

Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan Peptida Susu Kambing Hasil Hidrolisis dengan Protease *Lactobacillus plantarum* S31
(Antibacterial and Antioxidant Activity of Goat Milk Peptide Hydrolyzed with Protease of *Lactobacillus plantarum* S31)

Nina Herlina¹, Apon Zaenal Mustopa¹, Rahma Sari Surachma², Lita Triratna¹, Gina Kartina¹, & Wida Nurul Alfisyahrin¹

¹Puslit Bioteknologi-LIPI, Jalan Raya Bogor Km 46, Cibinong, Bogor 16911, Indonesia

²Jurusan Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Jl. Dramaga-Bogor 16680, Indonesia. Email: azmustopa@yahoo.com

Memasukkan: Desember 2018, **Diterima:** Februari 2019

ABSTRACT

Research on the hydrolysis of milk with various protease obtained from the digestive tract, plants and animals has been widely carried out, but the hydrolysis process of goat milk with protease enzymes from *Lactobacillus plantarum* S31 isolated from bekasam is still widely unknown. This study aims to determine the antibacterial and antioxidant activity of peptides hydrolyzed by protease enzymes from *L. plantarum* S31. Isolation and purification of extracellular proteases was carried out with 80% ammonium sulfate saturation, dialysis and G-50 Sephadex matrix. The results of hydrolysis showed that fraction 11 has the highest antioxidant activity. Goat milk with pH 5 has a greater inhibitory activity of about 29%, which is 5% compared to goat milk pH 7. This fraction also has a quite good antibacterial activity of Entero Pathogenic *Escherichia coli* (EPEC K1.1) bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*.

Keywords: goat milk, hydrolysis, antibacterial, antioxidant, *Lactobacillus plantarum*

ABSTRAK

Penelitian mengenai hidrolisis susu dengan berbagai protease yang diperoleh dari saluran pencernaan, tanaman maupun hewan telah banyak dilakukan, namun proses hidrolisis susu kambing dengan enzim protease asal *Lactobacillus plantarum* S31 yang diisolasi dari bekasam masih belum banyak diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dan antioksidan dari peptida bioaktif yang dihidrolisis oleh enzim protease dari *L. plantarum* S31. Isolasi protease ekstraseluler dilakukan dengan cara presipitasi menggunakan ammonium sulfat 80%, kemudian dilakukan dialisis untuk menghilangkan garam ammonium sulfat dan dilanjutkan dengan purifikasi fraksinasi dengan matriks Sephadex G-50. Antioksidan tertinggi ditunjukkan pada fraksi 11. Fraksi 11 susu kambing dengan pH 5 memiliki antibakteri yang lebih besar sekitar 5% dibandingkan susu kambing pH 7 yaitu sebesar 29%. Fraksi ini juga memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri *Entero Pathogenic Escherichia coli* (EPEC K1.1), *Staphylococcus aureus* dan *Listeria monocytogenes* yang cukup baik.

Kata Kunci : susu kambing, hidrolisis, antibakteri, antioksidan, *Lactobacillus plantarum*

PENDAHULUAN

Susu merupakan sumber nutrisi kaya protein yang mengandung peptida dengan aktivitas anti hipertensi, antioksidan, antibakteri dan imunomodulator yang dilepaskan oleh kasein melalui proses biokimia dan hidrolisis ketika proses pencernaan (Contreras *et al.* 2009). Susu kambing memiliki kelebihan dibandingkan susu sapi yaitu tingkat pencernaan lebih tinggi dan β kasein mau pun rantai asam lemak pada susu kambing berukuran lebih pendek sehingga lebih efisien dan baik untuk mengurangi kadar

kolesterol jaringan (Jandal, 1996). Sebagian besar protein susu mengandung peptida yang belum aktif, pelepasan peptida bioaktif tersebut dipengaruhi oleh cara hidrolisis dan enzim yang digunakan. Peptida bioaktif yang dihidrolisis dari susu kambing menggunakan enzim bromelin diketahui memiliki aktivitas antioksidan dan antibakteri terhadap bakteri seperti *E. coli*, *S. typhimurium* dan *L. monocytogenes* (Kusumaningtyas dkk. 2016).

Protease merupakan enzim yang banyak digunakan pada industri makanan dan berfungsi untuk mengkatalis proses hidrolisis ikatan peptida pada molekul protein untuk meningkatkan

nilai produk dan *nutraceutical* (Palsaniya *et al.* 2012). Protease juga diketahui berperan penting dalam bidang farmasetika dan telah digunakan pada berbagai aktivitas terapi sebagai antikanker, antitumor, gangguan pencernaan dan imun (González-Rábade *et al.* 2011). Enzim protease banyak dihasilkan dari tanaman dan mikroba seperti kapang, khamir dan bakteri (Aftab *et al.* 2006). Beberapa bakteri seperti genus *Bacillus*, *Lactobacillus* dan *Arsukibacterium* diketahui memiliki enzim protease dengan berbagai aktivitas biologi. Keragaman jenis protease berimplikasi terhadap berat molekul (BM) dan sekuen asam amino dari peptida-peptida yang dihasilkannya sehingga aktivitas biologi yang didapat akan berbeda pula. Oleh karena itu, penelitian mengenai isolasi dan purifikasi enzim dari berbagai sumber menjadi trend dan akan terus berkembang.

