



PENGARUH PERLAKUAN *HIGH HYDROSTATIC PRESSURE* DAN ENZIMATIS TERHADAP PERUBAHAN MIKROSTRUKTUR PROTEIN SUSU SKIM SAPI: SUSU HIPOALERGENIK (STUDI PUSTAKA)

The Effect of High Hydrostatic Pressure and Enzymatic Treatment on Microstructural Protein Changes in Hypoallergenic Skim Milk: Literature Study

Fathma Syahbanu¹*, Muhammad Alfid Kurnianto²

¹Departemen Ilmu Gizi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Singaperbangsa Karawang, Karawang, Indonesia

²Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknik, Universitas Pembangunan Nasional Veteran Jawa Timur, Surabaya, Indonesia

*Email: fathma.syahbanu@fikes.unsika.ac.id (Telp: +682123231335)

Diterima tanggal 18 Maret 2023
Disetujui tanggal 31 maret 2023

ABSTRACT

Food allergy is one of the major health problems worldwide in both adults and children, and its prevalence has been increasing over the last two decades. Epidemiological studies report that Cow's Milk Allergy (CMA) is considered one of the most common food allergies especially in early childhood with an incidence of 2 - 7.5% in population studies in various countries. Many cow's milk allergies occur due to the high intake of milk both in raw and processed form. One of the main allergens in skim cow's milk is beta-lactoglobulin. The microstructure approach to modify the structure of milk protein is one of the effective methods in preventing allergies. This manuscript review was conducted using the literature review narrative method. Several food treatments can be effectively used to reduce the allergenicity of milk protein by changing the microstructure of the protein, including enzymatic treatment and high hydrostatic pressure. The size reduction caused by both treatments results in allergenic proteins being unable to reach the antibody paratopes. The tendency of antigenic milk proteins to become immunological sensitizing agents decreases due to these microstructural changes. The protein microstructure modification can be utilized as a breakthrough in obtaining hypoallergenic milk-based food products in the future. The purpose of this review article was to discuss the enzymatic and HHP treatments of milk protein microstructure, especially their ability to reduce the number of allergenic proteins in milk.

Keywords: β -Lactoglobulin, enzymatic treatment, high hydrostatic pressure, hypoallergenic milk, skim milk

ABSTRAK

Alergi makanan merupakan salah satu masalah kesehatan utama di seluruh dunia baik terjadi pada orang dewasa maupun anak-anak, bahkan prevalensinya terus meningkat selama dua dekade terakhir. Studi epidemiologi melaporkan bahwa Cow's Milk Allergy (CMA) dianggap salah satu alergi makanan yang paling umum terjadi terutama pada anak usia dini dengan kejadian 2 - 7,5% pada studi populasi di berbagai negara. Alergi susu sapi ini banyak terjadi akibat tingginya asupan susu baik dalam bentuk mentah maupun olahannya. Salah satu alergen utama pada susu skim sapi adalah beta laktoglobulin. Pendekatan mikrostruktur untuk memodifikasi struktur protein susu menjadi salah satu metode efektif dalam pencegahan terjadinya alergi. Ulasan naskah ini dilakukan menggunakan metode *literature review narrative*. Beberapa perlakuan pada pangan dapat digunakan secara efektif untuk mengurangi alergenitas protein susu dengan mengubah mikrostruktur dari protein tersebut, diantaranya perlakuan enzimatis dan *High Hydrostatic Pressure*. Reduksi ukuran akibat kedua perlakuan tersebut mengakibatkan protein alergen tidak dapat mencapai paratop antibodi. Kecenderungan protein susu antigenik untuk menjadi agen sensitisasi imunologi menurun akibat adanya perubahan mikrostruktur tersebut. Modifikasi mikrostruktur protein tersebut dapat dimanfaatkan sebagai suatu terobosan baru dalam memperoleh produk pangan berbasis susu yang hypoalergenik di masa yang akan datang. Tujuan dari ulasan artikel ini yaitu untuk membahas



perlakuan enzimatis dan HHP terhadap mikrostruktur protein susu, terutama kemampuannya dalam menurunkan jumlah protein alergenik pada susu.

Kata kunci: *β -Laktoglobulin, high hydrostatic pressure, susu hipoalergenik, susu skim, perlakuan enzimatis*

PENDAHULUAN

Alergi makanan merupakan salah satu masalah kesehatan utama di seluruh dunia baik terjadi pada orang dewasa maupun anak-anak, bahkan prevalensinya terus meningkat selama dua dekade terakhir (Lack & Du Toit, 2014). Alergi makanan ini merupakan respon imunologi abnormal akibat sensitisasi terhadap makanan atau komponen makanan tertentu. Banyak makanan yang telah dilaporkan dapat menimbulkan reaksi alergi, lebih dari 90% alergi makanan disebabkan oleh susu, telur, ikan, krustasea, kacang tanah, kacang pohon, gandum dan kedelai, yang disebut sebagai "The Big Eight" (Torok et al., 2014). Studi epidemiologi melaporkan bahwa Cow's Milk Allergy (CMA) dianggap salah satu alergi makanan yang paling umum terjadi terutama pada anak usia dini dengan kejadian 2 - 7,5% pada studi populasi di berbagai negara (Fiocchi et al. 2010). Alergi susu sapi ini banyak terjadi akibat tingginya asupan susu baik dalam bentuk mentah maupun olahannya, bahkan saat ini protein susu telah banyak dimanfaatkan sebagai ingredien fungsional pada produk makanan dan minuman.

Susu skim adalah cairan biologis kompleks dengan jumlah yang tinggi protein, mineral, namun kandungan lipid pada susu skim sangat rendah. Kandungan lemak pada susu skim lebih rendah apabila dibandingkan dengan susu murni, sehingga susu skim lebih rendah kalori dan cocok untuk orang yang menerapkan diet rendah kalori. Pada umumnya, orang dewasa lebih cocok untuk mengonsumsi susu yang rendah lemak dan kaya kalsium. Pemenuhan kebutuhan asupan kalsium sangat penting bagi orang dewasa terutama untuk menjaga kepadatan tulang. Pada industri pangan, penambahan nutrisi suplemen pada susu skim seperti kalsium dan vitamin D sering dilakukan oleh para pelaku usaha untuk meningkatkan kadar vitamin dan mineralnya terutama sebagai sumber nutrisi kesehatan tulang. Namun, susu skim sapi dapat menyebabkan alergi pada orang yang memiliki alergenitas terhadap susu skim.

Susu skim sapi mengandung banyak protein yang bersifat antigenik beberapa diantaranya adalah β -laktoglobulin, kasein, dan α -laktalbumin sebagai alergen utama. Selain itu, protein yang terdeteksi dalam jumlah rendah seperti bovin serum albumin, laktoferin, dan imunoglobulin juga telah terbukti menjadi pemicu terjadinya alergi susu. Dari sudut pandang imunologi, alergi susu sapi biasanya dikaitkan dengan reaksi hipersensitivitas tipe 1 yang diperantarai oleh IgE sehingga dapat mengakibatkan terjadinya reaksi pada kulit (atopik dermatitis, urtikaria, angioedema), pernafasan (rhinitis, asma, batuk), dan gastrointestinal (muntah, diare, kolik, gastroesophageal refluks) serta dalam beberapa kasus ekstrim bahkan dapat mengakibatkan anafilaksis sistemik (Caffarelli et al. 2018; Lifschitz et al 2015; Luyt et al. 2014; Wood et al. 2013; Wal, 2004). Salah satu alergen



utama yang telah disebutkan sebelumnya pada susu skim sapi adalah beta laktoglobulin (Geiselhart et al. 2021; Lv et al. 2021; Mudgil & Barak 2019; Caubet et al. 2017). Beta laktoglobulin merupakan protein whey utama yang paling banyak terkandung pada spesies mammalia, namun tidak ditemukan pada susu tikus dan manusia. Protein beta laktoglobulin mengandung dua ikatan disulfida sehingga menyebabkan sifat dari beta laktoglobulin sangat stabil (kestabilan tinggi) terhadap enzim protease dan hidrolisis asam.

