

# 1 PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Emulsi terdiri dari dua fase yang tidak dapat bercampur (pada umumnya air dan minyak), dengan satu fase terdispersi sebagai droplet kecil di fase lainnya. Emulsi tidak dapat dibentuk begitu saja dengan menghomogenisasi air dan minyak bersama, karena kedua fase tersebut dapat memisah dengan cepat. Hal ini dikarenakan droplet minyak cenderung menyatu satu sama lain ketika saling bertumbukan, yang pada akhirnya menyebabkan pemisahan fase secara total. Pembentukan emulsi yang stabil memungkinkan apabila menggunakan pengemulsi (McClements, 2016). Salah satu aspek kritis dalam pembentukan emulsi yang baik adalah pemilihan pengemulsi yang tepat. Pengemulsi merupakan senyawa aktif permukaan yang memiliki peran memfasilitasi pembentukan emulsi dan mendorong peningkatan stabilitas emulsi (Kralova & Sjöblom, 2009). Protein dan fosfolipid digunakan secara luas sebagai pengemulsi, terutama pada industri pangan (Bos & Nylander, 1996).

Protein merupakan salah satu pengemulsi yang sering terdapat pada industri pangan, karena memiliki permukaan aktif yang mengandung campuran asam amino hidrofilik dan hidrofobik sepanjang rantai polipeptidanya. Protein memiliki sifat emulsifikasi karena sifat amfipatiknya (memiliki gugus hidrofobik dan hidrofilik) dan kemampuan membentuk lapisan pada antar-muka minyak air (McClements, 2004). Namun, emulsi yang distabilisasi dengan protein sensitif terhadap perubahan muatan, serta protein cenderung berdifusi lambat menuju antar-muka dibandingkan pengemulsi dengan berat molekul yang lebih kecil (Bos & Vliet, 2001; Sui et al., 2016). Protein cenderung teragregasi pada titik isoelektrik, sehingga emulsi yang distabilisasi protein perlu memiliki pH yang lebih jauh dari titik isoelektrik untuk mencegah agregasi (Yamamoto & Araki, 1997). Oleh karena itu, berdasarkan masalah tersebut, emulsi yang distabilisasi protein dapat membatasi pengolahan dan produksi industri minuman.

Fosfolipid merupakan salah satu pengemulsi ionik dan termasuk pengemulsi dengan berat molekul rendah yang digunakan untuk mengurangi tegangan permukaan (Mottola *et al.*, 2015). Pengemulsi dengan berat molekul rendah (fosfolipid) lebih efektif dalam

mengurangi tegangan permukaan emulsi dibandingkan pengemulsi berat molekul tinggi (protein). Namun, pengemulsi berat molekul rendah lebih tidak efektif dalam melawan *coalescence*. Hal ini dikarenakan gaya tolak menolak sterik di antara droplet minyak yang dilingkupi protein sangat efektif dalam melawan agregasi (Bos & Vliet, 2001). Ketika protein membentuk kompleks dengan fosfolipid, terjadi peningkatan kestabilan emulsi walaupun pH emulsi di sekitar titik isoelektrik (Comas *et al.*, 2006). Selain itu Scuriatti *et al.* (2003), menemukan bahwa penambahan fosfolipid dapat meningkatkan kestabilan emulsi yang mengandung protein natif atau terdenaturasi. Interaksi hidrofobik antara protein yang terdenaturasi dan fosfolipid berperan penting dalam pembentukan kompleks protein-fosfolipid (Nieuwenhuyzen & Szuhaj, 1998).

Mekanisme pembentukan kompleks protein-fosfolipid dimulai dari atraksi ionik/elektrostatik, yang kemudian diikuti oleh interaksi hidrofobik untuk menstabilisasi kompleks (Brown *et al.*, 1983). Ikatan elektrostatik tarik menarik terjadi karena muatan yang berlawanan antara protein dan fosfolipid. Molekul muatan positif fosfolipid (contoh: kolin) akan saling tarik menarik dengan molekul muatan negatif protein (contoh: aspartil, glutamil), atau muatan negatif gugus fosfat fosfolipid dan muatan positif protein (contoh: lisil atau guanidil, amil) (Friberg *et al.*, 2004). Adanya adsorpsi protein pada bagian hidrofobik gugus ekor fosfolipid dapat meningkatkan densitas lapisan yang melingkupi droplet minyak, sehingga dapat menurunkan risiko droplet minyak saling menempel (Fang & Dalgleish, 1993).

