

LAPORAN AKHIR

**APLIKASI TEKNOLOGI LACTOPEROXIDASE-SEPHAROSE-
MEMBRANE SEBAGAI METODE PENGAWETAN SUSU SEGAR
YANG MURAH DAN AMAN**

INSENTIF RISET TERAPAN

Nomor Pendaftaran Online: RT-2012-1283

Bidang Fokus/Faktor Pendukung:

1. Ketahanan Pangan

Kode Produk Target: 1.4

Kode Topik: 1.04.02

Peneliti Utama: Ahmad Ni'matullah Al-Baarri, Spt., MP., PhD

Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro

Jl. Prof. Sudharto, Kampus Tembalang, Semarang

November 2012

Daftar Isi

Halaman Pengesahan.....	2
Daftar Isi	4
Daftar Grafik.....	5
Daftar Ilustrasi	6
Executive Summary	7
Bab I. Pendahuluan	9
Bab II. Tujuan dan Manfaat.....	11
Tujuan Kegiatan.....	11
Manfaat Penelitian.....	13
Bab III. Tinjauan Pustaka.....	14
Bab IV. Materi dan Metode	20
Materi.....	20
Metode.....	20
Pengambilan susu sapi segar	20
Determinasi endogenous LPOS di dalam susu	20
Pembuatan whey.....	21
Immobilisasi LPO ke dalam Sepharose.....	21
Determinasi aktivitas LPO di dalam beads	21
Bab IV. Rencana Capaian, Hasil dan Pembahasan	24
Perkembangan bakteri di dalam susu segar	24
Indegenous komponen LPOS di dalam whey	25
Kandungan Hidrogen Peroksida di dalam susu segar	27
Kandungan thiocyanate di dalam susu segar	28
Aktivitas Laktoperoksidase pada Susu Segar	29
Purifikasi LPO	30
Uji Ketahanan LPO.....	32
Total Bakteri dengan perlakuan penambahan LPO	34
Efisiensi Imobilisasi LPO kedalam sepharose	35
Pembuatan membran LPO	36
Penyimpanan membran.....	40
Perbesaran volume susu segar yang disaring	41
Bab V. Kesimpulan dan Saran.....	43
Kesimpulan.....	43
Saran.....	43
Hambatan Penelitian.....	44
Tahap Penelitian akan Dilakukan pada Tahun Kedua.....	44
Daftar Pustaka.....	45
Foto-foto kegiatan	53
Mini Banner Hasil Kegiatan.....	56
Poster kegiatan	58
Bukti submitted to international Journal.....	59
Article for International Journal.....	60

Daftar Grafik

Grafik 1. Produksi susu Jawa Tengah, Jawa Barat dan Jawa Timur selama lima tahun terakhir.	9
Grafik 2. Total mikroba susu yang disimpan selama 6 jam setelah pemerahan.	24
Grafik 3. Konsentrasi komponen Lactoperoxidase System (LPOS) di dalam whey (SCN^- , H_2O_2 , dan OSCN^- , dalam mM) yang disimpan dalam suhu kamar (a) dan suhu 4°C (b) selama 6 jam.	25
Grafik 4. Grafik perubahan kandungan kadar hidrogen peroksida di dalam susu segar yang disimpan dalam suhu kamar.....	27
Grafik 5. Grafik perubahan kadar thiocyanate di dalam susu segar yang disimpan dalam suhu kamar.....	28
Grafik 6. Grafik penurunan aktivitas LPO di dalam susu segar yang disimpan dalam suhu kamar	29
Grafik 7. Absorbansi cairan yang diambil dari Sepharose setelah dialiri secara berturut-turut: whey dan 0.01 mM NaCl . Cairan ini diambil dengan cara dilusi dengan larutan 0.05 mM NaCl dalam phosphate buffer pH 7.0. Cairan ini (masing-masing sebanyak 5 ml) ditampung ke dalam tabung reaksi. Proses pengambilan cairan dari Sepharose ini berlangsung dalam suhu 4°C	30
Grafik 8. Grafik total bakteri pada susu segar yang disimpan pada suhu kamar selama 6 jam setelah dilakukan penambahan LPO dengan tingkat aktivitas yang berbeda (0, 5, 25, dan 50 U/ml).	34
Grafik 9. Penurunan efisiensi imobilisasi pada sepharose ketika digunakan untuk mengimobilisasi LPO. Kisaran LPO yang digunakan untuk mengetahui efisiensi imobilisasi ini adalah $540 - 16200\text{ U/ml}$	35
Grafik 10. Perkembangan total bakteri di dalam susu segar dengan penambahan LPO yang terimobilisasi didalam resin.....	38
Grafik 11. Perbedaan total bakteri tiap jam di dalam susu segar yang disaring melewati lactoperoxidase-sepharose-membrane pada jam ketiga	38
Grafik 12. Perbedaan total bakteri tiap jam di dalam susu segar yang disaring melewati lactoperoxidase-sepharose-membrane pada jam pertama	39
Grafik 13. Penurunan aktivitas LPO dalam membran yang direndam dengan menggunakan tiga jenis larutan perendam dalam suhu 10°C	40
Grafik 14. Penurunan aktivitas LPO dalam membran yang direndam dengan menggunakan tiga jenis larutan perendam dalam suhu 25°C	40
Grafik 15. Total bakteri (dalam CFU/mL) pada berbagai macam volume susu segar yang dibiarkan selama 6 jam pada suhu kamar setelah mendapat perlakuan penyaringan dengan menggunakan Lactoperoxidase-sepharose-membrane pada jam ketiga penyimpanan.....	42

Daftar Ilustrasi

- Ilustrasi 1. Mekanisme kimiawi LPO dalam mengkatalis dua senyawa alami susu untuk menghasilkan OSCN⁻ yang berfungsi untuk membunuh bakteri..... 14
- Ilustrasi 2. Mekanisme yang terjadi pada LPOS dengan menggunakan substrat H₂O₂ dan SCN⁻ hingga menghasilkan OSCN⁻ sebagai zat pembunuh bakteri..... 18
- Ilustrasi 3. Profil SDS PAGE Electrophoresis 11 fraksi pilihan yang diambil dari Sepharose setelah didilusikan dengan 0.05 mM NaCl. Bagian paling kiri adalah standar protein marker. Tampak dalam gambar, enzim LPO terdeteksi mulai fraksi ke 51 hingga 73..... 31

Executive Summary

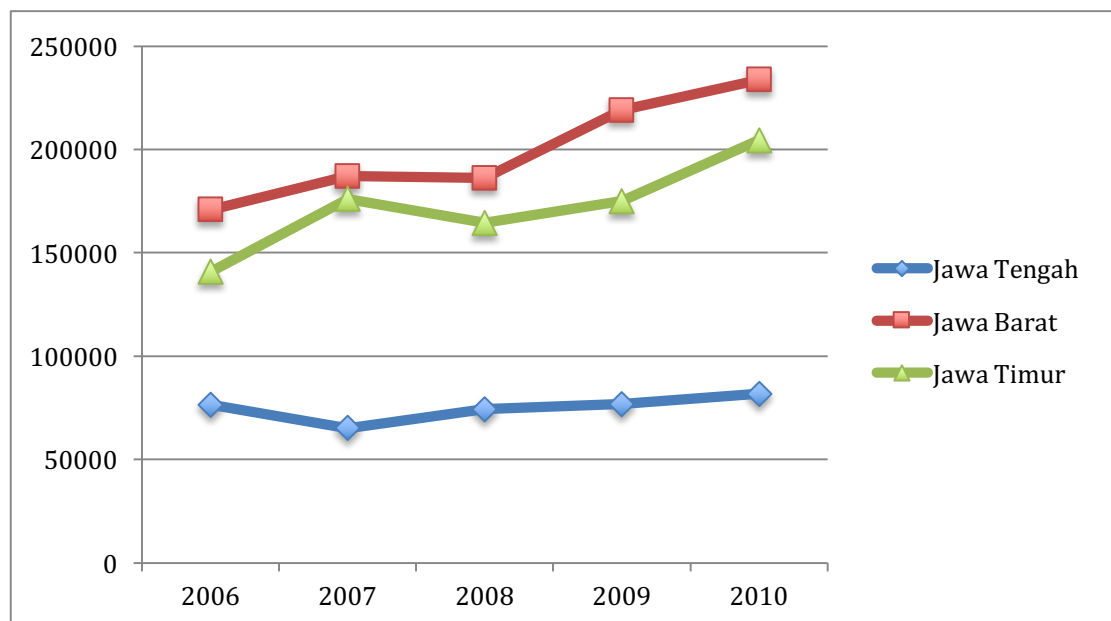
Permasalahan yang dialami oleh peternak sapi perah secara nasional adalah tingginya angka kuman. Hal ini paling jelas terlihat di Jawa Tengah dengan maraknya penolakan setoran susu segar di Industri Pengolahan Susu dan berbagai keracunan susu yang sering terjadi. Hal yang paling memprihatinkan adalah “image” Jawa Tengah sebagai penghasil susu dengan kualitas rendah. Program pemerintah mulai dari pembuatan sarana pendingin, hingga program sanitasi kandang, telah dilaksanakan namun belum optimal hasilnya. Oleh karena itu, perlu strategi yang tepat dan cepat guna menurunkan angka kuman, yaitu melalui teknologi tepat guna yang mudah dilaksanakan dan aman bagi kesehatan. Metode Lactoperoxidase-Sepharose-Membrane adalah metode yang memenuhi kriteria tersebut. Prinsip pembuatan membran tersebut adalah menempatkan sepharose yang telah diaktivasi dengan enzim laktoperoksidase diantara dua lapisan membran nylon. Nantinya membran tersebut digunakan untuk menyaring susu segar. Tahapan kegiatan yang dilaksanakan meliputi penentuan berapa gram sepharose yang optimal digunakan untuk setiap liter susu segar, penentuan berapa unit laktoperoksidase yang akan digunakan untuk setiap liter susu, dan prinsip pemeliharaan membran dalam suhu kamar. Kegiatan ini sangat bermanfaat untuk para peternak sapi perah dan KUD didalam upaya untuk menekan angka kuman. Metode pembuatan membran yaitu dengan menempatkan 1 g sepharose diantara 2 membran yang terbuat dari kain nylon. Membran tersebut dibuat dalam bentuk lingkaran dengan diameter 8,5 cm dan pada tepinya, diklem dengan plastik jenis polyethylene. Membran ini kemudian digunakan untuk menyaring susu segar. Hasil yang paling optimal untuk menyaring 1 L susu segar adalah dengan menggunakan 1 g sepharose yang telah diaktivasi dengan laktoperoksidase sebanyak 80 Unit. Membran ini dapat disimpan dan diaktifkan di dalam whey pada suhu kamar. Hasilnya, susu segar yang telah disaring melalui membran ini dapat ditekan angka kumannya sebanyak 1 log CFU/ml pada jam keenam penyimpanan. Susu dengan perlakuan membran ini dapat diperpanjang masa simpannya dari 6 jam menjadi 8 jam pada suhu kamar dengan angka kuman yang kurang dari 1 juta CFU/ml.

Kegiatan ini mempunyai target (1) Prosedur pembuatan membran, aplikasi membran untuk menyaring susu segar, dan pemeliharaan membran, dan (2) Publikasi di jurnal internasional. Luaran atas kegiatan ini adalah (1) ditemukannya prosedur yang tepat untuk pembuatan membran, penggunaannya, dan pemeliharannya, dan (2) Publikasi di jurnal internasional yang bernama Journal of Food Protection. Prosedur ini akan didaftarkan patennya pada kegiatan lanjutan.

Oleh karena seluruh target terpenuhi, maka kegiatan ini dapat dinilai berhasil. Mengingat kegiatan ini adalah kegiatan terapan yang akan menghasilkan teknologi tepat guna, maka besar harapannya untuk dapat dilanjutkan dengan kegiatan aplikasi teknologi ini di peternak sapi perah dan KUD.

Bab I. Pendahuluan

Produksi susu nasional dari peternakan sapi perah rakyat tahun 2010 tercatat sebesar 584.000 ton per tahun. Peternak di Jawa Barat tercatat sebagai penyumbang produksi susu yang terbesar, yaitu sebanyak 40% dari produksi susu nasional dan diikuti dengan Jawa Timur yang menyumbang produksi susu sebesar 35%. Produksi susu di Jawa Tengah tercatat terbesar ketiga, yaitu sebesar 14% atau sekitar 84.000 ton per tahun (Dirjen–Peternakan, 2011). Seperti yang terlihat pada Grafik 1, angka ini telah mengalami peningkatan sekitar 5.000 ton (atau sekitar 5%) dari tahun sebelumnya. Sebenarnya, peningkatan produksi susu di Jawa Tengah pada tahun terakhir ini adalah karena adanya musim hujan yang berkepanjangan. Jawa Tengah hanya mengalami peningkatan produksi susu sebesar 14.000 ton dalam kurun waktu lima tahun terakhir. Artinya, per tahunnya hanya ada peningkatan sebesar 2.800 ton per tahun (atau sebesar 3,3%). Peningkatan per tahun ini dapat dikatakan mengalami tahap stagnasi dan masih sangat jauh jika dibandingkan dengan peningkatan produksi susu pertahun di Jawa Timur (6,3%) dan Jawa Barat (6%).



