

DETEKSI PROTEOLISIS PADA SUSU SAPI DAN SUSU KEDELAI FERMENTASI MENGGUNAKAN ASAM TRINITROBENZENE SULFONAT

Tridjoko W. Murti¹

INTISARI

Fermentasi susu dengan bakteri asam laktat (BAL) sering menimbulkan kepahitan karena reaksi proteolisis yang membebaskan asam amino. Sejauh ini deteksi proteolisis menggunakan metode asam trinitrobenzene sulfonat (TNBS) dikenal yang paling sensitif untuk menguji proteolisis produk fermentasi. Penelitian ini bertujuan membandingkan pola proteolisis BAL susu sapi (S) dan susu kedelai (K). Enam strains dari 3 spesies BAL, yakni *Streptococcus thermophilus* (St), *Lactococcus lactis subsp. lactis* (Lc) dan *Bifidobacterium sp.* (B) digunakan dalam penelitian ini. Hasilnya menunjukkan bahwa pada susu kedelai, konsumsi asam amino oleh St lebih banyak dari pada produksinya. Sebaliknya, Lc lebih banyak memproduksi asam amino bebas, sehingga nilai δ asam aminonya positif. *Bifidobacterium sp.* cenderung untuk mengkonsumsi asam amino lebih banyak di awal inkubasi, namun membebaskan lebih banyak mulai 24- 48 jam inkubasi. Pada media susu sapi, St, Lc dan B cenderung membebaskan secara bervariasi asam amino pada awal inkubasi sampai 8 jam dengan masing-masing; 0,6, 0,6- 0,8 dan 0,2 mMol setara Glisin/mL. Kemudian terjadi kenaikan konsumsi untuk pertumbuhan masa sel bakterinya yang mengarah pada kesetimbangan produksi dan konsumsi asam amino bebas.

(Kata Kunci : Susu Sapi, Kedelai, Fermentasi Laktat, Aktivitas Proteolisis, TNBS)

Buletin Peternakan 20: 59-65, 1996.

¹Fak. Peternakan UGM, Karangmalang-Yogyakarta 55281

PROTEOLYTIC DETECTION OF FERMENTED MILK AND FERMENTED SOYMILK USING TRINITROBENZENE SULFONIC ACID

ABSTRACT

Fermented milk using lactic acid bacteria (LAB) could produce bitterness of products, due to the proteolysis that release some bitter amino acids or peptides. Proteolytic detection methods are considered, until now, as less sensitive. Its improvement using trinitrobenzene sulfonic acid is capable to detect free amino acids in milk without interferency among amino acids. This study was to compare the proteolytic patterns of fermented milk and fermented soymilk in the presence of *Streptococcus thermophilus* (St), *Lactococcus lactis subsp. lactis* (Lc) and *Bifidobacterium sp.* (B). The results showed that, in soymilk, the rate of amino acids consumption of St was higher than its production. In contrast, *Lactococcus sp.* had produced more free amino acids than its consumption leading to δ amino acids positive. Bifidobacteria had consumed more amino acids in the early of incubation then produced more in the late of incubation (40 h). In milk, all of spesies (St, Lc and B) had release different quantity of free amino acids until 8 h of incubation, i.e.: 0.6; 0.6-0.8 and 0.2 mMol equiv. of Gly/mL, respectively. Then they had consumed more amino acids for cell developing leading to the balance production and consumption of free amino acids.

(Key Words : Milk, Soymilk, Lactic Acid Fermentation, Proteolytic Activities, TNBS)

Pendahuluan

Susu fermentasi, khususnya yoghurt, telah dikenal sejak lama sebagai satu cara konservasi susu, namun ketenarannya di berbagai negara baru berlangsung kira-kira kurang dari 40 tahun. Beberapa genus bakteri yang sering digunakan untuk memfermentasi susu, antara lain : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* dan *Acetobacter* (Puhan, 1988). Bakteri ini sering dikenal pula sebagai bakteri asam laktat (BAL).

