

Catatan Penelitian

Daya Tahan Laktoperoksidase yang Diimobilisasi ke dalam Sepharose dengan Berbagai Macam Bahan Perendam pada Suhu yang Berbeda

Diana Nur Fitri¹, Ahmad Ni matullah Al-Baarri², Anang Mohamad Legowo²

¹Program Studi Peternakan Program Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang

²Program Studi Teknologi Pangan Program Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang

Korespondensi dengan penulis (albari@undip.ac.id)

Artikel ini dikirim pada tanggal 28 April 2013 dan dinyatakan diterima tanggal 20 Juli 2013. Artikel ini juga dipublikasi secara online melalui www.journal.ift.or.id

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang diperbanyak untuk tujuan komersial.

Diproduksi oleh Indonesian Food Technologists® ©2014 (www.ift.or.id)

Abstrak

Imobilisasi digunakan pada enzim laktoperoksidase (LPO) adalah bertujuan agar dapat digunakan berulang-ulang dan efisien. Tujuan penelitian ini adalah menganalisa daya tahan LPO yang telah diimobilisasi dengan menggunakan Sepharose Fast Flow setelah direndam dengan 3 macam bahan perendam: *phosphate buffer*, whey, dan susu dalam suhu 4°C dan 30°C. Nilai absorbansi dan aktivitas LPO kemudian diamati setelah disimpan selama 3 hari pada suhu 4 dan 3°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai absorbansi pada LPO yang disimpan pada suhu 4°C tidak berbeda nyata diantara bahan perendam, namun pada suhu 30°C terdapat perbedaan yang nyata. Aktivitas LPO yang tertinggi yang dihasilkan oleh bahan perendam whey (pada suhu 4°C) dan bahan perendam berupa phosphate buffer pH 7 (pada suhu 30°C).

Kata kunci: laktoperoksidase, imobilisasi, bahan perendam, suhu, dan SP-Sepharose.

Pendahuluan

Susu segar adalah produk hasil peternakan yang mudah mengalami kerusakan atau *highly perishable*. Oleh karena itu, diperlukan metode pengawetan untuk memecahkan permasalahan cepat rusaknya susu segar. Metode pengawetan yang sering dilakukan adalah dengan cara pendinginan. Metode pengawetan dengan pendinginan ini dapat dijumpai di KUD persusuan. Susu yang diperoleh dari peternak, langsung dimasukkan dalam unit pendingin agar dapat bertahan lama sebelum susu tersebut dikirimkan ke Industri Pengolahan Susu (IPS). Susu segar mengandung zat antibakteri alami yang secara natural terdapat di dalam susu diantaranya nisin, laktoferin, laktoperoksidase. Jika dilihat berdasarkan kekuatan sebagai antimikroba maka komponen laktoperoksidase ini memiliki peran yang besar dalam mempertahankan kualitas susu dari serangan mikroorganisme. Penelitian tentang laktoperoksidase untuk pengawetan susu, sudah banyak dilakukan. Secara umum dapat disimpulkan bahwa laktoperoksidase ketika ditambahkan ke dalam susu dapat meningkatkan daya tahan susu. Namun disisi lain, laktoperoksidase tidak dapat dijumpai dengan mudah dan harganya sangat mahal. Oleh karena itu perlu metode untuk mengambil laktoperoksidase ini dari susu yang diambil LPOnya yang berasal dari whey.

Penelitian yang telah dilakukan oleh [Al-Baarri et al., \(2010^b\)](#) menyimpulkan bahwa Sepharose Fast Flow® dapat mengimobilisasi laktoperoksidase dengan sangat baik dengan efisien immobilisasi mencapai 90%. Oleh karena itu, sepharose jenis Fast Flow telah terbukti sangat baik untuk mengimobilisasi laktoperoksidase. Salah satu teknologi yang dapat diterapkan dalam upaya meningkatkan efisiensi penggunaan laktoperoksidase adalah dengan cara imobilisasi. Melalui proses ini, enzim dapat digunakan berulang kali. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan

untuk mengimobilisasi laktoperoksidase dengan bantuan resin berjenis Sepharose Fast Flow dan upaya mempertahankan laktoperoksidase yang telah terimobilisasi kedalam resin tersebut dengan berbagai macam materi perendam resin.

Materi dan Metode

Materi

Susu segar, whey, Sepharose Fast Flow (SP-FF), NaCl 0,05 N, fosfat buffer pH 7, alkohol, parafilm, kain saring, aquades, asetat buffer, H₂O₂, dan *2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid* (ABTS).

