

ADSORPSI KOMPETITIF FOSFOLIPID PADA PERMUKAAN GLOBULA MINYAK DALAM SISTEM EMULSI YANG DISTABILISASI KASEINAT

Competitive Adsorption among Phospholipids at Oil Globule Interface of Caseinate Stabilized Emulsion

Teti Estiasih

Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan - Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Teknologi Pertanian - Universitas Brawijaya
Jl. Veteran - Malang
Email: teties@yahoo.co.id

ABSTRAK

Kasein dan fosfolipid merupakan pengemulsi alami yang biasa digunakan secara bersama-sama dalam sistem pangan. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji perubahan komposisi fosfolipid dan kasein yang teradsorpsi pada permukaan globula minyak dalam sistem emulsi minyak ikan yang distabilisasi fosfolipid kuning telur dan natrium kaseinat. Emulsi dibuat dengan menghomogenisasi larutan natrium kaseinat (10% b/v) dengan berbagai konsentrasi fosfolipid kuning telur yaitu 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, and 2.5% (b/v) dan minyak ikan 20% (b/v). Hasil penelitian menunjukkan bahwa fosfolipid pada permukaan globula minyak mengalami peningkatan dengan meningkatnya konsentrasi fosfolipid kuning telur yang ditambahkan pada emulsifikasi. Terjadi adsorpsi kompetitif antar jenis fosfolipid untuk teradsorpsi pada permukaan globula minyak. Fosfatidilkolin mempunyai preferensi untuk teradsorpsi pada permukaan globula minyak yang disebabkan oleh aktivitas permukaan dan kuantitasnya yang lebih tinggi. Fosfatidiletanolamin kurang mempunyai preferensi untuk teradsorpsi akibat aktivitas permukaannya yang lebih rendah. Adapun fosfatidilinositol tidak mempunyai preferensi untuk teradsorpsi akibat kadarnya yang rendah. Perubahan komposisi pada permukaan globula minyak disebabkan oleh pembentukan kompleks antara kasein-fosfolipid dan pergantian kasein oleh fosfolipid dari permukaan globula minyak.

Kata kunci: preferensi adsorpsi, kaseinat, fosfolipid, emulsi, globula minyak, antarmuka, aktivitas permukaan, adsorpsi kompetitif, pergantian, lapisan teradsorpsi, pembentukan kompleks

ABSTRACT

Casein and phospholipids are natural compounds usually used concomitantly as emulsifier. This research was conducted to elucidate the adsorbed phospholipids composition that stabilized oil globule interface during fish oil emulsification by sodium caseinate and phospholipids. Emulsion was formed by homogenizing sodium caseinate solution (10% w/v) with various phospholipids concentration of 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, and 2.5% (w/v) at fish oil concentration of 20%. The results showed that the quantity of adsorbed phospholipids increased in line with increasing phospholipids concentration. Competitive adsorption occurred among various phospholipids that indicated by compositional changes of adsorbed phospholipids at oil globule interface. Their preference to adsorb was influenced by their surface activities. Among various phospholipids, phosphatidylcholine had preference to adsorb due to its higher surface activity and quantity. Phosphatidylethanolamine had less preference to adsorb because of its lower surface activity. Meanwhile, phosphatidylinositol had less ability to compete due to its low quantity. The change of adsorbed layer in oil globule interface was caused by phospholipids-casein complexation and displacement of casein by phospholipids to occupy oil globule interface.

Keywords: preference to adsorb, caseinate, phospholipids, emulsion, oil globule, interface, surface activity, competitive adsorption, displacement, adsorbed layer, complexation

PENDAHULUAN

Natrium kaseinat dan fosfolipid merupakan bahan alami yang dapat berperan sebagai pengemulsi. Pengemulsi dibutuhkan untuk menstabilkan produk pangan seperti emulsi dan buih karena mempunyai kemampuan menempatkan diri pada antarmuka dengan cara membentuk lapisan di sekeliling globula lemak atau udara. Pengemulsi, karena sifatnya bersifat amfifilik (mempunyai afinitas terhadap air dan fase non polar), teradsorpsi dan membentuk lapisan pada permukaan globula minyak (Lucero *et al.*, 2008).

Lesitin adalah nama komersial fosfolipid dan merupakan pengemulsi alami yang paling banyak digunakan (Tong *et al.*, 2008). Fosfolipid merupakan lipid polar yang komponen utamanya terdiri dari fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinositol, dan asam fosfatidat (Tong *et al.*, 2008; Joshi *et al.*, 2008). Natrium kaseinat merupakan campuran dari protein fleksibel dengan berat molekul rendah (Villiere *et al.*, 2005). Selama pengolahan pangan keduanya dapat berperan menstabilkan emulsi baik digunakan secara terpisah maupun bersama-sama. Keberadaan keduanya dalam sistem emulsi pangan dapat menstabilkan maupun menyebabkan ketidakstabilan sehingga hubungan antara keduanya penting untuk diteliti. Diharapkan hasil penelitian ini dapat menjadi pertimbangan untuk penggunaan keduanya secara bersama-sama dalam sistem emulsi pangan.

Pada sistem emulsi yang distabilisasi protein dan surfaktan (pengemulsi berberat molekul kecil), protein dan surfaktan saling mempengaruhi yang pengaruhnya bergantung pada aktivitas permukaan keduanya. Hubungan antar keduanya dapat berupa adsorpsi kompetitif, proses pergantian, dan interaksi antara protein dan surfaktan (Bergenstahl dan Claesson, 2004). Biasanya protein dan lipid berkompetisi untuk teradsorpsi membentuk lapisan pada permukaan globula minyak (Wangine *et al.*, 2005). Pada adsorpsi kompetitif, protein dan surfaktan bersaing untuk menempati antarmuka, yaitu molekul yang mempunyai aktivitas permukaan paling tinggi atau molekulnya paling banyak akan mendominasi. Persaingan tersebut dipengaruhi oleh rasio antara surfaktan dan protein dalam larutan. Pada proses pergantian, surfaktan karena aktivitas per-

mukaannya lebih tinggi, akan mengganti protein yang teradsorpsi pada permukaan globula minyak (Nylander, 2004). Protein dan surfaktan dapat berinteraksi membentuk kompleks. Kompleks tersebut dapat mempunyai aktivitas permukaan yang lebih tinggi atau lebih rendah. Interaksi antara protein dan surfaktan juga dapat menyebabkan pembentukan lapisan pada permukaan globula minyak dengan susunan yang lebih efisien untuk teradsorpsi pada permukaan globula minyak (Bos *et al.*, 2008).