Peranan penting BAL adalah mengubah susu menjadi bentuk lain, berstruktur dan bercita rasa serta cita bau baru dan mempunyai aktivitas metabolisme melawan mikrobia penyebab

penyakit dan kerusakan lainnya (Dellaglio, 1988). Peran khususnya, antara lain : Kemampuan BAL menghasilkan asam laktat, asam asetat, beberapa senyawa penyebab bau dan polisakarida. Disamping itu aktivitas metabolisme menaikkan kecernaan pangan, peranan antibiotik, anti tumor dan anti leukemia. Diantara bakteri tergolong BAL ada yang mempunyai aktivitas probiotik, yakni menyeimbangkan ekologi mikrobia usus manusia, seperti *L. acidophilus* dan *Bifidobacterium sp.* yang memberikan nilai positif terhadap kesehatan manusia. Untuk sebab-sebab tersebut, maka BAL dapat dikatakan sebagai pusat motor penggerak dari semua macam susu fermentasi yang ada.

Namun demikian, pengembangan susu fermentasi di Indonesia sejauh ini masih sangat terbatas dan lambat. Hal itu tidak terlepas dari rendahnya konsumsi susu di Indonesia karena persepsi cita rasa, dan cita bau lebih menyukai produk asal tanaman dari pada hewan (Murti, 1994), ketidak tahanan terhadap laktosa (gula susu) yang menghinggapi sebagian besar populasi Indonesia akibat kekurangan enzim laktase (β -galactosidase) yang dihasilkan oleh sel epitel dari usus halus (Scrimshaw dan Murray, 1988 disitasi oleh Murti, 1993), dan alergi susu yang menyerang terutama anak-anak. Pada bayi, reaksi terhadap ini timbul karena ketiadaan laktoglobulin β pada ASI (Otani dan Hosono, 1987 disitasi oleh Murti, 1993).

Sebaliknya kedelai adalah tanaman pangan sumber protein nabati yang luas penggunaannya di Indonesia dan telah dikenal di China sejak 3.000 tahun sebelum Yesus Kristus. Teknologi pemanfaatan kedelai sejak itu bolch dikata hanya mengalami sedikit sekali perubahan dari bentuk seperti tempe, tahu (tofu) dan susu kedelai. Disamping manfaatnya menyediakan protein seimbang (kecuali metionin), lemak, dan non kolesterol juga mempunyai beberapa faktor antinutrisi seperti α -galaktosida, asam fitat, hemaglutinin, senyawa antitripsik dan cita bau serta cita rasa kurang menyenangkan buat konsumen (Kanda *et al.*, 1976). Kedua hal terakhir ini ditimbulkan karena hadirnya senyawa non volatil seperti : Genistine, daidzin, saponin A, E dan B serta keturunannya (Okuba *et al.*, 1992 disitasi oleh Murti, 1993) dan senyawa volatil, *n-hexanal* yang merupakan

produk oksidasi dari asam linoleat (Forss, 1979).

Fermentasi dengan mikrobia tergolong dalam BAL merupakan satu cara perbaikan penampilan dan penerimaan susu sapi dan susu kedelai untuk konsumen yang lebih luas. Pertumbuhan suatu strain BAL, *Lactococcus sp.* dalam susu akan menaikkan jumlah sel bakteri itu sampai 500 μ g bakteri/ml (10^9 bakteri/mL). Untuk mencapai jumlah itu, bakteri perlu mensintesis lebih kurang 260 μ g protein/mL. Jumlah sebesar itu tidak mungkin dipenuhi dari asam amino bebas yang secara natural ada di dalam susu dan hanya memungkinkan pertumbuhan antara 8-16% dari pertumbuhan normalnya (Thomas dan Pritchard, 1987). Oleh karena itu BAL akan menghidrolisis protein susu menggunakan perangkat enzimnya, terutama yang terdapat di dalam dinding selnya. Namun asam amino bebas yang dihasilkan justru sering menimbulkan kepahitan pada produk fermentasi (Renz dan Puhan, 1975; McKellar, 1981), karena kebanyakan asam amino bebas tadi berkonfigurasi L, termasuk yang terdapat pada peptida dari protein kedelai (Ishibashi *et al.*, 1987).

Penelitian ini bertujuan untuk melihat aktivitas proteolisis BAL pada susu sapi dan susu kedelai.