Kedua tahap mekanisme tersebut dipengaruhi oleh faktor lingkungan emulsi yaitu pH dan suhu pemanasan. Ikatan elektrostatik dipengaruhi oleh faktor pH emulsi, sementara ikatan hidrofobik dipengaruhi perlakuan untuk mendenaturasi protein seperti suhu pemanasan, maka penting untuk mengetahui pengaruh pH dan suhu pemanasan terhadap mekanisme kedua ikatan tersebut pada kompleks protein-fosfolipid. Oleh karena itu, penelitian *review* ini bertujuan menyediakan informasi dan menganalisis pengaruh pH dan suhu pemanasan terhadap mekanisme stabilisasi pembentukan kompleks protein-fosfolipid pada emulsi minyak dalam air. Hasil dari studi *review* ini dapat digunakan untuk kepentingan penelitian berbagai emulsi yang distabilisasi oleh protein, sehingga dapat meningkatkan stabilitas emulsi tersebut.

## 1.2 Publikasi *Review* Sebelumnya

Interaksi protein-fosfolipid sebagai pengemulsi dapat meningkatkan kestabilan emulsi. Pengetahuan dasar mengenai interaksi antara protein dan fosfolipid dibutuhkan untuk meningkatkan stabilitas emulsi di pengolahan makanan. Dalam *review* oleh Nieuwenhuyzen & Szuhaj (1998), dijabarkan berbagai hasil penelitian mengenai berbagai efek sinergis protein-fosfolipid terhadap stabilitas emulsi.

Ozturk & McClements (2015), menyediakan *review* dari berbagai studi terkini tentang identifikasi, karakterisasi, dan penggunaan *natural food-grade emulsifier* seperti protein dan fosfolipid. Khususnya karakterisasi yang berhubungan dengan sifat struktural pengemulsi tersebut terhadap kemampuannya untuk membentuk dan menstabilkan emulsi. Pengaruh lingkungan seperti pH dan pemanasan dapat mempengaruhi kinerja pengemulsi protein dan fosfolipid pada aplikasinya di berbagai emulsi

Keefektifan proses pemanasan protein susu sebagai alternatif untuk memodifikasi sifat emulsifikasi protein telah didokumentasikan pada berbagai literatur. Dalam *review* oleh Peng *et al* (2016) dan Raikos (2010), telah dirangkum berbagai efek pemanasan terhadap sifat emulsifikasi protein. Kedua *review* tersebut mengkombinasikan berbagai pengetahuan pada bagaimana proses pemanasan protein susu kedelai dan susu sapi mempengaruhi sifat fisikokimiawi emulsi yang distabilisasi oleh kedua protein tersebut.

Dari semua *review* di atas, belum ada yang membahas mengenai mekanisme pembentukan kompleks protein-fosfolipid dan pengaruhnya terhadap stabilisasi emulsi. Dalam pembentukan kompleks tersebut perlu diulas kedua faktor lingkungan emulsi yang mempengaruhi pembentukannya yaitu pH dan pemanasan. Pada *review* ini, akan dibahas pengaruh kedua faktor lingkungan emulsi tersebut dalam pembentukan kompleks protein-fosfolipid dan pengaruhnya terhadap kestabilan emulsi.

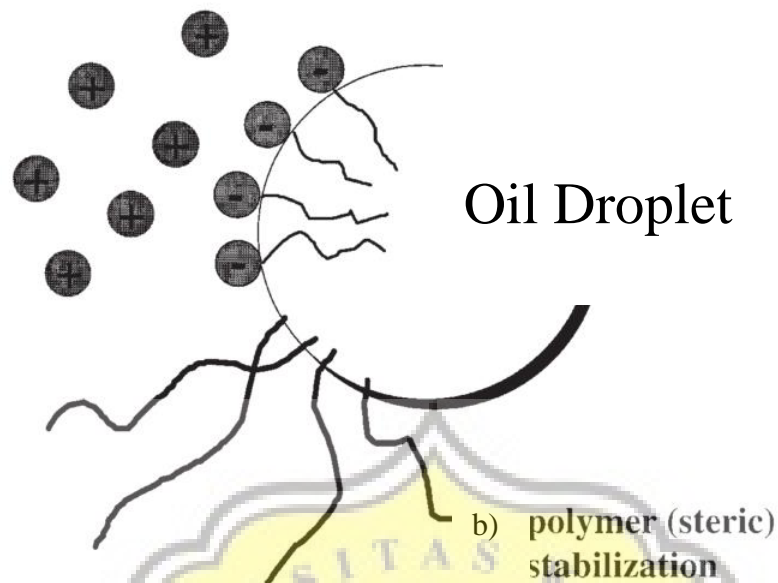
### 1.3 Mekanisme Stabilisasi Emulsi

Menurut hukum termodinamika sistem emulsi tidak stabil, dikarenakan sistem akan cenderung bergerak ke tingkat energi terendah. Secara normal, air dan minyak akan terpisah membentuk dua fase yang stabil (Molina *et al.*, 1999). Emulsi dapat distabilisasi dengan menurunkan tegangan permukaan droplet minyak atau dengan meningkatkan densitas lapisan yang melingkupi droplet minyak (Jeong *et al.*, 2001). Kestabilan emulsi tergantung interaksi antara berbagai gaya tarik menarik dan tolak menolak di antara droplet yang dipengaruhi stabilisasi elektrostatis dan sterik.

