

PERUBAHAN KOMPOSISI KASEIN PADA PERMUKAAN GLOBULA MINYAK SEBAGAI PENGARUH PENINGKATAN KONSENTRASI FOSFOLIPIDA SELAMA EMULSIFIKASI

(CASEINS COMPOSITIONAL CHANGES AT OIL GLOBULE INTERFACE
AS AFFECTED BY PHOSPHOLIPIDS CONCENTRATION DURING EMULSIFICATION)

Teti Estiasih *)

ABSTRACT

Casein and phospholipids are natural compounds usually used concomitantly as emulsifier. This research is conducted to elucidate the adsorbed casein composition that stabilized oil globule interface during fish oil emulsification as affected by phospholipids concentration. Each casein has different behaviour at oil globule interface.

The results showed the changes of adsorbed α , β , and κ casein at oil globule interface because of phospholipids addition. Among caseins, α casein has preference to desorb, β casein has preference to adsorb, and κ casein has no preference to adsorb or desorb. Their preferences to adsorb or desorb are influenced by their surface activities and layer properties.

Casein compositional changes are caused by caseins-phospholipids complex formation. This complex has less preference to adsorb at oil globule interface.

Keywords: oil globule interface, preference to adsorb, surface activity, complex formation.

PENDAHULUAN

Natrium kaseinat dan fosfolipida merupakan bahan alami yang dapat berperan sebagai pengemulsi. Selama pengolahan pangan keduanya dapat berperan menstabilkan emulsi baik digunakan secara terpisah maupun bersama-sama. Beberapa hasil penelitian menunjukkan adanya hubungan sinergis antara protein globular dan fosfolipida kuning telur dalam pembentukan emulsi (Nakamura *et al.*, 1988). Efek sinergis tersebut terbentuk karena fosfolipida teradsorpsi di celah-celah pada antar permukaan yang tidak distabilisasi protein (Corredig dan Dalgleish, 1998).

Pada sistem emulsi yang mengandung protein dan surfaktan (pengemulsi berberat molekul kecil), terbentuk hubungan antara protein dan surfaktan yang tergantung dari aktivitas permukaan keduanya. Hubungan tersebut dapat berupa adsorpsi kompetitif, proses pergantian, dan interaksi antara protein dan surfaktan.

Protein dan surfaktan dapat berinteraksi membentuk kompleks dengan aktivitas permukaan meningkat atau menurun, atau menyebabkan penataan yang lebih efisien pada antar permukaan (Bos *et al.*, 1997).

Menurut Bos *et al.* (1997), kasein dapat membentuk kompleks dengan fosfolipida pada permukaan globula lemak. Kompleks tersebut terbentuk melalui interaksi elektrostatik.

Hasil penelitian Fang dan Dalgleish (1996) menunjukkan bahwa terjadi interaksi spesifik antara dioleilfosfatidilkolin dengan β kasein membentuk kompleks yang bersifat lebih hidrofilik dan mempunyai aktivitas

permukaan yang lebih rendah. Diduga kompleks tersebut terdesorpsi dari permukaan globula lemak.

Kasein merupakan protein susu yang terdiri dari α_{s1} , α_{s2} , β , dan κ dengan proporsi mendekati 38, 10, 36, dan 13% atau 4:1:4:1 (Tomberg *et al.*, 1997). Masing-masing kasein mempunyai sifat pada antar permukaan yang berbeda (Robson dan Dalgleish, 1987), sehingga diduga terjadi perubahan komposisi jenis kasein yang teradsorpsi pada permukaan globula minyak jika selama emulsifikasi dilakukan penambahan fosfolipida.

Penelitian ini bertujuan mengkaji perubahan komposisi jenis kasein yang teradsorpsi pada permukaan globula minyak emulsi sebagai pengaruh penambahan fosfolipida sehingga hubungan keduanya dalam sistem emulsi dapat diketahui. Penyebab perubahan tersebut juga dikaji.

Perubahan komposisi lapisan yang teradsorpsi tersebut dapat menjelaskan perubahan sifat-sifat sistem emulsi yang distabilisasi natrium kaseinat karena adanya fosfolipida, sehingga diketahui keefektifan penggunaan keduanya secara bersama-sama sebagai pengemulsi.

METODOLOGI

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan untuk membuat emulsi adalah minyak ikan dengan kadar asam lemak ω -3 tinggi yang dibuat dengan metode pematatan cepat (Moffat *et al.*, 1993) yang dimodifikasi, natrium kaseinat teknis (Sigma Co.), fosfolipida yang diekstrak dari kuning telur dengan metode Schneider (1989), dan akuades.