Budiarto *et al.* (2016) telah mengkarakterisasi dua protease utama dari *L. plantarum* S31 hasil isolasi dari bekasam, yaitu LMS31.18 (18 kDa) dan LP31.37 (37 kDa). Campuran kedua protease ekstraseluler ini memiliki karakterisasi yaitu aktif pada pH 5, thermostable, dan memiliki spesifik aktivitas 2 IU/mg. Namun, aktivitasnya dihambat oleh keberadaan SDS, cofactor (Mg²⁺ dan Ca²⁺) dan DTT. Aplikasi protease pada hidrolisat susu skim menunjukkan aktifitas antibakteri terhadap *E. coli* and *L. monocytogenes*. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan antibakteri dari hidrolisat susu kambing dengan enzim protease asal *L. plantarum* S31 yang diisolasi dari bekasam.

BAHAN DAN CARA KERJA

Tahap ini dilakukan sesuai Budiarto *et al.* (2016) dengan sedikit modifikasi. Isolat *L. plantarum* S31 diinokulasikan ke dalam media MRS broth (mengandung *dipotassium hydrogen phosphate*, *glucose*, *magnesium sulfate heptahydrate*, *manganous sulfate tetrahydrate*, *meat extract*, *peptone*, *sodium acetate trihydrate*, *triammonium citrate* dan *yeast extract*) dan diinkubasi tanpa aerasi dan rotasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian disentrifugasi (10.000 rpm, 4°C, 30 menit), supernatan ditambahkan ammonium sulfat 80% pada suhu 4°C sampai homogen untuk

mengendapkan protein. Protein hasil pengendapan diresuspensi dengan buffer Tris HCl 25 mM, pH 7,4, pada suhu 4°C. Sampel protein sebagaimana didialisis (Thermo Scientific™ Slide–Alyzer™ 10K MWCO Dialysis Cassette). Protein hasil dialisis dipurifikasi dengan kolom filtrasi gel sephadex G-50 dan dielusi menggunakan bufer Tris HCl 25 mM, pH 7,4, pada suhu 4°C. Konsentrasi total protein diukur sesuai Sambrook & Russel (2001) dengan menggunakan BCA *protein assay kit* (Termo Scientific 23227). Fraksi hasil filtrasi direaksikan dengan *working reaction* (Reagent A: Reagent B= 50: 1) dengan perbandingan 1:20 (v/v). Larutan dimasukkan dalam microplate 96 well dan diinkubasi 37°C, 30 menit menghasilkan warna ungu. Standar yang digunakan adalah bovine serum albumin (BSA) dengan deret konsentrasi 0; 0,025; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5, dan 2,0 mg/ml. Hasil reaksi dibaca pada panjang gelombang 540 nm.

Aktivitas protease dilakukan dengan metode modifikasi Cupp-Enyard (2008). Fraksi hasil filtrasi ditambah substrat kasein (1%) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan *trichloroacetic acid* (TCA). Selanjutnya, ditambahkan reagen A (campuran larutan Na₂CO₃ dan CuSO₄·5H₂O) dan folin ciocalteau (Sigma) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit dan disentrifugasi. Hasil reaksi dibaca pada panjang gelombang 540 nm. Standar yang digunakan adalah tirosin.

Uji zimogram (Kleiner & Stetler-Stevenson, 1994) menggunakan *separating gel* 12% (v/v) dengan komposisi acrylamide 30%, 2,5 M TrisHCl pH 8,4, ammonium per sulfate 30 mg/mL, TEMED, ddH₂O dan gelatin 0,2%. *Stacking gel* 3,9% (v/v) terdiri dari Acrylamide 30%, 2,5 M TrisHCl pH 8,4, ammonium per sulfate 30 mg/mL, TEMED, dan ddH₂O. Gel diwarnai dengan 0,05% *Coomassie brilliant blue* selama 24 jam dan *destaining* sampai muncul pita bening. Pita protein dihitung nilai *Retardation factor* (Rf) menggunakan rumus (Cavalli *et al.* 2006)

Rf =	Jarak pergerakan pita protein dari tempat awal
	Jarak pergerakan marker dari tempat awal

