

## KONSENTRASI MINIMUM SISTEM LAKTOPEROKSIDASE UNTUK MENEKAN PERTUMBUHAN *Escherichia coli* PADA SUSU SAPI SEGAR

[*Minimum Inhibitory Concentration of Lactoperoxidase System Against Escherichia coli in Fresh Bovine Milk*]

Bagus Fitriansyah<sup>1)</sup>, Ahmad Ni'matullah Al-Baarri<sup>2)\*</sup>, dan Anang Mohamad Legowo<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Jurusan Peternakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro Semarang, Semarang

<sup>2)</sup> Jurusan Pertanian, Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro Semarang, Semarang

Diterima 04 Maret 2015 / Disetujui 29 Juni 2015

### ABSTRACT

Fresh milk production in Central Java has increased every year resulting in the requirement of the rapid and good process for fresh milk handling to keep the quality against bacteria. Lactoperoxidase system (LPOS) was well documented as a strategy to extend the shelf life of fresh milk but it hasn't been known yet for the minimum level of lactoperoxidase (LPO) utilization to activate LPOS in the milk. The purpose of this study was to analyze minimum concentration of LPO and its components by calculating minimum inhibitory concentration (MIC) against *Escherichia coli* and total bacteria in fresh milk. LPO was obtained from bovine whey and its purity was analyzed using SDS-PAGE. To activate the LPO performance, two substrates namely H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and KSCN were used with various concentrations. The MIC was analyzed 3 times using 3M™ Petrifilm™ Aerobic Count Plates. The result showed that 3.11 unit/mL LPO, 0.03 mM substrates have been found as MIC of LPOS against bacteria and *Escherichia coli* in milk. This result might provide benefit to the utilization of minimal LPOS in fresh milk to save the amount of LPO.

**Keywords:** *Escherichia coli*, fresh milk, lactoperoxidase, minimum inhibitory concentration

### ABSTRAK

Produksi susu segar di Jawa Tengah mengalami peningkatan setiap tahunnya yang mengakibatkan penanganan susu segar harus dirancang dengan tepat untuk memperpanjang umur simpan. Metode sistem laktoperoksidase (LPOS) telah dipelajari dapat memperpanjang umur simpan susu dengan menekan pertumbuhan bakteri dalam susu segar. Namun hingga saat ini belum diketahui penggunaan LPO minimal dan komponen substratnya dalam upaya untuk menghambat pertumbuhan bakteri dalam susu. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) LPO dan komponen-komponennya dalam upaya menekan pertumbuhan *Escherichia coli* dan bakteri dalam susu segar. LPO diperoleh dari whey susu sapi dan tingkat kemurniannya dianalisis dengan menggunakan SDS-PAGE. Guna mengaktifkan kerja LPOS, digunakan dua substrat: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan KSCN dengan konsentrasi yang berbeda. MIC dianalisis 3 kali dengan menggunakan 3M™ Petrifilm™ Aerobic Count Plates. Hasil penelitian menunjukkan bahwa MIC dalam menekan *Escherichia coli* dan total bakteri dalam susu adalah sebanyak 3,11 unit/mL LPO dan 0,03 mM substrat. Hasil ini dapat memberikan manfaat bagi upaya pemanfaatan LPOS dalam susu segar secara hemat dengan menggunakan jumlah LPO yang minimal.

**Kata kunci:** *Escherichia coli*, laktoperoksidase, minimum inhibitory concentration, susu segar

### PENDAHULUAN

Produksi susu segar di Jawa Tengah mengalami peningkatan setiap tahunnya. Produksi susu yang tinggi ini harus diimbangi dengan penanganan pascapanen yang tepat agar susu tetap

berkualitas baik dan tidak mudah rusak serta untuk menanggulangi masalah yang berakibat pada tolaknya susu dari peternak oleh industri pengolahan susu (IPS) dan tidak termanfaatkannya susu sebagai akibat penanganan pascapanen yang kurang baik.

\*Penulis Korespondensi:  
E-mail: albari@undip.ac.id

Penanganan susu yang sering dilakukan yaitu pendinginan. Namun penanganan ini memiliki kelemahan diantaranya masih berbiaya tinggi dan sulit dilakukan di tingkat pedesaan, padahal peternakan sapi perah pada umumnya berlokasi di daerah pedesaan. Oleh karena itu perlu ditemukan penanganan pascapanen yang murah dan aman diantaranya dengan menerapkan prinsip sistem laktoperoksidase (LPOS). LPOS terdiri tiga komponen, yaitu enzim laktoperoksidase, hidrogen peroksida dan ion thiosianat dan ketiganya secara alami sudah tersedia di dalam susu. Namun jumlah ketiga komponen ini, sangat terbatas dan tidak bertahan lama. Sebagai contoh, aktivitas enzim LPO akan hilang pada jam ke 3 penyimpanan pada suhu kamar dari jumlah mula-mula dalam susu sekitar 10-30 ppm (Fitriansyah, 2012; Seifu *et al.*, 2005). Sistem laktoperoksidase merupakan sistem antibakterial yang terdapat di dalam susu dan digunakan untuk mengawetkan susu terutama pada kondisi tanpa pendinginan (Asaah *et al.*, 2007; Defabachew, 2003). Enzim laktoperoksidase murni dan *whey* mampu berperan bersama dalam mencegah pertumbuhan *Salmonella enterica* sehingga *whey* mampu dijadikan sebagai bahan antimikroba (Al-Baarri *et al.*, 2011). Pengaktifan LPO digunakan untuk mengontrol pertumbuhan *Pseudomonas* di dalam susu (Saad, 2008). LPOS memberikan efek bakterisidal yang kuat terhadap mikroba patogen. Sistem LPO mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella enterica* dan *Escherichia coli* O157:H7 (Min *et al.*, 2005). Sistem laktoperoksidase mempunyai aktivitas antimikroba terhadap mikroorganisme patogen. Pengaktifan LPOS efektif dilakukan pada susu segar. LPOS tidak mendukung pertumbuhan mikroorganisme patogen. LPOS digunakan untuk menjaga kualitas susu karena terbukti memiliki efek bakteristatik dari tahap pengumpulan susu hingga tahap proses akhir. LPOS sebagai tindakan alternatif yang efisien untuk pengawetan susu tidak menghambat dan tidak berdampak negatif pada proses pengolahan selanjutnya (FAO, 2005). Pengaktifan LPOS di dalam susu sapi dan susu kambing tidak memberikan efek pada uji organoleptik keju putih. Semua produk keju dengan aktivasi LPOS dapat diterima oleh konsumen (Suleiman *et al.*, 2009).

