

Pengujian Aktivitas Antioksidan Peptida Dari *Water Soluble Extract* Susu Kambing Hasil Fermentasi Bakteri *Bacillus subtilis*

Ira Adiyati Rum Garnadi Jafar, Tri Puji Astuti

Sekolah Tinggi Farmasi Bandung, Jalan Soekarno Hatta no 754 Cibiru Bandung

email : ira.adiyati@stfb.ac.id

ABSTRAK

Protein memiliki sekuens peptida yang memberikan dampak positif terhadap kesehatan yang dikenal dengan peptida bioaktif. Peptida bioaktif yang berasal dari susu diketahui memiliki aktivitas antibakteri, antihipertensi, antioksidan dan antimikroba. Protein susu telah diakui sebagai salah satu sumber yang paling signifikan dari peptida bioaktif. Susu kambing memiliki kandungan protein yang paling tinggi dibandingkan susu sapi, susu kuda, ataupun susu kedelai yakni sebesar 35 g/Kg. Tujuan dari penelitian ini adalah pengujian aktivitas antioksidan dari WSE (*water soluble extract*) susu kambing yang telah difermentasi oleh bakteri protease *Bacillus subtilis*. Bakteri tersebut berperan untuk menghidrolisis protein. WSE diperoleh dari hasil sentrifuga susu fermentasi yang selanjutnya diberi perlakuan *freeze dry* untuk menstabilkan pH. Hasil WSE yang diperoleh dilakukan pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH. Variasi konsentrasi kultur bakteri yang ditambahkan pada susu kambing serta analisis profil protein dari protein susu fermentasi dilakukan pada penelitian ini. Hasil pengujian aktivitas antioksidan susu fermentasi menunjukkan nilai IC₅₀ dengan kultur bakteri berturut-turut 5%, 10%, dan 15% adalah 1,87%, 5,48%, dan 2,36%. Profil protein dengan SDS-PAGE menunjukkan protein yang berperan dalam aktivitas antioksidan memiliki berat molekul dari 10,5 sampai 75,0 KDa.

Kata Kunci: Antioksidan, Fermentasi, *Freeze dry*, SDS-PAGE, Protein

Diterima: 18 Mei 2018

Direvisi: 1 Juli 2018

Dipublikasikan: 1 Agustus 2018

PENDAHULUAN

Radiasi sinar matahari, polusi udara dan lingkungan merupakan faktor eksogen utama penyebab timbulnya radikal bebas di dalam tubuh selain metabolisme aerob (Sayuti dan Rina, 2015). Radikal bebas adalah molekul yang tidak berpasangan dan oleh karena itu sangat tidak stabil dan sangat reaktif. Radikal bebas hanya dapat bertahan dalam hitungan *millisecond* (10^{-9} - 10^{-12}) sebelum bereaksi dengan molekul lain untuk menstabilkan dirinya (Turan, 2010). Akibat dari reaktivitas yang sangat tinggi tersebut radikal bebas dapat menimbulkan kerusakan jaringan yang dikenal dengan *stress oxidative* (Widayati, 2011).

Untuk mencegah dan melindungi tubuh dari radikal bebas maka diperlukan

senyawa antioksidan yang merupakan agen yang dapat membatasi efek dari reaksi oksidasi dalam tubuh. Secara langsung efek yang diberikan oleh antioksidan dalam tubuh, yaitu dengan mereduksi radikal bebas dalam tubuh, dan secara tidak langsung, yaitu dengan mencegah terjadinya pembentukan radikal (Wildman, 2001). Saat ini mulai banyak dikembangkan antioksidan alami dibandingkan antioksidan sintetis. Hal itu diarekan adanya kekhawatiran kemungkinan efek samping yang belum diketahui dari antioksidan sintetis. Beberapa antioksidan sintesis yang biasa digunakan oleh industri, seperti BHA dan BHT, akhir-akhir ini diduga bersifat karsinogenik (Sayuti dan Rina, 2015).