Grafik 1. Produksi susu Jawa Tengah, Jawa Barat dan Jawa Timur selama lima tahun terakhir.

Masalah lain yang dihadapi oleh Jawa Tengah adalah keracunan akibat mengkonsumsi susu. Setiap tahun peristiwa ini terjadi dan tercatat berlangsung sejak lama. Dalam skala nasional, kasus keracunan susu di Jawa Tengah tercatat paling banyak terjadi (Suara–Merdeka, 2009; Tempo, 2010). Keracunan susu berulang kali terjadi setiap tahun. Kejadian keracunan ini terakhir tercatat pada tahun 2010 (Tempo, 2010). Kejadian keracunan ini selalu terjadi setiap tahun dalam kurun waktu lima tahun terakhir (Pikiran–Rakyat, 2006, Okezone, 2007, Suara–Merdeka, 2009, Suara–Merdeka, 2008). Jika dilakukan penelusuran, maka penyebab utama keracunan ini adalah satu: angka kuman yang melampaui ambang batas standar susu sehat (yaitu 10^6 CFU/ml) (Legowo, 2003, Legowo et al., 2009).

Angka penolakan susu oleh IPS di Jawa Tengah juga tercatat cukup tinggi dibandingkan dengan Jawa Barat dan Jawa Timur. PT Sari Husada telah berulang kali menolak susu dari berbagai KUD di wilayah Jawa Tengah dan DIY. PT Cita Nasional juga tercatat beberapa kali menolak susu segar dari KUD. Sehingga IPS sudah mempunyai “image” bahwa susu dari Jawa Tengah adalah berkualitas jelek.

Berbagai macam metode untuk menurunkan angka kuman telah dilakukan, mulai dari penyuluhan sanitasi kandang dan peralatan, pemberian insentif, hingga diselenggarakannya proyek pengadaan cooling unit bagi KUD, namun hingga saat ini belum dapat menurunkan rata-rata angka kuman susu segar dari peternak. Program pengadaan cooling unit bagi KUD memang dinilai sangat signifikan untuk menekan pertumbuhan kuman namun dalam kenyataannya, justru angka kuman dinilai sangat meningkat ketika susu dalam perjalanan dari peternak ke KUD. Menurut survei lapangan yang telah dilakukan pada tahun 2011, ternyata kenaikan angka kuman dari KUD ke IPS hanya 0,8 log CFU/ml selama 3 jam perjalanan. Oleh karena itu, permasalahan sebenarnya adalah di titik peternak ke KUD, yang mana di titik ini, tidak ada proses pendinginan. Oleh karena itu, tujuan penelitian ini akan difokuskan pada penanganan susu di tingkat peternak hingga titik sebelum susu dicampurkan menjadi satu di KUD.

Bab II. Tujuan dan Manfaat

Tujuan Kegiatan

Tujuan penelitian dibagi menjadi dua tahap dan penelitian tahap ini adalah penelitian tahap pertama yaitu:

1. Melakukan upaya penyempurnaan terhadap teknologi lactoperoxidase-sepharose-membrane, terutama dalam hal ketahanan membran terhadap temperatur, kelembaban, dan metode penyimpanan, serta dapat memperoleh data hingga berapa kali *load* membran ini dapat dipakai serta upaya untuk memperpanjang masa pakai. Membran dibuat dari kain nylon berserat tipis yang dapat menahan sepharose supaya tidak ikut mengalir ke dalam susu. Membran akan diisi dengan sepharose dan akan ditempatkan sedemikian sehingga dapat digunakan untuk menyaring susu. Membran ini berbentuk bulat dan mempunyai diameter ukuran mini (8,5 cm) yang akan digunakan sebagai uji coba tingkat laboratorium untuk penyaringan susu. Target yang didapat dalam tahapan ini adalah memperoleh data mengenai kondisi yang tepat untuk menjalankan membran ini.
2. Melakukan uji coba tingkat laboratorium tentang efektivitas membran ini. Tahap ini dilakukan dengan melewati susu melalui membran. Membran yang dimaksud nantinya akan ditempatkan pada tutup milkcan (penelitian tahap II), sehingga susu yang masuk ke dalam milkcan akan terlebih dahulu berinteraksi dengan lactoperoxidase-sepharose-membrane ini. Pada tahap I ini, membran akan diuji coba dalam skala laboratorium dan terukur untuk: (1) kecepatan aliran susu, (2) banyaknya enzim LPO (dalam satuan unit) yang efektif, (3) umur susu segar saat melakukan penyaringan dengan membran, sehingga target dari penelitian tahap I ini adalah menemukan kecepatan alir yang optimal, banyaknya enzim LPO yang efektif, dan saat yang tepat dilaksanakan tahap penyaringan agar susu segar pada umur 6 jam penyimpanan, angka kumannya lebih rendah dari 6 log CFU/ml.

Manfaat Penelitian

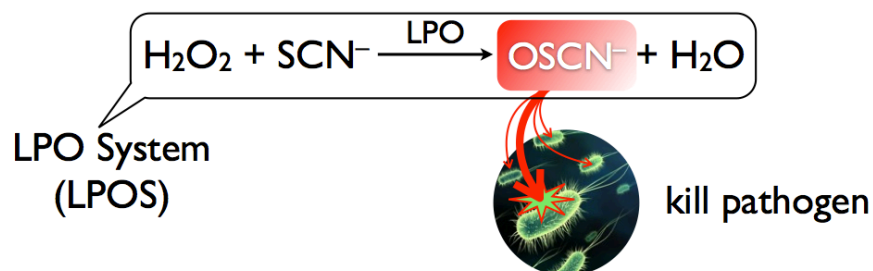
Manfaat dari penelitian ini adalah angka kuman yang ada pada susu segar, dapat dihambat perkembangannya (menurunkan tingkat keracunan susu segar). Sebagaimana telah dipersyaratkan, bahwa angka kuman susu segar yang diterima oleh industri pengolahan susu adalah tidak boleh melebihi 6 log CFU/ml, maka manfaat penelitian ini adalah sangat penting dalam menekan angka kuman sehingga tidak melebihi 6 log CFU/ml. Manfaat lain disisi peternak atau KUD adalah mereka tidak lagi khawatir akan ditolaknya susu segar oleh industri pengolahan susu karena angka kuman yang tinggi. Keadaan ini akan membuat gairah mereka akan terus terjaga dan dapat terus memproduksi susu dan menyetor susu dengan lancar ke industri pengolahan susu. Bagi peternak yang menyetor susunya ke KUD dan sering kali ditolak karena angka kuman yang tinggi, maka dengan adanya kegiatan ini, maka para peternak tidak lagi khawatir akan ditolaknya susu karena menggunakan alat yang dikembangkan ini.

Manfaat jangka panjang, Jawa Tengah tidak lagi terkenal sebagai penghasil susu yang jelek dengan angka kuman yang tinggi, dengan aplikasi membran LPO ini, maka dapat dihasilkan susu dengan angka kuman dibawah yang telah dipersyaratkan oleh Standar Nasional Indonesia atau industri pengolahan susu. Akhirnya, hal ini dapat mengangkat nilai Jawa Tengah dalam persusuan nasional.

Bab III. Tinjauan Pustaka

Laktoperoksidase atau lactoperoxidase (LPO) adalah enzim alami yang tersedia dalam jumlah banyak di dalam susu (kandungannya sekitar 30 mg/l susu) (Kussendrager and Hooijdonk, 2000). Cara kerja enzim ini adalah unik, tidak sebagaimana enzim lainnya di dalam susu. LPO mengkatalisa reaksi antara *hydrogen peroxide* (H_2O_2) dan *thiocyanate* (SCN^-) yang secara natural terdapat dalam susu menjadi senyawa yang dinamakan *hiphothiocyanite* ($OSCN^-$) (Ilustrasi 1.) (Barrett et al., 1999, Kussendrager and Hooijdonk, 2000, Seifu et al., 2007). Proses katalisis yang dilakukan oleh LPO dalam rangka memproduksi $OSCN^-$ dinamakan *lactoperoksidase system* (LPOS). Senyawa $OSCN^-$ ini adalah senyawa yang bertanggung jawab untuk membunuh bakteri, fungi, dan virus dengan merusak gugus sulfhidril (gugus S-H) dari membran sel, yang mengakibatkan pada kerusakan vital membran sel yang pada akhirnya akan membawa pada kematian sel (Al-Baarri et al., 2011b, Borch et al., 1989).

LPO di dalam susu hanya mampu bertahan selama 0.5–1 jam, dan selanjutnya LPO akan terdegradasi yang berakibat pada kehilangan kuantitas dan aktivitasnya (Al-Baarri et al., 2011c). Saat LPO hilang aktivitasnya, substrat H_2O_2 dan SCN^- akan tersisa di dalam susu. Sisa substrat inilah yang nantinya akan dimanfaatkan melalui metode membran laktoperoksidase. Setelah substrat ini jika melewati membran laktoperoksidase, maka akan terkonversi menjadi $OSCN^-$ sebagai anti bakteri. Metode ini dinilai sebagai metode yang praktis, mudah dan aman.



Ilustrasi 1. Mekanisme kimiawi LPO dalam mengkatalis dua senyawa alami susu untuk menghasilkan $OSCN^-$ yang berfungsi untuk membunuh bakteri.

Secara alamiah, susu mempunyai zat yang berfungsi untuk mencegah berkembangbiaknya bakteri pathogen, diantaranya adalah nisin, laktoferin, dan lactoperoksidase (Seifu et al., 2004, Legowo et al., 2009). Ketiga zat ini adalah sejenis enzim yang berfungsi untuk mempertahankan susu dari serangan bakteri. Namun oleh karena jumlahnya yang terbatas, enzim-enzim ini tidak mampu terus menerus mempertahankan kualitas susu dari serangan bakteri yang berasal dari luar maupun yang berasal dari perkembangan endogenous bakteri. Diantara ketiga enzim yang berfungsi mempertahankan kualitas susu ini, enzim lactoperoxidase (LPO) sangat berperan untuk membunuh bakteri (Al-Baarri et al., 2011a, Seifu et al., 2005, Asaah, 2007, Legowo et al., 2011).

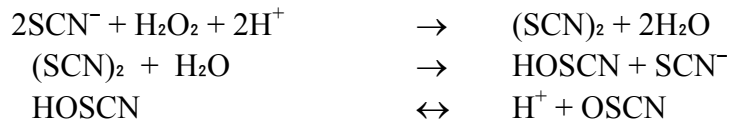
LPO adalah enzim yang tersedia dalam jumlah banyak di dalam susu (kandungannya sekitar 30 mg/l susu) (Kussendrager and Hooijdonk, 2000). LPO mempunyai berat molekul sebesar 78 kDa dan tersusun dari 612 jenis asam amino (Seifu et al., 2004, Østdal et al., 2000, Shakeel-ur et al., 2002). Gambaran lebih detail mengenai LPO ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Data fisik-kimia yang dimiliki oleh enzim LPO (Al-Baarri et al., 2011a, Kussendrager and Hooijdonk, 2000, Wolfson and Sumner, 1993)

Komponen/karakteristik	Data
Berat molekul	78431 Da
Jumlah asam amino	612
Kandungan karbohidrat	10 %
Kandungan struktur besi	0,07 %
Prosthetic group	Haem protoporphyrin IX
Iso-electric point	9,6
Absorptivity $\epsilon_{412 \text{ nm}}$	$112,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Absorptivity 280 nm	14,9–15,0
Kinetic Inhibition	0,3~3,3 mM

LPO telah terbukti dapat membunuh semua bakteri pathogen di dalam susu (Seifu *et al.*, 2005), fungi (Al-Baarri et al., 2011c, Seifu et al., 2007) bahkan virus (Yener *et al.*, 2009). LPO adalah jenis enzim yang sangat stabil dan mempunyai daya tahan yang kuat terhadap berbagai kondisi yang ekstrim seperti pemanasan dan pendinginan daripada enzim lainnya di dalam susu (Boots and Floris, 2006). Oleh karena itu, keberadaan enzim ini sangat menentukan masa simpan susu.