Pendekatan mikrostruktur untuk memodifikasi struktur protein susu menjadi salah satu metode efektif dalam pencegahan terjadinya alergi. Modifikasi struktur dari epitop beta laktoglobulin atau dengan mengecilkan ukuran peptida beta laktoglobulin termodifikasi setelah dihidrolisis oleh enzim protease dapat menyebabkan beta laktoglobulin tersebut tidak lagi bersifat alergen karena beta laktoglobulin tersebut telah mengalami perubahan struktur spesifik epitop ataupun perubahan ukuran peptida menjadi lebih kecil, sehingga tidak dapat berikatan secara spesifik pada paratop antibodi IgE dan menurunkan kemampuan IgE untuk berikatan silang pada sel mastosit. Selain itu, karena pentingnya kasein dan misel kasein dalam penentuan karakteristik fungsional produk susu skim, maka dengan memberikan perlakuan tertentu pada produk susu skim diharapkan dapat mengubah mikrostruktur misel kasein sehingga dapat meningkatkan kualitas dari produk susu skim.

Beberapa perlakuan yang dapat mengubah mikrostruktur protein susu antara lain perlakuan secara enzimatik dan High Hydrostatic Pressure (HHP). Perubahan mikrostruktur pada protein susu dapat diamati menggunakan beberapa instrumen mikroskopik seperti mikroskop cahaya, mikroskop fluoresens, mikroskop konfokal, mikroskopelektron, analisis X-ray dan teknik imunolabeling. Data mikroskopik ini digunakan untuk menjelaskan hasil analisis proteomik menggunakan beberapa metode separasi dan karakterisasi protein hasil modifikasi seperti SDS PAGE dan kromatografi. Selain itu keberadaan protein alergenik juga dapat dianalisis dengan enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Modifikasi mikrostruktur protein tersebut dapat digunakan sebagai suatu terobosan baru dalam memperoleh produk pangan berbasis susu yang hipoalergenik dimasa yang akan datang. Dengan demikian konsumen yang memiliki riwayat alergi tidak perlu menurunkan jumlah asupan susu yang dikonsumsi. Tujuan dari ulasan artikel ini yaitu untuk membahas perlakuan enzimatik dan HHP terhadap mikrostruktur protein susu, terutama kemampuannya dalam menurunkan jumlah protein alergenik pada susu.

METODE

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode *literature review narrative*. Langkah awal yang dilakukan adalah melakukan pencarian literatur ilmiah yang diterbitkan antara tahun 2005 – 2022 yang terindeks di dalam



database jurnal ilmiah seperti Scopus, Pubmed, Google Scholar dan Sinta. Langkah selanjutnya adalah melakukan identifikasi kata kunci, yang mana kata kunci yang digunakan berkaitan dengan beta laktoglobulin, alergi susu sapi, *high hydrostatic pressure*, perlakuan enzimatis, dan pangan hipoalergenik. Langkah ketiga adalah melakukan ulasan atau review pada abstrak dan isi artikel masing-masing literatur, dimana pada langkah ini artikel yang memiliki kata kunci yang sesuai tetapi abstrak dan isi artikel tidak sesuai dengan tujuan penelitian akan dikeluarkan (exclude). Pada langkah terakhir, dilakukan sintesis temuan dari isi artikel dan diintegrasikan ke dalam naskah publikasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

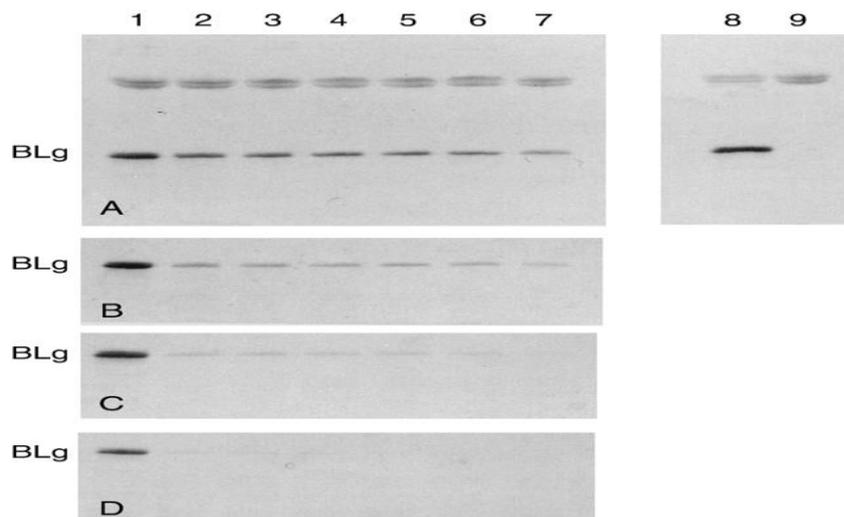
Pengaruh High Hydrostatic Pressure terhadap Fungsionalitas (Hipoalergen) dari Protein Susu Skim Sapi

Susu merupakan cairan biologis kompleks dengan jumlah protein dan mineral yang tinggi dan dapat menyebabkan alergi pada penderita hypersensitivity. Alergen yang terkandung dalam susu sebagian besar merupakan protein beta laktoglobulin. Struktur beta laktoglobulin mengandung dua ikatan disulfida. Hal ini menyebabkan sifat dari beta laktoglobulin yang sangat stabil (kestabilan tinggi) terhadap enzim protease dan hidrolisis asam. Dengan memodifikasi struktur dari epitop beta laktoglobulin atau dengan mengecilkan ukuran peptida beta laktoglobulin termodifikasi setelah dihidrolisis oleh enzim protease dapat menyebabkan beta laktoglobulin tersebut tidak lagi bersifat alergen karena beta laktoglobulin tersebut telah mengalami perubahan struktur spesifik epitop ataupun perubahan ukuran peptida menjadi lebih kecil. Dengan demikian, beta laktoglobulin tidak dapat berikatan secara spesifik pada paratop antibodi IgE dan menurunkan kemampuan IgE untuk berikatan silang pada sel mastosit. Selain itu, karena pentingnya kasein dan misel kasein dalam penentuan karakteristik fungsional produk susu, maka dengan memberikan perlakuan tertentu pada produk susu diharapkan dapat mengubah mikrostruktur misel kasein sehingga dapat meningkatkan kualitas dari produk susu. Salah satu perlakuan yang dapat meningkatkan kualitas produk susu sapi yaitu dengan memberikan perlakuan tekanan tinggi (HHP) (Hernandez et al. 2021; Bu et al. 2013; Chawla et al. 2011). Beta laktoglobulin memiliki sifat yang stabil terhadap proses denaturasi serta tahan terhadap hidrolisis proteolitik (Barbiroli et al. 2022; Sharabi et al. 2018; Breiteneder & Mills 2005). Sifat beta laktoglobulin ini sama seperti sifat alergen pada umumnya. Penelitian imunologi terkait tentang beta laktoglobulin telah menunjukkan bahwa beberapa daerah IgE-binding (epitop) dari protein beta laktoglobulin dikaitkan dengan reaksi alergi. Kebanyakan epitop IgE spesifik pada permukaan protein beta laktoglobulin.