Susu kambing diatur pH-nya menjadi 5 dan 7 dengan HCl kemudian proses hidrolisis dilakukan sesuai dengan yang dilakukan oleh Pan *et al.* 2009 dan Kusumaningtyas dkk. 2016. Susu kambing disentrifus dengan kecepatan 6000 g selama 10 menit 4°C lalu ditambahkan enzim dengan perbandingan 1:20 (v/v) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam. Selanjutnya dilakukan pemanasan pada suhu 100°C selama 10 menit. Sampel kemudian disentrifus 13000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Lalu supernatan difilter menggunakan milipore 0,45 µm. Penentuan bobot molekul hidrolisat dengan SDS PAGE dilakukan sesuai Kleiner & Stetler-Stevenson (1994). Hasil hidrolisat dielektroforesis dengan SDS-PAGE. *separating gel* 12% (v/v) dengan komposisi acrylamide 30%, 2,5 M TrisHCl pH 8,4, ammonium per sulfate 30 mg/mL, TEMED, ddH₂O dan *Stacking gel* 3,9% (v/v) terdiri dari Acrylamide 30%, 2,5 M TrisHCl pH 8,4, ammonium per sulfate 30 mg/mL, TEMED, dan ddH₂O. Gel diwarnai dengan silver stain kit (*Pierce Silver Stain Kit*).

Uji antibakteri dilakukan sesuai metode Sogandi *et al.* (2015). Isolat bakteri uji *EPEC KI.1*, *S. aureus* IPBCC serta *L. monocytogenes* UGMCC pada OD₆₀₀ = 0,5 dihomogenkan dengan NaCl 0,85%. Kemudian sebanyak 3 ml dimasukkan ke 17 ml media umum Nutrient Agar (mengandung agar, beef extract, peptone dan NaCl) dan dituang ke cawan petri steril. Setelah itu kertas cakram (Filtres Fioroni) dengan diameter 6mm diletakkan pada media dan ditetesi dengan hidrolisat pH5 fraksi 7 (5022,7 mg/mL) Fraksi 11 (5672,7 mg/ml) dan pH 7 Fraksi 7 (5012,7 mg/ml) Fraksi 11 (4939,3 mg/ml), masing masing sebanyak 30µl. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 8 jam.

Aktivitas inhibisi ditandai dengan terbentuknya zona bening. Diameter zona bening diukur dengan mistar untuk mendapatkan nilai antimikroba. Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah kloramfenikol (10 mg/ml).

Pengujian antioksidan menggunakan DPPH (2,2 -difenil-1-pikrilhidrazil) dilakukan berdasarkan kombinasi metode Thaipong *et al.* (2006) dan Clarke *et al.* (2013). Antioksidan hidrolisat susu kambing diuji dengan mengukur kemampuan menetralsir radikal bebas DPPH. Warna pada radikal bebas DPPH akan berkurang dengan kehadiran antioksidan yang mendonorkan ion hidrogen. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 540 nm. Aktivitas antioksidan dihitung berdasarkan persamaan prosentase dari selisih absorbansi kontrol dan ekstrak terhadap daya hambat

HASIL

Purifikasi Protease Ekstraseluler *L. plantarum* S31

Hasil tiap tahapan proses pemurnian protease ekstraseluler asal *L. plantarum* S31 ditunjukkan pada Tabel 1. Fraksi 7 menunjukkan aktivitas spesifik yang lebih tinggi dibandingkan fraksi 11 yaitu sebesar 123,547 U/mg dengan kemurnian sebesar 7,901 Fold. Purifikasi protease dengan kromatografi kolom *sephadex* G-50 menghasilkan 27 fraksi dengan aktivitas protease dan OD (*optical density*) yang berbeda-beda (Gambar 1). Elusi dengan Tris HCl 25 mM, pH 7.4, menunjukkan puncak (*peak*) aktivitas protease tertinggi pada fraksi 1, 7, 11, 15, dan 16. Fraksi tersebut selanjutnya dipilih untuk dilakukan penentuan bobot molekul dengan metode zimogram.

Hasil zimogram menunjukkan adanya zona bening tunggal pada fraksi ke 7 dan 11 (Gambar 2). Bobot molekul kedua fraksi menunjukkan

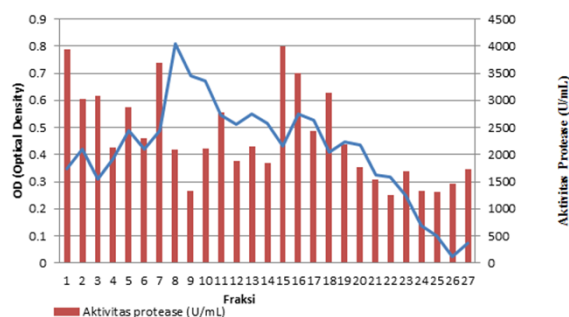
Tabel 1. Hasil purifikasi protease ekstraseluler *L. plantarum* S31

Tahapan Pemurnian	Total Aktivitas (U)	Total protein (mg)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Tingkat Kemurnian (Fold)	Yield (%)
Ekstrak kasar	14523,607	928,767	15,638	1	1
Amonium sulfat 80%	762,619	14,758	51,676	3,305	1,589
Dialisis	92,513	3,822	24,204	1,548	0,412
Sephadex G-50					
- Fraksi 7	135,198	1,094	123,547	7,901	0,118
- Fraksi 11	91,7859	1,058	86,743	5,547	0,114

