

## PENGIKATAN GARAM EMPEDU OLEH SUSU KEDELAI TERFERMENTASI DAN STABILITASNYA TERHADAP PEPSIN DAN PANKREATIN

[Binding of Bile Salts by Fermented Soymilk and Its Stability Against Pepsin and Pancreatin]

Yusmarini<sup>1)\*</sup>, Retno Indrati<sup>2)</sup>, Tyas Utami<sup>2)</sup> dan Yustinus Marsono<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Riau, Riau

<sup>2)</sup> Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Diterima 16 Februari 2012 / Disetujui 04 Desember 2012

### ABSTRACT

Processed soybean products especially the fermented ones have beneficial health effects since they are capable of reducing the level of plasmacholesterol (hypocholesterolemic effect). One of the mechanisms is by increasing the binding of bile salt. This research was aimed to assess the ability of soymilk, fermented soymilk products and fermented soymilk products combined with enzymatic hydrolysis to bind bile salts. The stability of the binding against hydrolysis by digestive enzymes (pepsin and pancreatin) was also evaluated. Fermented soybean products inoculated with isolates of *L. plantarum* 1 R.11.1.2 was able to bind 1.40  $\mu\text{mol}/100$  mg protein (62.26%) of natrium taurocholate. This binding ability is slightly higher than that of soymilk to natrium taurocholate, i.e. 1.33  $\mu\text{mol}/100$  mg protein (59.04%). Addition of a protease enzyme specific to hydrophobic amino acid (thermolysin) on fermented soymilk products was able to enhance the ability of bind natrium taurocholate. Enzymatic hydrolysis products having a molecular weight of <7 kDa could bind 1.51  $\mu\text{mol}/100$  mg protein natrium taurocholate (67.4%). There was a significant increase in the binding, i.e. 7.9% by the fermented products or an increase of 13.5% from soymilk. Meanwhile peptides measuring  $\geq 7$  kDa showed no binding ability against natrium taurocholate.

**Keywords:** bile salt, fermented soymilk

### ABSTRAK

Produk olahan kedelai terutama produk fermentasi mempunyai efek menguntungkan bagi kesehatan diantaranya dapat menurunkan level kolesterol plasma (bersifat hipokolesterolemik). Salah satu mekanisme hipokolesterolemik adalah melalui pengikatan garam empedu. Tujuan penelitian adalah untuk mengkaji kemampuan susu kedelai, produk fermentasi susu kedelai dan produk fermentasi susu kedelai yang dikombinasikan dengan hidrolisa enzimatis dalam mengikat garam empedu serta mengkaji stabilitas pengikatan garam empedu terhadap hidrolisa oleh enzim pencernaan (pepsin dan pankreatin). Garam empedu yang terikat diukur dengan menggunakan *Total Bile Acid Binding Kit*. Produk fermentasi susu kedelai yang diinokulasi dengan isolat *L. plantarum* 1 R.11.1.2 mampu mengikat natrium taurokolat sebesar 1.40  $\mu\text{mol}/100$  mg protein (62.26%). Angka ini sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan kemampuan susu kedelai dalam mengikat natrium taurokolat 1.33  $\mu\text{mol}/100$  mg protein (59.04%). Penambahan enzim protease spesifik asam amino hidrofobik (thermolysin) pada produk fermentasi susu kedelai dapat meningkatkan kemampuan dalam mengikat natrium taurokolat. Produk hidrolisa enzimatis yang mempunyai berat molekul <7 kDa mampu mengikat natrium taurokolat sebesar 1.51  $\mu\text{mol}/100$  mg protein (67.4%). Terjadi peningkatan pengikatan yang signifikan yakni sebesar 7.9% dari produk fermentasi atau meningkat 13.5% dari susu kedelai, sedangkan peptida yang berukuran  $\geq 7$  kDa tidak menunjukkan peningkatan pengikatan terhadap natrium taurokolat.