Persiapan pembuatan whey

Pembuatan whey dilakukan dengan menggunakan dua setengah liter susu sapi yang di sentrifugasi sebesar 6.000 rpm selama 30 menit, sentrifus akan menyebabkan lemak dan skim terpisah, kemudian skim diambil dan diberikan 0,02% (b/v) rennet dan 2,0 ml asam laktat pada suhu 30°C selama 40 menit. Kasein yang terkandung dalam whey kemudian dipisahkan dengan filtrasi melalui kain saring, terlebih dahulu kain saring dipanaskan agar dapat membuka pori-pori pada kain saring kemudian melalui kertas filter dibawah kondisi pompa vakum. Filtrat yang merupakan whey yang akan digunakan dalam penelitian ini, dan disimpan dalam refrigerator untuk selanjutnya dapat digunakan pada tahap selanjutnya ([Al-Baarri et al., 2010^b](#)).

Pencucian kolom terbuka berisi Sepharose Fast Flow

Kolom terbuka dicuci aquades sebanyak 1 molar NaCl dalam 500 ml aquades, aquades dialirkan kedalam kolom terbuka yang berisi SP-FF selanjutnya kolom terbuka dicuci kembali dengan 0,1 molar NaOH sebanyak 300 ml, sampai dihasilkan oput yang jernih ([Al-Baarri et al., 2011](#)).

Proses purifikasi LPO

Purifikasi LPO dilakukan dengan menggunakan SP-FF sebagai media untuk imobilisasi dari whey. Whey dengan volume 2 liter dialirkan pada kolom terbuka (0,5 x 10 cm) yang telah terdapat SP-FF disirkulasikan melalui kolom terbuka dengan menggunakan sebuah tabung dan pompa vakum. Whey yang dialirkan dengan aliran 1,0 ml/menit dengan bantuan pompa vakum (Al-Baarri *et al.*, 2011). Hasil output berupa LPO murni ini akan digunakan untuk penelitian selanjutnya.

Pembuatan kolom terbuka untuk pengujian LPO

Kolom terbuka untuk pengujian LPO diperlukan kolom terbuka berukuran 1 ml, yang kemudian diisi dengan SP-FF sebanyak 0,6 gram, lalu ditutup menggunakan 1 lapis *fiber cloth* disesuaikan dengan diameter kolom. Larutan LPO dialirkan dengan menggunakan pompa vakum dengan aliran 1,0 ml/menit, kemudian dimasukkan kedalam bahan perendam: whey, susu yang di pasteurisasi, dan phosfat buffer pH 7 dalam keadaan tertutup, dengan menggunakan parafilm dan disimpan di dalam *refrigerator* selama 3 hari dengan suhu 4°C dan dalam inkubator 30°C. Kuantitas absorbansi diuji setiap hari selama 3 hari dengan menggunakan 250µl H₂O₂ dan 750µl 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) sebagai radikal bebas diukur selama 20 detik dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 412 nm (Al-Baarri *et al.*, 2010^b).

Perendaman LPO

Setelah dilakukan imobilisasi LPO, maka LPO yang menempel pada resin SP-FF direndam ke dalam tiga macam larutan perendam: phosphate buffer pH 7,0 (a₁), whey (a₂), dan susu (a₃). Penyimpanan dilakukan dalam suhu 4°C dan 30°C. Sisa LPO yang masih terikat didalam resin kemudian dihitung untuk mengetahui seberapa banyak LPO yang tersisa setelah penyimpanan selama 3 hari.

Hasil dan Pembahasan

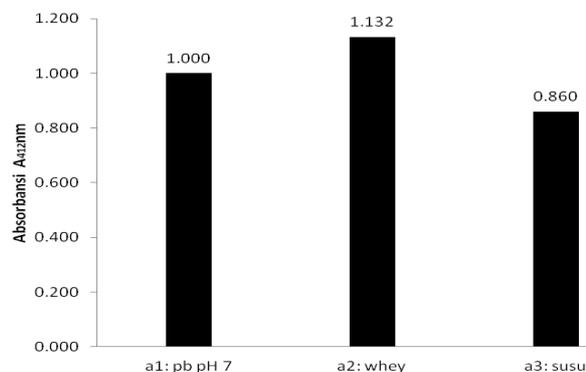
Berdasarkan Figur 1, rata-rata nilai absorbansi a₁= 1,033, a₂= 1,132, dan a₃= 0,860. Nilai absorbansi tertinggi terdapat pada perlakuan perendaman a₂, diikuti oleh a₁ dan a₃. Semakin tinggi nilai absorbansi maka aktivitas LPO makin tinggi. Warna hijau yang muncul adalah menandakan seberapa jauh kemampuan radikal bebas yang ditangkap oleh LPO.