Aktivitas LPO akan meningkat ketika tersedia  $H_2O_2$  dan  $SCN^-$ . Ketersediaan senyawa lain juga mempengaruhi efisiensi sistem LPO (Fonteh *et al.*, 2005). Aktivitas laktoperoksidase dipengaruhi oleh banyak faktor, antara lain faktor ternak, pakan dan tahap-tahap laktasi. Oleh karena itu, thiosianat dan hidrogen peroksida yang dibutuhkan untuk mengaktifkan sistem laktoperoksidase untuk mengawetkan susu segar bervariasi jumlahnya tergantung dari faktor-faktor tersebut (Fonteh *et al.*, 2002).

Laktoperoksidase dalam susu dapat diaktifkan dengan menggunakan sodium thiosianat dan sodium percarbonate masing-masing sebanyak 14 mg/liter dan 30 mg/liter pada 0-2 jam setelah pemerahan (FAO, 2005; Saad, 2008).

Senyawa  $H_2O_2$  dan  $SCN^-$  juga sudah tersedia di dalam susu masing-masing sebanyak 3-5 ppm dan 1-2 ppm. Enzim LPO bersama dengan oksigen mengubah  $SCN^-$  menjadi  $OSCN^-$  yang nantinya berfungsi sebagai antimikroba (Dwiyantri, 2009). Al-Baarri dan Legowo (2012) menyatakan bahwa LPO di dalam susu dapat menjadi sebuah katalisator untuk membentuk senyawa hipotiosianit ( $OSCN^-$ ) yaitu produk anti mikroba yang dapat menekan pertumbuhan bakteri dalam susu. Penelitian mengenai konsentrasi minimum  $OSCN^-$  sangat diperlukan untuk membuat formula yang tepat agar pemakaian komponen dalam LPOS ini sesuai dengan kebutuhan. Kontrol konsentrasi minimum ini dapat dilakukan dengan mengontrol konsentrasi LPO. Laktoperoksidase dapat secara khusus diambil dari *whey* tanpa mengurangi kandungan gizi yang terdapat dalam *whey* seperti mengobati kanker, penyakit jantung, dan sebagai agen antimikroba (Marshall, 2004). *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) lazimnya digunakan untuk menentukan konsentrasi minimal terhadap suatu zat dalam melakukan upaya aktif sesuai dengan tujuan dibuatnya senyawa tersebut. Walaupun LPOS telah banyak dipelajari, namun MIC konsentrasi LPO, belum dipelajari. Hal ini sangat penting untuk menggunakan konsentrasi LPO secara minimal agar kerja LPOS tetap dapat berfungsi dengan baik. Hal ini penting sekali untuk dipelajari karena penggunaan LPOS masih dinilai mahal, sehingga konsentrasi minimal LPO perlu untuk diketahui. Dalam rangka menghemat penggunaan substrat, maka dua komponen substrat:  $H_2O_2$  dan  $SCN^-$  juga perlu dianalisis. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menguji jumlah atau konsentrasi minimum LPO dan komponen substratnya:  $H_2O_2$  dan  $SCN^-$  dalam upaya menekan pertumbuhan bakteri pada susu dan *Escherichia coli*. Penelitian ini sangat bermanfaat dalam upaya melakukan penghematan penggunaan enzim LPO dan komponen pendukungnya dalam upaya menekan pertumbuhan mikroba susu dan *Escherichia coli*.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan adalah susu segar yang diperoleh dari peternakan sapi perah di Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro Semarang pada pemerahan pagi hari jam 4 pagi. Sapi yang diperah berumur sekitar 3-4

tahun dengan masa laktasi 3-5 bulan berjumlah 5 ekor. Hal ini bertujuan untuk mempertahankan kualitas enzim LPO yang akan diimobilisasi. Lokasi kandang tidak jauh dari laboratorium. Setelah pemerahan susu dimasukkan ke dalam kotak pendingin lalu dibawa ke Laboratorium dan disimpan di dalam freezer.

### Pengambilan LPO dari whey

Prosedur pengambilan LPO dari whey susu sapi (whey didapat dari reaksi enzimatis dengan menggunakan renet) (Formase 50, Holand) yang bercampur dengan Lactic Acid (Purac, Indonesia Lot number 1107002157) yang dipanaskan menggunakan *waterbath* (W, Germany) dengan suhu 35°C. Terdapat 2 bagian setelah proses ini yaitu cairan dan padatan, dan yang diambil adalah cairan (whey) dengan memisahkan menggunakan kain nilon. Berdasarkan pada metode peneliti sebelumnya (Al-Baarri *et al.*, 2011) Sepharose Fast Flow (SP-FF) (GE Healthcare Bio-Science AB, Sweeden, Lot number 10081054) digunakan sebagai agen untuk mengimobilisasi LPO dari whey. Kolom kaca dengan ukuran 0,5 x 10 cm dibersihkan setelah itu diberi tutup di bawahnya dengan lubang kecil di tengah. Diantara tutup dan kolom kaca terdapat kain nilon sebagai penyaring agar SP-FF tidak ikut hanyut ke bawah. Aquades dialirkan untuk mencoba apakah bocor apa tidak di dalam tutup, setelah dirasa baik maka whey dialirkan secara perlahan ke dalam kolom kaca yang didalamnya telah diisi dengan SP-FF dan telah dicuci dengan menggunakan 1,0 dan 10,0 mL Phosphate Buffer (PB) yaitu penggabungan antara NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O dan NaHPO<sub>4</sub> (HIMEDIA, India) 10 mM (pH 7,0) secara berturut-turut. Whey disirkulasikan melalui kolom dengan bantuan pompa peristaltik yang diatur dengan kecepatan 1 mL per menit. Setelah itu, SP-FF dialiri dengan 0,1 M NaCl (Merck, Germany) dalam 10 mM PB sebanyak 100 mL yang bertujuan untuk menghilangkan protein non LPO yang terikat ke dalam SP-FF. Selanjutnya, SP-FF dialiri dengan 100 mL 0,25 mM NaCl dalam 10 mM PB dan hasil yang keluar dari aliran terakhir ini, ditampung dalam *ultracentrifuge tube* (Biologix, China) berukuran 15 mL (sebanyak 10 ml per tabung). LPO tersebut dipakai untuk proses selanjutnya dan disimpan di dalam freezer.