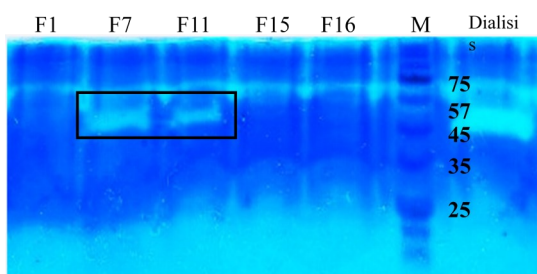
adanya perbedaan, jika dibandingkan dengan pita marker protein. Berat molekul fraksi 7 sebesar 41 kDa sedangkan fraksi 11 yaitu 45 kDa. Fraksi tersebut selanjutnya digunakan sebagai fraksi enzim protease terpilih untuk hidrolisis susu kambing.

Hidrolisis Susu Kambing dan Skim dengan Protease Ekstraseluler *L. plantarum* S31

Hidrolisis protein susu kambing dengan fraksi 7 dan 11 menghasilkan peptida dengan berat molekul lebih rendah pada analisis SDS-PAGE dibandingkan profil protein susu kambing tanpa dihidrolisis. Protein susu kambing memiliki 8 pita protein dengan bobot molekul 69,7 kDa, 36,0 kDa, 33,93 kDa, 24,0 kDa, 18,74 kDa, 14,0 kDa, 12,0 kDa, 10,0 kDa (Gambar 3). Pita-pita tersebut kemudian dihidrolisis dengan fraksi enzim protease 7 dan 11 menjadi peptida berukuran 61,0 kDa (Gambar 3). Protein kasein (21,0-36,0 kDa) pada hidrolisat susu kambing pH 7 juga terlihat telah terhidrolisis, sedangkan pada hidrolisat susu kambing pH 5 fraksi 7 masih terlihat adanya protein α S1-kasein (34 kDa).



Gambar 1. Kromatogram hasil purifikasi dengan kolom Sephadex G-50

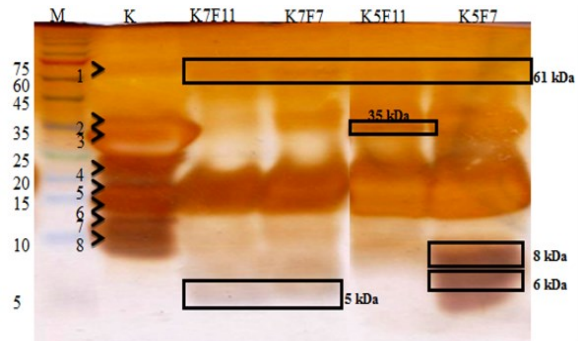


Gambar 2. Elektroforegram protease *L. plantarum* S31. F1 : fraksi 1, F7: fraksi 7, F11: fraksi 11, F15: fraksi 15, F16: fraksi 16, M : marker. BM=57.189 kDa

Hidrolisis protein susu kambing oleh protease juga menghasilkan beberapa peptida baru. Hidrolisat susu kambing pH 5 fraksi 7 menunjukkan munculnya tiga peptida baru dengan berat molekul 61 kDa, 8 kDa, dan 6 kDa, sedangkan hidrolisat susu kambing pH 5 fraksi 11 hanya menunjukkan dua peptida baru dengan berat molekul 61 kDa dan 35 kDa. Hidrolisat susu kambing pH 7 untuk kedua fraksi menghasilkan dua peptida baru dengan berat molekul 61 kDa dan 5 kDa (Gambar 3).

Aktivitas Antibakteri Hidrolisat Protein Susu Kambing

Bakteri patogen yang digunakan adalah EPEC K1.1, *S. aureus* IPBCC dan *Listeria monocytogenes* UGMCC. Hidrolisat susu kambing menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap ketiga patogen. Diameter zona bening yang paling besar yaitu terhadap EPEC K11 diikuti oleh *L. monocytogenes* dan *S. aureus*. Kontrol susu kambing tanpa hidrolisis tidak menunjukkan aktivitas antibakteri pada *L. monocytogenes*, namun setelah dihidrolisis dengan protease terlihat adanya aktivitas antibakteri dengan diameter zona hambat rata-rata 1,5-2,5 mm (Tabel 2). Fraksi 11 menunjukkan aktivitas penghambatan yang lebih tinggi terhadap *L. monocytogenes* dan EPEC K11 dibanding fraksi 7. Hidrolisat susu kambing fraksi 7 tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap EPEC K11. Hidrolisat susu kambing pH 5 menunjukkan penghambatan yang lebih besar terhadap ketiga patogen dibandingkan hidrolisat susu kambing pH 7 (Gambar 4).