Protein telah diketahui memiliki sekuens peptida yang memberikan dampak positif terhadap kesehatan dimana sekuens tersebut dikenal dengan peptida bioaktif. Perbedaan antara protein dengan peptida terletak pada ukuran dan panjang asam aminonya. Senyawa yang memiliki urutan lebih dari 50 asam amino disebut dengan protein sedangkan senyawa peptida dengan 2-50 asam amino. Bioaktif peptida telah menarik perhatian besar dalam industri kosmetik terutama dalam pengembangan kosmetik anti aging (**Badenhorst, 2014**).

Susu merupakan sumber pangan kaya akan protein yang memiliki banyak manfaat untuk kesehatan tubuh. Menurut penelitian Lestari (2015), kasein dan whey utuh maupun yang sudah terhidrolisis dari susu kambing memiliki aktivitas antibakteri yang cukup signifikan. Selain itu, penelitian Adinda dkk. (2014) dan Saputro (2016) menunjukkan bahwa peptida bioaktif yogurt memiliki aktivitas antihipertensi. Berbagai protein susu dapat menjadi peptida bioaktif setelah melalui hidrolisis oleh enzim-enzim protease yang dapat diperoleh dari pencernaan hewan, tanaman maupun mikroorganisme (Kusumaningtyas, 2016).

Pada penelitian ini digunakan susu kambing sebagai sumber protein. Sah (2013) telah menunjukkan bahwa kandungan peptida aktif dalam susu sapi yang difermentasi oleh bakteri asam laktat (BAL) memiliki aktivitas antioksidan. Menurut Uniacke-Lowe dkk. (2010) dalam Saputro (2016), susu kambing

memiliki kandungan protein yang paling tinggi dibandingkan susu sapi, susu kuda, ataupun susu kedelai yakni sebesar 35 g/Kg. Susu kambing tersebut akan difermentasi oleh bakteri protease yaitu *Bacillus subtilis*. Bakteri tersebut yang berperan untuk menghidrolisis protein. Susu fermentasi kemudian disentrifuga sehingga akan menghasilkan WSE (*water soluble extract*) yang selanjutnya di *freeze dryer* untuk menstabilkan pH. Hasil yang diperoleh dilakukan pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Dengan dilakukannya pengujian ini dapat diketahui aktivitas antioksidan peptida susu kambing yang diharapkan dapat menambah sumber antioksidan alami dalam perkembangan agen terapeutik yang memiliki keunggulan dibanding antioksidan sintetis.

METODE PENELITIAN

Penelitian Aktivitas Antioksidan Peptida dari WSE Susu Kambing Hasil Fermentasi Bakteri *Bacillus subtilis* dilakukan dengan tahapan kerja meliputi pengumpulan bahan baku, fermentasi susu, pembuatan WSE (*water soluble extract*), dan pengujian aktivitas antioksidan. Pengolahan susu kambing diawali dengan proses sterilisasi dengan pasteurisasi pada suhu 72°C selama 5 menit, kemudian didinginkan hingga mencapai suhu 45°C (Adinda, dkk., 2013). Penyiapan kultur starter dilakukan dengan menambahkan 1 ose bakteri *Bacillus subtilis* ke dalam 100 ml media Luria Bertani broth steril (pH 7).

Inkubasi dilakukan dalam inkubator pada suhu 40°C selama 30 jam (Safey dan Raouf, 2009).

Susu kambing difermentasi dengan beberapa konsentrasi starter bakteri yaitu 5%, 10%, 15% dan susu tanpa kultur bakteri digunakan sebagai kontrol negatif. Semua sampel susu tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Susu kambing hasil fermentasi disentrifuga dingin dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 5°C selama 10 menit yang akan menghasilkan larutan supernatan yang disebut WSE atau *water soluble extract* (Adinda, dkk., 2013). WSE tersebut kemudian dikering bekukan (*freeze dry*) dengan menggunakan alat *freeze dryer* untuk mempertahankan pH. Analisis profil protein dilakukan dengan menentukan kadar protein total metode Bradford dan menentukan berat molekul protein menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*).

