

PENGARUH PEMANASAN DAN LAMA PENYIMPANAN PASCA FERMENTASI TERHADAP KONSENTRASI LAKTOFERIN SUSU KAMBING DAN KEFIR

The Effect of Heating and Postfermentation on Lactoferrin of Fresh and Kefir Goat Milk

Erfan Kustiawan¹⁾, Hari Purnomo²⁾, Lilik Eka Radiati²⁾

¹⁾Jurusan Peternakan Politeknik Negeri Jember

²⁾Program Studi Teknologi Hasil Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

diterima 5 Februari 2010; diterima pasca revisi 10 Agustus 2010

Layak diterbitkan 25 Agustus 2010

ABSTRACT

The aim of this study was determined of lactoferrin profile in goat milk and kefir. The samples were collected from whey raw milk, pasteurized and kefir. Lactoferrin profile in this study consisted of concentration and molecule weight of lactoferrin. Goat lactoferrin was isolated from whey by fractionation on sephadex G-100 column, it was eluted at 0.1 M phosphate buffer pH 6.8. Characterization of goat lactoferrin by electrophoretic SDS-PAGE techniques detected molecule weight of goat lactoferrin that the isolate of the fractions from fractionation on sephadex G-100 column. Result of the research showed that pasteurization during storage after fermentation process were influenced by concentration of lactoferrin significant ($P < 0.05$). The molecule weights of lactoferrin in goat milk and kefir were estimated at 84 kDa and 80 kDa. The average concentration of goat lactoferrin at 1.915 mg/ml (without pasteurized), 1.579 mg/ml (pasteurized at 65°C), 0.954 mg/ml (pasteurized at 73°C) and 0.322 mg/ml (pasteurized at 83°C). The average concentration of goat lactoferrin in kefir during storage at 0.663 mg/ml (0 day), 0.448 mg/ml (3 day), 0.249 mg/ml (6 day), 0.142 mg/ml (9 day) dan 0.048 mg/ml (12 day). Pasteurization at temperature 65°C 30'' can defend concentration of lactoferrin higher than temperature 73°C 15'' and temperature 83°C 2''. Concentration of lactoferrin in kefir were defended until 12 day storage.

Keywords : Lactoferrin, goat milks, kefir

PENDAHULUAN

Komponen susu, termasuk juga susu kambing mengandung beberapa komponen bioaktif yang memiliki efek kesehatan. Sebagian besar komponen dalam susu telah diketahui fungsinya secara biologis bagi tubuh. Komponen yang telah diketahui fungsinya dan banyak berguna bagi kesehatan tubuh karena mengandung sistem imunitas, antihipertensi, antibakteri dan antikanker adalah laktoferin (Ferrer *et al.*, 2000).

Laktoferin merupakan salah satu komponen bioaktif susu yang berperan penting dalam menunjang kesehatan. Rahman *et al.* (2007) menyatakan

laktoferin merupakan sub-fraksi protein whey yang telah dilaporkan sebagai antiviral, antibakteri, antikanker dan modulasi kekebalan.

Pemanfaatan laktoferin pertama kali digunakan dalam susu formula bayi hingga susu pengganti air susu ibu (PASI). Selanjutnya pemanfaatan laktoferin banyak diaplikasikan dalam suplemen nutrisi zat besi (Fe), kosmetik, minuman dan juga produk fermentasi susu (Steijns, 2004).

Kefir merupakan susu fermentasi menggunakan kefir grain, yang terdiri atas bakteri dan khamir. Kefir adalah salah satu produk makanan fungsional, yaitu makanan yang berfungsi sebagai sumber

nutrisi dan juga berkhasiat terapeutik karena mengandung komponen bioaktif, sehingga berpotensi menjaga kesehatan tubuh. Aktivitas mikroba dalam kefir mampu menghasilkan komponen metabolit asam organik, protein, peptide aktif dan polisakarida yang berperan sebagai komponen bioaktif sebagai antimikroba, antioksidan dan mempunyai nilai tambah terhadap peningkatan fungsional produk. Sedangkan laktoferin merupakan bahan makanan (*food ingredients*) yang bersifat fungsional karena memiliki multifungsi yang sangat bermanfaat dalam menunjang kesehatan, terutama bagi anak-anak yang baru lahir.