Gambar 3. Elektroforegram hidrolisat susu kambing. M: marker, K: susu kambing tanpa hidrolisis, K7F11: susu kambing pH 7 (fraksi 11), K7F7: susu kambing pH 7 (fraksi 7), K5F11: susu kambing pH 5 (fraksi 11), K5F7: susu kambing pH 5

Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein Susu Kambing

Hasil pengujian aktivitas antioksidan menunjukkan susu sebelum dihidrolisis (kontrol) memiliki aktivitas yang lebih rendah dibandingkan setelah dihidrolisis dengan protease ekstraseluler (Gambar 5). Penambahan protease ekstraseluler ke dalam susu kambing dapat meningkatkan aktivitas antioksidan.

Daya hambat yang paling tinggi terhadap radikal DPPH terdapat pada hidrolisat susu

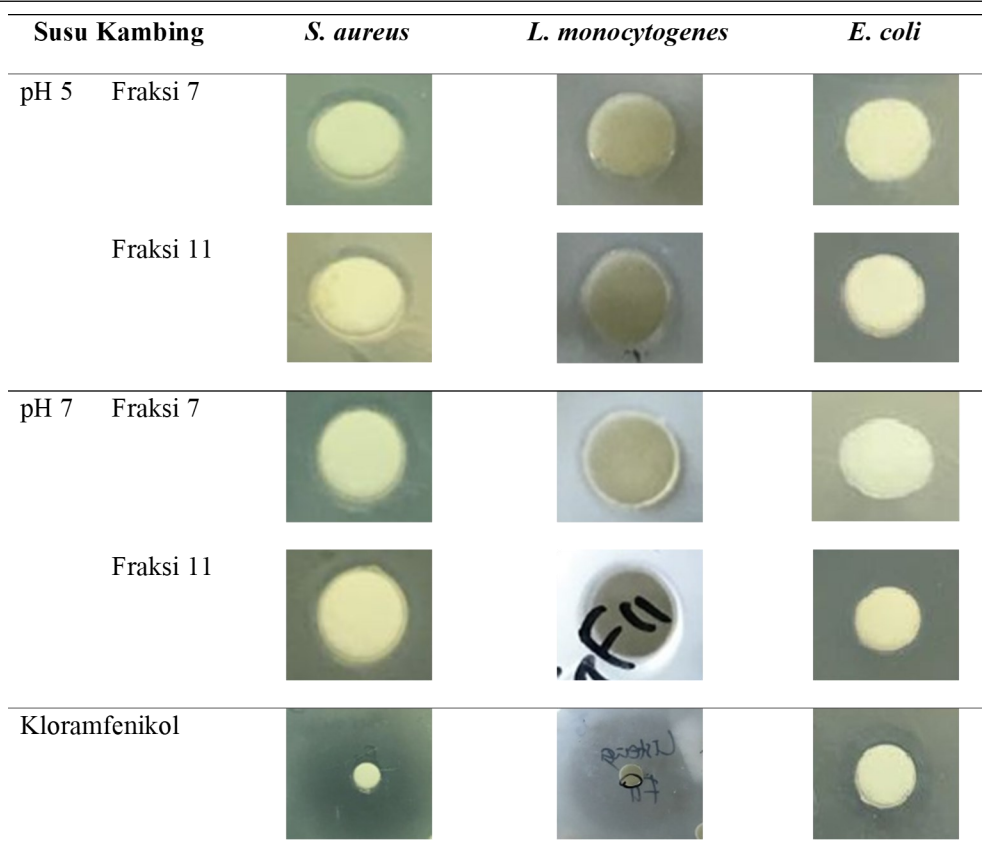
kambing fraksi 11 dengan persen penghambatan sebesar $29,3 \pm 0,005$ (susu kambing pH 5) dan $24,08\% \pm 0,027$ (susu kambing pH 7). Aktivitas paling rendah ditunjukkan oleh susu kambing pH 7 fraksi 7 dengan persen penghambatan sebesar 15,84%.

PEMBAHASAN

Pengendapan menggunakan ammonium sulfat bertujuan untuk menghilangkan campuran senyawa

Tabel 2. Diameter zona bening hidrolisat susu kambing

Sampel	<i>S. aureus</i> (mm)	<i>L. monocytogenes</i> (mm)	EPEC K11 (mm)
Kloramfenikol	14,5 ± 0.35	25,25 ± 0.71	5 ± 0
Susu kambing pH 5	1.5 ± 0.71	0	2,75 ± 0,35
Susu kambing pH 7	0	0	1,5 ± 0
Susu kambing pH 5, Fraksi 7	2 ± 0	2,5 ± 0	0
Susu kambing pH 5, Fraksi 11	1,75 ± 0,35	2,5 ± 0	2 ± 0
Susu kambing pH 7, Fraksi 7	1,75 ± 0.35	1,5 ± 0	0
Susu kambing pH 7, Fraksi 11	1,5 ± 0	2 ± 0	2,25 ± 0,35