Penentuan aktivitas antioksidan dengan menentukan IC₅₀ atau konsentrasi yang dapat menghambat atau meredam radikal bebas sebesar dari WSE dengan metode peredaman radikal bebas DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), diukur kadarnya dengan menggunakan spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang ± 516 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fermentasi Sampel. Susu kambing yang telah dipasteurisasi pada suhu 72°C selama 5 menit (Adinda, dkk., 2013) disentrifuga

dengan kecepatan 6000 rpm, 5°C selama 15 menit untuk memisahkan kandungan lemak (Kusumaningtyas, 2016). Pemisahan lemak bertujuan untuk menghilangkan bau menyengat yang timbul setelah fermentasi. Fermentasi dilakukan dengan variasi konsentrasi kultur starter yang ditambahkan yaitu 5%, 10%, 15%, dan 0% starter yang digunakan sebagai kontrol negatif.

Hasil fermentasi menunjukkan *curd* yang mengambang di permukaan dan sebagian kecil menempel di dinding botol. Susu berubah warna menjadi kekuningan, kecuali kontrol. Bau yang ditimbulkan tidak menyengat hanya bau khas dari susu kambing.

Evaluasi Hasil Fermentasi

1. Pengukuran pH. Pengukuran pH pada susu fermentasi dapat dijadikan salah satu parameter keberhasilan fermentasi yang ditunjukkan dengan penurunan pH. Penurunan pH dapat diketahui dengan pengukuran sampel sebelum dan setelah fermentasi atau dengan membandingkan terhadap kontrol negatif. Nilai pH ditentukan karena adanya ion H⁺ pada sampel. Nilai pH dipengaruhi oleh produk yang dihasilkan selama fermentasi. Dalam penelitian ini, produk fermentasi yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* adalah asam organik dan enzim ekstraseluler yaitu protease. Pengukuran pH pada susu fermentasi dilakukan setelah 3 hari penyimpanan dengan hasil seperti tertera di tabel berikut :

Tabel Nilai evaluasi pH susu fermentasi

Kultur Starter	Pengulangan		
	I	II	III
K (-)	6,2	6,2	6,2
5%	5,3	5,2	5,2
10%	5,2	5,2	5,2
15%	5,0	5,0	5,0



Menurut Vandekar & Dulmage (1982) pada saat proses fermentasi terjadi, bakteri *Bacillus subtilis* yang digunakan akan menghidrolisis glukosa yang terkandung dalam susu kambing menjadi asam organik. Seluruh jenis gula yang terkandung dalam susu kedelai digunakan *Bacillus subtilis* sebagai sumber energi untuk memenuhi proses pertumbuhan sel. Adanya asam tersebut dapat menurunkan pH pada proses fermentasi. Semakin tinggi kandungan gula maka pH akan semakin turun dan pada keadaan asam dapat menghambat pertumbuhan *Bacillus subtilis*.

2. Evaluasi Kadar Fenol. Pengukuran kadar fenol total dengan menggunakan pereaksi Folin-Ciocalteu dilakukan dengan tiga langkah, yaitu penetapan serapan maksimum asam galat, pembuatan kurva kalibrasi standar asam galat, dan pengukuran panjang gelombang sampel. Meskipun mekanisme pasti tentang reaksi yang terjadi pada pereaksi Folin-Ciocalteu belum diketahui, tetapi pada dasarnya

adalah reduksi senyawa fosfomolybdotungstat menjadi heteropolimolybdenum yang berwarna biru (Walker, 2002).

Pembuatan kurva kalibrasi standar asam galat dilakukan dengan mengukur serapan yang diberikan oleh larutan uji dengan konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, dan 80 ppm pada panjang gelombang 756 nm. Hasil persamaan regresi linier yang didapat yaitu, $y = 0,0033 x + 0,0909$ dengan nilai $r^2 = 0,9944$.