Keberadaan laktoferin sebagai fungsional komponen susu tentunya diharapkan tidak akan mengalami perubahan baik secara struktur maupun fungsinya dalam proses pemanasan (pasteurisasi) sebelum dilakukan fermentasi dan juga selama fermentasi. Hal ini juga perlu didukung dengan penelitian - penelitian yang berhubungan dengan laktoferin sangat penting dilakukan terutama untuk mendapatkan dan memberikan informasi mengenai identifikasi, isolasi, dan purifikasi laktoferin secara mudah, sederhana dan memperoleh hasil maksimal. Kandungan laktoferin pada kefir belum banyak diteliti dan didokumentasikan, sehingga dianggap perlu untuk dilakukan penelitian

MATERI DAN METODE

Alat dan Bahan

Peralatan untuk mengeringkan whey dan supernatant kefir adalah *freeze dryer tipe Kinetic EZ-DRY* buatan USA dan seperangkat alat untuk analisa proksimat dan titrasi buret. Sedangkan peralatan untuk analisa kandungan laktoferin antara lain kuvet dan Daichi spektrofotometer (UV-2000-1).

Peralatan untuk fraksinasi protein whey dan pemurnian laktoferin adalah kolom kromatografi ukuran (2,5 x 60 cm) dan seperangkat elektroforesis apparatus

merk Bio-Rad yang dihubungkan dengan *power supply* berkekuatan 300 volt dan 120 mA, preparasi sampel meliputi (*sample plate, scapel, pinset, deep freezer, mistar, pipet, pisau dan neraca digital*), penyiapan gel (*gelas ukur, Erlenmeyer, neraca digital, pipet, pemanas, sarung tangan, kaca, plastik tipis, pemberat, pipet, neraca digital, gel plate, inkubator*), pembuatan buffer (*gelas ukur, pipet dan Erlenmeyer*).

Metode Penelitian

Penelitian ini dirancang dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan pemanasan (pasteurisasi) pada susu segar, terdiri tanpa pasteurisasi (T0), pasteurisasi pada suhu 65°C 30 menit (T1), pasteurisasi pada suhu 73°C 15 detik (T2) dan pasteurisasi pada suhu 83°C 2 detik (T3) pada penelitian tahap I dengan 4 ulangan. Sedangkan pada penelitian tahap II, proses fermentasi susu menggunakan 5% starter *kefir grain* (w/v) dan proses pasteurisasi menggunakan perlakuan terbaik pada penelitian tahap I dengan rancangan yang sama. Perlakuan penelitian pada tahap ini, yaitu lama penyimpanan pasca fermentasi, terhitung setelah proses inkubasi, meliputi 0 hari (L0), 3 hari (L1), 6 hari (L2), 9 hari (L3), dan 12 hari (L4) penyimpanan.

Pelaksanaan Penelitian

Purifikasi Laktoferin Susu Kambing Penyiapan susu

Susu kambing segar dipasteurisasi sesuai masing-masing perlakuan. selanjutnya suhu diturunkan hingga 35°C, kemudian ditambahkan CaCl₂ 20% sebanyak 0,04% (v/v) dan enzim sebanyak 0,02% (v/v) untuk menggumpalkan susu (Isniah, 2004). *Curd* yang terbentuk dipisahkan dari whey, kemudian whey disaring dengan kain saring dan dilanjutkan penyaringan menggunakan kertas whatman No. 41 untuk memisahkan dari butiran *curd* yang masih terdapat pada cairan whey

Pengeringan Beku Whey

Pengeringan beku (*freeze Drying*) whey dilakukan dengan menggunakan alat *freeze dryer tipe Kinetics EZ-DRY* selama 15 jam atau sampai menjadi bubuk.

Pemurnian Laktoferin

Pemurnian laktoferin dilakukan dengan menggunakan prosedur kromatografi kolom filtrasi gel menggunakan *sephadex G-100*, sebagai bahan yang akan dimurnikan adalah whey setelah proses *freeze drying*.

