

5 PENGARUH PH DAN PEMANASAN TERHADAP MEKANISME STABILISASI KOMPLEKS PROTEIN-FOSFOLIPID

Dari mekanisme pembentukan kompleks protein-fosfolipid pada Subbab 1.3.3., diketahui bahwa stabilisasi emulsi diawali dari atraksi ionik/ elektrostatik, yang kemudian diikuti oleh interaksi hidrofobik (Brown *et al.*, 1983). Ikatan elektrostatik 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). Adanya adsorpsi protein pada gugus hidrofobik di gugus ekor fosfolipid tersebut dapat meningkatkan densitas lapisan yang melingkupi droplet minyak, sehingga dapat menurunkan risiko saling menempelnya antar droplet minyak (Fang & Dalgleish, 1993). Ikatan elektrostatik dipengaruhi oleh faktor pH emulsi, sementara ikatan hidrofobik dipengaruhi perlakuan untuk mendenaturasi protein seperti pemanasan. Oleh karena itu, pentingnya mengetahui pengaruh pH dan pemanasan terhadap mekanisme kedua ikatan tersebut pada kompleks protein-fosfolipid.

5.1 pH

Sifat dari emulsi yang distabilisasi dengan oleh pengemulsi ionik (protein dan fosfolipid) sensitif terhadap pH emulsi. Protein dan fosfolipid memiliki muatan, sehingga nilai pH emulsi dapat memodifikasi permukaan aktif antara droplet minyak di emulsi. Apabila nilai pH emulsi menyebabkan pengemulsi kehilangan muatannya, maka gaya elektrostatik tarik menarik antar protein-fosfolipid tidak cukup kuat untuk membentuk lapisan pelindung droplet, sehingga dapat menyebabkan droplet teragregasi. Agregasi droplet dapat menyebabkan ketidakstabilan emulsi seperti laju *creaming* yang lebih tinggi (McClements, 2016).

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 *et al.*, 1989). Salah satu contoh emulsi buatan fosfolipid adalah lesitin, campuran fosfolipid yang

mengandung 29-46% fosfatidilkolin (FK), 21-34% fosfatidiletanolamin (FE), dan 13-21% fosfatidilinositol (FI) (Dickinson, 1993). Molekul FK dan FE terdiri dari muatan positif gugus choline (untuk FK) dan etanolamin (untuk FE), serta muatan negatif gugus fosfat. Dapat dilihat pada tabel 2, 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., 1999; Wang & Wang, 2008).

Sementara kajian muatan fosfolipid selain pada pH netral belum tersedia, sehingga perlu dipelajari lebih lanjut. Oleh karena itu, dugaan muatan fosfolipid pada pH tertentu berdasarkan analogi ion *zwitter* pada protein dapat dilihat pada tabel 2. Di atas pH tertentu, fosfolipid memiliki muatan positif yang lebih dominan, sebaliknya dibawah pH tertentu, fosfolipid memiliki muatan negatif yang lebih dominan. Hal ini dikarenakan masing- masing jenis fosfolipid memiliki gugus muatan yang berbeda.

Tabel 2. Muatan berbagai jenis fosfolipid dari pH asam hingga basa

Jenis fosfolipid	pH		
	Asam (<7)	Netral (7)	Basa (>7)
FK dan FE	+	+/-	-
AF,FG, FS, dan FI	+/-	-	-

FK: fosfatidilkolin, FE: fosfatidiletanolamin, FI: fosfatidilinositol, AF: asam fosfatidat, FS: fosfatidilserin

pH larutan menjadi penting untuk menjaga stabilitas emulsi yang dibuat dengan protein. pH dapat mempengaruhi perubahan konformasi protein. Telah diketahui bahwa protein cenderung teragregasi saat pH pada titik isoelektrik. Oleh karena itu, emulsi yang distabilisasi oleh protein, pH emulsi harus jauh dari titik isoelektrik untuk mencegah *coalescence* dan *creaming* yang merupakan salah satu bentuk agregasi (Yamamoto & Araki, 1997). Perubahan pH emulsi dapat mempengaruhi muatan protein. Apabila pH emulsi di atas titik isoelektrik protein, maka protein akan bermuatan negatif dan sebaliknya protein akan bermuatan positif pada pH emulsi di bawah titik isoelektrik. Pada kondisi elektrostatik tolak menolak rendah (pH di sekitar titik isoelektrik) terjadi

flokulasi, sementara kondisi elektrostatik tolak menolak tinggi (pH jauh dari titik isoelektrik) dapat mencegah terjadi flokulasi (Delahaije *et al*, 2013).