### Analisis profil protein

Analisis protein menggunakan elektroporesis (GE Healthcare Bio-Science AB, Sweeden). Profil protein masing-masing tabung yang diperoleh dari hasil pengambilan LPO, kemudian dianalisis konsentrasi dan kemurniannya masing-masing dengan menggunakan metode Lowry dan 10% SDS-PAGE (Hames, 1998). Sampel sebanyak 30 µL kemudian ditambahkan 30 µL gel *loading* buffer. Terakhir,

ditambahkan 6 µL mercaptoetanol (BioChemica, Inggris) menggunakan pipet (Eppendorf, Germany) dan tip (Axygen, USA) lalu sampel dididihkan selama 2 menit. Volume injeksi adalah 15 µL pada setiap *lane*. Gel ditempatkan dalam unit elektroporesis dengan tegangan sebesar 30 V dan diproses selama 7 jam. Tabung dengan *lane* tunggal yang berwarna biru kemudian dipilih untuk digunakan sebagai sumber LPO pada penelitian ini.

### Pengukuran aktivitas LPO spektro mini UV shimatzu

Pengukuran aktivitas LPO dilakukan berdasarkan pada penelitian Al-Baarri *et al.* (2011) menggunakan spektrofotomeer (UV Mini Shimadzu, China). Aktivitas LPO diukur dengan cara mencampurkan 50 µL LPO dan 450 µL 1mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) (BioChemica, Inggris Lot 1Y00616) dalam 10 mM acetat buffer (Himedia, India) (pH 4,4). Reaksi enzimatis selama 20 detik menggunakan stopwatch (Agnesis, Indonesia) dimulai dengan menambahkan 450 µL 0,55 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Germany). Nilai absorbansi dimonitor pada 412 nm. Satu unit aktivitas enzimatis LPO dalam susu dinyatakan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk mengoksidasi 1 µmol ABTS per menit. Koefisien molar ABTS pada 412 nm adalah 32400 per molar per sentimeter.

### Penentuan residu substrat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam LPOS pasca reaksi, diukur melalui prosedur sebagaimana dinyatakan oleh Hanna Instrumen dengan menggunakan tes kit HI3844 (Hanna Instrumen, Indonesia) dengan sedikit modifikasi. Konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Germany) dihitung berdasarkan kurva standar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan konsentrasi berkisar 0,1 sampai dengan 0,5 mM. Perubahan warna yang ada pada tes kit menunjukkan adanya H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Deteksi konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> digunakan spektrofotometer (UV Mini Shimadzu, China) dengan panjang gelombang 350 nm.

### Pengujian total bakteri

Pengujian total bakteri *Escherichia coli* dilakukan pada laminar (Airtech, China). Sampel yang berupa *Escherichia coli* murni didilusikan dengan larutan 10 mM PB steril dan kemudian 1 mL sampel diteteskan pada permukaan petrifilm (3M, USA) bagian dalam, setelah itu petrifilm ditutup kembali lalu ditekan dengan menggunakan penekan plastik berbentuk bulat guna meratakan sampel. Petrifilm diinkubasi pada inkubator (Heraeus, Germany) selama 2 hari pada suhu 30°C untuk mengetahui total bakteri dalam sampel. Penggunaan LPOS, maka LPO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dan KSCN dengan berbagai unit dan konsentrasi yang di saring dengan *syringe* filter (3M,

USA) diinkubasi dalam suhu kamar dan tabung steril selama 1 jam. Larutan LPOS ini kemudian digunakan untuk mengetahui sifat antibakteri yang di campurkan dengan *Escherichia coli*.

### Aplikasi LPOS dalam susu segar

Guna mengaktifkan LPOS, maka LPO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dan KSCN masing-masing sebanyak 3,11 U/mL, 0,03 dan 0,03 mM yang di saring dengan syringe filter diinkubasi dalam suhu kamar dan tabung steril selama 1 jam. Larutan LPOS ini kemudian digunakan untuk mengetahui sifat antibakteri di dalam susu segar. Penambahan LPOS dalam susu segar ditetapkan sebesar 5% (v/v). Susu segar yang didapat dari peternak ( $\pm 1$  jam pasca pemerahan) dituangkan ke dalam tabung steril tertutup di dalam laminar (Airtech, China) kemudian 1 mL sampel diteteskan pada permukaan petrifilm (3M, USA) bagian dalam, setelah itu petrifilm ditutup kembali lalu ditekan dengan menggunakan penekan plastik berbentuk bulat guna meratakan sampel lalu ditempatkan di dalam inkubator (Heraeus, Germany) dengan suhu 30°C. Penambahan larutan LPOS ini dilakukan dilakukan bervariasi mulai dari jam ke-2 hingga jam ke-6 inkubasi. Uji total bakteri semua sampel susu tanpa dan dengan perlakuan LPO dilakukan pada jam ke-6 inkubasi.