Salah satu cara yang diaplikasikan untuk mengurangi tingkat alergenitas pada protein beta laktoglobulin yaitu perlakuan tekanan tinggi (*High Pressure*). Efek *High Pressure* pada beta laktoglobulin diamati



menggunakan enzim pepsin sesuai dengan kondisi sistem saluran pencernaan (*simulated gastric*). Perlakuan tekanan tinggi terhadap beta laktoglobulin pada 400 MPa selama 10 menit hanya sedikit berperan dalam meningkatkan derajat hidrolisis beta laktoglobulin tersebut oleh enzim pepsin yang diamati dengan menggunakan SDS PAGE (Gambar 1), sehingga beta laktoglobulin yang diberi perlakuan tekanan tinggi pada 400 MPa tersebut hanya terdegradasi sebesar 50% dalam kurun waktu selama 30 menit (waktu diinkubasi dengan pepsin). Namun, perlakuan tekanan tinggi sebesar 600 MPa dan 800 MPa sangat berperan dalam meningkatkan derajat hidrolisis beta laktoglobulin, sehingga beta laktoglobulin terdegradasi dengan cepat (*Rapid digestion* pada beta laktoglobulin). Setelah perlakuan tekanan tinggi sebesar 600 MPa dan 800 MPa, beta laktoglobulin tersebut terdegradasi dalam kurun waktu kurang dari 1 menit oleh enzim pepsin yang diamati dengan menggunakan SDS PAGE (Gambar 1). Hal ini disebabkan oleh efek perlakuan tekanan tinggi pada 600 MPa dan 800 MPa yang dapat meningkatkan jumlah unfolded protein (terbukanya struktur tersier dari beta laktoglobulin) yang mengakibatkan terjadinya peningkatan degradasi oleh enzim pepsin.



Gambar 1. Proses degradasi oleh enzim pepsin (rasio pepsin: beta laktoglobulin sebesar 3:1) terhadap beta laktoglobulin kontrol (tidak diberi perlakuan tekanan tinggi) (A), 400 MPa (B), 600 MPa (C), dan 800 MPa (D) yang dicerna oleh enzim pepsin sesuai dengan kondisi sistem di saluran pencernaan (*simulated gastric*). (Sumber: Zeece et al. 2008)

Analisis dengan menggunakan spektrometri massa (LC MS/MS (MALDI-TOF)) terhadap hasil degradasi beta laktoglobulin (yang telah diberi perlakuan tekanan tinggi) oleh enzim pepsin yang bersesuaian dengan urutan waktu inkubasi pepsin (0, 30, 60, 120 s) menunjukkan bahwa beta laktoglobulin terdegradasi dengan cepat dan progresif dengan semakin meningkatnya waktu inkubasi. Lebih dari 90% produk-produk peptida (yang dihasilkan melalui proses degradasi oleh enzim pepsin terhadap beta laktoglobulin yang telah diberi perlakuan tekanan tinggi) memiliki bobot molekul kurang dari 1500 Da. Produk-produk peptida dari hasil degradasi oleh



enzim pepsin selanjutnya diidentifikasi dan dipetakan ke area beta strand (Leu32-Leu54 dan Phe82-Leu104) serta juga dipetakan ke area terminal N- dan C- (Leu1–Leu10 dan Ser150–Leu156) pada beta laktoglobulin. Area-area ini berhubungan dengan epitop dari paratop IgE yang terdapat pada beta laktoglobulin. Produk-produk peptida (7-10 residu) tersebut dominan dihasilkan dari inkubasi yang singkat selama 60 detik. Hasil dari perlakuan tekanan tinggi 600 MPa dan 800 MPa menunjukkan dapat meningkatkan daya cerna beta laktoglobulin serta perlakuan tekanan tinggi tersebut dapat mengurangi tingkat alergenisitas dari alergen (salah satunya adalah beta laktoglobulin) yang terkandung dalam berbagai produk makanan

Tabel 1. Identifikasi MALDITOF-MS/MS pada peptida-peptida beta laktoglobulin termodifikasi hasil perlakuan enzimatis pepsin in vitro

Massa (d)	Massa (c)	Sekuens	Residu β -Laktoglobulin
806.4	805.9	SFNPTQL	150-156
1069.2	1069.2	LDAQSAPLRV	32-41
1098.6	1098.2	ELKPTPEGDL	43-54
1118.8	1119.2	DADSAPLRVY	33-42
1158.6	1158.3	DTDYKKYLL	96-104
1218.7	1218.5	IVTQTMKGDL	1-10
1227.6	1227.3	EELKPTPGDL	43-54
1234.7	1234.5	IVTQTM * KGDL	1-10
1326.7	1326.5	VEELKPTPEGDL	42-54
1468.9	1468.8	KIDALNEMKVLVL	82-95
1489.7	1489.6	YVEELKPTPEGDL	41-54
1618.8	1618.8	YVEELKPTPEGDLE	41-55

Keterangan: Massa dari peptida-peptida disajikan dalam tabel sebagai hasil percobaan (Da) (d) dan sebagai hasil perhitungan berdasarkan urutan (Da) (C) (Sumber: Zeece *et al.* 2008)

Residu peptida-peptida yang memiliki bobot molekul berukuran kecil tersebut dapat menurunkan kemampuan IgE untuk berikatan silang pada sel mastosit, sehingga dapat menghambat terjadinya tahapan sensitasi yang menjadi pemicu reaksi alergi. Oleh karena itu, metode in vitro yang digunakan untuk mengevaluasi parameter efek perlakuan tekanan tinggi dalam menurunkan tingkat alergenisitas pada bahan pangan adalah uji in-vitro pepsin digestion yang dikombinasikan dengan analisis MS terhadap produk-produk hasil hidrolisis oleh enzim pepsin. Efek dari perlakuan tekanan tinggi dapat menyebabkan terbukanya struktur tersier dari protein susu sehingga dapat mereduksi atau mengurangi tingkat alergenisitas dari protein susu tersebut. Protein susu yang telah terbuka struktur tersiernya (unfolded protein) tidak memiliki kecenderungan untuk menjadi agen