Stabilisasi elektrostatis tarik menarik (Gambar 1) terjadi karena adanya perbedaan muatan antara permukaan droplet minyak dan pengemulsi ionik. Semua droplet di emulsi distabilisasi oleh tipe pengemulsi yang sama, sehingga memiliki muatan yang sama. Interaksi elektrostatis di antara droplet yang memiliki muatan yang sama adalah tolak menolak, sehingga interaksi elektrostatis berperan besar dalam mencegah droplet saling mendekat untuk agregasi. Gaya elektrostatis yang tinggi di antara droplet minyak menyebabkan semakin tingginya stabilitas emulsi. Oleh karena itu, interaksi antara dua droplet tergantung dari muatan permukaan droplet. Protein dan fosfolipid merupakan pengemulsi ionik, sehingga dapat menstabilisasi emulsi secara elektrostatis (McClements, 2016; Nieuwenhuyzen & Szuhaj, 1998; Ozturk & McClements, 2015).

Sementara, stabilisasi sterik (Gambar 1) adalah stabilisasi droplet minyak oleh makromolekul non ionik dengan membentuk pembatas fisik, untuk mencegah kontak antara droplet minyak. Polimer dengan berat molekul yang tinggi seperti protein dapat diadsorpsi pada permukaan droplet fase terdispersi, sehingga menyediakan pembatas kontak fisik. Protein memiliki rantai samping polipeptida hidrofobik dan hidrofilik, dimana sisi hidrofobik akan berlokasi pada fase minyak, sedangkan sisi hidrofilik pada sisi air di antar-muka. Ketika partikel yang telah dilingkupi oleh polimer saling mendekat, menyebabkan timbulnya gaya tolak menolak yang memisahkan partikel satu sama lain. Protein dapat menstabilisasi sterik dengan cara membentuk lapisan tebal pada antar-muka minyak air (Napper, 1977).

a) **electrostatic stabilization**



Gambar 1. Mekanisme Stabilisasi Emulsi. Stabilisasi elektrostatis, (a) perbedaan muatan yang diberikan oleh pengemulsi ionik membantu menstabilkan emulsi, sedangkan stabilisasi sterik (b) akan menghalangi droplet minyak secara fisik untuk membentuk agregat (Nieuwenhuyzen & Szuhaj, 1998)

### 1.3.1 Protein

Protein memiliki permukaan aktif karena mengandung campuran asam amino hidrofilik dan hidrofobik sepanjang rantai polipeptidanya. Oleh karena itu, protein memiliki sifat emulsifikasi karena sifat amfipatik (memiliki gugus hidrofobik dan hidrofilik) dan kemampuan membentuk lapisan pada permukaan droplet minyak. Dua mekanisme protein dalam mencegah agregasi droplet minyak yaitu dengan stabilisasi sterik dan elektrostatis (Foegeding & Davis, 2011).

Stabilisasi elektrostatis tolak menolak dapat dihasilkan karena protein mengandung asam amino dengan rantai samping yang memiliki muatan negatif ( $-\text{COO}^-$ ) atau positif ( $-\text{NH}_3^+$ ). Pembentukan lapisan muatan yang melingkupi droplet minyak menyebabkan droplet saling tolak menolak untuk mencegah tumbukan. Sementara, stabilisasi tolak menolak sterik terjadi dengan cara membentuk lapisan tebal pada droplet minyak. Dikarenakan protein termasuk berat molekul yang tinggi, maka protein dapat membentuk lapisan pembatas fisik yang tebal pada permukaan droplet minyak untuk mencegah agregasi

droplet minyak (Chen & Ono, 2014; Foegeding & Davis, 2011). Asam amino hidrofobik yang terdapat di dalam inti protein harus keluar dan teradsorpsi pada permukaan droplet minyak. Sementara, asam amino hidrofilik yang berada di dalam fase air berperan sebagai penghalang sterik untuk melawan *coalescence* dan flokulasi (Nishinari *et al.*, 2014).