Cara kerja enzim ini adalah unik, tidak sebagaimana enzim lainnya di dalam susu. LPO mengkatalisa reaksi antara *hydrogen peroxide* (H_2O_2) dan *thiocyanate* (SCN^-) yang secara natural terdapat dalam susu menjadi senyawa yang dinamakan hiphothiocyanite (OSCN^-) (Barrett et al., 1999, Kussendrager and Hooijdonk, 2000, Seifu et al., 2007). Proses katalisis yang dilakukan oleh LPO dalam rangka memproduksi OSCN^- dinamakan laktoperoksidase system (LPOS). Senyawa OSCN^- ini adalah senyawa yang bertanggung jawab untuk membunuh bakteri, fungi, dan virus dengan merusak gugus sulfhidril (gugus S-H) dari membran sel, yang mengakibatkan pada kerusakan vital membran sel yang pada akhirnya akan membawa pada kematian sel (Al-Baarri et al., 2011b, Borch et al., 1989).



Ilustrasi 2. Mekanisme yang terjadi pada LPOS dengan menggunakan substrat H_2O_2 dan SCN^- hingga menghasilkan OSCN^- sebagai zat pembunuh bakteri.

LPO di dalam susu mampu bertahan selama 10-12 jam dalam suhu kamar, dan selanjutnya LPO akan terdegradasi yang berakibat pada kehilangan aktivitasnya (Al-Baarri et al., 2011c). Walaupun LPO mampu bertahan selama itu, namun substrat H_2O_2 dan SCN^- akan habis dalam waktu tidak lebih dari 3 jam. Didalam susu, terkandung endogenous H_2O_2 sekitar 100 μM (Wolfson and Sumner, 1993) dan SCN^- 400 μM (Kussendrager and Hooijdonk, 2000). H_2O_2 dalam susu terjadi diantaranya karena adanya proses fagositosis dari polymorphonuclear leucocytes (Wit and Hooijdonk, 1996). SCN^- tersedia secara natural di dalam susu dan berbagai jaringan sekresi tubuh mamalia (Reiter and Harnulv, 1984). Kedua substrat ini di dalam susu akan terdegradasi menjadi OSCN^- dalam waktu tiga jam. Oleh karena itu, selama tiga jam pertama, perkembangan bakteri yang ada di dalam susu dapat ditekan. Seiring dengan habisnya substrat H_2O_2 dan SCN^- maka tidak ada lagi kandungan OSCN^- dalam susu (Seifu et al., 2005, Al-Baarri et al., 2010). Hal inilah yang mengakibatkan perkembangan bakteri secara signifikan meningkat setelah lebih dari 3 jam pada suhu kamar.

Susu segar dari ternak yang sehat, mengandung total bakteri kurang dari 1000 CFU/ml (Jay, 2000) dan tergolong aman dikonsumsi serta memenuhi persyaratan angka kuman (atau total bakteri) pada Industri Pengolahan Susu (IPS) (Munir, 2010). Total bakteri ini akan tetap terjaga peningkatannya selama tiga jam pertama setelah pemerahan pada level dibawah 10^2 CFU/ml. Selanjutnya akan meningkat dua kali lipat dalam waktu tidak lebih dari satu jam. Oleh karena itu, sering kali dijumpai susu yang mengandung total bakteri sebanyak 10^6 CFU/ml pada jam ke 5 penyimpanan pada suhu kamar. Jika susu yang mengandung bakteri

sejumlah ini dikonsumsi, maka akan menimbulkan efek keracunan seperti demam, kepala pusing, diare dan muntah-muntah (Buckle, 1987, Legowo et al., 2009).

Peningkatan total bakteri pada susu yang telah diaktifkan LPOS-nya, dapat ditekan dengan baik. Setelah pengaktifan LPOS, kandungan total bakteri pada susu yang disimpan pada suhu kamar selama 6 jam, dapat ditekan hingga menjadi 10^3 CFU/ml. Total bakteri akan mencapai 10^6 CFU/ml pada 12 jam penyimpanan pada suhu kamar (Asaah, 2007, Seifu et al., 2004). Oleh karena itu, FAO menyarankan penggunaan LPOS untuk menambah daya tahan susu segar di negara-negara yang mengalami kesulitan dalam hal pengangkutan dalam kontainer dingin. LPOS tergolong metode pengawetan yang aman sehingga organisasi pangan lainnya seperti FSANZ, juga mendeklarasikan bahwa LPOS adalah metode preservasi yang aman (FAO, 2005, FSANZ, 2002).

Bab IV. Materi dan Metode

Materi

Materi yang digunakan adalah Spectrophotometer (Schimadzu UV mini 1240, Japan), Sepharose® FF Column (GE, Japan), kolom gelas 50 x 3 cm, pompa vakum, susu sapi segar dari peternakan milik Fakultas Peternakan dan Pertanian Undip, kain nylon (sebagai bahan pembuat membran), waterbath, hidrogen peroksida, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (Sigma Aldrich, Singapore), ferric nitrate (Applychem, Jakarta).

Metode

Metode penelitian yang akan dilakukan adalah metode penelitian laboratorium dan dapat dijelaskan secara rinci sebagai berikut:

Pengambilan susu sapi segar

Susu segar di dikumpulkan setiap kali akan melaksanakan penelitian. Oleh karena penelitian dilaksanakan pada pagi hari, maka susu segar akan didapat dari pemerahan pagi hari. Uji kualitas susu meliputi pH dan keasaman dilakukan dengan menggunakan alat pH meter dan titrasi, uji denaturasi dilakukan dengan alkohol, uji protein dan kadar lemak dilakukan masing masing dengan metode lowry dan metode gerber. Selain itu, dilakukan juga uji organoleptik berdasarkan panelist test.

Determinasi endogenous LPOS di dalam susu

Komponen yang akan dideteksi adalah aktivitas LPO, konsentrasi H_2O_2 , SCN^- dan $OSCN^-$. Aktivitas LPO akan di uji dengan menggunakan metode spektrofotometri, yang menggunakan ABTS sebagai substrat (Pruitt *et al.*, 1990). Metode ini dinilai sangat cermat dalam mendeteksi aktivitas LPO di dalam susu. Susu setelah di sentrifugasi 10.000 g, selanjutnya segera dipisahkan komponen krim untuk diambil skim nya. Skim inilah yang nantinya akan digunakan untuk melihat aktivitas LPO. Aktivitas LPO yang ada di dalam susu, akan dihitung

berdasarkan standar kurva yang diperoleh dari perhitungan LPO komersial. Konsentrasi H_2O_2 akan dianalisa dengan memodifikasi metode analisa LPO dengan menggunakan horseradish peroxidase sebagai katalisator (Touch *et al.*, 2004). Konsentrasi SCN^- akan dikalkulasikan dengan menggunakan *ferric sulphate*. Konsentrasi SCN^- adalah seiring dengan terbentuknya warna kuning kecoklatan pada sampel setelah sampel berreaksi dengan *ferric sulphate* dan *nitric acid* (Al-Baarri *et al.*, 2011a). Konsentrasi OSCN^- diukur dengan memperhitungkan *oxidation rate* Nbs menjadi Nbs_2 .

Pembuatan whey

Susu segar disentrifugasi 8000g selama 30 menit untuk mengurangi kadar lemak. Kemudian dengan penambahan rennet dan asam laktat, susu didiamkan beberapa saat (kira kira 1 jam) pada *incubator* dengan suhu 30°C . Setelah itu, akan terbentuk *curd* dan whey dipisahkan dari *curd* dengan kain saring.

Immobilisasi LPO ke dalam Sepharose

Sepharose beads sebanyak 100 g ditempatkan ke dalam kolom dengan diameter 3 cm dan panjang 50 cm. Sebelumnya, beads di cuci dengan pure water terlebih dahulu untuk menghilangkan sisa ethanol akibat penyimpanan. Beads secara berurutan dialiri pure water dan whey (sebanyak 2 liter). Kegiatan ini dilakukan pada suhu 4°C untuk menghindari kerusakan terhadap enzim LPO. Whey setelah melewati kolom yang berisi beads, ditampung dengan menggunakan beaker glass. Metode seperti ini akan mengikat LPO ke dalam beads dan adanya LPO dapat terlihat dari perubahan warna menjadi agak hitam pada beads bagian atas. Kemudian ke dalam kolom dialiri larutan 0.001 mM NaCl untuk melarutkan komponen bukan enzim.

Determinasi aktivitas LPO di dalam beads

Sebanyak 1 g beads yang mengandung LPO diambil dari kolom gelas untuk diukur aktivitas LPOnya dan dimasukkan ke dalam kolom mini berdiameter 0,5 cm dan panjang 5 cm. Setelah itu, secara berturut-turut ke dalam kolom mini

tersebut, dimasukkan 0,5 mM ABTS dan 0,5 mM H₂O₂. Setelah reaksi dibiarkan selama 1 menit, maka campuran kedua senyawa tersebut disedot keluar dengan bantuan pompa vakum. Kegiatan penyedotan ini dilakukan secara cepat dengan menyetel aliran pompa vakum secara maksimal. Setelah itu, larutan hasil sedotan ini akan berwarna kehijauan dan dianalisis dengan menggunakan spectrophotometer pada panjang gelombang 412 nm. LPO didalam beads inilah yang nantinya digunakan sebagai bahan pembuatan membrane. Pembuatan membrane akan dimulai dilakukan pada tahap kedua penelitian tahun pertama ini.

Pembuatan Whey

Pembuatan whey dilakukan dengan dua liter susu sapi dipanaskan pada waterbath hingga mencapai suhu 35°C. Susu yang telah mencapai suhu 35°C kemudian ditambahkan asam laktat hingga mencapai pH 6,0 kemudian dimasukkan rennet sebanyak 0,02% (b/v), larutan kemudian diaduk hingga merata dan ditunggu hingga 40 menit. Susu yang telah menggumpal kemudian dipotong membentuk dadu dan dibiarkan hingga 40 menit, Susu kemudian dipisahkan dengan filtrasi melalui kain saring. Filtrat yang merupakan whey yang akan digunakan dalam penelitian ini.

Imobilisasi Whey

Imobilisasi laktoperoksidase (LPO) dilakukan dengan menggunakan *ion exchange chromatography*. Whey dialirkan pada kolom yang berisi Sepharose FF. Sepharose FF kemudian dialirkan dengan 0,4 M NaCl dalam 0,1 M phospat buffer sebanyak 500 ml untuk mendapatkan LPO. Sepharose FF kemudian dialirkan kembali dengan 0,1 M NaCl untuk membersihkan sepharose. Sepharose FF kemudian direndam dalam larutan aquadest dengan 20% alkohol untuk penyimpanan.

Pembuatan Membran LPO

Ke dalam membran yang terbuat dari kain nylon berbentuk bundar dengan diameter 8,5 cm, diletakkan 1 g Sepharose. Untuk menghindari hilangnya Sepharose, maka dilakukan pelapisan dengan kain nylon yang lain sehingga terbentuk dua lapis tipis kain nylon yang didalamnya terdapat Sepharose. Pada tepi Sepharose di klem dengan poliethylene sehingga Sepharose tetap berada di dalam membran. Membran yang sudah jadi ini, kemudian digunakan untuk menyaring susu. Sebelum digunakan untuk menyaring susu, dilakukan terlebih dahulu pencelupan ke dalam whey yang telah diketahui kadar LPO nya.

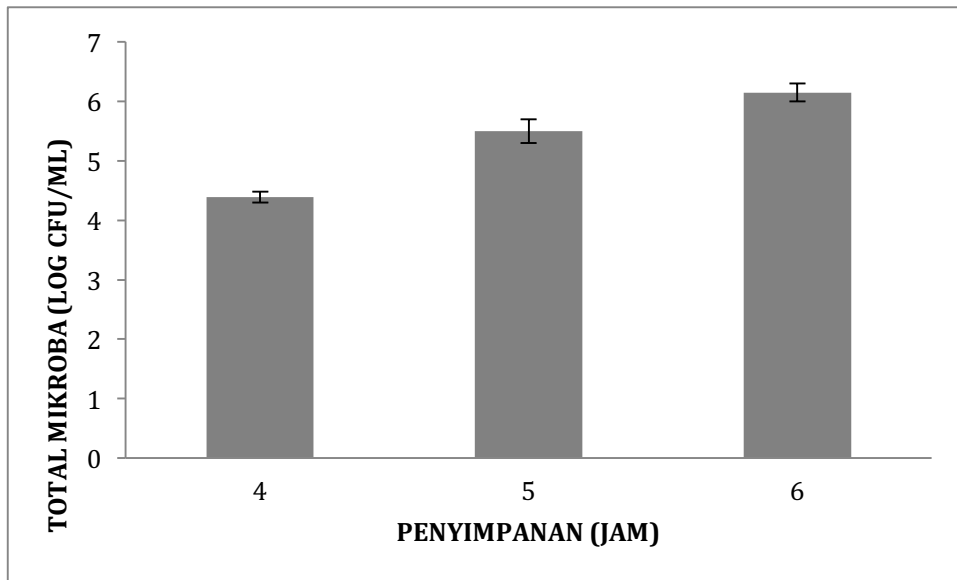
Penentuan Efisiensi Imobilisasi

Laktoperoksidase murni yang telah diketahui aktivitasnya dilewatkan pada kolom yang berisi SP-Sepharose sebanyak 1 gram. Laktoperoksidase sebanyak 10, 100, 200 dan 300 ml disirkulasikan melalui kolom pada laju aliran 1,0 ml/menit menggunakan sebuah pompa peristaltik. Cairan buangan yang telah melewati kolom kemudian ditentukan aktivitas LPOnya.

