

Enzim Lipoksigenase: Penyebab Aroma Langu pada Kedelai dan Upaya Penanggulangannya Melalui Eliminasi Genetik

M. Muchlish Adie

Balai Penelitian Kacang-kacangan dan Umbi-umbian, Malang

ABSTRAK

Kedelai dikenal sebagai sumber protein yang murah dan terjangkau. Dalam dekade terakhir ragam olahan dan penggunaan kedelai mengalami peningkatan yang berarti terutama di kawasan Asia Selatan dan Amerika Latin. Kelemahan kedelai sebagai bahan baku olahan adalah adanya aroma langu yang disebabkan oleh berbagai bentuk isomerik lipoksigenase. Hal tersebut akan menjadi sangat penting terutama bagi industri yang terkait dengan masalah aroma. Upaya menonaktifkan enzim lipoksigenase yang dilakukan saat pengolahan telah dilakukan di antaranya dengan perlakuan panas dan ekstraksi dengan bahan organik. Upaya tersebut memerlukan biaya mahal dan belum sepenuhnya mampu mengeliminir aroma langu. Eliminasi genetik merupakan pendekatan yang atraktif untuk mengatasi aroma langu. Kedelai normal paling tidak terdiri dari tiga enzim lipoksigenase yaitu lipoksigenase 1 (L-1), lipoksigenase 2 (L-2) dan lipoksigenase 3 (L-3). Keberadaan ketiga enzim tersebut dalam biji kedelai dapat dianalisis dengan metode sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) dengan tingkat hasil yang akurat. Kajian genetik menunjukkan bahwa enzim L-1, L-2, dan L-3 dikendalikan oleh alel tunggal resesif, masing-masing oleh *lx-1*, *lx-2* dan *lx-3*. Locus *lx-3* bersifat bebas terhadap locus *lx-1* dan *lx-2*. Enzim L-2 diketahui menghasilkan hexanal terbesar dibanding L-1 dan L-3. Eliminasi genetik terhadap L-2, akan bermanfaat untuk mengurangi aroma langu. Karenanya rekombinasi antara varietas kedelai yang telah adaptif dan diterima konsumen dengan kedelai defisit L-2 dan L-3 akan merupakan strategi pendekatan genetik yang paling memungkinkan untuk menyediakan bahan baku kedelai untuk keperluan industri.

Kata kunci: Enzim lipoksigenase, aroma langu, kedelai.

ABSTRACT

Soybean has been the most economical source of food protein and in the last decade, soybean production and use in human foods have become increasingly popular in South Asia and America Latin. Soybean lipoxygenases are responsible for the generation of undesirable flavors which limit wide utilization of soybean in food products. Treatments such as heat or extraction with an organic solvent have been used to improved the flavors of soybean products but are expensive and not entirely adequate. Genetic elimination of lipoxygenase enzymes from soybean seeds has attracted attention as a useful approach to reduce such undesirable flavors. Normal soybean seed contains, at least three lipoxygenase enzymes namely lipoxygenase 1 (L-1), lipoxygenase 2 (L-2), and lipoxygenase 3 (L-3). The presence or absence of lipoxygenase enzymes can be readily and accurately determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) technique. Genetic studies indicated that the absence of L-1, L-2, and L-3 due to single recessive alleles *lx-1*, *lx-2*, and *lx-3*, respectively, and that the *lx-3* locus is

independent of the *lx-1* and *lx-2* loci. The enzyme of L-2 is largely responsible for the generation of hexanal, so that, genetic elimination of L-2 was effective in improving the flavor of soybean products. Therefore, we have attempted to breed new commercial soybean varieties lacking L-2 and L-3, that would be acceptable to the soybean food industry.

Key words: Lipoxygenase enzymes, undesirable flavors, soybean.

PENDAHULUAN

Komoditas kedelai sebagai sumber protein potensial telah digunakan secara meluas dalam berbagai bentuk bahan olahan. Bahkan dalam dekade terakhir, industri yang berbahan baku kedelai terus berkembang, terutama di kawasan Asia Selatan dan Amerika Latin, termasuk Indonesia. Karenanya, permintaan komoditas kedelai di Indonesia setiap tahun cenderung terus meningkat sehingga harus dipenuhi oleh kedelai asal luar negeri.