Sampel (Konsentrasi kultur starter)	Kadar Fenol (mg)	
	I	II
K (-)	86,67	79,73
5%	153,06	149,42
10%	90,94	92,15
15%	99,72	98,21

Dari hasil pengujian, diketahui bahwa sampel yang memiliki kandungan fenol terbanyak yang dinyatakan setara dengan asam galat adalah pada susu fermentasi dengan kultur starter 5% dengan kandungan fenol total sebanyak 71,85 mg setara asam galat tiap gram sampel WSE.

3. Evaluasi Total Asam. Pada penelitian ini, total asam dinyatakan sebagai persen asam laktat yang terdapat pada produk, hal ini karena asam laktat merupakan komponen asam dominan yang terbentuk selama proses fermentasi. Nilai total asam ini menunjukkan jumlah hidrogen total dalam suatu produk baik dalam bentuk terdisosiasi atau tidak (Rohadi, 2013).

Hasil pengukuran total asam menunjukkan semakin tinggi penambahan konsentrasi

kultur starter, maka nilai total asam semakin tinggi. Keempat sampel memiliki kisaran asam laktat antara 0.706 – 3,230%. Susu fermentasi dengan total asam tertinggi adalah susu kambing dengan penambahan kultur starter sebanyak 15% dan susu kambing komtrol negatif atau dengan penambahan kultur starter 0% mempunyai nilai total asam terendah.

Pengujian Aktivitas Antioksidan. DPPH (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil) merupakan senyawa radikal nitrogen. DPPH akan mengambil atom hidrogen yang terdapat dalam suatu senyawa, misalnya senyawa fenol. Mekanisme terjadinya reaksi DPPH ini berlangsung melalui transfer elektron. Radikal DPPH akan bereaksi dengan antioksidan membentuk 1,1-diphenil-2-pikrilhidrazin (Juniarti *et al.*, 2009).

Larutan DPPH akan mengoksidasi senyawa dalam sampel yang memiliki aktivitas antioksidan. Proses ini ditandai dengan memudarnya warna larutan dari ungu menjadi kekuning. Hasil pengukuran serapan larutan DPPH dengan konsentrasi 4M yang telah ditambahkan 0,2 ml metanol dan diinkubasi selama 30 menit adalah 0,875 dengan panjang gelombang maksimum 516 nm.

Tabel Hasil Pengujian Aktivitas Antioksidan

Kultur Starter (%)	IC50 (%)
K (-)	3,80
5%	1,87
10%	5,48
15%	2,36

Setelah ditetapkan panjang gelombang maksimum pengukuran, maka dilakukan pengukuran sampel. Dari sampel yang diuji, dapat dilihat bahwa WSE susu kambing yang memberikan IC₅₀ yang paling rendah adalah sampel dengan kultur starter 5% yaitu sebanyak 1,9%. Pengujian dengan metode DPPH ini menunjukkan semua WSE susu kambing memiliki IC₅₀ yang sangat tinggi. WSE susu kambing sebenarnya memiliki aktivitas antioksidan hanya kemungkinan pengujian senyawa aktif tidak sesuai menggunakan metode DPPH. Meskipun metode DPPH adalah metode yang umum digunakan dalam penentuan aktivitas antioksidan produk alam, tapi memiliki kelemahan bagi senyawa aktif antioksidan yang bersifat hidrofilik karena itu berarti hanya larut dalam pelarut organik terutama media beralkohol (Tang, dkk., 2010).

Metode DPPH ini mudah digunakan, cepat, cukup teliti, dan baik digunakan dalam pelarut organik, khususnya alkohol (Apak, dkk., 2007). Metode ini juga sensitif untuk menguji aktivitas antioksidan dalam ekstrak tanaman (Pourmorad, dkk., 2006). Akan tetapi, metode DPPH kurang sensitif untuk mengukur aktivitas antioksidan selain dari senyawaan fenol (Apak, dkk., 2007)

Analisis Kadar Protein Total. Analisa dilakukan dengan menggunakan menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan konsentrasi bertingkat (2; 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; dan 0,1 mg/mL) sebagai standar dengan persamaan yang

didapatkan $y = 0,297x + 0,0865$ dan nilai $r^2 = 0,9579$.

