

IDENTIFIKASI LAKTOFERIN PADA SUSU KAMBING KACANG DENGAN METODE IMUNODIFUSI RADIAL TUNGGAL DAN NATRIUM DODESIL SULFAT POLIAKRILAMIDA ELEKTROFORESIS GEL

Rarah Ratih Adjie Maheswari^{1*}, Joni Setiawan¹, Slamet Mulyanto¹,
Imas Batubara², Cece Sumantri¹, Akhmad Farajallah²

ABSTRACT

LACTOFERRIN IDENTIFICATION ON KACANG GOAT MILK USING SINGLE RADIAL IMMUNODIFFUSION AND SODIUM DODECYL SULPHATE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS METHODS

Kacang goat is one of Indonesian local goat which has not been optimized in exploration. *Kacang* goat has potency as a dairy goat. Milk and colostrum from this type of goat is one of lactoferrin sources which has various benefit, such as antimicrobial activity. The milk as a lactoferrin source is expected to be a solution for bacterial gastrointestinal infection cases which is a major problem in Indonesia. This research described the identification of lactoferrin from milk and colostrum of *kacang* goat by single radial immunodiffusion (SRID) and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). SRID is based on the diffusion of whey protein from a circular well into a homogeneous gel containing anti-lactoferrin. SDS-PAGE was performed in 7.5% polyacrylamide gel. Both methods were able to identify lactoferrin in colostrum and milk from the sample, but SRID showed low sensitivity toward low concentration of lactoferrin in both colostrums and milk. The estimation of lactoferrin molecular weight by relative mobility of protein from the bands that perform of colostrum and milk of *kacang* goat is approximately 74,100 Dalton. Based on the ring diameter of the precipitin, the lactoferin level in colostrum and milk increased until 48 hours after postpartum and subsequently decreased.

Keywords: colostrum, milk, *kacang* goat, lactoferrin, SRID, SDS-PAGE

ABSTRAK

Kambing kacang merupakan ternak lokal yang belum tereksplorasi secara optimum. Selain sebagai ternak pedaging, kambing jenis ini berpotensi sebagai penghasil susu sehingga dapat memberikan nilai tambah bagi perekonomian masyarakat. Susu kambing ini merupakan salah satu sumber laktoferin yang memiliki manfaat, di antaranya sebagai anti-mikrob. Pemanfaatannya sebagai sumber laktoferin diharapkan dapat mengatasi kasus infeksi pencernaan bakterial yang tinggi pada masyarakat. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi mutu susu kambing *kacang* dari peternakan rakyat di Kecamatan

an Jasinga dan Tenjo, Kabupaten Bogor serta mengidentifikasi laktoferin yang terkandung di dalamnya. Laktoferin dalam kolostrum dan susu diidentifikasi dengan metode imunodifusi radial tunggal (SRID) dan natrium dodesil sulfat gel poliakrilamida (SDS-PAGE). Aplikasi metode SRID dengan mendifusikan whey dari sampel ke dalam gel yang mengandung anti-laktoferin. Susu kambing asal Kecamatan Jasinga dan Tenjo, memiliki kadar protein 5,2-5,5%; kadar lemak 4,7-7,9%; kadar bahan kering 16,2-19,3%; dan bobot jenis 1,035-1,037. Laktoferin dapat diidentifikasi dengan metode SRID maupun SDS-PAGE. Metode SRID tidak mampu mengidentifikasi keberadaan laktoferin dengan konsentrasi yang rendah, sedangkan metode SDS-PAGE lebih akurat untuk mengidentifikasi kandungan laktoferin di dalam kolostrum dan susu kambing kacang. Bobot molekul laktoferin dari sampel adalah 73 144 Da. Kandungan laktoferin ditentukan secara kualitatif berdasarkan diameter zona presipitin yang menunjukkan kadarnya lebih besar dari 11,77 mg/mL. Kandungan laktoferin dalam susu meningkat sampai 48 jam pasca-melahirkan, kemudian mengalami penurunan setelahnya.

Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor. Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor. Telp./Fax. 0251-8628379

Alumni Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.

Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor

* Penulis Korespondensi: juriptfapet@ipb.ac.id

Kata kunci: kolostrum, susu, kambing kacang, laktoferin, SRID, SDS-PAGE

PENDAHULUAN

Kesehatan masyarakat dengan tingkat ekonomi rendah pada saat ini masih sangat memprihatinkan, yang ditunjukkan dengan sering dijumpainya kasus infeksi saluran pencernaan khususnya pada balita oleh bakteri *Escherichia coli*. Kondisi tersebut membutuhkan penanganan yang serius, sehingga tidak terjadi *loss generation* di masa yang akan datang. Kebutuhan pangan sehat dan kaya akan gizi, terutama susu, dengan harga yang murah tetapi bermutu tinggi perlu mendapatkan perhatian dari pemerintah.

Pemenuhan kebutuhan akan susu yang masih rendah baik secara kuantitas maupun mutu menjadikan pemerintah harus segera menciptakan kondisi peternakan yang lebih mandiri. Susu kambing mempunyai nilai gizi serupa dengan susu sapi sehingga dapat digunakan sebagai suatu alternatif pengganti susu sapi untuk merehabilitasi anak-anak penderita gizi buruk (Razafindrakoto *et al.* 1994). Sangat diharapkan ketersediaan susu dari dalam negeri, yang tidak mengandalkan impor, dengan jumlah yang besar dan bermutu baik diantaranya berkadar laktoferin tinggi (Conner 1993; Naidu 2003; Takakura *et al.* 2003), akan meningkatkan kesehatan masyarakat karena harganya pun akan menjadi terjangkau oleh seluruh masyarakat.

