MEKANISME PENGHAMBATAN PRODUK-PRODUK REAKSI MAILLARD (Inhibitory Mechanisms of Maillard Reaction Products)

Laksmi Ambarsari[1], H. M. Mochtar[2]

[1]Jurusan Kimia FMIPA-IPB, [2]Staf Ahli P3GI-Pasuruan

ABSTRACT

To determinine the inhibitory mechanism of antibacterial Maillard reaction products (PRM), heated mixtures containing GL (glukosa-lisin) and TU (molasses-urea) were studied for their effect on uptake oxygen and iron solubility. It was found that the tested PRM had an inhibitory effect on the uptake of oxygen was observed. The PRM also had an effect on the solubility of iron in nutrient broth and in phosphate buffer. While the GL mixture reduced the solubility of iron it was increased by the TU mixture. The present data suggest that the antibacterial effect of the tested PRM is primarily due to the interaction between PRM and iron, resulting in reduced metabolic activity and uptake of nutrients.

PENDAHULUAN

Salah satu masalah paling serius yang menyangkut efisiensi produksi gula di Indonesia adalah kerusakan tebu pada pasca panen. Hasil evaluasi pasca panen terhadap penurunan kualitas tebu di tujuh pabrik gula pada tahun 1992 menunjukkan antara lain: penurunan rendemen rata-rata 2,9 poin, kenaikan kadar dekstran 1392,0 %, kenaikan gula reduksi 144,1 %, kenaikan kadar abu 13,0 %, serta penurunan pH 2,4 % (Mochtar, dkk, 1993).

Kerusakan tebu pada pasca panen antara lain disebabkan oleh aktivitas mikroorganisme yang terdapat di tebu sehingga menyebabkan kehilangan sukrosa (Clarke, 1980). Hal ini biasanya terjadi saat tebu ditebang, luka potong karena pisau yang terkontaminasi serta tebu yang terbakar. Kehilangan sukrosa oleh mikroba disebabkan terbentuknya polisakarida seperti dekstran yang merupakan produk dari aktivitas *Leuconostoc mesenteroides* (Clarke, 1980). Dekstran tidak saja menurunkan kualitas tebu, akan tetapi juga menyebabkan kesukaran dalam prosesing pabrik gula.

Untuk menekan kehilangan sukrosa karena kerusakan tebu selama pasca panen yang efektif yaitu dengan mengolah tebu setelah tebang (di bawah 24 jam setelah tebang) sesegera mungkin, namun adanya permasalahan dalam tebang-angkut, tenaga tebang, dan tebu terbakar menyebabkan penundaan tebu lebih lama, akibatnya kerusakan tebu tidak dapat dihindari. Untuk mengatasi hal tersebut di atas maka digunakan desinfektan, namun hingga saat ini belum ada desinfektan yang dapat digunakan dengan praktis, aman, dan murah. Ravelo *et al.*, 1991 telah menggunakan IFOPOL yang merupakan produk reaksi Maillard, dari tetes bahan tersebut dapat menghambat pembentukan oligo dan polisakarida pada tebu, namun pengembangannya masih dirahasiakan dan hanya berupa paten.

Mochtar dkk, 1997 telah berhasil mensintesis PRM (Produk Reaksi Maillard) yang dibuat dengan memanaskan campuran berbagai asam-asam amino dengan gula reduksi. PRM hasil sintesis tersebut mempunyai sifat biologi yaitu sebagai antibakteri. Hasil penelitian dilaporkan bahwa PRM yang diperoleh dengan memanaskan campuran yang mengandung glukosa dengan lysin (GL) dapat menghambat pertumbuhan bakteri pembentuk asam PSIB-91002 (diidentifikasi sebagai *Bacillus* sp) dan pembentuk polisakarida PSIB-92001 (diidentifikasi sebagai *Pseudomonas* sp) serta menghambat pembentukan gula reduksi, sedangkan campuran glukosa dengan arginin (GA) dapat menghambat pemecahan sukrosa. PRM lainnya yaitu TL (campuran tetes-lysin) dan TU (campuran tetes-urea) juga dilaporkan mempunyai pengaruh dalam menghambat pembentukan gula reduksi, dekstran, dan asam (Mochtar dkk, 1998).