Penentuan aktivitas LPO dilakukan dengan menggunakan ABTS sebagai substrat. 450 μ l 1,0 mM ABTS dalam 10 mM asetat buffer (pH 4,4) dan 450 μ l dari 0,55 mM H₂O₂ dalam air murni yang dimasukkan ke dalam cuvet, kemudian output kolom dituangkan sebanyak 50 μ l ke dalam cuvet, dikocok perlahan dengan menggunakan pipet agar homogen dan dibaca pada absorban 412 nm, satu unit aktivitas enzimatis LPO dinyatakan oleh jumlah enzim yang diperlukan untuk mengoksidasi 1 μ mol ABTS/ min. koefisien molat penghilangan ABTS pada 412 nm sebesar 32.400 m⁻¹ cm⁻¹.

Bab IV. Rencana Capaian, Hasil dan Pembahasan

Perkembangan bakteri di dalam susu segar

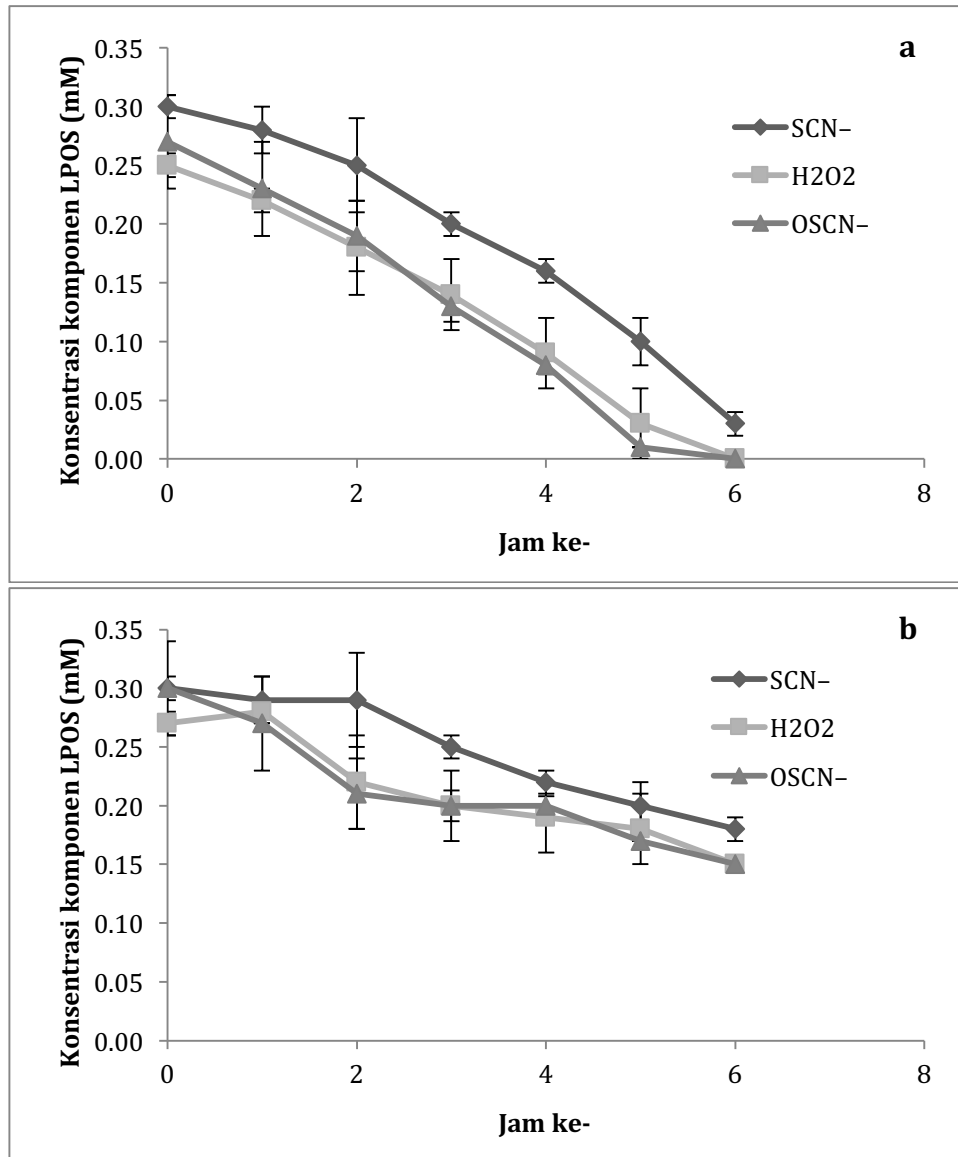


Grafik 2. Total mikroba susu yang disimpan selama 6 jam setelah pemerahan.

Susu merupakan pangan yang mudah terkontaminasi dengan mikroba. Apalagi di dalam suhu ruang. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 4 jam penyimpanan total mikroba sebanyak 4,389 log CFU/ml dan selama 6 jam penyimpanan total mikroba di dalam susu sebanyak 6,15 log CFU/ml. Hal ini dapat diartikan bahwa semakin lama penyimpanan maka semakin banyak total mikroba yang terdapat di dalam susu.

Adanya mikroba yang semakin banyak ini disebabkan semakin rendahnya sistem pertahanan OSCN di dalam susu. Rendahnya OSCN yang terbentuk karena enzim LPO sebagai katalisator hilang ketika pada jam ke 3 sehingga pada jam ke 4 sampai jam ke 6 total mikroba di dalam susu meningkat.

Indigenous komponen LPOS di dalam whey



Grafik 3. Konsentrasi komponen Lactoperoxidase System (LPOS) di dalam whey (SCN⁻, H₂O₂, dan OSCN⁻, dalam mM) yang disimpan dalam suhu kamar (a) dan suhu 4°C (b) selama 6 jam.

Data tentang indigenous komponen LPOS, yaitu SCN⁻, H₂O₂, dan OSCN⁻ di dalam whey beserta perubahannya setiap jam yang dilakukan pada suhu kamar dan suhu 4°C dapat dilihat pada Grafik 3. Berdasarkan data yang didapat, maka dapat disimpulkan bahwa seluruh komponen LPOS di dalam whey baik yang disimpan di dalam suhu kamar maupun suhu 4°C mengalami penurunan.

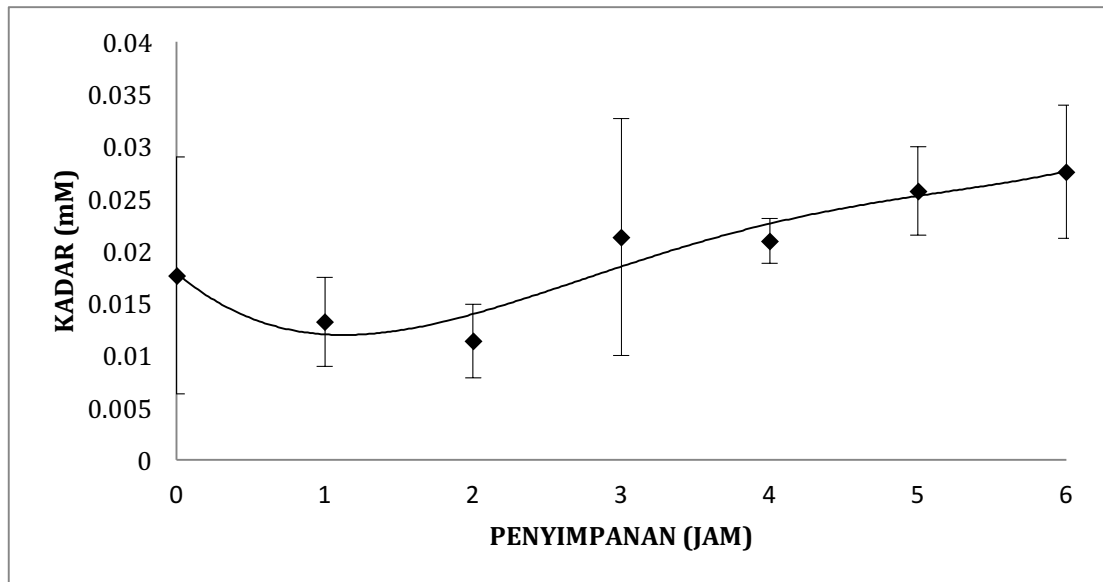
Pada whey yang disimpan di dalam suhu kamar dapat disimpulkan bahwa hanya sedikit sekali komponen LPOS yang tersisa, bahkan untuk SCN^- dan OSCN^- tidak terdeteksi. Semua komponen LPOS ini tidak terdeteksi sama sekali pada whey yang disimpan selama 7 jam dalam suhu kamar (data tidak ditampilkan). Jika grafik ini dikonfirmasi dengan total bakteri, maka terdapat linearitas, bahwa semakin menurun komponen LPO, semakin tinggi total bakteri. Hal ini dapat ditunjukkan dengan total bakteri mula-mula yaitu sebesar 10^3 CFU/ml (bakteri pada jam ke-0) hingga berkembang menjadi 10^7 CFU/ml pada whey jam ke-6 penyimpanan (data tidak ditampilkan). Penambahan total bakteri pada whey ini adalah sebagai akibat tidak adanya pertahanan alamiah dari LPOS di dalam whey. Hal ini sesuai dengan pernyataan Asaah (2007) yang menyatakan bahwa konsentrasi LPO akan menurun seiring dengan lamanya penyimpanan. Namun penelitian lain menyatakan bahwa LPO yang diinkubasi dalam suhu hingga 50°C selama 5 jam di dalam whey, tidak menunjukkan adanya penurunan aktivitas (Al-Baarri, 2011). Perbedaan medium penyimpanan sangat berpengaruh terhadap perkembangan aktivitas LPO selama masa inkubasi karena adanya faktor penghambatan kerja enzim oleh berbagai macam komponen, misalnya laktosa (Al-Baarri et al., 2011a) dan protein lain selain LPO (Clausen et al., 2008).

Penurunan konsentrasi komponen LPO pada whey yang disimpan didalam suhu 4°C walaupun terlihat namun mampu bertahan sekitar 50% dari konsentrasi semula. Hal ini disebabkan karena adanya pertumbuhan bakteri yang dapat ditekan pada suhu penyimpanan ini. Bakteri akan mengalami tahap pertumbuhan lambat pada suhu yang tidak optimal untuk pertumbuhan (Drgalić et al., 2005). Akibatnya, OSCN^- yang diproduksi tidak digunakan sepenuhnya untuk membunuh bakteri. Begitu pula dengan SCN^- dan H_2O_2 yang tidak digunakan untuk menghasilkan OSCN^- yang berakibat pada tersisanya jumlah kedua substrat tersebut.

Kandungan Hidrogen Peroksida di dalam susu segar

Tabel 2. Data kandungan hidrogen peroksida di dalam susu segar yang disimpan dalam suhu kamar

Penyimpanan (jam)	Absorbansi (nm)	Konsentrasi (mM)
0	0,021	0,017647
1	0,015	0,013235
2	0,0125	0,011397
3	0,026	0,021324
4	0,0255	0,020956
5	0,032	0,025735
6	0,0345	0,027574



Grafik 4. Grafik perubahan kandungan kadar hidrogen peroksida di dalam susu segar yang disimpan dalam suhu kamar.