Laktoferin atau sering juga disebut sebagai lakto-transferin adalah transferin yang diisolasi dari susu. Laktotransferin bersifat antimikrob karena mengandung asam amino glikoprotein-703 yang mempunyai kemampuan sangat tinggi dalam mengikat Fe dari mikrob sehingga akan menghambat pertumbuhan mikrob (Connely 2001). Kadar laktoferin dalam susu sangat nyata dipengaruhi secara genetis. Gen laktoferin mempunyai dua alel A dan B, individu bergenotipe AA mempunyai kadar laktoferin lebih tinggi dari AB dan BB (Schanbacher *et al.* 1993).

Pemanfaatan kambing kacang sebagai ternak lokal, plasma nutfah Indonesia, selain sebagai penghasil daging juga dapat dijadikan alternatif untuk penghasil susu. Susu kambing oleh awam telah dipercaya mempunyai kelebihan dalam bidang kesehatan di antaranya mampu menyembuhkan diare,

penyakit tuberkulosis (TBC), meningkatkan vitalitas bagi pria dan mempunyai pencernaan tinggi. Susu kambing juga dapat dimanfaatkan dalam industri kosmetik, di antaranya digunakan sebagai bahan baku pembuatan sampo, sabun, deodoran, dan beberapa jenis krim untuk wajah dan tubuh.

Susu kambing mengandung berbagai komponen alami yang dapat meningkatkan mutu nutrisinya, salah satunya adalah laktoferin, yang telah banyak dimanfaatkan dalam bidang kesehatan. Keberadaan laktoferin dalam susu meningkatkan mutu hayati susu. Pengembangan teknologi untuk menggali manfaat laktoferin telah diwujudkan, salah satunya dengan mengisolasi laktoferin yang kemudian digunakan sebagai bahan tambahan pangan untuk menghasilkan pangan fungsional.

Seleksi terhadap kambing kacang untuk memperoleh kambing superior yang dapat memproduksi susu dengan kuantitas dan mutu yang diinginkan sangat diperlukan. Hal ini dapat dilakukan dengan cara percepatan proses melalui teknologi molekuler dengan memanfaatkan gen penciri yang mempunyai peranan dalam mengendalikan sifat produksi susu berlaktoferin tinggi.

Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi mutu susu kambing kacang dan mengidentifikasi laktoferin baik pada kolostrum maupun susunya dengan metode *single radial immunodifusi* (SRID) dan *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Kandungan laktoferin pada susu manusia dan sapi telah banyak diteliti dengan menggunakan berbagai metode, di antaranya SRID dan SDS-PAGE, namun belum ada penelitian tentang kandungan laktoferin susu kambing. Identifikasi laktoferin susu kambing juga memungkinkan dengan menggunakan metode tersebut sehingga menarik untuk dilakukan.

METODE

Penyiapan Sampel

Hewan coba yang digunakan adalah induk kambing kacang betina. Kambing tersebut telah berproduksi dan dipelihara pada kondisi manajemen pemeliharaan secara tradisional oleh peternak kambing kacang rakyat di Kecamatan Jasinga dan Kecamatan Tenjo, Kabupaten Bogor. Sampel kolostrum dan susu yang diperoleh dengan cara pemerahan

an manual dari induk kambing ditampung dalam botol steril dan selama pengangkutan dijaga dalam kondisi dingin ($7\pm 1^{\circ}\text{C}$) dalam *cool box* berisi es batu hingga dianalisis di laboratorium. Sampel kolostrum diperah pada 24, 48, dan 72 jam pasca-melahirkan. Sampel susu diperah pada 4, 5, 6, dan 7 hari pasca-melahirkan.

Analisis Mutu Kolostrum dan Susu

Kolostrum dan susu dianalisis keadaan dan mutunya yang meliputi nilai pH (BSN 1992), bobot jenis (BSN 1998a), kadar air (BSN 1998a), kadar abu (AOAC 2000), kadar lemak (AOAC 2000), kadar protein (BSN 1998a) dan penghitungan *total plate count* sesuai dengan SNI 19-2897-1992 (BSN 1992; FDA BAM 2001).

Pemisahan *Whey* Kolostrum dan Susu (Yoshida dan Xiuyun 1991; Yoshida *et al.* 2000)

Krim pada kolostrum dan susu dipisahkan dengan sentrifugasi (12.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C); susu skim yang diperoleh ditambah dengan HCl 2 N hingga pH 4,6. Endapan kasein yang terbentuk dipisahkan dari *whey* dengan menggunakan sentrifugasi (12.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C). *Whey* asam ini dinetralkan ke pH 6,8 dengan NaOH 2N dan disentrifugasi kembali (12.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C). Supernatan diambil dan disimpan di dalam *freezer* untuk digunakan pada analisis selanjutnya.

Metode SRID

(Mancini *et al.* 1965; Tsuji *et al.* 1990)

Kadar laktoferin di dalam kolostrum dan susu diukur dengan metode SRID. Antigen laktoferin didifusikan ke dalam agar-agar yang telah dicampur antibodi, kemudian zona bening yang terbentuk dihitung dan diproposionalkan dengan logaritma dari konsentrasi antigen. Selanjutnya sampel antigen yang belum diketahui konsentrasinya dibandingkan dengan kurva yang telah dibuat dari antigen yang telah diketahui konsentrasinya.

Sebanyak 1 % agarosa disiapkan di dalam 0,05 M bufer fosfat pH 7,5 yang mengandung 0,1% (b/v) NaN_3 dan 2% anti-laktoferin (Sigma-Aldrich Co). Larutan agarosa dimasukkan ke dalam cawan Petri dengan ketebalan 1,5 mm. Sumur pada gel dibuat

dengan diameter 5 mm dengan jarak antarsumur 12 mm. Sebanyak 20 μl sampel *whey* yang akan diukur kandungan laktoferinnya dimasukkan ke dalam sumur. Laktoferin dari susu dan kolostrum sapi (Sigma-Aldrich Co) digunakan sebagai standar dengan konsentrasi masing-masing 1,17 mg/mL dan 11,7 mg/mL. Diameter cincin presipitin sampel yang diuji diplot pada kurva standar laktoferin untuk mendapatkan konsentrasi laktoferin sampel.