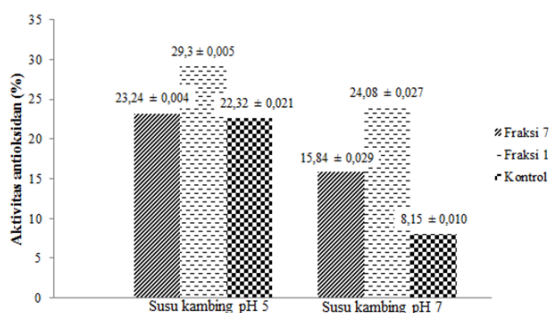
Gambar 4. Penghambatan antibakteri hidrolisat susu kambing fraksi 7, fraksi 11 dan kontrol Kloramfenikol

yang terdapat dalam metabolit seperti karbohidrat, serat, vitamin dan lemak. Prinsip *salting out*, yaitu mempresipitasi enzim dari ekstrak kasar dan mencegah pembentukan ikatan hidrogen dengan air, garam ammonium sulfat memfasilitasi agregasi sehingga mempresipitasi keluar dari larutan (Duong-ly & Gabelli 2014). Dialisis dilakukan untuk menghilangkan garam-garam amonium sulfat pada tahap presipitasi sedangkan filtrasi gel dengan matriks Sephadex G-50 dilakukan sebagai proses pemurnian protease. Pemurnian tersebut menghasilkan dua tipe protease ekstraseluler melalui uji zimogram. Zimogram merupakan teknik elektroforesis yang mampu mendeteksi dan mengukur aktivitas proteolitik atau aktivitas hidrolase suatu enzim. Aktivitas tersebut terlihat dari adanya zona bening sebagai aktivitas proteolitik terhadap substrat gelatin (Leber & Balkwill 1997). Karakterisasi fraksi 7 dan 11 dengan SDS PAGE menunjukkan berat molekul 41 dan 45 kDa seperti terlihat pada uji zimogram. Hasil purifikasi fraksi 7 menunjukkan peningkatan derajat kemurnian enzim sebesar 7,901 kali dengan aktivitas spesifik sebesar 123,547 U/mg, sedangkan fraksi 11 memiliki aktivitas spesifik 86,743 dengan kemurnian sebesar 5,547 Fold (Tabel 1). Hasil ini tidak berbeda jauh dengan kemurnian enzim protease *L. plantarum* yang diperoleh Budiarto *et al.* (2016) yaitu sebesar 8,01 Fold.

Protein merupakan makromolekul yang tersusun dari asam amino. Peptida bioaktif merupakan fragmen spesifik dari protein yang mengandung 2-20 residu asam amino atau lebih dan beberapa diantaranya dapat bersifat

multifungsi (Korhonen 2009; Ryan *et al.* 2011). Peptida bioaktif yang terdapat di dalam susu diketahui memiliki aktivitas antioksidan, antihipertensi (Moslehishad *et al.* 2013), antitrombotik, hipokolesterolemik, antibakteri, immunomodulator, dan antifungi (Szwajkowska *et al.* 2011). Peptida bioaktif tersebut dapat dijumpai pada protein susu sapi, susu kambing, susu skim, dan susu kuda setelah dihidrolisis secara enzimatik.

Sebelum hidrolisis, susu kambing memiliki 8 pita protein pada berat molekul 69,7 kDa, 36 kDa, 34 kDa, 24 kDa, 18,74 kDa, 14 kDa, 12 kDa, dan 10 kDa (Gambar 3). Protein tersebut termasuk dalam protein utama susu yaitu kasein dan *whey*. Protein tidak larut (kasein) terdiri dari beberapa tipe yaitu : $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β -, K- dan γ -kasein, sementara protein terlarut (*whey*) terdiri dari β -laktoglobulin, α -laktalbumin, laktoferin, imunoglobulin, serum albumin, glikomakropeptida, enzim dan faktor pertumbuhan (McGregor & Poppitt 2013). Proses hidrolisis menggunakan enzim protease yang berbeda akan menghasilkan senyawa peptida yang berbeda dikarenakan perbedaan titik potong substrat. Pemecahan protein susu menghasilkan fragmen peptida yang bersifat bioaktif sebagai antibakteri atau antioksidan. Hasil hidrolisat dengan protease *L. plantarum* S31 menunjukkan adanya tiga pita peptida baru pada hidrolisat susu kambing pH 5 fraksi 7. Selain itu ditemukan satu peptida baru pada hidrolisat susu kambing pH 5 fraksi 11, dan dua peptida baru pada hidrolisat susu kambing pH 7. Peptida baru yang dihasilkan memiliki bobot molekul 61 kDa, 35 kDa, 8 kDa, 6 kDa, dan 5 kDa (Kusumaningtyas dkk. 2015). Kusumaningtyas dkk. (2016) melaporkan hidrolisis susu kambing dengan enzim bromelin menunjukkan peptida baru pada berat molekul antara 12-35 kDa. Penelitian tersebut menunjukkan keragaman enzim pada proses hidrolisis menghasilkan peptida yang berbeda sehingga aktivitas fungsional dari hidrolisat tersebut juga akan berbeda. Hal ini menyebabkan penelitian mengenai penggunaan enzim untuk hidrolisis produk pangan marak dilakukan. Selain itu, penelitian mengenai peptida bioaktif dari susu dan produk olahannya menggunakan enzim proteolitik pun berkembang cukup pesat. Peptida bioaktif dari hidrolisis produk fermentasi susu memiliki aktivitas antiinflamasi,



Gambar 5. Penghambatan hidrolisat susu kambing fraksi 7, fraksi 11 dan kontrol terhadap radikal bebas DPPH

antihemolitik dan antioksidan (Aguilar-Toala *et al.* 2017). ukuran peptida bioaktif akan mempengaruhi aktivitas biologis dan fungsi dari senyawa yang dihidrolisis (Fitzgerald & Meisel 2003).