Penelitian ini bertujuan mengkaji perubahan komposisi fosfolipid dan kasein yang teradsorpsi pada permukaan globula minyak emulsi sehingga hubungan keduanya dalam sistem emulsi dapat diketahui. Penyebab perubahan komposisi tersebut juga dikaji pada penelitian ini. Perubahan komposisi lapisan yang teradsorpsi tersebut dapat menjelaskan perubahan sifat-sifat sistem emulsi yang distabilisasi natrium kaseinat karena adanya fosfolipid, sehingga diketahui keefektifan penggunaan keduanya secara bersama-sama.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan untuk membuat emulsi adalah minyak ikan dengan kadar asam lemak ω -3 tinggi (minyak kaya asam lemak ω -3) yang dibuat dengan metode pemadatan cepat yang dimodifikasi (Estiasih dan Ahmadi, 2004), natrium kaseinat teknis (Sigma Co.), fosfolipid yang diekstrak dari kuning telur dengan metode Schneider (1989), dan akuades. Bahan kimia yang digunakan untuk analisis adalah standar fosfolipid (fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinositol), standar α , β dan κ kasein (Sigma Co.), kloroform, metanol, asam sulfat, HCl, aseton, dan silika gel G60 (semua untuk analisis) dari Merck; akrilamida, bis akrilamida, TEMED, SDS, commasie blue, asam asetat, merkaptotanol, dan bufer Tris-HCl (Sigma Co.).

Peralatan yang digunakan adalah neraca analitik (HR-300, AND), homogenizer (Altech), pemayar kromatografi lapis tipis (TLC scanner) (Camag), pH meter (Jenway), perangkat elektroforesis (Bio-Rad), sentrifusa (T51-1, MLW), densitoscan process visu-24 (Helena), dan ultrasentrifusa (Beckman).

Pembuatan emulsi

Emulsi dibuat dengan cara menghomogenisasi minyak kaya asam lemak ω -3 (5% b/v) dalam larutan natrium kaseinat (10% b/v) pada tekanan 2500 psi selama 15 menit. Fosfolipid ditambahkan sebelum homogenisasi pada konsentrasi 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, dan 2.5% (b/v).

Pemisahan globula minyak dari emulsi

Globula minyak atau fase krim dipisahkan dari fase kontinyu dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 60000 X g selama 30 menit (Euston *et al.*, 1995). Fase krim yang terpisah merupakan kumpulan globula-globula minyak yang terpisah dari fase kontinyu setelah sentrifugasi.

Analisis jenis fosfolipid pada permukaan globula minyak

Lapisan krim dipisahkan dari emulsi dengan metode Euston *et al.* (1995) yaitu emulsi disentrifugasi pada 60000 X g selama 15 menit. Ekstraksi fosfolipid dilakukan mengikuti prosedur Courthaudon *et al.* (1991) sebagai berikut: Sebanyak 0.5 g fase krim dikocok dengan 12 mL larutan kloroform:metanol 2:1 (v/v) dan 3 mL larutan KCl 1% dalam air. Setelah sentrifugasi, supernatan (campuran air/metanol) yang mengandung kontaminan larut air (terutama natrium kaseinat) dibuang. Subnatan kemudian dikocok dengan 6 mL larutan metanol:air 1:1 (v/v), dan setelah sentrifugasi supernatan dibuang. Subnatan yang dihasilkan mengandung lipid (trigliserida dan fosfolipid) dalam larutan kloroform:metanol:air 9:1. Larutan disaring dan diuapkan dengan gas nitrogen. Fosfolipid dan trigliserida dipisahkan dengan metode Nzai dan Proctor (1998).

Pemisahan fosfolipid dan trigliserida (Nzai dan Proctor, 1998) dilakukan sebagai berikut: Minyak dari hasil ekstraksi lapisan krim tersebut ditambah aseton 1 mL, dikocok selama 5 detik, disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit. Campuran kemudian didekantasi dan lapisan kaya fosfolipid dicuci dengan 1 mL aseton. Ekstrak fosfolipid kasar (residu) dikeringkan dengan gas nitrogen untuk menghilangkan residu aseton setelah pencucian.

Analisis dengan kromatografi lapis tipis (Nzai dan Proctor, 1998) dilakukan sebagai berikut: Sebanyak 20 μ L sampel dengan konsentrasi 20 mg/mL dilarutkan dalam

campuran kloroform:metanol 95:5 (v/v) dan diteteskan pada plat silika gel G60. Pelarut yang digunakan untuk elusi adalah kloroform:metanol:air (75:25:3 v/v). Elusi dilakukan selama 40 menit. Visualisasi dilakukan dengan menyemprotkan larutan asam sulfat dalam air (1:1) dilanjutkan dengan pemanasan 140 °C selama 20 menit. Kuantifikasi jenis-jenis fosfolipid pada spot TLC yang terpisah dilakukan dengan menggunakan TLC scanner dengan dibandingkan dengan standar masing-masing jenis fosfolipid.

Analisis jenis-jenis kasein yang teradsorpsi pada permukaan globula minyak

Jenis kasein pada fase krim dianalisis dengan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamida dengan penambahan natrium dodesil sulfat (SDS PAGE=Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) untuk mengetahui proporsi α , β dan κ kasein sebagai pengaruh peningkatan konsentrasi fosfolipid. Analisis SDS PAGE dilakukan menggunakan metode Sing dan Creamer (1991). Lapisan krim (0.1 g) didispersikan dalam 4.9 g buffer SDS (0.5 M Tris, 2% SDS, 0.05% merkaptotetanol, dan pH diatur menjadi 6.8 dengan HCl 1 M) dan dipanaskan pada suhu 90 °C selama 5 menit. Sampel dalam buffer (5 μ L) diaplikasikan pada gel SDS. Gel pemisahan (resolving gel) terdiri dari akrilamida 20% (b/v dalam buffer Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8). Gel pemisahan (stacking gel) terdiri dari akrilamida 4% (b/v dalam buffer Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8). Gel dijalankan pada tegangan listrik 200 V selama sekitar 45 menit dan diwarnai dengan 0.1% comassie blue R (b/v) dalam air/metanol/asam asetat 5:5:2. Setelah pencucian, pita protein dikuantifikasi dengan densitoscan. Luas area dari masing-masing individu protein dihitung sebagai persentase dari luas total area sampel. Identifikasi jenis protein dilakukan dengan mengaplikasikan standar α , β dan κ kasein pada gel yang sama.