Metode SDS-PAGE (Laemmli 1970)

Justifikasi hasil SRID dan pengukuran bobot molekul laktoferin dilakukan dengan metode SDS-PAGE dengan gel pemisah (*running gel*) 7,5% dan gel penahan (*stacking gel*) 3%. Sebelum dimasukkan ke dalam sumur, *whey* susu ditambah dengan *dissociation buffer* dengan nisbah 2:1, lalu dipanaskan dalam penangas air selama 3 menit. Sampel *whey* susu yang telah disiapkan sebanyak 20 μl dimasukkan ke dalam sumur di gel penahan dan di-*running* dalam 600ml reservoir bufer pada 30 mA selama 2 jam. Gel difiksasi di dalam larutan TCA 12% selama 4 jam sambil terus digoyang. Pewarnaan dilakukan semalaman di dalam larutan pewarna. Gel yang telah diwarnai dibilas dengan larutan *destaining* sambil terus digoyang sampai terbentuk gel dengan latar belakang pita-pita protein dalam keadaan bersih.

Penentuan Bobot Molekul Laktoferin

Bobot molekul ditentukan dengan membuat kurva protein standar (marker) dari bobot molekul yang diketahui diplot pada *relative mobility* (R_m) yang diperoleh dan R_m protein yang ingin diketahui bobot molekulnya diplot pada kurva tersebut. R_m dihitung dengan rumus:

$$\text{Relative mobility} = \frac{\text{Jarak migrasi protein dari awal resolving gel}}{\text{Jarak antara awal resolving gel dan tracking dye}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Komposisi Kolostrum dan Susu

Kadar protein, lemak, bahan kering, bobot jenis, dan nilai pH kolostrum dan susu kambing kacang yang diperoleh (Tabel 1) masih sesuai dengan pernyataan Johnson (1974), Bonczar dan Regula (2003), dan Pulina dan Nudda (2004), yaitu kadar

protein 5,20-5,5%; kadar lemak 4,66-7,9%; kadar bahan kering 16,18-19,29%; bobot jenis 1,035-1,037, dan nilai pH 6,63-6,65. Komposisi susu kambing kacang pada penelitian ini juga memenuhi syarat mutu susu segar menurut SNI No. 01-3141-1998, yaitu kadar lemak minimum 3,0%, kadar protein minimum 2,7%, dan bobot jenis minimum 1,028.

Tabel 1 Komposisi kolostrum dan susu kambing kacang pada minggu pertama pasca-melahirkan

Komposisi	Waktu Pemerahan Pasca-melahirkan (jam)			SNI No. 01-3141-1998 (BSN 1998b)
	Kolostrum	Susu		
	48	72	96	
Bahan kering (%)	17,44	18,69	13,38	8,0
Lemak (%)	7,16	7,51	4,83	3,0
Protein (%)	4,62	5,01	4,94	2,7
Abu (%)	0,61	1,00	1,03	-
pH	6,53	6,63	6,68	-
Bobot jenis (g/mL)	1,047	1,038	1,030	1,028
TPC (cfu/mL)	$3,1 \times 10^2$	$6,0 \times 10^3$	$5,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$

Komposisi lemak dan bahan kering susu mulai menurun pada pemerahan 96 jam pasca-melahirkan, disebabkan oleh terjadinya perubahan kolostrum menjadi susu normal. Susu hasil pemerahan 2 hingga 3 hari pertama pasca-melahirkan masih berupa kolostrum, sesuai dengan Brandano *et al.* (2004) yang menyatakan bahwa kolostrum tidak diproduksi lagi setelah 4 hingga 5 hari pasca-melahirkan, selanjutnya akan terjadi perubahan kolostrum menjadi susu sepenuhnya. Menurut Johnson (1974) kolostrum memiliki kandungan bahan kering, kadar lemak, dan kadar protein yang tinggi. Hasil yang sama diperoleh pada penelitian ini. Susu hasil pemerahan 48 dan 72 jam memiliki kandungan bahan kering dan lemak yang hampir sama, karena masih berupa kolostrum. Kandungan bahan kering dan lemak kolostrum kambing kacang lebih tinggi dibandingkan susu hasil pemerahan 96 jam pasca-melahirkan, namun hasil ini masih di bawah nilai kadar lemak dan bahan kering kolostrum yang diperoleh Brandano *et al.* (2004) pada pemerahan 24 jam pertama setelah ternak melahirkan, yaitu kadar lemak 8,8% dan kadar bahan kering 22,6%. Komposisi kolostrum kambing kacang berbeda nyata pada pemerahan 24 jam pertama pasca-melahirkan, sedangkan kolostrum hasil pemerahan 24-72 jam pasca-melahirkan tidak terlalu berbeda dibandingkan komposisi susu normal (96 jam).