**Kata kunci:** garam empedu, susu kedelai terfermentasi

### PENDAHULUAN

Hiperkolesterol merupakan salah satu faktor resiko penyakit kardiovaskuler. Berbagai upaya dilakukan untuk mencegah penyakit kardiovaskuler antara lain dengan mengonsumsi makanan yang bersifat hipokolesterolemik. Kedelai dan produk fermentasi dari kedelai dikenal dapat menurunkan kolesterol plasma atau bersifat hipokolesterolemik (Kahlon dan Woodruff, 2002; Nisa *et al.* 2007). Salah satu mekanisme hipokolesterolemik adalah melalui pengikatan garam empedu (Kahlon dan Shao, 2004; Yoshie-Stark *et al.* 2008; Nagaoka *et al.* 2010).

Pengikatan garam empedu akan berdampak pada meningkatnya jumlah garam empedu yang diekskresikan melalui feses dan menurunnya resirkulasi garam empedu ke hati. Penurunan resirkulasi garam empedu akan memacu hati untuk mensintesa garam empedu baru dengan menggunakan kolesterol sebagai prekursor, sehingga secara tidak langsung menyebabkan terjadinya penurunan konsentrasi kolesterol di dalam darah. Efek hipokolesterolemik dari produk kedelai diberikan antara lain oleh protein atau peptida bioaktif yang merupakan hasil hidrolisa protein kedelai secara enzimatis. Peptida bioaktif yang bersifat hipokolesterolemik umumnya mempunyai asam amino hidrofobik pada terminal nitrogennya seperti leusin pada *sequence* Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg (Yoshikawa *et al.* 2000); Leu-Pro-Tyr-Pro dan Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg (Kwon *et al.* 2002);

\*Korespondensi Penulis :  
E-mail : yusmarini\_69@yahoo.co.id; Telp: 08127699124

triptofan pada *sequence* Trp-Gly-Ala-Pro-Val-Thr, Trp-Gly-Ala-Pro-Ser-Leu, dan Trp-Gly-Ala-Pro-Ser-Ile (Zhong *et al.* 2007<sup>b</sup>), valin pada *sequence* Val-Ala-Trp-Trp-Met-Tyr (Nagaoka *et al.* 2010).

Susu kedelai terfermentasi yang dibuat dengan menambahkan bakteri asam laktat proteolitik hasil isolasi dari susu kedelai yang terfermentasi secara spontan, diharapkan mampu mengikat garam empedu, karena diduga mengandung peptida bioaktif yang dihasilkan oleh aktivitas proteolitik bakteri asam laktat. Kemampuan susu kedelai terfermentasi dalam mengikat garam empedu dapat ditingkatkan dengan hidrolisa protein lebih lanjut sehingga dihasilkan peptida bioaktif lebih banyak. Beberapa peneliti telah melakukan percobaan penambahan protease pada produk fermentasi seperti tempe dan nato (Gibbs *et al.* 2004) maupun produk non fermentasi seperti pada isolat protein kedelai (Zhong *et al.* 2007<sup>a</sup>). Peptida yang dihasilkan mempunyai sifat anti hipertensi dan hipokolesterolemik.

Penambahan protease spesifik asam amino hidrofobik (thermolysin) pada susu kedelai terfermentasi, merupakan cara yang dapat dilakukan untuk menghidrolisa protein lebih lanjut menjadi peptida bioaktif yang bersifat hipokolesterolemik. Tujuan penelitian adalah untuk mengkaji kemampuan susu kedelai, susu kedelai terfermentasi dan produk hidrolisa enzimatis susu kedelai terfermentasi dalam mengikat garam empedu serta mengkaji stabilitas pengikatan garam empedu terhadap hidrolisa oleh enzim pencernaan (pepsin dan pankreatin).

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kacang kedelai varietas Anjasmoro yang diperoleh dari Balai Benih Tanaman Palawija – Wonosari Daerah Istimewa Yogyakarta. Isolat bakteri asam laktat *L. plantarum* 1 R.11.1.2 hasil isolasi dari susu kedelai yang terfermentasi spontan (Yusmarini *et al.* 2009). Enzim protease thermolysin – EC,3,4,24,27 (Nacalai-Jepang), pankreatin (Sigma-Aldrich) dan pepsin EC,3,4,23,1 (Nacalai-Jepang), Total Bile Acid (TBA) Kit (Wako-Jepang) dan natrium taurokolat (Nacalai-Jepang).