### Analisis data

Penelitian ini dilakukan dengan replikasi 3 kali dan kemudian untuk seluruh data yang diperoleh, yaitu hasil aktivitas LPO, konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, total mikroba, dan profil protein dianalisis dengan metode analisis deskriptif berupa analisis dari rata-rata dan range data yang telah diperoleh dihitung secara deskriptif. Analisis ini menggambarkan atau menjelaskan fenomena spesifik pada suatu penelitian yang dapat mewakili gambaran objektif dari sampel yang diteliti. Gambaran umum ini dapat menjadi acuan untuk melihat karakteristik dari data (Fahardian *et al.*, 2012). Menurut Dwiloka dan Srigandono (2006) deskriptif adalah gambaran mengenai sifat suatu populasi tertentu sehingga diperlukan data yang mewakili populasi sehingga gambaran populasi menjadi objektif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil proses purifikasi LPO dari whey

Penelitian ini menggunakan bantuan SP-FF untuk mengimobilisasi LPO dari whey agar enzim dapat digunakan secara berulang atau tidak larut dalam pelarutnya. Dalam penggunaannya, imobilisasi ini berguna untuk menangkap enzim dari media, mengukur stabilitas enzim dan menggunakan enzim berulang kali (Sebayang, 2006).

Laktoperoksidase merupakan enzim yang paling banyak di dalam susu sapi dibanding dengan enzim lain dan bersifat stabil dalam kondisi relatif panas serta aktivitasnya tetap bertahan meskipun setelah mengalami pasteurisasi pada suhu 63°C selama 30 menit. Pemanasan whey atau susu pada suhu 80°C selama 2,5 detik dapat merusak LPO (Suleiman *et al.*, 2009). Purifikasi LPO pada penelitian ini menggunakan whey dari susu sapi yang dilakukan sebanyak dua kali guna memenuhi kebutuhan volume yang digunakan dalam penelitian, yaitu sebanyak 20 mL LPO dengan konsentrasi rata-rata sebesar 89,79 unit per mL. Hasil pengukuran aktivitas LPO pada purifikasi ke-1 dan 2 dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pengukuran absorban (412 nm) dan unit aktivitas laktoperoksidase

| Purifikasi ke- | Absorban |        | Selisih Absorban | Aktivitas LPO (U/mL) |
|----------------|----------|--------|------------------|----------------------|
|                | Awal     | Akhir  |                  |                      |
| 1              | 0,618±   | 1,120± | 0,502±           | 93,53±               |
|                | 0,037    | 0,017  |                  |                      |
| 2              | 0,693±   | 1,153± | 0,460±           | 86,05±               |
|                | 0,038    | 0,016  |                  |                      |
| Rerata         | 0,655±   | 1,137± | 0,655±           | 89,79±               |
|                | 0,053    | 0,023  |                  |                      |

Keterangan: Purifikasi LPO 1 menghasilkan 93,53 ± 3,74 unit dan LPO 2 menghasilkan 86,05 ± 3,74 unit

Aktivitas enzim LPO ditentukan dengan menggunakan substrat ABTS dan diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 412 nm. Secara visual aktivitas LPO yang tinggi dapat dilihat dengan warna hijau pada sampel setelah terjadinya reaksi antara LPO, ABTS, dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Hasil pengukuran yang terdapat pada Tabel 1 mengindikasikan adanya kemampuan SP-FF dalam mengimobilisasi LPO dari whey. Hasil sampel dari purifikasi ke-1 dan 2 memiliki selisih nilai absorban masing-masing sebesar 0,50±0,15 dan 0,46±0,19.

Sepharose Fast Flow memiliki keunggulan dalam menangkap LPO dengan mudah dan kuat. Hal ini dapat terlihat dari tingginya aktivitas LPO yang didapat, yaitu sebesar 93,53±3,74 U dan 86,05±3,74 U. Penelitian yang dilakukan oleh Al-Baarri *et al.* (2010) menunjukkan bahwa 1 gram SPFF efektif untuk menahan 750 unit/mL LPO. Jika penelitian ini dibandingkan dengan penelitian tersebut maka, sebenarnya SPFF yg dipakai masih mencukupi untuk menahan lebih banyak LPO.

Pengukuran perkiraan protein dari sampel purifikasi LPO dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm (Al-Baarri *et al.*, 2010). Berdasarkan perhitungan tersebut, didapat hasil bahwa sampel mempunyai protein yang diperkirakan sebesar 59,26% (pada purifikasi ke-1) dan 61,06% (pada purifikasi ke-2). Jika dibandingkan dengan hasil purifikasi penelitian

yang lain maka hasil yang didapat pada penelitian ini lebih rendah. Hal ini disebabkan karena proses purifikasi dari *whey*, berbeda dengan penelitian Al-Baarri *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa hasil purifikasi LPO bekisar 90% yang proses purifikasi tersebut dari LPO murni. Uji Lowry yang dilakukan terhadap campuran hasil purifikasi ke-1 dan 2 menghasilkan konsentrasi protein sebesar 58,50% (data tidak ditampilkan). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa angka perkiraan jumlah protein dan hasil uji Lowry, mempunyai selisih yang tidak terlalu besar namun jika kedua angka ini dibandingkan dengan hasil peneliti terdahulu, maka hasilnya jauh lebih kecil. Perbedaan ini diduga karena perbedaan konsentrasi awal LPO pada *whey* yang digunakan.

### Profil protein hasil purifikasi

Hasil pengujian profil protein dengan menggunakan SDS-Page menunjukkan bahwa standar albumin komersial dan LPO masing-masing berada pada band 67 dan 78 kDa *lane* 1 (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil analisis profil protein dengan menggunakan SDS-PAGE. *Lane* 1 adalah standar protein berupa albumin (67 kDa) dan laktoperoksidase (78 kDa). *Lane* 2–6 adalah sampel yang diambil dari pengumpulan hasil elusi dari kolom SP-FF. Nampak hanya *lane* 6 yang menunjukkan *single band*

