

Kemampuan susu kedelai yang difermentasi oleh *Lactobacillus plantarum* 1 dalam mengikat asam empedu

Ability of fermented soymilk by *Lactobacillus plantarum* 1 in bile acids binding

Yusmarini,^{1,2*} Indrati, R.² Utami, T.² dan Marsono, Y.²

¹ Program Studi Teknologi Hasil Pertanian - Universitas Riau

² Fakultas Teknologi Pertanian -Universitas Gadjah Mada

Abstrak

Beberapa strain bakteri asam laktat (BAL) hasil isolasi dari susu kedelai yang terfermentasi secara spontan mempunyai aktivitas proteolitik. Penggunaan isolat BAL proteolitik hasil isolasi dalam memfermentasi susu kedelai diharapkan mampu menghasilkan peptida bioaktif yang bersifat hipokolesterolemik. Penelitian bertujuan untuk mengetahui aktivitas proteolitik dari isolat *Lactobacillus plantarum* 1 R.1.3.2 dan *L. plantarum* 1 R.11.1.2 dibandingkan dengan *L. acidophilus* FNCC 0051 serta melihat kemampuan susu kedelai yang difermentasi oleh ketiga isolat tersebut dalam mengikat asam empedu dibandingkan dengan susu kedelai non fermentasi. Aktivitas proteolitik (U/mL) diukur secara spektrofotometri dengan menggunakan tyrosin sebagai standar dan untuk menentukan asam empedu yang terikat ($\mu\text{M}/100$ mg protein) digunakan Total Bile Acid Binding Kit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketiga isolat mempunyai aktivitas proteolitik yang hampir sama dan secara umum kemampuan pengikatan asam empedu meningkat dengan adanya proses fermentasi.

Kata kunci : susu kedelai fermentasi, bakteri asam laktat proteolitik, pengikatan asam empedu

Abstract

Some lactic acid bacteria (LAB) strains have been isolated from spontaneously fermented soymilk which showing proteolytic activity. These isolated were expected could producing bioactive peptides that could lowering cholesterol content when they used for soymilk fermentation. This research was aimed to determine the proteolytic activity of *Lactobacillus plantarum* 1 R.1.3.2 and *L. plantarum* 1 R.11.1.2 comparing with *L. acidophilus* FNCC 0051 as a control. Furthermore soymilk fermented with these isolates were monitored for their ability to bind bile acid and these results were compared with the control of soymilk with no fermentation. Proteolytic activities (U/mL) were measured spectrophotometrically using tyrosin as a standard product, while bile acid binding capacity ($\mu\text{M}/100$ mg protein) using Total bile Acid Binding Kit. The results show that all isolates use in this study had no different proteolytic activity nor bile acid binding capability to that of control strain. The fermentation process could increased their ability to bind with the bile acid.

Key words : fermented soymilk, proteolytic lactic acid bacteria, bile acid binding

Pendahuluan

Hiperkolesterolemia merupakan salah satu faktor resiko penyakit kardiovaskuler. Data hasil Survey Kesehatan Rumah Tangga

Nasional (SKRTN) tahun 2002 menunjukkan bahwa kematian akibat penyakit kardiovaskuler di Indonesia dari tahun ke tahun mengalami peningkatan.

World Health Organization (WHO) memperkirakan pada tahun 2020 penyakit jantung dan stroke menjadi penyebab utama kematian di seluruh dunia (Erdmann, *et al.*, 2008).

Berbagai upaya dilakukan untuk mencegah penyakit kardiovaskuler antara lain dengan mengkonsumsi makanan yang bersifat hipokolesterolemik. Produk fermentasi susu kedelai merupakan salah satu produk olahan kedelai yang bersifat hipokolesterolemik. Efek hipokolesterolemik dari susu kedelai fermentasi dapat berasal dari peptida hasil hidrolisis protein oleh BAL (Nisa *et al.*, 2006) maupun dari BAL yang digunakan. Mekanisme hipokolesterolemik dari protein atau peptida dari kedelai diantaranya melalui pengikatan asam atau garam empedu.