Penentuan Protein Terlarut

Protein terlarut ditentukan dengan metode Bradford (Walker, 1996) sebagai berikut: sebanyak 1 ml sampel yang tersedia dalam tabung reaksi ditambahkan 1 ml pereaksi Bradford, pada tabung reaksi lain yang berisi blanko 1 ml air suling ditambahkan 1 ml pereaksi Bradford. Kedua campuran tersebut dibiarkan pada suhu ruang selama 10 menit. Selanjutnya absorbansi diukur pada panjang gelombang 595 nm. Penentuan konsentrasi protein terlarut dengan menggunakan kurva kalibrasi absorbansi *bovine serum albumin* yang memiliki konsentrasi tertentu.

Pendeteksian Berat Molekul Laktoferin secara elektroforesis

Berat molekul laktoferin hasil pemurnian dengan kromatografi kolom filtrasi gel *sephadex G-100* dikarakterisasi secara elektroforesis SDS-PAGE (Hames dan Rickwood, 1990).

Purifikasi Laktoferin Kefir

Proses purifikasi laktoferin kefir sama seperti pada purifikasi laktoferin susu kambing segar. Purifikasi laktoferin dilakukan dengan prosedur kromatografi seperti pada penelitian sebelumnya. Sebelum dilakukan proses pemurnian, dilakukan sentrifugasi 3000 rpm selama 20 menit, kemudian supernatan dikumpulkan dan dilanjutkan dengan penyaringan menggunakan kertas whatman No. 41. Konsentrasi protein terlarut hasil

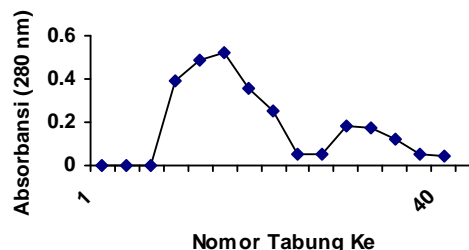
kromatografi ditentukan dengan metode Bradford (Walker, 1996).

Deteksi berat molekul isolat laktoferin hasil pemurnian dengan *sephadex G-100* menggunakan metode elektroforesis SDS-PAGE seperti prosedur pada penelitian sebelumnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemurnian Laktoferin Susu Kambing Segar dengan *Sephadex G-100*

Metode filtrasi gel merupakan salah satu metode untuk isolasi dan pemurnian protein, termasuk didalamnya adalah laktoferin. Hasil pemisahan *sephadex G-100* dalam penelitian ini menghasilkan dua puncak absorbansi 280 nm (Gambar 6). Puncak pertama dan kedua sebagai laktoferin karena berdasarkan hasil elektroforesis menunjukkan pita protein dengan berat molekul 84 kDa dan 80 kDa seperti ditunjukkan Gambar 1 dan 3.



Keterangan : A:Fraksi I B:Fraksi II

Gambar1. Hasil pemurnian laktoferin whey susu kambing pada *sephadex G-100* (2,5 x 60 cm), eluen 0,1M buffer fosfat pH 7,0, absorbansi protein 280 nm

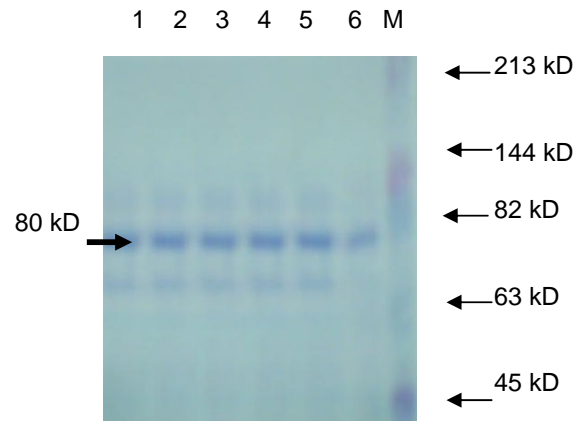
Hasil pemisahan *sephadex G-100* tersebut diduga kuat bahwa fraksi yang tidak lolos dari anyaman matrik gel *sephadex* adalah laktoferin. Hal ini disebabkan laktoferin memiliki berat molekul yang lebih tinggi dibandingkan berat molekul komponen whey lainnya. Menurut Sudarmadji (1996), molekul-molekul protein yang lebih besar dari ukuran pori terbesar *sephadex* yang telah

membengkak, tidak dapat masuk dalam partikel gel, maka molekul besar ini akan mengalir dengan cairan bufer di luar partikel *sephadex*, sehingga molekul besar akan keluar lebih dulu.