Laktoperoksidase dikatakan murni jika terbukti dengan munculnya 1 *band* saja pada masing-masing *lane*, yaitu terdapat pada *lane* 6, sedangkan pada *lane* yang lain, muncul dua *band* atau lebih. Profil protein dari purifikasi kedua, didapatkan hasil yang tidak berbeda jauh dengan purifikasi pertama sehingga dari hasil purifikasi ke-2, yang diambil sebagai LPO hanyalah sampel *lane* 6. Kemurnian

suatu protein dapat diperoleh informasinya berdasarkan profil protein dengan menggunakan SDS PAGE (Sisecioglu *et al.*, 2010). Oleh karena itu, dalam penelitian ini, untuk mendeteksi kemurnian LPO, dilakukan analisis SDS PAGE. Intensitas ketebalan pita sebagaimana tampak dalam Gambar 1, disebabkan kuantitas protein dalam sampel dan kuatnya interaksi elektrostatis (Maheswari *et al.*, 2007; Kukic dan Nielsen, 2010; Tay dan Gam, 2011). Walaupun *lane* 6 terlihat lebih tipis dari *lane* lainnya, namun karena hanya muncul satu band, maka dipilihlah sampel *lane* 6 ini sebagai sumber LPO. SDS PAGE dipilih sebagai penentuan profil protein dikarenakan poliakrilamid merupakan polimer sintesis yang larut dalam air dan mampu memisahkan protein dengan kisaran 0,5–250 kDa (Widyastuti dan Nucholis, 2012).

Selanjutnya, sampel *lane* 6 hasil purifikasi ke-1 dicampur dengan hasil purifikasi ke-2 serta dilakukan sterilisasi dengan menggunakan *syringe* filter 0,22  $\mu\text{m}$ . Sampel LPO ini disimpan di dalam dalam microtube (200  $\mu\text{L}$  per tube) didalam *freezer* untuk digunakan dalam penelitian.

### Residu $\text{H}_2\text{O}_2$ dalam LPOS

Tabel 2 menunjukkan kandungan residu  $\text{H}_2\text{O}_2$  pada LPOS setelah satu jam pasca reaksi. Penggunaan  $\text{H}_2\text{O}_2$  dengan konsentrasi sebesar 0,4 mM atau lebih, dapat menghasilkan residu  $\text{H}_2\text{O}_2$  sebesar lebih dari 0,1 mM. Walaupun jauh dari ambang batas maksimal sesuai dengan standar dari Environmental Protection Agency (EPA), yaitu sebesar 3,52 mM (Venkitanarayanan *et al.*, 2002), namun adanya residu ini dapat berakibat pada melemahnya aktivitas LPO (Al-Baarri *et al.*, 2010).

Tabel 2. Hasil Pengukuran residu  $\text{H}_2\text{O}_2$  dalam larutan LPOS yang dibuat dengan menggunakan berbagai konsentrasi  $\text{H}_2\text{O}_2$

| Konsentrasi Penggunaan $\text{H}_2\text{O}_2$ (mM) | Residu $\text{H}_2\text{O}_2$ dalam LPOS (mM) |
|--|---|
| 0,55   | 0,173 $\pm$ 0,107                             |
| 0,50   | 0,122 $\pm$ 0,056                             |
| 0,45   | 0,139 $\pm$ 0,073                             |
| 0,40   | 0,110 $\pm$ 0,044                             |
| 0,35   | 0,086 $\pm$ 0,020                             |
| 0,30   | 0,021 $\pm$ 0,045                             |
| 0,25   | 0,031 $\pm$ 0,035                             |
| 0,20   | 0,027 $\pm$ 0,039                             |
| 0,15   | 0,016 $\pm$ 0,050                             |
| 0,10   | 0 $\pm$ 0,059                                 |
| 0,05   | 0 $\pm$ 0,059                                 |

Keterangan: Residu (mM)  $\text{H}_2\text{O}_2$  dari penggunaan  $\text{H}_2\text{O}_2$  pada larutan LPOS mulai konsentrasi 0,05-0,55 mM

Pada pembentukkan OSCN', sesuai dengan proses reaksi yang ada dalam LPOS, yaitu satu

molekul  $H_2O_2$  akan bereaksi dengan satu molekul ion SCN yang akan menghasilkan satu melokul OSCN. Namun proses reaksi ini dibatasi oleh kemampuan enzimatis LPO sehingga jika jumlah substrat dan aktivitas LPO tidak seimbang, akan berakibat pada munculnya residu substrat, baik itu  $H_2O_2$ , maupun ion SCN. Penggunaan 0,10 mM  $H_2O_2$  dalam LPOS terlihat tidak menyisakan residu  $H_2O_2$ , sehingga dalam penelitian selanjutnya, digunakan konsentrasi  $H_2O_2$  sebesar maksimal 0,1 mM.

#### Minimum inhibitory concentration konsentrasi LPO terhadap bakteri *Escherichia coli*

Menurut Al-Baarri *et al.* (2011), kemampuan LPOS dalam menekan atau membunuh bakteri adalah tergantung kepada jumlah *hyphothiocyanite*. Semakin besar substrat yang digunakan akan berpotensi untuk menghasilkan daya antibakteri yang besar, namun karena LPO akan dihambat aktivitasnya oleh substrat KSCN dan  $H_2O_2$ , maka penggunaan substrat dengan jumlah yang banyak, tidak menjamin dihasilkannya aktivitas antibakteri yang tinggi. Disamping itu, penggunaan substrat yang berlebih, diperlukan LPO yang banyak pula. Oleh karena aplikasi LPOS dalam produk pangan masih dikatakan relatif mahal, maka dalam penggunaannya perlu disesuaikan dengan tujuan untuk membunuh bakteri atau untuk menekan pertumbuhan bakteri. Penelitian ini fokus pada upaya menekan jumlah bakteri patogen di dalam susu sehingga pada jam ke-6 penyimpanan pada suhu kamar, tidak lebih dari  $10^6$  CFU/mL sebagaimana yang telah ditentukan dalam BSN susu segar. Sebelum diaplikasikan ke dalam susu segar, maka LPOS perlu terlebih dahulu dicobakan pada *single bacteria* dan dipilihlah bakteri *Escherichia coli* untuk mengetahui konsentrasi LPO minimal untuk menghambat bakteri ini.