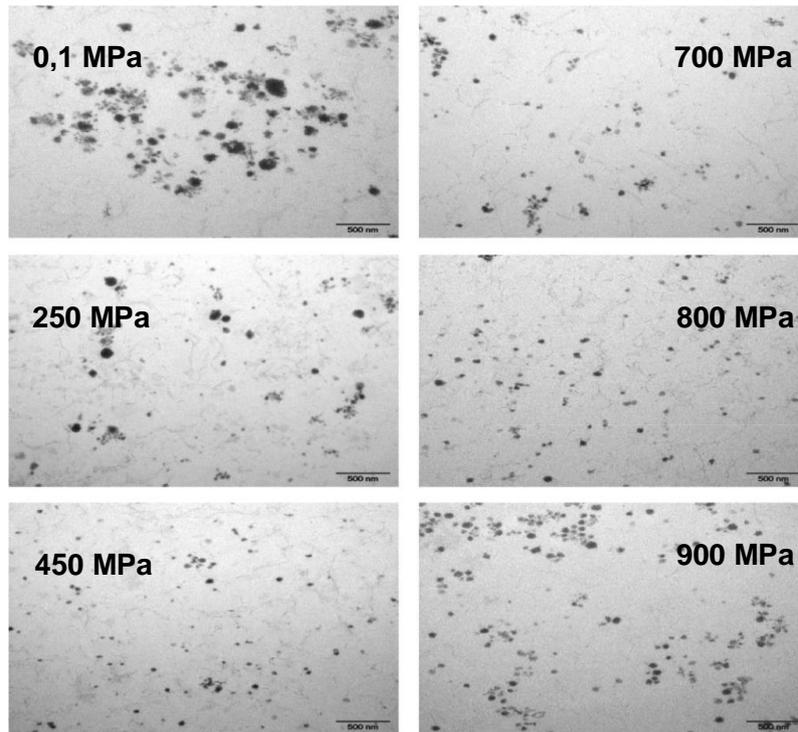


sensitisasi imunologi karena unfolded protein tersebut lebih mudah mengalami hidrolisis akibat terjadinya peningkatan aksesibilitas enzim-enzim pencernaan untuk mendegradasi unfolded protein tersebut. Dengan demikian, perlakuan tekanan tinggi dapat diaplikasikan pada bahan pangan seperti whey isolat protein sehingga dapat berkontribusi pada pengembangan pangan hipoalergenik seperti hydrolyzed milk proteins.

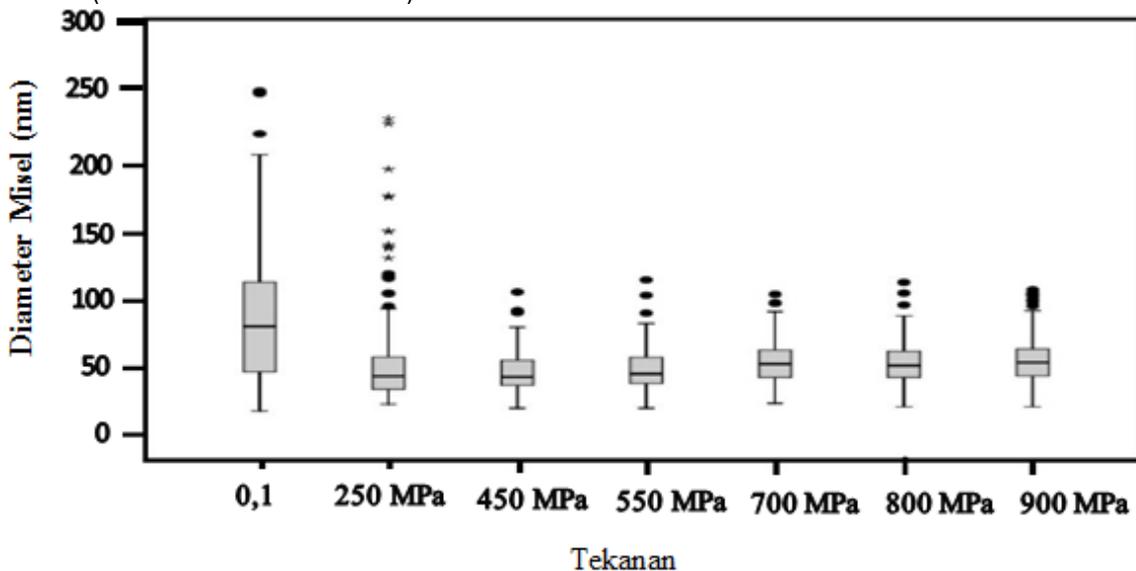
Pengaruh High Hydrostatic Pressure Terhadap Mikrostruktur Protein Susu Skim Sapi

Pengetahuan mengenai teknologi tekanan tinggi telah meningkat terus selama dua puluh tahun yang lalu, terutama berorientasi pada pengawetan pangan. Unit tekanan tinggi yang digunakan hingga mencapai 650 MPa pada suatu industri pangan. Di samping itu, beberapa kemajuan teknologi juga berkontribusi terhadap peralatan skala pilot yang dapat mencapai tekanan yang lebih tinggi yaitu hingga mencapai 1400 MPa (Bermudez-Aguirre & Barbosa-Canovas 2011). Perlakuan tekanan tinggi menyebabkan terjadinya modifikasi pada protein susu yang mempengaruhi kualitas dari susu. Tekanan menyebabkan denaturasi protein whey dan mempengaruhi misel struktur kasein, menyebabkan rusaknya misel dan re-agregasi serta lepasnya partikel kasein yang larut air. Tekanan menginduksi perubahan dari protein whey dan kasein sehingga dapat menghasilkan fraksi-fraksi protein yang memberikan nilai gizi atau meningkatkan kemampuan dari protein susu berperan sebagai kerier untuk enkapsulasi dan membawa komponen bioaktif (Bravo, Molina, & Lopez-Fandino 2012; Yazdi *et al.* 2013).

Gambar 2 menunjukkan hasil analisis TEM dari susu yang diberi tekanan antara 250 hingga 900 MPa. Diameter misel pada susu tanpa perlakuan tekanan (unpressurized milk) berada pada kisaran dari 17 hingga 255 nm (rata-rata sebesar 84 nm). Ukuran diameter tersebut dapat diturunkan melalui pemberian tekanan tinggi (HHP), mencapai minimum pada 450 MPa (Gambar 3). Misel yang diberi tekanan tinggi (450 MPa hingga 900 MPa) memiliki bentuk yang lebih bulat dan memiliki ukuran yang lebih homogen apabila dibandingkan dengan susu tanpa perlakuan tekanan (unpressurized milk) dan susu dengan tekanan HHP sebesar 250 MPa. Pada tekanan lebih dari sama dengan ≥ 450 MPa, diameter misel maksimum sangat mirip dan lebih kecil dari 115 nm (dengan rata-rata antara 45,97 dan 53,65 nm).