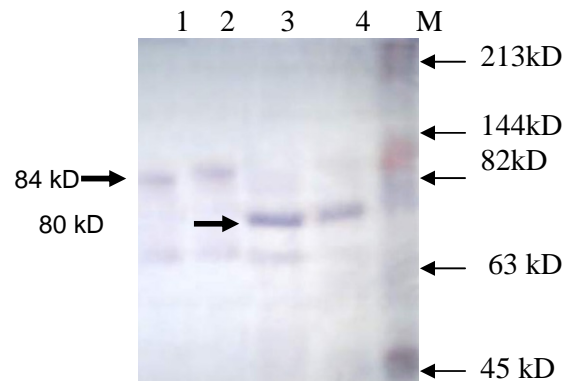
Deteksi Berat Molekul Laktoferin Susu Kambing Segar

Hasil elektroforesis whey susu kambing sebelum dilakukan pemisahan dengan *sephadex G-100* antar perlakuan (T0, T1, T2 dan T3) menunjukkan terdapat 6 pita protein dengan berat molekul masing-masing pita protein adalah 84 kDa, 80 kDa, 64 kDa, 27 kDa, 18 kDa dan 16 kDa. Hasil elektroforesis ini menunjukkan komponen-komponen protein yang terdapat dalam whey, seperti α -laktalbumin, β -laktoglobulin, serum albumin dan laktoferin dapat terdeteksi dengan metode elektroforesis SDS-PAGE. Pita protein dengan berat molekul 84 kDa dan 80 kDa merupakan laktoferin. Menurut Yoshida *et al.* (2000), laktoferin dapat disepara menjadi laktoferin-a dan laktoferin-b dari susu sapi. Berat molekul laktoferin-a adalah 84 kDa dan laktoferin-b 80 kDa. Peneliti lain (Castelino *et al.*, 1970) melaporkan berat molekul laktoferin adalah 77 kDa yang diisolasi menggunakan metode filtrasi gel dengan pelarut 6 M *guanidine hydrochloride*. Sedangkan menurut Yoshida (1989), berat molekul laktoferin yang diisolasi dari whey asam susu sapi adalah 87 kDa.

Hasil Elektroforesis whey setelah fraksinasi dengan *sephadex G-100* menghasilkan dua pita protein dengan berat molekul berturut-turut adalah 84 kDa dan 80 kDa. Berat molekul pada pita protein pertama dan kedua adalah laktoferin, karena memiliki berat molekul 80 kDa dan 84 kDa. Hal ini diperkuat dengan hasil laporan Elfagm dan Wheelock (1998), serta Pulina *et al.* (2002) yang mengkarakterisasi laktoferin susu sapi menggunakan SDS-PAGE menghasilkan pita protein pertama adalah laktoferin.



Gambar 2. Hasil elektroforesis laktoferin standar



Keterangan : 1 dan 2 adalah fraksi I
3 dan 4 adalah fraksi II

Gambar 3. Hasil elektroforesis whey susu kambing setelah fraksinasi

Deteksi berat molekul laktoferin setelah fraksinasi dengan *sephadex G-100* hampir sama dengan deteksi berat molekul laktoferin sebelum fraksinasi. Hasil deteksi berat molekul laktoferin ini hampir sama dengan yang dilakukan Hurley *et al.* (1993), yang telah mengisolasi laktoferin susu sapi dan ASI menggunakan metode kromatografi afitas heparin-agaros, kemudian dilakukan karakterisasi menggunakan elektroforesis SDS-PAGE. Hasil elektroforesis yang diperolehnya menunjukkan berat molekul laktoferin adalah 83 kDa dan 87 kDa.