Masalah menonjol penggunaan kedelai sebagai bahan baku, terutama untuk industri yang terkait dengan masalah aroma (tepung kedelai, susu kedelai, yoghurt, ice cream, dan sebagainya) adalah adanya aroma langu (*grazzy-beany flavors*) yang disebabkan oleh berbagai bentuk isomerik lipoksigenase (Hildebrand, 1989). Masalah lipoksigenase pada kedelai telah diketahui dan dikaji puluhan tahun yang lalu, bahkan jauh sebelum perusahaan Short Milling Co, Chicago (1934) mematenkan penggunaan bahan kedelai sebagai bahan *bleaching* untuk pigmen karotin pada tepung gandum (Wolf, 1975).

Upaya untuk mengurangi aroma langu telah dilakukan dengan berbagai cara, yang dilakukan bersamaan pada saat proses pengolahan bahan, di antaranya melalui perlakuan panas, ekstraksi menggunakan bahan organik maupun dengan dekomposisi dengan aldehyde-dehydrogenase (Wolf, 1975; Rackis *et al.*, 1979; Sessa, 1979). Di antara berbagai cara tersebut, perlakuan penggunaan panas paling banyak diaplikasikan. Kelemahan dengan menggunakan metode seperti di atas adalah:

1. Dengan menggunakan perlakuan panas, akan berpengaruh terhadap kerusakan protein pada biji kedelai, di samping pengaruh terhadap daya kelarutan protein itu sendiri.
2. Penambahan bahan-bahan kimia untuk menonaktifkan atau mengurangi aktivitas enzim dalam jangka panjang akan memiliki pengaruh negatif terhadap konsumen.
3. Penggunaan metode di atas secara keseluruhan akan menambah biaya pengolahan di samping upaya di atas tidak sepenuhnya mampu mengeliminir aroma langu pada olahan kedelai.

Enzim lipoksigenase sebagai penyebab aroma langu telah dikenal secara luas. Pendekatan genetik untuk mengatasi aroma langu memiliki beberapa keuntungan, selain biayanya lebih murah, tidak memiliki pengaruh samping dan luaran yang

dihasilkan (berupa varietas) akan mudah diadopsi oleh petani. Masalahnya pendekatan tersebut belum banyak dilakukan dan baru dilakukan oleh pemuliaan tanaman kedelai, Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian, Malang.

ENZIM LIPOKSIENASE DAN KONSTITUSI GENETIK*

Lipoksigenase (linoleate: oxygen oxidoreductase, EC 1.13.11.2) merupakan salah satu enzim yang mengkatalis hidroperoksidase dari asam lemak tak jenuh (Hildebrand, 1989) dan diperkirakan jumlahnya sekitar 1-2% dari total protein dalam biji (Kitamura, 1984; Davies dan Nielsen, 1986). Aroma langu pada olahan kedelai timbul jika enzim lipoksigenase tercampur dengan minyak kedelai melalui proses oksidasi, yang akhirnya terjadi proses dekomposisi aldehid dan alkohol yang menjadi penyusun utama terjadinya aroma langu.

Pada kedelai normal telah diidentifikasi paling tidak tiga enzim lipoksigenase yaitu lipoksigenase 1 (L-1), lipoksigenase 2 (L-2), dan lipoksigenase 3 (L-3) (Axelrod *et al.*, 1981). Pada awal tahun 1980-an telah diperoleh tiga galur kedelai yang masing-masing defisit (tidak mengandung) enzim L-1 (Hildebrand dan Hymowitz, 1982), defisit L-2 (Kitamura *et al.*, 1985; Davies dan Nielsen, 1986) serta galur kedelai defisit L-3 (Kitamura *et al.*, 1983). Diperolehnya tiga galur kedelai yang defisit untuk setiap enzim tersebut memberikan wahana kajian baru yang lebih efektif terhadap enzim lipoksigenase serta dimulainya pendekatan genetik untuk meniadakan atau mengurangi keberadaan enzim lipoksigenase pada kedelai.