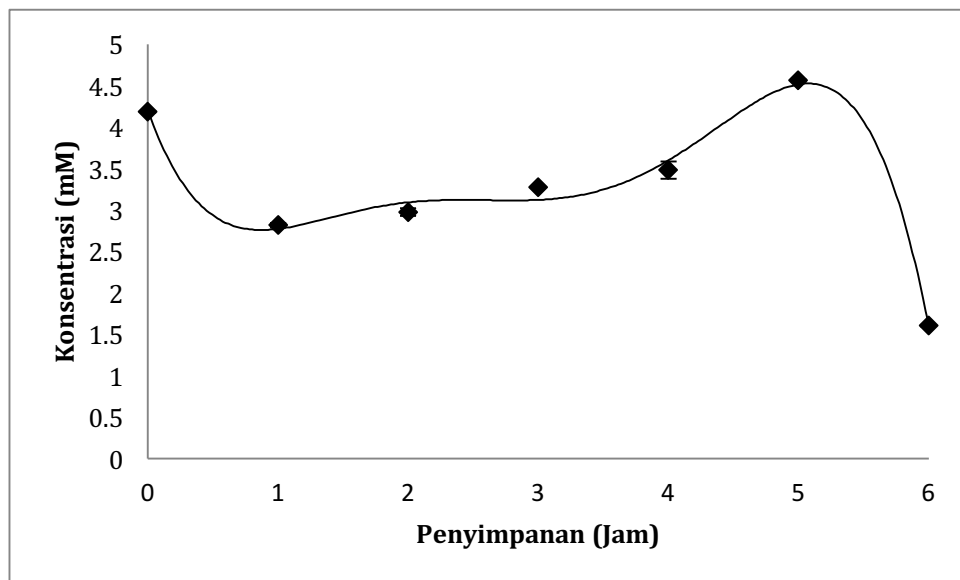
Hidrogen peroksida merupakan komponen pembentuk sistem laktoperoksidase. Hidrogen peroksida pada jam ke 0 cukup tinggi karena hidrogen peroksida disekresikan oleh semua kelenjar termasuk kelenjar mammae. Kadar hidrogen peroksida pada jam pertama hingga jam kedua menurun. Penurunan hidrogen peroksida ini disebabkan hidrogen peroksida dimanfaatkan dalam pembentukan sistem laktoperoksida dimana hidrogen peroksida mengoksidasi SCN bersama enzim LPO hingga terurai.

Kandungan H_2O_2 di dalam susu pada jam ke 3 hingga jam ke 6 mulai meningkat. Hal ini dikarenakan senyawa H_2O_2 tidak dapat terurai dan dimanfaatkan untuk membentuk sistem LPO sehingga kandungannya di dalam susu meningkat. Hal ini terjadi karena enzim laktoperoksidase di dalam susu aktivitasnya mulai menurun dan hilang pada jam ke 3 sampai jam ke 6 sehingga tidak tersedia LPO sebagai katalisator untuk memecah H_2O_2 .

Kandungan thiocyanate di dalam susu segar

Tabel 3. Data jumlah thiocyanate yang ada di dalam susu segar yang disimpan dalam suhu kamar

Penyimpanan (jam)	Absorbansi (nm)	Konsentrasi (mM)
0	0,685	4,184375
1	0,467	2,81875
2	0,492	2,975
3	0,540	3,278125
4	0,573	3,48125
5	0,746	4,5625
6	0,273	1,60625



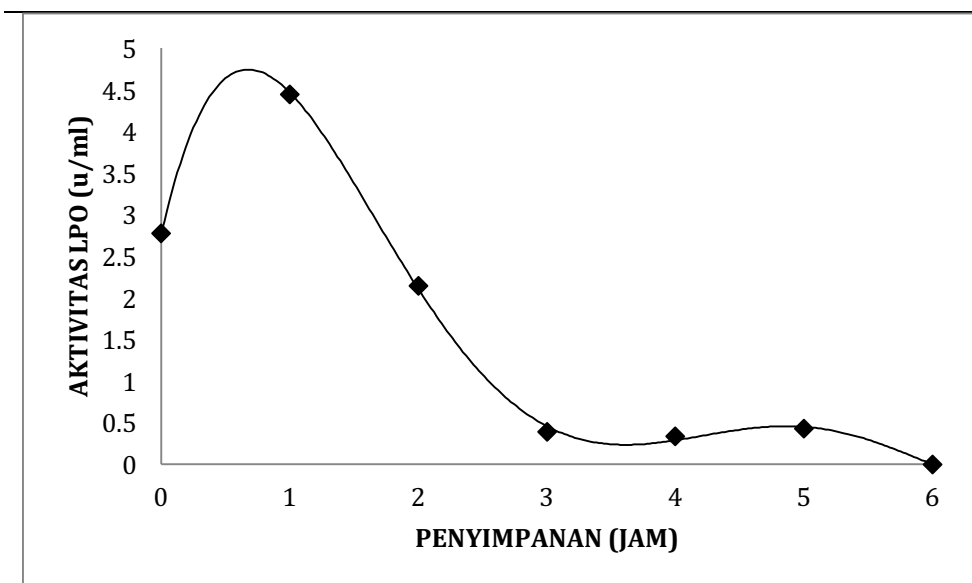
Grafik 5. Grafik perubahan kadar thiocyanate di dalam susu segar yang disimpan dalam suhu kamar.

Thiocyanate merupakan komponen yang tersedia di dalam susu dan merupakan salah satu komponen pembentuk sistem laktoperoksidase. Kandungan thiocyanate di dalam susu selama penyimpanan tidak drastis berubahannya namun pada jam pertama hingga jam keempat keberadaan ion thiocyanate di dalam susu menurun dan pada jam kelima meningkat. Penurunan ion thiocyanate pada jam pertama hingga jam keempat disebabkan senyawa thiocyanate digunakan untuk pembentuk sistem LPO sehingga SCN di dalam susu akan diubah oleh enzim LPO bersama oksigen membentuk OSCN.

Aktivitas Laktoperoksidase pada Susu Segar

Tabel 4. Aktivitas LPO di dalam susu segar yang disimpan dalam suhu kamar

Penyimpanan (jam)	Absorbansi (nm)	Aktivitas LPO (U/ml)
0	0,15	2,778
1	0,24	4,444
2	0,11	2,1481
3	0,02	0,3889
4	0,02	0,3333
5	0,02	0,4259
6	0	0

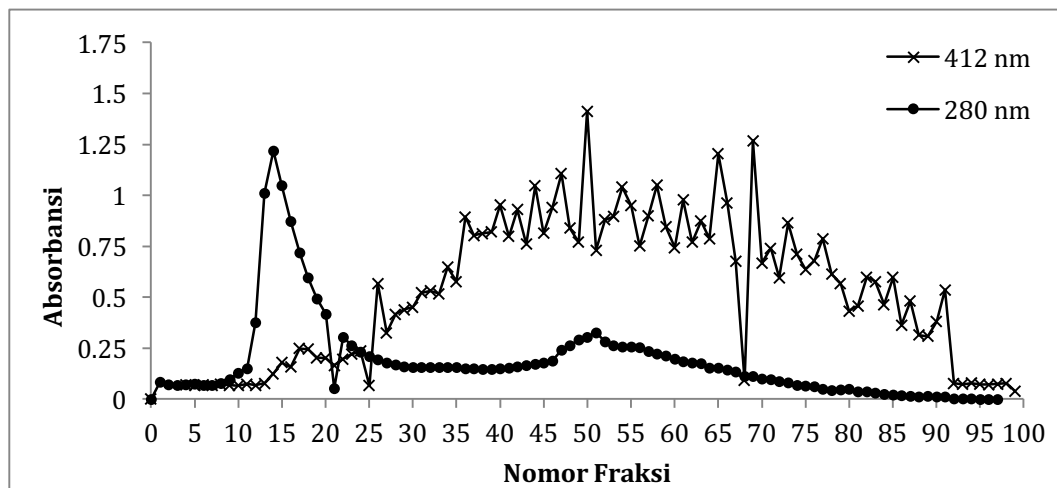


Grafik 6. Grafik penurunan aktivitas LPO di dalam susu segar yang disimpan dalam suhu kamar

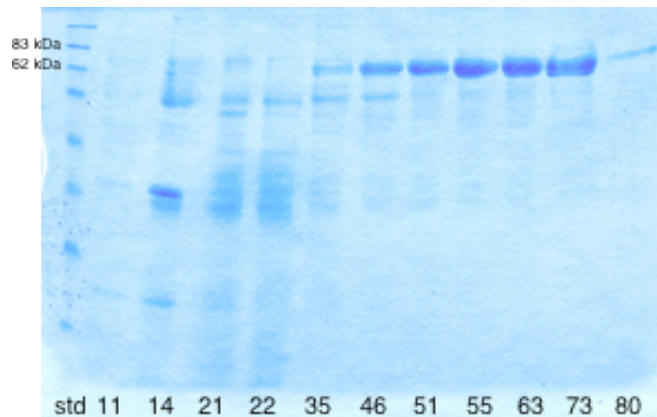
Laktoperoksidase merupakan salah satu enzim yang terdapat di dalam susu. Enzim ini masih stabil meskipun dipanaskan pada suhu 30°C. Menurut Kussendrager dan Hooijdonk (2000) enzim LPO ini mengkatalisis peroksida dan thiocyanate untuk menghasilkan produk yang dapat membunuh pertumbuhan mikroba.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin lama susu disimpan aktivitas laktoperoksidase di dalam susu menurun. Aktivitas laktoperoksidase pada jam ke 0 sebanyak 2,7778 U/ml, jam ke 1 sebanyak 4,4444 U/ml berangsur-angsur menurun hingga jam ke 5 aktivitasnya menjadi 0,4259U/ml. Laktoperoksidase di dalam susu mulai turun drastis pada jam ke 3 sampai jam ke 6 selama penyimpanan. Hal ini kemungkinan disebabkan LPO ini digunakan untuk membentuk senyawa OSCN sebagai antimikroba di dalam susu. Ketika LPO pada jam ke 3 sampai jam ke 6 rendah maka senyawa OSCN yang terbentuk sebagai sistem antimikroba juga menurun.

Purifikasi LPO



Grafik 7. Absorbansi cairan yang diambil dari Sepharose setelah dialiri secara berturut-turut: whey dan 0.01 mM NaCl. Cairan ini diambil dengan cara dilusi dengan larutan 0.05 mM NaCl dalam phosphate buffer pH 7.0. Cairan ini (masing-masing sebanyak 5 ml) ditampung ke dalam tabung reaksi. Proses pengambilan cairan dari Sepharose ini berlangsung dalam suhu 4°C.



Ilustrasi 3. Profil SDS PAGE Electrophoresis 11 fraksi pilihan yang diambil dari Sepharose setelah didilusikan dengan 0.05 mM NaCl. Bagian paling kiri adalah standar protein marker. Tampak dalam gambar, enzim LPO terdeteksi mulai fraksi ke 51 hingga 73.

Guna mengimobilisasi LPO ke dalam Sepharose, maka diperlukan enzim LPO murni yang diambil dari whey. Untuk itulah dalam penelitian ini diperlukan purifikasi LPO dengan menggunakan kromatografi kolom terbuka dengan menggunakan resin Sepharose FF Big Beads. LPO diambil dari whey yang dialirkan ke dalam kolom yang kemudian dialiri secara berturut-turut dengan 0.01 mM NaCl dan 0,05 mM NaCl. Sebanyak 5 ml cairan yang keluar dari kolom dikumpulkan menjadi satu fraksi yang kemudian langsung diukur absorbansinya pada 280 nm guna memprediksi kuantitas protein di dalam masing-masing fraksi. Hasil pengukuran fraksi pada spektrofotometer dapat dilihat pada Grafik 2. Fraksi yang berhasil dikumpulkan kemudian diukur perkiraan aktivitas LPO nya dengan mereaksikan LPO dengan ABTS dan H₂O₂. Hasil dari prediksi aktivitas LPO masing-masing fraksi dapat dilihat pada Grafik 2. Terdapat dua macam puncak pada fraksi-fraksi yang dideteksi pada spektrometer dengan 280 nm, yaitu pada fraksi nomor 15 dan 50 sebagai indikator bahwa fraksi-fraksi ini memiliki protein yang tinggi. Akan tetapi fraksi dengan tinggi tingkat proteinnya, belum tentu memiliki kandungan LPO yang juga tinggi, sehingga perlu dilakukan analisis aktivitas LPO dan analisis profil enzim dengan menggunakan SDS PAGE Electrophoresis.