Materi dan Metode

Dua macam media susu dipakai, yakni susu skim (protein 35%, gula 51%, lemak 1%, mineral 9% dan air 5%) dan susu kedelai (protein 45%, gula 20%, lemak 25%, mineral 5,5% dan air 4%). Enam strain BAL dari 3 spesies, yakni : *Streptococcus thermophilus* (St

404 dan 1209); *Lactococcus lactis subsp. lactis* (Lc 29), *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* (Lc 124) dan *Bifidobacterium sp.* (1300 dan 1494). Semua strain diisolasi dari produk komersial dan menjadi CNRZ-INRA Jouy en Josas (France). Isolat tersimpan pada suhu -30°C dalam susu litimus tanpa penambahan atau pra-inkubasi, kecuali untuk *Bifidobacterium sp* ditambahkan padanya ekstrak yeast 5 g/l. Rekonstitusi media pada 10% Bahan Kering (BK), dipanaskan pada 110°C ($10'$) dan disimpan segera pada 4°C semalam sebelum digunakan. Prakultur dilakukan pada strain terpakai pada kadar 9% BK, dan diinkubasikan pada temperatur 42°C (St), 30°C (Lc) dan 39°C (B) sampai keasaman mencapai 3 g setara asam laktat/kg (0,3%). Ini menjadi sumber semua inokulasi kultur yang dilakukan pada 5% BK (v/v) dan diinkubasikan sampai 48 jam. Pengambilan sampel dilaksanakan setiap 4 jam.

Uji proteolisis dilakukan dengan mengukur asam amino bebas menurut McKellar (1981). Sebanyak dua mL sampel kultur dicendapkan dengan 0,72 N asam Trichloroasetat (TCA) selama 30 menit pada suhu kamar. Supernatan diperoleh melalui pemisahan dengan sentrifugasi 3.000 g, selama 15 menit (Sorval-Dupont). Supernatan tersebut disaring dengan filter Millipore 0,45 μ m. Sebanyak 0,2 mL filtrat dicampur dengan 2 mL larutan penyangga Potasium borat 1 M dan 0,8 mL larutan asam Trinitrobenzen sulfonat (TNBS-Sigma), diinkubasikan pada keadaan gelap selama 30 menit pada suhu kamar, kemudian ditambahkan 0,8 mL larutan monosodium fosfat 2 M mengandung 18 mM Na Sulfit untuk menghentikan reaksi. Pengamatan proteolisis menggu-

nakan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm. Absorbansi senyawa kompleks trinitro-amino-nitrit berwarna kuning muda (Barlow *et al.*, 1986) dikonversikan ke mMol grup asam amino bebas/mL kultur dengan kurva standar menggunakan Glisin. Proteolisis didefinisikan sebagai perubahan (kenaikan) konsentrasi dari grup asam amino bebas setara mMol Gli yang tidak tergumpalkan oleh TCA tiap mL susu atau susu kedelai fermentasi.

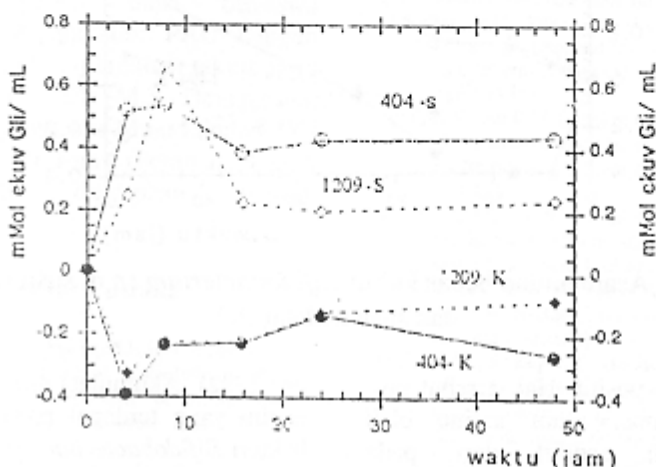
Hasil dan Pembahasan

Derajat proteolisis adalah kesetimbangan antara produksi dan konsumsi asam amino bebas oleh BAL yang menunjukkan kecenderungan berbeda antara media, atau bahkan antara spesies dan strain yang digunakan. *S. thermophilus* tumbuh dan membebaskan asam amino pada susu sapi pada awal inkubasi yang menyebabkan δ asam amino bebas sehingga menghasilkan analisis yang positif dan akan mencapai puncaknya pada 8 jam waktu inkubasinya setara 0,6 mMol Gli/mL (Gb. 1) Selanjutnya terjadi penurunan produksi asam amino menjadi 0,4 mMol Gli/mL. *S. thermophilus* dikenal mempunyai kapasitas proteolitik lebih rendah, berkisar setengah dari kapasitas proteolitik *L. bulgarius* pada media casein susu (Singh dan Sarma, 1983). Pada susu kedelai, banyak mengkonsumsi asam amino pada awal inkubasi setara $-0,4$ mMol/mL. Hal ini berarti bahwa pertumbuhan yang cepat dari masa sel tidak terimbangi oleh pembebasan asam aminonya. Pertumbuhan yang cepat tadi dipengaruhi pula terutama kemampuannya memanfaatkan gula yang ada. Pada susu kedelai banyak