### Pembuatan susu kedelai

Susu kedelai dibuat dengan menggunakan metode yang mengacu pada Yusmarini *et al.* (2010). 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 dengan menggunakan autoklaf (Eastern Medical EA-632) pada suhu 115°C selama 10 menit. Dilakukan uji kemampuan mengikat garam empedu.

### Fermentasi susu kedelai oleh isolat BAL

Proses fermentasi susu kedelai mengacu pada Yusmarini *et al.* (2010). Susu kedelai yang telah disterilisasi pada suhu

115°C selama 10 menit didinginkan dengan cepat hingga mencapai suhu 45°C selama 15-30 menit. Setelah itu diinokulasi dengan isolat BAL (*Lactobacillus plantarum* 1 R.11.1.2) sebanyak 1% (v/v) dengan jumlah mikroba  $4.5 \times 10^6$  dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 jam di dalam incubator (Sanyo MIR-262). Pada akhir fermentasi dilakukan pengukuran pengikatan garam empedu.

### Hidrolisa enzimatis susu kedelai terfermentasi oleh Thermolysin

Susu kedelai terfermentasi dihidrolisa dengan menggunakan protease spesifik asam amino hidrofobik (thermolysin). Prosedur hidrolisa enzimatis mengacu pada Yoshie-Stark dan Wäsche (2004). Susu kedelai terfermentasi dipanaskan pada suhu 80°C selama 20 menit. Setelah itu dilakukan pengaturan nilai pH susu kedelai terfermentasi tersebut hingga mencapai pH 8 dengan menggunakan NaOH dan kemudian ditambah thermolysin, diinkubasi selama 2 jam pada suhu 65°C di dalam *water bath shaker* (Sibata WS-240). Setelah itu dilakukan pemanasan selama 20 menit pada suhu 90°C untuk menginaktifkan enzim thermolysin.

### Pemisahan protein dengan teknik dialisa

Produk hidrolisa enzimatis dari susu kedelai terfermentasi dialisa menggunakan kantung dialysis (*cut off* 7 kDa). Pemisahan protein dengan teknik dialisa mengacu pada Pohl. (1990). Sampel sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam kantung dialisa dalam larutan buffer fosfat 20 mM pH 7. Dialisa dilakukan selama 12 jam di dalam ruang pendingin (*cool room*) dan selama proses dialisa dilakukan pengadukan dengan menggunakan *magnetic stirrer* (Cimarec 2). Sampel yang terdapat pada kantung (berat molekul  $\geq 7$  kDa) dan sampel yang terdapat pada buffer (berat molekul  $< 7$  kDa) dibekukan dan selanjutnya dikeringkan dengan menggunakan *freeze dryer*. Peptida hasil dialisa baik yang berukuran  $\geq 7$  kDa maupun peptida yang berukuran  $< 7$  kDa dianalisa kemampuannya dalam mengikat garam empedu.

### Uji stabilitas terhadap enzim pencernaan (pepsin dan pankreatin)

Stabilitas pengikatan garam empedu oleh produk hidrolisa enzimatis dari susu kedelai terfermentasi terhadap hidrolisa oleh pepsin dan pankreatin dilakukan secara *in vitro*. Uji stabilitas mengacu pada Yoshie-Stark dan Wäsche (2004). Susu kedelai terfermentasi yang telah dihidrolisa oleh protease spesifik dan didialisa diatur pH hingga mencapai pH 2 dengan menggunakan HCl. Setelah itu ditambah enzim pepsin dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C di dalam incubator (Sanyo MIR-262). Sebagian sampel dianalisa kemampuan pengikatan garam empedunya dan sebagian digunakan untuk tahap berikutnya yakni stabilitas terhadap pankreatin. Nilai pH dari susu kedelai fermentasi yang telah dihidrolisa dengan pepsin ditingkatkan menjadi 7 dengan menggunakan NaOH dan ditambahkan enzim pankreatin. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 3 jam. Kemudian dilakukan pemanasan selama 20 menit pada suhu 80°C, selanjutnya dilakukan analisa pengikatan garam empedu.

