

EFEKTIVITAS FERMENTASI SUSU KAMBING DENGAN PENAMBAHAN *Lactobacillus rhamnosus* SEBAGAI INHIBITOR TIROSINASE

Fermentation Effectivity of Goat Milk added Lactobacillus rhamnosus as Tyrosinase Inhibitor

Zuraida Hanum^{1,2}, Cece Sumantri³, Purwantiningsih⁴, Irmanida Batubara^{4,5}, dan Epi Taufik³

¹Sekolah Pascasarjana Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor, Bogor

²Fakultas Peternakan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

³Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor, Bogor

⁴Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor, Bogor

⁵Pusat Studi Biofarmaka Institut Pertanian Bogor, Bogor

E-mail: zuraidahanum@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui efektivitas susu kambing fermentasi sebagai inhibitor tirosinase dengan menggunakan *starter Lactobacillus rhamnosus* TW 2 (*L. rhamnosus* TW 2). Pemeriksaan susu segar meliputi kandungan berat jenis, protein, dan lemak. Dalam penelitian ini ditambahkan kultur *starter* bakteri asam laktat *L. rhamnosus* TW 2 dengan konsentrasi 3, 4, dan 5%, diinokulasikan pada susu kambing yang telah dipasteurisasi terlebih dahulu, selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Ekstrak susu fermentasi diperoleh dengan cara disentrifugasi dan supernatan diambil untuk diuji inhibitor tirosinase pada substrat L-tirosin dan L-dopa. Hasil analisis kualitas susu kambing peranakan Etawah diperoleh berat jenis; kadar protein; dan kadar lemak masing masing sebesar 1,028; 3,73; dan 5,45%. Identifikasi ulang pada bakteri asam laktat menunjukkan sifat yang sama dengan bakteri asam laktat hasil isolasi secara morfologi, fisiologis, dan biokimia. Kurva pertumbuhan sebagai *starter* kerja dari *L. rhamnosus* TW 2 diperoleh pada jam ke-12. Pengamatan konsentrasi *starter* terbaik terhadap inhibitor tirosinase ditunjukkan pada konsentrasi 5% pada substrat L-tirosin. Disimpulkan bahwa penggunaan *L. rhamnosus* TW 2 efektif menghambat tirosinase pada konsentrasi penambahan *starter* sebanyak 5%.

Kata kunci: susu kambing, fermentasi, inhibitor tirosinase

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effectivity of goat milk fermentation as tyrosinase inhibitory with *Lactobacillus rhamnosus* TW 2. The examination of fresh milk contained the density, protein, and fat content. The culture of *Lactobacillus rhamnosus* TW 2 acid lactic bacteria *starter* was added with the concentration of 3, 4, and 5%, inoculated in pasteurized goat milk, then incubated at 37° C for 24 hours. Fermented milk were extracted by centrifugation, then supernatant was collected and was used for inhibition of tyrosinase enzymes activity on L-tyrosin and L-dopa substrate. The result showed that the density, fat content, and protein content of Etawah crossbred goat milk are 1.028, 3.73, and 5.45%, respectively. Re-identification of lactic acid bacteria showed similar morphology, physiology, and bio-chemistry with the isolated lactic acid bacteria. The growth curve of TW 2 was observed in 12 hours. The 5 % of *Lactobacillus rhamnosus* TW 2 was the best concentration to inhibit tyrosinase activity in L-Tyrosin substrate. In conclusion, fermentation of goat milk using *Lactobacillus rhamnosus* TW 2 at concentration of 5% as *starter* is effective to inhibit tyrosinase activity significantly.

