

PENGARUH CaCl_2 SEBAGAI *CROSS LINKED AGENT* TERHADAP SIFAT FISIK DAN KIMIA EDIBLE FILM PROTEIN WHEY

The Effect of CaCl_2 as The Cross Linked Agent on Physic and Chemistry Properties of Whey Protein Edible Film

Manik Eirry Sawitri¹, Abdul Manab¹, Siti Khoirul Zanah²

diterima 11 Februari 2008; diterima pasca revisi 25 Juli 2008
Layak diterbitkan 20 Agustus 2008

¹Program Studi Teknologi Hasil Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Malang

²Alumni Program Studi Teknologi Hasil Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

ABSTRACT

The aim of this research was to know effect percentage CaCl_2 addition as the cross linked agent on physic and chemistry properties of whey protein edible film. The design of this research was completely randomized design, consisted of four treatments: C1 (CaCl_2 0.15%), C2 (CaCl_2 0.20%), C3 (CaCl_2 0.25%) and C4 (CaCl_2 0.30%) which each treatment had three repetitions. The variables were water vapor permeability (wvp), protein solubility, microstructure and electroforetic. The result showed that there was highly significant effect ($P < 0.01$) of the addition CaCl_2 on the wvp and protein solubility. C2 treatment gave lower wvp value and protein solubility. CaCl_2 addition gave structure of edible film look like porous and not flat on its surface. The electroresis look occurred at band more thin with molecular weight 14-18 kDa.

Key words: *edible film whey prtein, CaCl_2 .*

PENDAHULUAN

Edible film merupakan lapisan tipis dan kontinyu yang digunakan untuk melapisi produk (*coating*), diletakkan diantara produk (film) yang berfungsi sebagai *barrier* terhadap transfer massa (misalnya kelembaban, oksigen, lipid, cahaya dan zat terlarut), sebagai *carrier* bahan pangan dan aditif dan atau meningkatkan penanganan produk (McHugh and Krochta, 1994). Salah satu bahan dasar penyusun *edible film* adalah protein whey.

Protein whey sebagai salah satu bahan dasar *edible film* karena terdiri dari beberapa komponen protein yang mempunyai protein globuler dan bersifat labil terhadap panas seperti β -laktoglobulin, α -laktalbumin, bovin serum albumin,

protease-pepton dan imunoglobulin (Damodaran and Paraf, 1997). Adanya protein globuler mengakibatkan film bersifat hidrofил sehingga permeabilitas terhadap uap air tinggi dan film mudah larut, maka dibutuhkan denaturasi panas untuk membuka struktur globuler, merusak ikatan disulfida yang ada agar membentuk ikatan hidrofobik dan disulfida intermolekuler yang baru (Damodaran and Paraf, 1997; Krochta, 1992).

Edible film protein whey dibuat dengan cara mendenaturasi protein whey pada suhu 90°C selama 30 menit, yang sebelumnya diberi penambahan *plasticizer* untuk mengatasi sifat mudah robek film, lipid untuk mengurangi sifat hidrofил dan meningkatkan sifat hidrofob film dan ditambah CaCl_2 sebagai agen *cross linking*.

Didinginkan pada suhu ruang, diatur pHnya dengan HCl atau NaOH, dicetak dan dikeringkan menggunakan oven semivacum berventilasi selama 24 jam. Film yang dihasilkan mempunyai warna transparan, lunak, fleksibel, dan mempunyai sifat penahan aroma dan oksigen yang baik pada RH yang rendah.

Penambahan agen *cross linking* berfungsi untuk memperkuat ikatan disulfida intermolekuler film. Agen *cross linking* film protein whey yang biasa digunakan adalah glutaraldehyd, glyseraldehyd, formaldehyd, gossipol dan tannin dan asam laktat serta CaCl_2 (Marquie, Aymard, Cuq and Guilbert, 1995; Cagri, Ustunol, Osburn and Ryser, 2003). CaCl_2 digunakan untuk meningkatkan *cross linking* ionik dalam film (Cagri *et al.*, 2003), ikatan ini penting untuk membantu meningkatkan gaya kohesi antara ikatan protein yang diperkirakan efektif untuk memperbaiki sifat dari film, sifat *barrier*, kekuatan dan mencegah film larut dalam air (Galiotta, Gioia, Guilbert and Cuq, 1998; Cagri *et al.*, 2003; Marquie, *et al.*, 1995; Brault, 1997). Park, Rhee, Bae and Hettiarachchy (2001) menambahkan bahwa sifat *barrier* kelembaban dalam film protein kedelai dapat ditingkatkan dengan ikatan silang kalsium dan mengatur isoelektrik untuk mengoptimalkan protein.

Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan penelitian tentang penambahan jumlah CaCl_2 yang tepat sebagai agen *cross linking* terhadap sifat fisik dan kimia *edible film* protein whey, yang meliputi *Water Vapor Permeability* (WVP), *Scanning Electron Microscope* (SEM), kelarutan protein, dan Sodium Dodesil Sulfat Elektroforesis Gel Poliakrilamida (SDS-PAGE).

MATERI DAN METODE

Materi Penelitian

Bahan yang digunakan untuk pembuatan *edible film* protein whey adalah whey, akuades, NaOH 0,1N, HCl 0,1 N,

buffer pH 4 dan pH 7, CaCl_2 , dan gliserol. Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain, timbangan analitik, sentrifugator, pH meter, oven, pompa vakum, teflon, desikator, *hot plate* dengan motor stirrer, stirrer, refrigerator,.

Peralatan dan bahan yang digunakan untuk analisis penelitian adalah, mortar porselin berpendingin, seperangkat alat electrophoresis *Bio-Rad* (7045) model *mini-protein 112-D cell*, alat sentrifugasi *Bench top refrigerated microliter centrifuge* model *hettich mikro 22R sentrifuge*, stirrer, vortex, *hamilton syringe* 20 μL dan 50 μL , 0,1 M KCl, 0,04M Tris-base, 1% Triton x-100, alkohol 70%, 1M Tris-HCl (pH 8,8), 1M Tri-HCl (pH 6,8), 30% bis akrilamid, gliserol 50%, glisin, 2-mercaptoetanol, Bromophenol blue 1%, dd H_2O , HCl, SDS 10%, TEMED, APS, Comassie blue stain (R-250), dan marker protein produksi MBI Fermentas dengan berat molekul : 116,0 KD; 66,2 KD; 45,0 KD; 35,0 KD; 25,0 KD; 18,4 KD; dan 14,4 KD.

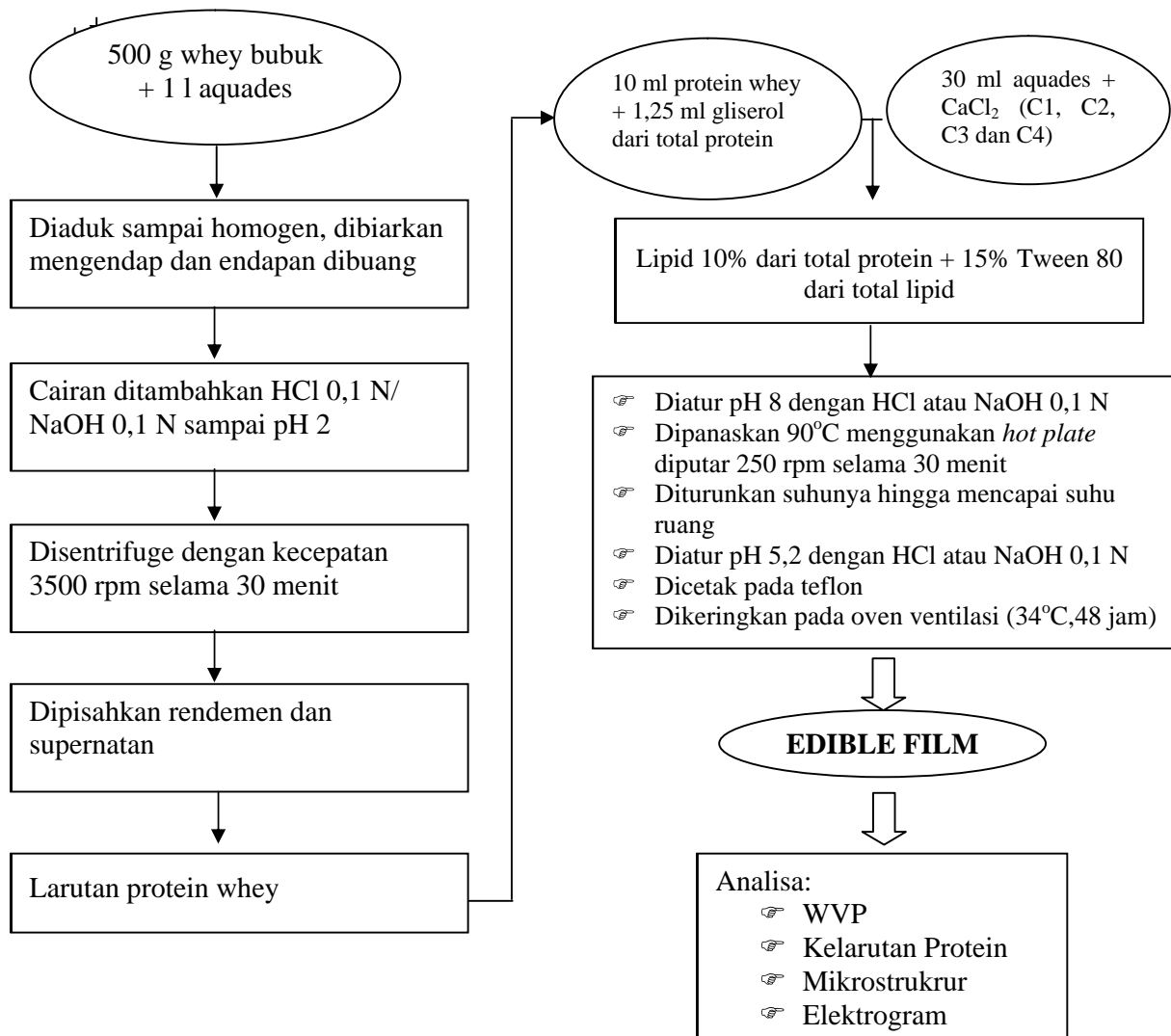
Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan penambahan CaCl_2 dengan tiga ulangan, $C_1 = \text{CaCl}_2$ 0, 15% (b/v), $C_2 = \text{CaCl}_2$ 0, 20% (b/v), $C_3 = \text{CaCl}_2$ 0, 25% (b/v), $C_4 = \text{CaCl}_2$ 0, 30% (b/v). Prosedur pembuatan *edible film* dilakukan menurut Galiotta *et al* (1998). Diagram alir penelitian dapat dilihat pada Gambar 1.