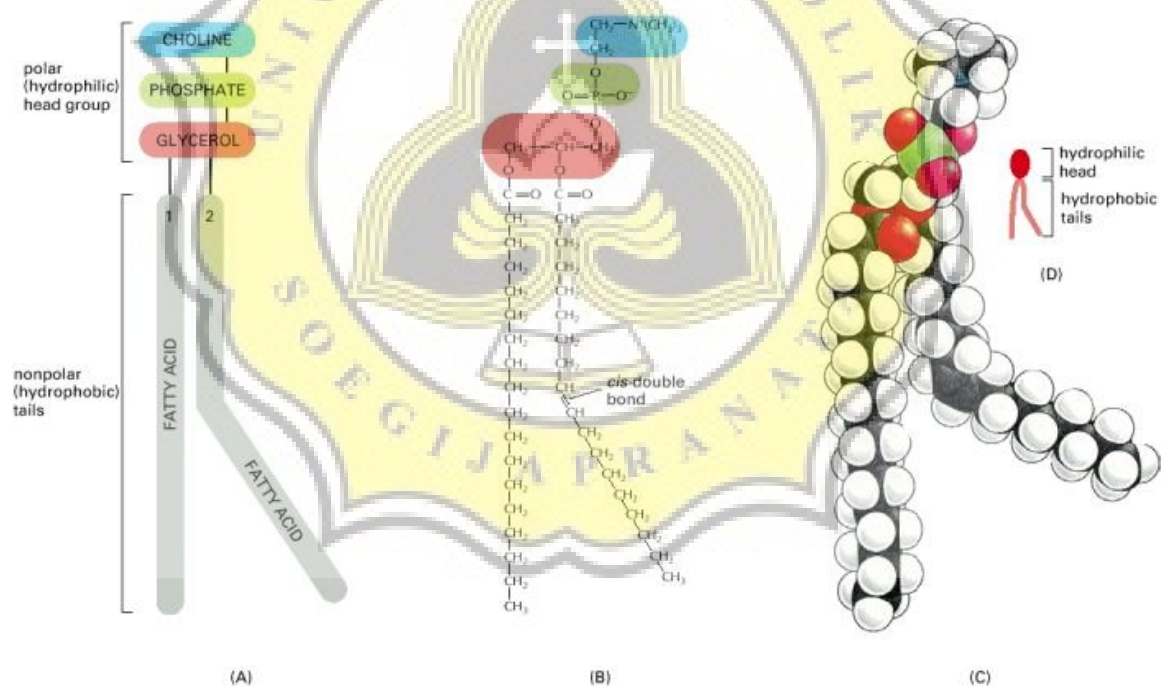
Tidak seperti pengemulsi dengan berat molekul kecil yang dapat berdifusi dengan cepat menuju antar-muka sehingga membentuk emulsi yang baik, protein cenderung mengambil tempat yang besar dan memiliki laju difusi yang lambat (McClements, 2016). Permukaan hidrofobik mempengaruhi kemampuan protein untuk mengadsorpsi minyak pada antar-muka, dimana semakin besar sifat hidrofobik protein maka semakin tinggi kapasitas emulsi (Kim *et al.*, 2005). Sementara, muatan protein mempengaruhi laju difusi protein menuju permukaan droplet minyak (Karaca *et al.*, 2011).

Protein dapat menyusun ulang strukturnya pada permukaan droplet minyak. Bagian hidrofobik protein akan terbuka pada fase lipid dan bagian polar (hidrofilik) akan terbuka pada fase air. Bagian hidrofobik akan berada di dalam molekul, sementara bagian hidrofilik akan berada di permukaan molekul. Bentuk globular tertutup dan ukuran molekul yang besar pada protein menyebabkan sifat emulsifikasi dapat terbatas (Chen *et al.*, 2014). Perubahan suhu berperan dalam proses denaturasi protein tersebut. Kemampuan protein untuk berdifusi, muatan permukaan, kemudahan untuk *unfolding* (denaturasi), dan membentuk lapisan pada droplet akan mempengaruhi tegangan permukaan (Lakemond *et al.*, 2000). Studi oleh Graham & Philips (1979) pada kinetik adsorpsi protein di antar-muka menyebutkan bahwa protein menjadi pengemulsi yang baik apabila memiliki sifat : (1) laju difusi dan adsorpsi yang tinggi menuju antar-muka, (2) kemampuan *unfold* yang cepat dan re-orientasi pada antar-muka, dan (3) interaksi intradroplet pada antar-muka.