Uji aktivitas antibakteri hidrolisat susu kambing dilakukan terhadap bakteri uji yaitu *S. aureus*, *E.coli* dan *L. monocytogenes*. *E. coli* merupakan kelompok bakteri gram negatif sedangkan *S. aureus* dan *L. monocytogenes* termasuk bakteri gram positif. Bakteri tersebut bersifat *food borne disease* yang menyerang sistem pencernaan dan dapat ditemukan pada kondisi *food poisoning*. Pada konsentrasi antara 4,9 sampai 5,7 g/ml, aktivitas antibakteri hasil hidrolisat susu kambing menunjukkan adanya aktivitas antibakteri yang lemah dengan daya hambat < 3mm (Pan *et al.* 2009). Hidrolisat fraksi 11 efektif dalam menghambat pertumbuhan EPEC K11 dan *L. monocytogenes*, sedangkan fraksi 7 efektif dalam menghambat *S.aureus*. Fraksi 7 memiliki dua peptida berukuran < 10 kDa yang bersifat sebagai antibakteri sehingga menghambat pertumbuhan *S. aureus* lebih baik dibandingkan fraksi 11. Sebaliknya, fraksi 11 dengan berat molekul 5 kDa dan 35 kDa lebih efektif menghambat pertumbuhan bakteri gram positif. Peptida antibakteri bersifat spesifik spesies dan efektif terhadap bakteri tertentu Mondhe *et al.* (2014).

Peningkatan aktivitas penghambatan radikal bebas ditunjukkan pada susu kambing yang telah dihidrolisis oleh enzim protease dibandingkan tanpa perlakuan hidrolisis. Menurut Korhonen (2009), hal ini disebabkan proses hidrolisis mampu melepaskan peptide bioaktif dari protein asalnya. Peptida dengan berat molekul < 3 kDa dengan waktu hidrolisis 24 jam menunjukkan aktivitas proteolitik yang cukup tinggi dengan melepaskan sejumlah kelompok amino sehingga aktivitas antioksidan cukup tinggi Eun Ha *et al.* (2015). Hidrolisat protein yang didominasi oleh ikatan peptida dengan bobot molekul <500 Da memiliki aktivitas antioksidan lebih rendah dibandingkan dengan hidrolisat protein yang didominasi oleh ikatan peptida dengan bobot molekul 1000-3000 Da (You *et al.* 2009). Susu kambing memiliki asam amino yang cukup tinggi terutama fenilalanin dan histidin sehingga kandungan peptida yang bersifat antioksidan juga cukup tinggi (Sabahelkheir *et al.* 2012).

Mekanisme kerja antioksidan oleh peptide bioaktif antara lain sebagai *radical scavenging*, pengkelat mineral, reduktor logam, dan pelindung (Yoshinori *et al.* 2010). Struktur primer asam amino akan menentukan mekanisme antioksidan suatu senyawa. Aktivitas penghambatan radikal bebas yang lebih tinggi pada fraksi 11 kemungkinan disebabkan aktivitas peptida dan asam amino histidin dan yang bersifat hidrofobik dibandingkan fraksi 7. Fraksinasi lebih lanjut menggunakan Reverse-Phase HPLC dapat menghasilkan elusi yang lebih murni dan sesuai dengan aktivitas biologis yang diharapkan.

KESIMPULAN

Fraksi protein dengan berat molekul 41 kDa dan 45 kDa mampu menghidrolisis susu kambing sehingga memberikan penghambatan terhadap radikal bebas dan memiliki aktivitas antibakteri yang lemah terhadap bakteri *E. coli*, *S. aureus* dan *L. monocytogenes*. Persentase penghambatan antioksidan terbesar ditunjukkan oleh fraksi 11 sebesar 29%. Fraksi ini juga mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *L. monocytogenes* sedangkan fraksi 7 yang memiliki aktivitas antioksidan sebesar 24% lebih efektif menghambat pertumbuhan *S. aureus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Aftab, S., S.Ahmed, S.Saeed, & SA. Rasool. 2006. Screening, isolation and characterization of alkaline protease producing bacteria from soil. *Pakistan Journal Biological Science*. 9:2122-2126.
- Aguilar-Toalá JE., L. Santiago-López, CM. Peres, HS. Garcia, B. Vallejo-Cordoba, AF. González-Córdova, & A. Hernández-Mendoza. 2017. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal Dairy Science*. 100(1): 65-75.
- Budiarto, BR., AZ Mustopa, & T. Idarmawan. 2016. Characterization of partially extracellular proteases from bekasam-isolated *Lactobacillus plantarum* S31 and its application to hydrolyze skimmed-milk with antibacterial property. *International Food Research*