Key words: goat milk, fermentation, tyrosinase inhibitory

PENDAHULUAN

Proses pembentukan melanin pada tubuh manusia dapat direduksi dengan beberapa mekanisme, seperti inhibitor enzim tirosinase, anti-oksidan, dan aktivitas hormonal. Tirosinase adalah enzim yang dapat mengatalisis sintesis melanin di dalam melanosit. Enzim tirosinase menggunakan molekul oksigen untuk mengatalisis reaksi hidroksilasi tirosin dan oksidasi 3,4-dihydroxyphenylalanine/L-dopa menjadi *dopaquinone*. Inhibitor enzim tirosinase dapat diperoleh dari senyawa sintetik ataupun dari bahan alam yang dikembangkan sebagai bahan sediaan kosmetik (Sulaimon dan Kitchell, 2003).

Penggunaan bahan sediaan kosmetik sintetik selain menghambat melanin, juga berdampak negatif terhadap inaktivasi dari kultur sel yang memproduksi melanin, sehingga pemakaiannya sudah dilarang. Bahan-bahan alam mulai dikembangkan dalam sediaan kosmetik sebagai inhibitor melanin karena aman bagi kulit dan tidak menimbulkan efek samping. Fermentasi susu untuk

kulit, berhubungan dengan pengobatan pada luka dan luka bakar, dan saat ini mulai berkembang luas sebagai material pembuatan kosmetik (Baba *et al.*, 2006). Fermentasi susu dengan menggunakan *Lactobacillus helveticus*, menghasilkan susu yang mampu memberikan efek kelembapan pada kulit. Selain itu, bakteri asam laktat pada ekstrak kedelai memberi efek menghambat melanogenesis yang telah dicoba pada kultur sel B16F0 melanosit (Chen *et al.*, 2012).

Di Indonesia, kambing perah merupakan komoditas peternakan yang memiliki prospek pengembangan yang baik. Kambing perah dapat berperan ganda sebagai penghasil susu dan daging. Selain itu, ditinjau dari kebutuhan investasi, usaha kambing perah memerlukan investasi yang jauh lebih kecil dibandingkan sapi perah. Susu kambing mempunyai globula yang lebih kecil, terhomogenisasi lebih lama sehingga tidak mudah rusak (Sunarlim dan Setiyanto, 2008). Ketertarikan konsumen terhadap susu kambing dewasa ini terutama karena susu kambing diyakini memiliki banyak manfaat baik dari segi kesehatan maupun kecantikan.

Pemanfaatan fermentasi susu kambing sebagai sediaan kosmetik dengan menggunakan bakteri asam laktat spesies tertentu masih sangat terbatas, sehingga perlu dikaji lebih mendalam pemanfaatannya. Penelitian ini bertujuan mengetahui efektivitas fermentasi susu kambing sebagai inhibitor melanin secara enzimatik dengan menggunakan *starter Lactobacillus rhamnosus* TW 2 (*L. rhamnosus* TW 2).

MATERI DAN METODE

Susu kambing yang digunakan berasal dari kambing peranakan Etawah (PE). Susu kambing diperoleh dari Koperasi Daya Mitra Primata, Desa Cikarawang, Kecamatan Dramaga, Bogor. Susu kambing yang digunakan pada penelitian ini merupakan susu segar yang diperoleh dari pemerahan pada pagi hari. Susu dikemas dalam plastik *high density polyethylene* (HDPE) selama pengangkutan dari tempat pemerahan. Susu dianalisis kandungan awal berupa berat jenis, protein, lemak, dan susu dipasteurisasi pada suhu 85° C selama 30 menit sebelum dilakukan fermentasi.

Fermentasi Susu

Fermentasi susu menggunakan isolat bakteri asam laktat yaitu *L. rhamnosus* TW 2. Bakteri ini telah diisolasi Setyawandani (2012), dari susu kambing PE yang berasal dari Koperasi Daya Mitra Primata, Desa Cikarawang, Kecamatan Dramaga, Bogor. Bakteri asam laktat diidentifikasi secara morfologi, fisiologis, dan biokimia sebagai kultur *starter* probiotik.