Telah diketahui bahwa dalam reaksi Maillard terbentuk sentawa-senyawa tang dapat menghambat pertumbuhan mikroba, senyawa-senyawa tersebut antara lain furfural, maltol, dan HMF (5-hidroksi metil furfural). Pengaruh furfural telah dipelajari oleh Bhat *et al.*, 1984 dan dilaporkan bahwa produksi asam sitrat pada pembuatan asam sitrat dengan *Aspergillus niger* turun apabila sterilisasi media dilakukan lebih lama dari normal. Juga ditemukan bahwa penambahan HMF ke dalam media yang disterilisasi secara normal mengakibatkan penghambatan yang sama seperti pada HMF yang terbentuk selama sterilisasi. Dinyatakan pula bahwa pengaruh penghambatan PRM tergantung pada jenis PRM dan jenis bakteri yang digunakan, namun mekanisme penghambatan PRM belum banyak diteliti (Einarsson *et al.*, 1983). Secara umum mekanisme penghambatan senyawa-senyawa yang bersifat sebagai antibakteri dibagi dalam tiga kelompok, yaitu: senyawa yang menyerang membran sel, material genetic, dan enzim. PRM yang disintesis (GL, GA, TU, dan TL) hingga saat ini masih belum diketahui mekanisme penghambatannya.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari mekanisme penghambatan PRM sebagai anti bakteri dengan menentukan uji kelarutan besi serta uji pengikatan oksigen oleh bakteri PSIB-92001 dan PSIB-91002.

METODE PENELITIAN

Sintesis Produk Reaksi Maillard (PRM)

Sintesis PRM dilakukan dengan mereaksikan 0,5 M monosakarida (glukosa, gula reduksi dari tetes) dengan 1,0 M asam-asam amino (Lysin, arginin, urea) dalam 500 ml aquadest, pH campuran tersebut diatur 7.0 dengan menambahkan basa atau asam. Campuran di atas kemudian direfluks selama 5, 10, 20, 30 jam; dengan kondisi lingkungan diatur tanpa oksigen dan dengan oksigen, setelah direfluks larutan diukur pada λ 450 nm. Selanjutnya larutan diuapkan dalam vakum dan dikeringkan dalam eksikator. PRM yang didapat disimpan dalam botol berwarna coklat.

Uji Kelarutan Fe (Maccaro, 1961)

Larutan segar 0,02% $FeCl_3$ ditambahkan ke dalam 9 ml nutrient broth (NB) pada pH 7,0 atau pada 9 ml buffer fosfat pH 5,0 dan 8,0. Kemudian ditambahkan PRM hingga konsentrasinya 2 mg/ml, aduk campuran tersebut, biarkan selama 2 jam pada suhu 20 °C hingga terbentuk endapan. Setelah dibiarkan campuran disentrifugasi pada 2000 g selama 15 menit. Filtrat ditampung dan diukur kadar besinya dengan AAS.

Uji Pengikatan Oksigen oleh Bakteri PSIB-92001 dan PSIB-91002 (Lingnert, 1979)

Sel bakteri PSIB-92001 ditumbuhkan dalam medium NB pada suhu 30 °C selama 12-16 jam, kemudian sentrifugasi pada 2000 g selama 15 menit. Pellet yang diperoleh dicuci sebanyak 2 kali dengan 0,05 M buffer fosfat pH 7,0 dan disuspensikan kembali dalam buffer yang sama sehingga mengandung $\pm$ 10^{10} sel/ml. Suspensi tersebut dapat disimpan pada suhu 4 °C dan tahan selama 16 jam sebelum digunakan. Ke dalam tabung reaksi dimasukkan 4,5 ml buffer fosfat (0,05 M; pH: 7,0) dan 4,5 ml 10% glukosa, kemudian tambahkan campuran PRM (5 mg/ml) dan 0,02% $FeCl_3$, segera diaduk hingga kadar oksigen stabil. Suspensi sel selanjutnya disuntikkan ke dalam campuran di atas, konsentrasi oksigen dicatat setelah suspensi sel ditambahkan. Percobaan ini dilakukan dalam dua kali ulangan. Untuk penentuan pengikatan oksigen (*Oxygen uptake*) digunakan *oxygen analyzer WTW*

HASIL DAN PEMBAHASAN

Untuk melihat pengaruh PRM GL dan TU pada kelarutan besi, maka telah dicoba pengaruh PRM tersebut pada bakteri PSIB-92001 yang ditumbuhkan dalam medium NB pH: 7,4 yang mengandung 0,02% $FeCl_3$ (tabel 1). Terlihat bahwa konsentrasi Fe pada kontrol (tanpa penambahan PRM) sebesar 39,55 ppm. Penambahan PRM GL menyebabkan kadar Fe turun menjadi 16,6 ppm, sedangkan penambahan PRM TU menyebabkan kadar Fe naik menjadi 45,79 ppm. Berdasarkan pengamatan di atas, PRM GL maupun TU menunjukkan adanya pengaruh terhadap kelarutan Fe walaupun dalam mekanisme yang berbeda.