Pengaruh Pasteurisasi Terhadap Konsentrasi Laktoferin Susu Kambing Segar

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan panas (pasteurisasi) berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap konsentrasi laktoferin pada susu kambing segar. Suhu pasteurisasi 65°C selama 30 menit (T1) menghasilkan konsentrasi laktoferin yang lebih tinggi, yaitu 1,579 mg/ml dibandingkan dengan suhu pasteurisasi 73°C selama 15 detik (T2) dengan konsentrasi laktoferin sebesar 0,954 mg/ml dan suhu pasteurisasi 83°C selama 2 detik (T3) dengan konsentrasi laktoferin 0,322 mg/ml.

Tabel 1. Konsentrasi Laktoferin Susu Kambing Segar (mg/ml)

Suhu	Ulangan				Rataan
	I	II	III	IV	
T0	1,51	1,70	2,14	2,31	1,915 ^a
T1	1,36	1,17	1,70	2,08	1,579 ^a
T2	0,87	0,67	1,33	0,94	0,954 ^b
T3	0,04	0,38	0,42	0,44	0,322 ^c

Keterangan: superskrip yang berbeda menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$)

Paulsson *et al.* (1993) menyatakan bahwa perilaku panas mempengaruhi sifat fisik laktoferin, karena adanya denaturasi pada laktoferin-a (a-Lf). Lebih lanjut dijelaskan, denaturasi panas pada laktoferin masih dapat mempertahankan status besi laktoferin pada suhu pasteurisasi 60°C – 80°C. Sedangkan pada suhu UHT terjadi denaturasi struktur protein dan sifat aktifitas antibakteri laktoferin jauh mengalami penurunan.

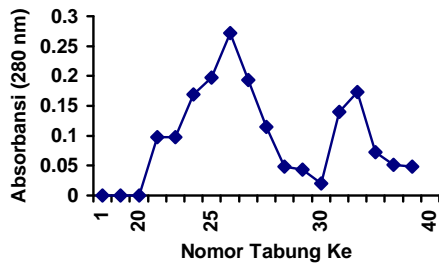
Perlakuan pasteurisasi pada suhu 65°C selama 30 menit memberikan pengaruh sangat kecil terhadap penurunan konsentrasi laktoferin dibandingkan dengan perlakuan pasteurisasi pada suhu 73°C selama 15 detik dan perlakuan pasteurisasi pada suhu 83°C selama 2 detik. Robinson (1999) juga menyatakan bahwa pada suhu 64°C-69°C laktoferin akan mengalami denaturasi, dan dengan adanya denaturasi akan mengakibatkan

perubahan pada konsentrasi laktoferin yang terdapat dalam susu.

Berbeda dengan laporan Drackova *et al.* (2009) yang melakukan pasteurisasi pada suhu 72°C selama 15 detik. Pada suhu pasteurisasi tersebut relatif masih dapat mempertahankan penurunan konsentrasi laktoferin susu kambing dan tidak mempengaruhi struktur laktoferin. Lebih lanjut dilaporkan, bahwa konsentrasi laktoferin pada susu segar (mentah) berkisar antara 0,098 mg/ml sampai 0,149 mg/ml dan konsentrasi laktoferin pada susu yang dipasteurisasi berkisar antara 0,087 mg/ml sampai 0,121 mg/ml. Sedangkan pada penelitian ini, rata-rata konsentrasi laktoferin susu kambing segar adalah 1,915 mg/ml dan susu kambing yang dipasteurisasi pada suhu 63°C selama 30 menit adalah 1,579 mg/ml. Kenyataan ini menunjukkan konsentrasi laktoferin susu kambing relatif lebih tinggi dibandingkan konsentrasi laktoferin susu kambing dengan adanya perlakuan pemanasan (pasteurisasi). Dilaporkan juga oleh Tomita *et al.* (1994) dalam USA Patent No.US005340924A bahwa dalam kondisi pH netral pada suhu 60°C dan 70°C tidak mengakibatkan denaturasi laktoferin, tetapi pada suhu 80°C terjadi denaturasi sebesar 33%.

Pemurnian Laktoferin Kefir

Upaya pemurnian laktoferin pada tahap penelitian ini adalah hasil penentuan suhu pasteurisasi optimum pada penelitian tahap I, yaitu pada suhu pasteurisasi 65°C selama 30 menit yang merupakan salah satu upaya menghasilkan produk kefir sebagai pangan fungsional dari produk susu yang memiliki kandungan komponen bioaktif laktoferin relatif tinggi. Hasil pemisahan *sephadex G-100* dalam penelitian ini menghasilkan dua puncak absorbansi 280 nm. Kedua puncak absorbansi pada fraksi tersebut berdasarkan hasil elektroforesis menunjukkan pita protein dengan berat molekul 84 kDa dan 80 kDa seperti ditunjukkan Gambar 6.