Gambar 2. Hasil analisis *Transmission electron micrographs* (TEM) dari susu tanpa perlakuan tekanan (0.1 MPa) dan susu dengan perlakuan tekanan sebesar 250, 450, 700, 800 and 900 MPa selama 5 menit. Garis berukuran 500 nm (Sumber: Bravo *et al.* 2015)



Gambar 3. Diameter misel (nm) pada susu tanpa tekanan (unpressurized milk) (0.1 MPa) dan susu yang diberi tekanan pada 250–900 MPa selama 5 menit diperkirakan dari TEM (Sumber: Bravo *et al.* 2015)

Perlakuan tekanan sangat tinggi pada susu dari 700 hingga 900 MPa, tidak menurunkan ukuran misel dan juga tidak menghasilkan lebih banyak kasein yang larut, berurutan dengan perlakuan tekanan yang lebih rendah (250–550 MPa). Bagaimanapun, perlakuan terhadap susu pada tekanan yang tinggi menyebabkan tingkat denaturasi yang tinggi juga pada protein whey, khususnya beta laktoglobulin. Ukuran misel kasein ternyata tidak



dipengaruhi oleh perlakuan tekanan 100 atau 200 MPa selama 20 menit pada suhu 200C, sementara perlakuan pada 250 MPa cenderung meningkatkan ukuran misel sebesar 20% dan pada tekanan yang lebih tinggi (300-800 MPa) menurunkan ukuran misel sebesar 50% (Yu et al. 2022; Bogahawaththa *et al.* 2018; Anema *et al.* 2005; Huppertz *et al.* 2004). Pada penelitian yang lain melaporkan bahwa ukuran misel beragam dari 150 hingga 200 nm pada susu yang tidak diberi perlakuan, sementara susu yang diberi perlakuan tekanan memiliki ukuran misel sekitar 40 nm pada tekanan 300 MPa suhu 200C selama 15 menit (Garcia-Risco *et al.* 2003; Needs *et al.* 2000).

Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2 dan 3, diameter misel yang dianalisis menggunakan TEM menunjukkan ukuran minimum sekitar 450 MPa yang tidak berubah pada tekanan yang lebih tinggi. Distribusi ukuran partikel berpengaruh pada beberapa organoleptik, karakteristik susu seperti kekeruhan, kecerahan, dan viskositas. Misel kasein dengan ukuran yang lebih kecil dapat meningkatkan viskositas dan menurunkan karakteristik sebaran cahaya susu, menurunkan kekeruhan dan membuat susu tersebut tampak tembus (Lopez-Fandino 2006a). Hal ini disebabkan oleh ukuran partikel pada sistem koloid menjadi lebih kecil sehingga sedikit mengubah arah cahaya (penghamburan cahaya yang terjadi lebih sedikit). Rusaknya misel selama perlakuan tekanan tinggi pada susu karena terjadinya gangguan interaksi elektrostatik intermolekul dan kelarutan dari koloid kalsium fosfat (Huppertz & De Kruif 2006, 2007). Pengukuran in situ menunjukkan bahwa kelarutan misel kalsium fosfat linier dengan fungsi dari tekanan. Pada tekanan sebesar 400 MPa, maka gangguan misel akan menjadi lengkap dan bersifat irreversibel (Huppertz & De Kruif 2007), sehingga dapat mempengaruhi ukuran misel kasein, jumlahnya, serta kandungan kasein yang tidak terendapkan (kasein larut).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Bravo *et al.* 2015, perubahan ukuran misel terjadi pada saat susu diberi perlakuan HHP (Gambar 2 dan 3) yang berkorelasi dengan konsentrasi kasein terlarut akibat perlakuan pada 250 MPa yang secara signifikan dapat memperkuat kadar kasein yang terlarut (non-sedimentable casein). Sementara itu, pada perlakuan tekanan antara 700 dan 900 MPa tidak ada peningkatan kadar kasein terlarut lebih lanjut lagi. Suhu yang lebih tinggi pada kisaran 50 – 730C yang dicapai dalam bejana tekanan pada 550 – 900 MPa (dibandingkan dengan suhu 440C pada tekanan sebesar 450 MPa) dapat mengurangi kelarutan koloid kalsium fosfat dan mempromosikan ikatan hidrofobik, dan secara parsial menidakan efek dari tekanan tinggi pada ukuran misel (Anema 2008; Garcia-Risco, Olano, Ramos, & Lopez-Fandiño 2000).

Perlakuan tekanan lebih dari 700 MPa menyebabkan beta laktoglobulin terdenaturasi hingga 77–87%. Perpindahan panas antara transmisi tekanan cairan (fluid) dan sampel (susu) memungkinkan penyebab terjadinya denaturasi protein whey, sebagai perlakuan suhu yang mempromosikan hilangnya struktur asli (native) dari protein whey dan selanjutnya akan meningkatkan terjadinya agregasi yang diinduksi melalui perlakuan tekanan (Lopez-Fandino 2006b). Garcia-Risco *et al.* (2000) melaporkan tingkat denaturasi beta laktoglobulin yang sama, walaupun pada tekanan dan suhu yang lebih rendah (400 MPa, 250C). Perbedaan ini juga dapat dikaitkan



pada perbedaan durasi atau lamanya perlakuan (perlakuan HHP pada penelitian yang dilakukan oleh Bravo *et al.* 2015 hanya 5 menit, sementara perlakuan HHP yang dilakukan oleh Garcia-Risco *et al.* 2000 selama 30 menit). Durasi atau lamanya perlakuan HHP pada susu memiliki efek yang kuat terhadap penyebab terjadinya denaturasi protein whey (Bravo *et al.* 2012).

Selain terjadinya denaturasi pada beta laktoglobulin, alpha laktalbumin juga mengalami denaturasi pada tekanan yang lebih tinggi (>700 MPa). Molekul alfa laktalbumin juga merupakan salah satu polen alergen pada susu sapi selain beta laktoglobulin. Alfa laktalbumin stabil hingga pada tekanan 450-500 MPa. Sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Anema (2008b), sekitar 90% beta laktoglobulin dan 30% alpha laktalbumin terdenaturasi setelah perlakuan tekanan sebesar 800 MPa selama 30 menit pada suhu 200C. Dengan demikian dapat diketahui bahwa perlakuan HHP dapat digunakan untuk memodifikasi struktur beta laktoglobulin sehingga kemampuan antibodi IgE untuk berikatan dengan epitop-epitop yang terdapat pada alergen menurun.

Pengaruh Perlakuan Enzimatis terhadap Mikrostruktur Protein Susu

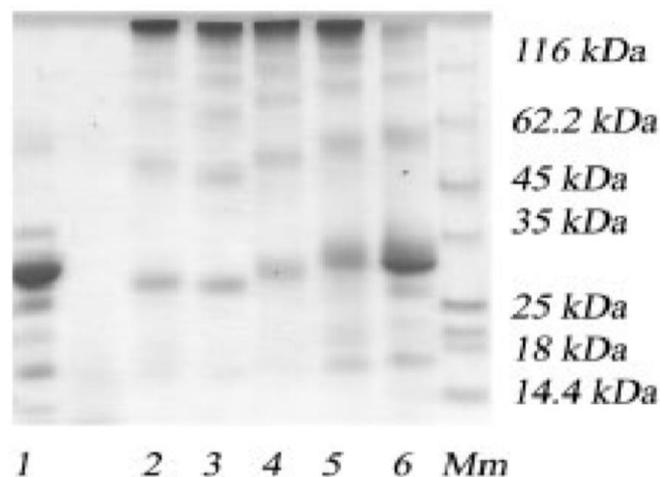
Perlakuan enzimatis telah menjadi salah satu alternatif yang sangat menjanjikan untuk memodifikasi suatu molekul. Hal ini dikarenakan enzim memiliki spesifisitas yang tinggi untuk bereaksi pada suatu bagian di molekul target. Selain itu penggunaan enzim juga menjadi pilihan alternatif untuk proses modifikasi protein yang tidak melibatkan panas ataupun pH ekstrim yang justru dapat menyebabkan kerusakan pada bagian non target lainnya.

