

AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN ANTIOKSIDAN HIDROLISAT HASIL HIDROLISIS PROTEIN SUSU KAMBING DENGAN EKSTRAK KASAR BROMELIN

[Antibacterial and Antioxidant Activity of Hydrolysate from Goat Milk Protein Hydrolyzed by Crude Bromelain Extract]

Eni Kusumaningtyas^{1,2)}, Raphaella Widiastuti¹⁾, Harsi Dewantari Kusumaningrum²⁾, dan Maggy Thenawidjaja Suhartono^{2)*}

¹⁾ Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl RE Martadinata 30 Bogor, Bogor

²⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor

Diterima 03 Agustus 2015 / Disetujui 02 November 2015

ABSTRACT

Goat milk is highly nutritious foodstuffs that beneficial for improving health. The milk contains bioactive peptides which produced by hydrolysis process. The aim of this study was to evaluate antibacterial and antioxidant activities of hydrolysate produced from hydrolysis of goat milk protein by crude bromelain extract. Hydrolysis of goat milk protein was conducted using crude bromelain (0.1 U/mL) at pH 6, 50°C for 60 min. Hydrolysate was fractionated by using membrane molecular weight cut off 10 kDa. Hydrolysate before and after fractionation were assayed for antibacterial and antioxidant activities. Toxicity of the Hydrolysate was determined by hemolysis assay. The result showed that the hydrolysate before and after fractionation inhibited growth of *E. coli*, *S. Typhimurium* and *L. monocytogenes*. Hydrolysate after fractionation has higher antibacterial activity indicated that fractionation was able to improve antibacterial activities of the hydrolysate fraction. The hydrolysate showed scavenging activity to ABTS and DPPH radicals. Fraction <10 kDa has the highest antioxidant activity against both ABTS and DPPH radicals. Hemolysis assay showed that hydrolysate before and after fractionation did not cause lysis of red blood cells, indicating safe for application. Both fraction <10 kDa and >10 kDa not only showed absence of hemolysis but also they were able to reduce autolysis of red blood cells. The result showed that hydrolysate from goat milk hydrolyzed by bromelain were able to be antibacterial and antioxidant.

Keywords: antibacterial, antioxidant, bromelain, goat milk, hydrolysate

ABSTRAK

Susu kambing merupakan bahan pangan bernutrisi tinggi yang bermanfaat untuk meningkatkan kesehatan. Susu mengandung peptida bioaktif yang dapat dihasilkan melalui proses hidrolisis. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri dan antioksidan hidrolisat yang dihasilkan dari hidrolisis protein susu kambing dengan bromelin. Hidrolisis protein susu kambing dilakukan menggunakan ekstrak kasar bromelin (0,1 U/mL) pada pH 6, 50 °C selama 60 menit. Hidrolisat difraksinasi menggunakan membran *molecular weight cut off* 10 kDa. Hidrolisat sebelum dan sesudah fraksinasi diuji kemampuan antibakteri dan antioksidannya. Toksisitas hidrolisat dan hasil fraksinasi diuji dengan uji hemolisis. Hasil menunjukkan bahwa hidrolisat sebelum dan sesudah fraksinasi dapat menghambat pertumbuhan *E. coli*, *S. Typhimurium* dan *L. monocytogenes*. Hidrolisat setelah fraksinasi mempunyai aktivitas antibakteri lebih tinggi yang mengindikasikan bahwa fraksinasi dapat meningkatkan aktivitas antibakteri. Fraksi hidrolisat juga menunjukkan aktivitas netralisasi radikal ABTS dan DPPH. Fraksi <10 kDa mempunyai aktivitas antioksidan yang paling tinggi terhadap radikal ABTS dan DPPH. Uji hemolisis menunjukkan bahwa hidrolisat sebelum dan sesudah fraksinasi tidak menimbulkan lisis pada sel darah merah menandakan aman untuk diaplikasikan. Kedua fraksi <10 kDa dan >10 kDa tidak hanya menunjukkan ketidakberadaan hemolisis tetapi juga dapat menurunkan autolisis pada sel darah merah. Hasil tersebut menunjukkan bahwa susu kambing yang dihidrolisis dengan bromelin dapat berfungsi sebagai antibakteri dan antioksidan.

Kata kunci: antibakteri, antioksidan, bromelin, hidrolisat, susu kambing

PENDAHULUAN

Susu merupakan bahan pangan bernutrisi tinggi yang ditandai dengan keseimbangan asam

aminonya dan dapat meningkatkan kesehatan. Susu juga dapat menjadi sumber peptida bioaktif dengan fungsi biologis yang luas (Szwajkowska *et al.*, 2011).

*Penulis Korespondensi:
E-mail: mthenawidjaja@yahoo.com

Peptida bioaktif yang berasal dari protein susu sapi telah banyak dilaporkan, diantaranya adalah peptida yang dapat berfungsi sebagai antihipertensi (Mos-lehishad *et al.*, 2013), antibakteri (Atanasova dan Ivanova 2010) antitrombotik, opioid, opioid antagonis, immunomodulator, antifungi, mencegah amnesia, dan optimalisasi kontrol kontraksi dan relaksasi otot polos (Szwajkowska *et al.*, 2011) misalnya pada kandung kemih (Uckert *et al.*, 2002).

Susu kambing telah lama dimanfaatkan sebagai pengganti susu sapi terutama yang mempunyai risiko alergi terhadap protein susu sapi. Meskipun demikian, laporan mengenai pemanfaatan susu kambing sebagai penghasil peptida bioaktif belum banyak dilaporkan. Beberapa peptida bioaktif hasil hidrolisis enzimatis susu kambing yang telah teridentifikasi adalah peptida antibakteri (Almaas *et al.*, 2011), antioksidan (Li *et al.*, 2013) dan penghambat *Angiotensin converting enzyme* (ACE) (Nandhini *et al.*, 2012). Peptida-peptida tersebut biasanya masih terikat dalam protein alamiahnya dan dapat diisolasi melalui proses hidrolisis. Beberapa enzim yang dapat digunakan untuk menghidrolisis protein adalah enzim dari pencernaan hewan seperti tripsin, kimotripsin dan pepsin, dari tanaman seperti bromelin dan papain atau enzim yang dihasilkan oleh bakteri misalnya alkalase dari *Bacillus licheniformis* (Li *et al.*, 2016). Keberhasilan untuk mendapatkan potongan peptida yang bersifat bioaktif sangat ditentukan oleh sumber protein dan spesifitas enzim, sehingga pemilihan enzim merupakan tahap penting untuk mendapatkan peptida bioaktif dan akan menentukan bioaktivitas peptida yang dihasilkan (Kumar *et al.*, 2013). Bromelin dihasilkan dari buah nanas yang banyak tersedia di Indonesia. Kelebihan bromelin dibandingkan dengan protease tanaman yang lain adalah bromelin mudah diperoleh dan tersedia dari awal perkembangan buah sampai buah matang meskipun ada fluktuasi pada aktivitas proteolitiknya (Maurer, 2001). Protease dari buah lain seperti tin dan papaya, ficin dan papain hanya ditemukan ketika buah masih hijau dan protease menghilang setelah buah masak (Bartholomew *et al.*, 2003). Selain itu, bromelin juga aktif baik dalam bentuk enzim murni maupun masih dalam bentuk jus buah nanas. Pemanfaatan bromelin untuk menghasilkan peptida bioaktif dari susu kambing belum pernah dilaporkan.