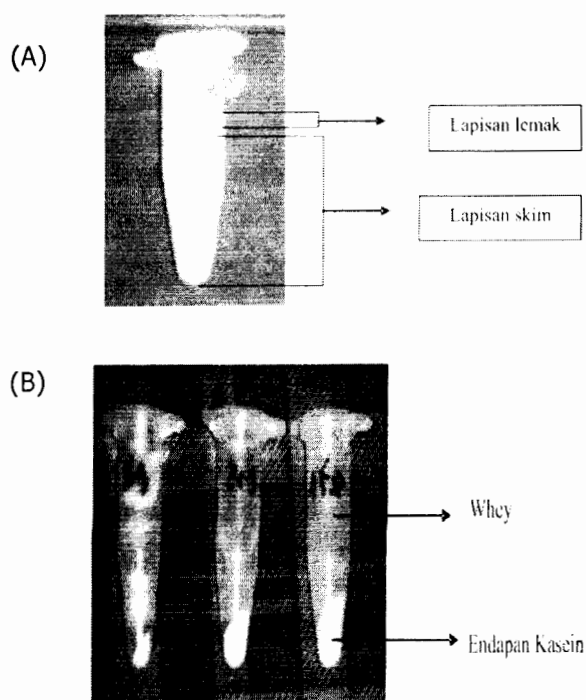
Kadar protein susu hasil pemerahan pada waktu yang berbeda memiliki nilai yang hampir sama, tidak sesuai dengan pernyataan Johnson (1974) yang menyatakan kadar protein kolostrum lebih tinggi dibanding susu normal. Globulin sangat menentukan kadar protein pada kolostrum (Schmidt 1971). Rendahnya kadar protein kolostrum dapat disebabkan oleh rendahnya kadar globulin, karena globulin akan dihasilkan maksimal pada 24 jam pertama pasca-melahirkan. Ontsouka *et al.* (2003) menambahkan kandungan total protein pada kolostrum yang tinggi dipengaruhi oleh immunoglobulin G (IgG) yang tinggi pada kolostrum dibanding susu normal. Selain IgG konsentrasi fraksi protein yang lain seperti lakto-globulin, laktoferin, dan transferin dalam kolostrum juga lebih tinggi dibandingkan susu normal. Immunoglobulin merupakan antibodi yang disekresikan cukup banyak di dalam susu pada 24 jam pertama pasca-melahirkan.

Pemerahan pada mamalia yang laktasi minimal dilakukan 2 kali sehari. Susu sebagai makanan yang bersifat mudah rusak (*perishable*) sangat mudah terkontaminasi oleh mikroba. Jumlah *total plate count* pada kolostrum dan susu pada waktu pemerahan 48 dan 72 jam pasca-melahirkan berturut-turut adalah $3,1 \times 10^2$ cfu/mL dan $6,0 \times 10^3$ cfu/mL. Jumlah total mikroba pada susu kambing kacang ini masih memenuhi SNI 01-3141-1998 (BSN 1998b) yang menentukan batas maksimum total mikroba pada susu segar sebesar $1,0 \times 10^6$ cfu/mL. Hal ini menunjukkan susu kambing kacang tersebut masih layak guna diolah lebih lanjut untuk dikonsumsi.

Pemisahan Krim dan Skim dari Kolostrum dan Susu

Pemisahan lemak dan kasein bertujuan memekatkan laktoferin pada *whey* sehingga pada analisis selanjutnya laktoferin lebih mudah dideteksi. Sesuai dengan pernyataan Bos *et al.* (2000), laktoferin merupakan komponen utama pada *whey* manusia, walaupun hanya sedikit pada *whey* sapi. Hasil penelitian Kunz dan Lonnerdall (1989) menunjukkan bahwa dalam pemisahan protein-protein *whey* susu secara elektroforesis, yang dominan adalah laktoferin dan serum albumin dengan pita yang lebih tebal dan gelap.

Sentrifugasi kolostrum dan susu kambing kacang dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 menit dapat memisahkan lemak dari skim susu. Lemak susu membentuk lapisan tipis pada bagian atas tabung karena memiliki bobot jenis yang lebih rendah dibandingkan susu skim. Hasil sentrifugasi kolostrum dan susu dapat dilihat pada Gambar 1. Lemak kolostrum dan susu memiliki warna putih, berbeda dengan lemak susu sapi yang berwarna kekuning-kuningan karena karoten (pro-vitamin A) yang terkandung di dalamnya sebagian besar telah tereduksi menjadi vitamin A.



Gambar 1 Hasil pemisahan (A) lemak/krim dengan skim dan (B) kasein dengan *whey* dari kolostrum dan susu kambing kacang dengan sentrifugasi

Pemisahan Kasein dan *Whey* dari Kolostrum dan Susu

Pengasaman susu pada pH isoelektrik (4,6) secara umum dapat menyebabkan koagulasi kasein dan terbentuknya *whey* (Singh dan Bennet 2002). Penurunan pH susu, ditegaskan oleh Kunz dan Spenderdall (1989), dapat menghasilkan *whey* yang lebih bersih dan fraksi kasein pada *whey* menjadi lebih sedikit.

Skim dari susu atau kolostrum diperoleh melalui sentrifugasi terlebih dahulu (Gambar 1A), lalu ditambah dengan HCl 2N hingga pH 4,6. Pemisahan

antara kasein dan *whey* secara nyata dapat dilihat, setelah dilakukan sentrifugasi pada campuran. Muatan protein susu belum sepenuhnya dinetralkan oleh ion H^+ dari HCl pada awal reaksi, adanya sentrifugasi dengan kecepatan 12 000 rpm selama 30 menit membantu pemisahan antara kasein dan *whey* dari kolostrum maupun dari susu dengan lebih baik. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) untuk menghindari kerusakan pada laktoferin yang akan diidentifikasi selanjutnya (Oria *et al.* 1993; Paulsson *et al.* 1993). Hasil pemisahan antara kasein dan *whey* setelah sentrifugasi dapat dilihat pada Gambar 1B.

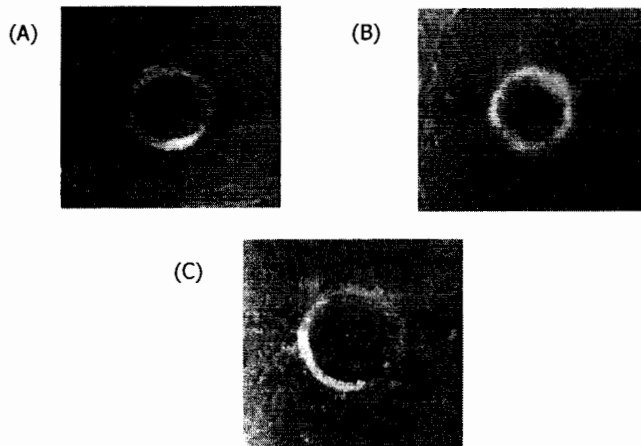
Identifikasi Laktoferin dalam Kolostrum dan Susu dengan Metode SRID

Teknik radial immunodiffusi telah digunakan untuk mengukur kuantitas laktoferin dan plasma protein lain seperti immunoglobulin. Difusi sampel dan standar ke dalam agar-agar yang berisi antiserum akan menyebabkan pembentukan suatu zona atau cincin presipitin. Setelah beberapa waktu, diameter cincin akan sebanding dengan konsentrasi antigen di dalam sumur (Dixon 1998).