Dari kajian lebih lanjut juga diperoleh hasil bahwa keberadaan enzim L-1, L-2, dan L-3 pada kedelai ternyata dikendalikan oleh alel tunggal yang bersifat resesif, yaitu masing-masing oleh *lx-1*, *lx-2*, dan *lx-3* (Kitamura *et al.*, 1983). Locus *lx-3* bersifat bebas terhadap *lx-1* dan *lx-2*, namun locus *lx-2* bersifat tidak bebas terhadap locus *lx-1* (Davies dan Nielsen, 1986). Karena faktor pengendali enzim tersebut yang bersifat tunggal dan resesif maka proses seleksinya akan lebih mudah dan harapan keberhasilan untuk melakukan eliminasi genetik akan lebih besar.

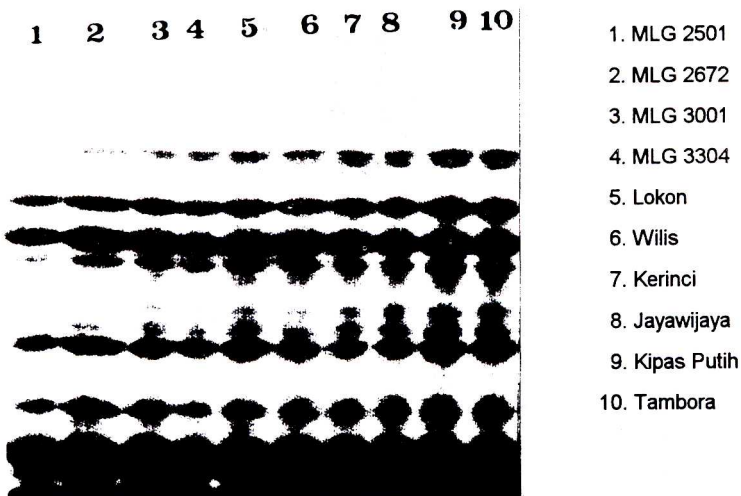
METODE SDS - PAGE (SODIUM DODECYL SULFATE - POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS) SEBAGAI PENGUKUR KRITERIA SELEKSI

Pendekatan genetik untuk mengurangi aroma langu akan terlaksana jika tersedia suatu teknik yang mampu mendeteksi keberadaan ketiga enzim lipoksigenase dalam biji kedelai secara akurat. Berbagai metode untuk mendukung keperluan mendeteksi enzim tersebut telah tersedia di antaranya adalah dengan pengukuran nilai absorbance pada 234 dan 280 nm, polarografik, teknik imunologi, carotene-

bleaching maupun dengan menggunakan cara SDS-PAGE (Axelrod *et al.*, 1981; Yubuuchi *et al.*, 1982, Kitamura, 1984, Suda *et al.*, 1995).

Metode dimensi tunggal SDS-PAGE yang telah disempurnakan oleh Kitamura (1984) nampaknya paling banyak digunakan untuk mendeteksi enzim lipoksigenase. Kelebihan metode ini adalah keakuratannya serta kemampuannya mendeteksi ketiga enzim dalam waktu bersamaan tanpa melakukan interpretasi hasil analisis secara rumit. Kekurangannya, terutama jika dibandingkan dengan metode carotene-bleaching adalah pada penggunaan bahan kimia yang cukup banyak serta membutuhkan waktu relatif lebih lama.

Aplikasi metode SDS-PAGE untuk mendeteksi kandungan enzim lipoksigenase dari 137 galur kedelai asal koleksi plasma nutfah Balitkabi telah kami lakukan (Gambar 1). Dari analisis tersebut diperoleh lima galur kedelai yang tidak mengandung L-1, yaitu MLG 2501, MLG 2672, MLG 3001, MLG 3304, dan Lokon (Tabel 1). Sebagai ilustrasi pemetaan enzim lipoksigenase terhadap berbagai tipe kedelai dengan metode SDS-PAGE juga dilakukan oleh Nishiba *et al.* (1995) memberikan gambaran yang jelas terhadap karakteristik pola pita dari berbagai kedelai bertipe L-1, L-2, dan L-3 (Gambar 2).