Bromelin termasuk dalam sistein protease yang dapat diisolasi dari buah nanas. Bromelin juga merupakan endoprotease yang memecah protein menjadi peptida (Arshad *et al.*, 2014). Bromelin memecah protein pada ujung karbonil asam amino lisin, alanine, tirosin dan glisin (Godfrey dan Reichel, 1983). Bromelin dapat digunakan untuk memproduksi peptida bioaktif seperti peptida antimikroba dari protein ikan *Meuschenia sp.* yang dapat menghambat *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus cereus*

(Salampessy *et al.*, 2010) Hidrolisis protein oleh protease seperti bromelin menghasilkan hidrolisat yang mengandung campuran peptida yang bersifat bioaktif maupun yang tidak mempunyai aktivitas. Oleh karena itu, diperlukan fraksinasi pemekatan dan pemurnian peptida bioaktif. Beberapa metode dapat digunakan untuk mengisolasi peptida bioaktif yang diinginkan dan memisahkan dari protein yang tidak terhidrolisis atau kontaminan lainnya. Salah satunya adalah pemisahan menggunakan membran *molecular weight cut off* (MWCO). Filtrasi tersebut mampu memekatkan peptida yang diinginkan berdasarkan berat molekul tertentu (Vandanjon *et al.*, 2007). Metode filtrasi tersebut dinilai mudah untuk digunakan dalam skala besar dengan biaya yang lebih murah dibandingkan dengan metode kromatografi cair (Muro *et al.*, 2013).

Pada penelitian ini bromelin digunakan untuk menghidrolisis protein susu kambing dan selanjutnya hidrolisat yang dihasilkan diuji aktivitas antibakteri dan antioksidannya. Pada uji antioksidan digunakan dua metode yaitu pengujian menggunakan [2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)] (ABTS) dan 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) untuk membandingkan dan mendapatkan metode yang sesuai untuk sampel hidrolisat susu kambing. Hidrolisat tersebut mengandung peptida-peptida yang dapat berfungsi sebagai antibakteri sekaligus antioksidan dan akan membuka peluang untuk pemanfaatan peptida bioaktif dari susu kambing sebagai ingredien pangan fungsional di masa depan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah susu kambing peranakan Ettawa (PE) diperoleh dari peternakan kambing, Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor. Buah nanas bogor mengkal diperoleh dari pasar di kota Bogor dan mikroorganisme yang digunakan pada penelitian ini adalah *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* sub spesies enterica serovar *Salmonella* Typhimurium (ATCC 13311) dan *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313).

Persiapan susu kambing

Lemak yang terkandung pada susu segar dipisahkan dengan sentrifugasi 6000xg (Hybrid refrigerated centrifuge, CAX-371, Tomy Seiko, Japan) pada suhu 4°C selama 15 menit. Susu bebas lemak selanjutnya dihidrolisis atau disimpan pada -20°C sampai digunakan.

Penentuan kadar protein

Pengukuran kadar protein dilakukan menggunakan larutan Bradford (Quick start™ Bradford

protein assay, Bio-Rad Inc, Philadelphia, USA). Kurva standar dibuat dengan mereaksikan 5 μ L larutan standar Bovine serum albumin (BSA) dengan berbagai konsentrasi dengan 95 μ L larutan Bradford. Perlakuan yang sama dilakukan pada sampel protein dan aquades sebagai blanko. Larutan didiamkan selama 5 menit dan diukur absorbansinya pada $\lambda = 600$ nm (Labsystems, original Multiscan Ex, Champaign, USA).

Ekstraksi dan penentuan aktivitas enzim

Bromelin diekstrak dengan menghancurkan buah nanas muda tanpa kulit menggunakan *food processor*. Jus yang diperoleh selanjutnya disaring menggunakan kertas saring Whatman No. 41 (Sigma-Aldrich, USA), ditambahkan aseton (Sigma-Aldrich, USA) dengan perbandingan 1:1 (v/v) dan disimpan pada suhu 4°C semalam. Larutan disentrifugasi (micro ultracentrifuge CS 150 NX, Hitachi, Japan) pada suhu 4°C 6000 xg selama 15 menit. Endapan kemudian dicampur dengan *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7,4 dengan perbandingan 1:1 (w/v) (Rowan *et al.*, 1990). Penentuan aktivitas enzim dilakukan menggunakan metode Bergmeyer dan Grassel (1983) dengan mereaksikan 250 μ L kasein (Oxoid, UK) dengan konsentrasi 2% (w/v) dengan 50 μ L enzim dan 250 μ L PBS 0,05 M pH 7. Campuran reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit kemudian ditambahkan 500 μ L TCA (Sigma-Aldrich, USA) 0,2 M. Larutan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 10 menit, disentrifugasi 2000xg (centrifuge MRX-152, Tomy Seiko, Japan) selama 10 menit. Supernatan 375 μ L dicampurkan dengan 1250 μ L Na₂CO₃ 0,4 M dan ditambahkan 250 μ L pereaksi *Folin ciolcateau* (Merck, Darmstadt, Germany) dengan pengenceran 1:2 (v/v) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer (LKB-Novaspec II, Pharmacia-Biotech) pada λ 578 nm. Aquades digunakan sebagai blanko dan sebagai standar digunakan larutan tirosin (Sigma-Aldrich, USA) 5 mM. Satu unit aktivitas didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu μ mol tirosin permenit pada kondisi pengujian.

Hidrolisis protein susu kambing

Hidrolisis dilakukan pada suhu 50°C, pH 6 selama 60 menit dengan aktivitas bromelin 0,1 unit/mL dengan perbandingan enzim:substrat 1:4 (v/v). Hidrolisat yang diperoleh sebagian digunakan langsung untuk uji antibakteri dan antioksidan, sebagian lagi difraksinasi menggunakan membran *cut off* 10 kDa (AMICON Ultra centrifugal units, Merck Millipore Ltd., Darmstadt, Germany). Masing-masing fraksi peptida yang diperoleh yaitu <10 kDa dan >10 kDa diuji aktivitas antimikroba dan antioksidannya.

Sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Penentuan berat molekul peptida dilakukan menggunakan SDS-PAGE (Laemmli, 1970) dengan komposisi gel penahan 4% dan gel pemisah 10% untuk protein dan 18% untuk peptida (Anderson *et al.*, 1983). Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 Volt. Pewarnaan dilakukan menggunakan *comasie blue* (Sigma-Aldrich, USA) untuk protein susu kambing dan *silver staining kit* (Sigma-Aldrich, USA) untuk peptida.