Analisis kemungkinan pembentukan kompleks

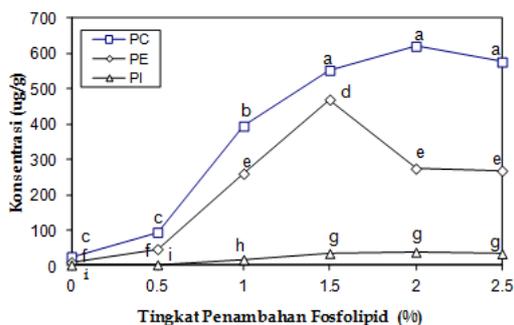
Fase kontinyu atau fase pendispersi (fase akueus) dipisahkan dari emulsi dengan sentrifugasi pada 60000 X g selama 15 menit (Euston *et al.*, 1995). Fase kontinyu merupakan subnatan dan dianalisis dengan PAGE untuk mengetahui kemungkinan pembentukan kompleks kasein-fosfolipid dengan aktivitas permukaan menurun yang terdesorpsi

atau lepas dari permukaan globula minyak. Kompleks kasein-fosfolipid dapat diketahui dari pembentukan pita baru pada gel elektroforesis, dengan jarak migrasi yang lebih pendek dibandingkan jarak migrasi α , β dan κ kasein. Kompleks kasein-fosfolipid yang terbentuk pada fase kontinyu menunjukkan bahwa kompleks tersebut mempunyai aktivitas permukaan yang menurun dibandingkan kasein dan fosfolipid, sehingga terdesorpsi dari permukaan globula minyak.

Kemungkinan pembentukan kompleks kasein-fosfolipid dianalisis dengan elektroforesis gel poliakrilamida (PAGE=*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) tanpa penambahan bahan-bahan pendenaturasi protein (*non denaturation system*). Karakterisasi protein dengan SDS PAGE mengikuti metode Sing dan Creamer (1991).

Analisis kemungkinan pergantian kasein oleh fosfolipid pada permukaan globula minyak

Fosfolipid diekstraksi dari lapisan krim sesuai dengan prosedur Courthaudon *et al.* (1991), dan dipisahkan dengan kromatografi lapis tipis dengan metode Nzai dan Proctor (1998) untuk mengetahui kadar fosfolipid pada fase krim. Kuantifikasi fosfolipid dilakukan dengan menggunakan TLC scanner yang dibandingkan dengan standar. Kadar protein yang teradsorpsi pada permukaan globula lemak yaitu protein yang ada pada fase krim setelah emulsi disentrifugasi ditentukan dengan metode Euston *et al.* (1995).



Gambar 1. Konsentrasi jenis fosfolipid pada fase krim sebagai pengaruh penambahan fosfolipid pada saat emulsifikasi. PC = fosfatidilkolin, PE = fosfatidiletanolamin, PI = fosfatidilinositol. Keterangan: huruf yang sama menunjukkan perlakuan tidak berbeda nyata pada taraf $\alpha=0.05$

Analisis statistik

Variabel yang dikaji adalah konsentrasi penambahan fosfolipid 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

Konsentrasi Jenis Fosfolipid pada Fase Krim

Pada penelitian ini fosfolipid kuning telur ditambahkan pada minyak kaya asam lemak ω -3 yang akan dibuat emulsi. Keberadaan fosfolipid pada fase minyak sebelum homogenisasi atau sebelum antarmuka minyak/air terbentuk, penting bagi fosfolipid untuk mengatur diri pada antarmuka minyak/air (Miura *et al.*, 2004). Pemisahan globula-globula lemak dari sistem emulsi dilakukan dengan sentrifugasi pada kecepatan tinggi sehingga diperoleh fase krim. Konsentrasi jenis fosfolipid pada fase krim menunjukkan kuantitas jenis fosfolipid tersebut pada permukaan globula minyak. Konsentrasi fosfatidilkolin dalam fase krim pada sistem emulsi tanpa penambahan fosfolipid adalah 24.72 $\mu\text{g/g}$. Peningkatan konsentrasi fosfolipid menyebabkan perubahan komposisi fosfolipid yang teradsorpsi pada permukaan globula minyak seperti terlihat pada Gambar 1

Peningkatan konsentrasi fosfolipid selama emulsifikasi menyebabkan konsentrasi fosfatidilkolin pada permukaan globula minyak meningkat (Gambar 1). Peningkatan fosfatidilkolin tersebut disebabkan oleh peningkatan konsentrasinya dalam sistem emulsi, sehingga fosfatidilkolin mengalami peningkatan adsorpsi pada permukaan globula minyak. Menurut Fang dan Dalgleish (1996a), dalam sistem emulsi yang distabilisasi natrium kaseinat dan dioleilfosfatidilkolin, pada rasio molar dioleilfosfatidilkolin terhadap natrium kaseinat yang tinggi terjadi adsorpsi kompetitif antara dioleilfosfatidilkolin dengan natrium kaseinat.

Konsentrasi fosfatidiletanolamin pada fase krim dalam sistem emulsi yang tidak ditambah fosfolipid adalah 19.20 $\mu\text{g/g}$.

Penambahan fosfolipid pada sistem emulsi menyebabkan peningkatan konsentrasi fosfatidiletanolamin fase krim sampai dengan konsentrasi fosfolipid 1.5%, dan kemudian menurun pada penambahan fosfolipid lebih lanjut.

Berbeda dengan fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin fase krim mengalami penurunan pada penambahan fosfolipid 2.0 dan 2.5% yang nyata. Penurunan tersebut kemungkinan disebabkan fosfatidiletanolamin terdesorpsi menuju fase kontinyu. Ada kemungkinan proses desorpsi tersebut disebabkan oleh pembentukan kompleks antara kasein dan fosfolipid, dan kemungkinan sebagian besar fosfolipid yang membentuk kompleks tersebut adalah fosfatidiletanolamin.