Hasil penelitian menunjukkan adanya pembentukan cincin presipitin berupa zona keruh di sekeliling sumur, kecuali pada sampel susu kambing kacang K1 yang diperah pada 72 jam pasca-melahirkan (Gambar 2). Terbentuknya cincin presipitin menunjukkan adanya laktoferin di dalam sampel yang bereaksi dengan antibodi yang digunakan. Antibodi yang digunakan adalah anti-human laktoferin (Sigma-Aldrich).

Kandungan Laktoferin dari Kolostrum dan Susu

Diameter cincin presipitin yang terbentuk beragam antarkambing dan waktu pemerahan (Tabel 2). Diameter cincin presipitin yang terbentuk ekuivalen dengan konsentrasi laktoferin pada sampel. Hal ini berarti semakin besar diameter cincin presipitin yang terbentuk, semakin tinggi kadar laktoferin pada sampel tersebut. Diameter cincin presipitin yang tertinggi adalah 6,55 mm pada susu kambing 3 hasil pemerahan 48 jam, sedangkan susu kambing 1 hasil pemerahan 72 jam pasca-melahirkan tidak terbentuk cincin presipitin. Berdasarkan diameter cincin presipitin, kandungan laktoferin pada susu kambing kacang beragam antarindividu kambing dan waktu



Gambar 2 Hasil uji radial immunodifusi (SRID) pada susu kambing kacang: (A) Pemerahan 24 Jam pasca-melahirkan, (B) Pemerahan 48 Jam pasca-melahirkan dan (C) Pemerahan 72 Jam pasca-melahirkan

Tabel 2 Diameter cincin presipitin kolostrum dan susu kambing kacang pada umur laktasi yang berbeda dengan metode SRID

Temak	Umur Laktasi	Rerata Diameter Cincin Presipitin (mm)
Kambing kacang 1	24 jam	6,15 ± 0,02
	48 jam	6,21 ± 0,31
	72 jam	5,00 ± 0,00
Kambing kacang 2	24 jam	6,26 ± 0,15
	48 jam	6,32 ± 0,39
	7 hari	6,30 ± 0,23
Kambing kacang 3	24 jam	6,27 ± 0,46
	48 jam	6,55 ± 0,53
	5 hari	6,37 ± 0,21
	7 hari	6,22 ± 0,10

Keterangan: Diameter sumur 5,00 mm

pemerahan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Tsuji *et al.* (1990), bahwa kandungan laktoferin pada kolostrum atau susu beragam antarspesies dan antar-individu di dalam spesies.

Konsentrasi laktoferin pada kolostrum dan susu kambing dalam penelitian ini belum dapat ditentukan secara kuantitatif. Hal ini disebabkan standar laktoferin yang digunakan tidak menghasilkan cincin presipitin. Konsentrasi laktoferin dengan demikian hanya bisa diduga secara kualitatif berdasarkan besarnya diameter cincin presipitin yang terbentuk. Kadar laktoferin pada kolostrum dan susu kambing Kacang diduga lebih tinggi dari 11,7 mg/mL. Anti-laktoferin yang digunakan belum mampu bereaksi dengan

standar laktoferin dengan konsentrasi 11,7 mg/mL untuk menghasilkan cincin presipitin. Hal ini tidak sejalan dengan Tsuji *et al.* (1990) yang mendapatkan konsentrasi laktoferin kolostrum sapi tertinggi sebesar 11,77 mg/mL dan konsentrasi terendah tidak terdeteksi dengan metode SRID. Konsentrasi standar laktoferin pada penelitian juga lebih tinggi dibandingkan konsentrasi standar lipoprotein densitas rendah (LDL) yang digunakan Bosa *et al.* (1985), yaitu sebesar 40-240 mg/dL (0,4-2,4 mg/mL). Hal ini bisa disebabkan oleh antilaktoferin hanya mampu bereaksi dengan laktoferin yang memiliki konsentrasi tinggi di dalam kolostrum dan susu kambing kacang. Antibodi yang digunakan lebih spesifik dan lebih optimum bereaksi dengan laktoferin susu atau kolostrum manusia. Didukung oleh Kent Laboratories (2006) yang menyatakan bahwa metode SRID spesifik pada berbagai protein dan bergantung pada reaksi setiap protein dengan antibodi yang spesifik. Anti-laktoferin yang digunakan adalah antihuman laktoferin dari serum kelinci (Sigma-Aldrich Co.).

Diameter sumur dan jumlah sampel yang digunakan pada metode SRID juga bisa mempengaruhi zona presipitin yang dihasilkan. Penelitian ini menggunakan diameter sumur 5 mm dan jumlah sampel yang didifusikan di sumur sebesar 20 µl, berbeda dengan Bosa *et al.* (1985) yang menggunakan diameter sumur 1,8 mm dan jumlah sampel yang didifusikan sebesar 4 µL. Volume sampel yang lebih besar diharapkan menghasilkan cincin presipitin yang lebih jelas dan besar karena kandungan laktoferin yang bereaksi dengan antibodi juga lebih banyak. Bosa *et al.* (1985) menyatakan, apabila konsentrasi antigen besar pada sampel, maka waktu inkubasi sebelum 5 hari menyebabkan cincin presipitin yang terbentuk belum optimum. Sebaliknya, konsentrasi antigen kecil akan menghasilkan cincin presipitin yang kecil dan waktu optimum terbentuknya cincin presipitin lebih cepat. Sampel yang terlalu sedikit memungkinkan terjadinya penguapan pada *whey*, sehingga laktoferin di dalam *whey* tidak berdifusi secara sempurna di dalam gel. Laktoferin akan tertinggal di sekitar sumur, sehingga konsentrasi laktoferin tidak dapat ditentukan secara tepat.

