

EFEK HIPOKOLESTEROLEMIK SUSU KEDELAI FERMENTASI STERIL SECARA *IN VITRO*

Fatma Zuhrotun Nisa¹, Y.Marsono², Eni Harmayani²

¹Gizi Kesehatan, FK UGM, Yogyakarta

²Fakultas Teknologi Pertanian, UGM, Yogyakarta

ABSTRACT

Background: High blood cholesterol level is a risk factor of atherosclerosis, a condition causing coronary heart disease, obesity and others. The utilization of live cell like probiotic was proven to reduce cholesterol level in blood. The problem of the utilization of live cell was the low of distribution and difficulty in storage. Should be invented an alternate to produce the product with the same characteristic, that is, by utilization of inactive cell.

Objective: to evaluate the effect of sterilized fermented soymilk on cholesterol reduction *in vitro*, that is the binding of cholesterol by the component of sterilized fermented soymilk.

Method: The ability of sterilized fermented soymilk to bind cholesterol was assayed using inoculation of sterilized fermented soymilk in MRS medium with 0,1% pure cholesterol then was incubated at 37 C for 24 hours. After incubation, the cholesterol level bonded was measured by O-Pthalaldehyd method.

Result: The research has shown that the sterilized fermented soymilk and the fermented milk could bind the cholesterol. The sterilized fermented soymilk could bind the cholesterol the higher than the non sterilized fermented soymilk.

Conclusion: The sterilized fermented soymilk had the ability of cholesterol binding

Keywords: hypocholesterolemic, fermented soymilk

PENDAHULUAN

Kadar kolesterol tinggi dalam darah merupakan faktor risiko timbulnya aterosklerosis yang selanjutnya dapat menyebabkan berbagai penyakit seperti jantung koroner dan stroke. Oleh karena itu, menjaga kadar kolesterol darah pada tingkat yang normal sangat perlu dilakukan untuk menurunkan risiko penyakit jantung koroner. Salah satu upaya menjaga kadar kolesterol darah yaitu dengan mengkonsumsi makanan fungsional sebagai cara yang alami dan lebih ekonomis.

Kedelai secara alami mempunyai kemampuan dalam menurunkan kolesterol dan telah dibuktikan pada beberapa penelitian baik pada manusia maupun pada hewan coba.^{1,2} Diduga bahwa salah satu mekanisme penurunan kolesterol dari kedelai adalah adanya penghambatan penyerapan kolesterol oleh komponen bioaktif yang terdapat dalam kedelai seperti saponin, isoflavin atau potongan-potongan peptida.^{3,4} Susu kedelai terbuat dari ekstrak biji kedelai yang merupakan bahan nabati berprotein tinggi. Susu kedelai kurang begitu disukai karena mengandung *off-flavour* yang sering disebut "langu" kedelai (*beany flavor*). Fermentasi merupakan salah satu upaya yang telah dilakukan dan telah terbukti dapat meningkatkan nilai gizi dan memperbaiki akseptabilitas susu kedelai.^{5,6} Namun penggunaan sel hidup dalam fermentasi susu mempunyai

beberapa kendala baik dalam pengolahan, penyimpanan maupun distribusi, sehingga perlu dilakukan cara lain dalam penggunaan mikroba dalam produk susu kedelai. Penggunaan mikroorganisme dapat memberikan efek menguntungkan dengan dua cara yaitu efek langsung dari sel hidup mikroba dan efek tidak langsung melalui metabolit dari sel tersebut.⁷ Metabolit peptida hasil fermentasi susu (susu asam) bermanfaat bagi kesehatan yaitu dapat menurunkan tekanan darah.⁸ Namun informasi mengenai keterlibatan komponen metabolit yang dihasilkan oleh mikroba selama fermentasi susu kedelai yang berperan dalam menurunkan kolesterol masih sangat terbatas. Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan dipelajari mengenai efek hipokolesterolemik susu kedelai fermentasi yang disterilisasi dengan menguji kemampuannya dalam mengikat kolesterol secara *in vitro*.