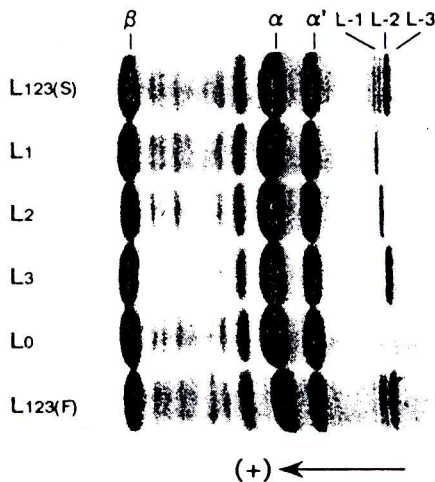


Gambar 1. Identifikasi enzim lipoksigenase dari beberapa galur kedelai dengan metode SDS-PAGE.

Tabel 1. Kandungan enzim lipoksigenase dari lima galur kedelai asal Indonesia.

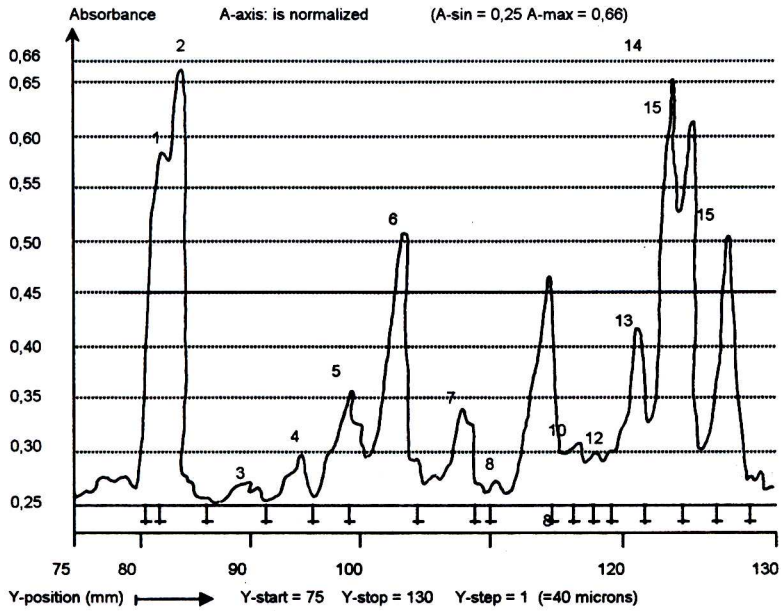
Galur	Contoh 1			Contoh 2			Contoh 3			Contoh 4			Contoh 5		
	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3
MLG 2501	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
MLG 2672	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
MLG 3001	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
MLG 3304	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Lokon	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+

Keterangan: L1, L2, dan L3 = lipoksigenase-1, lipoksigenase-2, dan lipoksigenase-3
 + = tersedia, - = tidak tersedia

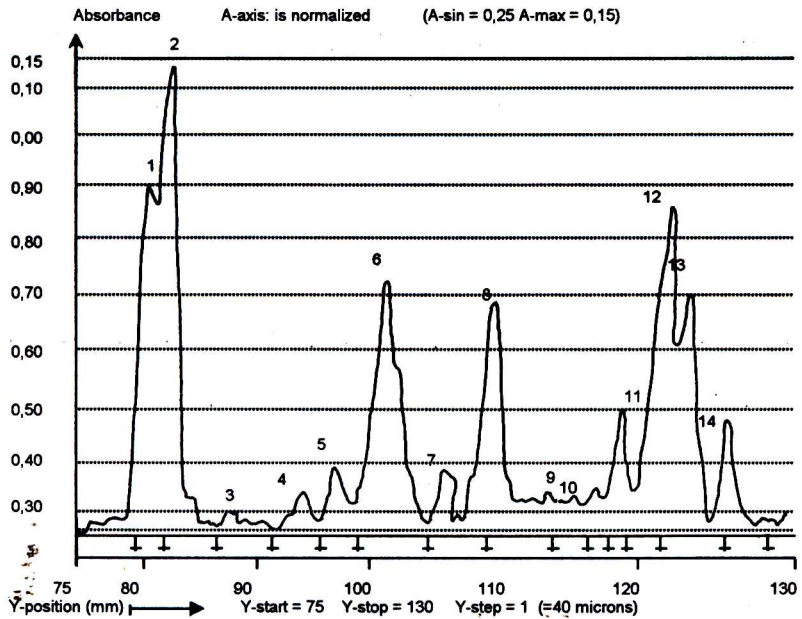


Gambar 2. Analisis enzim lipoksigenase dari beberapa galur kedelai dengan metode SDS – PAGE.