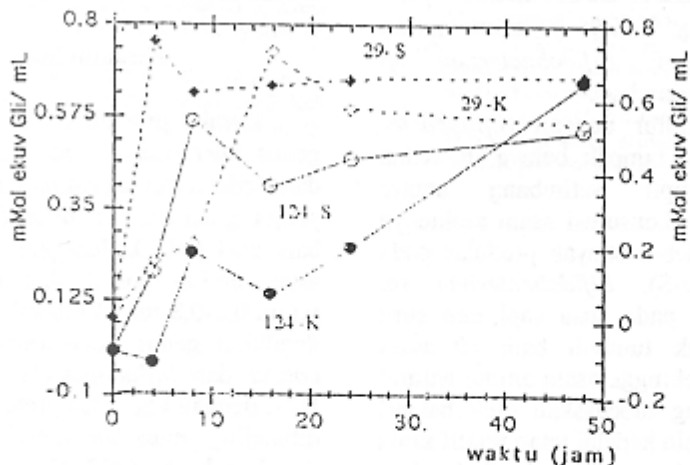
terkandung senyawa gula yang berikatan dengan α -galaktosida seperti raffinosa, stachiosa, verbakosa dan sukrosa (Mital dan Steinkrauss, 1975).

Pada *Lc. lactis subsp. lactis* (Lc 29) dan *Lc. lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* (Lc 124) menunjukkan

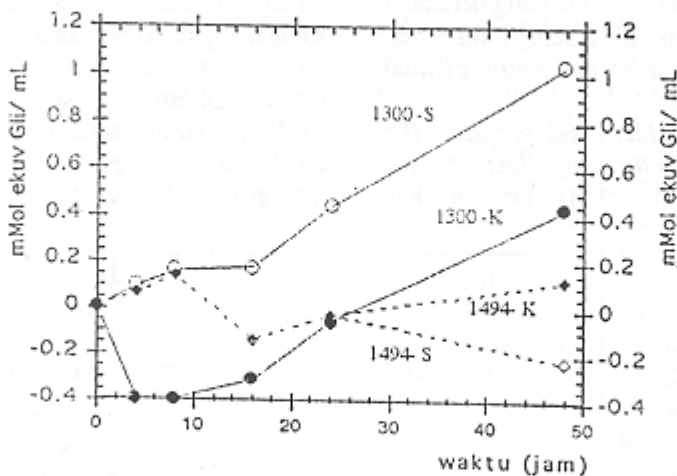
terjadinya nilai δ asam amino positif sampai 8 jam pada kedua media, setara 0,6-0,8 mMol/mL pada susu sapi dan 0,8 mol Gli/mL pada susu kedelai (Gb. 2). Kedua strain menunjukkan perbedaan kemampuan proteolisisnya. Strain 124 terlihat lebih sedikit menghasilkan



Gb. 1 δ Asam amino bebas kultur *St. thermophilus* di susu sapi (S) dan susu kedelai (K)



Gb. 2. δ Asam amino bebas kultur *Lc. lactis subsp. lactis* di susu sapi (S) dan susu kedelai (K)



Gb. 3. ∂ Asam amino bebas kultur *Bifidobacterium sp* di susu sapi (S) dan susu kedelai (K)

∂ asam amino positif. Hal tersebut bisa berarti konsumsi asam amino oleh bakteri lebih sedikit dari pada produksinya. Disamping itu konsumsi macam asam amino oleh bakteri yang tergolong BAL tidaklah pasti sama dengan macam asam amino yang dihasilkannya. Nilai ∂ asam amino kultur dengan *Bifidobacterium sp* terlihat pada gambar 3.

Pada kultur dengan *Bifidobacterium sp.* itu, tampak bahwa di kedua media hampir setimbang antara produksi dan konsumsi asam aminonya (cenderung lebih banyak produksi pada kultur 1300-S). *Bifidobacterium sp.* Strain 1494 pada susu sapi dan susu kedelai tidak tumbuh baik (∂ asam amino 0). Sehingga asam amino natural ataupun yang dibebaskan oleh bakteri ini dari protein kedelai tetap relatif sama dengan sebelum inkubasi. Sedangkan *Bifidobacterium sp.* strain 1300 tidak tumbuh baik pada susu kedelai, namun tumbuh lambat pada susu sapi (Murti *et*

al., 1992). Akumulasi asam amino oleh enzim yang terdapat pada dinding sel bakteri *Bifidobacterium sp.* strain 1300, ini tidak diikuti dengan konsumsi asam amino untuk pertambahan masa sel bakteri itu sendiri, sehingga terjadi akumulasi asam amino bebas.