Bahan kimia yang digunakan untuk analisis adalah standar α , β , κ kasein, glisin, akrilamida, bis akrilamida, tris, TEMED, amonium persulfat (Sigma Co.); etanol, asam asetat, merkaptoetanol, KCl, biru komasi, asam sulfat, HCl, dan aseton (semua untuk analisis) dari Merck;

Peralatan yang digunakan adalah neraca analitik (HR-300, AND), alat-alat gelas, pengaduk magnet (Nouvo II), homogenizer (Altech), densitoscan process visu-24 (Helena), pH-meter (Jenway), perangkat elektroforesis (Bio-Rad), sentrifusa (T51-1, MLW), dan ultrasentrifusa (Beckman).

Metode Penelitian

a. Pembuatan emulsi

Emulsi dibuat dengan cara menghomogenisasi minyak ikan (5% b/v) dalam larutan natrium kaseinat (10% b/v) pada tekanan 2500 psi selama 15 menit. Fosfolipida ditambahkan sebelum homogenisasi pada konsentrasi 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5% (b/v).

*) Staf Pengajar Jurusan Teknologi Hasil Pertanian – FTP – Universitas Brawijaya

b. Pemisahan globula minyak dari emulsi

Globula minyak dipisahkan dari fase kontinu dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 60.000 X g selama 30 menit (Euston *et al.*, 1995). Fase krim merupakan kumpulan globula-globula minyak yang terpisah dari fase kontinu setelah sen-trifugasi.

c. Analisis jenis kasein pada permukaan globula minyak

Jenis kasein pada fase krim menunjukkan jenis kasein yang teradsorpsi pada permukaan globula minyak. Jenis kasein ini dianalisis dengan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamida dengan penambahan sodium dodesil sulfat (SDS PAGE=*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) untuk mengetahui proporsi α , β , dan κ kasein sebagai pengaruh peningkatan konsentrasi fosfolipida. Analisis SDS PAGE dilakukan dengan menggunakan metode Singh dan Creamer (1991).

Penyebab perubahan komposisi kasein diduga disebabkan oleh pembentukan kompleks antara kasein dan fosfolipida sehingga pada penelitian ini dilakukan analisis kemungkinan pembentukan kompleks. Kemungkinan pembentukan kompleks tersebut dianalisis dengan elektroforesis gel poliakrilamida (PAGE=*Poly-acrylamide Gel Electrophoresis*) tanpa penambahan bahan-bahan pendenaturasi protein (*non denaturation system*).

Analisis statistik.

Variabel yang dikaji adalah konsentrasi penambahan fosfolipida dengan taraf perlakuan 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5% (b/v). Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dua kali ulangan. Jika diperlukan, analisis statistik dilanjutkan dengan uji lanjut dengan DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) untuk mengetahui perbedaan dari masing-masing taraf perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proporsi jenis kasein pada permukaan globula minyak

Kasein yang digunakan untuk menstabilisasi emulsi terdiri dari 50,06% α kasein, 37,67% β kasein, dan 12,27% κ kasein. Tornberg *et al.* (1997) melaporkan bahwa proporsi jenis kasein pada susu adalah 48% α kasein, 36% β kasein, dan 13% κ kasein.

Pada sistem emulsi tanpa penambahan fosfolipida, proporsi α kasein yang teradsorpsi pada permukaan globula minyak lebih tinggi dibandingkan β kasein. Alfa kasein mempunyai preferensi teradsorpsi yang lebih tinggi dibandingkan β kasein, walaupun β kasein mempunyai aktivitas permukaan yang lebih tinggi dari α kasein.

Menurut Euston dan Hirst (1999), preferensi α kasein yang lebih tinggi dibandingkan β kasein diduga disebabkan oleh pembentukan agregat β kasein. Beta kasein mempunyai kemampuan untuk membentuk agregat seperti misel pada konsentrasi kasein tinggi (Rollema, 1997). Pada penelitian ini konsentrasi natrium kaseinat yang digunakan adalah sekitar 74-85 mg/ml. Menurut Euston dan Hirst (1999), aktivitas permukaan misel β kasein ini lebih rendah dibandingkan β kasein bebas, sehingga misel β kasein tidak mampu berkompetisi dengan α kasein.