Analisis enzim lipoksigenase dengan cara SDS-PAGE juga dapat digunakan untuk keperluan analisis lanjutan mengukur kepadatan enzim lipoksigenase dengan alat densitometer. Pengukuran kepadatan enzim lipoksigenase yang kami lakukan terhadap dua varietas/galur kedelai yaitu Wilis dan MLG 2501 (Gambar 3 dan 4) diperoleh hasil bahwa galur MLG 2501 memiliki kepadatan enzim hanya setengah dari kepadatan enzim varietas Wilis (luasan relatif 8,81%). Dari Tabel 1 dan Gambar 1 diungkapkan bahwa galur MLG 2501 bertipe L23 sedangkan varietas Wilis terkriteria sebagai varietas kedelai normal yang memiliki ketiga enzim lipoksigenase.



Gambar 3. Kepadatan enzim lipoksigenase (puncak 16) dari varietas Wilis.



Gambar 4. Kepadatan enzim lipoksigenase (puncak 14) dari galur MLG 2501.

Walaupun Suda *et al.* (1995) menunjukkan bahwa penggunaan metode carotene-bleaching merupakan metode cepat dan murah untuk mendeteksi enzim lipoksigenase galur kedelai dalam jumlah banyak sehingga potensial digunakan untuk keperluan skrining, namun untuk keperluan seleksi galur tidak sepenuhnya dapat digunakan, dan kami sarankan kedua metode dapat digunakan secara bertahap. Tahap awal dapat digunakan metode carotene-bleaching untuk tujuan skrining awal dan kemudian galur terpilih dengan metode tersebut dikonfirmasi dengan metode SDS-PAGE. Dengan cara tersebut selain dapat dihemat waktu analisis juga akan lebih efisien dalam penggunaan biaya.

STRATEGI PENDEKATAN GENETIK

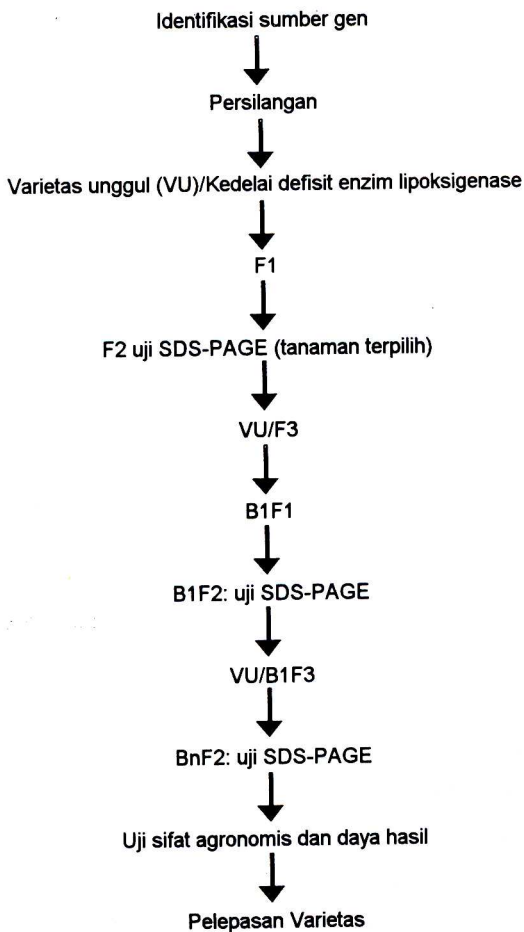
Salah satu bentuk hidropersidase dari asam lemak tak jenuh adalah n-hexanal, yang akan menjadi penentu aroma langu pada olahan kedelai. Karenanya produksi hexanal dari enzim lipoksigenase sering dijadikan tolok ukur kajian untuk menilai derajat kearomaan dari suatu galur kedelai.