Variabel Penelitian meliputi *Water Vapor Permeability* (WVP) (Perez-Gago and Krochta, 1999). Kelarutan protein (Morr, German, Kinsella, Regenstein, Van Buren, Kilara, Lewis and Mangino, 1985). Mikrostruktur Metode *Scanning Electron Microscope* (SEM) (Montero, Mateos, and Solas, 1997). Profil Protein Metode Sodium Dodesil Sulfat Elektroforesis Gel Poliakrilamida (SDS-PAGE) (Widyarti, 2003).

Analisis data menggunakan analisis peragam, apabila menunjukkan perbedaan, maka dilanjutkan dengan menggunakan Uji

Beda Nyata Terkecil (BNT) (Yitnosumarto, 1993).



Gambar 1. Diagram alir penelitian (Susrini 1995, Galiotta *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 2001; Ruan *et al.*, 1998).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Water Vapor Permeability (WVP)

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa CaCl_2 sebagai agen *crosslink* memberikan perbedaan pengaruh yang sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap WVP film

protein whey. Kadar $-\text{SH}$ reaktif dari β -laktoglobulin kemungkinan meningkat dengan meningkatnya CaCl_2 (Tabel 1), penurunan WVP pada penambahan CaCl_2 0,2% terdapat 3 dugaan, dugaan pertama pada konsentrasi tersebut Ca mereduksi ikatan disulfide (S-S) menjadi ikatan-ikatan

disulfide baru sehingga struktur protein membentuk suatu jaringan yang cukup kuat sehingga transfer uap air menjadi sulit, dugaan kedua adanya *crosslink* ionik antara gugus karboksil yang bermuatan negative berikatan dengan Ca^{2+} sehingga membentuk jembatan garam protein-Ca-protein. *Crosslink* tidak hanya mengurangi pergerakan protein segmental, namun juga kelarutan dalam air, sehingga menurunkan WVP melalui matrik protein (Park *et al.*, 2001). Dugaan ketiga gugus sulfhidril (-SH) protein dengan adanya garam kalsium menjadi lebih reaktif untuk membentuk ikatan disulfida baru. mengakibatkan WVP meningkat lagi, kemungkinan sebagai akibat dari reduksi ikatan disulfida yang berlebihan atau melalui peningkatan reaktifitas gugus -SH tanpa terjadi peningkatan -SH total.