Pada sistem emulsi tanpa penambahan fosfolipida, proporsi α kasein adalah yang paling tinggi dan κ kasein paling rendah. Bila dihubungkan dengan proporsinya pada natrium kaseinat, α kasein adalah yang tertinggi dan κ kasein yang terendah. Selain karena aktivitas permukaannya diduga lebih tinggi dari β kasein, kuantitas α kasein paling tinggi sehingga mendominasi permukaan globula minyak.

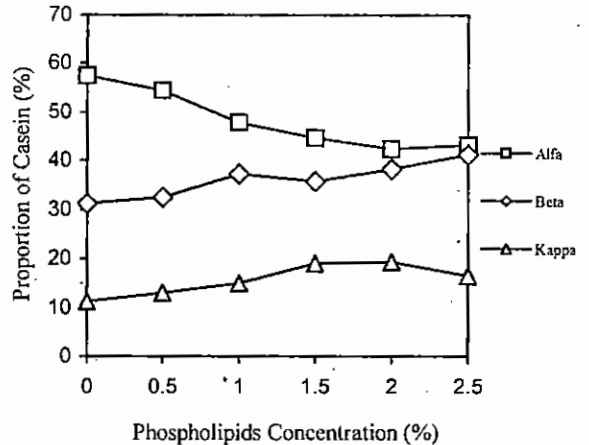


Figure 1. Casein proportion at oil globule interface as affected by phospholipids addition during emulsification

Proporsi α kasein yang teradsorpsi semakin menurun dengan bertambahnya konsentrasi fosfolipida (Figure 1). Proporsi α kasein yang teradsorpsi tidak berbeda nyata ($\alpha=0,05$) sampai konsentrasi fosfolipida 1,0%. Penambahan fosfolipida lebih lanjut menyebabkan penurunan proporsi α kasein yang teradsorpsi secara nyata ($\alpha=0,05$). Penurunan tersebut disebabkan α kasein terdesorpsi dari permukaan globula minyak oleh fosfolipida karena sifatnya yang kurang hidrofobik dibandingkan β kasein, dan tidak membentuk lapisan yang kohesif seperti κ kasein.

Penambahan fosfolipida menyebabkan peningkatan proporsi β kasein yang teradsorpsi secara nyata ($\alpha=0,05$). Beta kasein mempunyai preferensi untuk tetap teradsorpsi walaupun dalam sistem emulsi terdapat fosfolipida. Menurut Bergenstahl dan Claesson (1997), preferensi β kasein untuk teradsorpsi disebabkan oleh sifatnya yang paling hidrofobik dibandingkan jenis kasein yang lain.

Kappa kasein tidak mempunyai preferensi untuk dihilangkan dari permukaan globula minyak atau teradsorpsi dengan adanya peningkatan konsentrasi fosfolipida yang ditunjukkan oleh proporsi κ kasein yang tidak berubah. Tidak adanya preferensi tersebut kemungkinan disebabkan oleh sifat κ kasein yang tidak mudah menyebar pada antar permukaan dan membentuk lapisan pada permukaan globula lemak yang kohesif (Mulvihill dan Fox, 1989; Robson dan Dalgleish, 1987). Hasil penelitian ini diperkuat oleh hasil penelitian Fang dan Dalgleish (1996) yang menunjukkan bahwa κ kasein tidak dipengaruhi oleh adanya dioleilfosfatidilkolin dalam sistem emulsi.

Proporsi jenis kasein pada fase kontinyu

Kasein pada fase kontinyu merupakan kasein yang tidak berperan menstabilisasi globula minyak. Proporsi jenis kasein yang ada pada fase kontinyu dianalisis dengan elektroforesis gel poli-akrilamida dengan sistem non denaturasi. Sistem non denaturasi digunakan untuk mencegah kemungkinan kompleks kasein-fosfolipida yang terbentuk menjadi terurai karena perubahan kon-formasi protein oleh bahan-bahan pendenaturasi.

Pada sistem emulsi tanpa penambahan fosfolipida, proporsi α kasein pada fase kontinyu paling tinggi dan κ kasein paling rendah. Proporsi α kasein paling tinggi karena proporsinya pada natrium kaseinat paling tinggi. Walaupun pada sistem emulsi ini α kasein mempunyai preferensi untuk teradsorpsi, tetapi karena jumlah kasein yang teradsorpsi jauh lebih rendah dari kasein pada fase kontinyu, proporsi α kasein tetap paling tinggi.