Matoba *et al.* (1985) melaporkan bahwa kedelai bertipe L-2 (defisit L-1 dan L-3) dinilai paling banyak menghasilkan hexanal dibanding kedelai bertipe L-1 maupun L-3. Hal yang sama juga disampaikan oleh Davies *et al.* (1987) yang menunjukkan bahwa eliminasi genetik terhadap kedelai bertipe L-2 ternyata cukup efektif dalam mengurangi aroma langu. Sebaliknya, kedelai bertipe L-3 dinilai memiliki produksi hexanal terendah (Hildebrand *et al.*, 1990). Penilaian akumulasi hexanal terhadap berbagai tipe kedelai yang dilakukan oleh Nishiba *et al.* (1995) memberikan hasil bahwa urutan dari tertinggi produksi hexanal adalah dari kedelai bertipe L2 > L123 > L1 > L3 > L0. Kajian lain dengan menggunakan uji sensori juga mengungkapkan bahwa aroma langu akan jauh berkurang dari kedelai yang defisit L-2 dan L-3 dibanding dengan yang defisit L-1 dan L-3 (Kitamura, 1995).

Hasil berbagai kajian di atas menjadi dasar pemikiran yang penting untuk melakukan eliminasi genetik, yakni bahwa aroma langu dapat dihilangkan dengan mendapatkan varietas kedelai bertipe L-0 (defisit L-1, L-2, dan L-3) atau dapat dikurangi secara nyata dengan menggunakan varietas kedelai bertipe L-1 (defisit L-2 dan L-3).

Manipulasi genetik untuk mendukung keperluan di atas dapat terlaksana jika tersedia sumber gen yang kemudian direkombinasikan dengan varietas kedelai yang diterima oleh pengguna (masyarakat petani dan industri kedelai). Identifikasi yang telah dilakukan terhadap sebagian kecil kekayaan plasma nutfah kedelai yang ada di Indonesia memang belum diperoleh sumber gen yang mampu menopang keperluan tersebut, walaupun sebetulnya ada peluang untuk memperoleh sumber gen yang diinginkan. Upaya lain yang telah berhasil adalah dengan melakukan irradiasi dengan sinar gamma 40 kR terhadap populasi F2 hasil biji persilangan kedelai bertipe L-1 dengan kedelai bertipe L-2 (Hajika *et al.*, 1995).

Pendekatan genetik untuk mengurangi aroma langu pada kedelai dapat ditempuh dengan dua strategi. Pertama adalah melakukan rekombinasi antara varietas yang telah diterima dengan kedelai tipe L-1 (jika tersedia dengan tipe L-0), selanjutnya dilakukan seleksi dengan SDS-PAGE pada generasi F2. Galur terpilih dapat diseleksi lebih lanjut dengan memasukkan hasil biji sebagai kriteria seleksi. Strategi kedua adalah membentuk galur iso-line, yang dapat ditempuh dengan cara silang balik (*back-crossing*). Seleksi juga dilakukan pada generasi F2 (Gambar 5) dengan metode SDS-PAGE. Strategi pertama jelas dibutuhkan waktu lebih cepat untuk menghasilkan varietas baru namun hasil sebagai komplemen seleksi harapan sulit diramalkan. Sebaliknya cara kedua, diperlukan waktu relatif lebih lama namun kepastian hasil serta sifat agronomik lainnya yang telah adaptif akan mudah diperoleh.



Gambar 5. Strategi pembentukan varietas kedelai untuk mengurangi aroma langu dan hasil tinggi.

Kitamura *et al.* (1987) melakukan tiga sampai empat kali silang balik terhadap *recurrent-parent* untuk memperoleh varietas iso-line untuk mengurangi aroma langu. Pengujian lebih lanjut terhadap penampakan sifat agronomis dan reaksi terhadap penyakit serta kandungan minyak tidak mengalami perbedaan dengan sifat-sifat dari *recurrent parentnya*. Hasil pengamatan terhadap populasi F1 hasil persilangan yang kami lakukan antara varietas Muria dengan kedelai tipe L-1 dan tipe L-2 juga tidak diperoleh penyimpangan terhadap sifat-sifat agronomisnya.