Menurut Bos *et al.* (2008), interaksi antara fosfolipid dan protein terjadi melalui interaksi hidrofobik dan elektrostatis. Diantara jenis fosfolipid pada fase krim, fosfatidiletanolamin merupakan fosfolipid yang paling non polar, sehingga karena sifatnya tersebut lebih mudah berinteraksi dengan kasein melalui interaksi hidrofobik, karena kasein merupakan protein hidrofobik. Ada kemungkinan interaksi fosfolipid-kasein juga terjadi melalui interaksi elektrostatis, karena fosfolipid merupakan lipid polar yang bermuatan positif dan negatif (*zwitter ion*) dan protein kasein bermuatan negatif pada pH netral.

Konsentrasi fosfatidilinositol pada fase krim dalam sistem emulsi yang tidak ditambah fosfolipid adalah 1.69 $\mu\text{g/g}$. Konsentrasi fosfatidilinositol ini paling rendah dibandingkan konsentrasi fosfatidilkolin dan fosfatidiletanolamin. Peningkatan konsentrasi fosfolipid menyebabkan peningkatan konsentrasi fosfatidilinositol pada fase krim.

Pada tingkat penambahan fosfolipid yang tinggi, ada preferensi fosfatidilkolin dan fosfatidilinositol untuk teradsorpsi pada permukaan globula minyak, sedangkan fosfatidiletanolamin mempunyai preferensi untuk dihilangkan atau terdesorpsi dari permukaan globula minyak. Kemungkinan polaritas fosfolipid mempengaruhi preferensi fosfolipid untuk teradsorpsi pada permukaan globula minyak. Fosfolipid yang bersifat lebih polar mempunyai preferensi teradsorpsi yang lebih tinggi dibandingkan yang bersifat kurang polar. Fosfatidilkolin dan fosfatidilinositol mempunyai polaritas yang lebih tinggi sehingga mempunyai preferensi teradsorpsi yang lebih tinggi dari fosfatidiletanolamin.

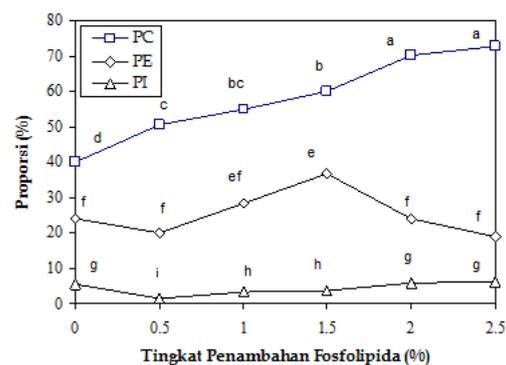
Dari hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa terjadi adsorpsi kompetitif di antara jenis fosfolipid untuk teradsorpsi pada permukaan globula minyak. Preferensi adsorpsi jenis fosfolipid dipengaruhi oleh kuantitas dan polaritas atau aktivitas permukaan.

Proporsi Jenis Fosfolipid pada Permukaan Globula Minyak

Pada sistem emulsi tanpa penambahan fosfolipid, proporsi jenis fosfolipid pada permukaan globula minyak ini adalah fosfatidilkolin 40.01%, fosfatidiletanolamin 23.98%, dan fosfatidilinositol 1.31%. Proporsi ini menunjukkan proporsi jenis fosfolipid yang berasal dari natrium kaseinat dan/atau minyak ikan. Peningkatan konsentrasi fosfolipid dalam sistem emulsi menyebabkan peningkatan proporsi fosfatidilkolin pada permukaan globula minyak (Gambar 2) yang menunjukkan bahwa fosfatidilkolin mempunyai preferensi untuk teradsorpsi pada permukaan globula minyak.

Penambahan fosfolipid 0.5% tidak menyebabkan perubahan proporsi fosfatidiletanolamin pada permukaan globula minyak. Pada konsentrasi fosfolipid ini sebenarnya terjadi peningkatan konsentrasi fosfatidiletanolamin pada fase krim, tetapi karena fosfatidiletanolamin tidak mempunyai preferensi untuk teradsorpsi pada permukaan globula minyak dibandingkan fosfatidilkolin dan fosfatidilinositol, proporsinya pada permukaan globula minyak tetap.

Proporsi fosfatidiletanolamin pada permukaan globula minyak meningkat pada



Gambar 2. Proporsi jenis fosfolipid pada permukaan globula minyak sebagai pengaruh penambahan fosfolipid pada saat emulsifikasi. PC = fosfatidilkolin, PE = fosfatidiletanolamin, PI = fosfatidilinositol. Keterangan: huruf yang sama menunjukkan perlakuan tidak berbeda nyata pada taraf $\alpha=0.05$

penambahan fosfolipid 1.5%, sedangkan pada konsentrasi penambahan fosfolipid lebih lanjut, proporsi fosfatidiletanolamin tidak berubah. Peningkatan yang hanya terjadi pada penambahan fosfolipid 1.5% ini menunjukkan bahwa fosfatidiletanolamin mempunyai preferensi yang rendah untuk teradsorpsi. Tampaknya faktor yang mempengaruhi preferensi adsorpsi fosfatidiletanolamin adalah aktivitas permukaannya. Fosfatidiletanolamin merupakan jenis fosfolipid yang paling non polar, sehingga kemungkinan aktivitas permukaannya paling rendah.

Penambahan fosfolipid 0.5% menyebabkan penurunan proporsi fosfatidilinositol pada permukaan globula minyak dibandingkan tanpa penambahan fosfolipid. Penurunan tersebut disebabkan pada tingkat penambahan fosfolipid 0.5% ini, peningkatan konsentrasi fosfolipid pada fase krim sebagian besar disebabkan oleh peningkatan konsentrasi fosfatidiletanolamin dan fosfatidilkolin. Fosfatidilinositol tidak mampu berkompetisi sehingga hanya mengalami sedikit peningkatan konsentrasi yang menyebabkan proporsinya mengalami penurunan. Penambahan fosfolipid 0.5-2.5% menyebabkan peningkatan proporsi fosfatidilinositol. Proporsi fosfatidilinositol yang teradsorpsi lebih rendah dari proporsinya pada kuning telur (data tidak ditunjukkan), yang menunjukkan bahwa fosfatidilinositol kurang mampu berkompetisi.