Tabel Kadar Protein Total

Kultur Starter	Volume total (mL)	Kadar Protein Total (mg)
K (-)	2,13	2,83
5%	3,23	7,99
10%	3,23	3,64
15%	3,23	2,88

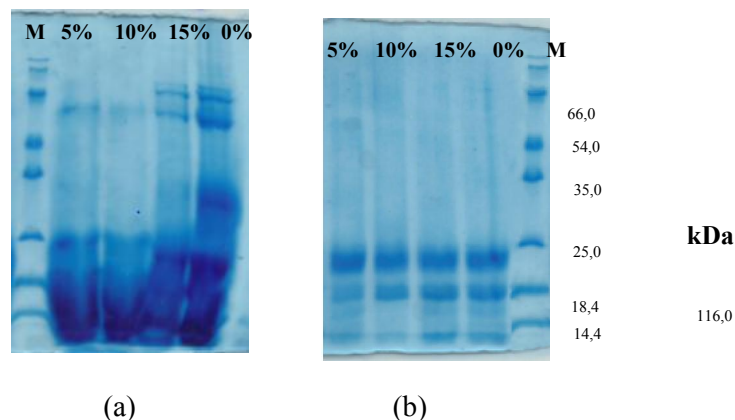
Sampel yang memiliki kadar protein total terbesar adalah sampel dengan kultur starter 5% yaitu 7,9934 mg.

Profil Protein Menggunakan SDS-PAGE. Pemisahan protein merupakan tahap yang harus dilakukan untuk mempelajari sifat dan fungsi protein. Protein dapat dipisahkan dari protein jenis lain atau dari molekul lain berdasarkan urutan, kelarutan, muatan, dan afinitas ikatan (Nelson, 2004). Salah satu teknis yang sering digunakan untuk melihat profil prtein dan menentukan bobot molekulnya menggunakan SDS-PAGE. Prinsip dasar SDS-PAGE ini adalah denaturasi protein oleh sodium dedosil

sulfat yang dilanjutkan dengan pemisahan molekul berdasarkan berat molekulnya.

Pada penelitian ini, konsentrasi gel poliakrilamid yang digunakan adalah 12%. Identifikasi dan analisis SDS-PAGE dengan membandingkan antara pita protein yang telah dipisahkan sebelumnya dengan protein standar. Bobot dari masing-masing protein dapat ditentukan dengan cara menghitung Rf dari masing-masing pita protein yang tampak. Selanjutnya dibuat kurva standar hubungan antara log BM dengan Rf dari protein standar sehingga nilai BM protein sampel dapat dihitung.

Hasil SDS-PAGE berdasarkan perhitungan berat molekul sesuai dengan kurva standar menunjukkan bahwa terdapat beberapa protein yang tampak. Kurva standar yang dihasilkan oleh protein adalah $y = - 0,0039 x + 2,1517$ dengan nilai $r^2 = 0,9658$. Berdasarkan uji SDS-PAGE, WSE sebelum di *freeze dry* memiliki 3 subunit protein dengan berat molekul 20,8 kDa; 16,5 kDa; dan 12,1 kDa.



Gambar VI.9 Hasil SDS-PAGE WSE susu kambing, (a) sebelum di *freeze dry*, (b) hasil *freeze dry* (M= marker; 5%, 10%, 15% = konsentrasi starter dalam sampel)

Pada penelitian ini dilakukan analisa profil protein terhadap WSE dalam bentuk serbuk dan WSE yang belum di *freeze dry* dalam bentuk larutan. WSE hasil *freeze dry* menghasilkan pita-pita yang tebal yang berarti pemisahan protein tidak sempurna, berbeda dengan hasil pemisahan WSE sebelum *freeze dry*.