$CaCl_2$ sebagai bahan *crosslink* digunakan untuk meningkatkan resistensi film terhadap air, kohesi, rigiditas, dan kekuatan mekanik. Pembentukan ikatan disulfida, *interchange* sulfhidril dan disulfida, atau *crosslink* protein-Ca-protein berpengaruh terhadap pembentukan gel protein. Ca sangat kuat terikat pada sisi spesifik dari α -laktalbumin, sehingga protein tersebut mengalami perubahan konformasi yang cukup banyak dan stabilitasnya meningkat terhadap panas. Pengikatan Ca ke β -laktoglobulin lemah, peningkatan afinitas Ca ke β -laktoglobulin berkaitan dengan perubahan konformasi dalam β -laktoglobulin sebagai akibat dari perlakuan panas.

Tabel1. Water vapor permeability (g.mm/m².h.kPa)

Perlakuan	WVP
C1 (CaCl ₂ 0,15%)	0,0110 ^a
C2 (CaCl ₂ 0,20%)	0,0089 ^a
C3 (CaCl ₂ 0,25%)	0,0113 ^{ab}
C4 (CaCl ₂ 0,30%)	0,0133 ^b

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata (P<0,01)

Kelarutan Protein

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa $CaCl_2$ tidak memberikan perbedaan pengaruh yang nyata (P>0,05) terhadap kelarutan protein film protein whey (Tabel2). Peningkatan jumlah $CaCl_2$ mengakibatkan matriks film protein whey menjadi lebih kuat akibat adanya *crosslink* protein-Ca-protein (Tabel 5). $CaCl_2$ dapat meningkatkan kadar -SH reaktif dari β -laktoglobulin, sebagai hasil dari reduksi ikatan disulfida atau terpaparnya gugus-SH yang berada di bagian dalam protein. Gugus -SH yang terpapar dapat berperan dalam *interchange* S-S/SH. Interaksi antara Ca dengan β -laktoglobulin kemungkinan melalui pembentukan jembatan garam intramolekuler antar gugus karboksil β -laktoglobulin dengan Ca^{2+} . Dengan demikian, $CaCl_2$ dapat berperan meningkatkan integritas edible film protein whey, sehingga proteinnya tidak mudah larut.

Tabel 2. Kelarutan Protein (%)

Perlakuan	Kelarutan Protein
C1 (CaCl ₂ 0,15%)	38,2666 ^a
C2 (CaCl ₂ 0,20%)	28,3367 ^a
C3 (CaCl ₂ 0,25%)	39,6008 ^{ab}
C4 (CaCl ₂ 0,30%)	31,2430 ^b

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata (P<0,01)

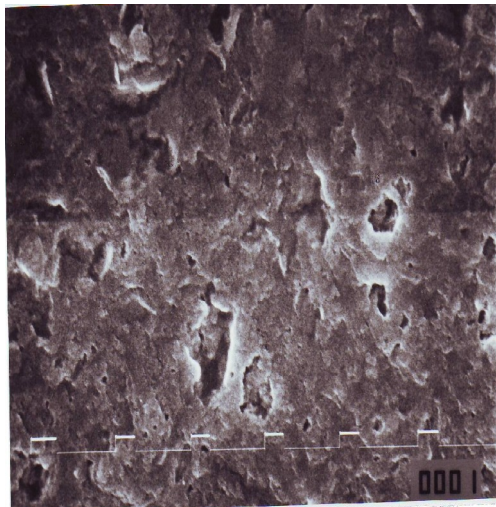
Mikrostruktur

Hasil pengujian mikrostruktur menggunakan SEM terhadap film protein whey dengan penambahan $CaCl_2$ disajikan pada Gambar 2. $CaCl_2$ sebanyak 0,25% menghasilkan edible film protein whey dengan struktur paling halus dan kompak, hasil ini mengindikasikan bahwa $CaCl_2$ 0,25% membantu pembentukan gel protein whey akibat adanya interaksi Ca- α -laktalbumin dan Ca- β -laktoglobulin yang intensif.