Produk fermentasi dari susu kedelai dibuat dengan menambahkan bakteri asam laktat (BAL), namun tidak semua BAL dapat hidup dengan baik pada susu kedelai karena tidak semua BAL menghasilkan enzim α -galaktosidase yang dibutuhkan untuk menghidrolisis rafinosa dan stakiosa yang banyak terdapat pada susu kedelai. Hanya BAL yang mampu memanfaatkan karbohidrat yang ada pada kedelai terutama rafinosa dan stakiosa yang dapat hidup dan berkembang biak dengan baik. Hasil penelitian Bordignon, *et al.*, (2004) menyatakan bahwa *Bifidobacterium adolescentis* JCM 1275 dapat memanfaatkan sukrosa, rafinosa maupun stakiosa, namun *B.bifidum* JCM 1255 dan *B. breve* JCM 1192 hanya memanfaatkan rafinosa dan stakiosa. Lebih lanjut dinyatakan bahwa *Streptococcus thermophilus* hanya memanfaatkan sukrosa sedangkan *L. bulgaricus* dapat memanfaatkan sukrosa dan rafinosa ataupun stakiosa.

Pada tahap pertama telah dilakukan isolasi dan identifikasi BAL proteolitik dari susu kedelai yang terfermentasi secara spontan. Dari hasil penelitian tersebut diperoleh dua isolat BAL proteolitik yakni *L. plantarum* 1 R.1.3.2 dan *L. plantarum* 1

R.11.1.2. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas proteolitik dari isolat *L. plantarum* 1 R.1.3.2 dan *L. plantarum* 1 R.11.1.2 dibandingkan dengan *L. acidophilus* FNCC 0051 serta melihat kemampuan susu kedelai yang difermentasi oleh ketiga isolat tersebut dalam mengikat asam empedu dibandingkan dengan susu kedelai non fermentasi.

Metodologi

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kacang kedelai varietas Anjasmoro yang diperoleh dari Dinas Pertanian Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta - Balai Pengembangan dan Promosi Agribisnis Perbenihan Tanaman Pangan (BP2APTP) - Seksi Pengembangan Perbenihan Palawija yang berlokasi di daerah Wonosari. Isolat *L. plantarum* 1 R.1.3.2 dan *L. plantarum* 1 R.11.1.2 hasil isolasi dari susu kedelai yang terfermentasi spontan (Yusmarini dkk., 2009). *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 (koleksi Laboratorium Mikrobiologi - Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada). Bahan-bahan kimia *analytical grade* diantaranya MRS broth (Merck), NaCl (Merck), Total Bile Acid (TBA) KIT (Wako, Jepang), serta bahan-bahan lainnya yang diperlukan untuk uji aktivitas proteolitik dan untuk pengujian pengikatan asam empedu. Peralatan yang digunakan meliputi inkubator (Sanyo MIR-262), waterbath shaker (Sibata WS-240), mikropipet (Socorex), sentrifuse (Eppendorf 5417R), vortex (Nesco XH-C), dan spektrofotometer (Genesys 20).

Cara penelitian

Pengukuran aktivitas proteolitik

Pengukuran aktivitas proteolitik mengacu pada (Walter, 1984) yakni 1 mL casein 2 % ditambah 1 mL larutan 0,2 M buffer Tris - HCl pH 8. Kemudian ditambah 0,5 mL larutan enzim yang merupakan supernatan yang diperoleh dari hasil sentrifugasi MRS broth yang telah diinokulasi dengan isolat BAL dan diinkubasi selama 20 jam (sampel); 0,5 mL akuades (blanko) dan 0,5 mL larutan tyrosin 0,5 mM/L (standar). Semua perlakuan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 50° C. Setelah itu ditambahkan 2 mL TCA 10% dan 0,5 mL akuades untuk

Tabel 1. Aktivitas Proteolitik dari Isolat *L.plantarum* 1 R.1.3.2, *L.plantarum* 1 R.11.1.2 dan *L. acidophilus* FNCC 0051