Perlakuan enzimatis pada susu diawali dengan pengikatan silang β -Casein dengan beberapa enzim yang dapat menyebabkan terjadinya polimerisasi pada peptida molekul protein β -Casein seperti enzim Transglutaminase (Tgase), dan Tirosinase dari *Trichoderma reesei* (TrTyr) serta kontrol negatif (β -Casein tanpa diberi perlakuan enzimatis). Tahapan kedua, sebelum dilakukan analisis dengan SDS PAGE maka perlu adanya perlakuan digesti dengan penambahan HCl 0,1 M pH 2,5 diikuti dengan penambahan pepsin pada β -Casein hasil pengikatan silang serta β -Casein kontrol di suhu 37°C. Perlakuan ini untuk memperoleh suasana yang serupa dengan kondisi pencernaan di dalam tubuh. Tahapan ketiga adalah analisis berat molekul dan morfologi menggunakan elektroforesis SDS PAGE, Atomic Force Microscopy (AFM) serta MALDI-TOF MS terhadap sampel. Tahapan terakhir adalah pengujian inhibisi IgE pada protein sampel dengan menggunakan metoda ELISA. Tahapan ini digunakan untuk mengkonfirmasi terjadinya penurunan sifat alerginitas β -Casein hasil pengikatan silang dibandingkan β -Casein kontrol dengan menggunakan ELISA.

Efek perubahan ukuran berat molekul dan struktur β -Casein hasil pengikatan silang enzim Tgase dan TrTyr melalui analisis SDS PAGE, AFM dan MALDI-TOF MS telah dipelajari oleh Monogioudi *et. al* (2011). Perlakuan enzimatis pada β -Casein ternyata dapat memberikan pengaruh pada ukuran molekul protein β -Casein. Pada



Gambar 4 dapat diketahui bahwa setelah β -Casein diikat silang dengan enzim Tgase dan TrTyr terjadi peningkatan ukuran berat molekul pada β -Casein. Hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya marker β -Casein hasil pengikatan silang memiliki berat molekul 116 kDa (kecuali pada marker 6), yang mana berat molekul ini lebih besar dibandingkan β -Casein kontrol tanpa diberi perlakuan yaitu sekitar 35 kDa. Pengikatan silang dengan enzim ini dapat meningkatkan berat molekul β -Casein karena adanya reaksi polimerisasi yang dikatalisa oleh enzim Tgase dan TrTyr pada rantai asam amino β -Casein.



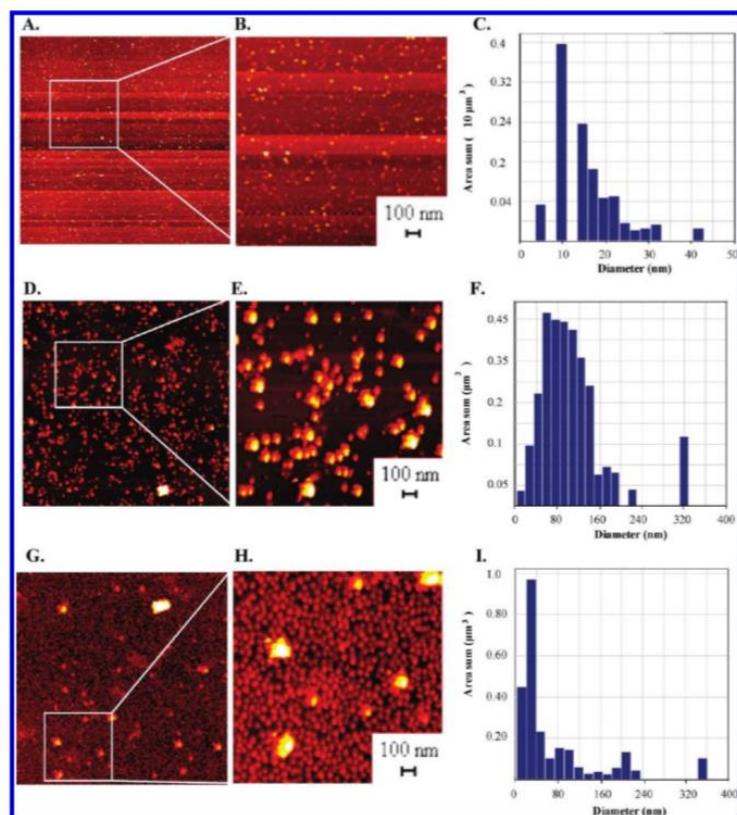
Gambar 4. Kondisi β -Casein hasil pengikatan silang melalui analisis SDS-PAGE. Lane 1: β -Casein kontrol. Lane 2: β -Casein hasil pengikatan silang oleh Tgase 100nkat/g. Lane 3: β -Casein hasil pengikatan silang oleh Tgase 1000nkat/g. Lane 4: β -Casein hasil pengikatan silang oleh TrTyr 1000nkat/g. Lane 5: β -Casein hasil pengikatan silang oleh AbTyr 1000nkat/g dan asam kafeat. Lane 6: β -Casein hasil pengikatan silang oleh ThL 1000nkat/g dan asam kafeat (Stanic *et al.* 2010)

Hasil analisis morfologi menggunakan AFM pada Gambar 5 menunjukkan bahwa partikel pada β -Casein hasil pengikatan silang memiliki bentuk disk. Ukuran partikel pada β -Casein hasil pengikatan silang oleh enzim TrTyr dan Tgase adalah lebih besar 2 kali lipat dibandingkan β -Casein kontrol. Ukuran partikel terbesar pada β -Casein oleh enzim TrTyr dengan konsentrasi 1000 nkat/g adalah sebesar 340 nm. Rata-rata ukuran partikel β -Casein yang dihasilkan melalui enzim TrTyr adalah sebesar 80 nm. Sedangkan ukuran partikel agregat terbesar pada β -Casein hasil pengikatan silang dengan konsentrasi 1000 nkat/g adalah sebesar 360 nm serta rata-rata ukuran partikel agregatnya adalah sebesar 20 nm.

Berdasarkan data tersebut juga dapat diperoleh informasi bahwa β -Casein hasil pengikatan silang oleh enzim Tgase memiliki ukuran partikel yang lebih kecil dan morfologi yang lebih rapat dibandingkan partikel yang dihasilkan silang oleh enzim TrTyr. Hal ini menunjukkan bahwa dimungkinkan adanya interaksi ikatan silang intramolekular pada partikel protein β -Casein hasil pengikatan silang oleh enzim Tgase tersebut. Interaksi ikatan silang intramolekular tersebut dapat terbentuk karena enzim transglutaminase mengkatalisa reaksi antara residu asam amino lisin dan residu asam amino glutamin dan membentuk ikatan ϵ -(γ -glutamil) lisin isopeptida yang



menghasilkan penggabungan ikatan kovalen intramolekuler yang berikatan silang. Selain itu intensitas pengikatan silang oleh Tgase lebih tinggi karena β -Casein memiliki sisi reaktif terhadap enzim Tgase yang lebih banyak dibandingkan TrTyr, yang mana β -Casein memiliki 11 lisin dan 20 glutamin yang bisa diikat silang oleh transglutaminase. Sedangkan pada β -Casein hasil pengikatan silang oleh enzim TrTyr memiliki ukuran partikel yang lebih besar. Hal tersebut mengindikasikan bahwa ikatan intermolekular lebih dominan pada partikel tersebut dikarenakan β -Casein hanya memiliki 4 sisi reaktif, yaitu residu tirosin, yang digunakan sebagai substrat oleh enzim TrTyr untuk membentuk ikatan silang.