### Pengikatan garam empedu

Preparasi sampel mengacu pada Yoshie-Stark dan Wäsche (2004). Satu milliliter sampel (susu kedelai non fermentasi dan susu kedelai terfermentasi) ditambah 2.5 ml larutan 0.1 M buffer fosfat pH 7 dan diaduk dengan menggunakan vortex (Nesco XH-C), hingga tercampur secara sempurna. Seratus mikroliter suspensi sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah larutan garam empedu 0.25 mM sebanyak 900  $\mu$ l. Garam empedu yang digunakan adalah natrium taurokolat. Suspensi diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C dan kemudian disentrifugasi pada kecepatan 9900 x g selama 10 menit dengan menggunakan sentrifuse (ependorf 5417-R). Supernatan dipisahkan dan endapan yang terbentuk ditambah dengan 0.5 ml larutan 0.1 M buffer natrium fosfat pH 7. Dilakukan pencampuran dan kemudian disentrifugasi kembali pada kecepatan dan waktu yang sama. Supernatan yang dihasilkan digabungkan dengan supernatan yang didapat pada sentrifugasi pertama. Garam empedu yang terdapat pada supernatan dianalisa dengan *Total Bile Acid* kit (Wako-Jepang) yang dilanjutkan dengan pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer (Genesys 20) dan hasil yang diperoleh merupakan garam empedu yang tidak terikat. Perhitungan jumlah garam empedu yang terikat adalah pengurangan dari jumlah garam empedu yang ditambahkan dengan garam empedu yang terdapat pada supernatan (garam empedu tidak terikat).

Data yang diperoleh ditabulasi dan kemudian dianalisa dengan menggunakan *software* SPSS versi 17 dan untuk membedakan antar perlakuan digunakan uji Duncan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

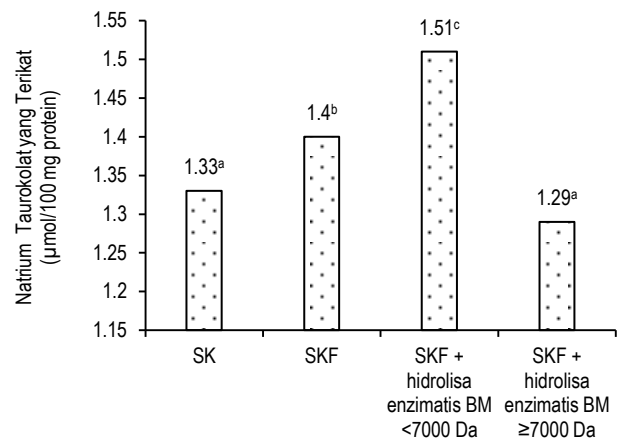
### Pengikatan garam empedu oleh produk susu kedelai

Hasil penelitian yang dilakukan oleh beberapa peneliti menyebutkan bahwa protein kedelai dapat mengikat garam empedu (Sugano *et al.* 1990; Kahlon dan Shao 2004; Yoshie-Stark *et al.* 2008). Penelitian ini mengkaji pengaruh proses fermentasi dan fermentasi yang dikombinasikan dengan hidrolisa enzimatis terhadap kemampuan produk dalam mengikat natrium taurokolat. Kemampuan produk mengikat natrium taurokolat disajikan pada Gambar 1.

Data pada Gambar 1 menunjukkan bahwa susu kedelai dapat mengikat natrium taurokolat sebesar 1.33  $\mu$ mol/100 mg protein atau sebesar 59.04%. Kemampuan mengikat natrium taurokolat diduga ada kaitannya dengan kandungan asam amino hidrofobik yang dikandung oleh susu kedelai. Dari hasil analisa dengan menggunakan HPLC diketahui bahwa kedelai mengandung sejumlah asam amino hidrofobik maupun hidrofilik (*unpublished result*).