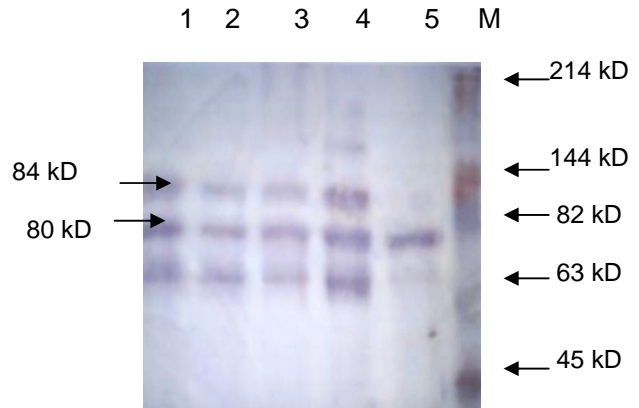


Gambar 4. Hasil pemurnian laktoferin kefir pada *sephadex G-100* (2,5 x 60 cm), eluen 0,1M buffer fosfat pH 6,8, absorbansi protein 280 nm

Deteksi Berat molekul Laktoferin Kefir

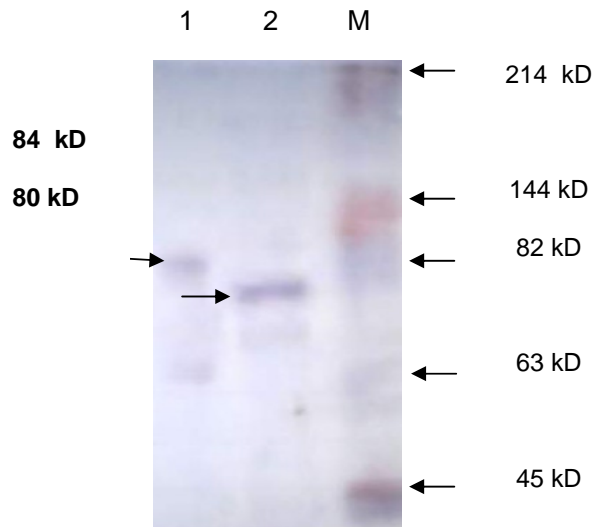
Hasil elektroforesis pada supernatan kefir sebelum dilakukan pemisahan dengan *sephadex G-100* menunjukkan terdapat 3 pita protein dengan berat molekul masing-masing pita protein adalah 84 kDa, 80 kDa, 65 kDa. Berat molekul ketiga pita protein tersebut sama seperti hasil elektroforesis whey susu kambing segar dan whey susu kambing yang dipasteurisasi pada penelitian sebelumnya. Hasil elektroforesis ini menunjukkan berat molekul laktoferin hasil fraksinasi dengan *sephadex G-100* pada susu kambing segar dan supernatant kefir memiliki berat molekul yang sama.

Hasil Elektroforesis supernatant kefir setelah fraksinasi dengan *sephadex G-100* juga menghasilkan dua pita protein (pita mayor) dengan berat molekul berturut-turut adalah 84 kDa dan 80 kDa. Berat molekul pada pita protein pertama dan kedua adalah laktoferin, karena memiliki berat molekul 80 kDa dan 80 kDa. Laporan Hurley et al. (1992), yang mengkarakterisasi laktoferin susu sapi dan ASI. Sedangkan Elfagm dan Weelock (1998), serta Pulina et al. (2002) yang mengkarakterisasi laktoferin susu sapi,



Keterangan :
 1. kefir penyimpanan 0 hari
 2. kefir penyimpanan 3 hari
 3. kefir penyimpanan 6 hari
 4. kefir penyimpanan 9 hari
 5. kefir penyimpanan 12 hari