Namun, pada Tabel 3 ketika protein membentuk kompleks dengan fosfolipid, terjadi peningkatan kestabilan emulsi walaupun pH emulsi di sekitar titik isoelektrik (Comas *et al.*, 2006). Hal ini dikarenakan ikatan elektrostatik tarik menarik terjadi karena muatan yang berlawanan 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). Oleh karena itu, pH emulsi harus dikondisikan agar muatan antara protein dan fosfolipid berlawanan, sehingga dapat terjadi interaksi elektrostatik tarik menarik. Interaksi kedua senyawa tersebut membentuk kompleks protein-fosfolipid pada permukaan droplet minyak. Kompleks yang terbentuk dapat meningkatkan densitas lapisan pelindung droplet minyak. Oleh karena itu, untuk membuat emulsi yang distabilisasi oleh protein stabil perlu bantuan muatan berlawanan dari fosfolipid.

Selain itu, perlu diketahui bahwa, walaupun muatan protein dikatakan negatif, namun tetap membawa muatan positif, dimana dengan orientasi protein yang sesuai pada antar-muka dapat mengikat gugus negatif pada antar-muka (Nylander, 1998). Protein dengan muatan negatif dapat berinteraksi dengan fosfolipid muatan negatif, dikarenakan adanya daerah residu muatan positif pada permukaan protein dapat berorientasi menuju muatan positif fosfolipid. Hal tersebut berhubungan dengan sifat orientasi yang berbeda pada masing-masing protein (Bos & Nylander, 1996).

Tabel 3. Pengaruh pH emulsi terhadap kestabilan emulsi oleh kompleks protein –fosfolipid

Protein	Fosfolipid	Titik isoelektrik protein	pH emulsi	Parameter Pengukuran Kestabilan Emulsi	Hasil Pengukuran	Referensi
Isolat protein kedelai (mengandung 90 % protein kedelai murni)	Lesitin (44,1% FK; 31,9 % FE; 13,4% FI; 10,4% AF dan FS)	4,5	2,0	<i>Sauter Mean Diameter</i> **	14,0 μm	(Comas <i>et al.</i> , 2006)
			5,5		8,0 μm^*	
			6,2		12,5 μm	
β -laktoglobulin	Lesitin	5,2	2,0	Mobilitas Elektroforesis**	1,8	(Chen & Soucie, 1985)
			5,0		-4,0*	
			6,5		-3,8	
	Fosfolipid (67% FK; 23% FE; 7,4 % tidak diketahui)	5,2	4,4	Konsentrasi protein di lapisan β -laktoglobulin - fosfolipid	2,8 mg/ m ² *	(Cornell & Patterson, 1989)
			7,0		0,4 mg/m ²	
			3,0	<i>Cream layer</i>	1,3 %	(Yamamoto & Araki, 1997)
4,5		0,5 % *				
7,0		1,9 %				
Fosfatidilkolin	5,2	3,7	Ukuran dan distribusi droplet	Droplet yang kecil dan seragam*	(Brown <i>et al.</i> , 1983)	
		7,2		Terbentuk agregat droplet		

* Kestabilan emulsi yang terbaik

** Hasil diinterpretasikan dari grafik

FK: fosfatidilkolin, FE: fosfatidiletanolamin, FI: fosfatidilinositol, AF: asam fosfatidat, FS: fosfatidilserin

5.2 Pemanasan

Kestabilan emulsi dapat dipengaruhi suhu pemanasan. Suhu pemanasan dapat mempengaruhi tingkat denaturasi protein. Denaturasi protein dibutuhkan untuk mengeluarkan residu asam amino hidrofobik yang tertimbun menuju permukaan. Protein kemudian membentuk posisi dengan sendirinya, asam amino hidrofobik berada di dalam fase minyak dan asam amino hidrofilik berada di dalam fase air. 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; Walstra, 2003).

Terdapat dua tipe pemanasan berdasarkan banyaknya tahapan yaitu pemanasan satu tahap dan dua tahap. Pemanasan satu tahap dilakukan dalam satu tahap pemanasan hingga mencapai suhu denaturasi semua jenis protein dalam suatu emulsi, sehingga semua protein terdenaturasi sekaligus dan bersamaan. Pada kasus ini terjadi interaksi antara protein terdenaturasi yang tidak teradsorpsi pada droplet minyak, sehingga menyebabkan peningkatan ukuran partikel karena terbentuknya agregat dari kedua protein tersebut. Selain itu, agregasi droplet disebabkan interaksi antara protein yang terdenaturasi dan tidak teradsorpsi pada fase kontinu dengan protein yang teradsorpsi di permukaan droplet minyak (Gambar 12) (Monahan *et al.*, 1996). Protein yang tidak teradsorpsi berperan sebagai “lem” yang mengaitkan droplet emulsi menjadi agregat besar (Euston *et al.*, 2000).