Tampaknya fosfatidilinositol karena jumlahnya sangat sedikit kurang mampu melakukan adsorpsi kompetitif dengan jenis fosfolipid yang lain untuk teradsorpsi. Proporsi fosfatidilinositol pada permukaan globula minyak dan konsentrasinya pada fase krim adalah yang terendah. Bila dilihat dari aktivitas permukaan, tampaknya fosfatidilinositol mempunyai aktivitas permukaan yang tinggi yang terlihat dari proporsinya pada permukaan globula minyak terus mengalami peningkatan.

Pembentukan Kompleks Kasein-Fosfolipid

Kemungkinan terjadi pembentukan kompleks antara kasein dan fosfolipid dianalisis dari fase kontinyu dengan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamida sistem non denaturasi. Penggunaan sistem non denaturasi bertujuan untuk mencegah konformasi protein pada kompleks kasein-fosfolipid terbuka sehingga merusak struk-

tur kompleks tersebut dan kasein terurai dalam bentuk bebas. Apabila ada dalam bentuk bebas, kompleks kasein-fosfolipid tidak dapat diidentifikasi dan dikuantifikasi. Identifikasi pita kompleks kasein-fosfolipid diketahui dengan membandingkan dengan pita standar α , β dan κ kasein, dan dengan memperhatikan jarak migrasinya. Pita kompleks kasein-fosfolipid merupakan pita baru yang terbentuk dan bukan merupakan pita α , β dan κ kasein dengan jarak migrasi yang lebih pendek.

Analisis pembentukan kompleks kasein-fosfolipid dilakukan dari fase kontinyu karena diduga penurunan protein kasein yang teradsorpsi pada permukaan globula minyak disebabkan oleh kasein diganti oleh fosfolipid dan pembentukan kompleks kasein-fosfolipid. Kompleks antara kasein dan fosfolipid diduga lebih bersifat hidrofilik dan lebih larut pada fase kontinyu sehingga menghilang dari permukaan globula minyak. Pada penelitiannya, Fang dan Dalgleish (1996a) 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 dioleilfosfatidilkolin- β kasein ini terdesorpsi dari permukaan globula lemak. Berdasarkan hal tersebut, analisis kemungkinan pembentukan kompleks kasein-fosfolipid 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 fosfolipid. Fang dan Dalgleish (1996a) 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.* (2008), interaksi elektrostatis bersifat penting pada interaksi antara protein-fosfolipid pada permukaan globula lemak.

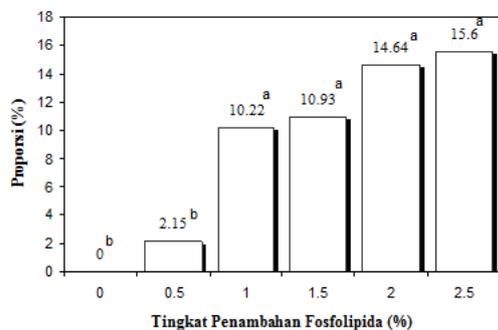
Proporsi kompleks kasein-fosfolipid pada fase kontinyu semakin meningkat dengan bertambahnya konsentrasi fosfolipid dalam sistem emulsi (Gambar 3). Semakin tinggi fosfolipid yang ditambahkan, fosfolipid se-

makin tersedia untuk membentuk kompleks dengan kasein.

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

Dari hasil analisis jenis kasein pada permukaan globula minyak dan fase kontinyu, dapat diketahui kemungkinan jenis kasein yang membentuk kompleks dengan fosfolipid adalah α kasein. Menurut Aynie *et al.* (1992), interaksi antara α kasein dengan lipid polar yang bermuatan lebih tinggi dibandingkan β kasein. Interaksi tersebut terjadi melalui ikatan hidrogen dan/atau interaksi elektrostatis. Kemungkinan jenis fosfolipid yang membentuk kompleks atau berinteraksi dengan α kasein adalah jenis fosfolipid yang mengalami penurunan proporsi pada permukaan globula minyak dengan meningkatnya konsentrasi fosfolipid (Gambar 4). Kemungkinan sebagian besar fosfatidiletanolamin membentuk kompleks.

Peningkatan konsentrasi fosfolipid dalam sistem emulsi menyebabkan peningkatan proporsi kasein yang membentuk kompleks dengan fosfolipid. Semakin tinggi fosfolipid yang ditambahkan, fosfolipid semakin tersedia untuk membentuk kompleks dengan kasein. Data dari hasil penelitian ini tidak dapat digunakan untuk memperkirakan apakah pembentukan kompleks tersebut telah jenuh atau optimum. Pembentukan kom-



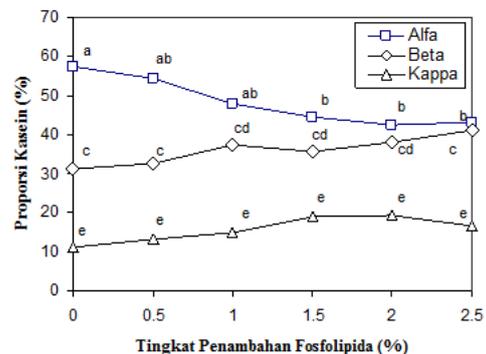
Gambar 3. Proporsi kasein yang membentuk kompleks dengan fosfolipid sebagai pengaruh penambahan fosfolipid pada saat emulsifikasi. Keterangan: huruf yang sama menunjukkan perlakuan tidak berbeda nyata pada taraf $\alpha=0.05$

pleks yang meningkat tajam pada penambahan fosfolipid 1.0% dibandingkan 0.5% menunjukkan bahwa pada konsentrasi 1.0% fosfolipid cukup tersedia untuk membentuk kompleks.