Karakterisasi peptida dengan reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

Karakterisasi peptida dalam hidrolisat dilakukan menggunakan HPLC (Waters, Massachuset, USA) berdasarkan metode McCann *et al.* (2006). Sampel hidrolisat dimasukkan ke dalam kolom HPLC C-18 (5 μ m, 4.6 x 250 mm, Xterra, Waters, Massachuset, USA). Elusi hidrolisat dilakukan dengan menggunakan gradient acetonitril (ACN) (Sigma-Aldrich, USA) dan trifluoroacetic acid (TFA) (Sigma-Aldrich, USA) yang terdiri dari larutan A 0,1% TFA (v/v) dalam ACN dan larutan B 0,1% (v/v) TFA dalam air tanpa ion (*deionized water*). Sistem HPLC diseimbangkan dengan 95% larutan B selama 5 menit, diikuti gradien linier 5-45% (v/v) larutan A selama 20 menit untuk mengelusi peptida dan kemudian diseimbangkan kembali dengan 95% (v/v) larutan B selama 5 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 215 nm yang merupakan panjang gelombang spesifik untuk peptida (Driver dan Raynie, 2007).

Uji antibakteri

Pengujian antibakteri dilakukan berdasarkan metode Lopez-Exposito *et al.* (2007) dengan mencampurkan 100 μ L bakteri uji 10⁵ CFU/mL dengan 100 μ L peptida dengan konsentrasi 1 mg protein/mL dalam mikroplate kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam. Setelah 2 jam, campuran diencerkan dan masing-masing pengenceran ditumbuhkan pada media *Mueller Hinton Agar* (Oxoid, UK) dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 24 jam. Jumlah koloni yang tumbuh dihitung. Pengujian dilakukan dengan 3 kali ulangan.

Pengujian antioksidan

Pengujian antioksidan dilakukan berdasarkan metode Thaipong *et al.* (2006) menggunakan [2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)] (ABTS) (Sigma-Aldrich, USA) dan 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, USA). Larutan stok ABTS dibuat dengan melarutkan ABTS dalam *deionized water* sehingga diperoleh konsentrasi 7,4 mM. Larutan stok potassium persulfat (Sigma-Aldrich, USA) dibuat dengan konsentrasi 2,6

mM. Untuk larutan yang akan direaksikan dibuat dengan mencampurkan larutan stok ABTS dengan larutan stok potassium persulfat dengan perbandingan 1:1 (v/v). Reaksi oksidasi dilakukan dalam kondisi gelap selama 16-18 jam. Selanjutnya larutan diencerkan dengan *deionized water* sehingga diperoleh absorbansi $1,1 \pm 0,02$ unit pada panjang gelombang 405 nm. Sebanyak 100 μ L peptida sebelum atau setelah fraksinasi dengan konsentrasi 0,1 mg protein/mL dicampurkan dengan 200 μ L radikal ABTS dalam mikroplate dan diletakkan pada suhu ruangan selama 10 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan pada λ 405 nm (Labsystems, original Multiscan Ex, Champaign, USA). Untuk standar antioksidan digunakan vitamin C p.a. pada berbagai konsentrasi. Pengujian menggunakan DPPH dilakukan berdasarkan kombinasi metode *Thaipong et al.* (2006) dan *Clarke et al.* (2013) dengan menambahkan etanol 96% pada DPPH sehingga diperoleh absorbansi $1,1 \pm 0,05$ pada $\lambda=540$ nm. Sebanyak 100 μ L hidrolisat dan fraksi peptida dengan konsentrasi 0,1 mg protein/mL ditambahkan dengan 200 μ L DPPH, dibiarkan selama 30 menit dan absorbansi campuran diukur pada λ 540 nm (Labsystems, original Multiscan Ex, Champaign, USA). Untuk standar antioksidan digunakan vitamin C p.a. pada berbagai konsentrasi. Aktivitas antioksidan pada uji ABTS dan DPPH dihitung berdasarkan persamaan:

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{A \text{ blanko} - A \text{ sample}}{A \text{ blanko}} \times 100\%$$

Keterangan:

A blanko : absorbansi hasil reaksi larutan ABTS/DPPH dan *deionized water*

A sampel : selisih absorbansi antara sampel (hasil reaksi peptida dan ABTS/DPPH) dan kontrol peptida

Uji hemolisis

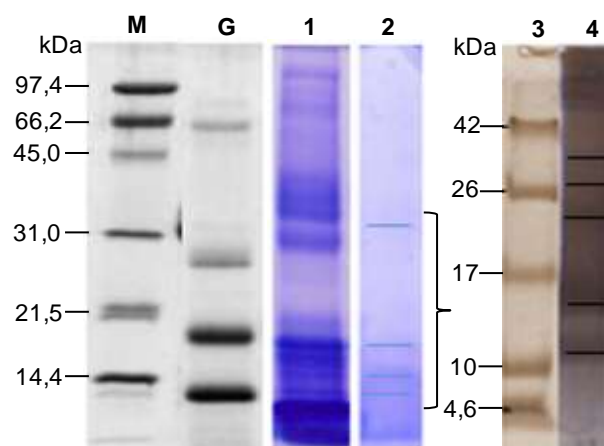
Uji hemolisis dilakukan berdasarkan metode *Lorenzon et al.* (2012) dan *Nguyen et al.* (2011). Sel darah merah ayam dicuci dengan 0,01 M Tris-HCl (pH 7,4) yang mengandung 0,15 M NaCl (Tris-salin) kemudian disentrifugasi pada 1000 \times g (Microspin 12, Biosan, EU) supernatan dibuang dan pelet dicuci lagi sebanyak 2 kali. Suspensi 0,1% sel darah merah dibuat dengan melarutkan kembali sel darah merah dengan larutan Tris-salin. Sebanyak 100 μ L peptida ditambahkan dengan 100 μ L sel darah merah 0,1%, diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C, kemudian disentrifugasi pada 2000 \times g (Microspin 12, Biosan, EU) selama 5 menit. Supernatan dipisahkan dan diambil 100 μ L, dimasukkan ke dalam mikroplate. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 540 nm (Labsystems, original Multiscan Ex, Champaign, USA). Triton X-100

(Sigma-Aldrich, USA) digunakan sebagai kontrol positif untuk lisis 100% dan Trissalin sebagai kontrol negatif. Pengujian dilakukan dengan 3 kali ulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Profil susu kambing dan peptida dengan SDS-PAGE

Hasil analisis SDS-PAGE susu kambing seperti terlihat pada Gambar 1, jalur 1. Apabila dibandingkan dengan SDS-PAGE susu kambing oleh *Munoz et al.* (2004) pita protein pada penelitian terlihat lebih banyak, kemungkinan disebabkan konsentrasi sampel dan pewarnaan yang menyebabkan pita protein pada *Munoz et al.* (2004) sangat tipis dan kurang jelas. Menurut *Munoz et al.* (2004) pita antara 20-35 kDa teridentifikasi sebagai casein dan tiga pita lainnya merupakan α -lactalbumin, β -lactoglobulin dan serum albumin (Gambar 1, jalur G).