BAHAN DAN CARA PENELITIAN

Bahan yang digunakan adalah susu kedelai yang dibuat dengan menggunakan metode ekstraksi seperti yang dilakukan oleh Pusat Pengembangan Teknologi Pangan (Pusbangtepa) Institut Pertanian Bogor (IPB)⁹ dengan sedikit modifikasi. Biji kedelai lokal kering untuk pembuatan susu kedelai dibeli di Pasar Prawirotaman Yogyakarta. Susu skim merek

Lactona dan kultur murni *Lactobacillus bulgaricus* (FNCC 0041), *Streptococcus thermophilus* (FNCC 0040), dan *Lactobacillus* sp. DAD 13 (LD13) diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Pusat Studi Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Kultur stok disimpan dalam gliserol 10% dan skim 10% dengan perbandingan 1:1, lalu dimasukkan dalam tabung ependorf dan disimpan pada suhu -40°C. Subkultur dilakukan setiap kali akan digunakan sebagai kultur kerja yaitu dengan cara menginokulasikan 4 ose dari kultur stok ke dalam media cair *Mann Rogosa Sharpe* (MRS), kemudian diinkubasi selama 24 jam disuhu 37°C.

Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk analisis total protein dengan menggunakan metode Lowry antara lain: larutan Lowry A (10% Na₂CO₃ dalam NaOH 0,5 N), Lowry B (CuSO₄), Lowry C (Kalium tartat 2%), Lowry D (campuran dari Lowry A, Lowry B, dan Lowry C dengan perbandingan 10 : 0,5 : 0,5) dan Lowry E (Folin). Adapun bahan-bahan kimia yang digunakan untuk analisis asimilasi kolesterol antara lain KOH 50%, etanol 95%, hexan, o-pthalaldehid dan asam sulfat pekat, sedangkan bahan kimia untuk analisis kolesterol digesta antara lain aseton, alkohol, asetat anhidrid, dan asam sulfat pekat. Bahan-bahan kimia tersebut diperoleh dari Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM dan Laboratorium Rekayasa Fakultas Teknologi Pangan.

A. Kandungan Protein Terlarut

Protein terlarut ditentukan dengan menggunakan metode Lowry.¹⁰ Prinsip kerja dari metode Lowry adalah reaksi antara protein dengan asam fosfotungstat - fosfomolibdat pada suasana alkalis akan memberikan warna biru yang intensitasnya tergantung pada konsentrasi protein yang ditera. Sebelum dilakukan peneraan, terlebih dahulu dilakukan pengenceran terhadap sampel supaya masuk dalam *range standard protein* yang telah dibuat sebelumnya. Dalam hal ini sampel diencerkan sampai 100 x faktor pengenceran (1 ml ditambah aquades sampai volumenya 100 ml).

B. Pengikatan Kolesterol

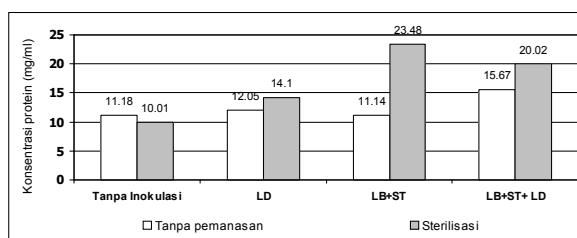
Susu kedelai diinokulasi dengan starter sebanyak 10% (v/v) kemudian diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C. Tiga jenis starter yang digunakan yaitu starter *Lactobacillus* sp. DAD 13, starter yogurt (*S.thermophilus* dan *L.bulgaricus* dengan perbandingan 1: 1), dan campuran dari starter L.DAD