Diduga kation divalent kalsium (Ca^{2+}) terikat kuat pada gugus polar protein

untuk membentuk jaringan struktur tiga dimensi yang dapat membentuk ikatan silang antara muatan negative gugus karboksil pada ikatan polipeptida. Park et al (2001) menyatakan bahwa penambahan kalsium klorida pada protein menunjukkan laju penggumpalan yang lebih cepat sehingga film mempunyai struktur yang

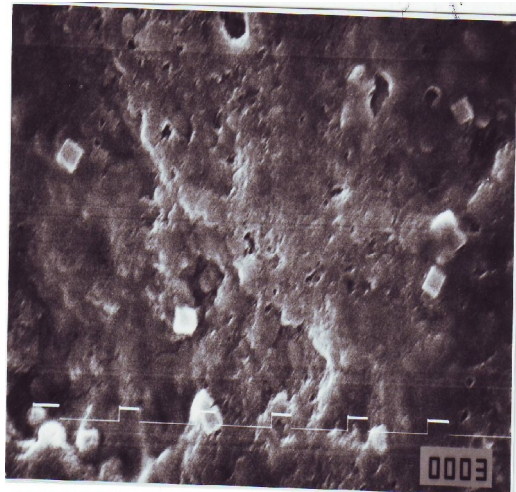
heterogen. Ju and Kilara (1998) menemukan mikrostruktur penggabungan kalsium menyebabkan gel menjadi besar dan tebal dibandingkan tanpa kalsium, dan penggabungan membentuk gumpalan dengan sedikit ikatan.



1.a. CaCl_2 0,15%



1.b. CaCl_2 0,2%



1.c. CaCl_2 0,25%



1.d. CaCl_2 0,3%

Gambar 2. Mikrostruktur Film Protein Whey dengan Penambahan CaCl_2 . Pembesaran 2000x.

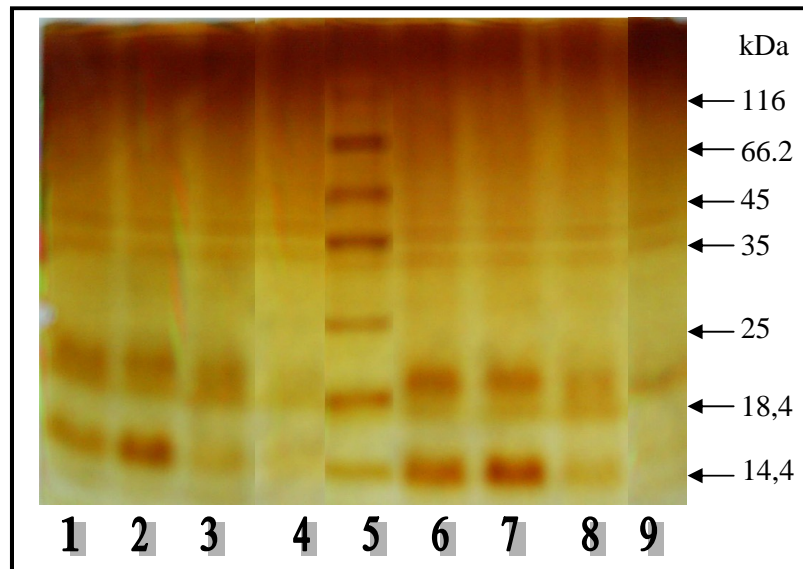
Elektrogram

Berdasarkan elektroforegram pada Gambar 3 diketahui bahwa peningkatan kadar CaCl_2 cenderung meningkatkan berat

molekul protein, hal ini mengindikasikan bahwa Ca berperan dalam pembentukan *crosslink* protein-Ca-protein. Menurut Jerjajah and Allen (1994) Ca bisa terikat

kuat ke α -laktalbumin, sehingga mengakibatkan perubahan konformasi α -laktalbumin dan stabilitasnya terhadap pemanasan mengalami peningkatan. Perlakuan pemanasan mengakibatkan β -laktoglobulin mengalami perubahan konformasi dan peningkatan CaCl_2 akan mengakibatkan kadar gugus $-\text{SH}$ yang

reaktif meningkat sehingga gugus $-\text{SH}$ lebih banyak berada di bagian permukaan sehingga afinitasnya terhadap Ca meningkat. Interaksi Ca^{2+} dengan β -laktoglobulin kemungkinan melalui pembentukan jembatan garam intramolekuler antara gugus karboksil β -laktoglobulin dengan Ca^{2+} .