Gambar 1. SDS-PAGE susu kambing, M: marker, G: susu kambing (*Munoz et al.*, 2004). 1. Susu kambing sebelum dihidrolisis, 2. Susu kambing setelah dihidrolisis dengan enzim bromelin selama 60 menit, konsentrasi gel 10%, pewarnaan dengan *coomassie blue*. 3. Marker, 4. Peptida hasil hidrolisis susu kambing menggunakan enzim bromelin selama 60 menit, konsentrasi gel 18%, pewarnaan dengan pewarna *silver*

Hidrolisis protein susu kambing dengan bromelin menghasilkan peptida-peptida dengan berat molekul rendah (Gambar 1). Berdasarkan kandungan proteinnya, protein susu telah terhidrolisis 90% (dari kadar protein susu kambing 50 mg/mL menjadi 5 mg/mL pada hidrolisat). Hasil tersebut menandakan bahwa hampir semua protein susu telah terhidrolisis. Peptida-peptida yang dihasilkan mempunyai berat molekul antara 12-35 kDa (Gambar 1, jalur 4).

Karakterisasi peptida dengan RP-HPLC

Karakterisasi dilakukan menggunakan RP-HPLC dengan panjang gelombang 215 nm yang spesifik untuk peptida. Kromatogram menunjukkan adanya 4 puncak peptida (Gambar 2). Berdasarkan waktu retensinya yaitu antara 1.9–2.6 menit menunjukkan peptida tersebut terdeteksi pada waktu fase gerak dalam kondisi hidrofilik, menandakan bahwa peptida-peptida tersebut bersifat hidrofilik. Permukaan sisi hidrofobik bertanggung jawab pada pembentukan dan pertahanan struktur spasial, interaksi peptida, termasuk ikatan dengan membran sel, pengenalan antar peptida atau protein dan pembentukan kompleks dengan suatu senyawa (Mundi dan Aluko, 2014). Pada peptida antimikroba, informasi tentang karakter hidrofobisitas akan memberikan pemahaman lebih jauh tentang mekanisme kerja dan berpengaruh pada bioaktivitasnya (Zhao *et al.*, 2013). Semakin besar hidrofobisitas dan muatan positif suatu peptida maka semakin besar pula kemampuan antimikrobanya (Yin *et al.*, 2012). Hidrofobisitas juga menentukan spesifisitas peptida antibakteri sehingga hanya bakteri patogen yang menjadi target sedangkan flora normal tidak terpengaruh. Menurut Huang *et al.* (2014), peptida antibakteri dapat didesain untuk meningkatkan spesifitas dan aktivitasnya melalui penggantian asam amino hidrofobik atau hidrofilik.

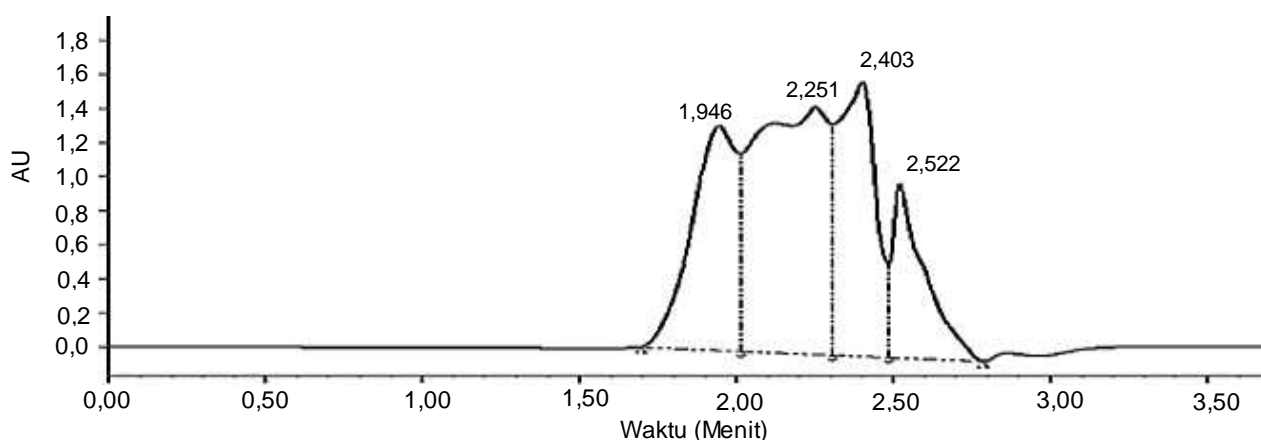
Pada penelitian ini protein dan peptida-peptida pada hidrolisat bersifat hidrofilik. Meskipun demikian, hidrolisat dan hasil fraksinasi masih menunjukkan aktivitas antimikroba. Menurut Yin *et al.* (2012) aktivitas antimikroba suatu peptida ditentukan oleh keseimbangan antara hidrofobisitas dan distribusi muatan. Hidrofobisitas yang tinggi justru dapat meningkatkan *self-association* yang dapat mengurangi kemampuan antimikrobanya. Distribusi muatan positif yang seimbang pada ujung terminal peptida dapat mengembalikan kemampuan antimikroba tersebut. Hidrolisat hasil hidrolisis protein susu kambing dengan bromelin pada

penelitian ini belum dipisahkan dan disekuensing sehingga masih sulit untuk menentukan pengaruh hidrofobisitas terhadap aktivitas antimikrobanya.