13 dan starter yogurt dengan perbandingan 1:1. Susu kedelai yang telah difermentasi kemudian disterilisasi selama 10 menit pada suhu 115 °C. Setelah itu dilakukan uji asimilasi (pengikatan) kolesterol sebelum dan sesudah fermentasi dan sterilisasi. Uji pengikatan kolesterol dilakukan dengan cara¹¹: 1% sampel yang sudah diinokulasikan ke dalam media MRS disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit, 1 ml supernatan yang dihasilkan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah dengan 3 ml KOH 50%, serta 3 ml etanol 95%. Campuran tersebut kemudian dipanaskan dalam *waterbath* dengan suhu 60°C selama 15 menit. Setelah dingin tambahkan 5 ml heksan dan divortex selama 5-20 menit. Setelah homogen tambahkan 1 ml aquades yang berfungsi untuk memisahkan hasil ekstraksi kolesterol oleh heksan. Ambil 1 ml larutan heksan dan diuapkan dengan gas nitrogen. Setelah menguap tambahkan 2 ml larutan o-pthalaldehid dan didiamkan selama 10 menit. Kemudian tambahkan 1 ml asam sulfat pekat dan divortex. Setelah berubah warna menjadi merah muda kemudian ditera pada panjang gelombang 550 nm. Angka absorbansi yang diperoleh dimasukkan ke dalam persamaan kurva standar untuk memperoleh jumlah konsentrasi kolesterolnya.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Protein Terlarut Susu Kedelai Fermentasi dan Sterilisasi

Kandungan protein terlarut susu kedelai fermentasi dan susu kedelai fermentasi steril dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Grafik Kandungan Protein Terlarut Susu Kedelai Fermentasi dengan LD, LB+ST, LB+ST+LD dan Susu Kedelai Fermentasi Steril

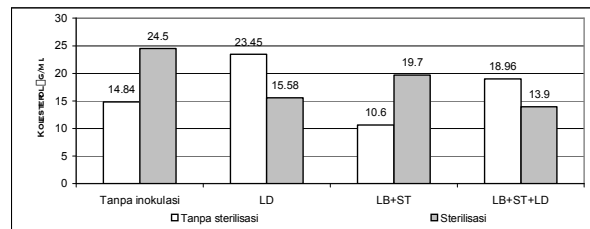
Kandungan protein terlarut pada susu kedelai fermentasi dan sterilisasi untuk semua perlakuan tidak berbeda nyata ($P < 0,05$). Kandungan protein terlarut pada susu kedelai fermentasi dengan bakteri yogurt (LB+ST) lebih rendah dibandingkan susu

kedelai fermentasi dengan LD dan LB+ST+LD. Berdasarkan penelitian ditemukan bahwa kemampuan bakteri yogurt untuk tumbuh dalam media susu kedelai relatif rendah.⁵ Rendahnya pertumbuhan bakteri yogurt dalam susu kedelai menyebabkan jumlah protein yang terhidrolisis juga rendah, sehingga jumlah peptida dan asam amino bebas berkurang. Hal inilah yang menjadi penyebab rendahnya kandungan protein terlarut pada susu kedelai fermentasi dengan LB+ST.

Kandungan protein terlarut pada susu kedelai fermentasi steril untuk semua perlakuan lebih tinggi jika dibandingkan dengan susu kedelai fermentasi. Sterilisasi dapat menyebabkan protein dalam susu kedelai mengalami denaturasi. Denaturasi dapat memecah ikatan hidrofobik protein dan meningkatkan jumlah hidrolisis protein.¹² Susu kedelai fermentasi steril dengan LB+ST mempunyai kandungan protein terlarut lebih tinggi dibandingkan dengan LD dan LB+ST+LD. Kandungan protein terlarut susu kedelai tanpa inokulasi setelah sterilisasi lebih rendah dibandingkan sebelum sterilisasi walaupun tidak beda nyata. Pemanasan dapat menyebabkan terjadinya denaturasi protein. Denaturasi protein ada dua macam yaitu pengembangan molekul protein dan pemecahan ikatan protein¹³ karena tidak mengalami proses fermentasi maka denaturasi yang mungkin terjadi adalah pengembangan molekul protein, sehingga tidak sampai terjadi pemecahan ikatan protein (hidrolisis).

B. Kemampuan Mengikat Kolesterol

Pengujian ini dilakukan atas dasar dugaan mekanisme penurunan kolesterol yang salah satunya adalah penghambatan penyerapan kolesterol dan asam empedu oleh komponen-komponen yang terdapat dalam susu kedelai seperti saponin, isoflavon dan potongan peptida atau asam amino.^{3,4} Walaupun pengujian ini belum sepenuhnya membuktikan dugaan tersebut, namun dapat dijadikan sebagai informasi awal untuk melakukan pembuktian selanjutnya. Jumlah kolesterol yang terikat pada susu kedelai fermentasi dan susu kedelai fermentasi steril dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Grafik Jumlah Kolesterol yang Terikat Susu Kedelai Fermentasi dengan LD, LB+ST, LB+ST+LD dan Susu Kedelai Fermentasi Steril