Setelah dilakukan konfirmasi data dengan aktivitas LPO sebagaimana terlihat pada Grafik 2 (absorbansi 412 nm) maka didapat kesimpulan bahwa aktivitas LPO mulai nampak pada fraksi nomor 26 dan akan hilang pada fraksi nomor 90. Oleh karena itu, fraksi-fraksi diantara 26 hingga 90 dapat disimpulkan mengandung LPO. Namun karena dalam penelitian ini bertujuan mengimobilisasi enzim LPO maka fraksi yang mengandung LPO saja yang dapat dipilih. Untuk mendapatkan profil kemurnian enzim, maka dilakukan analisa SDS PAGE. Setelah dilakukan cross check dengan hasil analisa SDS PAGE Electrophoresis ternyata enzim LPO (dengan berat molekul 78 KDa) dapat ditemukan pada fraksi nomor 51 hingga 73. Oleh karena itu, fraksi nomor 51-73 dikumpulkan untuk mendapatkan cairan yang hanya mengandung satu enzim, yaitu enzim LPO.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Makoto et al. (2010) bahwa untuk enzim LPO lazim didapat dari fraksi-fraksi mulai fraksi ke-50 hingga 30 hingga 40 fraksi setelahnya tergantung jenis pelarut dan molaritas pelarut yang digunakan. Peneliti lain juga melakukan hal yang tidak jauh berbeda dalam hal metode purifikasi LPO namun dengan variasi yang berbeda dalam hal konsentrasi dan aktivitas LPO yang didapat (Touch et al., 2004).

Uji Ketahanan LPO

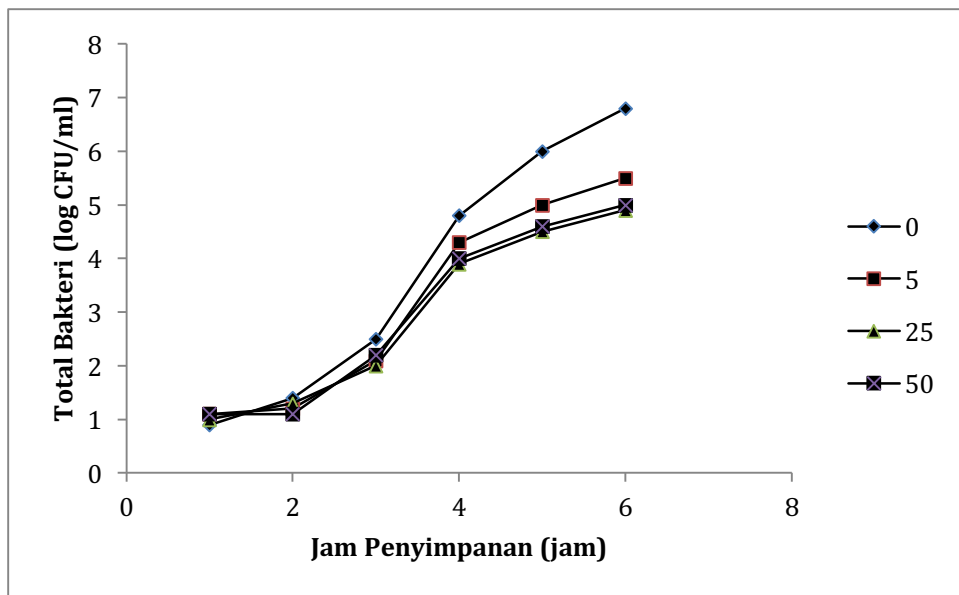
Tabel 5. Aktivitas LPO yang terikat di dalam FF Sepharose Bead yang disimpan di dalam berbagai jenis larutan selama 4 minggu pada suhu 4° dan 10°C

Penyimpanan (minggu)	Aktivitas LPO (Unit)					
	4°C			10°C		
	Buffer Phosphate	Wh ey	Aquad es	Buffer Phosphate	Wh ey	Aquad es
1	108	104	100	101	90	90
2	106	108	90	87	71	67
3	105	104	70	56	54	33
4	97	106	31	39	50	10

Tabel 1 memberikan gambaran bahwa LPO yang terikat di dalam resin (FF Sepharose Beads) dapat dipertahankan aktivitasnya jika disimpan di dalam suhu 4°C dengan menggunakan buffer phosphate dan whey sebagai larutan

perendamnya. Penelitian ini menggunakan LPO yang diambil dari whey susu sapi dan dari hasil purifikasi LPO yang telah dilaksanakan, menghasilkan LPO dengan aktivitas sebesar 108 U/ml. Berdasarkan LPO mula-mula, maka dapat disimpulkan bahwa perendaman LPO dalam buffer dan whey serta penyimpanan di dalam suhu 4°C selama 4 minggu dapat mempertahankan aktivitas LPO sebesar 89% dan 98%, masing-masing untuk buffer dan whey. Penyimpanan dalam aquades hanya mampu mempertahankan aktivitas LPO sebesar 29%. Walaupun penyimpanan pada suhu 4°C dinilai dapat mempertahankan aktivitas LPO, namun ketika suhu penyimpanan berubah menjadi 10°C maka tidak dapat mempertahankan aktivitas LPO dengan baik terbukti aktivitas LPO dapat menurun hingga 9%. Berdasarkan hasil penelitian ini, maka untuk penelitian selanjutnya LPO yang terikat di dalam resin disimpan di dalam whey.

Total Bakteri dengan perlakuan penambahan LPO

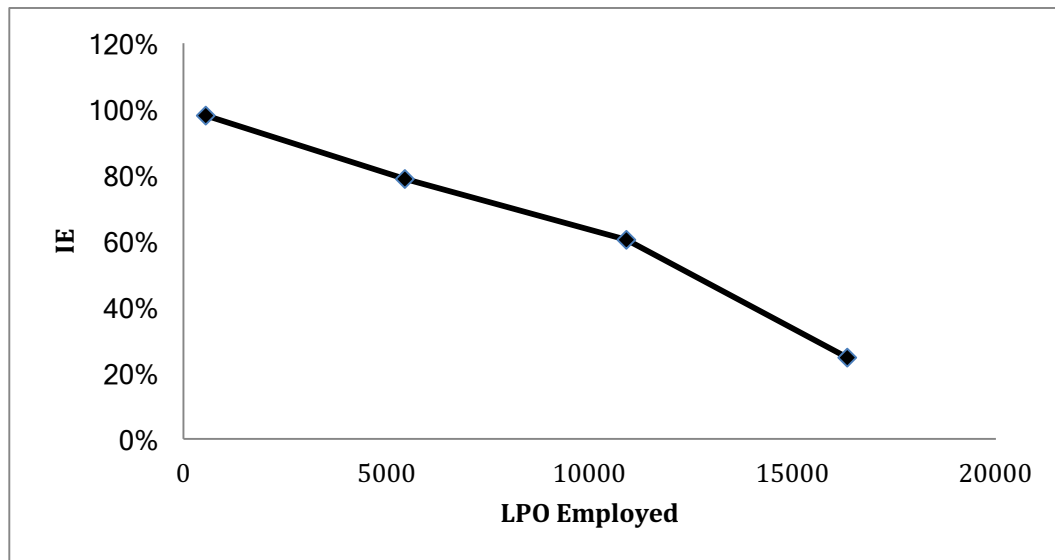


Grafik 8. Grafik total bakteri pada susu segar yang disimpan pada suhu kamar selama 6 jam setelah dilakukan penambahan LPO dengan tingkat aktivitas yang berbeda (0, 5, 25, dan 50 U/ml).

Berdasarkan grafik yang ada pada Ilustrasi 3, dapat disimpulkan bahwa total bakteri pada susu segar dapat ditekan perkembangannya dengan adanya penambahan LPO. Penggunaan LPO dengan aktivitas 5 U/ml dapat menurunkan populasi bakteri lebih dari 1 log CFU/ml. Penambahan LPO dengan berbagai tingkat aktivitas yang bervariasi di atas 5 U/ml terbukti dapat lebih menurunkan total bakteri (hingga 4,9 log CFU/ml) walaupun dinilai tidak efektif.

Penurunan sebanyak 1 log CFU/ml dinilai sangat bermakna terlebih lagi karena susu segar tersebut akan disetor ke IPS yang mempunyai peraturan ketat dalam total bakteri. Susu dengan total bakteri lebih dari 6 log CFU/ml akan ditolak oleh IPS. Sehingga sebagaimana tertera pada Ilustrasi 3, susu segar setelah 6 jam diperah dapat dipastikan ditolak oleh IPS sedangkan susu dengan penambahan LPO dapat dipastikan lolos uji bakteri pada IPS.

Efisiensi Imobilisasi LPO kedalam sepharose



Grafik 9. Penurunan efisiensi imobilisasi pada sepharose ketika digunakan untuk mengimobilisasi LPO. Kisaran LPO yang digunakan untuk mengetahui efisiensi imobilisasi ini adalah 540 - 16200 U/ml

Tabel 1 menunjukkan penggunaan resin sepharose fast flow (SP-FF) dalam menangkap laktoperoksidase (LPO) dalam berbagai unit LPO yaitu 540, 10.800, dan 16.200 U/ml LPO. Enzim laktoperoksidase yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari whey susu sapi. Pemisahan laktoperoksidase dalam penelitian ini dengan metode *ion exchange chromatografi* menggunakan sepharose fast flow (SP-FF).

Grafik hasil penelitian menunjukkan bahwa resin sepharose fast flow (SP-FF) memiliki keterbatasan dalam kemampuan mengimobilisasi LPO. Semakin banyak enzim yang ditambahkan akan mempengaruhi kemampuan sepharose dalam mengimobilisasi LPO. Hal ini terlihat dari grafik bahwa semakin besar unit LPO yang dialirkan pada *ion exchange chromatografi* maka kemampuan sepharose dalam menangkap LPO akan semakin menurun.

Sepharose FF sebanyak 1 gram dinilai optimum dalam mengimobilisasi enzim LPO hingga 540 unit dengan laju aliran 1 ml/ menit. Sepharose memiliki kemampuan dalam menangkap LPO hal ini terlihat bahwa ketika SP-FF dialirkan enzim laktoperoksidase 100 hingga 500 unit, SP-FF masih memiliki efisiensi

imobilisasi yang tinggi ($\pm 97\%$, data tidak ditampilkan). Ternyata jika dilakukan penambahan unit LPO yang dialirkan melalui SP-FF (melebihi 540 unit), maka terlihat pada grafik 9, SP-FF tidak mampu lagi untuk menangkap enzim secara optimal. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Al-Baarri *et al* (2012) menunjukkan bahwa 1 gram SP-FF efektif untuk menyerap 300 ml whey, (750 unit/ml LPO), dengan demikian dapat dinyatakan bahwa aktivitas adsorpsi optimum sepharose sebanyak 750 unit. Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Al-Baarri (2010) menunjukkan bahwa SP-FF mampu mengimobilisasi enzim LPO murni sebanyak 600 unit/ ml per gram sepharose. Berdasarkan data yang didapatkan pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa imobilisasi efisiensi LPO yang paling efektif dengan menggunakan sepharose fast flow adalah sebanyak 540 U/ml LPO.

Pembuatan membran LPO

Membran LPO akan dibuat dengan menempatkan Sepharose Fast Flow di dalam berbagai macam jenis kain penyaring yang terbuat dari nylon dan polyester. Proses pembuatannya adalah dengan menggunting 2 helai kain tersebut menjadi berbentuk lingkaran dengan diameter 9 cm. Lingkaran dengan diameter sebesar 9 cm ini ditujukan untuk memberikan ukuran yang sesuai dengan mesin press yang lazim dijumpai di pasaran. Kemudian diantara 2 lembar kain tersebut, diletakkan sebanyak 1 g SP-FF berat basah yang kemudian diratakan hingga ke seluruh permukaan kain. Setelah itu, kedua helai kain tersebut ditempatkan kedalam mesin press hingga tepi kedua helai kain tersebut akhirnya menyatu dan membentuk suatu bentuk yang kaku dan siap digunakan untuk menyaring susu segar.