Tidak semua kasein pada permukaan globula minyak membentuk kompleks dengan fosfolipid pada semua konsentrasi fosfolipid yang digunakan pada penelitian ini. Kemungkinan besar kasein yang membentuk kompleks dengan fosfolipid adalah kasein yang tidak teradsorpsi kuat pada permukaan globula minyak atau kasein pada lapisan ganda. Menurut Euston dan Hirst (1999), pada konsentrasi protein yang tinggi, kasein membentuk lapisan ganda yang terdiri dari protein yang terikat lemah pada lapisan protein yang teradsorpsi. Kasein ini mudah digantikan dari permukaan globula minyak dan mudah berinteraksi dengan fosfolipid membentuk kompleks.

Pergantian Kasein oleh Fosfolipid pada Permukaan Globula Minyak

Analisis kemungkinan proses pergantian kasein oleh fosfolipid dari permukaan globula minyak dapat diketahui dari perubahan konsentrasi fosfolipid dan kasein yang teradsorpsi pada permukaan globula minyak. Perubahan konsentrasi fosfolipid yang teradsorpsi pada permukaan globula minyak dapat diketahui dari perubahan konsentrasi fosfolipid pada fase krim, karena fase krim merupakan kumpulan globula minyak yang dipisahkan dari fase kontinyu dengan ultrasentrifugasi. Konsentrasi kasein yang teradsorpsi pada permukaan globula minyak



Gambar 4. Proporsi jenis kasein pada permukaan globula minyak sebagai pengaruh penambahan fosfolipid pada saat emulsifikasi. Keterangan: huruf yang sama menunjukkan perlakuan tidak berbeda nyata pada taraf $\alpha=0.05$

ditunjukkan oleh protein teradsorpsi, yaitu massa protein yang teradsorpsi pada permukaan globula minyak per volume emulsi (mg/mL).

Peningkatan konsentrasi fosfolipid dalam sistem emulsi menyebabkan peningkatan konsentrasi fosfolipid pada fase krim sampai penambahan fosfolipid 1.5% (Gambar 6). Penambahan fosfolipid dalam emulsi lebih dari 1.5% menyebabkan konsentrasi fosfolipid fase krim yang secara statistik tidak berubah.

Emulsi yang distabilisasi oleh natrium kaseinat saja menunjukkan nilai protein teradsorpsi yang tertinggi yaitu 8.38 mg/mL, yang berbeda nyata (taraf $\alpha=0.05$) dengan protein teradsorpsi pada sistem emulsi yang ditambah fosfolipid. Penambahan fosfolipid menyebabkan penurunan jumlah protein yang teradsorpsi (Gambar 5) dan peningkatan fosfolipid (Gambar 6) pada permukaan globula minyak.

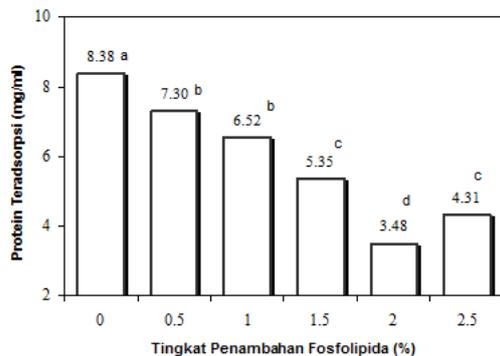
Fosfolipid mendesorpsi protein yang teradsorpsi pada permukaan globula minyak melalui pembentukan kompleks kasein-fosfolipid yang larut pada fase kontinu dan proses pergantian kasein oleh fosfolipid untuk teradsorpsi pada permukaan globula minyak yang diindikasikan oleh peningkatan konsentrasi fosfolipid pada fase krim dan penurunan protein teradsorpsi. Proses pergantian tersebut terjadi kemungkinan disebabkan aktivitas permukaan fosfolipid lebih tinggi dibandingkan natrium kaseinat, sehingga fosfolipid mempunyai preferensi untuk teradsorpsi. Menurut McClements (2004) molekul kecil surfaktan mempunyai

afinitas terhadap antarmuka yang lebih tinggi dibandingkan protein pada konsentrasi surfaktan yang tinggi, dan cenderung untuk menggantikan protein dari antarmuka.

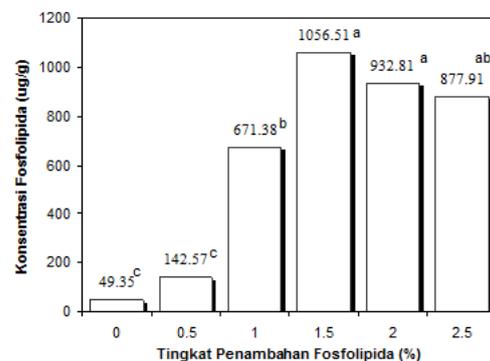
Apabila protein teradsorpsi dalam bentuk lapisan tunggal, kemungkinan desorpsi sangat rendah karena terdapat sejumlah besar segmen yang teradsorpsi per molekul protein (Robson dan Dalgleish, 1987). Natrium kaseinat menghasilkan emulsi yang stabil karena teradsorpsi kuat pada antarmuka minyak-air (Mulvihill dan Fox, 2003).

Penambahan fosfolipid 0.5 dan 1.0% menyebabkan penurunan protein teradsorpsi yang nyata pada taraf $\alpha=0.05$. Penambahan fosfolipid lebih dari 1.0% menyebabkan penurunan protein teradsorpsi lebih lanjut yang sangat nyata pada taraf $\alpha=0.01$. Pada penambahan fosfolipid 2.5% protein teradsorpsi sedikit mengalami peningkatan tetapi tidak nyata. Belum diketahui pasti penyebab peningkatan tersebut. Apabila dihubungkan dengan konsentrasi fosfolipid pada fase krim, pada tingkat penambahan fosfolipid ini, konsentrasi fosfolipid pada fase krim sedikit mengalami penurunan (Gambar 6). Tingkat penambahan fosfolipid sangat mempengaruhi kemampuan natrium kaseinat untuk teradsorpsi pada antarmuka.