Jumlah kolesterol terikat pada susu kedelai fermentasi untuk semua perlakuan berbeda nyata ($P < 0,05$). Jumlah kolesterol yang terikat pada susu kedelai fermentasi dengan *Lactobacillus sp.* DAD 13 lebih tinggi yaitu sebesar 23,45 mg/ml dibandingkan dengan susu kedelai fermentasi dengan LB+ST dan susu kedelai fermentasi dengan LB+ST+LD. Hasil yang sama juga telah dilaporkan bahwa isolat *Lactobacillus sp.* DAD 13 mempunyai kemampuan mengikat kolesterol lebih tinggi yaitu sebesar 37,67 mg/ml.¹⁴ Jumlah kolesterol yang terikat pada susu kedelai fermentasi steril berbeda nyata ($P < 0,05$). Jumlah kolesterol yang terikat pada susu kedelai fermentasi dengan LB+ST steril lebih tinggi yaitu sebesar 19,7 mg/ml, dibandingkan dengan susu kedelai fermentasi dengan LD dan susu kedelai fermentasi dengan LB+ST+LD. Hal ini mungkin disebabkan karena perbedaan kandungan metabolit hasil fermentasi susu kedelai oleh bakteri asam laktat. Hal ini terkait dengan kemampuan bakteri dalam menggunakan nutrisi yang ada dalam susu kedelai.

Kemampuan susu kedelai fermentasi steril dalam mengikat kolesterol diduga terkait dengan kandungan metabolit susu kedelai fermentasi. Metabolit hasil fermentasi yang telah terbukti bermanfaat bagi kesehatan adalah metabolit peptida.¹⁵ Pada penelitian dengan hewan coba diketahui bahwa diet asam amino protein kedelai dapat menurunkan kolesterol lebih rendah dibandingkan dengan diet asam amino kasein.¹⁶ Efek penurunan kolesterol oleh protein kedelai diduga karena adanya senyawa yang berikatan dengan protein kedelai ketika protein kedelai mengalami hidrolisis.

Beberapa komponen yang terdapat dalam susu kedelai seperti saponin, isoflavon atau potongan peptida diduga berpengaruh dalam penyerapan kolesterol dan asam empedu dalam usus.⁴ Kandungan saponin pada serat tanaman dilaporkan juga dapat mengikat asam empedu secara *in vitro*.¹⁷

Berdasarkan hasil analisis kandungan protein terlarut yang telah dijelaskan sebelumnya, susu kedelai fermentasi steril dengan *starter* yogurt mengandung protein terlarut lebih tinggi. Dengan demikian komponen yang mungkin mengikat kolesterol adalah protein baik dalam bentuk peptida atau asam amino bebas hasil hidrolisis protein selama fermentasi dan sterilisasi, sedangkan jumlah kolesterol terikat pada susu kedelai sebelum sterilisasi lebih rendah dibandingkan setelah sterilisasi. Hal ini disebabkan oleh denaturasi lapisan nonpolar protein yang dapat membentuk ikatan dengan lipida.¹³ Pengendapan kolesterol dan garam empedu terkonjugasi tergantung pada mediumnya.¹⁸ Pengendapan garam empedu terjadi pada pH kurang dari 6, sedangkan pengendapan kolesterol terjadi pada pH kurang dari 5,5. Berbeda dengan penelitian ini, jumlah kolesterol terikat oleh susu kedelai fermentasi dengan LB+ST lebih rendah dibandingkan pada susu kedelai, walaupun pH susu kedelai fermentasi di bawah 5,5. Hal ini menunjukkan bahwa sebenarnya komponen susu kedelai secara alami mampu mengikat kolesterol.