Karena kelarutan Fe tergantung pada pH, maka dilakukan percobaan yang sama dengan menggunakan buffer fosfat pada pH 5,0; dan 8,5. Hasil percobaan dapat dilihat pada tabel 2. Pada pH 8,0 penambahan PRM GL menyebabkan kadar Fe turun menjadi 1,08 ppm, sedangkan pada pH 5,0 penambahan PRM GL dan TU menyebabkan kadar Fe meningkat menjadi 4,91 ppm dan 4,49 ppm demikian pula penambahan PRM TU pada pH 8,0 kadar Fe meningkat menjadi 23,00 ppm.

Tabel 1. Pengaruh PRM GL dan TU pada kelarutan Fe dalam medium NB pH: 7,4 yang mengandung 0,02% $FeCl_3$

PRM	Besi terlarut (ppm)	
	PH 7,4	% turun / naik
Tanpa PRM	39,55	
GL	16,66	- 58,00
TU	45,79	+ 15,78

Tabel 2. Pengaruh PRM GL dan TU terhadap kelarutan Fe dalam buffer fosfat pH 5,0 dan 8,0

PRM	Besi terlarut (ppm)	
	pH 5.0	pH 8.0
Buffer	2,23	4,79
BF + GL	4,91	1,08
BF + TU	4,49	23,0

Keterangan :
BF : buffer fosfat

Dalam percobaan ini terlihat bahwa pengaruh pH terhadap kelarutan Fe sangat besar. Pada medium NB pH 7,4 dan larutan Buffer pH 8,0 penambahan PRM GL dapat menurunkan kadar Fe terlarut dengan penurunan masing-masing sebesar 58% dan 77%. Penurunan kadar Fe tersebut disebabkan karena terjadinya interaksi antara PRM dengan Fe sehingga terbentuk endapan PRM-Fe. Hal ini dapat dijelaskan dengan pendekatan mekanisme yang terjadi pada senyawa-senyawa yang mempunyai sifat dapat mengkelat logam seperti EDTA. Sifat tersebut menyebabkan kebutuhan logam untuk pertumbuhan bakteri menjadi berkurang. Hasil penelitian (Bulgarelli dan Shelef, 1985) dilaporkan bahwa EDTA dapat menghambat pertumbuhan *Bacillus cereus* juga adanya EDTA dapat menyebabkan konsentrasi didalam sel menjadi tidak stabil (lebih rendah bila dibandingkan tanpa EDTA). Penelitian yang sama (Einarsson *et al.*, 1987) melaporkan bahwa PRM AX (arginin-silosa) menurunkan kelarutan Fe, sedangkan HG (histidin-glukosa) menaikkan kelarutan Fe. Hasil percobaan di atas juga menunjukkan bahwa penambahan PRM GL dengan kenaikan pH menyebabkan berkurangnya kadar Fe terlarut, hal tersebut dapat dilihat pada tabel 1 dan tabel 2. Pada pH 8,0 penurunan kadar Fe lebih besar bila dibandingkan pada pH 7,4. Berdasarkan pengamatan tersebut dapat disimpulkan bahwa PRM GL mempunyai sifat yang sama seperti EDTA yaitu mempunyai kemampuan untuk mengkelat logam (dalam hal ini adalah Fe), adanya interaksi antara PRM dengan Fe menyebabkan pengikatan nutrisi (dalam hal ini Fe) sehingga mengakibatkan pertumbuhan bakteri PSIB-92001 terhambat. Hal ini sesuai dengan percobaan sebelumnya yaitu PRM GL dapat menghambat pertumbuhan bakteri PSIB-92001 dan PSIB-91002 (Mochtar dkk, 1997).

Pengaruh PRM GL dan TU pada pengikatan oksigen oleh bakteri PSIB-92001 dan PSIB-91002 dapat dilihat pada tabel 3 dan tabel 4.