Sementara, pada pemanasan dua tahap, yaitu pemanasan tahap pertama dilakukan dalam suhu denaturasi suatu jenis protein dalam emulsi yang lebih rendah, kemudian pemanasan dilanjutkan dengan suhu yang lebih tinggi hingga suatu jenis protein satunya terdenaturasi. Hal ini memungkinkan protein terdenaturasi tidak sekaligus dan tidak bersamaan. Jenis protein pertama yang terdenaturasi pertama dapat teradsorpsi pada droplet minyak terlebih dahulu, sehingga banyaknya protein yang terdenaturasi pada fase kontinu dapat berkurang

Dari tabel 4, pada studi oleh Shimoyamada *et al.* (2008), dilakukan satu tahap pemanasan tunggal pada suhu 70, 80, 90, dan 115 °C. Pada pemanasan pada suhu 70 dan 80 °C meningkatkan presipitat susu kedelai (5,3%), dibandingkan susu kedelai mentah (4,6%). Namun, suhu pemanasan di atas 90 °C dapat menurunkan presipitat (presipitat 3,9-3,3%), dibandingkan susu kedelai mentah. Hal ini dikarenakan, protein β -konglisinin (7s) dan glisinin (11s) masing-masing terdenaturasi panas pada suhu 65-75 dan 85-95 °C. Oleh karena itu, pada suhu 70 atau 80 °C, hanya β -konglisinin yang terdenaturasi, sementara glisinin belum terdenaturasi. Hasil presipitasi menunjukkan keberadaan β -konglisinin

terdenaturasi dan glisinin natif menurunkan stabilitas susu kedelai, tetapi stabilitas meningkat ketika kedua protein terdenaturasi.



Gambar 12. Skematik struktur agregat pada emulsi yang distabilisasi protein. Agregat terbentuk oleh interaksi antara protein yang tidak teradsorpsi dan protein yang teradsorpsi (Euston *et al.*, 2000)

Kemudian, pemanasan dua tahap dilakukan dengan pemanasan pertama pada suhu 70, 80, 90, 100°C dan kemudian dipanaskan pada suhu 115°C, menghasilkan presipitat yang lebih sedikit dibandingkan pemanasan dua tahap (3,1-3,3%). Hal ini menunjukkan bahwa, pemanasan dua tahap memiliki efek yang lebih baik pada kestabilan emulsi dibandingkan pemanasan satu tahap, serta pemanasan pada suhu yang lebih rendah dibandingkan suhu denaturasi protein dapat mempercepat pembentukan presipitasi (Shimoyamada *et al.*, 2008).

Perlakuan pemanasan dua tahap memberikan dampak yang lebih positif terhadap kestabilan emulsi dibandingkan pemanasan satu tahap. Pada susu kedelai, protein β -konglisinin (7s) dan glisinin (11s) memiliki suhu denaturasi yang berbeda, yaitu masing-masing 65-75 dan 85-95 °C. Pada pemanasan susu kedelai dua tahap yaitu pada suhu 20-75 °C, kemudian dilanjutkan 75-95°C, protein β -konglisinin terdenaturasi terlebih dahulu, kemudian glisinin. Oleh karena itu, β -konglisinin yang sudah tidak terlipat, dapat membentuk jaringan dengan droplet minyak diseluruh sistem susu kedelai terlebih dahulu hingga glisinin mulai terdenaturasi. Hal ini memungkinkan, terbentuknya agregat yang lebih kecil dibandingkan apabila menggunakan pemanasan satu tahap. Pemanasan satu

tahap menyebabkan denaturasi kedua protein β - konglisinin dan glisinin bersamaan, sehingga dapat menyebabkan terbentuknya agregat yang besar karena interaksi kedua protein tersebut sebelum terikat dengan droplet minyak (Liu *et al.*, 2004).