Dalam percobaan tingkat laboratorium ini, berdasarkan data yang didapat dari penelitian sebelumnya maka digunakan LPO sebesar 540 U/ml. Cara imobilisasi yang dilakukan adalah dengan menempatkan membran yang sudah terisi dengan SP-FF ke dalam larutan LPO sebanyak 100 ml. Karena setiap mililiter larutan LPO mengandung 54 U, maka sejumlah 100 ml dapat diartikan mempunyai kandungan LPO sebesar 540 U. Pencelupan ke dalam larutan LPO ini

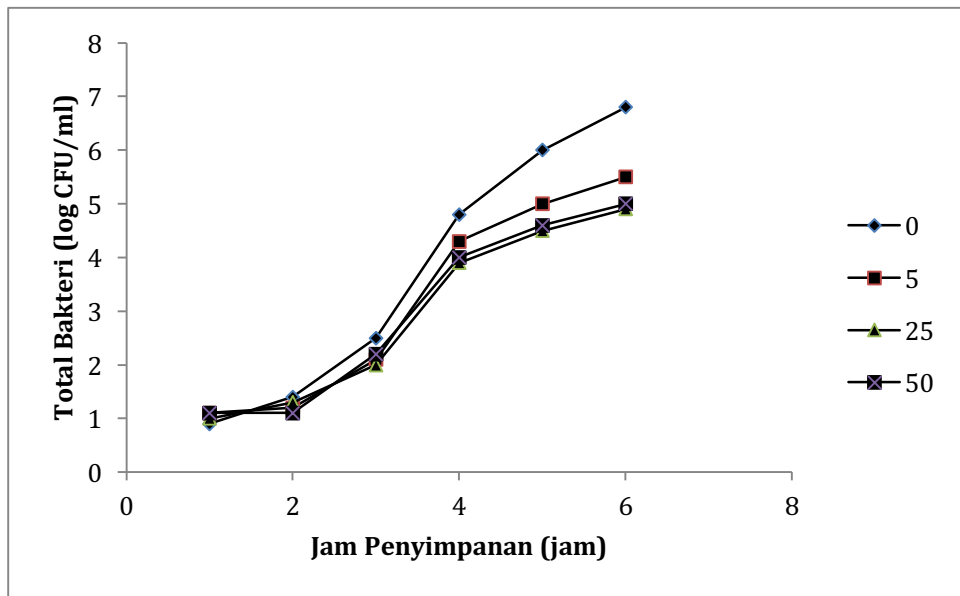
dilakukan selama 30 menit di dalam suhu 4°C untuk menghindari penurunan aktivitas enzim.

Setelah dilakukan proses pencelupan, maka LPO-Sepharose Membrane siap digunakan untuk menyaring susu segar. Tahap penelitian laboratorium digunakan susu segar dengan kapasitas 100 – 1000 mL. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada grafik berikut ini.

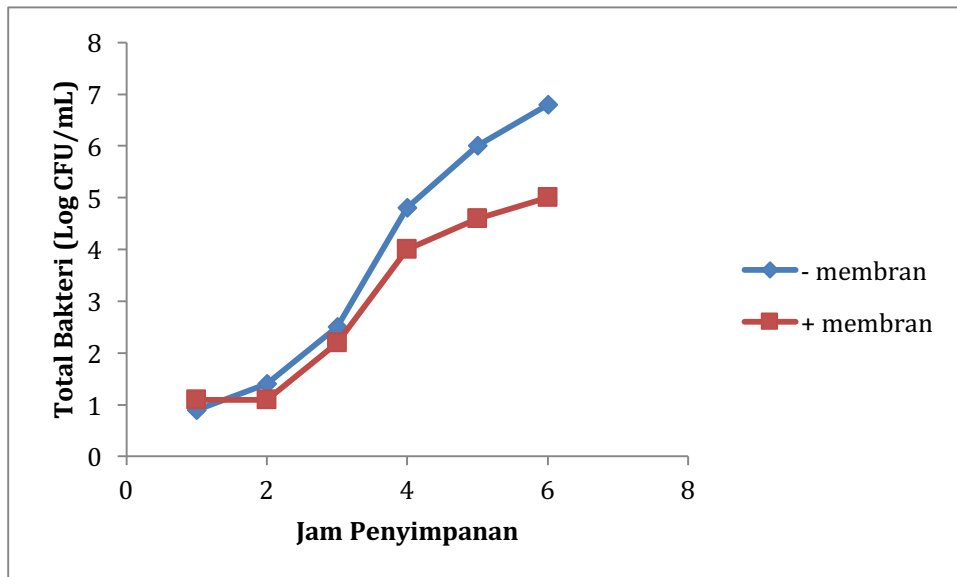
Tabel 6. Daya tahan dan laju alir dua jenis kain: kain nylon dan polyester, yang digunakan untuk bahan membuat membran

	Jenis Kain	
	Nylon	Polyester
Daya tahan	93%	75%
Laju alir per menit	5 L	4 L

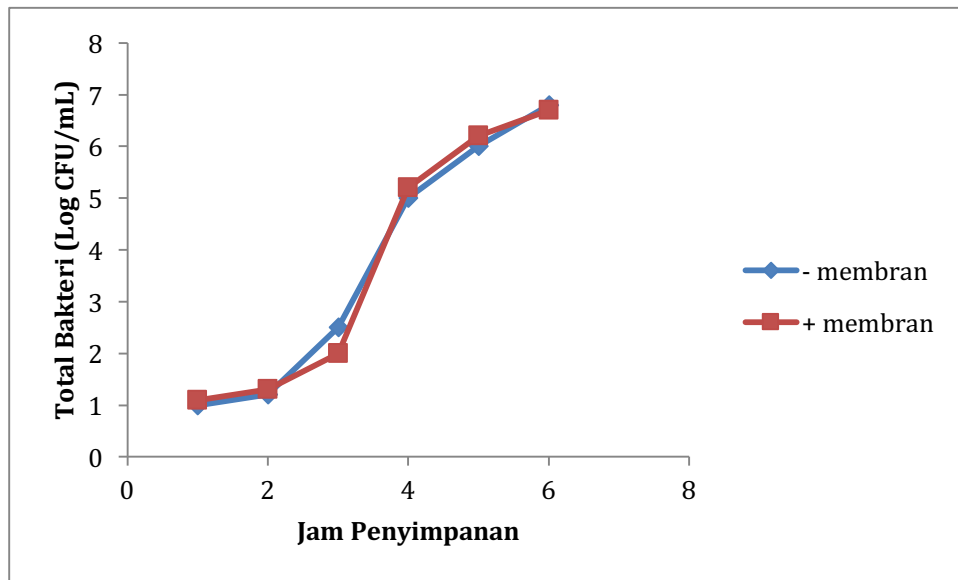
Keterangan: Daya tahan adalah daya untuk menahan sepharose agar tidak lolos melewati kain yang dihitung dalam persentase (persentase berat sepharose yang tertahan di kain dibagi dengan berat sepharose mula-mula)



Grafik 10. Perkembangan total bakteri di dalam susu segar dengan penambahan LPO yang terimobilisasi didalam resin.



Grafik 11. Perbedaan total bakteri tiap jam di dalam susu segar yang disaring melewati lactoperoxidase-sepharose-membrane pada jam ketiga

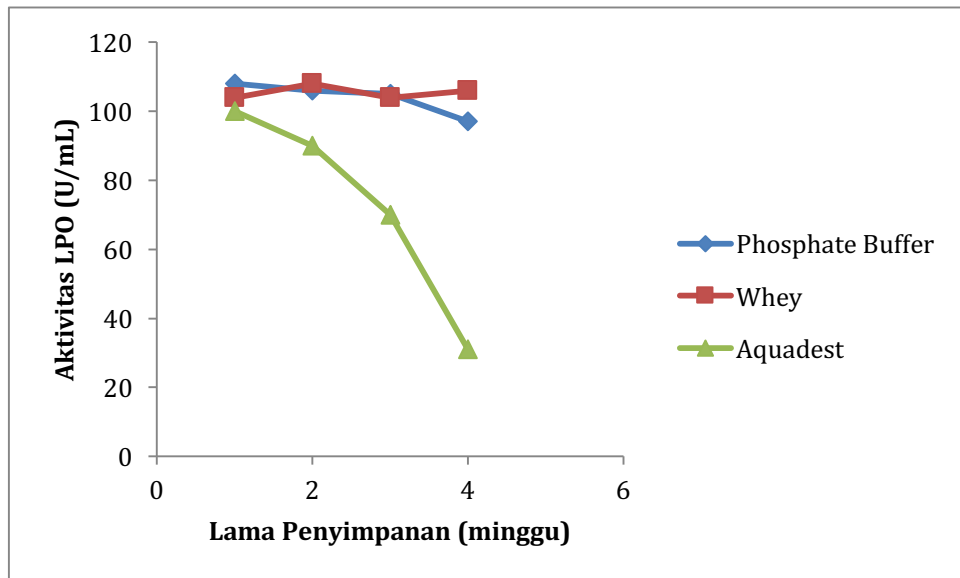


Grafik 12. Perbedaan total bakteri tiap jam di dalam susu segar yang disaring melewati lactoperoxidase-sepharose-membrane pada jam pertama

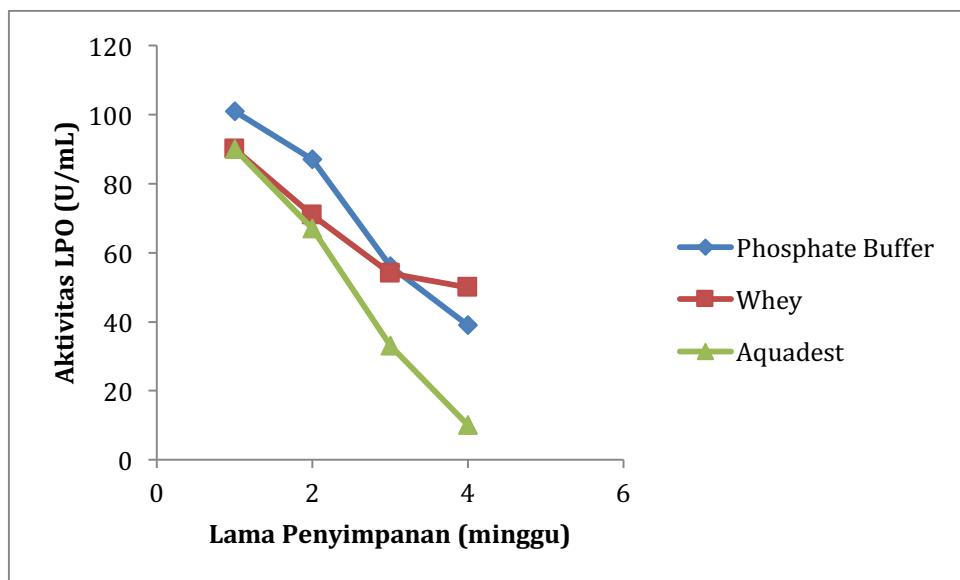
Berdasarkan grafik 11 dan 12 maka dapat disimpulkan bahwa lactoperoxidase-sepharose-membrane telah terbukti berhasil menekan perkembangan total bakteri pada susu segar disimpan pada suhu kamar selama 6 jam penyimpanan. Sebagaimana terlihat pada grafik 11, penggunaan membran untuk menyaring susu pada jam ke tiga masa penyimpanan, dapat menurunkan total bakteri pada jam keenam penyimpanan sebanyak sekitar 1 log unit. Angka penurunan ini sangat berarti bagi peternak yang menyeter susu ke industri pengolahan susu yang mempunyai persyaratan angka kuman atau total bakteri sebesar 6 log unit.

Penelitian dengan melakukan penyaringan susu segar pada jam pertama (grafik 11), tidak didapat hasil yang memuaskan. Sebagaimana terlihat pada grafik 11, tidak ada perbedaan total bakteri antara susu yang disaring dengan susu yang tidak disaring. Oleh karena itu, rekomendasi yang dapat diberikan adalah penggunaan membran pada jam ketiga.

Penyimpanan membran



Grafik 13. Penurunan aktivitas LPO dalam membran yang direndam dengan menggunakan tiga jenis larutan perendam dalam suhu 10°C



Grafik 14. Penurunan aktivitas LPO dalam membran yang direndam dengan menggunakan tiga jenis larutan perendam dalam suhu 25°C

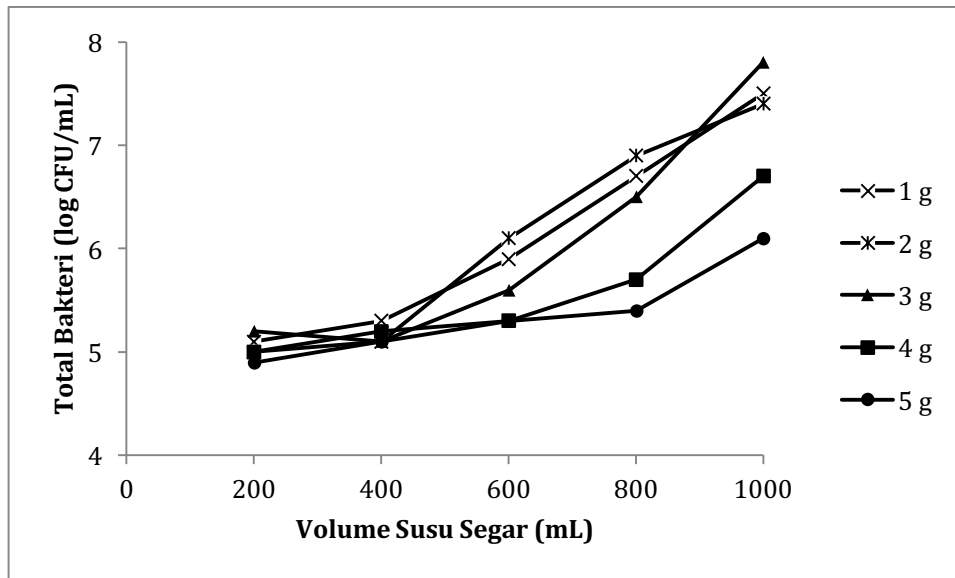
Sebagaimana terlihat pada Grafik 13 dan 14, aktivitas LPO dalam membran menurun seiring dengan lamanya penyimpanan. Pada grafik 13, didapat kesimpulan bahwa perendaman pada suhu 10°C dengan menggunakan phosphate buffer atau whey, dapat menekan nilai penurunan aktivitas LPO. Penurunan yang cukup tajam terjadi pada membran yang direndam dalam aquades.