Penelitian ini juga mengidentifikasi kembali karakteristik secara morfologi (pewarnaan Gram), identifikasi fisiologis (uji ketahanan terhadap suhu, uji ketahanan terhadap garam, dan uji pH), dan identifikasi kimiawi (uji katalase). Populasi bakteri asam laktat terlebih dahulu dihitung jumlah koloninya dan diukur waktu inkubasi/jam sampai 48 jam untuk menentukan *starter* kerja yang digunakan pada proses fermentasi. Kultur bakteri asam laktat yang ditambahkan untuk proses fermentasi sebanyak 3, 4, dan 5% dengan waktu inkubasi 24 jam. Selanjutnya, dilakukan perhitungan total populasi bakteri asam laktat, pengukuran total asam laktat, pengukuran kadar protein, dan pengukuran kadar lemak.

Uji Populasi Bakteri Asam Laktat-Metode Tuang (Pour Plate)

Sebanyak 1 ml sampel yang telah diencerkan, dimasukkan ke dalam cawan petri, dituangkan media agar cair *deMan Rogosa Sharpe Agar* (MRSA) pada suhu 44-46° C sebanyak 15-20 ml untuk setiap cawan petri. Penuangan media agar pada cawan petri maksimum 15 menit setelah penuangan sampel dalam cawan petri. Media dicampur merata dengan cara menggoyang cawan petri mengikuti arah angka delapan. Setelah media agar memadat, cawan petri dimasukkan ke dalam inkubator dan diletakkan dalam posisi terbalik. Inkubasi pada suhu 32° C selama 48±3 jam (Sudarwanto, 2012).

Pengukuran Kadar Protein

Pengukuran kadar protein berdasarkan petunjuk Sudarwanto (2012), dengan menggunakan sampel susu sebanyak 10 ml (duplo) yang dimasukkan ke dalam wadah steril. Selanjutnya, dimasukkan kalium oksalat dan *phenolphthalein* 3 tetes, dilakukan titrasi dengan menambahkan 2 tetes formalin, dititrasi dengan NaOH sampai larutan berwarna merah muda.

Pengukuran Kadar Lemak

Kadar lemak diukur dengan menggunakan metode Gerber menggunakan sampel sebanyak 10 ml dan asam sulfat pekat 91% sebanyak 10 ml. Lemak mencair, dan melalui proses sentrifugasi akan terpisah dari bahan kering tanpa lemak di dalam butirometer. Penambahan amil alkohol sebanyak 1 ml memudahkan terjadinya pemisahan sebelum dipanaskan dalam penangas air. Lemak susu yang terpisah dibaca pada skala tabung sebagai kadar lemak (Sudarwanto, 2012).

Prosedur Uji Total Asam Metode Acidi-alkalimetri

Sebanyak 15 ml sampel ditambah 2-3 tetes indikator *phenolphthalein* 1% kemudian dititrasi menggunakan larutan NaOH 0,1 N sampai titik akhir titrasi tercapai, yaitu terbentuk warna merah muda tetap. Total asam (w/v) dihitung sebagai persen asam laktat (Fardiaz, 1992).

Ekstraksi Susu

Susu fermentasi sebanyak 10 g dihomogenkan dengan 2,5 ml dH₂O, pH susu fermentasi diturunkan dengan HCL 0,1 M hingga mencapai pH 4,0. Susu fermentasi kemudian dipanaskan dengan *waterbath* (45° C) selama 10 menit diikuti dengan sentrifugasi dengan kecepatan 5.000 grav selama 10 menit. Supernatan diambil dan ditambahkan NaOH sehingga pH menjadi 7. Supernatan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 5000 grav selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh diambil dan disaring (*millipore millex* 0,45 µm), selanjutnya disimpan pada suhu -20° C untuk analisis (Shabboo dan Baba, 2011).