### 1.3.2 Fosfolipid

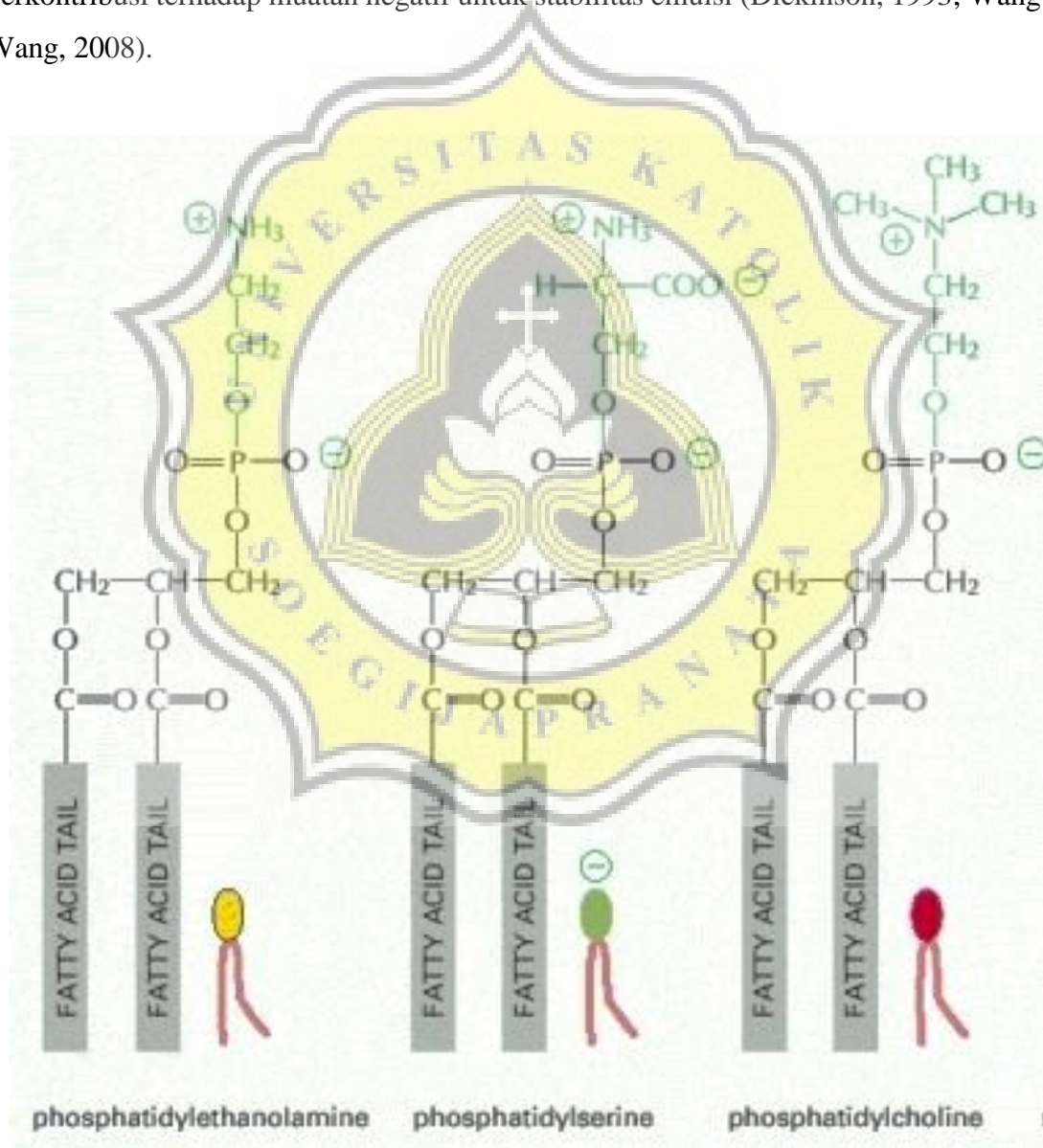
Fosfolipid merupakan molekul amfipatik, sehingga dapat teradsorpsi pada antar-muka dengan bagian ekor (asam lemak non polar) yang mengikat fase minyak dan bagian kepala (polar) yang mengikat fase air, sehingga menurunkan tegangan permukaan atau antar-muka (Xu *et al.*, 2011). Stabilisasi fosfolipid dalam melapisi droplet minyak untuk melawan agregasi adalah dengan gaya elektrostatis dikarenakan muatan elektrik pada gugus hidrofiliknya (Ozturk *et al.*, 2014). Fosfolipid memiliki satu gugus kepala (hidrofilik) polar dan dua gugus ekor hidrokarbon (hidrofobik). Bagian ekor merupakan asam lemak, dan dibedakan menurut panjangnya (biasanya mengandung antara 14 sampai 24 atom karbon). Satu ekor biasanya memiliki satu atau lebih ikatan rangkap –cis (asam lemak tidak jenuh) dan yang lainnya tidak memiliki ikatan rangkap (jenuh), seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2 (Alberts *et al.*, 2002).