- Journal*. 23(1): 340-349.
- Cavalli, SV., SV. Silva, C. Cimino, FX. Malcata & N. Priolo. 2006. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum*. *Plant Physiology*. 1-7.
- Clarke, G., KN. Ting, C. Wiart, & J. Fry. 2013. High correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, ferric reducing activity potential and total phenolics content indicated redundancy in use of all three assay in use of all three assay to screen for antioxidant activity of extracts of plants from the Malaysian reforested. *Antioxidants*. 2: 1-10. doi: 10.3390/antiox2010001.
- Contreras, MdM., R. Carron, MJ. Montero, M. Ramos, & I. Recio. 2009. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19: 566-573.
- Cupp-Enyard, C. 2008. Sigma's non-specific protease activity assay casein as a substrate. *Journal Visual Experiment*. 19:1-2.
- Duong-Ly, KC. & SB. Gabelli. 2014. Salting out of protein using ammonium sulfate precipitation. *Methods in enzymol*. 541: 85-94.
- Eun Ha, G., CO. Ki, HG. Sung, HJ. Sang, B. Park, & S. Jeong. 2015. Comparison of Antioxidant Activities of Hydrolysates of Domestic and Imported Skim Milk Powders Treated with Papain. *Korean Journal. Food Science*. An. 35(3):360-369.
- González-Rábade N., JA. Badillo-Corona, JS. Aranda-Barradas, & MDC. Oliver-Salvador. 2011. Production of plant proteases in vivo and in vitro — a review. *Biotechnology Advance* 29:983–996.
- Jandal, JM. 1996. Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Researc*. 22:177-185.
- Kleiner, DE. & WG. Stetler-Stevenson. 1994. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochemical*. 218: 325–329.
- Korhonen, H. 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal Function Foods*. 177-187.
- Kusumaningtyas, E., R. Widiastuti, HD. Kusumaningrum, & MT. Suhartono 2015. Antimicrobial and antioxidative activities of peptides from goat milk hydrolyzed with various protease. *Journal Animal Veterinary Science*. 20(3):175-183.
- Kusumaningtyas, E., R. Widiastuti, HD. Kusumaningrum, & TM. Suhartono. 2016. Aktivitas antibakteri dan antioksidan hidrolisat hasil hidrolisis protein susu kambing dengan ekstrak kasar bromelin. *Jurnal Teknologi Industri Pangan*. 26(2): 179-188. doi: 10.6066/jtip.2015.26.2.179.
- Leber, TM. & BR. Blakwill. 1997. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal Biochemical*. 249(1):24-8.
- FitzGerald, RJ. & H. Meisel. 2003. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. *Advance. Dairy Chemical*. 3:675-698.
- McGregor, R., & SD. Poppitt. 2013. Milk protein for improved metabolic health: a review of the evidence. *Nutr Metab*. 10 (46):1-13.
- Mondhe, M., A. Chessher, S. Goh, I. Good, & JEM. Stach. 2014. Species-selective killing of bacteria by antimicrobial peptida-PNAs. *PLoS ONE*. 9(2): e89082.
- Palsaniya, P., M. Rinki, N. Beejawat, S. Sethi, & BL. Gupta. 2012. Optimization of alkaline protease production from bacteria isolated from soil. *Journal of Microbiol & Biotechnology Research*. 2 (6):695-701.
- Pan, XF., T. Chen, H. Wu, Tang, & Z. Zhou. 2009. The acid, bile tolerance, and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control*. 20(6): 598-602.
- Sabahelkheir, MK., MM. Faten, & AA. Hassan. 2012. Amino acid composition of human and animal's milk (camel, cow, sheep and goat). *ARP Journal Science Technology*. 2: 32-34.
- Sambrook, J. & DW. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York (US): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sogandi., AZ. Mustopa, IM. Artika & BR. Budiarto. 2015. Inhibitory activity of

- Lactobacillus plantarum* U10 isolated from tempoyak (fermented durian) made in Indonesia against *Salmonella typhi*. *Microbiologi Indonesia*. 9(2): 73-81.
- Thaipong K., U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisneros -Zevallos, DH. & Byrne. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimation antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal Food Compos Anals*. 19: 669-676. doi : 10.1016/j.jfca.2006.01.003.
- You L., M. Zhao, C. Cui, H. Zhao, & B. Yang. 2009. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Innovation Food Science Emerging Technology*. 10: 235-240.
- Yoshinori M., E. Li-Chan, & B. Jiang. 2010. *Bioactives Protein and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals*. Iowa (US): Wiley.

Herlina dkk.