Tersedianya metode dimensi tunggal SDS-PAGE sebagai kriteria seleksi enzim lipoksigenase dan enzim tersebut dikendalikan oleh alel tunggal resesif serta dari beberapa hasil kajian yang menunjukkan adanya penyimpangan fisiologis akibat hilangnya beberapa enzim lipoksigenase pada biji kedelai, maka pendekatan genetik untuk mengurangi aroma langu memberikan kemungkinan yang sangat besar. Hasil yang diperoleh akan memberikan sumbangan yang sangat berarti untuk menyediakan bahan baku kedelai untuk industri baik yang berskala besar maupun kecil.

DAFTAR PUSTAKA

- Axelrod, B., T.M. Chessbrough, and S. Laakso. 1981. Lipoxygenase from soybean. *Methods Enzymol.* 71: 441-451.
- Davies, C.S. and N.C. Nielsen. 1986. Genetic analysis of a null allele for lipoxygenase-2 in soybean. *Crop Sci.* 26: 460-463.
- Davies, C.S., S.S. Nielsen, and N.C. Nielsen. 1987. Flavor improvement of soybean preparations by genetic removal of lipoxygenase-2. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 64: 1428-1433.
- Hajika, M., K. Igita, and Y. Nakazawa. 1995. Induction of a soybean line lacking all seed lipoxygenase isozymes. *JARQ.* 29: 73-76.
- Hildebrand, D.F. 1989. Lipoxygenases. *Physiol. Plant.* 76: 249-253.
- Hildebrand, D.F. and T. Hymowitz. 1982. Inheritance of lipoxygenase-1 activity in soybean seeds. *Crop Sci.* 22: 851-853.
- Hildebrand, D.F., T.R. Hamilton-Kem, J.H. Loughrin, K. Ali, and R. Anderson. 1990. A lipoxygenase 3 reduces hexanal production from soybean seed homogenates. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1934-1936.
- Kitamura, K. 1984. Biochemical characterization of lipoxygenase lacking mutants, L-1 less, L-2 less, and L-3 less soybeans. *Agric. Biol. Chem.* 48: 2339-2346.
- Kitamura, K. 1995. Genetic improvement of nutritional and food processing quality in soybean. *JARQ.* 29: 1-8.

- Kitamura, K., C.S. Davies, H. Kaizuma, and N.C. Nielsen. 1983.** Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seed. *Crop Sci.* 23: 924-927.
- Kitamura, K., T. Kumagai, and A. Kukuchi. 1985.** Inheritance of lipoxygenase-2 and genetic relationships among genes for lipoxygenase-1, -2, and -3 in soybean seeds. *Japan J. Breed.* 35: 413-420.
- Kitamura, K., A. Kikuchi, and K. Harada. 1987.** Performance of near-isogenic lines lacking seed lipoxygenases. *Soybean Genet. Newsl.* 14: 109-112.
- Matoba, T., H. Hadaka, H. Narita, K. Kitamura, N. Kaizuma, and M. Kato. 1985.** Lipoxygenase-2 isozyme is responsible for generation of n-hexanal in soybean homogenate. *J. Agric. Food. Chem.* 33: 852-855.
- Nishiba, Y., S. Furuta, H. Makita, K. Igita, and I. Suda. 1995.** Hexanal accumulation and DETBA value in homogenate of soybean seeds lacking two or three lipoxygenase isozymes. *J. Agric. Food Chem.* 43: 738-741.
- Rackis, J.J., D.J. Sessa, and D.H. Honig. 1979.** Flavor problem of vegetable food proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56: 262-271.
- Sessa, D.J. 1979.** Biochemical aspects of lipid-derived flavors in legumes. *J. Agric. Food Chem.* 27: 234-239.
- Suda, I., M. Hajika, Y. Nishiba, S. Furuta, and K. Igita. 1995.** Simple and rapid method for the selective detection of individual lipoxygenase isozymes in soybean seeds. *J. Agric. Food Chem.* 43: 742-747.
- Yubuuchi, S., R.M. Lister, B. Axelrod, J.R. Wilcox, and N.C. Nielsen. 1982.** Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of lipoxygenase isoenzymes in soybean. *Crop Sci.* 22: 333-337.
- Wolf, J.W. 1975.** Lipoxygenase and flavor of soybean protein products. *J. Agric. Food. Chem.* 23: 136-141.