Gambar 2. Bagian Molekul Fosfolipid. (A) skematis, (B) secara formula, (C) model space-filling, dan (D) simbol (Alberts *et al.*, 2002)

Struktur dari fosfolipid dengan gugus kepala yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 3. Pada fosfolipid, gugus kepala dapat terbentuk dari kolin, etanolamin, serin, gliserol ataupun inositol yang membentuk FK (fosfatidilkolin), FE (fosfatidiletanolamin), FS

(fosfatidilserin), FG (fosfatidilgliserol), dan FI (fosfatidilinositol) (Dornbos, Mullen, & Hammondc, 1989). Molekul FK dan FE terdiri dari muatan positif gugus kolin (untuk FK) dan etanolamin (untuk FE), serta muatan negatif gugus fosfat. FK dan FE merupakan pengemulsi tipe ion *zwitter*, sehingga bersifat netral pada pH netral. Sementara, FI (fosfatidilinositol), AF (asam fosfatidat), FG (fosfatidilgliserol), dan fosfatidilserin (FS) memiliki muatan negatif dan merupakan pengemulsi anionik pada pH netral (Gierula *et al.*, 2008; Wang & Wang, 2008). FK dan FE tidak berkontribusi secara signifikan pada muatan droplet emulsi pada pH netral, sedangkan FI atau komponen anionik lainnya berkontribusi terhadap muatan negatif untuk stabilitas emulsi (Dickinson, 1993; Wang & Wang, 2008).



Gambar 3. Tiga jenis fosfolipid dengan gugus kepala yang berbeda beserta muatannya (Alberts *et al*, 2002)



### 1.3.3 Mekanisme Emulsifikasi oleh Kompleks Protein-Fosfolipid

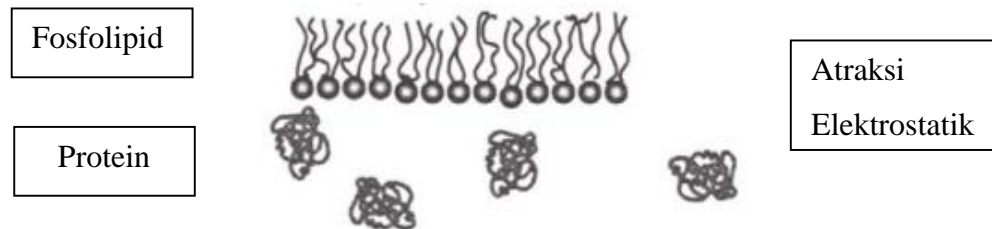
Protein dan fosfolipid digunakan secara luas sebagai pengemulsi, terutama pada industri pangan (Bos & Nylander, 1996). Berdasarkan berat molekulnya, terdapat dua kelas molekul yang memiliki kecenderungan teradsorpsi kuat pada permukaan droplet minyak pada emulsi minyak dalam air, yaitu pengemulsi dengan berat molekul tinggi seperti protein dan pengemulsi dengan berat molekul rendah seperti fosfolipid (Courthaudon *et al.*, 1991). Fosfolipid ditambahkan ke berbagai pengolahan makanan sebagai pengemulsi utama atau bersama dengan protein. Pengemulsi dengan berat molekul rendah (fosfolipid) lebih efektif dalam mengurangi tegangan permukaan emulsi dibandingkan pengemulsi berat molekul tinggi (protein). Namun, pengemulsi berat molekul rendah lebih tidak efektif dalam melawan *coalescence*. Hal ini dikarenakan gaya tolak menolak sterik di antara droplet minyak yang dilindungi protein sangat efektif dalam melawan agregasi (Bos & Vliet, 2001). Oleh karena itu, kompleks protein-fosfolipid berkontribusi secara signifikan terhadap sifat fisik berbagai sistem emulsi (Hasenhetzl & Hartel, 2008).

Mekanisme yang memungkinkan interaksi protein-lipid pada antar-muka o/w terdiri dari beberapa langkah dapat dilihat pada Gambar 4 yaitu,