Pada penelitian ini, protein yang teradsorpsi per mililiter emulsi sangat tinggi. Menurut Anton dan Gandemer (1997), ketika antar permukaan telah tertutup oleh protein secara sempurna, lapisan protein tambahan akan melapisi antar permukaan dan membentuk lapisan ganda. Lapisan protein tambahan ini menstabilkan emulsi. Fang dan



Gambar 5. Protein teradsorpsi emulsi minyak kaya asam lemak ω -3 yang distabilisasi natrium kaseinat sebagai pengaruh penambahan fosfolipid. Keterangan: huruf yang sama menunjukkan perlakuan tidak berbeda nyata pada taraf $\alpha=0.05$



Gambar 6. Konsentrasi fosfolipid pada fase krim sebagai pengaruh penambahan fosfolipid pada saat emulsifikasi. Keterangan: huruf yang sama menunjukkan perlakuan tidak berbeda nyata pada taraf $\alpha=0.05$

Dalgleish (1996b) melaporkan bahwa fosfatidilkolin kuning telur menggantikan β kasein dari antar permukaan n-tetradekana-air lebih efisien dibandingkan dari antar permukaan minyak kedelai-air pada rasio molar fosfatidilkolin/protein yang tinggi. Pada penelitian ini, semakin tinggi tingkat penambahan fosfolipid kuning telur (rasio molar fosfolipid/protein semakin tinggi), protein teradsorpsi semakin menurun. Konsentrasi α kasein pada permukaan globula minyak semakin menurun dengan meningkatnya konsentrasi fosfolipid (Gambar 3), yang menunjukkan bahwa protein kasein yang didesorpsi oleh fosfolipid kemungkinan sebagian besar adalah α kasein. Hasil penelitian Fang dan Dalgleish (1996b) menunjukkan bahwa pada konsentrasi kasein rendah ($< 0.8\%$), perbedaan protein teradsorpsi antara emulsi yang ditambah fosfatidilkolin kuning telur dan yang tidak ditambah fosfatidilkolin tidak nyata. Pada konsentrasi kasein rendah, seluruh kasein teradsorpsi pada antar permukaan walaupun fosfatidilkolin kuning telur juga teradsorpsi. Pada penelitian ini digunakan konsentrasi natrium kaseinat yang tinggi sehingga penambahan fosfolipid menyebabkan desorpsi lapisan protein, sehingga protein teradsorpsi menjadi menurun.

Fang dan Dalgleish (1996b) melaporkan bahwa pada konsentrasi kasein tinggi ($>1\%$), adanya fosfatidilkolin kuning telur menyebabkan lapisan protein yang melapisi antarmuka lebih tipis, karena kasein diganti oleh fosfolipid. Ada kemungkinan fosfolipid menginduksi perubahan konformasi protein yang teradsorpsi, sehingga protein yang asalnya teradsorpsi menjadi terdesorpsi, menyebabkan protein teradsorpsi menjadi menurun.

Menurut Robson dan Dalgleish (1988), protein umumnya teradsorpsi secara irreversibel pada antar permukaan apabila teradsorpsi dalam bentuk lapisan tunggal. Desorpsi secara spontan untuk seluruh molekul menjadi rendah karena terdapat sejumlah besar segmen per molekul yang teradsorpsi pada antar permukaan. Pada penelitian ini, tingginya nilai protein teradsorpsi pada sistem emulsi yang distabilisasi natrium kaseinat tanpa penambahan fosfolipid menunjukkan kemungkinan protein teradsorpsi dalam bentuk lapisan ganda. Menurut Eus-

ton dan Hirst (1999), pada konsentrasi protein yang tinggi, kasein membentuk lapisan ganda yang terikat lemah pada lapisan protein yang teradsorpsi. Berhubung dalam bentuk lapisan ganda, hanya sejumlah kecil segmen per molekul yang teradsorpsi. Keadaan ini menyebabkan kemungkinan desorpsi sangat tinggi.

Bila dibandingkan dengan konsentrasi protein yang teradsorpsi (mg protein/g fase krim), konsentrasi protein pada fase krim tetap lebih tinggi dibandingkan konsentrasi fosfolipid pada fase krim, walaupun pada konsentrasi fosfolipid fase krim yang tertinggi. Sebagai contoh, pada sistem emulsi dengan nilai protein teradsorpsi terendah, yaitu 3.48 mg/mL emulsi pada sistem emulsi dengan penambahan fosfolipid 2.0%, konsentrasi protein pada fase krim adalah 126.48 mg/g fase krim. Nilai ini jauh lebih tinggi dibandingkan konsentrasi fosfolipid pada fase krim untuk sistem emulsi yang sama, yaitu 932.81 $\mu\text{g/g}$. Keadaan ini menunjukkan bahwa natrium kaseinat tetap mendominasi permukaan globula minyak.

Natrium kaseinat dan fosfolipid merupakan jenis molekul yang berbeda. Natrium kaseinat merupakan makromolekul dan fosfolipid merupakan molekul tunggal. Perbedaan tersebut kemungkinan menyebabkan natrium kaseinat tetap mendominasi permukaan globula minyak. Dominasi tersebut kemungkinan menyebabkan rasio molar fosfolipid terhadap natrium kaseinat yang rendah. Menurut Imm dan Regenstein (1997), pelapisan natrium kaseinat pada permukaan globula lemak bersifat padat. Sifat tersebut menyebabkan kaseinat tetap mendominasi permukaan globula minyak.

Jumlah protein teradsorpsi juga tergantung dari rasio molar surfaktan terhadap protein (R), dan tidak tergantung konsentrasi protein saja. Apabila rasio kritis surfaktan:protein tercapai, surfaktan secara sempurna menggantikan seluruh protein dari antar permukaan (Cornec *et al.*, 1998). Pada penelitian ini, rasio kritis surfaktan:protein pada konsentrasi surfaktan yang ditambahkan belum tercapai, sehingga fosfolipid yang ditambahkan tidak menggantikan seluruh protein dari permukaan globula minyak, tetapi hanya menggantikan sebagian kasein teradsorpsi.