Figur 2 menunjukkan bahwa perendaman pada suhu 30°C menghasilkan nilai absorbansi yaitu: a₁= 0,809, a₂= 0,328, a₃= 0,186. Sampel a₁ merupakan hasil perlakuan dengan nilai absorbansi tertinggi. Berdasarkan nilai tersebut didapat kesimpulan bahwa rata-rata hasil perlakuan dari ketiga bahan perendam tersebut mengalami selisih yang cukup jauh antara bahan perendam satu dengan yang lainnya.

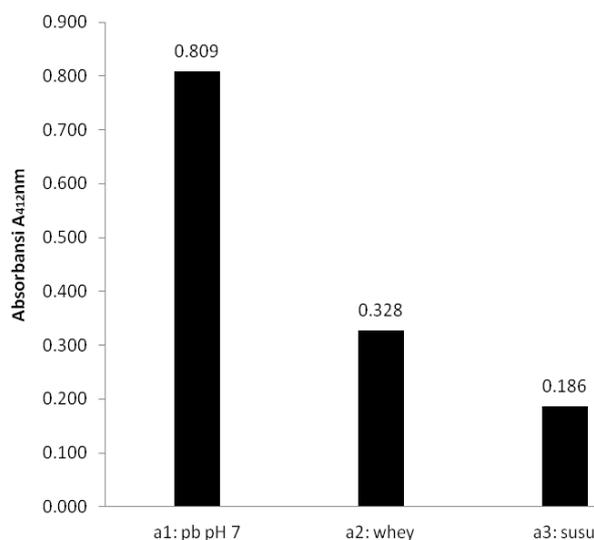
Aktivitas LPO pada Suhu 4°C

Berdasarkan Tabel 1, aktivitas enzim yang dihasilkan ketika disimpan pada suhu 4°C dengan

berbagai perendam diperoleh hasil yaitu a₁= 47,809 unit/ml, a₂= 52,392 unit/ml dan a₃= 39,637 unit/ml. Angka ini didapat dari nilai absorbansi setelah dilakukan konversi dengan menggunakan angka molekular ekstensi dari ABTS. Secara statistik, tidak terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan macam bahan perendam namun perlakuan a₂ ternyata menghasilkan aktivitas enzim tertinggi. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Al-Baarri *et al.*, (2011) bahwa whey mampu mempertahankan aktivitas enzim LPO. Seifu *et al.*, (2004) menyatakan laktoperoksidase bersama enzim lainnya di dalam susu seperti nisin dan laktoferin berfungsi untuk mencegah pertumbuhan bakteri patogen sehingga jika enzim ini dapat dipertahankan keberadaannya di dalam susu maka dapat memperpanjang masa simpan susu. Disamping itu, pendinginan tidak hanya mempertahankan kerja enzim, namun juga mampu menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk (Legowo *et al.*, 2009).



Figur 1. Grafik absorbansi LPO dengan berbagai macam perendam pada suhu 4°C



Figur 2. Grafik absorbansi LPO dengan berbagai macam perendam pada suhu 30°C

Aktivitas LPO pada Suhu 30°C

Menurut Martoharsono (1994), phosphate buffer dapat mencegah enzim mengalami inaktivasi. Pernyataan ini sesuai dengan hasil penelitian ini yang menunjukkan hasil bahwa perendaman

laktoperoksidase dalam buffer terbukti mampu menghasilkan aktivitas tertinggi pada suhu 30°C (Tabel 1). Sedangkan pada nilai aktivitas enzim yang paling rendah adalah a₃, yaitu dalam susu. Hal ini dikarenakan di dalam susu terdapat kasein yang dapat menghambat aktivitas laktoperoksidase. Hal ini sesuai dengan penelitian [Fonteh et al. \(2005\)](#) bahwa kasein menyebabkan aktivitas laktoperoksidase menjadi rendah. Ditambahkan oleh [Al-Baarri et al. \(2010^a\)](#) bahwa selain kasein, laktosa juga menyebabkan rendahnya aktivitas enzim LPO.