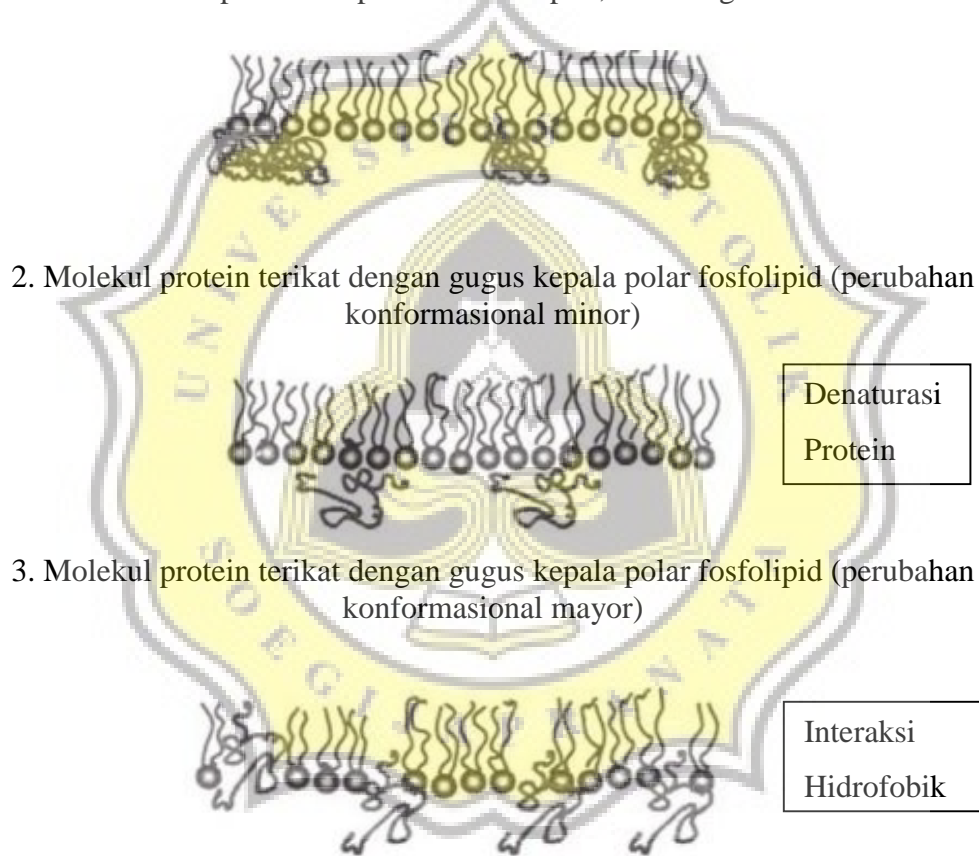
1. pendekatan molekul protein ke permukaan droplet, didukung dengan elektrostatis tarik menarik
2. pengikatan protein dengan lipid
3. masuknya sejumlah protein ke dalam gugus hidrofobik fosfolipid (Cornell & Patterson, 1989).

Dari Gambar 4 diketahui bahwa mekanisme pembentukan kompleks protein-fosfolipid dimulai dari atraksi ionik/ elektrostatis, yang kemudian diikuti oleh interaksi hidrofobik untuk menstabilisasi kompleks (Brown *et al.*, 1983). Ikatan elektrostatis terjadi karena perbedaan muatan elektrik pada protein maupun fosfolipid dalam stabilitas emulsi pada kondisi pH berbeda. Molekul muatan positif fosfolipid (contoh: kolin) akan saling tarik menarik dengan molekul muatan negatif protein (contoh: aspartil, glutamil), atau muatan negatif gugus fosfat fosfolipid dan muatan positif protein (contoh: lisil atau guanidil, amil) (Friberg *et al.*, 2004). Setelah itu, pada tahap kedua terjadi adsorpsi protein pada lubang hidrofobik di gugus ekor fosfolipid yang dapat meningkatkan densitas lapisan

yang melingkupi droplet minyak, sehingga dapat menurunkan risiko saling menempelnya antar droplet minyak (Fang & Dalgleish, 1993). Interaksi hidrofobik dapat ditingkatkan dengan mendenaturasi protein untuk mengeluarkan bagian hidrofobik protein.