Metode SRID pada penelitian ini menggunakan 1% agarosa dan waktu inkubasi selama 5 hari. Peng-

gunaan konsentrasi agarosa lebih dari 1% lebih sulit ditangani karena gel lebih cepat mengeras. Bosa *et al.* (1985) dalam uji SRID menggunakan standar LDL menunjukkan diameter cincin presipitin yang maksimal dipengaruhi oleh waktu inkubasi dan konsentrasi agarosa yang digunakan. Penggunaan LDL dengan konsentrasi rendah disarankan menggunakan waktu inkubasi lebih cepat (24 jam), sedangkan konsentrasi LDL di atas 200mg/dL memerlukan waktu inkubasi 5-6 hari untuk mendapatkan diameter cincin presipitin yang linear.

Diameter zona presipitin memiliki pola yang hampir sama pada semua sampel yang diteliti. Diameter cincin presipitin meningkat sampai pemerahan 48 jam dan menurun setelah 48 jam melahirkan (Tabel 2). Hal ini bisa karena susu setelah pemerahan 48 jam telah berubah menjadi susu penuh atau susu normal, sedangkan hasil pemerahan sebelum 48 jam masih berupa kolostrum. Hal ini sesuai dengan Playford *et al.* (2000) yang menyatakan kolostrum merupakan susu yang diproduksi pada 48 jam pertama pasca-melahirkan dan keberadaan laktoferin yang nyata hanya pada kolostrum (Renner 1989; Tsuji *et al.* 1990; Conner 1993; Schanbacher *et al.* 1993; Ferer *et al.* 2000).

Menurut Renner *et al.* (1989), pada susu sapi keberadaan laktoferin yang nyata hanya pada kolostrum dan menurun sampai 6 bulan laktasi dengan peningkatan kembali setelah itu. Kolostrum manusia juga memiliki kandungan laktoferin yang tinggi dan menurun secara cepat pada minggu pertama laktasi. Hal ini juga berlaku pada kambing kacang. Berdasarkan diameter cincin presipitin yang terbentuk, kandungan laktoferin pada susu kambing kacang menurun setelah 48 jam laktasi.

Diameter zona presipitin pada kambing 1 pada pemerahan 72 jam pasca-melahirkan menurun secara mencolok dan tidak terdeteksi adanya zona presipitin. Berbeda dengan kedua kelompok kambing lainnya, penurunan juga terjadi tetapi tidak mencolok. Terjadinya kasus infeksi pada ambing merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kandungan laktoferin pada susu. Menurut Renner *et al.* (1989), peningkatan konsentrasi laktoferin terjadi pada susu yang berasal dari ambing yang diinfeksi oleh bakteri patogen, sedangkan jika infeksi oleh bakteri patogen

diberikan dalam jumlah sedikit tidak akan berpengaruh nyata pada peningkatan konsentrasi laktoferin. Tsuji *et al.* (1990) menambahkan bahwa konsentrasi laktoferin pada susu normal akan meningkat selama infeksi koliform. Infeksi pada ambing kambing kacang yang diamati tidak mempengaruhi konsentrasi laktoferin pada susu yang diuji, karena jumlah total mikrob masih mampu ditekan sesuai dengan standar. Jumlah rata-rata total mikrob pada susu yang diuji, hasil pemerahan 24, 48, dan 72 jam setelah pemerahan secara berturut-turut adalah $8,0 \times 10^2$ cfu/mL, $3,1 \times 10^2$ cfu/mL, dan $6,0 \times 10^3$ cfu/mL masih memenuhi ketentuan SNI susu segar (BSN 1998b), yang menetapkan batas maksimum total mikrob pada susu segar sebesar $1,0 \times 10^6$ cfu/mL.

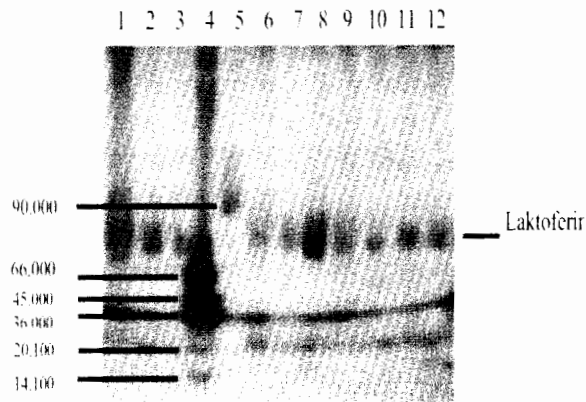
Identifikasi Laktoferin Kolostrum dan Susu dengan Metode SDS-PAGE

Sampel yang digunakan untuk uji SRID diuji kembali dengan SDS-PAGE untuk mengetahui keberadaan laktoferin pada setiap sampel. Metode SDS-PAGE digunakan untuk menguji keberadaan laktoferin pada sampel yang kemungkinan tidak dapat dideteksi dengan metode imunodifusi.

Menurut Smith (1998), protein biasanya dipisahkan dengan menggunakan konsentrasi gel 4-15%. Konsentrasi gel 15% digunakan untuk memisahkan protein dengan bobot molekul di bawah 50 kDa, sedangkan untuk protein dengan bobot molekul lebih dari 500 kDa menggunakan konsentrasi gel lebih rendah dari 7%. Hal ini berarti bahwa untuk memisahkan laktoferin yang memiliki bobot molekul sekitar 70-90 kDa dapat digunakan konsentrasi gel 7-15%. Kunz dan Lonnerdal (1989) memisahkan protein pada *whhey* susu manusia dengan menggunakan *polyacrylamide gradient gel electrophoresis* (PAGGE) dengan konsentrasi gel 3-27% pada 35 mA selama 6 jam atau 10-20% selama 4 jam.