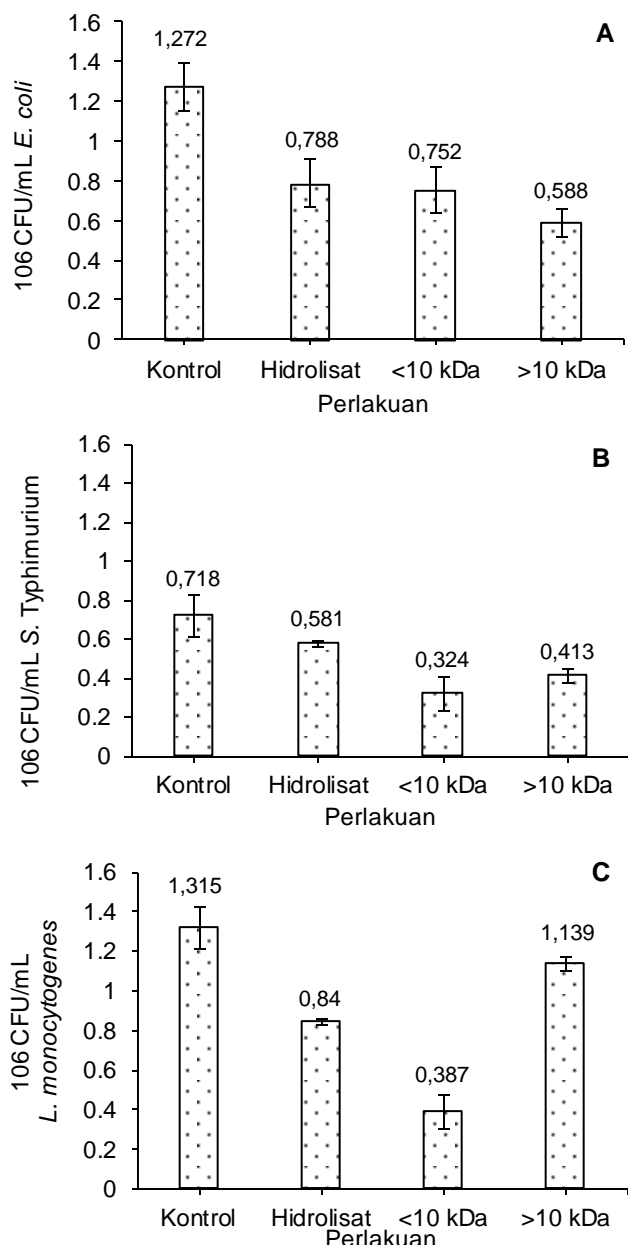
Aktivitas antibakteri

Hasil pengujian antibakteri menunjukkan bahwa peptida sebelum dan sesudah fraksinasi dapat menghambat pertumbuhan *E. coli*, *S. Typhimurium* dan *L. monocytogenes* (Gambar 3). Pada *E. coli*, fraksi >10 kDa menunjukkan penghambatan yang lebih baik dibandingkan dengan peptida sebelum fraksinasi maupun fraksi <10 kDa. Untuk *S. Typhimurium* dan *L. monocytogenes*, fraksinasi dapat meningkatkan aktivitas antibakterinya.

Hasil pengujian antibakteri juga menandakan bahwa peptida yang berukuran besar maupun kecil mempunyai aktivitas antibakteri. Aktivitas antibakteri peptida tersebut berbeda dengan hasil hidrolisis kasein susu sapi dengan protease *Lactobacillus acidophilus* DPC6026 yang menunjukkan bahwa peptida dengan ukuran >10 kDa tidak mempunyai aktivitas antibakteri (Hayes *et al.*, 2006). Perbedaan sumber protein dan spesifitas enzim menyebabkan perbedaan ukuran dan aktivitas peptida yang dihasilkan. Berdasarkan aktivitas antibakteri, penghambatan tertinggi terjadi pada *L. monocytogenes* fraksi <10 kDa. Pada *L. monocytogenes*, aktivitas hidrolisat lebih tinggi daripada fraksi >10 kDa dan aktivitas tertinggi pada fraksi <10 kDa. Berdasarkan hasil tersebut kemungkinan peptida yang aktif sebagai antimikroba banyak terkandung pada fraksi <10 kDa, sehingga ketika dipisahkan maka aktivitas fraksi >10 kDa lebih rendah dibandingkan dengan hidrolisat yang merupakan campuran fraksi <10 kDa dan >10 kDa. Menurut Lopez-Solanilla *et al.* (2003) kerentanan *L. monocytogenes* terhadap peptida antimikroba juga tergantung pada suhu. *L. monocytogenes* menjadi sangat rentan terhadap peptida antimikroba pada suhu 37°C dan menjadi resisten pada suhu 20°C.



Gambar 2. Kromatogram *Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) dari peptida hasil hidrolisis susu kambing dengan enzim bromelin selama 60 menit pada $\lambda=215$ nm



Gambar 3. Hasil uji antibakteri terhadap peptida hasil hidrolisis susu kambing sebelum fraksinasi (hidrolisat) dan setelah fraksinasi menggunakan membran *cut off* 10 kDa. Pengujian dilakukan terhadap *E. coli* (A), *S. Typhimurium* (B) dan *L. monocytogenes* (C)

Pada penelitian ini inkubasi dilakukan pada suhu 37°C yang mungkin membuat aktivitas peptida hasil hidrolisis susu kambing dengan bromelin fraksi <10 kDa terhadap *L. monocytogenes* lebih tinggi dibandingkan aktivitasnya terhadap *E. coli* dan *S. Typhimurium*. *L. monocytogenes* merupakan bakteri psikrofilik yang mampu tumbuh dan berkembang biak pada suhu rendah (Saha *et al.*, 2015). *L. monocytogenes* mengembangkan resistensi terhadap

peptida antimikroba pada suhu yang lebih rendah dengan mengubah komposisi membran sitoplasma dan meningkatkan ketebalan dinding sel (Mendoza *et al.*, 1999). Lebih lanjut, Dare *et al.* (2014) menyatakan bahwa proporsi lipida seperti lisilcardiolipin dan lisilfosfatidilgliserol berubah dengan turunnya suhu lingkungan dan meningkatkan kemampuan bertahan *L. monocytogenes* dari peptida antimikroba.

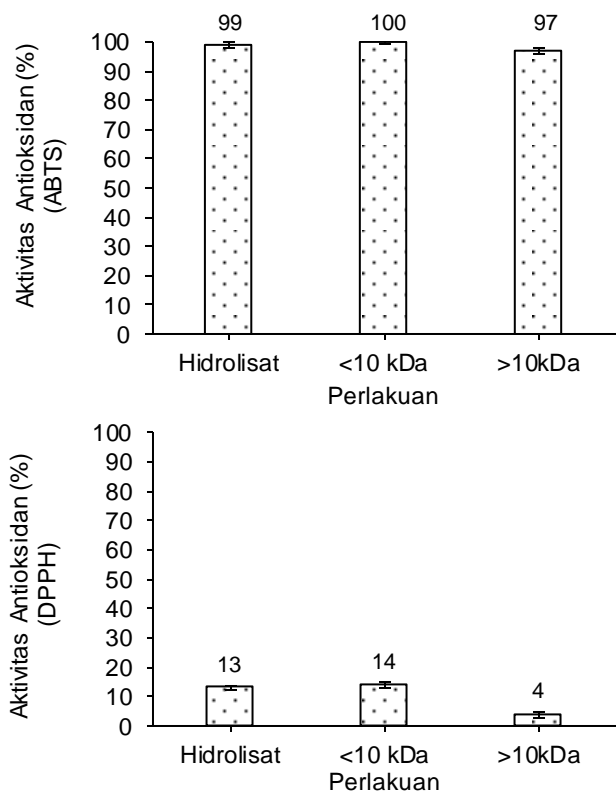
Pada Gambar 3. terlihat bahwa fraksi >10 kDa efektif pada *S. aureus*, sedangkan fraksi <10 kDa lebih efektif pada *S. Typhimurium* dan *L. monocytogenes*. Dari hasil tersebut terlihat bahwa fraksi peptida tertentu spesifik terhadap bakteri tertentu pula. Menurut Mondhe *et al.* (2014) peptida antibakteri secara alamiah atau hasil modifikasi bersifat spesifik spesies, yaitu peptida tersebut hanya efektif terhadap bakteri tertentu sehingga peptida dapat membunuh bakteri patogen tanpa harus mematikan flora normal. Peptida antibakteri berinteraksi dengan membran sel bakteri melalui interaksi muatan positif peptida dengan muatan negatif pada permukaan sel bakteri. Mekanisme selanjutnya tergantung pada tipe peptida. Secara umum dapat dipisahkan peptida yang bekerja dengan mempengaruhi permeabilitas membran dan peptida yang bekerja di dalam sitoplasma. Peptida yang bekerja dengan mempengaruhi permeabilitas membran dapat terjadi dengan cara membuat pori atau dengan cara melarutkannya (bekerja seperti halnya deterjen) (Mihajlovic dan Lazaridis, 2010). Mekanisme lain adalah peptida antibakteri masuk ke dalam sitoplasma dan menghambat fungsi intraseluler seperti menghambat sintesis DNA, RNA dan reaksi enzimatik tanpa mengganggu stabilitas membran (Jenssen *et al.*, 2006).