Gambar 5. Hasil elektroforesis kefir sebelum purifikasi



Keterangan : 1 adalah fraksi I
 2 adalah fraksi II

Gambar 6. Hasil elektroforesis kefir setelah purifikasi

Pengaruh Umur Penyimpanan Terhadap Konsentrasi Laktoferin Kefir

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa lama penyimpanan pasca fermentasi berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap konsentrasi laktoferin. Lama penyimpanan kefir terhitung setelah proses inkubasi (pemeraman) selama 20 jam. Bertambahnya umur penyimpanan kefir menyebabkan penurunan konsentrasi laktoferin (Tabel 3). Lama penyimpanan 0 hari (L0) memiliki konsentrasi laktoferin yang lebih tinggi, yaitu 0,663 mg/ml dibandingkan dengan lama penyimpanan 3 hari (L1), 6 hari (L2), 9 hari (L3) dan 12 hari (L4) dengan konsentrasi laktoferin berturut-turut 0,448 mg/ml, 0,249 mg/ml, 0,142 mg/ml dan 0,048 mg/ml.

Tabel 3. Konsentrasi Laktoferin Kefir (mg/ml)

	Ulangan				Rataan
	I	II	III	IV	
L0	0,24	0,59	0,73	1,09	0,66 ^a
L1	0,21	0,39	0,57	0,63	0,45 ^{ab}
L2	0,15	0,22	0,23	0,39	0,25 ^{bc}
L3	0,03	0,17	0,18	0,19	0,14 ^{cd}
L4	0,002	0,03	0,06	0,09	0,05 ^{de}

Keterangan : superskrip yang berbeda menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$)

Analisis jarak berganda Duncan menunjukkan bahwa lama penyimpanan kefir terhadap konsentrasi laktoferin memberikan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$). Konsentrasi laktoferin kefir pada lama penyimpanan 0 hari (L0) berbeda nyata dengan semua perlakuan, kecuali dengan lama penyimpanan 3 hari (L1), lama penyimpan 3 hari (L1) tidak berbeda nyata dengan lama penyimpanan 6 hari (L2) dan berbeda nyata dengan lama penyimpanan 9 hari (L3) dan lama penyimpanan 12 hari (L4). Sedangkan lama penyimpanan 9 hari (L3) tidak berbeda nyata dengan lama penyimpanan kefir 12 hari (L4). Berdasarkan hasil tersebut dapat diasumsikan bahwa umur penyimpanan kefir dengan jarak waktu yang relatif pendek menyebabkan perubahan

konsentrasi laktoferin relatif kecil. Hal ini diduga proses degradasi komponen susu (protein susu) oleh aktivitas mikroba kefir, perubahannya relatif kecil. Menurut Belem *et al.* (1998) dalam proses fermentasi susu terjadi proteolisis yang merubah protein susu menjadi beberapa peptida dan penurunannya tampak jelas setelah 48 jam. Lebih lanjut dijelaskan pada proses fermentasi whey, keberadaan β -laktoglobulin dan α -laktalbumin serta komponen lain yang terdapat didalam whey akan dirubah menjadi beberapa peptida, seperti halnya β -laktoglobulin yang merupakan komponen utama whey dirubah menjadi β -laktoglobulin-a, β -laktoglobulin-b dan *angiotensin converting enzyme* (ACE).

KESIMPULAN

Purifikasi laktoferin menggunakan kromatografi kolom *sephadex G-100* menghasilkan dua puncak absorbansi (595 nm) dan setelah dilakukan karakterisasi secara elektroforesis menunjukkan berat laktoferin 84 kDa dan 80 kDa.

Proses pasteurisasi dan fermentasi cenderung mengakibatkan terjadinya penurunan konsentrasi laktoferin susu kambing dan kefir. Suhu pasteurisasi 65°C selama 30 menit adalah suhu optimal dan cenderung dapat mempertahankan konsentrasi laktoferin lebih tinggi dibandingkan suhu pasteurisasi 73°C selama 15 detik dan suhu pasteurisasi 83°C selama 2 detik.

Lama penyimpanan kefir cenderung menyebabkan penurunan konsentrasi laktoferin. Konsentrasi laktoferin kefir cenderung masih dapat dipertahankan hingga 12 hari penyimpanan.