Pengukuran Inhibitor Tirosinase

Sampel susu yang sudah diekstraksi diuji langsung pada *multiplate*. Asam kojat digunakan sebagai kontrol positif. Sebanyak 70 µl dari masing-masing ekstrak ini ditambahkan dengan 30 µl enzim tirosinase (Sigma 333 unit/ml dalam bufer fosfat). Selanjutnya, dilakukan inkubasi pada suhu kamar selama lima menit. Kemudian ditambahkan 110 µl substrat (2 mM L-tirosin atau 12 mM L-dopa) ke dalam tiap lubang *multiplate*, campuran diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Campuran diukur menggunakan *multiplate reader* pada panjang gelombang 492 nm (Batubara *et al.*, 2010).

Analisis Data

Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dan dilakukan analisis data secara analisis varian dan dilanjutkan dengan uji Tukey.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan kualitas susu kambing yang digunakan disajikan pada Tabel 1. Data yang diperoleh pada Tabel 1 terkait kandungan berat jenis dari susu kambing yang digunakan sesuai dengan TAS (2008), sehingga susu yang digunakan dalam penelitian ini telah memenuhi syarat susu kambing segar. Pengukuran berat jenis susu berdasarkan periode laktasi yang dilakukan oleh Fitriyanto *et al.* (2013), menunjukkan bahwa angka periode awal laktasi 1,0291, periode puncak laktasi 1,0290 dan periode akhir laktasi 1,0284. Dari data yang diperoleh, susu kambing PE yang digunakan diambil pada akhir laktasi.

Persentase protein dan lemak dalam penelitian ini masing-masing adalah 3,725 dan lemak 6,450%. Berdasarkan TAS (2008), susu kambing segar yang digunakan pada penelitian telah memenuhi standar yang ditetapkan. Persentase protein dan lemak dari susu yang digunakan tergolong sangat baik (premium). Hasil identifikasi dari bakteri asam laktat yang digunakan disajikan pada Tabel 2.

Berdasarkan identifikasi yang dilakukan sifat probiotik dari bakteri asam laktat yang digunakan masih sama dengan yang diisolasi oleh Setyawandani (2012). Pada penelitian dilakukan perhitungan populasi awal mikrob dan diperoleh hasil populasi *L. rhamnosus* TW 2 sebesar $3,1 \times 10^9$ cfu/ml. Jumlah minimum keberadaan bakteri asam laktat dalam produk fermentasi 10^8 cfu/ml (Sunarlim dan Setiyanto, 2008). Isolat yang digunakan dalam penelitian masih mempunyai viabilitas sel yang cukup tinggi sebesar 10^9

cfu/ml sehingga layak untuk digunakan dalam pengembangan produk fermentasi.

Setelah susu dipasteurisasi, susu diberikan perlakuan penambahan bakteri asam laktat *L. rhamnosus* TW 2 sebanyak 3, 4, dan 5%, diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Pengamatan dilakukan terhadap populasi dari bakteri asam laktat, total asam laktat (TAT), kadar protein (%), dan kadar lemak (%) disajikan pada Tabel 3.

Berdasarkan hasil pengamatan yang diperoleh pada susu kambing telah difermentasi dengan bakteri asam laktat *L. rhamnosus* TW 2, populasi bakteri asam laktat pada Tabel 3 sebesar 10^9 cfu/ml pada *L. rhamnosus* TW 2. Menurut Fitriyanto *et al.* (2013), populasi bakteri asam laktat sangat memengaruhi kualitas dari produk yang akan dihasilkan. Jumlah minimum keberadaan bakteri asam laktat dalam produk fermentasi adalah 10^7 cfu/ml. Populasi bakteri asam laktat dalam penelitian ini telah memenuhi standar. Penurunan kadar protein pada susu fermentasi disebabkan adanya aktivitas katabolisme bakteri asam laktat yang memecah protein menjadi peptida.