Gambar 3. Elektroforegram Film Protein Whey dengan Penambahan CaCl_2 sebagai Agen *Crosslink*. Lajur 1,6: CaCl_2 0,3%; Lajur 2,7: CaCl_2 0,2%; Lajur 3,8: CaCl_2 0,15%; Lajur 4,9: CaCl_2 0,25%; Lajur 5: Pemarkah. Elektroforesis dilakukan pada gel poliakrilamida 12,5% dengan pewarnaan Perak Nitrat (AgNO_3).

KESIMPULAN

Penambahan CaCl_2 memberikan pengaruh yang sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap WVP dan kelarutan protein edible film. Penambahan CaCl_2 0,20% menghasilkan WVP dan kelarutan protein terendah, struktur permukaan edible film protein whey lebih kompak. Penebalan pita protein pada berat molekul 14-18 kDa terjadi pada penambahan CaCl_2 0,20% dan 0,30%.

DAFTAR PUSTAKA

- Damodaran, S and Paraf, A. 1997. Food Protein and Their Application. Marcel Dekker Inc. New York
- Galiotta, G., Di Gioia, L. D., S. Guilbert, and B. Cuq. 1998. Mechanical and Thermomechanical Properties of Films Based on Whey Proteins as Affected by Plasticizer and Crosslinking Agents. J. Dairy Sci, Vol. 81: 3132-3130.
- Jerajayah, S. and J.C. Allen. 1994. Calcium Binding and Salt-induced Structural

- Changes of Native and Preheated β -lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* 42:80-85.
- Ju, Z. Y. and A. Kilara. 1998. Aggregation Induced by Calcium Chloride and Subsequent Thermal Gelation of Whey Protein Isolate. *Journal of Dairy Science*, 81:925-931.
- Krochta, J. M. 1992. Control of Mass Transfer in Foods with Edible-Coatings and Films. In Singh, R.P. and Wirakartakusumah, M.A.(Ed). *Advances in Food Engineering*. p. 517-538. CRC Press Inc. London. In Perez-Gago, M.B and Krochta, J.M., 1999. Water Vapour Permeability of Whey Protein Emulsion Film as Affected by pH. *Journal of Food Science*. Vol 64: 695-698
- Marquie, C., C. Aymard, J. L. Cuq, and Guilbert. 1995. Biodegradable Packaging Made from Cottonseed Flour: Formation and Improvement by Chemical Treatment with Gossypol, Formaldehyde and Glutaraldehyde. *J. Agric Food Chem.*, Vol. 43 : 2762-2766. In Galiotta, G., L. Di Gioia, S. Guilbert, and B. Cuq. 1998. Mechanical and Thermomechanical Properties of Films Based on Whey Proteins as Affected by Plasticizer and Crosslinking Agents. *J. Dairy Sci.*, Vol. 81:3132-3130.
- McHugh, T. H. , and J. M. Krochta. 1994 Water Vapor Permeability Properties of edible Whey Protein Lipid Emulsion. *J Am Oil Chem Soc*, Vol. 71:307-312. In Perez-Gago, M. B., and J. M. Krochta, 1999. Water Vapor Permeability of Whey Protein Emulsion Film as Affected by pH. *J. Food Sci.*, Vol. 64(4): 695-698.
- Montero, P., P.M. Mateos and Solas. 1997. Comparison of Different Gelation Methods Using Washed Sardine (*Sardina philcardus*) Mince: Effect of Temperature and Pressure. *J. of Food Scie.* 45: 4613-46126.
- Morr, C. V., B. German, J. E. Kinsella, J. M. Regenstein, J. P. Van Buren, A. Kilara, B.A. Lewis, and M.E. Mangino. 1985. A Collaborative Study to Develop a Standardized Food Protein Solubility Procedure, *J. Food Sci*, Vol. 50: 1715.
- Park, S.K., C.O. Rhee, D.H. Bae and N.S. Hettyarachchy. 2001. Mechanical Properties and Water Vapor Permeability of Soy Protein Films Affected by Calcium Salt and Glucono- δ -lactone. *J. Agric Food Chem.* 49:2308-2312.
- Perez-Gago M. B. and J. M. Krochta. 1999. Water Vapor Permeability of Whey Protein Emulsion Film as Affected by pH. *J. Food Sci*, Vol. 64 (4): 695-698.
- Widyarti, S. 2003. Petunjuk Praktikum Biokimia Teknik. Dalam Susanto, E. 2005. Karakteristik Fraksi Protein Bakso Babi dengan Menggunakan SDS-PAGE. Skripsi Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Yitnosumarto, S. 1993. Percobaan, Perancangan, Analisis dan Interpretasinya. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.