Penurunan yang tajam terjadi pada membran yang direndam dengan menggunakan ketiga jenis bahan perendam pada suhu penyimpanan 25°C. Walaupun terjadi penurunan hingga 50% aktivitasnya, perendaman dalam phosphate buffer atau whey, dapat lebih menekan nilai penurunan dibandingkan dengan perendaman dalam aquades.

Berdasarkan tahap penelitian ini, dengan memperhatikan faktor ketersediaan bahan dan kemudahan bahan untuk didapat, maka perendaman dengan menggunakan whey merupakan perendaman yang terbaik dibandingkan dengan phosphate buffer. Perendaman di dalam aquades tidak disarankan karena akan menurunkan aktivitas LPO secara drastis walaupun disimpan dalam suhu dingin (10°C).

Perbesaran volume susu segar yang disaring

Susu segar yang digunakan dalam penelitian terdahulu adalah susu segar dengan kapasitas 100 mL dan menunjukkan penurunan total bakteri sebanyak 1 log CFU/mL. Upaya ini perlu dikembangkan untuk dapat diaplikasikan pada susu dengan volume yang lebih besar sehingga dapat digunakan di masyarakat. Untuk itulah, penelitian tahap berikutnya adalah menggunakan susu dengan kapasitas lebih besar dan dengan kapasitas Sepharose yang lebih besar lagi. Penelitian tersebut menggunakan susu segar dengan volume 1000 mL dan dengan Sepharose sebanyak 5 g. Hasil dari penelitian tahap ini dapat dilihat pada grafik 15.



Grafik 15. Total bakteri (dalam CFU/mL) pada berbagai macam volume susu segar yang dibiarkan selama 6 jam pada suhu kamar setelah mendapat perlakuan penyaringan dengan menggunakan Lactoperoxidase-sepharose-membrane pada jam ketiga penyimpanan.

Grafik 15 didapat dari perhitungan total bakteri pada susu segar setelah melewati Lactoperoxidase-sepharose-membran. Secara teknis, susu segar yang didapat dari pemerahan, kemudian diinkubasi pada suhu kamar didalam tempat yang steril kemudian pada jam ketiga dilewatkan melalui membran. Sepharose yang digunakan untuk pembuatan Lactoperoxidase-membran adalah berkisar dari 1 sampai 5 g dan susu segar yang dilewatkan melalui membran tersebut adalah berkisar dari 200 hingga 1000 mL. Setelah melewati membran, susu segar diteruskan proses inkubasinya hingga jam keenam dan kemudian dihitung total bakterinya.

Sebagaimana tampak pada grafik 15 bahwa semakin banyak volume sepharose yang digunakan di dalam membran, maka akan semakin menekan total bakteri pada susu segar yang diinkubasi pada jam keenam. Hal ini terlihat dari penggunaan 5 g sepharose ternyata dapat menekan populasi bakteri pada susu segar sebanyak 1000 mL pada jam keenam inkubasi.

Bab V. Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

Komponen indigenous LPOS yaitu SCN^- , H_2O_2 , dan OSCN^- telah berhasil dideteksi dengan baik dan masih dianggap layak untuk mengaktifkan LPOS di dalam susu. Berdasarkan data penelitian penggunaan volume sepharose, maka volume sebanyak 1 gram adalah yang paling optimal untuk digunakan untuk menyaring susu sebanyak 1 liter. Perlakuan penyaringan susu melalui membran ini dapat secara efektif dilakukan pada susu segar yang telah berumur 3 jam setelah pemerahan. Metode penyaringan melalui membran ini berhasil untuk menekan angka kuman pada susu segar sebesar 1 log CFU/ml, artinya susu segar yang telah disaring dengan membran ini dapat ditekan angka kumannya dari 1 juta CFU/ml menjadi 100 ribu CFU/ml. Penelitian ini dinilai sangat tepat untuk diaplikasikan di masyarakat terutama masyarakat peternak dan KUD.

Saran

Tahap penelitian selanjutnya direncanakan aplikasi teknologi tepat guna lactoperoxidase-sepharose-membrane di tingkat masyarakat yaitu peternak dan KUD. Oleh karena itu, besar harapannya untuk mendapat nominasi untuk pendanaan di tahun kedua.

Hambatan Penelitian

1. Secara umum, tidak ada hambatan yang berarti dalam penelitian ini, namun perlunya adanya peningkatan sikap disiplin dalam hal hak dan kewajiban antara peneliti dan RISTEK.

Tahap Penelitian akan Dilakukan pada Tahun Kedua

1. Melakukan immobilisasi LPO ke dalam Sepharose dalam jumlah besar sehingga dapat diaplikasikan di masyarakat
2. Menyempurnakan prototipe Lactoperoxidase-sepharose-membran untuk mudah ditempatkan di dalam wadah yang digunakan untuk menampung susu di kalangan peternak (*milkcan*)
3. Melakukan sosialisasi penggunaan Lactoperoxidase-sepharose-membrane di kalangan peternak dan KUD
4. Memantau aplikasi di lapangan sehingga pemakaian Lactoperoxidase-sepharose-membrane dapat digunakan dengan baik
5. Memperbaiki segala kekeliruan yang terjadi sebagai akibat kesalahan penggunaan Lactoperoxidase-sepharose-membrane di lapangan. Kesalahan ini mungkin terjadi sebagai akibat penerapan teknologi baru yang belum lazim digunakan
6. Melakukan pendampingan hingga pemakai (peternak) mampu untuk merawat dan mengisi ulang Lactoperoxidase-sepharose-membrane secara mandiri
7. Melakukan upaya komersialisasi produk Lactoperoxidase-sepharose-membrane dan upaya pendaftaran hak patent.

Daftar Pustaka

- Al-Baarri, A. N. 2011. Lactoperoxidase Activity on Bovine Whey at Critical Temperature Storage. *Unpublished data*.
- Al-Baarri, A. N., Hayashi, M., Ogawa, M. & Hayakawa, S. 2011a. Effects of mono- and di-saccharides on the antimicrobial activity of bovine lactoperoxidase system. *Journal of Food Protection*, 74, 134–139.
- Al-Baarri, A. N., Legowo, A. M., Ogawa, M. & Hayakawa, S. 2011b. Application of an immobilized lactoperoxidase to continuous hypochlorite production. *Journal of Food Science (submitted)*.
- Al-Baarri, A. N., Ogawa, M. & Hayakawa, S. 2010. Scale-up studies on immobilization of lactoperoxidase using milk whey for producing antimicrobial agent. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 35, 185–191.
- Al-Baarri, A. N., Ogawa, M. & Hayakawa, S. 2011c. Application of lactoperoxidase system using bovine whey and the effect of storage condition on lactoperoxidase activity. *International Journal of Dairy Science*, 6, 72–78.
- Asaah, N. O., Fonteh, P. Kanga, S. Mendi, H. Imele. 2007. Activation of the lactoperoxidase system as a method of preserving raw milk in areas without cooling facilities. *African J. Food Agr. Nutr. Develop.*, 7, 1-15.
- Barrett, N. E., Grandison, A. S. & Lewis, M. J. 1999. Contribution of the lactoperoxidase system to keeping quality of pasteurized milk. *Journal of Dairy Research*, 66, 73-80.
- Boots, J.-W. & Floris, R. 2006. Lactoperoxidase: from catalytic mechanism to practical applications. *International Dairy Journal*, 16, 1272-1276.
- Borch, E., Wallentin, C., Rosén, M. & Björck, L. 1989. Antibacterial effect of the lactoperoxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide system against strains of *Campylobacter* isolated from poultry. *Journal of Food Protection*, 52, 638–641.
- Buckle, K. A. 1987. *Ilmu Pangan*. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Clausen, M. R., Skibsted, L. H. & Stagsted, J. 2008. Inhibition of lactoperoxidase-catalyzed 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) and tyrosine oxidation by tyrosine-containing random amino acid copolymers. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 8692–8698.
- Dirjen–Peternakan. 2011. Data Statistik Peternakan Dirjen Peternakan Republik Indonesia. Direktorat Jendral Peternakan Republik Indonesia.
- Drgalić, I., Tratnik, L. & Božanić, R. 2005. Growth and survival of probiotic bacteria in reconstituted whey. *Lait*, 85, 171–179.
- FAO. 2005. Benefits and potential risks of the lactoperoxidase system of raw milk preservation. Report of an FAO/WHO technical meeting. FAO/WHO, Rome, Italy. 28th November – 2nd December 2005.
- FSANZ. 2002. Application A404 lactoperoxidase system. Food Standards Australia New Zealand Final Assesment Report. 18 December 2002.
- Hayashi, M. & Al-Baarri, A. N. 2010. Fixed Method of lactoperoxidase purification using Sepharose Fast Flow Column resin. *Unpublished data*.

- Jay, I. M. 2000. Taxonomy, Role, and Significance of Microorganisms in Food. *Modern Food Microbiology*. Aspen Publishers, Gaithersburg MD.
- Kussendrager, K. D. & Hooijdonk, A. C. M. v. 2000. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence mechanism of action and application. *British Journal of Nutrition*, 84, S19-S25.
- Legowo, A. M. 2003. Mengawetkan susu segar dengan LP-system. *Harian Kompas*. Harian-Kompas, Jakarta.
- Legowo, A. M., Al-Baarri, A. N., Ogawa, M. & Hayakawa, S. 2011. The Performance Inhibition of Ketoheoses and Aldoheoses in Lactoperoxidase Activity Assay. *Proceedings of the International Conference of Indonesian Society Lactic Acid Bacteria (In Press)*.
- Legowo, A. M., Kusrahayu & Mulyani, S. 2009. *Ilmu dan Teknologi Susu*. Badan Penerbit Universitas Diponegoro, Semarang.
- Munir, A. M. 2010. Nestlé Indonesia Inc., Unpublished Data.
- Østdal, H., Bjerrum, M. J., Pedersen, J. A. & Andersen, H. J. 2000. Lactoperoxidase-induced protein oxidation in milk. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3939 - 3944.
- Pruitt, K. M., Kamau, D. N., Miller, K., Mansson-Rahemtulla, B. & Rahemtulla, F. 1990. Quantitative, standardized assays for determining the concentrations of bovine lactoperoxidase, human salivary peroxidase, and human myeloperoxidase. *Analytical Biochemistry*, 191, 278-286.
- Reiter, B. & Harnulv, B. G. 1984. Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. *Journal of Food Protection*, 47, 724–732.
- Seifu, E., Buys, E. M. & Donkin, E. F. 2005. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 137-154.
- Seifu, E., Buys, E. M. & Donkin, E. F. 2007. Potential of Lactoperoxidase to diagnose subclinical mastitis in goats. *Small Ruminant Research*, 69, 154-158.
- Seifu, E., Buys, E. M., Donkin, E. F. & Petzer, I.-M. 2004. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against food-borne pathogens in Saanen and South African Indigenous goat milk. *Food Control*, 15, 447–452.
- Shakeel-ur, R., Farkye, N. Y. & Hubert, R. 2002. Enzymes indigenous to milk - lactoperoxidase. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Oxford: Elsevier., 938–941.
- Tempo. 2010. Puluhan Siswa SD Keracunan Susu Kadaluwarsa. Tempo Interaktif, Lumajang.
- Touch, V., Hayakawa, S., Yamada, S. & Kaneko, S. 2004. Effect of lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system on Salmonella enteritidis in animal or vegetable foods. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 175-183.
- Wit, J. N. d. & Hooydonk, A. C. M. v. 1996. Structure, functions, and application of lactoperoxidase in natural antimicrobial system. *Netherland Milk and Dairy Journal*, 50.

- Wolfson, L. M. & Sumner, S. S. 1993. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: A Review *Journal of Food Protection*, 56, 887-892.
- Yener, F. Y. G., Korel, F. & Yemenicioğlu, A. 2009. Antimicrobial activity of lactoperoxidase system incorporated into cross-linked alginate films. *Journal of Food Science*, 74, M73-M79.