Penggunaan konsentrasi gel pada penelitian ini sebesar 7,5% berbeda dengan penelitian Yoshida dan Xiuyun (1991) yang menggunakan konsentrasi gel 12,5% pada 6,5 mA selama 15 jam dan mampu mendapatkan pita laktoferin yang lebih jelas. Penelitian ini sesuai dengan Yoshida *et al.* (2000) yang melakukan pemisahan laktoferin-a dan laktoferin-b dari kolostrum sapi dengan menggunakan konsentrasi

gel 7,5%. Hasil SDS-PAGE dengan menggunakan konsentrasi 7,5% dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3 Hasil SDS-PAGE (7,5% Gel) Whey susu kambing kacang (1-3 : Kambing kacang K1 pemerahan 24, 48 dan 72 jam pasca-melahirkan; 4 : Marker; 5 : Standar Laktoferin; 6-8 : Kambing kacang K2 pemerahan 24 jam, 48 jam dan 7 hari pasca-melahirkan; 9-12 : Kambing kacang K3 pemerahan 24 jam, 48 jam, 5 hari dan 7 hari pasca-melahirkan)

Sodium dodesil sulfat (SDS) dan bahan pereduksi yang terdapat di dalam dissociation buffer berfungsi untuk memisahkan protein menjadi subunit-subunit. Bahan pereduksi yang digunakan adalah merkapto-etanol yang dapat mengurangi ikatan disulfida pada protein subunit atau antarsubunit. Protein mengikat SDS sehingga menjadi bermuatan negatif. Hal ini menyebabkan protein terpisah berdasarkan ukuran dengan sendirinya (Smith 1998).

Sampel yang dielektroforesis adalah sampel whey yang telah ditambah dissociation buffer. Semakin besar tambahan dissociation buffer, semakin rendah konsentrasi laktoferin pada larutan tersebut. Konsentrasi laktoferin yang rendah pada larutan akan menyebabkan pita laktoferin yang terbentuk setelah dielektroforesis tidak terlalu tebal.

Pengujian dengan SDS-PAGE mempertegas hasil identifikasi laktoferin dengan metode imunodifusi SRID. Hasil SDS-PAGE menunjukkan terdapat pita yang diduga merupakan laktoferin pada semua kambing kacang dengan waktu pemerahan berbeda. Hal ini berbeda dengan hasil uji imunodifusi, pada sampel kambing Kacang K1 hasil pemerahan 72 jam pasca-melahirkan tidak terdapat zona presipitin. Hal ini dimungkinkan oleh kandungan laktoferin pada

sampel 72 jam pasca-melahirkan terdapat dengan jumlah sangat kecil sehingga tidak dapat dideteksi dengan metode SRID.

Perbedaan bobot molekul laktoferin dari kolostrum dan susu kambing Kacang antarindividu dan antarwaktu pemerahan tidak dijumpai. Perkiraan bobot molekul laktoferin kolostrum dan susu kambing kacang berdasarkan hasil SDS-PAGE dengan menggunakan konsentrasi gel 7,5% adalah 73.144 Dalton (Da), lebih rendah dari bobot molekul laktoferin hasil sekresi kelenjar ambing sapi yang diperoleh Hurley et al. (1993), yaitu mendekati 83 dan 87 kDa. Yoshida et al. (2000) menambahkan, bobot molekul laktoferin-a diperkirakan pada 84.000 Da dan 80.000 Da untuk laktoferin-b. Nibbering et al. (2001) menggunakan laktoferin dari susu manusia dan mendapatkan bobot molekul sebesar 77.000 Da dari hasil pemurnian dengan menggunakan kromatografi penukar kation.

KESIMPULAN

Kesimpulan

Susu kambing kacang memiliki komposisi yang sesuai dengan standar minimum susu segar (BSI, 1998b). Identifikasi laktoferin dapat dilakukan dengan metode SRID maupun SDS-PAGE. Metode SRID tidak mampu mengidentifikasi laktoferin dengan konsentrasi rendah di dalam kolostrum dan susu kambing kacang, sedangkan metode SDS-PAGE lebih sesuai untuk identifikasi kandungan laktoferin di dalam kolostrum dan susu kambing kacang. Bobot molekul laktoferin kolostrum dan susu kambing Kacang berdasarkan hasil SDS-PAGE adalah 73.144 Da. Kandungan laktoferin pada kolostrum dan susu kambing kacang berdasarkan diameter zona presipitin meningkat sampai 48 jam pasca-melahirkan dan turun kembali setelah 48 jam melahirkan.