Hasil analisa menunjukkan bahwa asam amino yang terdapat pada kedelai yang terdeteksi dengan HPLC terdiri atas 15 jenis asam-asam amino dan 29.51% dari asam amino tersebut adalah asam amino hidrofobik yang meliputi alanin, metionin, valin, fenilalanin, isoleusin, leusin dan lisin (*unpublished result*). Asam-asam amino hidrofobik tersebut diduga memegang peranan dalam pengikatan natrium taurokolat. Hal ini didukung oleh pernyataan Sugano *et al.* (1990) dan

Kwon *et al.* (2002) yang menyatakan bahwa asam-asam amino hidrofobik yang terdapat pada terminal-N dari suatu protein atau peptida mempunyai peranan penting dalam mengikat asam atau garam empedu.



Keterangan: SK (susu kedelai); SKF (susu kedelai terfermentasi); SKF+hidrolisa enzimatis (susu kedelai terfermentasi + thermolysin, BM <7 kDa); SKF+hidrolisa enzimatis (susu kedelai terfermentasi + thermolysin, BM  $\geq$ 7 kDa)

Gambar 1. Pengikatan natrium taurokolat oleh susu kedelai, susu kedelai terfermentasi dan produk hidrolisa enzimatis dari susu kedelai terfermentasi. (Notasi dengan huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata pada taraf kepercayaan 95% ( $p < 0.05$ ))

Kemampuan susu kedelai terfermentasi yang diinokulasi dengan isolat *L. plantarum* 1 R.11.1.2 dalam mengikat natrium taurokolat sebesar 1.40  $\mu$ mol/100 mg protein (62.26%). Angka ini sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan kemampuan susu kedelai dalam mengikat natrium taurokolat 1.33  $\mu$ mol/100 mg protein (59.04%). Peningkatan yang terjadi hanya sebesar 5.3%. Selama proses fermentasi terjadi hidrolisa protein menjadi peptida oleh protease yang dihasilkan oleh isolat tersebut. Sebagian dari peptida yang dihasilkan diduga mempunyai kemampuan mengikat natrium taurokolat. Hasil penelitian yang dilaporkan oleh Sugano *et al.* (1990) menyatakan bahwa terjadi peningkatan pengikatan natrium taurokolat setelah protein kedelai dihidrolisa oleh protease yang berasal dari *Aspergillus oryzae* dan *Bacillus subtilis* yakni sebesar 0.35%-24.91%. Beragamnya kemampuan produk untuk mengikat natrium taurokolat diduga berkaitan dengan struktur kimia dan sifat ionik dari peptida yang dihasilkan oleh proses hidrolisa enzimatis. Protease mempunyai spesifisitas yang berbeda sehingga peptida yang dihasilkan juga akan berbeda. Zhong *et al.* (2007<sup>b</sup>) menyatakan bahwa pola pemecahan dan derajat hidrolisa berpengaruh terhadap produksi peptida bioaktif. Peptida yang bersifat hipokolesterolemik umumnya mempunyai susunan asam amino yang spesifik yakni mengandung asam amino hidrofobik pada terminal-N.

Kecilnya peningkatan garam empedu oleh susu kedelai setelah difermentasi oleh isolat *L. plantarum* 1 R.11.1.2 kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor antara lain spesifisitas dari protease yang dihasilkan oleh isolat bakteri

asam laktat kemungkinan tidak sepenuhnya dapat menghidrolisa protein menjadi peptida bioaktif atau aktivitas protease dari isolat bakteri asam laktat yang tidak optimal. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengkarakterisasi protease yang dihasilkan oleh isolat bakteri asam laktat proteolitik sehingga diketahui karakter dan spesifisitasnya dalam menghidrolisa protein.