Proses *freeze dry* dapat menyebabkan perubahan struktur pada protein sehingga hasil yang ditunjukkan nampak bias (Roy dan Gupta, 2004). Proses *freeze dry* menghasilkan beberapa senyawa dalam bentuk garam dan meningkatkan kepekatan protein yang terkandung karena penghilangan kadar air, selain protein terdapat pula senyawa lain yang konsentrasinya semakin pekat. Hal tersebut yang diduga menyebabkan pita yang dihasilkan dari WSE hasil *freeze dry* tebal dan tidak terpisah dengan baik.

KESIMPULAN

Pengujian aktivitas antioksidan WSE yang telah dihidrolisis *Bacillus subtilis* dengan kultur bakteri 5%, 10%, dan 15% menunjukkan nilai IC₅₀ sebesar 1,87%, 5,48%, dan 2,36%. Berat molekul protein dalam sampel antara 10,5 sampai 75,0 kDa. Sampel disimpulkan tidak memiliki aktivitas antioksidan, beberapa penyebabnya adalah proses pemisahan WSE yang kurang sempurna dan metode pengujian yang kurang sesuai.

DAFTAR PUSTAKA

Adinda, F., Masdiana C. P., dan Dyah K.W. *Efek Terapi Water Soluble*

Extract (WSE) Yoghurt Susu Kambing Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Hispatologi Aorta Tikus (Rattus norvegicus) Model Hipertensi Induksi DOCA-Salt. (2014). Universitas Brawijaya: Program Kedokteran Hewan.

Apak, Resat. Kubilay Guclu, Birsen D., Mustafa O., Saliha E. C., Burcu B., Isil B., Dilek O. 2007. *Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assay Applied to Phenolic Compounds with The Cuprac Assay.* Istanbul: Istanbul University

Badenhorst Travis, Darren Svirskis¹ and Zimei Wu. (2014). *Pharmaceutical Strategies for the Topical Dermal Delivery of Peptides/Proteins for Cosmetic and Therapeutic Applications.* New Zealand: University of Auckland.

Belitz, H.D. & W.Grosch. (2009). *Food Chemistry.* Second Edition. Berlin: Springer Berlin.

Buck DF. (1991). Antioksidant. J. Smith (eds). *Food Additive User's Handbook.* Galsgow-UK : Blakie Academic & Profesional.

Carr FJ, Hill D & Maida N. (2002). *The lactic acid bacteria: a literature survey.* Crit Rev Microbiol 28: 281-370.

Lestari, Diana. 2015. *Protein Dan Peptida Susu Kambing Serta Potensinya Sebagai Antibakteri.* Bogor: Institut Pertanian Bogor.