Proporsi β kasein pada fase kontinyu lebih tinggi dari proporsi pada natrium kaseinat yang menunjukkan bahwa β kasein mempunyai preferensi teradsorpsi yang rendah. Proporsi κ kasein pada fase kontinyu yang rendah disebabkan proporsinya pada natrium kaseinat paling rendah dan kemungkinan pada sistem emulsi tanpa penambahan fosfolipida, κ kasein mempunyai preferensi teradsorpsi.

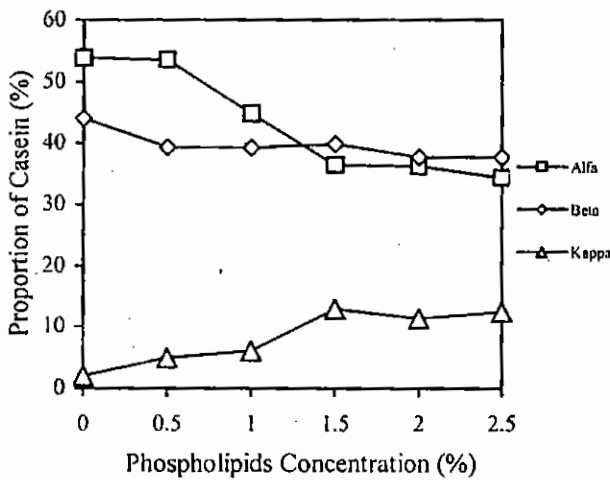


Figure 2. Proportion of casein at oil globule interface as affected by phospholipids addition during emulsification

Proporsi α kasein pada fase kontinyu semakin menurun dengan bertambahnya konsentrasi fosfolipida dalam sistem emulsi. Penambahan fosfolipida menyebabkan penurunan proporsi α kasein pada fase kontinyu (Figure 2) yang nyata ($\alpha=0,05$).

Pada kenyataannya, peningkatan konsentrasi kasein pada fase kontinyu diikuti oleh penurunan proporsi α kasein. Hal ini berarti bahwa α kasein tidak terdesorpsi dari permukaan globula minyak atau terdesorpsi dalam bentuk kompleks kasein-fosfolipida. Bila dihubungkan dengan proporsi α kasein yang teradsorpsi, penambahan fosfolipida menyebabkan penurunan α kasein, yang berarti α kasein terdesorpsi dari permukaan globula minyak.

Apabila α kasein terdesorpsi dalam bentuk bebas, proporsinya pada fase kontinyu akan meningkat. Pada kenyataannya, proporsi α kasein pada fase kontinyu

mengalami penurunan, sehingga kemungkinan besar α kasein terdesorpsi dari permukaan globula minyak dalam bentuk kompleks kasein-fosfolipida.

Proporsi β kasein pada fase kontinyu tidak mengalami perubahan ($\alpha=0,05$). Kenyataan ini menunjukkan bahwa β kasein kemungkinan tidak terdesorpsi atau digantikan oleh fosfolipida dari permukaan globula minyak. Peningkatan proporsi β kasein pada permukaan globula minyak disebabkan oleh α kasein terdesorpsi dan β kasein mempunyai preferensi untuk teradsorpsi.

Proporsi κ kasein pada fase kontinyu mengalami peningkatan dengan bertambahnya konsentrasi fosfolipida dalam sistem emulsi (Figure 2) secara nyata ($\alpha=0,05$). Peningkatan tersebut disebabkan oleh penurunan proporsi α dan β kasein pada fase kontinyu. Kappa kasein tidak mempunyai preferensi untuk teradsorpsi yang ditunjukkan oleh proporsinya pada permukaan globula minyak yang tetap.

Menurut Mulvihill dan Fox (1989) serta Robson dan Dalgleish (1987), κ kasein membentuk lapisan pada permukaan globula lemak yang kohesif karena adanya ikatan disulfida dalam dan antar molekul. Lapisan yang kohesif tersebut menyebabkan κ kasein sulit mengalami desorpsi dari permukaan globula minyak, walaupun pada konsentrasi fosfolipida yang tinggi.

Analisis kemungkinan pembentukan kompleks kasein-fosfolipida

Kemungkinan pembentukan kompleks antara kasein dan fosfolipida dianalisis dari fase kontinyu dengan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamida sistem non denaturasi. Penggunaan sistem non denaturasi bertujuan untuk mencegah kon-formasi protein pada kompleks kasein-fosfolipida terbuka sehingga merusak struktur kompleks tersebut dan kasein terurai dalam bentuk bebas. Apabila ada dalam bentuk bebas, kompleks kasein-fosfolipida tidak dapat diidentifikasi dan dikuantifikasi.