Tabel 1. Perbandingan aktivitas enzim laktoperoksidase pada suhu 4°C dan 30°C

Macam Perendam	Suhu	
	4°C	30°C
a ₁	47,809 ^{ns}	37,916 ^a
a ₂	52,392 ^{ns}	15,193 ^b
a ₃	39,637 ^{ns}	8,588 ^b

Keterangan : superskrip pada baris dan kolom yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata (p<0,05). Superskrip ns menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata (p>0,05)

Penyimpanan selama beberapa hari pada suhu 30°C di dalam phosfat buffer pH 7 ternyata mampu mempertahankan aktivitas enzim LPO. Pada penelitian ini, penyimpanan selama 3 hari dapat menurunkan aktivitas LPO menjadi 16,528 unit/ml (data tidak ditampilkan). Hal ini sesuai dengan pendapat oleh [Al-Baarri et al. \(2010^b\)](#) aktivitas enzim LPO secara alamiah mengalami pengurangan seiring dengan lamanya waktu penyimpanan. Hilangnya aktivitas laktoperoksidase dalam LPO yang direndam pada *phosphate buffer* dimungkinkan karena adanya pelepasan enzim dari resin. Denaturasi pada enzim juga dapat disebabkan oleh interaksi protein dengan lingkungan yang mengandung air ([Chaplin dan Buckle, 1990](#)). Menurut [Lehninger \(1990\)](#) *phosphate buffer* akan efektif dalam menjalankan kemampuan buffernya di dalam cairan intraseluler yang mempunyai kisaran pH 6,9-7,4. Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan pH sebesar 7,0.

Berdasarkan nilai aktivitas LPO, didapat hasil bahwa nilai LPO yang disimpan dalam suhu 30°C lebih rendah daripada nilai LPO yang disimpan dalam suhu 4°C. Hal ini sesuai dengan pendapat [deMan \(1997\)](#) bahwa peroksidase bersifat tidak tahan terhadap panas dan pada suhu pasteurisasi, peroksidase dapat diinaktifkan.

Menurut [Schwedt dan Stein \(1994\)](#) bahwa imobilisasi dapat mencegah lepasnya enzim untuk bercampur ke dalam larutan dan mudah untuk diperoleh kembali. Imobilisasi juga berfungsi mengurangi jumlah enzim yang digunakan dan dapat digunakan lagi untuk penggunaan berikutnya. Beberapa kasus, imobilisasi juga dapat meningkatkan aktivitas enzim. Hal ini sangat berfungsi terutama dalam menurunkan biaya pemanfaatan LPO untuk membunuh bakteri. Ditambahkan oleh [Legowo et al. \(2011\)](#) bahwa enzim laktoperoksidase (LPO) sangat berperan untuk

membunuh bakteri. Oleh karena itu, dengan melakukan imobilisasi, maka dapat menurunkan biaya yang dikeluarkan untuk membeli atau memproduksi enzim.

Kesimpulan

LPO yang direndam dengan menggunakan whey, mampu dipertahankan aktivitasnya dengan baik pada suhu 4°C selama 3 hari sedangkan perendaman dalam kondisi suhu 30°C, *phosphate buffer* merupakan bahan perendam yang terbaik karena dapat mempertahankan aktivitas LPO dengan baik.

Daftar Pustaka

- Al-Baarri, A. N., M. Hayashi, M. Ogawa, S. Hayakawa. 2010a. Effect of mono- and disaccharides on the antimicrobial activity of bovine lactoperoxidase system. *Journal Food Protein*. 74: 134–139.
- Al-Baarri, A. N., Ogawa, M. & Hayakawa, S. 2010b. 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. 2011. Application of lactoperoxidase system using bovine whey and the effect of storage condition on lactoperoxidase activity. *International Journal of Dairy Science*. 6: 72–78.
- Chaplin, MF dan Buckle C. 1990. *Enzym Technology*. Cambridge University Press. New York.
- deMan, J.M. 1997. *Kimia Makanan*. Cetakan ke-2. Institut Teknologi Bandung, Jakarta (Diterjemahkan oleh Kosasih P.).
- Fonteh, F. A., Gradison, A.S. & Lewis, M.J. 2005. Factor affecting lactoperoxidase activity. *International Journal of Dairy Technology*. 58 (4) : 233-236
- Legowo, M. A., Kusrahayu dan Sri Mulyani. 2009. *Ilmu dan Teknologi Susu*. BP UNDIP, Semarang.
- Legowo, A. M., Al-Baarri, A. N., Ogawa, M. & Hayakawa, S. 2011. The performance inhibition of ketohexoses and aldohexoses in lactoperoxidase activity assay. *Proceedings of the International Conference of Indonesian Society Lactic Acid Bacteria* (In Press).
- Lehninger, Albert. 1990. *Dasar-dasar Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Martoharsono, S. 1994. *Biokimia I*. Universitas Gajah Mada Press. Yogyakarta.
- Schwedt, G., & K. Stein. 1994. Immobilized enzymes as tools in food analysis. *European Food Research and Technology*. 199: 171-182.
- 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.