Kesimpulan

Derajat proteolisis BAL tergolong genus *Lactococcus* pada susu sapi (S) dan Kedelai (K) sangat tergantung strain yang digunakan, namun cenderung lebih baik dari pada kedua genus lainnya (∂ asam amino positif dan stabil pada setara 0,6-0,8 mMol Gli/mL). Meskipun demikian genus *Lactococcus*, *Streptococcus* dan *Bifidobacterium* tergolong BAL dengan kapasitas proteolitik lemah dibanding genus *Lactobacillus* (Thomas dan Pritchard, 1987; Kurmann, 1988). Pola proteolisis dalam satu spesies umumnya sama pada kedua media. Perbedaan yang terjadi lebih mencerminkan kecepatan daya adaptasi

enzimatiknya terhadap gula terlarut (laktosa) pada susu sapi dan gula yang mengandung α -galaktosida pada susu.

Ucapan Terima Kasih

Artikel ini merupakan hasil penelitian berkat dana beasiswa pemerintah RI, melalui PAU Pangan dan Gizi UGM dan bantuan teknis serta nasehat dari : Dr. M.J. Demazeaud, M.C. Bouillanne dan Mme Landon dari INRA Jouy en Josas (Perancis. Untuk semua itu diucapkan banyak terimakasih.

Daftar Pustaka

- Barlow, L.E., G.T. Lloyd and E.H. Ramshaw. 1986. The measurement of proteolytic in cheddar cheese. A comparison of trinitrobenzene sulfonic acid procedures. *Aust. J. Dairy Technol.* 3.
- Dellaglio, F. 1988. Starters for fermented milk. Section 1. Taxonomy and metabolism. *In* Fermented milk. Science and Technology. IDF bull no 227.
- Forss, D.A. 1979. Review of the progress of dairy sciences. Mechanisms of formation of aroma in milk and milk products. *J. Dairy Res.* 46: 691-706.
- Ishibashi, N., L. Ono, K. Kato, T. Shigenaga, I. Shinoda, H. Okai, and S. Fukui. 1987. Role of the hydrophobic amino residue in the bitterness of peptide. *Agric. Biol. Chem.* 52: 91-94.
- Kanda, H., H.L. Wang, C.W. Hesseltine, and K. Warner. 1976. Yoghurt production by *Lactobacillus* fermentation of soybean milk. *Process. Biochem.* 11: 23-25.
- Kurmann, J.A. 1988. Starters for fermented milk. Section 5. Starters with selected intestinal bacteria. *In* Fermented milk, Science and Technology. IDF Bull. no 227.
- McKellar, R.C. 1981. Development of flavors in Ultra high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. *J. Dairy Sci.* 64: 2138-2145.
- Mital, B.K. and K.H. Steinkraus. 1975. Utilization of oligosaccharides by lactic acid bacteria during fermentation of soymilk. *J. Food Sci.* 40: 114-118.
- Murti, T.W. 1993. "Growth, Sensory and biochemical effects of fermented soymilk using lactic acid bacteria and bifidobacteria, as compared to those of fermented cowmilk". Disertasi doktor Universitas Caen-INRA Jouy en Josas (Perancis).
- Murti, T.W., S. Roger, C. Bouillanne, M. Landon et M.J. Desmazeaud. 1992. Croissance de *Bifidobacterium sp.* CNRZ 1494 dans l'extrait du soja et du lait de vache. L'effet sur les composés aromatiques. *Sci. Aliments* 12: 429-439.
- Puhan, Z. 1988. Introduction. *In* Fermented milk, Science and Technology. IDF bull no 227.
- Rens, V. U, and Z. Puhan. 1975. "Contribution to knowledge of favouring bitterness in yoghurt. *Milchwissenschaft* 30: 265-271.
- Singh, J. and D.K. Sharma. 1983. Proteolytic breakdown of casein and its fraction by lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft* 38: 148-149.
- Thomas, T.D., and G.G. Pritchard. 1987. Proteolytic enzymes of dairy starters cultures. *FEMS Microb. Rev.* 46: 245-268.