1. Pendekatan molekul protein ke permukaan droplet, didukung oleh atraksi elektrostatis

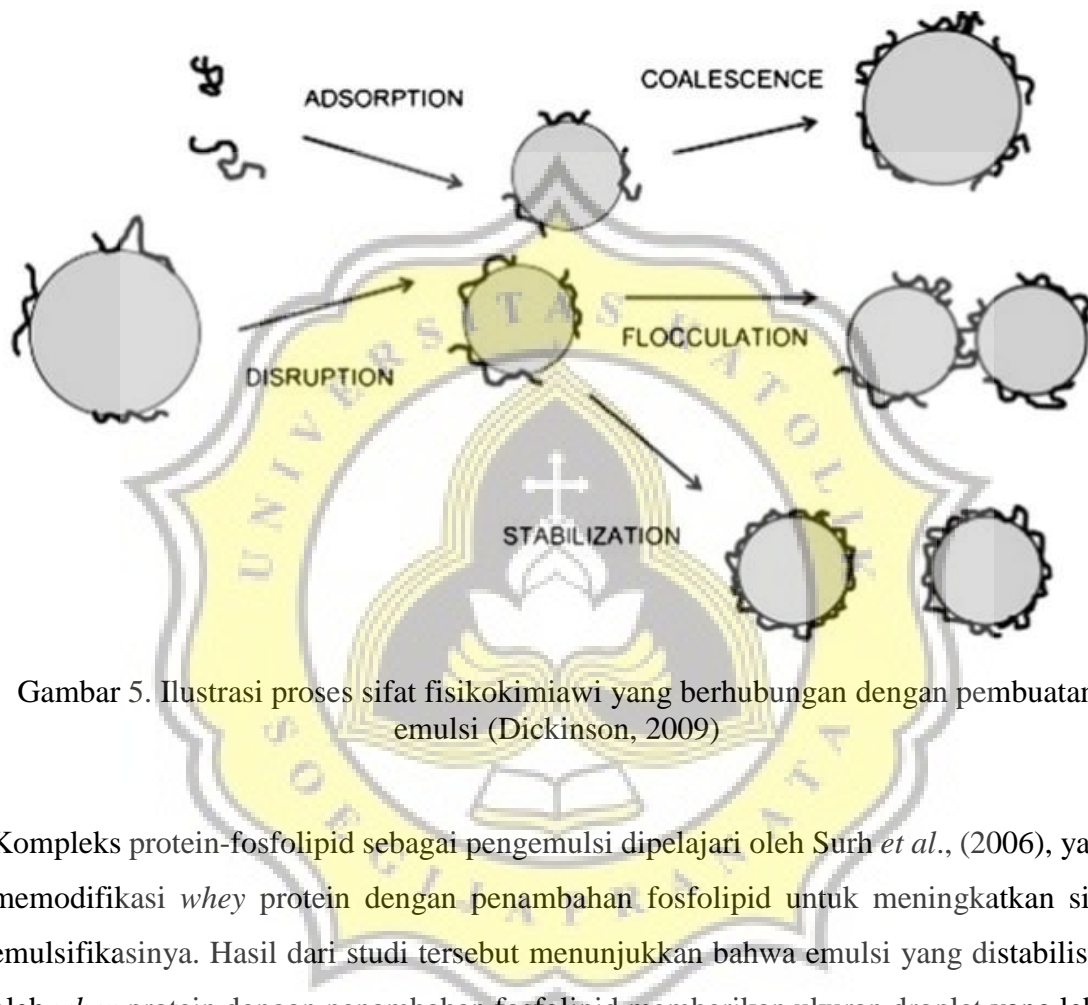


4. Molekul protein penetrasi pada bagian gugus ekor hidrofobik fosfolipid

Gambar 4. Mekanisme Emulsifikasi oleh Kompleks Protein-Fosfolipid (Nylander, 1998)

Pada Gambar 5 dapat dilihat, bahwa gangguan mekanis seperti homogenisasi akan memecah droplet minyak menjadi lebih kecil, sehingga setelah itu pengemulsi harus teradsorpsi secara efektif melingkupi seluruh permukaan droplet. Lapisan pengemulsi

yang tidak mencukupi dapat menyebabkan *coalescence* atau flokulasi (Dickinson, 2009). Oleh karena itu, jumlah protein yang teradsorpsi pada antar-muka perlu ditingkatkan untuk mengurangi risiko *coalescence* ataupun flokulasi, dengan meningkatkan stabilisasi elektrostatik pada tahap pertama.



Gambar 5. Ilustrasi proses sifat fisikokimiawi yang berhubungan dengan pembuatan emulsi (Dickinson, 2009)

Kompleks protein-fosfolipid sebagai pengemulsi dipelajari oleh Surh *et al.*, (2006), yaitu memodifikasi *whey* protein dengan penambahan fosfolipid untuk meningkatkan sifat emulsifikasinya. Hasil dari studi tersebut menunjukkan bahwa emulsi yang distabilisasi oleh *whey* protein dengan penambahan fosfolipid memberikan ukuran droplet yang lebih kecil dibandingkan *whey* protein konvensional. Hal ini dikarenakan oleh (i) fosfolipid teradsorpsi lebih cepat menuju permukaan droplet dibandingkan protein, sehingga meningkatkan interaksi elektrostatik tarik menarik antara fosfolipid dan protein (McClements, 2016); (ii) kompleks protein-fosfolipid menyebabkan peningkatan ketebalan lapisan antarmuka minyak-air, sehingga menyediakan kestabilan yang lebih baik untuk melawan *coalescence* (Sjöblom, 2001).

#### 1.4 Tujuan

Penelitian *review* ini bertujuan menyediakan informasi dan menganalisis pengaruh pH dan suhu pemanasan terhadap mekanisme stabilisasi pembentukan kompleks protein-fosfolipid pada emulsi minyak dalam air.