Aktivitas antioksidan

Aktivitas antioksidan peptida sebelum dan sesudah fraksinasi diuji dengan mengukur kemampuannya untuk menetralkan radikal ABTS dan DPPH. Warna pada radikal ABTS dan DPPH akan berkurang dengan kehadiran antioksidan yang mendonorkan ion hidrogen atau yang dapat memecah rantai senyawa radikal (Correa *et al.*, 2011). Hasil pengujian antioksidan seperti terlihat pada Gambar 4. Pada pengujian dengan ABTS, aktivitas antioksidan sebelum fraksinasi dan fraksi <10 kDa hampir sama yaitu 99% dan 100%. Untuk fraksi >10 kDa lebih rendah yaitu 97%. Jadi fraksi yang paling aktif adalah fraksi peptida <10 kDa.

Pada pengujian antioksidan dengan DPPH menunjukkan bahwa fraksi <10 kDa mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih tinggi daripada sebelum fraksinasi dan fraksi >10 kDa. Apabila dibandingkan dengan hasil hidrolisis kacang merah menunjukkan bahwa peptida hasil hidrolisis susu kambing dengan enzim bromelin <10 kDa mem-

punyai aktivitas antioksidan terhadap radikal DPPH yang lebih tinggi. Pada peptida dari kacang merah dengan konsentrasi 1 mg protein/mL mempunyai aktivitas antioksidan 15% (Mundi dan Aluko, 2014), sedangkan aktivitas peptida dari susu kambing fraksi <10 kDa 14% pada konsentrasi 0,1 mg protein/mL.



Gambar 4. Aktivitas antioksidan peptida terhadap radikal ABTS dan DPPH sebelum fraksinasi (hidrolisat) dan sesudah fraksinasi menggunakan membran *cut off* 10 kDa

Pada pengujian ABTS maupun DPPH, fraksi >10 kDa mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih kecil daripada peptida sebelum fraksinasi maupun fraksi <10 kDa, sedangkan aktivitas antioksidan tertinggi pada fraksi <10 kDa. Berdasarkan hasil tersebut kemungkinan peptida yang aktif lebih banyak pada fraksi <10 kDa. Fraksinasi akan menurunkan rasio peptida aktif pada fraksi >10 kDa sehingga aktivitasnya menjadi lebih rendah sedangkan untuk fraksi <10 kDa fraksinasi justru lebih mengkonsentrasikan peptida bioaktifnya. Ultrafiltrasi menggunakan membran *molecular weight cut off* (MWCO) memungkinkan untuk memekatkan peptida dengan berat molekul tertentu dengan menghilangkan konsentrasi garam dan kontaminan (Vandanjon *et al.*, 2007), sehingga aktivitasnya meningkat. Menurut Picot *et al.* (2010), fraksinasi peptida menggunakan membran MWCO merupakan

cara yang efektif untuk memekatkan peptida antioksidan, tetapi dalam prosesnya masih memerlukan optimasi. Selektivitas membran yang digunakan bukan hanya memisahkan peptida berdasarkan ukuran tetapi juga berdasarkan gugus aromatik (Picot *et al.*, 2010) dan muatan (Doyen *et al.*, 2011) yang berpengaruh pada bioaktivitasnya. Menurut Udenigwe dan Aluko (2011) asam amino yang mengandung sulfur, asam dan hidrofobik mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat terhadap radikal DPPH dan H_2O_2 . Berlett dan Levine (2014) menambahkan bahwa asam amino metionin, sistein dan aromatik seperti tirosin, histidin, fenilalanin dan triptofan menunjukkan aktivitas antioksidan jauh lebih tinggi dibandingkan asam amino yang lain. Untuk aktivitas antioksidan terhadap radikal superoksida hanya lisin dan leusin yang menunjukkan aktivitas tinggi. Sebaliknya, asam amino bermuatan positif dalam hidrolisat justru menurunkan aktivitas antioksidan pada uji *Fe reducing power*, DPPH dan H_2O_2 (Udenigwe dan Aluko, 2011). Keberadaan asam amino yang bertanggungjawab terhadap antioksidan terutama fenilalanin dan histidin pada susu kambing cukup tinggi (Sabahelkheir *et al.*, 2012) menandakan kemungkinan keberadaan peptida yang bersifat antioksidan juga cukup tinggi.

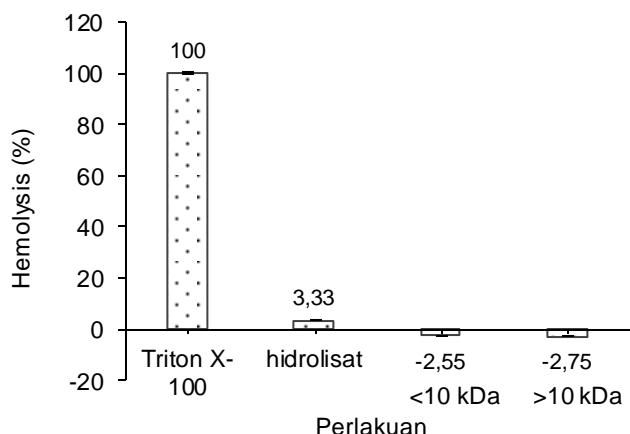
Aktivitas antioksidan pada pengujian dengan ABTS menghasilkan nilai yang lebih besar dibandingkan dengan hasil uji DPPH. Radikal DPPH lebih stabil dibandingkan dengan radikal ABTS yang menyebabkan DPPH lebih sulit dinetralisasi. Selain itu beberapa antioksidan bereaksi lebih cepat ketika diuji menggunakan metode lain dan bereaksi lebih lambat pada DPPH serta menghasilkan kisaran reaksi yang lebih kecil (Prior *et al.*, 2005). DPPH larut dalam pelarut organik yang lebih sesuai untuk senyawa lipofilik atau senyawa yang mempunyai kandungan lipid tinggi, sedangkan ABTS kompatibel dengan senyawa hidrofilik maupun hidrofobik (Damgaard *et al.*, 2014). Karakterisasi hidrolisat menggunakan HPLC menunjukkan bahwa hidrolisat didominasi oleh peptida hidrofilik sehingga memberikan hasil uji DPPH yang lebih kecil daripada hasil uji ABTS. Berdasarkan hasil tersebut pengujian antioksidan menggunakan DPPH kurang sesuai untuk digunakan pada hidrolisat bromelin susu kambing.