Pada Tabel 3 menunjukkan peningkatan kadar lemak dari susu kambing segar sebesar 1,22%. Hal ini disebabkan karena jumlah butiran lemak dalam susu kambing memiliki diameter yang lebih kecil dan homogen dibandingkan dengan susu sapi, sehingga selama proses fermentasi akan meningkatkan jumlah kadar lemak. Akan tetapi, pada susu yang difermentasi dengan bakteri asam laktat terjadi penurunan. Menurut Sunarlim dan Setiyanto (2008), hal ini terjadi karena adanya peningkatan asam laktat akibat proses

Tabel 1. Kualitas susu kambing

Pengamatan	Hasil analisis	Standar total asam laktat 6006 (2008)		
		Premium	Baik	Standar
Berat Jenis	1,0285±0,01			>1,028
Protein (%)	3,73±0,02	>3,7	> 3,4-3,7	3,1-3,4
Lemak (%)	6,45±0,17	>4	>3,5-4	3,2-3,5

Tabel 2. Identifikasi morfologi, fisiologis, dan biokimia

Nama Isolat	Gram	Katalase	Suhu (° C)			Kadar garam (%)			pH	
			10	37	45	4	0	6	4,4	7,0
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> TW 2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabel 3. Kualitas susu kambing setelah inkubasi

Sampel	Populasi BAL (cfu/mg)	Analisis		
		TAT (%)	Protein (%)	Lemak (%)
3% <i>Lactobacillus rhamnosus</i> TW 2	$8,3 \times 10^{10a}$	1,01±0,02 ^a	5,65±0,03 ^a	7,99 ±0,03 ^a
4% <i>Lactobacillus rhamnosus</i> TW 2	$6,5 \times 10^{8b}$	1,13±0,07 ^a	5,65 ±0,04 ^a	7,49±0,02 ^b
5% <i>Lactobacillus rhamnosus</i> TW 2	$9,3^a \times 10^{9c}$	1,29±0,07 ^b	5,16 ±0,0 ^b	7,21±0,0 ^c

^{a, b, c}Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05). BAL= Bakteri asam laktat, TAT= Total asam laktat

Tabel 4. Aktivitas penghambatan enzim tirosinase (%)

Ekstrak	Inhibitor tirosinase (%)	
	L-tirosin	L-dopa
3% <i>Lactobacillus rhamnosus</i> TW 2	35,101±0,364 ^a	20,491±0,630 ^a
4% <i>Lactobacillus rhamnosus</i> TW 2	42,239±0,147 ^a	44,530±0,224 ^a
5% <i>Lactobacillus rhamnosus</i> TW 2	82,323 ±1,139 ^b	51,018±1,221 ^b
Asam kojat (31,25 ppm)	66,977	33,303

^{a, b, c}Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

fermentasi oleh bakteri asam laktat yang memiliki aktivitas lipolitik untuk mereduksi lemak susu sehingga kadar lemak menurun.

Aktivitas Inhibitor Tirosinase

Hasil perlakuan yang dilakukan terhadap fermentasi susu kambing menggunakan isolat *L. rhamnosus* TW 2, dengan konsentrasi sebesar 3, 4, dan 5% disajikan pada Tabel 4.

Hasil pengamatan menunjukkan, perlakuan konsentrasi penggunaan bakteri asam laktat sangat berpengaruh terhadap aktivitas inhibitor tirosinase, penambahan *L. rhamnosus* TW 2 sebesar 3 dan 4% tidak mempunyai pengaruh, ketika konsentrasi ditambahkan sebesar 5% maka laju aktivitas penghambatan menunjukkan perbedaan yang nyata. Penambahan *L. rhamnosus* TW 2 pada konsentrasi 5% menghasilkan sejumlah asam laktat yang mempunyai kemampuan aktivitas inhibitor tirosinase yang pada substrat L-tirosin (monofenol) dan substrat L-dopa (difenol).