Identifikasi pita kompleks kasein-fosfolipida diketahui dengan membandingkan dengan pita standar α , β , dan κ kasein, dan dengan memperhatikan jarak migrasinya. Pita kompleks kasein-fosfolipida merupakan pita baru yang terbentuk dan bukan merupakan pita α , β , dan κ kasein dengan jarak migrasi yang lebih pendek.

Analisis pembentukan kompleks kasein-fosfolipida dilakukan dari fase kontinyu karena diduga penurunan protein kasein yang teradsorpsi pada permukaan globula minyak disebabkan oleh kasein diganti oleh fosfolipida dan pembentukan kompleks kasein-fosfolipida. Kompleks antara kasein dan fosfolipida diduga lebih bersifat hidrofilik dan lebih larut pada fase kontinyu sehingga menghilang dari permukaan globula minyak. Pada penelitiannya, Fang dan Dalgleish (1996) menduga terjadi interaksi spesifik antara dioleilfosfatidilkolin dan β kasein yang lebih hidrofilik dan mempunyai aktivitas permukaan yang lebih rendah dibandingkan β kasein dan dioleilfosfatidilkolin. Diduga kompleks tersebut terdesorpsi dari permukaan globula lemak. Berdasarkan hal tersebut, analisis kemungkinan pembentukan kompleks kasein-fosfolipida dilakukan dari fase kontinyu.

Diduga pengikatan tersebut terjadi pada beberapa lokasi pengikatan, yang kemungkinan terjadi melalui interaksi hidrofobik antara residu asam-asam amino non polar pada kasein dengan asam lemak pada fosfolipida. Fang dan Dalgleish (1996) menyatakan bahwa jika sisi pengikatan β kasein terhadap dioleilfosfatidilkolin berada pada bagian hidrofobik, kompleks β kasein-dioleilfosfatidilkolin akan bersifat hidrofilik dan akan terdesorpsi dari permukaan globula lemak.

Selain terjadi melalui interaksi hidrofobik, kemungkinan pengikatan juga dapat terjadi melalui netralisasi muatan. Menurut Bos *et al.* (1997), interaksi elektrostatik bersifat penting pada interaksi antara protein-fosfolipida pada permukaan globula lemak.

Jenis kasein yang membentuk kompleks dengan fosfolipida diketahui dari proporsi masing-masing jenis kasein pada permukaan globula minyak dan fase kontinyu. Jenis kasein yang membentuk kompleks dengan fosfolipida harus mempunyai proporsi pada permukaan globula minyak dan fase kontinyu yang menurun.

Dari hasil analisis jenis kasein pada permukaan globula minyak dan fase kontinyu, dapat diketahui bahwa kemungkinan jenis kasein yang membentuk kompleks dengan fosfolipida adalah α kasein. Menurut Aynie *et al.* (1992), interaksi antara α kasein dengan lipida polar yang bermuatan lebih tinggi dibandingkan β kasein. Interaksi tersebut terjadi melalui ikatan hidrogen dan/atau interaksi elektrostatik.

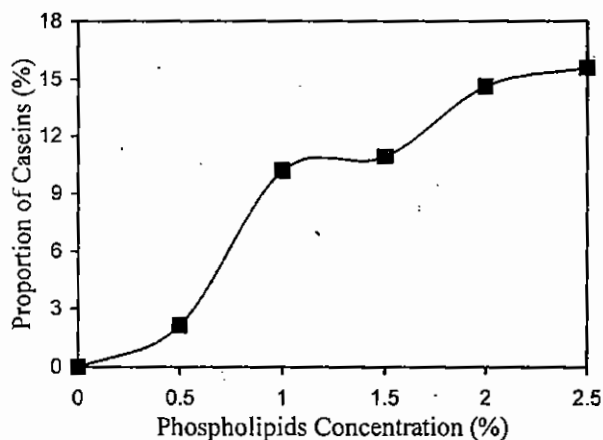


Figure 3. Proportion of complex forming caseins as affected by phospholipids addition during emulsification

Proporsi kompleks kasein-fosfolipida pada fase kontinyu semakin meningkat ($\alpha=0,05$) dengan bertambahnya konsentrasi fosfolipida dalam sistem emulsi (Figure 3). Semakin tinggi fosfolipida yang ditambahkan, fosfolipida semakin tersedia untuk membentuk kompleks dengan kasein.