Tabel 4. Pengaruh Pemanasan terhadap Kestabilan Emulsi

Referensi	Emulsi	Suhu Denaturasi Jenis Protein (°C)	Perlakuan Suhu	Parameter Pengujian	Hasil
(Shimoyama <i>et al.</i> , 2008)	Susu kedelai		Kontrol (mentah/ tanpa pemanasan)	Presipitat (waktu penyimpanan 7 hari)	4,6 %
		65-75 (β -konglisinin)	Pemanasan satu tahap (70 & 80°C)		5,3 %
		85-95 (glisinin)	Pemanasan satu tahap 90, 100, dan 115 °C		3,9 – 3,3%
(Monahan <i>et al.</i> , 1996)	Emulsi o/w (21,7 wt % minyak jagung dan 78,3 wt % air) yang distabilisasi dengan <i>whey</i> protein	60-65 (α -laktalbulmin)	Pemanasan satu tahap (30, 40, 50, 60, dan 70 °C)	Ukuran Agregat (waktu penyimpanan 15 jam)	< 3 μ m
		75-80 (β -laktoglobulin)	Pemanasan satu tahap (75 °C)		> 3 μ m
			Pemanasan satu tahap (80 dan 90 °C)		< 3 μ m
(Surh <i>et al.</i> , 2006)	Emulsi o/w (10 wt% minyak jagung + 90 wt% air) yang distabilisasi dengan <i>whey</i> protein	60-65 (α -laktalbulmin)	Pemanasan satu tahap (30, 40, 50, dan 60 °C)	Sauter Mean Diameter (waktu penyimpanan 24 jam)	0,3-0,4 μ m*
		75-80 (β -laktoglobulin)	Pemanasan satu tahap (70 °C)		0,6 μ m*
			Pemanasan satu tahap (80 dan 90°C)		0,4 μ m*
	Emulsi o/w (10 wt% minyak jagung + 90 wt% air) yang distabilisasi dengan <i>whey</i> protein + fosfolipid	60-65 (α -laktalbulmin)	Pemanasan satu tahap 30, 40, 50, dan 60°C	0,2 μ m*	
		75-80 (β -laktoglobulin)	Pemanasan satu tahap (70°C)	0,3 μ m*	
		Pemanasan satu tahap (80 dan 90°C)	0,2 μ m*		

*Diinterpretasikan dari grafik

Sama halnya dengan susu kedelai, emulsi yang distabilisasi oleh *whey* protein pada studi Monahan *et al.* (1996) serta Surh *et al.* (2006) mengalami kenaikan ukuran droplet

minyak ketika suhu pemanasan belum mencapai suhu denaturasi semua jenis protein *whey*. Suhu denaturasi untuk α -laktalbumin adalah 60-65°C, sementara suhu denaturasi untuk β -laktoglobulin adalah 75-80 °C (Paulsson & Dejmeek, 1990). Pemanasan di antara suhu 75-80 °C dapat meningkatkan ukuran droplet minyak menjadi lebih dari 3 μ m. Hal ini dikarenakan, pada suhu tersebut α -laktalbumin sudah terdenaturasi, sementara β -laktoglobulin baru mulai terdenaturasi. Menurut Raikos (2010), selama pemanasan, emulsi yang distabilisasi oleh protein *whey* terjadi denaturasi α -laktalbumin terlebih dahulu. Setelah itu, seiring dengan peningkatan temperatur denaturasi β -laktoglobulin dimulai, sehingga membentuk kompleks denaturasi dengan α -laktalbumin. Oleh karena itu, pemanasan pada suhu 90 °C memberikan kestabilan emulsi yang lebih baik dibandingkan suhu sebelum denaturasi.

Ketika terjadi *unfolding* protein, protein akan membuka residu asam amino yang menyebabkan peningkatan interaksi antar protein melalui interaksi hidrofobik. Interaksi tersebut dapat terjadi di antara molekul yang teradsorpsi pada droplet yang sama (intradroplet) atau di antara protein yang teradsorpsi di antara droplet yang berbeda (interdroplet). Interaksi intradroplet menyebabkan peningkatan viskoelastis lapisan permukaan, sedangkan interaksi interdroplet menyebabkan peningkatan kecenderungan droplet untuk flokulasi (McClements *et al.*, 1993). Menurut studi Demetriades *et al.*, pemanasan di sekitar 65-80°C terjadi interaksi interdroplet, namun pada temperatur di atas 80°C terjadi interaksi intradroplet.

Pemanasan satu tahap dapat ditingkatkan kestabilan emulsinya dengan menggunakan kombinasi pengemulsi protein dengan fosfolipid. Pada Tabel 4, pemanasan satu tahap pada emulsi yang distabilisasi dengan protein *whey* saja memiliki ukuran diameter droplet minyak (0,3-0,6 μ m) yang lebih besar dibandingkan pemanasan satu tahap yang distabilisasi dengan kombinasi protein *whey*+fosfolipid (0,2-0,3 μ m) (Surh *et al.*, 2006). Hal ini berhubungan dengan pembentukan kompleks protein-fosfolipid pada droplet minyak (pada Subbab 1.3.3.). Pembentukan kompleks tersebut dapat meningkatkan densitas lapisan pelindung droplet minyak. Peningkatan densitas lapisan droplet minyak dapat menurunkan resiko agregasi droplet minyak, sehingga kestabilan emulsi dapat ditingkatkan.