- Axelsson, L. (2004). *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology*. In Salminen, S., Wright, A.V., Ouwehand, A., editors. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Third edition. New York : Marcel Dekker, Inc.
- Cahyadi, Wisnu. (2008). *Analisa & Aspek Kesehatan Bahan Tambahan Pangan*. Jakarta: Penerbit Bumi Aksara.
- Fardiaz, S. (1992). *Analisa Mikrobiologi Pangan. PAU Pangan dan Gizi IPB*. Jakarta: Penerbit Raja Grafindo Persada.
- Ghafoor, A. dan Shahida Hasnain. 2009. *Production dynamics of Bacillus subtilis strain AG-1 and EAG-2, producing moderately alkaline proteases*. Pakistan: Department of Microbiology and Molecular Genetics, Quaid-e-Azam Campus University of the Punjab.
- Hantoro, I. dan K. P. Dwiana. (2010). *Penerapan Praktek Produksi Dan Penanganan Yang Baik Sebagai Upaya Menjamin Mutu Dan Keamanan Untuk Meningkatkan Daya Saing Susu Segar Produksi Lokal*. Jurnal RENAI.
- Hasanah, Luthfiyatul. (2016). *Formulasi Konsorsium Agen Hayati Mycorrhiza Helper Bacteria (Pseudomonas diminuta dan Bacillus subtilis) Pada Media Cair Limbah Tahu dan Molase*. Skripsi. Jember : Universitas Jember.
- Hatmanti, A. (2000). *Pengenalan Bacillus Spp. Oseana*, 25(1): 31-41.
- Herna'ndez-Ledesma, Amigo B, Ramos LM dan Recio I. (2004). *Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52 : 1504–1510.
- Hernani dan Rahardjo. (2005). *Tanaman Berkhasiat Antioksidan*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Jamilatun, Makhabbah. 2009. *Optimalisasi Fermentasi Rhizopus Oryzae dalam Pembentukan Curd dan Analisis Kualitas Keju Metah yang Terbentuk*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Khomsan, A. (2004). *Peranan Pangan dan Gizi untuk Kualitas Hidup*. Jakarta: PT Gramedia Widiasarana Indonesia.
- Kitts DD dan Weiler K. (2003). *Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery*. Current Pharmaceutical Design 9 : 1309–1323.
- Korhonen, H., dan Pihlanto A. (2006). *Bioactive peptides : Production and functionality*. International Dairy Journal 16 : 945–960
- Kusumaningtyas, Eni. (2016). *Peptida Bioaktif Susu Kambing Dan Susu Kuda Hasil Hidrolisis Bromelin Dan Protease Bacillus*

- thuringiensis*. Disertasi. Bogor : Institut Pertanian Bogor
- Langseth, L. (1995). *Oxidants, Antioksidants and Disease Prevention*. Belgium: ILSI Europe.
- Meisel, H. dan Fitz Gerald R.J. (2003). *Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects*. Current Pharmaceutical Design 9 : 1289–1295.
- Muharastrri, Y. (2008). *Analisis Kepuasan Konsumen Susu UHT Merek Real Good di Kota Bogor*. Skripsi. Bogor: IPB.
- Nakamura, Y., Yamamoto M., Sakai K., Okubo A., Yamazaki S., & Takano T. (1995). *Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk*. Journal of Dairy Science 78 : 777–783.
- Papadimitriou, C.G., A.V. Mastrojiannaki, S.V. Silvia, A.M. Gomes, F.X. Malcata, & E. Alichanidis. (2007). *Identification Of Peptides In Traditional And Probiotic Sheep Milk Yoghurt With Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Activity*. Food Chemistry, 105 (2) : 647-656.
- Pete, F. S., Allan. W., & Stephen, J. H. (1995). *Principles of Fermentation Technology*. Elsevier Science Ltd. 1-10.
- Pontis, Alves Jonierison. Costa, Luiz Antonio Mendonca Alves. Silvia, Silvio Jose Reis. Flach, Adriana. (2014). *Color, Phenolic and Flavonoid Content, and Antioxidant Activity of Honey from Roraima. Brazil: Food Science and Technology*. 34(1) : 69-73. ISSN 0101-2061.
- Pourmorad, F., Hossenimehr, S.J., Shahabimajd, N. (2006). *Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants*. Afrika: African Journal of Biotechnology. 5(11):1142-1145.
- Pratt, D.E., dan Hudson, B.J.F. (1992). *Natural Antioxidants not Exploited Commercially* cit. B.J.F. Hudson. *Food Antioxidants*. Elsevier Applied Science.
- Reddy G, Altaf MD, Naveena BJ, Venkateshwar M, & Kumar EV. (2008). *Amylolytic Bacterial Lactic Acid Fermentation*. Biotechnology Advances 26
- Reynertson, K. A. (2007). *Phytochemical Analysis of Bioactive Constituents from Edible Myrtaceae Fruit*. Dissertation. New York : The City University of New York.
- Rohadi. (2013). *Umur Simpan, Aktivitas Antioksidan dan Keamanan Minuman Madu Galohgor*. Bogor: IPB.
- Safey El dan Abdul Raouf. (2009). *Otease Purification and Characterization of Protease Enzyme From Bacillus subtilis*. Egypt: Al-Azhar University.