SIMPULAN

Penambahan fosfolipid pada sistem emulsi yang distabilisasi natrium kaseinat menyebabkan perubahan jenis fosfolipid yang teradsorpsi pada permukaan globula minyak. Peningkatan konsentrasi fosfolipid dalam sistem emulsi menyebabkan peningkatan konsentrasi fosfolipid pada fase krim, yang diduga disebabkan proses pergantian kasein oleh fosfolipid untuk teradsorpsi pada permukaan globula minyak. Terjadi adsorpsi kompetitif di antara jenis fosfolipid untuk teradsorpsi pada permukaan globula minyak. Fosfatidilkolin mempunyai preferensi untuk teradsorpsi karena aktivitas permukaan dan kuantitasnya paling tinggi. Fosfatidiletanolamin kurang mampu berkompetisi karena aktivitas permukaannya yang rendah dan fosfatidilinositol kurang mampu berkompetisi karena kuantitasnya yang rendah. Perubahan tersebut disebabkan oleh pembentukan kompleks kasein-fosfolipid. Diduga jenis fosfolipid yang membentuk kompleks adalah fosfatidiletanolamin. Dugaan ini perlu dibuktikan dan dikaji lebih lanjut. Penambahan fosfolipid pada saat emulsifikasi menyebabkan penurunan protein teradsorpsi yang disebabkan oleh pergantian natrium kaseinat oleh fosfolipid untuk teradsorpsi pada permukaan globula minyak. Proses pergantian tersebut menyebabkan perubahan proporsi jenis kasein dan fosfolipid yang teradsorpsi pada permukaan globula minyak.

DAFTAR PUSTAKA

- Anton M and Gandemer G. 1997. Composition, solubility, and emulsifying properties of granules and plasma of egg yolk. *J. of Food Sci.* 62(3): 484-487
- Aynie S, Le Meste M, Colas B, and Lorient D. 1992. Interaction between lipids and milk protein. *J. of Food Sci.* 57(4): 883-891
- Bergenstahl BA and Claesson PM. 2004. 'Surface Forces in Emulsions'. Dalam SE Friberg, K Larsson, and J Sjöholm (eds.). *Food Emulsions*. 4th edition, revised and expanded. Marcel Dekker Inc., New York
- Bos M, Nylander T, Arnebrant T, and Clark DC. 2008. 'Protein/Emulsifier Interaction'. Dalam GL Hasenhuetti and RW Hartel (eds.). *Food Emulsifier and Their Applications*. Chapman & Hall, New York
- Cornec M, Wilde PJ, Gunning PA, Mackie AR, Husband FA, Parker MC, and Clark DC. 1998. Emulsion stability as affected by competitive adsorption between an oil-soluble emulsifier and milk proteins at the interface. *J. of Food Sci.* 63(1): 39-43
- Corredig M and Dalgleish DG. 1998. Buttermilk properties in emulsions with soybean oil as affected by fat globule membrane-derived proteins. *J. of Food Sci.* 63(3): 476-480
- Courthaudon J-L, Dickinson, and Christie WW. 1991. Competitive adsorption of lecithin and β casein in oil in water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1365-1568
- Estiasih T dan Ahmadi K. 2004. Pembuatan trigliserida kaya asam lemak omega-3 dari minyak hasil samping pengalengan ikan lemuru. *Jurnal Teknologi Pertanian* 5(3): 116-128
- Euston SE, Singh H, Munro PA, and Dalgleish DG. 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 SR and Hirst RL. 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 Dalgleish DG. 1996a. Competitive adsorption between dioleoylphosphatidylcholine and sodium caseinate on oil-water interfaces. *J. Agric. Food Chem.* 44: 59-64
- Fang Y and Dalgleish DG. 1996b. Comparison of the effects of three different phosphatidylcholines on casein-stabilized oil-in-water emulsions. *J. of Am. Oil Chem. Soc.* 73(4): 437-442
- Imm JY and Regensteins JM. 1997. Interaction of commercial dairy proteins and chicken breast myosin in an emulsion system. *J. of Food Sci.* 62(5): 967-971
- Joshi A, Paratkar SG, and Thorat BN. 2006. Modification of lecithin by physical, chemical and enzymatic methods. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108: 363-373
- Lucero A, Nin MRN, Gunning AP, Morris VJ, Wilde PJ, and Patino JMR. 2008. Effect

- of hydrocarbon chain and ph on structural and topographical characteristics of phospholipid monolayers. *J. Phys. Chem.* 112 (25): 7651-7661
- McClements DJ. 2004. *Food Emulsions: Principles, Practice and Technique*. 2nd ed. CRC Press, USA.
- Miura S, Tanaka M, Suzuki A, and Sato K. 2004. Application of phospholipids extracted from bovine milk to the reconstitution of cream using butter oil. *J Am Oil Chem Soc.* 81, 97-100
- Mulvihill DM and Fox PF. 2003. 'Properties of Milk Proteins'. Dalam Fox PF and McSweeney PLH (eds.). *Advanced in Dairy Chemistry: Volume 1: Protein, Parts A & B*. Kluwer Academic, New York
- Nakamura R, Mizutami R, Yano M, and Hayakawa S. 1988. Enhancement of emulsifying properties of protein by sonicating with egg yolk lecithin. *J. Agric. Food Chem.* 36: 729-732
- Nylander T. 2004. 'Interactions between Proteins and Polar Lipids'. Dalam SE Friberg, K Larsson, and J Sjöholm (eds.). *Food Emulsions*. 4th edition, revised, and expanded. Marcel Dekker Inc., New York
- Robson EW and Dalgleish DG. 1987. Interfacial composition of sodium caseinate emulsions. *J. of Food Sci.* 52(6): 1694-1698
- Schneider M. 1989. 'Fractionation and Purification of Lecithin'. Dalam BF Szuhaj (ed.): *Lecithins: Sources, Manufacture and Uses*. The American Oil Chemistry Society, Champaign, Illinois
- Singh H and Creamer LK. 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
- Tong J, Nakajima M, and Nabetani H. 2002. Preparation of phospholipid oil-in-water microspheres by microchannel emulsification technique. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104: 216-221
- Villiere A, Viau M, Bronnec I, Moreau N, and Genot C. 2005. Oxidative stability of bovine serum albumin- and sodium caseinate-stabilized emulsions depends on metal availability. *J. Agric. Food Chem.* 53(5): 1514-1520
- Waninge R, Walstra P, Bastiaans J, Nieuwenhuijse H, Nylander T, Paulsson M, and Bergensthl J. 2005. Competitive adsorption between β -casein or β -lactoglobulin and model milk membrane lipids at oil-water interfaces. *J. Agric. Food Chem* 53 (3): 716-724