Untuk mengetahui apakah perlakuan penambahan PRM memberikan hasil yang nyata, maka hasil rata-rata dari perlakuan tersebut dibandingkan dengan hasil rata-rata tanpa penambahan PRM. Ditentukan pula koefisien korelasinya untuk menyatakan korelasi tersebut nyata atau tidak.

Tabel 3. Pengaruh PRM GL dan TU pada pengikatan oksigen oleh bakteri PSIB-92001

Perlakuan	Kadar oksigen (nmol / ml.menit)							
	PRM GL (5 mg / ml)	Tanpa PRM GL	beda	t-test	PRM TU (5 mg / ml)	Tanpa PRM TU	beda	t-test
Media NB	-1066,7	-33,0	-1033,4	31,0**	183,3	400,0	-216,7	13,0**
Glukosa 10%	-816,7	200,0	-1016,7	9999,9**	466,7	416,7	+50	1,73*
Glukosa + Fe	-749,2	224,8	-974,0	29,2**	80,6	257	-176,4	157,5**

Keterangan :
Untuk semua perhitungan statistik tanda * berarti nyata dan ** berarti sangat nyata
T-tabel 0,05; 1,49; 0,01; 2,86.

Tabel 4. Pengaruh PRM GL dan TU pada pengikatan oksigen oleh bakteri PSIB-91002

Perlakuan	Kadar oksigen (nmol / ml.menit)							
	PRM GL (5 mg / ml)	Tanpa PRM GL	beda	t-test	PRM TU (5 mg / ml)	Tanpa PRM TU	beda	t-test
Media NB	-866,7	66,7	-933,4	28 **	316,7	333,3	-16,6	0,50
Glukosa 10%	-766,7	166,7	-933,4	28 **	233,3	350,0	-166,7	7 **
Glukosa + Fe	-150,0	233,3	-383,3	22 **	283,1	206,3	+76,9	4,55**

Keterangan :
Untuk semua perhitungan statistik tanda * berarti nyata dan ** berarti sangat nyata

Pada perlakuan media NB untuk bakteri PSIB-92001 terlihat adanya penurunan kadar oksigen pada penambahan PRM GL dan TU, sedangkan pada PSIB-91002 penurunan kadar oksigen hanya terjadi pada penambahan PRM GL. Hasil uji t menunjukkan perbedaan yang nyata kecuali pada penambahan PRM TU untuk PSIB-91002. Turunnya kadar oksigen tersebut menunjukkan rendahnya pengikatan oksigen oleh bakteri. Dalam hal ini penambahan PRM GL dan TU pada media NB dapat menghambat pernafasan asli bakteri PSIB-92001 dan PSIB-91002, namun PRM GL menunjukkan pengaruh penghambatan yang lebih besar bila dibandingkan PRM TU.

Pada perlakuan penambahan larutan 10% glukosa ke dalam media NB (tanpa penambahan PRM GL), terlihat adanya kenaikan kadar oksigen bila dibandingkan pada perlakuan yang hanya mengandung media NB saja. Pada PSIB-92001 terjadi kenaikan dari –33,3 nmol / ml.menit (media NB) menjadi 200,0 nmol / ml.menit (pada penambahan 10% glukosa), sedangkan pada PSIB-91002 kenaikan kadar oksigen naik dari 66,7 nmol / ml.menit (media NB) menjadi 166,7 nmol / ml.menit (penambahan 10% glukosa). Meningkatnya kadar oksigen ini kemungkinan disebabkan glukosa yang ditambahkan ke dalam media NB dapat berperan sebagai substrat atau merupakan sumber energi yang dapat dimanfaatkan oleh bakteri, sehingga metabolisme oksigen berlangsung dengan baik. Namun penambahan PRM GL menyebabkan berkurangnya pengikatan oksigen oleh bakteri (hasil uji t menunjukkan perbedaan yang nyata), dengan demikian dapat dikatakan bahwa PRM GL menghambat sistem pengikatan glukosa yang diperlukan bakteri yang menyebabkan metabolisme oksigen terganggu. Pengaruh penambahan PTM TU pada percobaan ini menunjukkan penghambatan yang rendah bila dibandingkan penambahan PRM GL, namum mempunyai pola penghambatan yang sama.