Tirosinase merupakan enzim mono-oksigenase yang berperan sebagai katalisator pada reaksi hidrosilaksi monofenol menjadi bentuk difenol (monofenolase) dan oksidasi difenol menjadi kuinon (difenolase). Tirosinase memainkan peranan penting dalam pembentukan melanin selama proses melanogenesis karena kemampuannya menghidrosilasi L-tirosin (monofenol) menjadi L-dopa (difenol) dan mengoksidasi L-dopa menjadi dopakuinon (senyawa kuinon). Dopakuinon yang terbentuk akan bereaksi secara spontan membentuk dopakrom. Peran tirosinase dalam proses melanogenesis terjadi karena tirosinase memiliki gugus tembaga (Cu) yang merupakan *active site* yang dapat berkaitan dengan substrat pada proses pembentukan melanin (Ramsden dan Riley, 2010). Chen *et al.* (2006) menyatakan tiga mekanisme dalam reaksi pemutih, yaitu secara langsung mereduksi melanin, menghambat aktivitas melanin dan menekan pembentukan tirosinase.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa pemakaian *Lactobacillus rhamnosus* TW 2 pada konsentrasi 5% memberikan hasil signifikan sebagai inhibitor tirosinase.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr. Ir. Triana Setyawardani, M.Si atas izin penggunaan isolat bakteri asam laktat *L. rhamnosus* TW 2, yang merupakan hasil isolasi dari susu kambing pada tahun 2012 dan digunakan pengembangannya dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Baba, H., A. Masuyama, and T. Takano. 2006. Short communication: Effect of *Lactobacillus helveticus* fermented milk on the differentiation of cultured normal human epidermal keratinocytes. **J. Dairy Sci.** 89:2072-2075.
- Batubara, I., L.K. Darusman, T. Mitsunaga, M. Rahminiwati, and E. Djauhari. 2010. Potency of Indonesia medicinal plants as tyrosinase inhibitors and antioxidant agent. **J. Biol. Sci.** 10:138-144.
- Chen Y.M., W.S. Tsung, P.C. Chihwei, M.P. Tzu, and Y.T. Tsung. 2012. Effects of lactic acid bacteria-fermented soy milk on melanogenesis in B16F0 melanocytes. **J. Functional Foods.** 30:1-11.
- Chen, M.J., J.R. Liu, J.F. Sheu, C.W. Lin, and C.L. Chuang. 2006. Study of skin care properties of milk kefir whey. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.** 19:905-908.
- Fardiaz, S. 1992. **Mikrobiologi Pengolahan Pangan Lanjut.** PAU Pangan dan Gizi IPB, Bogor.
- Fitriyanto, Y.A. Triana, dan U. Sri. 2013. Kajian viskositas dan berat jenis susu kambing peranakan Etawah (PE) pada awal, puncak, dan akhir laktasi. **J. Ilmiah Peternakan.** 1:299-306.
- Ramsden, C.A. and A.R. Patrick. 2010. Mechanistic studies of tyrosinase suicide inactivation. **Special issues Reviews and Accounts.** 12:260-274.
- Setyawardani, T. 2012. Karakteristik dan Pemanfaatan Bakteri Asam Laktat Asal Susu Kambing untuk Pembuatan Keju dengan Sifat Probiotik. **Disertasi.** Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Shabboo, A. and A.S. Baba. 2011. Changes in yogurt fermentation characteristics, and antioxidant potential and in vitro inhibition of angiotensin-1 converting enzyme upon the inclusion of peppermint, dill and basil. **LWT- Food Sci. Technol.** 44:1454-1458.
- Sudarwanto, M. 2012. **Pemeriksaan Susu dan Produk Olahannya.** Buku Pegangan. IPB Press, Bogor.
- Sulaimon, S.S. and B.E. Kitchell. 2003. The biology of melanocytes. **Vet. Dermatol.** 14:57-65.
- Sunarlim, R. dan H. Setiyanto. 2008. Pengaruh kombinasi *Lactobacillus acidophilus* dengan starter yoghurt (*Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*) terhadap mutu susu fermentasi. **Prosiding Seminar Nasional "Inovasi Teknologi Mendukung Pengembangan Agribisnis Peternakan Ramah Lingkungan. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner"**. Bogor:317-326.
- TAS. Thailand Agricultural Standard. 2008. **Raw Goat Milk.** National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards 6006, Bangkok.