KESIMPULAN

Penambahan fosfolipida pada sistem emulsi yang distabilisasi natrium kaseinat menyebabkan perubahan proporsi jenis kasein yang teradsorpsi pada permukaan globula minyak. Preferensi jenis kasein untuk teradsorpsi dipengaruhi oleh aktivitas permukaan dan sifat pelapisannya pada antar permukaan. Perubahan tersebut disebabkan oleh pembentukan kompleks antara kasein dan fosfolipida yang mempunyai sifat lebih hidrofilik dan terdesorpsi dari antar permukaan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aynie, S., M. Le Meste, B. Colas, and D. Lorient. 1992. *Interaction between Lipids and Milk Protein*. J. of Food Sci. 57(4): 883-891.
- Bergenstahl, B.A. and P.M. Claesson. 1997. *Surface Forces in Emulsions*. In S.E. Friberg and K. Larsson (eds.). *Food Emulsions*. 3rd edition, revised and expanded. Marcel Dekker Inc., New York.
- Bos, M., T. Nylander, T. Arnebrant, and D.C. Clark. 1997. *Protein/Emulsifier Interaction*. In G.L. Hasenhuetti and R.W. Hartel (eds.). *Food Emulsifier and Their Applications*. Chapman & Hall, New York.
- Corredig, M. and D.G. Dalgleish. 1998. *Buttermilk Properties in Emulsions with Soybean Oil as Affected by Fat Globule Membrane-Derived Proteins*. J. of Food Sci. 63(3): 476-480.
- Euston, S.E., H. Singh, P.A. Munro, and D.G. Dalgleish. 1995. *Competitive Adsorption between Sodium Caseinate and Oil-Soluble and Water-Soluble Surfactants in Oil-in-Water Emulsions*. J. of Food Sci. 60(5): 1124-1130.
- Euston, S.R. and R.L. Hirst. 1999. *Comparison of the Concentration-Dependent Emulsifying Properties of Protein Products Containing Aggregated and Non-Aggregated Milk Protein*. Int. Dairy J. 9: 693-701.
- Fang, Y. and D.G. Dalgleish. 1996. *Competitive Adsorption between Dioleoylphosphatidylcholine and Sodium Caseinate on Oil-Water Interfaces*. J. Agric. Food Chem. 44: 59-64.
- Moffat, C.F., A.S. McGill, R. Hardy, and R.S. Anderson. 1993. *The Production of Fish Oils Enriched in Polyunsaturated Fatty Acid-Containing Triglycerides*. JAOCS 70(2): 133-138.
- Mulvihill, D.M. and P.F. Fox. 1989. *Properties of Milk Proteins*. In P.F. Fox (ed.). *Development in Dairy Chemistry-4*. Elsevier Applied Science, New York.
- Nakamura, R., R. Mizutami, M. Yano, and S. Hayakawa. 1988. *Enhancement of Emulsifying Properties of Protein by Sonicating with Egg Yolk Lecithin*. J. Agric. Food Chem. 36: 729-732.
- Nylander, T. and B. Ericsson. 1997. *Interactions between Proteins and Polar Lipids*. In S.E. Friberg and K. Larsson (eds.). *Food Emulsions*. 3rd edition, revised, and expanded. Marcel Dekker Inc., New York.
- Robson, E.W. and D.G. Dalgleish. 1987. *Interfacial Composition of Sodium Caseinate Emulsions*. J. of Food Sci. 52(6): 1694-1698.
- Rollema, H.S. 1997. *Casein Association and Micelle Formation*. In P.F. Fox (ed.). *Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins*. Blackie Academic & Professional, London.
- Schneider, M. 1989. *Fractionation and Purification of Lecithin*. In B.F. Szuhaj (ed.): *Lecithins: Sources, Manufacture and Uses*. The American Oil Chemistry Society, Champaign, Illinois.
- Singh, H. and L.K. Creamer. 1991. *Changes in Size and Composition of Protein Aggregates on Heating Reconstituted Concentrated Skim Milk at 120 °C*. J. of Food Sci. 56(3): 671-677.
- Tornberg, E., A. Olsson, and K. Persson. 1997. *The Structural and Interfacial Properties of Food Proteins in Relation to Their Function in Emulsions*. In S.E. Friberg and K. Larsson (eds.). *Food Emulsions*. 3rd ed., revised and expanded. Marcel Dekker Inc., New York.