Isolat	Aktivitas proteolitik (u/mL)	Aktivitas relatif (%)
<i>L. acidophilus</i> FNCC 0051	0,352 ^a	75,21 ^a
<i>L. plantarum</i> 1 R.1.3.2	0,468 ^a	100,00 ^a
<i>L. plantarum</i> 1 R.11.1.2	0,418 ^a	89, 32 ^a

Notasi dengan huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata pada taraf kepercayaan 5 %

sampel dan 0,5 mL larutan enzim untuk blanko maupun standar. Larutan digojog dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37° C, dan kemudian disentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu kamar. Supernatan sebanyak 1,5 mL ditambah 5 mL natrium karbonat 0,4 M dan larutan folin (1:2) sebanyak 1 mL. Larutan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 37° C dan kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 578 nm.

Pembuatan susu kedelai

Susu kedelai dibuat dengan menggunakan metode Pusat Pengembangan Teknologi Pangan Institut Pertanian Bogor (Nisa, *et al.*, 2006) dengan sedikit modifikasi. Biji kedelai kering disortir dan direndam dalam air selama 8 jam, kemudian dicuci dan ditiriskan lalu direbus hingga matang dan dicuci. Kedelai matang dihancurkan dengan blender sambil ditambahkan air panas dengan perbandingan 1:6 lalu disaring dengan menggunakan kain bersih yang telah dicuci dengan air panas. Susu kedelai yang dihasilkan kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan aluminium foil dan plastik. Setelah itu susu kedelai disterilisasi pada suhu 115° C selama 10 menit.

Fermentasi susu kedelai dengan isolat BAL

Proses fermentasi susu kedelai mengacu pada Yusmarini, *et al.*, (2001). Susu kedelai yang telah disterilisasi pada suhu 115° C selama 10 menit didinginkan dengan cepat hingga mencapai suhu 45° C. Setelah itu diinokulasi dengan isolat BAL sebanyak 1 % dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 20 jam.

Pengujian pengikatan garam empedu

Preparasi sampel mengacu pada Yumiko and Wäsche (2004). Satu milliliter sampel (susu kedelai non fermentasi dan susu kedelai

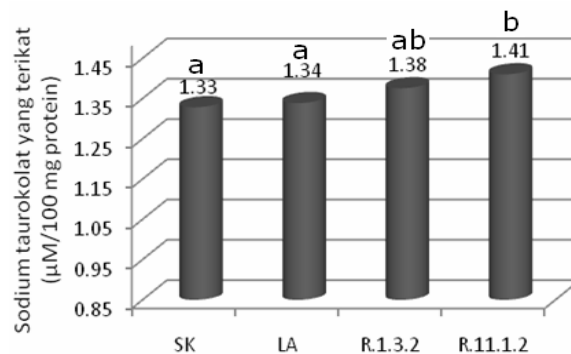
fermentasi) ditambah 2,5 mL larutan 0,1 M buffer fosfat pH 7 dan digojog dengan menggunakan vortex hingga tercampur secara sempurna. Seratus mikroliter suspensi sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambah larutan garam empedu 0,25 mM sebanyak 900 µL. Garam empedu yang digunakan adalah sodium taurokolat, sodium deoksikolat dan asam kolat (garam empedu dilarutkan terlebih dahulu dengan 0,1 M buffer fosfat pH 7). Suspensi kemudian diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37° C dan kemudian disentrifugasi pada kecepatan 9900 x g selama 10 menit. Supernatan dipisahkan dan endapan yang terbentuk ditambah dengan 0,5 mL larutan 0,1 M buffer sodium fosfat pH 7. Dilakukan pencampuran dan kemudian disentrifugasi kembali pada kecepatan dan waktu yang sama. Supernatan yang diperoleh digabungkan dengan supernatan yang pertama. Supernatan yang diperoleh dapat langsung dianalisa atau disimpan terlebih dahulu pada suhu -20° C. Asam empedu dianalisa dengan TBA KIT.

Hasil dan Pembahasan

Aktivitas proteolitik

Hasil pengukuran aktivitas proteolitik secara kuantitatif terlihat pada Tabel 1. Dari Tabel 1 terlihat bahwa aktivitas proteolitik dari isolat *L. plantarum* 1 R.1.3.2 terlihat sedikit lebih tinggi dibandingkan 2 isolat lainnya. Namun secara statistik aktivitas ketiga isolat tersebut tidak berbeda nyata. Hasil ini sejalan dengan hasil analisa aktivitas enzim secara kualitatif yang dilaporkan oleh Yusmarini *et al.*, (2009).