Berdasarkan jumlah kolesterol yang terikat dapat disimpulkan bahwa susu kedelai fermentasi steril dengan LB+ST mempunyai kemampuan mengikat kolesterol lebih tinggi secara *in vitro* dibandingkan dengan susu kedelai fermentasi steril dengan LD dan susu kedelai fermentasi steril dengan LB+ST+LD.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil uji pengikatan kolesterol diketahui bahwa susu kedelai fermentasi dan susu kedelai fermentasi steril mampu mengikat kolesterol secara *in vitro*. Susu kedelai steril mengikat kolesterol lebih banyak dibandingkan susu kedelai tanpa sterilisasi. Susu kedelai fermentasi dengan *Lactobacillus sp.* DAD 13 (LD) mampu mengikat kolesterol lebih tinggi dibandingkan susu kedelai fermentasi dengan *L.bulgaricus* dan *S.thermophilus* (LB+ST) dan dengan LB+ST+LD, sedangkan susu kedelai fermentasi steril dengan LB+ST mempunyai

kemampuan mengikat kolesterol paling tinggi dibandingkan dengan susu kedelai fermentasi steril dengan LD dan LB+ST+LD.

KEPUSTAKAAN

1. Anderson, J.W., Jhonstone, B.M., and Cook-Newell, M.L. Meta Analysis Effect of Soy Protein on Serum Lipids, N. Engl. J. Med., 1995;333: 276-82
2. Wisaniyasa, N.W., Marsono, Y., Noor, Z. Pengaruh Diet Protein Kedelai Terhadap Profil Lipida Tikus Diabetik Induksi Alloxan, Proseding PATPI.2001.
3. Carroll, K.K. Review of Clinical Studies on Cholesterol-Lowering Response to Soy Protein, J. Am. Diet Ass. 1991;91;820-7.
4. Potter, S.M. Overview of Possible Mechanisms for the Hypocholesterolemic Effect of Soy Perotein, J. Nutr. 1995;125; 606S-611S.
5. Karleskind, D., Laye, I., Halpin, E. dan Morr, C.V., 1991, Improving Acid Production in Soy-Based Yogurt by Adding Cheese Whey Proteins and Mineral Salts, J. Food Sci.1991; 56 (4); 999-1001.
6. Mital, B.K., dan Steinkraus, K.H. Utilization of Oligosaccharides by Lactic Acid Bacteria During Fermentation of Soy Milk, J. Food Sci. 1975;40:114-8.
7. Mitsuoka, T. Taxonomy of Lactic Acid Bacteria and Medical effect of Sour milk Jap, J. Dairy Food Sci. 1976;25: A170-6.
8. Yamamoto, N., Takano, T. Antihypertensive Peptides Derived from Milk Proteins, Nahrung, 1999;43:159-64.
9. Koesworo, S. Susu Kedelai Tidak Kalah dengan Susu Sapi. 1999. <http://www.Indomedia.com/intisari/>
10. Sudarmadji, S., Haryono, B., dan Suhardi. Analisis Bahan Makanan dan Pertanian, Penerbit Liberty, Yogyakarta. 1996.
11. Gilliland, S.E. dan Walker, D.K. Relationship among Bile Tolerance, Bile Salt, Deconjugation and Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*, J. Dairy Sci. 1993;76:956-61.
12. Fenema, O.R. Food Chemistry, Marcell Dekker Inc., New York.1985.
13. Winarno, F.G. Kimia Pangan dan Gizi, PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.1992.

14. Ngatirah. Seleksi Bakteri Asam Laktat sebagai Probiotik yang Berpotensi Menurunkan Kolesterol. Tesis S-2. Program Pascasarjana, UGM, Yogyakarta. 2000.
15. Mitsuoka, T. Significance of Dietary Modification of Intestinal Flora and Intestinal Environment, *Biosci. Mikroflora*. 2000;19:15-25.
16. Tasker, T.E. dan Potter, S.M. Effect of Dietary Protein Source on Plasma Lipid, HMG Coa Reductase Activity, and Hepatic Glutathione Levels in Gerbils, *J. Nutr. Biochem*. 1993;4:458-62.
17. Oekanful, D.G. Saponin in food, A review, *Food Chem*. 1981;7:19-40.
18. Klaver, F.A M., and Meer, R., The Assumed Assimilation of Cholesterol by Lactobacilli and Bifidobacterium bifidum Is Due to Their Bile Salt-Deconjugating Activity, *App. and Enviromental Microbiology*. 1993;59:1120-4.