Penambahan enzim protease spesifik asam amino hidrofobik (thermolysin) pada susu kedelai terfermentasi dapat meningkatkan kemampuan dalam mengikat natrium tauroklat. Thermolysin mempunyai aktifitas spesifik yakni dapat menghidrolisa ikatan peptida dan menghasilkan peptida dengan asam amino hidrofobik pada terminal-N. Bark *et al.* (2001) menyatakan bahwa thermolysin menghidrolisa ikatan peptida pada asam-asam amino hidrofobik terutama fenilalanin, valin, leusin dan soleusin.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa produk hidrolisa dari susu kedelai terfermentasi yang mempunyai berat molekul <7 kDa mampu mengikat natrium tauroklat sebesar 1.51  $\mu\text{mol}/100$  mg protein (67.4%). Terjadi peningkatan pengikatan yang signifikan yakni sebesar 7.9% dari produk fermentasi atau meningkat 13.5% dari susu kedelai, sedangkan peptida yang berukuran  $\geq 7$  kDa tidak menunjukkan peningkatan pengikatan terhadap natrium tauroklat (Gambar 1). Berdasarkan data tersebut diketahui produk yang mengandung peptida berukuran kecil (<7 kDa) mempunyai kemampuan lebih besar dalam mengikat natrium tauroklat dibanding produk yang mengandung peptida dengan berat molekul lebih besar ( $\geq 7$  kDa). Hasil ini sejalan dengan pernyataan Erdmann *et al.* (2008) yang menyatakan bahwa peptida bioaktif yang bersifat hipokolesterolemik umumnya disusun oleh 2-20 asam amino atau lebih dengan kata lain peptida bioaktif umumnya mempunyai berat molekul kecil. Dari hasil penelitian dapat dikatakan bahwa kemampuan mengikat garam empedu selain dipengaruhi oleh sifat dan susunan asam amino penyusun peptida atau protein serta struktur kimia dari garam empedu juga dipengaruhi oleh besar kecilnya ukuran peptida.

Kemampuan produk hidrolisa enzimatis dari susu kedelai terfermentasi dalam mengikat garam empedu kemungkinan dapat lebih besar jika selama proses hidrolisa oleh thermolysin dilakukan pengendalian pH susu kedelai. Thermolysin yang digunakan dalam penelitian berasal dari *Bacillus stearothermophilus* yang diproduksi oleh Nacalai-Jepang, aktif pada pH 5.0–8.5 namun pH optimumnya adalah 8.0. Proses hidrolisa akan menyebabkan terjadinya perubahan nilai pH sehingga secara tidak langsung akan mempengaruhi aktivitas thermolysin.

Jika dibandingkan dengan kolestiramin (obat yang biasanya digunakan untuk penderita hiperkolesterolemia dengan cara mengikat garam empedu) kemampuan produk fermentasi dan hidrolisa enzimatis dari susu kedelai dalam mengikat garam empedu masih jauh di bawah. Kolestiramin dapat mengikat 11.1  $\mu\text{mol}$  garam empedu/100 mg protein (Kahlon dan Shao, 2004), sedangkan susu kedelai terfermentasi dan produk hidrolisa enzimatis dari susu kedelai terfermentasi (BM <7 kDa) yang dihasilkan dalam penelitian ini hanya mampu mengikat garam empedu 1.40  $\mu\text{mol}/100$  mg protein dan 1.51  $\mu\text{mol}/100$  mg protein. Kemampuan kedua produk tersebut hanya sebesar

12.61 dan 13.60% dari kemampuan kolestiramin. Kemampuan susu kedelai terfermentasi dan produk hidrolisa enzimatis dari susu kedelai terfermentasi dalam mengikat garam empedu setara dengan kemampuan serat pangan yang berasal dari asparagus yakni 13.4%, namun lebih tinggi dibandingkan dengan serat pangan yang berasal dari wortel yang kemampuannya hanya 3.1% dari kemampuan kolestiramin (Kahlon *et al.* 2007).