Hidrofobisitas menjadi faktor penting yang berperan dalam aktivitas antioksidan suatu peptida (Mundi dan Aluko, 2014). Seperti telah dilaporkan oleh Pownall *et al.* (2010) aktivitas antioksidan lebih berhubungan dengan kandungan total asam amino hidrofobik daripada ukuran peptida. Pendapat yang sama dilaporkan oleh Ajibola *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa aktivitas yang tinggi pada fraksi peptida <1 kDa dari biji bengkuang disebabkan oleh jumlah total asam amino hidrofobik dan aromatik. Pada penelitian ini peptida yang terkandung pada hidrolisat bersifat hidrofilik. Selain hidrofobisitas,

muatan dan komposisi asam amino aromatik juga menjadi penentu aktivitas antioksidan (Udenigwe dan Aluko, 2011). Meskipun peptida dalam hidrolisat bersifat hidrofilik, kandungan asam amino aromatik pada susu kambing cukup tinggi yaitu (dalam mg asam amino/g total asam amino) tirosin (38,2), histidine (31,1), dan fenilalanin (62) (Sabahelkheir *et al.*, 2012). Keberadaan asam amino dengan aktivitas antioksidan tinggi seperti metionin (5,5), sistein (20,5), lisin (26,3) dan leusin (146,2) (Sabahelkheir *et al.*, 2012) juga ikut berperan dalam peningkatan aktivitas antioksidan peptida dalam hidrolisat.

Aktivitas hemolisis

Uji hemolisis biasa dilakukan untuk mengetahui toksisitas peptida antimikroba karena sensitivitasnya untuk mengevaluasi kerusakan membran sel eukariot (sel inang) (Lorenzon *et al.*, 2012). Seperti terlihat pada Gambar 5, peptida hasil hidrolisis protein susu kambing sebelum fraksinasi hanya sedikit menimbulkan hemolisis. Peptida setelah fraksinasi bahkan bernilai negatif yang menandakan bahwa nilai hemolisis lebih kecil daripada kontrol sel darah merah. Kontrol sel darah merah seperti diketahui juga mengandung enzim tertentu yang menyebabkan autolisis sel darah merah. Nilai negatif menandakan bahwa keberadaan peptida dapat membantu mengurangi autolisis pada sel darah merah. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa peptida hasil hidrolisis protein susu kambing dengan bromelin aman untuk diaplikasikan.



Gambar 5. Hasil uji hemolisis terhadap peptida sebelum fraksinasi (hidrolisat) dan sesudah fraksinasi dengan membran *cut off* 10 kDa. Nilai hemolisis negatif disebabkan oleh pengurangan terhadap kontrol negatif sel darah merah yang mempresentasikan hemolisis 0%. Triton X-100 sebagai kontrol positif hemolisis 100%

KESIMPULAN

Peptida hasil hidrolisis susu kambing dengan enzim bromelin dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*, *S. Typhimurium* dan *L. monocytogenes*. Peptida tersebut juga dapat berfungsi sebagai antioksidan yang ditandai dengan kemampuan untuk menetralsasi radikal ABTS dan DPPH. Fraksinasi menggunakan membran *cut off* 10 kDa dapat meningkatkan aktivitas antimikroba maupun antioksidan. Hasil uji hemolisis menunjukkan bahwa peptida tersebut tidak menyebabkan hemolisis bahkan dapat mengurangi autolisis pada sel darah merah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini terlaksana atas biaya penelitian Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian APBN 2013 No 18023D dan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, BOPTN 2013 No 2013.089.521219.

DAFTAR PUSTAKA

- Almaas H, Eriksen E, Sekse C, Comi I, Flengsrud R, Holm H, Jensen E, Jacobsen M, Langsrud T, Vegarud GE. 2011. Antibacterial peptides derived from caprine whey proteins, by digestion with human gastrointestinal juice. *Brit J Nutr* 106: 896-905. DOI: 10.1017/S0007114511001085.
- Anderson BL, Berry RW, Telser A. 1983. A sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis system that separates peptides and proteins in the molecular weight range of 2500 to 90,000. *Anal Biochem* 132: 365-375. DOI: 10.1016/0003-2697(83)90022-2.
- Ajibola CF, Fashakin JB, Fagbemi TN, Aluko RE. 2011. Effect of peptida size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. *Int J Mol Sci* 12: 6685-6702. DOI: 10.3390/ijms12106685.
- Arshad ZIM, Amid A, Yusof F, Jaswir I, Ahmad K, Loke SP. 2014. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 7283-7297. DOI: 10.1007/s00253-014-5889-y.
- Bartholomew DP, Paull RE, Rohrbach KG. 2003. *The Pineapple: Botany, Production and Uses*. 1-301. 1st Ed. Wallingford-UK: CABI Publishing.

- Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grassel M. 1983. Methods of Enzymatic Analysis. 2nd Ed. 118-126. Weinheim: Verlag Chemie, USA.
- Berlett BS, Levine RL. 2014. Designing antioxidant peptides. Redox Rep 19: 80-86. DOI: 10.1179/1351000213Y.0000000078.
- Clarke G, Ting KN, Wiart C, Fry J. 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 reforestation. Antioxidants 2: 1-10. DOI: 10.3390/antiox2010001.
- Correa AP, Daroit DJ, Coelho J, Meira SM, Lopes FC, Segalin J, Risso PH, Brandelli A. 2011. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine caseinate hydrolyzed with microbial protease. J Sci Food Agr 91: 2247-2254. DOI: 10.1002/jsfa.4446.
- Damgaard TD, Otte JAH, Meinert L, Jensen K, Lametsch R. 2014. Antioxidant capacity of hydrolyzed porcine tissues. Food Sci Nutr 2: 282-288. DOI: 10.1002/fsn3.106.
- Doyen A, Beaulieu L, Saucier L, Pouliot Y, Bazinet L. 2011. Impact of ultrafiltration membrane material on peptida separation from a snow crab byproduct hydrolysate by electro dialysis with ultrafiltration membranes. J Agric Food Chem 59: 1784-1792. DOI: 10.1021/jf103739m.
- Dare K, Shepherd J, Roy H, Seveu S, Ibba M. 2014. LysPGS formation in *Listeria monocytogenes* has broad roles in maintaining membrane integrity beyond antimicrobial peptide resistance. Virulence 5: 534-546. DOI: 10.4161/viru.28359.
- Driver JL, Raynie DE. 2007. Method Development for Biomolecules in HPLC Method Development for Pharmaceutical. 430-435. Ahuja SA, Rasmussen (Eds) Elsevier Inc. Italy.
- Godfrey T, Reichel J. 1983. Industrial Enzymology. Macmillan Publishers Ltd., 1-4 Surrey, UK.
- Hayes M, Ross RP, Fitzgerald FG, Hill C, Stanton C. 2006. Casein-derived antibacterial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. Appl Env Microb 72: 2260-2264. DOI: 10.1128/AEM.72.3.2260-2264.2006.
- Huang Y, He L, Li G, Zhai N, Jiang H, Chen Y. 2014. Role of helicity of α -helical antimicrobial peptides to improve specificity. Protein Cell 5: 631-642. DOI: 10.1007/s13238-014-0061-0.
- Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. 2006. Peptide antimicrobial agent. Clin Microbiol Rev 19: 91-111. DOI: 10.1128/CMR.00056-05.
- Kumar S, Chouhan S, Sanghi A, Teotia UVS. 2013. Antioxidative effect of yak milk caseinate hydrolyzed with three different proteases. Vet World 6: 799-802. DOI: 10.14202/vetworld. 2013.799-802.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685. DOI: 10.1038/227680a0.
- Li Z, Jiang A, Yue T, Wang Y, Su J. 2013. Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. J Dairy Sci 96: 4242-4251. DOI: 10.3168/jds.2012-6511.
- Li Y, Yu J, Goktepe I, Ahmedna M. 2016. The potential of papain and alcalase enzyme and process optimizations to reduce allergenic gliadins in wheat flour. Food Chem 196: 13388-1345. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.10.089.
- Lopez-Solanilla E, Gonzalez-Zorn B, Novella S, Vazquez-Boland JA, Rodriguez-Palenzuela P. 2003. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* to antimicrobial peptides. FEMS Microbiol Letter 226: 101-105.
- Lopez-Exposito I, Quiros A, Amigo L, Recio I. 2007. Casein hydrolysate as a source of anti-microbial, antioxidant and antihypertensive peptides. Le Lait 87: 241-249. DOI: 10.1051/lait:2007019.
- Lorenzon EN, Cespedes GF, Vicente EF, Nogueira LG, Bauab TM, Castro MS, Cilli EM. 2012. Effect of dimerization on the structure and biological activity of antibacterial peptide Ctx-Ha. Antimicrob Agents Ch 56: 3004-3010. DOI: 10.1128/AAC.06262-11.
- Maurer HR. 2001. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. Cell Mol Life Sci 58: 1234-1245.
- McCann KB, Shiell BJ, Michalski WP, Lee A, Wan J, Roginski H, Coventry MJ. 2006. Isolation and characterisation of antibacterial peptides derived from the f (164-207) region of bovine α_{S2} -casein. Int Dairy J 16: 316-323. DOI: 10.1016/j.idairyj.2005.05.005.
- Mendoza F, Maqueda M, Galvez A, Martinez-Bueno M, Valdivia E. 1999. Antilisterial activity of peptide AS-48 and study of changes induced in the cell envelope properties of an AS-48 adapted strain of *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol 65: 618-625.
- Mihajlovic M, Lazaridis T. 2010. Antimicrobial peptides in toroidal and cylindrical pores. Biochim Biophys Acta 1798: 1485-1493. DOI: 10.1016/j.bbammem.2010.02.023.
- Mondhe M, Chessher A, Goh S, Good I, Stach JEM. 2014. Species-selective killing of bacteria by