Saran

Seleksi terhadap kambing kacang untuk memperoleh kambing superior yang dapat memproduksi susu dengan kuantitas dan mutu yang diinginkan sangat diperlukan. Hal ini dapat dilakukan dengan cara percepatan proses melalui teknologi molekuler dengan memanfaatkan gen penciri yang mempunyai peranan dalam mengendalikan sifat produksi susu berlaktoferin tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC International. 2000. Official Methods of Analysis, 17th ed. AOAC International, Gaithersburg.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 1998a. SNI 01-2782-1998/Rev. 1992: Metode Pengujian Susu Segar. Jakarta: Dewan Standardisasi Nasional.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 1998b. SNI 01-3141-1998: Susu Segar Jakarta: Dewan Standardisasi Nasional.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2000. SNI 01-6366-1998: Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Batas Maksimum Residu dalam Bahan Makanan Asal Hewan. Jakarta: Dewan Standardisasi Nasional.
- Bonczar G, Reguła A. 2003. The influence of different amount of starter culture on the properties of yogurts obtained from ewe's milk. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Food Science and Technology* 6(2). <http://www.ejpau.media.pl/series/volume6/issue2/food/art-04.html>. [6 Juli 2006].
- Bos C, Gaudichon C, Tome D. 2000. Nutritional and physiological criteria in the assessment of milk protein quality for humans. *The Amer J Clin Nutr* 19:191S-205S.
- Bosa AJL, Adolphson JL, Albers JJ. 1985. Evaluation of the measurement of B protein of plasma low density lipoprotein by radial immunodiffusion. *J Lipid Res* 26: 995-1001.
- Brandano P, Rassu SPG, Lanza A. 2004. Feeding dairy lambs. Dalam Pulina G, Bencini R (Editor). *Dairy Sheep Nutrition*. Wallingford: CABI Publishing.
- Connely OM. 2001. Review: Antiinflammatory activities of lactoferrin. *J Amer College Nutr* 20:389S-395S.
- Conner DE. 1993. Naturally occurring compounds. Di dalam Davidson PM, Branen AL (Editor). *Antimicrobial in Food*. Edisi ke-2. New York: Marcel Dekker.
- Dixon DE. 1998. Immunoassays. Dalam Nielsen SS (Editor). *Food Analysis*, edisi ke-2. New York: Aspen.
- Ferrer PAR, Baroni A, Sambucetti ME, Lo'pez NE, Cernadas JMC. 2000. Lactoferrin levels in term and preterm milk. *J Amer College Nutr* 19:370-373.
- [FDA] Food and Drug Administration. 2001. *Bacteriological Analytical Manual*.
- Hurley WL, Grieve RCJ, Magura CE, Hegarty HM, Zou S. 1993. Electrophoretic comparisons of lactoferrin from bovine mammary secretions, milk neutrophils and human milk. *J Dairy Sci* 76:377-387.
- Johnson AH. 1972. The Composition of milk. Di dalam Webb BH, Johnson AH, Alford JA, editor. *Fundamentals of Dairy Chemistry*. Edisi ke-2. Connecticut: AVI.
- Kent Laboratories. 2006. Radial Immunodiffusion Plate Insert. http://www.kentlabs.com/rid_insert.html. [14 Juli 2006].
- Kunz C, Lonnerdal B. 1989. Human milk proteins: separation of whey proteins and their analysis by polyacrylamide gel electrophoresis, fast protein liquid chromatography (FPLC) gel filtration, and anion-exchange chromatography. *Amer J Clin Nutr* 49:464-470.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* 227:680-685.
- Lonnerdal, B dan Iyer, S. 1995. Lactoferrin: Molecular-Structure and Biological Function. *Annual Review of Nutrition*. 15: 93-110
- Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. 1965. Immunochemical quantitations of antigen by single radial immunodiffusion. *Immunochem* 2:235.
- Naidu AS. 2003. Antimicrobials from animals. Di dalam Roller S, editor. *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Food*. Cambridge: Woodhead.
- Nibbering PH, Ravensbergen E, Welling MM, van Berkel LA, van Berkel PHC, Pauwels EKJ, Nuijens JH. 2001. Human lactoferrin and peptides derived from its n-terminus are highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria. *Infect Immun* 69:1469-1476.
- Ontsouka CE, Bruckmaler RM, Blum JW. 2003. Fractionized milk composition during removal of colostrums and mature milk. *J Dairy Sci* 86:2005-2011.
- Oria R, Ismail M, Sanchez L, Calvo M, Brock JH. 1993. Effect of heat treatment and other milk protein on the interaction of lactoferrin with monocytes. *J Dairy Sci* 60:363-369.
- Paulsson MA, Svensson U, Kishore AR, Naidu AS. 1993. Thermal behaviour of bovine lactoferrin in water and relation to bacterial interaction and antibacterial activity. *J Dairy Sci* 76: 3711-3720.

- Playford RJ, Macdonald CE, Johnson WS. 2000. Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorder. *Amer J Clin Nutr* 72:5-14.
- Pulina G, Nudda A. 2004. Milk production. Dalam Pulina G, Bencini R, editor. *Dairy Sheep Nutrition*. Wallingford: CABI.
- Razafindrakoto O, Ravelomanana N, Rasolofo A, Rakotoarimanana RD, Gourgue P, Coquin P, Briend A, Desjeux JF. 1994. Goat's milk as a substitute for cow's milk in undernourished children: a randomized doubleblind clinical trial. *J Dairy Sci* 94:65-69.
- Renner E, Schaafsma G, Scott KJ. 1989. Micronutrients in milk. Dalam Renner E, editor. *Micronutrients in Milk and Milk-Based Food Products*. New York: Elsevier Science.
- Schanbacher FL, Goodman RE, Talhouk RS. 1993. Bovine mammary lactoferrin: implications from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins. *J Dairy Sci* 76:3812-3831.
- Schmidt, G. H. 1971. Biology of lactation. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- Singh H, Bennet RJ. 2002. Milk and milk processing. Di dalam Robinson RK, editor. *Dairy Microbiology Handbook*, edisi ke-3. New York: John Wiley.
- Smith DM. 1998. Protein separation and characterization procedures. Di dalam Nielsen SS, editor. *Food Analysis*, edisi ke-2. New York: Aspen.
- Takakura N, Wakabayashi H, Ishibashi H, Teraguchi S, Tamura Y, Yamaguchi H, Abe S. 2003. Oral laktoferrin treatment of experimental oral candidiasis in mice. *Antimicrob Agents and Chemother* 47:2619-2623.
- Tsuji S, Hirata Y, Mukai F. 1990. Comparison of lactoferrin content in colostrum between different cattle breeds. *J Dairy Sci* 73:125-128.
- Yoshida S, Xiuyun Y. 1991. Isolation of lactoperoxidase and lactoferrin from bovine milk acid whey by carboxymethyl cation exchange chromatography. *J Dairy Sci* 74:1439-1444.
- Yoshida S, Wei Z, Shinmura Y, Fukunaga N. 2000. Separation of lactoferrin-a and -b from bovine colostrum. *J Dairy Sci* 83:2211-2215.