Aktivitas proteolitik secara kualitatif (Yusmarini, *et al.*, 2009) diukur berdasarkan zona jernih yang dihasilkan pada media skim



Notasi dengan huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata pada taraf kepercayaan 5%

Gambar 1. Pengikatan sodium taurokolat oleh peptida dari susu kedelai non fermentasi dan susu kedelai fermentasi.

Keterangan : SK (susu kedelai non fermentasi); LA (susu kedelai difermentasi dengan *L. acidophilus* FNCC 0051); R.1.3.2 (susu kedelai difermentasi dengan *L. plantarum* 1 R.1.3.2); R.11.1.2 (susu kedelai difermentasi dengan *L. plantarum* 1 R.11.1.2)

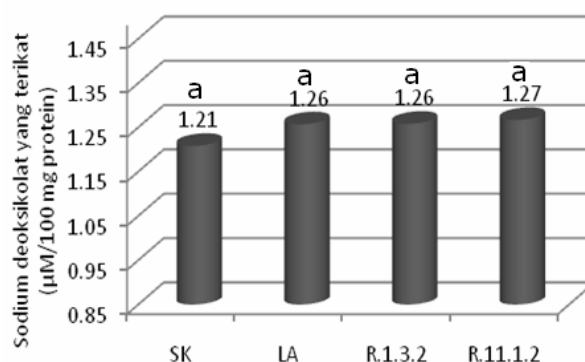
milk agar. Zona jernih yang dihasilkan oleh *L. plantarum* 1 R.1.3.2. adalah 0,83 cm, *L. plantarum* 1 R.11.1.2 sebesar 0,75 cm dan *L. acidophilus* FNCC 0051 adalah 0,80 cm. Hal ini menunjukkan bahwa isolat yang berbeda ternyata mempunyai aktivitas yang hampir sama. Nakazawa and Hasono (1992) menyatakan bahwa aktivitas proteolitik dari BAL yang berada dalam satu spesies mungkin saja sama ataupun berbeda. Hasil penelitian Gobetti, *et al.*, (1996) menunjukkan bahwa aktivitas spesifik dari enzim protease yang dihasilkan oleh *L. plantarum* DC400 lebih besar dibanding *L. acidophilus* BF4 maupun *L. fermentum* CC5. Selanjutnya Garabal *et al.*, (2007) menyatakan bahwa Lactococci mempunyai aktivitas proteolitik yang lebih tinggi dibandingkan dengan Lactobacilli.

Pengikatan Garam Empedu oleh Peptida

Kemampuan protein/peptida yang terdapat pada susu kedelai non fermentasi dan susu kedelai yang difermentasi oleh *L. acidophilus* FNCC 0051, *L. plantarum* 1 R.1.3.2, dan *L. plantarum* 1 R.11.1.2 dalam

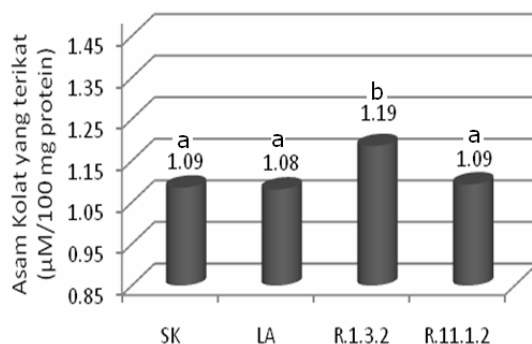
mengikat sodium taurokolat, sodium deoksikolat dan asam kolat bervariasi. Asam empedu yang terdapat pada manusia umumnya dalam bentuk asam empedu yang telah terkonjugasi yakni sodium glikokolat dan sodium taurokolat yang merupakan turunan dari asam kolat (Lehninger, 1982). Sodium deoksikolat merupakan senyawa yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang terdapat pada saluran pencernaan dan seringkali disebut sebagai *secondary bile acid*. Sedangkan asam kolat dan chenodeoksikolat merupakan asam-asam empedu yang dihasilkan oleh tubuh dan dikenal sebagai *primary bile acids* (Yumiko and Wäsche, 2004).