### Stabilitas pengikatan garam empedu terhadap pepsin dan pankreatin

Uji stabilitas bertujuan untuk mengetahui apakah terjadi penurunan kemampuan produk dalam mengikat garam empedu setelah dihidrolisa oleh enzim pepsin dan pankreatin yang merupakan enzim proteolitik pada saluran pencernaan. Hasil pengujian disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Stabilitas pengikatan natrium tauroklat oleh produk hidrolisa enzimatis BM  $\geq 7$  kDa dan BM <7 kDa

Perlakuan	Natrium Tauroklat yang Terikat ( $\mu\text{mol}/100$ mg Protein)	
	BM $\geq 7$ kDa	BM <7kDa
Susu kedelai terfermentasi+ thermolysin	1.29	1.52
Susu kedelai terfermentasi+ thermolysin + pepsin	1.36	1.54
Susu kedelai terfermentasi+ thermolysin+ pepsin+ pankreatin	1.41	1.58

Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa hidrolisa oleh pepsin dan pankreatin tidak menurunkan kemampuan produk hidrolisa dalam mengikat natrium tauroklat, baik pada produk yang mempunyai berat molekul  $\geq 7$  kDa maupun yang berukuran <7 kDa dengan kata lain produk stabil terhadap hidrolisa pepsin dan pankreatin. Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Yoshie-Stark dan Wäsche (2004) yang menyatakan bahwa hidrolisa isolat protein Lupin oleh pepsin dan pankreatin tidak menurunkan kemampuan isolat protein dalam mengikat garam empedu.

Kemampuan protease untuk menghidrolisa protein dan menghasilkan peptida bioaktif yang bersifat hipokolesterolemik akan mempengaruhi kemampuan produk untuk mengikat natrium tauroklat. Hasil penelitian Sugano *et al.* (1990) dan Zhong *et al.* (2007<sup>b</sup>) menyatakan bahwa peptida yang bersifat hipokolesterolemik mempunyai asam amino hidrofobik pada terminal-N. Pepsin dan pankreatin tidak spesifik menghidrolisa asam amino hidrofobik pada terminal-N, sehingga aktivitas peptida tersebut tidak terpengaruh. Oleh karena itu, meskipun terjadi hidrolisa dan peningkatan jumlah peptida karena hidrolisa oleh pepsin dan pankreatin, namun ternyata tidak berpengaruh secara signifikan terhadap kemampuan produk untuk mengikat natrium tauroklat.

## KESIMPULAN

Produk hidrolisa enzimatis dari susu kedelai terfermentasi yang mempunyai berat molekul <7 kDa mempunyai kemampuan lebih besar dalam mengikat natrium tauroklat

dibanding susu kedelai dan susu kedelai terfermentasi. Natrium taurokolat yang terikat pada susu kedelai adalah sebesar 1.33  $\mu\text{mol}/100\text{ mg}$  protein, sedangkan susu kedelai terfermentasi dapat mengikat natrium taurokolat sebesar 1.40  $\mu\text{mol}/100\text{ mg}$  protein. Kemampuan produk hidrolisa enzimatis dari susu kedelai terfermentasi yang mempunyai BM <7 kDa untuk mengikat natrium taurokolat lebih tinggi yakni 1.51  $\mu\text{mol}/100\text{mg}$  protein. Kemampuan pengikatan natrium taurokolat oleh produk hidrolisat stabil terhadap hidrolisa oleh enzim pencernaan (pepsin dan pankreatin).