Gambar 5. Morfologi β -Casein hasil pengikatan silang melalui analisis AFM : (A) β -Casein kontrol; (B) area terpilih pada permukaan β -Casein kontrol yang diperbesar; (C) histogram area-diameter kontrol; (D) β -Casein hasil pengikatan silang TrTyr; (E) area terpilih pada permukaan β -Casein hasil pengikatan silang TrTyr yang diperbesar; (F) histogram area-diameter sampel TrTyr; (G) β -Casein hasil pengikatan silang Tgase; (H) area terpilih pada permukaan β -Casein hasil pengikatan silang Tgase yang diperbesar; (I) histogram area-diameter sampel Tgase (Monogioudi *et al.* 2011)

Untuk mengidentifikasi peptida yang mengalami pembentukan ikatan silang intramolekular pada β -Casein maka dilakukan analisis dengan menggunakan MALDI-TOF MS. Tabel 2 menunjukkan beberapa peptida yang hilang dan membentuk ikatan silang dengan peptida yang lainnya. Pada β -Casein hasil pengikatan silang oleh



enzim Tgase berpotensi memiliki jumlah ikatan silang intramolekular yang lebih banyak dibandingkan oleh enzim TrTyr.

Peningkatan ukuran partikel serta terbentuknya ikatan silang intramolekular pada protein β -Casein sangat berpengaruh terhadap sifat fungsional dari protein itu sendiri. Menurut Stanic et. al (2010), ukuran protein antara 10-70 kDa dapat berpotensi menstimulasi produksi IgE yang memicu terjadinya proses alergi. Dengan demikian, ukuran molekul protein yang semakin besar dapat menurunkan potensi terjadinya alergi. Di samping itu, adanya hasil analisis AFM dan MALDI-TOF MS yang menunjukkan terjadinya perubahan pada struktur β -Casein juga dapat meningkatkan potensi penurunan alergenitas dari protein β -Casein itu sendiri. Hal ini disebabkan perubahan struktur protein tersebut berpengaruh pada beberapa daerah IgE-binding (epitop) yang dikaitkan dengan reaksi alergi. Kebanyakan epitop IgE spesifik berada pada permukaan protein. Untuk memastikan adanya pengaruh pada penurunan alergenitas β -Casein maka perlu dilakukan analisis lebih lanjut dengan menggunakan ELISA.

Tabel 2. Peptida yang hilang setelah direaksikan dengan Tgase dan TrTyr.

Kemungkinan asam amino yang berkaitan silang (*cross-linked amino acids*)

Peptida-Peptida	TrTyr		Tgase	
	Y	H	Q	K
VYFPFGPIPNLSPQNIPPLTQT	1	0	2	0
PVVVPPFLQPEVM	0	0	1	0
GVSKVKEAMAPKHKEMPFKYPVEPF	1	1	-	-
TESQSLTLT				
TDVENLHLPLPLLQS	0	1	-	-
QSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLS	0	2	4	0
SLSQSKVLPVPQKAVPYPQRDM	-	-	4	2
PIQAF				

Stanic et al. (2010) telah melaporkan efek alergenitas β -Casein hasil pengikatan silang enzim Tgase dan TrTyr dengan metode ELISA. Perubahan struktur yang terjadi pada β -Casein setelah pengikatan silang terbukti memberikan pengaruh signifikan pada pengenalan antibodi IgE terhadap β -Casein yang ditunjukkan dengan nilai IC50 pada Tgase (46,0 kAU/L) dan TrTyr (60,0 kAU/L) yang lebih rendah dari β -Casein kontrol (215,3 kAU/L). Perubahan pada struktur protein tersebut diduga terjadi pada sisi epitop β -Casein yang dapat menyebabkan adanya perubahan pada sisi epitop tersebut sehingga tidak lagi dikenali oleh IgE sebagai protein asing dan tentunya dapat menurunkan kemampuan IgE untuk berikatan silang pada sel mastosit, sehingga dapat menghambat terjadinya tahapan sensitasi yang menjadi pemicu reaksi alergi. Pembentukan ikatan silang



intramolekular pada struktur β -Casein oleh Tgase ternyata juga menyebabkan pengenalan IgE pada β -Casein menjadi lebih rendah dibanding TrTyr.

KESIMPULAN

Susu sapi merupakan sumber pangan yang bergizi tinggi namun, protein susu sapi juga merupakan salah satu alergen pangan yang utama dan cenderung menyebabkan reaksi alergi. Beberapa perlakuan pada pangan dapat digunakan secara efektif untuk mengurangi alergenitas protein susu dengan mengubah mikrostruktur dari protein tersebut, diantaranya meliputi perlakuan enzimatik dan *High Hydrostatic Pressure* (HHP). Pada prinsipnya perlakuan tersebut mampu mengubah struktur epitop dari protein antigenik. Perlakuan enzimatik menggunakan dua jenis enzim crosslinking berupa transglutaminase dan tirosinase mengakibatkan terbentuknya mikrostruktur protein yang lebih besar sehingga epitop pada protein alergen tidak lagi dikenali oleh paratop. Hal ini juga terjadi pada perlakuan tekanan tinggi, dimana protein alergen mengalami destrukurisasi akibat terbukanya struktur tersier protein alergen. *Unfolded* protein ini akan dengan lebih mudah dipecah oleh enzim sehingga terbentuk residu peptida-peptida dengan berat molekul yang sangat kecil. Reduksi ukuran ini mengakibatkan protein alergen tidak dapat mencapai paratop antibodi. Kecenderungan protein susu antigenik untuk menjadi agen sensitisasi imunologi menurun akibat adanya perubahan mikrostruktur tersebut. Dengan demikian beberapa strategi ini dapat digunakan untuk pengembangan produk susu hipoalergenik.

DAFTAR PUSTAKA

- Anema SG. 2008a. Effect of milk solids concentration on whey protein denaturation, particle size changes and solubilization of casein in high-pressure treated skim milk. *Int Dairy J.* 18: 228–235.
- Anema SG. 2008b. Heat and/or high-pressure treatment of skim milk: Changes to the casein micelle size, whey proteins and the acid gelation properties of the milk. *Int J Dairy Tech.* 61: 245–252.
- Anema SG, Lowe EK, Stockmann R. 2005. Particle size changes and casein solubilisation in HP-treated skim milk. *Food Hydro.* 19: 257–267.
- Bermúdez-Aguirre D, Barbosa-Cánovas GV. 2011. An update on high hydrostatic pressure, from the laboratory to industrial applications. *Food Eng Rev.* 3: 44–61.
- Bravo FI, Felipe X, López-Fandiñ R, Molina E. 2015. Skim milk protein distributions as a result of very high hydrostatic pressure. *Food Res Int.* 72: 74-79.
- Bravo FI, Molina E, López-Fandiño R. 2012. Effect of the high-pressure-release phase on the protein composition of the soluble milk fraction. *J Dairy Sci.* 95: 6293–6299.
- Breiteneder H, Mills ENC. 2005. Molecular properties of food allergens. *J Allergy Clin Immun.* 115: 14–23.
- Bu G, Luo Y, Chen F, Liu K, Zhu T. 2013. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review. *Dairy Sci. Technol.* 93: 211–223.