Pengikatan sodium taurokolat berkisar antara 1,33 - 1,41 µM/100 mg peptida (Gambar 1). Pengikatan yang paling kecil dijumpai pada susu kedelai non fermentasi (SK) yakni 1,33 µM/100 mg peptida, namun secara statistik kemampuan pengikatannya tidak berbeda dengan susu kedelai yang difermentasi dengan *L. acidophilus* FNCC 0051 (LA) yakni 1,34 µM/100 mg peptida.



Notasi dengan huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata pada taraf kepercayaan 5%

Gambar 2. Pengikatan sodium deoksikolat oleh peptida dari susu kedelai dan susu kedelai fermentasi.



Gambar 3. Pengikatan asam kolat oleh peptida dari susu kedelai non fermentasi dan susu kedelai fermentasi.

Sedangkan susu kedelai yang difermentasi dengan isolat *L. plantarum* 1 R.11.1.2 (R.11.1.2) mempunyai kemampuan pengikatan yang paling besar yakni 1,41 µM/100 mg peptida.

Secara umum dapat dikatakan bahwa proses fermentasi susu kedelai oleh bakteri asam laktat dapat meningkatkan kemampuan dalam mengikat sodium taurokolat. Hal ini disebabkan karena selama proses fermentasi enzim protease yang dihasilkan oleh BAL akan menghidrolisis protein menjadi peptida dan sebagian peptida yang dihasilkan bersifat

bioaktif yang mempunyai kemampuan dalam mengikat garam-garam empedu. Erdmann, dkk. (2008) menyatakan bahwa peptida bioaktif dapat dihasilkan selama proses fermentasi susu dimana pada saat itu peptida bioaktif akan dibebaskan dari parent protein.

Hasil pengikatan sodium deoksikolat oleh protein/peptida disajikan pada Gambar 2. Dari Gambar 2 terlihat bahwa kemampuan pengikatan sodium deoksikolat baik pada susu kedelai non fermentasi maupun susu kedelai fermentasi secara statistik tidak berbeda nyata.

Konsentrasi deoksikolat yang tinggi di dalam tubuh dapat menyebabkan terjadinya radang pada usus, oleh karena itu kapasitas pengikatan yang lebih tinggi terhadap deoksikolat juga diharapkan untuk mencegah radang pada usus disamping mengurangi kolesterol tubuh secara tidak langsung.

Gambar 3 menunjukkan kemampuan pengikatan terhadap asam kolat. Dibandingkan dengan sodium taurokolat dan sodium deoksikolat, kemampuan pengikatan terhadap asam kolat relatif lebih rendah yakni berkisar antara 1,08 – 1,19 $\mu\text{M}/100$ mg peptida.

Rendahnya kemampuan peptida dalam mengikat asam kolat disebabkan karena sifat dari asam kolat yang tidak larut, sedangkan sodium taurokolat dan sodium deoksikolat bersifat lebih larut. Pengikatan terhadap asam kolat yang paling tinggi dijumpai pada susu kedelai yang difermentasi dengan *L. plantarum* 1 R.1.3.2.

Perbedaan kemampuan pengikatan asam/garam empedu diantara susu kedelai fermentasi disebabkan karena adanya perbedaan pemecahan protein oleh enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yang digunakan. Jenis BAL yang berbeda akan menghasilkan enzim protease yang berbeda dengan spesifisitas pemecahan yang juga berbeda sehingga akan dihasilkan bermacam-macam peptida. Susunan asam