## DAFTAR PUSTAKA

- Bark SJ, Muster N, Yates JR, Siuzdak G. 2001. High-temperature protein mass mapping using a thermophilic protease. *J Am Chem Soc* 123: 1774-1775. DOI: [10.1021/ja002909n](https://doi.org/10.1021/ja002909n).
- Erdmann K, Cheung BWY, Schröder H. 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular diseases. *J Nutr Biochem* 19: 643-645. DOI: [10.1016/j.jnutbio.2007.11.010](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.11.010).
- Gibbs FB, Zougman A, Masse R, Mulligan C. 2004. Production and characterization of bioactive peptide from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Res Int* 37: 123-131. DOI: [10.1016/j.foodres.2003.09.010](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2003.09.010).
- Kahlon TS, Woodruff CL. 2002. *In vitro* binding of bile acids by soy protein, pinto beans, black beans and wheat gluten. *Food Chem* 79: 425-429. DOI: [10.1016/S0308-8146\(02\)00192-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00192-9).
- Kahlon TS, Shao Q. 2004. *In vitro* binding of bile acids by soy (*Glycine max*), black eye bean (*Vigna unguiculata*), garbanzo (*Cicer arietinum*) and lima bean (*Phaseolus lunatus*). *Food Chem* 86: 435-440. DOI: [10.1016/j.foodchem.2003.09.018](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.018).
- Kahlon TS, Chapman MH, Smith GE. 2007. *In vitro* binding of bile acids by okra, beets, asparagus, eggplant, turnips, green beans, carrots and cauli flower. *Food Chem* 103: 676-680. DOI: [10.1016/j.foodchem.2006.07.056](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.056).
- Kwon DY, Oh SW, Lee JS, Yang HJ, Lee SH, Lee JH, Lee YB, Sohn HS. 2002. Amino acid substitution of hypocholesterolemic peptide originated from glycinin hydrolyzate. *Food Sci Biotechnol* 11: 55-61.
- Nagaoka S, Nakamura A, Shibata H, Kanamaru Y. 2010. Soystatin (VAWWMY), a novel bile acid-binding peptide, decreased micellar solubility and inhibited cholesterol absorption in rats. *Biosci Biotech Bioch* 74: 1738-1741. DOI: [10.1271/bbb.100338](https://doi.org/10.1271/bbb.100338).
- Nisa FZ, Marsono Y, Harmayani E. 2007. Efek hipokolesterolemik susu kedelai fermentasi steril secara *in vitro*. *J Berita Kedokteran Masyarakat* 23: 47-51.
- Pohl T. 1990. Concentration of Protein and Removal of Solute. In: Guideto Protein Purification. Ed. Deutscher, M.P. Academic Press Inc. California.
- Sugano M, Goto S, Yamada Y, Yoshida K, Hashimoto Y, Matsuo T, Kimoto M. 1990. Cholesterol-lowering activity of various undigested fraction of soybean protein in rats. *J Nutr* 120: 977-985.
- Yoshikawa M, Fujita H, Matoba N, Takenaka Y, Yamamoto T, Yamauchi R, Tsuruki H, Takahata K. 2000. Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases. in: A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Compr Rev Food Sci F* 4: 63-78.
- Yoshie-Stark Y, Wäsche A. 2004. *In vitro* binding of bile acids by lupin protein isolates and their hydrolysates. *Food Chem* 88: 179-184. DOI: [10.1016/j.foodchem.2004.01.033](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.033).
- Yoshie-Stark Y, Wada Y, Wäsche A. 2008. Chemical composition, functional properties and bioactivities of rapeseed protein isolat. *Food Chem* 107: 32-39. DOI: [10.1016/j.foodchem.2007.07.061](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.061).
- Yusmarini, Indrati R, Utami T, Marsono Y. 2009. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat proteolitik dari susu kedelai yang terfermentasi spontan. *J Natur Indonesia* 12: 28-33.
- Yusmarini, Indrati R, Utami T, Marsono Y. 2010. Kemampuan susu kedelai yang difermentasi oleh *Lactobacillus plantarum* 1 dalam mengikat garam empedu. *Majalah Farmasi Indonesia* 21: 202-208.
- Zhong F, Liu J, Ma J, Shoemaker CF. 2007<sup>a</sup>. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. *Food Res Int* 40: 661-667. DOI: [10.1016/j.foodres.2006.11.011](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.11.011).
- Zhong F, Zhang X, Ma J, Shoemaker CF. 2007<sup>b</sup>. Fractionation and identification of a novel hypocholesterolemic peptide derived from soy protein Alcalase hydrolysates. *Food Res Int* 40: 756-762. DOI: [10.1016/j.foodres.2007.01.005](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.01.005).