadarnya tergantung pada standar yang digunakan, meskipun dalam jumlah yang relatif kecil sampai ukuran pM dan genestein merupakan aktivator yang paling efektif bagi NADH Oksidase sehingga yang terukur benar-benar hanya genestein. Pada ekstrak kedelai diperoleh kadar genestein adalah  $0,5921 \times 10^3$  ppm.

Kandungan isoflavon limbah tahu sebesar 20,77% jika dibanding dengan kandungan isoflavon kedelai.

## KESIMPULAN

Ekstrak kasar dari 1 liter limbah cair tahu masih mengandung isoflavon sebesar  $0,123 \times 10^3$  ppm sedangkan pada kedelai sebesar  $0,5921 \times 10^3$  ppm. Dari limbah tahu mengandung 20,77% isoflavon kedelai.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Hibah Bersaing X atas nama Drh. Sulistiyani, M.Sc, Ph.D.

## DAFTAR PUSTAKA

- Day RA, AL Underwood. 1989. Analisis Kimia Kualitatif. Aloysius HP, Penerjemah. Edisi kelima. Jakarta: Erlangga. Terjemahan dari: Quantitative Analysis.
- Dixon M, EC Webb. 1979. Enzymes. 3<sup>rd</sup>ed. New York: Academic Press.
- Ernita E. 1995. Identifikasi Senyawa-senyawa Isoflavon dari Limbah. [Skripsi]. Bogor: IPB jurusan kimia.
- Graham TL, MY Graham. 1998. Release of genistein by an isoflavon-specific glucosidase activates a peroxidase-like NADH oxidase which triggers the defense competency of soybean cells. *Plant Peroxidase Newsletter*.1.9.38.
- Setchell, Kenneth D.R. 2001. Bioavailability of Pure Isoflavones in Healthy Humans and Analysis of Commercial Soy Isoflavone Supplements. *J.of Nutrition*. 131: 1362-1375.
- Taher A. 2003. Peran Fitoestrogen Kedelai sebagai Antioksidan Dalam Penanggulangan Aterosklerosis. [Tesis]. Bogor: IPB Program Pascasarjana.