DAFTAR PUSTAKA

Belem, M.A.F., Gibbs, B.F., and Lee, B.H., 1998. Proposing Sequences for Peptides Derived from Whey Fermentation with Potential

- Bioactive Sites. *J. Dairy Sci.*, 82 : 466-493.
- Castellino, F.J., Fish, W.W., and Mann, K.G., 1970. Structural Studies on Bovine Lactoferrin. *The Journal of Biological Chemistry*, 245 (1) 4269-4275.
- Drackova, M., Borkovcova, I., Janstova, B., Naiserova, M., Pridalova, H., Navratilova, P., and Vorlova, L., 2009. Determination of Lactoferrin in Goat Milk by HPLC Method. *Czech J. Food Sci.*, (27) : S102-S104.
- Elfagm, A.A., and Wheelock, J.V., 1998. Heat Interaction between α -lactalbumin, β -lactoglobulin Casein in Bovine Milk. *J. Dairy Sci.*, 61 : 159-163.
- Ferrer, P.A.R., Baroni, A., Sambucetti, M.E.S., Lo'pez, N.E., and Cernadas, J.M.C., 2000. Lactoferrin Levels in Term and Preterm Milk. *Journal of the American College of Nutrition*, 19 (3) : 370-373.
- Hames, B.D and Rickwood, D., 1990. Gel Electrophoresis of Protein : A Practical Approach. 2nd Edition. Oxford University Press, New York.
- Hurley, W.L., Grieve, R.C.J., Magura, C.E., Hegarty, H.M., and Zou, S., 1992. Electroforetic Comparisons of Lactoferrin from Bovine Mammary Secretions, Milk Neutrophils and Human Milk. *J. Dairy Sci.*, 76 : 377-387.
- Isnia, U., 2004. Pembuatan Whey Protein Konsentrat (WPK) Kajian Hidrolisis Laktosa Whey Dengan Enzim Laktase (β -Galaktosidase) dan Lemak Whey Oleh Petroleum Eter. *Tesis*. Program Studi Teknologi Hasil Pertanian UB, Malang.
- Paulsson, M.A., Svensson, U., Kishore, A.R., and Naidu, S., 1993. Thermal Behavior of Bovine Lactoferrin in Water and Relation to Bacterial Interaction and Antibacterial Activity. *J. Dairy Sci.*, 76 : 3711-7455.
- Pulina, M.O., Zakharova, E.T., Sokolov, A.V, Shaviovski, M.M., Bass, M.G., Solovyov, K.V., Kokryakov, V.N., and Vasilyev, V.B., 2002. Studies of the Ceruloplasmin-Lactoferrin Complex. *Biochem. Cell Biol.*, 80 : 35-39.
- Rahman, M., Kim, W.S., Ito, T., Kumura, H., dan Shimazaki, K., 2007. Visualization of Bovine Lactoferrin Binding to Bifidobacteria. *Bioscience Microflora*, 26 (3) : 75-79.
- Robinson, R.K., 1999. *Modern Dairy Technology Volume 1 : Advances in Milk Processing*. 2nd Edition. An Aspen Publication, Aspen Publisher, Inc. Gaithersburg, Maryland. P:323-325
- Steijns, J.M., 2004. Technological Properties and Applications of Lactoferrin. Safety and Efficacy of Lactoferrin, *IFT Annual Meeting*, Las Vegas.
- Sudarmadji, S., 1996. *Teknik Analisa Biokimiawi*. Penerbit Liberty, Yogyakarta.
- Tomita, M., Tamura, Y., Miyakawa, H., Kamakura, Saito, H., Kawasaki, Abe, H., Yokosuka, Nagao, E., and Sagamihara. 1994. Method for Heat Treatment of Lactoferrin without Losing Physiological Activities Thereof. USA Patent No. US005340924A.
- Walker, J.M., 1996. *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Yoshida, S., Wei, Z., Shinmura, Y., and Fukunaga, N., 2000. Separation of Lactoferrin-a and Lactoferrin-b from Bovine Colostrum. *J. Dairy Sci.*, 8 : 2211-2215.
- Yoshida, S., 1989. Preparation of Lactoferrin by Hydrophobic Interaction Chromatography from Milk Acid Whey. *J. Dairy Sci.*, 72 : 1446-1450.