- Chandan RC, Kilara A. 2011. Dairy Ingredients for Food Processing. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Fiocchi A, Brozek J, Schünemann H, Bahna SL, von Berg A, Beyer K, Bozzola M, Bradsher J, Compalati E, Ebisawa M, Guzman MA, Li H, Heine RG, Keith P, Lack G, Landi M, Martelli A, Rancé F, Sampson H, Stein A, Terracciano L, Vieths S. 2010. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) guidelines. *Pediatr Allergy Immunol*. 21: 1–125.
- Garcia-Risco MR, Olano A, Ramos M, Lopez-Fandiño R. 2000. Micellar changes induced by high pressure. Influence in the proteolytic activity and organoleptic properties of milk. *J Dairy Sci*, 83, 2184–2189.
- Garcia-Risco MR, Recio I, Molina E, Lopez-Fandiño R. 2003. Plasmin activity in pressurized milk. *J Dairy Sci*, 86: 728–734.
- Huppertz T, De Kruif KG. 2007. High pressure-induced solubilisation of micellar calcium phosphate from cross-linked casein micelles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 205: 264–268.
- Huppertz T, Fox PF, Kelly AL. 2004. High pressure treatment of bovine milk: Effects on casein micelles and whey proteins. *J Dairy Res*, 71: 97–106.
- Huppertz T, Fox PF, De Kruif KG, Kelly AL. 2006. HP-induced changes in bovine milk proteins: A review. *Bio et Biophysica Acta*, 1764: 593–598.
- Lack G, Du Toit G. 2014. Prevention of food allergy. *Food Allergy: Adverse reactions to foods and food additives* 5th ed. 475- 491.
- López-Fandiño R. 2006a. High pressure-induced changes in milk proteins and possible applications in dairy technology. *Int Dairy J*, 16: 1119–1131.
- Monogioudi E, Permi P, Filpponen I, Lienemann M, Li B, Argyropoulos D, Buchert J, Mattinen ML. 2011. Protein Analysis by ³¹P-NMR Spectroscopy in Ionic Liquid: Quantitative Determination of Enzymatically Created Cross-links. *J of Agri Food Chem*, 59 (4): 1352–1362
- Needs EC, Stenning RA, Gill AL, Ferragut V, Rich GT. 2000. High-pressure treatment of milk: Effects on casein micelle structure and on enzymatic coagulation. *J Dairy Res*, 67: 31–42.
- Sharabi S, Okun Z, Shpigelman A. 2018. Changes in the shelf life stability of riboflavin, vitamin C and antioxidant properties of milk after (ultra) high pressure homogenization: Direct and indirect effects. *Innov Food Sci Emerging Technol*, 47: 161–169.
- Schuck P. 2013. Condensed and powdered milk. In: Park, Y., Haenlein, G.F.W. (Eds.), *Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health*. John Wiley & Sons, Oxford, UK.
- Stanic D, Monogioudi E, Ercili D, Radosavljevic J, Atanaskovic- Markovic M, Vuckovic O, Lantto R, Mattinen M, Buchert J, Cirkovic Velickovic T. 2010. Digestibility and allergenicity assessment of enzymatically crosslinked β -casein. *Mol Nut Food Res*, 54: 1273–1248
- Torok K, Horvath V, Horvath A, Hajas L, Bugyi Z, Tomoskozi S. 2014. Investigation of incurred single- and multi-component model food matrices for determination of food proteins triggering allergy and coeliac disease. *Eur Food Res Technol*, 239: 923-932.
- Wal JM. 2004. Bovine milk allergenicity. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 93: 2–11.
- Yazdi SR, Bonomi F, Iametti S, Miriani M, Brutti A, Corredig M. 2013. Binding of curcumin to milk proteins increases after static high-pressure treatment of skim milk. *J Dairy Res*, 80: 152–158.
- Zeece M, Huppertz T, Kelly A. 2008. Effect of high-pressure treatment on in-vitro digestability of beta lactoglobulin. *J Innov Food Sci Emerging Technol*, 9: 62-69.



- Lifschitz C, Szajewska H. 2015. Cow's milk allergy: evidence-based diagnosis and management for the practitioner. *Eur J Pediatr*. 174(2): 141-50
- Wood RA, Sicherer SH, Vickery BP, Jones SM, Liu AH, Fleischer DM, Henning AK, Mayer L, Burks AW, Grishin A, Stablein D, Sampson HA. 2013. The natural history of milk allergy in an observational cohort. *J Allergy Clin Immunol*. 131(3): 805-12
- Caffarelli C, Santamaria F, Di Mauro D, Mastroilli C, Montella S, Tchana B, Valerio G, Verrotti A, Valenzise M, Bernasconi S, Corsello G. 2018. Advances in pediatrics in 2017: current practices and challenges in allergy, endocrinology, gastroenterology, genetics, immunology, infectious diseases, neonatology, nephrology, neurology, pulmonology from the perspective of Italian Journal of Pediatrics. *Ital J Pediatr*, 44(1): 82.
- Geiselhart S, Podzhilkova A, Hoffmann-Sommergruber K. 2021. Cow's Milk Processing—Friend or Foe in Food Allergy? *Foods*, 10: 572.
- Caubet JC, Szajewska H, Shamir R, Nowak-Wegrzyn A. 2017. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies in children. *Pediatr Allergy Immunol*. 28: 6–17
- Mudgil D, Barak S. 2019. Dairy-Based Functional Beverages. *Milk-Based Bev*, 67–93
- Lv L, Qu X, Yang N, Ahmed I. 2021. The conformational structural change of β -lactoglobulin via acrolein treatment reduced the allergenicity. *Food Chem X*, 10: 100120.
- Barbiroli, Alberto, Stefania Iametti, Francesco Bonomi. 2022. Beta-Lactoglobulin as a Model Food Protein: How to Promote, Prevent, and Exploit Its Unfolding Processes. *Molecules*. 3: 1131.
- Yu T, Zhang X, Feng R, Wang C, Wang X, Wang Y. 2022. Comparison of the Effects of High Hydrostatic Pressure and Pasteurization on Quality of Milk during Storage. *Foods*, 11: 2837.
- Bogahawaththa D, Buckow R, Chandrapala J, Vasiljevic T. 2018. Comparison between thermal pasteurization and high-pressure processing of bovine skim milk in relation to denaturation and immunogenicity of native milk proteins. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 47, 301–308
- Luyt D, Ball H, Makwana N, Green MR, Bravin K, Nasser SM, Clark AT. 2014. Standards of Care Committee (SOCC) of the British Society for Allergy and Clinical Immunology (BSACI). BSACI guideline for the diagnosis and management of cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy*. 44(5):642-72.
- Chawla R, Patil GR, Singh AK. 2011. High hydrostatic pressure technology in dairy processing: a review. *J Food Sci Technol*. 48(3):260-8.
- Serna-Hernandez, Sergio O., Zamantha Escobedo-Avellaneda, Rebeca García-García, Magdalena de Jesús Rostro-Alanis, Jorge Welti-Chanes. 2021. High Hydrostatic Pressure Induced Changes in the Physicochemical and Functional Properties of Milk and Dairy Products: A Review. *Foods*, 8: 1867.