Hal yang sama juga terjadi pada larutan yang mengandung 10% glukosa dan 0,02% $FeCl_3$, terlihat adanya kenaikan kadar oksigen pada perlakuan tanpa penambahan PRM dan penurunan kadar oksigen setelah penambahan PRM. Kenaikan kadar oksigen pada percobaan ini menunjukkan bahwa Fe mempunyai peranan yang penting. Perlu diketahui bahwa pada metabolisme oksigen (rantai pernafasan), Fe berfungsi sebagai ko-faktor enzim. Sedangkan berkurangnya kadar oksigen disebabkan terjadinya interaksi antara PRM-Fe sehingga logam yang diperlukan bakteri tidak tersedia. Pada tabel 3 dan tabel 4 terlihat bahwa PRM GL memberikan pengaruh penghambatan terhadap pengikatan oksigen oleh bakteri PSIB-92001 dan PSIB-91002, sedangkan penambahan PRM TU memberikan pengaruh penghambatan hanya pada PSIB-92001.

KESIMPULAN

Hasil pengujian PRM yang diperoleh dengan memanaskan campuran glukosa-lysin (GL) dan tetes-urea (TU) menunjukkan penghambatan terhadap pengikatan oksigen oleh bakteri PSIB-92001 dan PSIB-91002, namun PRM GL mempunyai pengaruh penghambatan yang lebih besar bila dibandingkan PRM TU. PRM GL juga dapat mempengaruhi kelarutan besi yang diperlukan oleh bakteri dan penurunan kelarutan besi terbesar terjadi pada pH: 8,0. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa pengaruh anti bakteri dari PRM GL dapat mengakibatkan penurunan aktivitas metabolisme dan pengikatan nutrisi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Diucapkan terima kasih kepada Pimpinan Dewan Riset Nasional (DRN) yang telah membiayai penelitian ini melalui Riset Unggulan Terpadu (RUT).

DAFTAR PUSTAKA

Bhat, H.K., G.N. Qazi & C.L. Chopra. 1984. Effect of *5%-hydroxymethylfurfural* on Production of Citric Acid by *Aspergillus niger.* India J. of Experimental Biol., 33, 37-38.

Bulgarelli M.A. & L.A. Shelef. 1985. *Effect Of Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) on Growth From Spores of Bacillus cereus. J. Food. Sci.* 50. 661-664.

Clarke, M.A., E.J. Roberts, M.A. Godshall, M.A. Brannan, F.C. Carpenter & E.E. Coli. 1980. *Sucrose Loss In The Manufacture of Cane Sugar. Proc. 17th. Congr. ISSCT*, 2192-2203.

Einarsson, H., G.G. Snygg & C.E. Eriksson. 1983. *Inhibition of Bacterial Growth by Maillard Reaction Products. J. Agr. And Food Chem.* 31, 1043-1047.

Einarsson, H. 1987. *The Effect of Time, Temperature, pH, and Reactants on The Formation of Anibacterial Compounds in The Maillard Reaction.* SIK-The Swedish Food Institute, II:1-14.

Lingnert H., K. Vallentin & C. Eriksson. 1979. *Measurement of Antioxidative Effect in Model System. J. Food Proc. And Press.* 3, 87-103.

Maccaro G.A. 1961. *The Assessment of The Interaction Between Antibacterial Drugs. Progress in Ind. Microbiology*, 3, 173-210.

Mochtar, H.M., A. Bachtiar & B.E. Santoso. 1993. *Evaluasi Pasca Panen Beberapa Pabrik Gula di Indonesia Dalam Kaitannya Dengan Penurunan Kualitas Tebu dan Rendemen. Pros. Pert. Tehnis Tengah Tahunan I*, P3GI.

Mochtar, H.M., L. Ambarsari & E. Widhiastuti. 1997. *Produk Reaksi Maillard, Sintesa, dan Pengaruhnya Pada Penghambatan Kerusakan Tebu Dalam Pasca Panen. Buletin P3GI*, 146,1-19.

Mochtar, H.M., L. Ambarsari & E. Widhiastuti. 1998. *Produk Reaksi Maillard Sebagai Penghambat Kerusakan Gula Dalam Tebu Selama Pasca Panen, Aspek Teknis dan Ekonomisnya.* Buletin P3GI.

Ravello, S., L. Eduardo, S. Ramos & B.M. Torres, P. 1991. *Inhibition of Oligo and Polysaccharide Formation During Sugar Cane Deterioration. I.S.J.*, 93, 1113, 180-183.