amino yang dihasilkan selama proses fermentasi juga akan mempengaruhi kemampuan peptida dalam mengikat garam empedu. Sugano and Goto (1990) menyatakan bahwa fraksi protein kedelai yang bersifat hidrofobik mempunyai kemampuan mengikat asam empedu sedangkan Kwon *et al.*, (2002) dan Zhong *et al.*, (2007) menyatakan bahwa peptida yang mengandung asam amino hidrofobik pada terminal N mempunyai kemampuan dalam mengikat garam empedu.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa aktivitas relatif dari isolat *L. plantarum* 1 R.1.3.2 ; *L. plantarum* 1 R.11.1.2 dan *L. acidophilus* FNCC 0051 tidak berbeda yakni *L. plantarum* 1 R.1.3.2 sebesar 100 %, *L. plantarum* 1 R.11.1.2 sebesar 89,32 % dan *L. acidophilus* sebesar 75,21 %. Secara umum proses fermentasi dapat meningkatkan kemampuan pengikatan sodium taurokolat dan asam kolat namun tidak mempengaruhi kemampuan dalam pengikatan sodium deoksikolat.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada LPPM Universitas Gadjah Mada dan program I-MHERE Universitas Riau yang telah mendanai penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Bordignon, J. R., Nakahara, K., Yoshihashi T. and Nikkuni S. 2004. Hydrolysis of isoflavone and consumption of oligosacharides during lactic acid fermentation of soybean milk. JARQ 38 (4) 259- 265.
- Erdmann, K., Cheung, B. W. Y. and Schröder. H.2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular diseases. Journal of Nutritional Biochemistry. 19 : 643 – 654.
- Garabal, J. I., Alonso, P. R. and Centeno, J. A. 2007. Characterization of lactic acid bacteria isolated from raw cow's milk cheeses currently produced in Galicia (NW Spain). Swiss Soc. of Food Sci. And Technol.

- Gobbetti, M., Smacchi, E., Fox, P., Stepaniak, L. and Corsetti, A. 1996. The Sourdough Microflora. Cellular Localization and Characterization of Proteolytic Enzymes in Lactic Acid Bacteria. Academic Press Limited.
- Kwon, D. Y., Oh, S. W., Lee, J. S., Yang, H. J., Lee S. H. and Lee, J. H. 2002. Amino acid substitution of hypocholesterolemic peptide originated from glycinin hydrolyzate, *Food Science and Biotechnology* 11, pp. 55-61.
- Lehninger, A. L. 1982. Principles of biochemistry. Worth Publisher, Inc.
- Nakazawa Y. and Hosono, A. 1992. Function of fermented milk. Challenges for the health sciences. 180-184S
- Nisa, F. Z., Marsono, Y. and Harmayani, E. 2006. Efek hipokolesterolemik susu kedelai fermentasi steril pada model hewan coba. *Agrosains*, 19(1); 41-53
- SKRT. 2002. Perlu program penanggulangan penyakit kardiovaskular. *SKRT* :<http://www.kompas.com/kompas-cetak/0206/iptek/per119.htm>
- Sugano, M. and Goto, S. 1990. Steroid binding peptides from dietary protein. *J. of Nutrition Science and Vitaminology*, 36 : s147 - s150
- Walter, H. E. 1984. Method with Haemoglobin, Casein and Azocoll as Substrate In. Bergmeyer, H.U. (ed). Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie. Deerfield Beach Florida Basel.
- Yumiko, Y. S. and Wäsche, A. 2004. In vitro binding of bile acids by lupin protein isolates and their hydrolysates. *Food Chemistry* 88: 179 - 184.
- Yusmarini, Adnan, M. and Hadiwiyoto, S. 2001. Perubahan nilai cerna dan fraksi protein pada susu kedelai dalam proses pembuatan soygurt. *Agritech* Vol. 21 No.3. 95-98.
- Yusmarini, Indrati, R. Utami, T. and Marsono, Y. 2009. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat proteolitik dari susu kedelai yang terfermentasi spontan. *Jurnal Natur Indonesia* 12.1
- Zhong, F., Zhang, X., Ma, J. and Shoemaker, C. F. 2007. Fractionation and identification of a novel hypocholesterolemic peptide derived from soy protein Alcalase hydrolysates. *Food Research International*, 40 756-762.

*) Korespondensi : Yusmarini
Program Studi Teknologi Hasil Pertanian - Universitas Riau
Email : marini_thp@yahoo.co.id