Tabel 3. Aktivitas antibakteri LPOS terhadap *Escherichia coli* dengan menggunakan berbagai konsentrasi LPO

| Laktoperoksidase (Unit) | Total Bakteri <i>Escherichia coli</i> (CFU/mL) |
|-------------------------|--|
| 3,11                    | $1,5 \pm 0,5 \times 10^4$                      |
| 4,67                    | $1,5 \pm 0,5 \times 10^4$                      |
| 5,61                    | $3,5 \pm 0,5 \times 10^4$                      |
| 6,23                    | $2 \pm 1 \times 10^5$                          |
| 6,67                    | $1,5 \pm 0,5 \times 10^4$                      |
| Kontrol                 | $2,5 \pm 2,5 \times 10^5$                      |

Keterangan: Data total bakteri adalah rerata dari tiga kali percobaan. Sedangkan untuk mengaktifkan LPOS, digunakan KSCN dan  $H_2O_2$  dengan total konsentrasi masing-masing sebesar 0,03 mM

Tabel 3 menunjukkan penggunaan LPO dengan konsentrasi 3,11–6,67 U/mL. Pemilihan kisaran konsentrasi LPO ini adalah berdasarkan

kemudahan aplikasi dan berdasarkan hasil penelitian dari peneliti lain yang menggunakan LPO dengan konsentrasi sebesar 4,0–4,5 U/mL. Konsentrasi KSCN dan  $H_2O_2$  yang digunakan untuk mengaktifkan LPOS yaitu sebesar 0,03 mM. Hasil pengujian menunjukkan bahwa LPO 3,11 U/mL dapat menekan jumlah *Escherichia coli* sebesar 1 Log CFU/mL, yaitu dari  $2,5 \pm 2,5 \times 10^5$  menjadi  $1,5 \pm 0,5 \times 10^4$  CFU/mL. Sifat antibakteri ini sebesar 1 Log CFU/mL ini juga masih nampak saat penggunaan *Escherichia coli* sebesar  $1 \times 10^6$  dan  $1 \times 10^7$  (data tidak ditampilkan). Sifat antibakteri LPOS ini sejalan dengan banyak peneliti yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dengan menggunakan LPOS (Min *et al.*, 2005; Assah *et al.*, 2007). Hasil penelitian dengan menggunakan LPO sebesar lebih kecil dari 3,11 U/mL (yaitu 1,87 U/mL) tidak menunjukkan adanya antibakteri dari LPOS yang diaktifkan dengan menggunakan konsentrasi substrat sebesar 0,03 mM, sehingga MIC konsentrasi LPO untuk membunuh bakteri *Escherichia coli* adalah 3,11 U/mL.

#### Minimum inhibitory concentration LPOS berdasarkan konsentrasi substrat

Setelah mendapatkan MIC konsentrasi LPO sebesar 3,11 U/mL dengan konsentrasi substrat masing-masing sebesar 0,03 mM, maka perlu analisis lebih lanjut atas terjadinya ketidakmampuan LPOS dalam menghambat *Escherichia coli* jika menggunakan LPO sebesar 1,87 U/mL. Sebagaimana diketahui bahwa konsentrasi *hyphothiocyanite* adalah tergantung dari substrat LPO, maka penelitian lanjutan adalah menggunakan LPOS untuk membunuh *Escherichia coli* dengan menggunakan substrat yang lebih besar, yaitu 0,18 mM (Tabel 4).

Tabel 4. Aktivitas antibakteri LPOS terhadap *Escherichia coli* dengan berbagai konsentrasi komponen LPOS

| Laktoperoksidase (U/mL) | KSCN (mM) | $H_2O_2$ (mM) | Total Bakteri <i>Escherichia coli</i> |
|-------------------------|-----------|---------------|---------------------------------------|
| 1,87                    | 0,18      | 0,18          | $1,5 \pm 0,5 \times 10^5$             |
| 3,11                    | 0,03      | 0,03          | $1,5 \pm 0,5 \times 10^5$             |
| 4,67                    | 0,03      | 0,03          | $2,5 \pm 2,5 \times 10^5$             |
| Kontrol                 |           |               | $4 \pm 1 \times 10^6$                 |

Keterangan: LPO, KSCN dan  $H_2O_2$  dengan berbagai unit dan total konsentrasi

Berdasarkan Tabel 4, maka didapat hasil bahwa walaupun konsentrasi LPO ditingkatkan, tidak dapat meningkatkan daya antibakteri LPOS, namun ketika diturunkan konsentrasinya, tidak nampak adanya sifat antibakteri dari LPOS. Setelah konsentrasi substrat ditingkatkan menjadi 0,18 mM, maka terlihat adanya daya antibakteri sekitar 1 Log CFU/mL (terdapat pengurangan jumlah bakteri dari

$4\pm 1 \times 10^6$  menjadi  $1,5\pm 0,5 \times 10^5$  CFU/mL). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa konsentrasi substrat sebesar 0,18 mM merupakan konsentrasi minimal agar LPOS dapat mempunyai sifat antibakteri. Namun oleh karena jumlah substrat sebesar 0,18 mM, berdasarkan hasil penelitian sebagaimana tampil dalam Tabel 2, dapat meninggalkan residu  $H_2O_2$ , maka untuk langkah aplikasi pada susu segar, digunakan formula yang tidak meninggalkan residu  $H_2O_2$ , yaitu 3,11 U/mL LPO, 0,03 mM  $H_2O_2$ , dan 0,03 mM KSCN.

Aplikasi LPOS di dalam susu segar dinilai kompleks mengingat banyaknya faktor yang dapat menurunkan aktivitas LPO. Namun kecilnya substrat yang digunakan dapat diatasi dengan adanya fenomena bahwa di dalam susu segar terkandung  $H_2O_2$  dan ion SCN yang dapat mengaktifkan sistem laktoperoksidase. Susu sapi secara alami mengandung thiosianat namun dalam level yang rendah sehingga perlu ditambah konsentrasinya untuk mengaktifkan sistem LPO (Firmansyah *et al.*, 2002, Legowo *et al.*, 2009).