- Saputro, M. N. Bayu. (2016). *Profil Protein, Aktivitas Antioksidan, Dan Inhibitor Ace Dari Susu Kuda Dan Hidrolisatnya*. Disertasi. Bogor : Institut Pertanian Bogor
- Sayuti, Kesuma, dan Rina Yenrina. (2015). *Antioksidan Alami dan Sintetik*. Padang: Andalas University Press
- Sadikin, M.H. (2001). *Biokimia Darah*. Jakarta: Widya Medika.
- Sah, B.N.P., T. Vasiljevic, S. McKechnie, & O.N. Donkor. (2013). *Effect of Probiotics On Antioxidant and Antimutagenic Activities of Crude Peptide Extract From Yogurt*. Elsevier.
- Samin, Adi, Nurhayati B., Yuszda K. 2013. *Penentuan Kandungan Fenolik Total dan Aktivitas Antioksidan dari Rambut Jagung (Zea Mays L.) yang Tumbuh di Daerah Gorontalo*. Skripsi. Gorontalo: Universitas Negeri Gorontalo
- Shinta Simon. (2014) *Karakteristik Fungsional Tepung Putih Telur yang Dikeringkan Dengan Freeze Dryer Pada Suhu dan Ketebalan Berbeda*. Skripsi. Fakultas Peternakan Universitas Hasanudin Makasar.
- Shui, G., Wong, S.P., & Leong, L. P. (2004). *Characterization of Antioxidants and Change of Antioxidant Levels During Storage of Manilkara zapota L*. Agricultural and Food Chemistry. 52.
- Silalahi, Jansen. (2006). *Makanan Fungsional*. Cetakan ke-1. Yogyakarta: Penerbit Kanisius
- Tamat, S. R., T. Wikanta dan L. S. Maulina. (2007). *Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Ekstrak Rumput Laut Hijau Ulva reticulata Forsskal*. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia, 5 (1) : 31-36.
- Turan B. (2010). *Role of Antioxidants in Redox Regulation of Diabetic Cardiovascular Complications*. Current Pharmaceutical Biotechnology
- Uniacke-Lowe T, Huppertz T, Fox PF. (2010). Equine milk proteins: Chemistry, structure, and nutritional significance [ulas balik]. *Int Dairy J.* 20:609-629. doi:10.1016/j.idairyj.2010. 02.007.
- Vandekar M, Dulmage HT. (1982). *Guidelines for Production of Bacillus thuringiensis H-14*. Special Programe for Research and Training in Tropical Diseases. Geneva, Switzerland.
- Vasiljevic, T and N.P. Shah. (2008). *Culture milk and yoghurt*. In: Chandan, R.C., Kilara, A. and Shah, N. P. (Eds) *Dairy Processing Technology and Quality Assurance*. USA: Jhon willey and sond, Ltd.
- Walker J. (2002). *The Protein Protocols Handbook*. Totowa: Humana Press Inc.

- Widiyati, Eni. (2011). *Oxidasi Biologi, Radikal Bebas, dan Antiosidan*. Semarang: Biokimia FK Unissula.
- Wildman, R.E.C. (2001). *Handbook of Nutraceuticals dan Functional Food*. CRC Press. Boca Raton.
- Winarno, F.G., (1993). *Pangan Gizi Teknologi dan Konsumen*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Winarno, F.G. (1984). *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Winarsi, Hery. (2007). *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas, Potensi dan Aplikasinya Dalam Kesehatan*. Cetakan ke-1. Yogyakarta: Penerbit Kanisius
- Winarti, Sri. (2010). *Makanan Fungsional*. Yogyakarta.
- Zhao, D., & Shah, N. P. (2014). *Changes in Antioxidant Capacity, Isoflavone Profile, Phenolic and Vitamin Contents in Soymilk During Extended Fermentation*. Food Science and Technology.