- antimicrobial peptida-PNAs. PLoS ONE 9: e89082. DOI: 10.1371/journal.pone.0089082.
- Moslehisad M, Ehsani MR, Salami M, Mirdamadi S, Ezzatpanah, Naslaji AN, Moosavi-Movahedi AK. 2013. The comparative assessment of ACE-inhibitory and antioxidant of peptida fraction obtained from fermented camel and bovine milk by *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637. Int Dairy J 29: 82-87. DOI: 10.1016/j.idairyj.2012.10.015.
- Mundi S, Aluko RE. 2014. Inhibitory properties of kidney bean protein hydrolysate and its membrane fraction against renin, angiotensin converting enzyme, and free radicals. Austin J Nutr Food Sci 2: 1008.
- Munoz MT, Caballer DB, Lizana MF, G Mendiola R, Montano PP, Cano MS. 2004. Selective allergy to sheep's and goat's milk proteins. Allergol Immunopat 32: 39-42. DOI: 10.1016/S0301-0546(04)79222-8.
- Muro C, Riera F, Fernandez A. 2013. Advance in the fractionation of milk biopeptides by means of membrane processes. Intech 241-266. DOI: 10.5772/53674.
- Nandhini B, Angayarkanni J, Palaniswamy M. 2012. Angiotensin converting enzyme inhibitor activity and antioxidant properties of goat milk hydrolysates. Int J Pharm Pharm Sci 4: 367-370.
- Nguyen LT, de Boer L, Zaat SAJ, Vogel HJ. 2011. Investigating the cationic side chains of the antimicrobial peptide tritrypticin: hydrogen bonding properties govern its membrane-disruptive activities. BBA-Biomembranes 1808: 2297-2303. DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.05.015.
- Picot L, Ravallec R, Fouchereau-Peron M, Vandanjon L, Jaouen P, Chaplain-Derouiniot M, Guerard F, Chabeaud A, LeGal Y, Alvarez OM, Berge J, Batista I, Pires C, Thorkelsson G, Delannoy C, Jakobsen G, Johansson I, Bourseau P. 2010. Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. J Sci Food Agr 90: 1819-1826. DOI: 10.1002/jsfa.4020.
- Pownall TL, Udenigwe CC, Aluko RE. 2010. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. J Agr Food Chem 58: 4712-4718. DOI: 10.1021/jf904456r.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agr Food Chem 53: 4290-4302. DOI: 10.1021/jf0502698.
- Rowan AD, Buttle DJ, Barrett AJ. 1990. The cysteine proteinases of the pineapple plant. Biochem J 266: 869-875.
- Sabahelkheir MK, Fat en MM, Hassan AA. 2012. Amino acid composition of human and animal's milk (camel, cow, sheep and goat). ARPN J Sci Technol 2: 32-34.
- Saha M, Debnath C, Pramanik AK. 2015. *Listeria monocytogenes*: An emerging food borne pathogen. Int J Curr Microbiol App Sci 4: 52-72.
- Salampessy J, Phillips M, Seneweera S, Kailasapathy K. 2010. Release of antimicrobial peptides through bromelain hydrolysis of leather-jacket (*Meuschenia* sp.) insoluble proteins. Food Chem 120: 556-560. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.10.054.
- Szwajkowska M, Wolanciuk A, Barlowska J, Krol J, Zygmunt L. 2011. Bovine milk proteins as the source of bioactive peptidas influencing the consumers immune system. Anim Sci Pap Rep 29: 269-280.
- Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Byrne DH. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimation antioxidant activity from guava fruit extracts. J Food Compos Anal 19: 669-676. DOI: 10.1016/j.jfca.2006.01.003.
- Uckert S, Stief CG, Lietz B, Burmester M, Jonas U, Machtens SA. 2002. Possible role of bioactive peptides in the regulation of human detrusor smooth muscle-functional effects in vitro and immunohistochemical presence. World J Urol 20: 244-249.
- Udenigwe CC, Aluko RE. 2011. Chemometric analysis of the amino acid requirement of antioxidant food protein hydrolysates. Int J Mol Sci 12: 3148-3161. DOI: 10.3390/ijms12053148.
- Vandanjon L, Johannsson R, Derouiniot M, Bourseae, Jaouen P. 2007. Concentration and purification of blue whiting peptida hydrolysate by membrane processes. J Food Eng 83: 581-589. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2007.03.040.
- Yin LM, Edward MA, Li J, Yip CM, Deber CM. 2012. Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptides-membrane interaction. J Biol Chem 287: 7738-7745. DOI: 10.1074/jbc.M111.303602.
- Zhao LJ, Huang YB, Gao S, Cui Y, He D, Wang L, Chen YX. 2013. Comparison on effect of hydrophobicity on the antibacterial and antifungal activities of α -helical antimicrobial peptides. Sci China Chem 56: 1307-1314. DOI: 10.1007/s11426-013-4884-y.