#### Minimum inhibitory concentration LPOS pada susu segar

Data aplikasi LPOS pada susu segar terdapat pada Tabel 5. Aplikasi LPOS ini dengan menggunakan formula yaitu 3,11 U/mL LPO, 0,03 mM  $H_2O_2$ , dan 0,03 mM KSCN. Ketiga komponen LPOS ini dibiarkan bereaksi selama satu jam sebelum diaplikasikan ke dalam susu segar. Selain itu, sebagai pembanding, maka dilakukan juga aplikasi LPOS dengan menggunakan konsentrasi substrat yang lebih besar, yaitu: 0,3 mM  $H_2O_2$  dan 0,3 mM KSCN (dengan konsentrasi LPO tetap). Aplikasi LPO dilakukan secara bervariasi mulai dari aplikasi jam ke-2, 3, 4, 5, dan 6 pasca susu segar disimpan pada suhu 30°C dan data yang tampak pada Tabel 5 ini adalah data populasi bakteri dalam susu segar pada jam ke-6 penyimpanan pada suhu 30°C. Berdasarkan pada Tabel 5. LPOS terbukti dapat menekan populasi total bakteri pada susu segar hingga  $\pm 2$  Log CFU/mL (terdeteksi sebesar  $4\pm 1 \times 10^3$  dari

kontrol sebesar  $2\pm 1 \times 10^5$  CFU/mL), yaitu pada penggunaan LPOS dengan substrat 0,3 mM pada jam ke-2. Ketika konsentrasi substrat diturunkan, LPOS masih menunjukkan adanya sifat antibakteri sebesar  $\pm 1$  Log CFU/mL (terdeteksi sebesar  $5,5\pm 0,5 \times 10^4$  dari kontrol sebesar  $2\pm 1 \times 10^5$  CFU/mL). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa kedua macam konsentrasi substrat terbukti dapat menekan bakteri pada susu segar. Penggunaan LPOS pada jam ke-3 dan jam ke-4 pasca penyimpanan, masih nampak adanya sifat antibakteri LPOS namun ketika penggunaan LPOS diterapkan pada jam ke-5 dan 6 pasca penyimpanan, tidak nampak adanya sifat antibakteri dari LPOS dalam susu segar. Ketidakmampuan LPOS untuk menekan populasi bakteri tersebut diduga karena *load* bakteri yang tidak seimbang dengan jumlah *hyphothiocyanite* yang diproduksi oleh LPOS. Selain itu kandungan lain di dalam susu seperti laktosa dan *casein* dapat melemahkan aktivitas LPO. Gula termasuk laktosa telah digolongkan dalam *non competitive inhibitor*. Komponen lain seperti *casein* dan asam amino *tyrosine* juga dapat menghambat aktivitas LPO (Al-Barri *et al.*, 2011; Fonteh *et al.*, 2005).

Menurut Legowo *et al.* (2009) susu segar yang berkualitas baik mengandung 1-2 juta sel bakteri per mL susu. Penelitian Balia *et al.* (2008) menunjukkan bahwa jumlah bakteri pada susu segar asal peternakan rakyat dapat mencapai  $3,70 \times 10^6$  CFU/mL jika disimpan tanpa penyimpanan yang memadai. Jumlah bakteri telah ditentukan sebanyak maksimal  $1 \times 10^6$  CFU/mL (BSN, 2000), sehingga penggunaan LPO dengan konsentrasi substrat sebesar 0,03 mM telah mampu untuk menekan populasi bakteri secara minimal pada susu segar. Oleh karena itu, LPOS dengan LPO 3,11 unit dan substrat sebanyak 0,03 mM merupakan MIC substrat LPOS untuk dapat menekan pertumbuhan bakteri dalam susu segar yang dapat di aplikasikan kepada peternak secara langsung sesaat setelah pemerahan atau maksimal 1 jam, agar dapat memperpanjang masa simpan susu segar.

Tabel 5. Aktivitas antibakteri LPOS pada susu segar dengan konsentrasi substrat berbeda

| Konsentrasi Substrat (mM) | Populasi Bakteri (CFU/mL) |                          |                          |                          |                          |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                           | Jam Pengaktifan LPOS ke-  |                          |                          |                          |                          |
|                           | 2                         | 3                        | 4                        | 5                        | 6                        |
| 0,03                      | $5,5\pm 0,5 \times 10^4$  | $4,5\pm 1,5 \times 10^5$ | $1,5\pm 0,5 \times 10^4$ | $1,5\pm 0,5 \times 10^5$ | $2,5\pm 3,5 \times 10^5$ |
| 0,3                       | $4\pm 1 \times 10^3$      | $5\pm 1 \times 10^4$     | $1,5\pm 0,5 \times 10^4$ | $2,5\pm 2,5 \times 10^5$ | $4,5\pm 0,5 \times 10^5$ |
| Kontrol                   | $2\pm 1 \times 10^5$      | $2\pm 1 \times 10^5$     | $7,5\pm 1,5 \times 10^4$ | $1,5\pm 0,5 \times 10^5$ | $3\pm 0 \times 10^5$     |

Keterangan: Konsentrasi substrat rendah yaitu 0,03 mM; konsentrasi substrat tinggi 0,30 mM

## KESIMPULAN

*Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) LPOS LPO adalah sebesar 3,11 U/mL agar *Escherichia coli* dapat ditekan populasinya. Konsentrasi substrat LPO, yaitu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan KSCN agar LPOS menunjukkan sifat antibakteri, keduanya harus mempunyai konsentrasi minimal sebesar 0,03 mM. Konsentrasi sebesar ini terbukti tidak meninggalkan residu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam LPOS dan mampu menekan populasi *Escherichia coli* sebesar ±1 Log CFU/mL sehingga dapat disimpulkan bahwa MIC LPOS adalah 3,11 U/mL, dan konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan KSCN masing-masing sebesar 0,03 mM. Aplikasi LPOS di dalam susu segar dengan menggunakan formula ini terbukti dapat menekan pertumbuhan bakteri dalam susu segar sebesar ±1 Log CFU/mL sehingga formula ini juga dapat sebagai formula MIC LPOS pada susu segar.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan penghargaan dan ucapan terima kasih kepada Kemenristek Dikti yang telah memberikan dukungan finansial untuk melaksanakan penelitian ini melalui skema Hibah Kompetisi Nasional sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Al-Baarri AN, Legowo AM. 2012. Aplikasi Teknologi Laktoperoksidase-Sepharose-Membrane sebagai Metode Pengawetan Susu Segar yang Murah dan Aman. Prosiding InSiNas Hal:103-109. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Al-Baarri AN, Ogawa M, Hayakawa S. 2010. Scale-up studies on immobilization of lactoperoxidase using milk whey for producing antimicrobial agent. J Indonesian Tropical Anim Agr 35: 185-191.
- Al-Baarri AN, Ogawa M, Hayakawa S. 2011. Application of lactoperoxidase system using bovine whey and the effect of storage condition on lactoperoxidase activity. Int J Dairy Sci 6: 72-78. DOI: 10.3923/ijds.2011.72.78.
- Asaah NO, Fonteh F, Kamga P, Mendi S, Imele H. 2007. Activation of the lactoperoxidase system as a method of preserving raw milk in areas without cooling facilities. Afr J Food Agr Nutr Dev 7: 1-15.
- Balia RL, Harlia E, Suryanto D. 2008. Jumlah Bakteri Total dan Koliform pada Susu Segar Peternakan Sapi Perah Rakyat dan Susu Pasteurisasi Tanpa Kemasan di Pedagang Kaki Lima. Prosiding Prospek Industri Sapi Perah Menuju Perdagangan Bebas 2020, Hal. 322-325. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan Bogor.
- [BSN] Badan Standarisasi Nasional. 2000. SNI 01-6366-2000 tentang Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Batas Maksimum Residu dalam Bahan Makanan Asal Hewan, Jakarta.
- Seifu E. 2003. Application of the Lactoperoxidase System to Improve the Quality and Safety of Goat Milk and Goat Milk Cheese. [Disertasi]. Faculty of Natural and Agricultural Sciences. University of Pretoria. Pretoria.
- Dwiloka B, Srigandono B. 2006. Metodologi Penelitian. Badan Penerbit Universitas Diponegoro, Semarang.
- Dwiyanti G. 2009. Pengaruh penambahan aktivator laktoperoksidase terhadap ketahanan susu sapi segar. J Pengajaran MIPA 13: 1-10.
- Fahardian A, Jinap S, Faridah A, Zaidul ISM. 2012. Effects of marinating on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons (benzo[a]pyrene, benzo[b]fluoranthene and fluoranthene) in grilled beef meat. Food Cont 28: 420-425. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.04.034.
- [FAO] Food and Organization. 2005. Benefit and Potential Risks of the Lactoperoxidase System of Raw Milk Preservation. Animal Production Service. FAO Animal Production and Health Division. Rome.
- Firmansyah H, Maheswari RRA, Bakrie B. 2002. Perbandingan Kinerja Aktivator Sistem Laktoperoksidase (Lactoperoxidase System) dalam Pengawetan Susu dengan Volume yang Berbeda. [Seminar Nasional]. Teknologi Peternakan dan Veteriner 2002. Hal. 55-60.
- Fonteh F, Grandison A, Lewis MJ. 2002. Variations of lactoperoxidase activity and thiocyanate content in cow's and goat's milk throughout lactation. J Dairy Res 69: 401-409.
- Fonteh FA, Grandison AS, Lewis MJ. 2005. Factors affecting lactoperoxidase activity. Int J Dairy Tech 58: 233-236. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2005.00227.x.
- Kukic P, Nielsen JE. 2010. Electrostatics in proteins and protein-ligand complexes. Future Med Chem 2: 647-666. DOI: 10.4155/fmc.10.6.



- Legowo AM, Kusrahayu, Mulyani S. 2009. Ilmu dan Teknologi Susu. Badan Penerbit Universitas Diponegoro, Semarang.
- Maheswari RAA, Setiawan J, Mulyanto S, Batubara I, Sumantri C, Farajallah A. 2007. Identifikasi laktoferin pada susu kambing kacang dengan metode imunodifusi radial tunggal dan natrium deodesil sulfat poliakrilamida elektroforensis gel. *J Ilmu Pertanian Indonesia* 12: 163-172.
- Marshall K. 2004. Therapeutic applications of whey protein: review. *Alt Med Rev* 9: 136-156.
- Min S, Harris LJ, Krochta JM. 2005. Antimicrobial effects of lactoferrin, lysozyme, and the lactoperoxidase system and edible whey protein films incorporating the lactoperoxidase system against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Sci* 70: 332-338. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb11476.x.
- Saad AH. 2008. Activation of milk lactoperoxidase system for controlling pseudomonas in cow's milk. *Int J Dairy Sci* 3: 131-136. DOI: 10.3923/ijds.2008.131.136.
- Seifu E, Buys EM, Donkin EF. 2005. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trends Food Sci & Tech* 16: 137-154. DOI: 10.1016/j.tifs.2004.11.002.
- Sisecioglu M, Kirecci E, Cankaya M, Ozdemir H, Gulcin I, Atasever A. 2010. The prohibitive effect of lactoperoxidase system (LPS) on some pathogen fungi and bacteria. *Afr J Pharm Pharmacol* 4: 671-677.
- Suleiman AME, Zubier SE, Hardallou SBE. 2009. Activation of lactoperoxidase milk in manufacture of jibna-beida (white cheese). *J Sci Technol* 10: 1-12.
- Tay EP, Gam LH. 2011. Proteomics of human and the domestic bovine and caprine milk. *Aspac J Mol Biol Biotechnol* 19: 45-43.
- Venkitanarayanan KS, Lin CM, Balley H, Doyle MP. 2002. Inactivation of *Escherichia coli* O 157:H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes* on apples, oranges, and tomatoes by lactic acid with hydrogen peroxide. *J Food Protect* 65: 100-105.
- Widyastuti E, Nucholis M. 2012. Electrophoresis Food Analysis and Biochemistry-Practice. Ilmu Teknologi Pangan, Universitas Brajajaya, Malang.