

**ANALISIS KIMIA DAN IDENTIFIKASI PEPTIDA BIOAKTIF  
KEFIR SUSU KAMBING ETAWA SERTA UJI BIOAKTIVITASNYA**

Tesis

Oleh

**SIWI MEUTIA SADEWI**



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2023**

## ABSTRACT

### CHEMICAL ANALYSIS AND IDENTIFICATION OF BIOACTIVE PEPTIDES ETAWA GOAT'S MILK KEFIR AND BIOACTIVITY TEST

By

**Siwi Meutia Sadewi**

Kefir is a probiotic drink that is good for health, such as overcoming lactose intolerance, antioxidants and antibacterials. Kefir can be made from cow's milk, goat's milk or soy milk. This study aims to determine the chemical composition and bioactive peptides in whey and curd kefir in Etawa goat milk and their bioactivity as antioxidants and antibacterials. The methods used in this study include fermentation of Etawa goat milk with 10 % kefir seeds; analysis of chemical composition of protein, fat, total lactic acid, and alcohol; organoleptic test; bioactivity test (antibacterial and antioxidant); and identification of peptides including determination of peptide molecular weight and analysis of amino acid composition. The results showed that protein, fat, total lactic acid, and alcohol were relatively better in kefir curd, namely 7.08 %; 1.46 %; 0.93 %; and 0.45 %. The addition of 40 % (v/v) honey had a significant effect ( $p < 0.05$ ) on increasing the value of taste, aroma, texture and color in the organoleptic test of whey and curd kefir in Etawa goat milk. Antibacterial activity on kefir curd was in the strong category against *Bacillus cereus* bacteria with a clear zone diameter of 7 mm and medium category against *Escherichia coli* with a clear zone diameter of 6 mm. Antioxidant activity belongs to a very strong antioxidant group in curd with the addition of honey having an  $IC_{50}$  of 40.03 ppm. The kefir peptide weight in whey and kefir curd has three main bands, namely 10 kDa, 15 kDa, and 33 kDa. Meanwhile, curd kefir has one other band with a weight of 24 kDa which has a fairly high intensity. The results of the analysis of the amino acid composition of UPLC and LCMS showed that the 5 highest amino acids were glutamic acid, proline, leucine, serine, and lysine which had an effect on antioxidant activity.

**Keywords:** *whey* and *curd*, kefir, Etawa goat milk, peptides, antibacterial and antioxidants

## ABSTRAK

### ANALISIS KIMIA DAN IDENTIFIKASI PEPTIDA BIOAKTIF KEFIR SUSU KAMBING ETAWA SERTA UJI BIOAKTIVITASNYA

Oleh

**Siwi Meutia Sadewi**

Kefir merupakan salah satu minuman probiotik yang baik untuk kesehatan, seperti mengatasi intoleransi laktosa, antioksidan, dan antibakteri. Kefir dapat dibuat dari susu sapi, susu kambing, ataupun susu kedelai. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui komposisi kimia dan peptida bioaktif pada *whey* dan *curd* kefir susu kambing Etawa serta bioaktivitasnya sebagai antioksidan dan antibakteri. Metode yang digunakan pada penelitian ini meliputi fermentasi susu kambing Etawa dengan bibit kefir 10 %; analisis komposisi kimia protein, lemak, total asam laktat, dan alkohol; uji organoleptik; uji bioaktivitas (antibakteri dan antioksidan); dan identifikasi peptida meliputi penentuan berat molekul peptida dan analisis komposisi asam amino. Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein, lemak, total asam laktat, dan alkohol relatif lebih baik pada *curd* kefir yaitu 7,08 %; 1,46 %; 0,93 %; dan 0,45 %. Penambahan madu 40 % (v/v) memberi pengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap peningkatan nilai rasa, aroma, tekstur dan warna pada uji organoleptik *whey* dan *curd* kefir susu kambing Etawa. Aktivitas antibakteri pada *curd* kefir termasuk kategori kuat terhadap bakteri *Bacillus cereus* dengan diameter zona bening 7 mm dan kategori sedang terhadap *Escherichia coli* dengan diameter zona bening 6 mm. Aktivitas antioksidan termasuk golongan antioksidan sangat kuat pada *curd* dengan penambahan madu memiliki  $IC_{50}$  40,03 ppm. Berat peptida kefir pada *whey* dan *curd* kefir memiliki tiga pita utama yaitu 10 kDa, 15 kDa, dan 33 kDa. Sedangkan *curd* kefir terdapat satu pita lain dengan berat 24 kDa yang memiliki intensitas cukup tinggi. Hasil analisis komposisi asam amino UPLC dan LCMS terdapat 5 asam amino tertinggi yaitu asam glutamat, prolin, leusin, serin, dan lisin yang memberikan pengaruh terhadap aktivitas antioksidan.

**Kata kunci:** *whey* dan *curd*, kefir, susu kambing Etawa, peptida, antibakteri dan antioksidan

**ANALISIS KIMIA DAN IDENTIFIKASI PEPTIDA BIOAKTIF  
KEFIR SUSU KAMBING ETAWA SERTA  
UJI BIOAKTIVITASNYA**

Oleh

*Siwi Meutia Sadewi*

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar  
MAGISTER SAINS

Pada

Program Pascasarjana Magister Kimia  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2023**

Judul Tesis : **ANALISIS KIMIA DAN IDENTIFIKASI  
PEPTIDA BIOAKTIF KEFIR SUSU KAMBING  
ETAWA SERTA UJI BIOAKTIVITASNYA**

Nama : **SIWI MEUTIA SADEWI**


Nomor Pokok Mahasiswa : 2127011013

Program Studi : Magister Kimia


Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



  
**Dr. Nurhasanah, M.Si.**  
NIP 19741211 199802 2 001

  
**Dr. Sudiby, S.T., M.Sc.**  
NIP 19820327 201502 1 002

2. Ketua Program Studi Magister Kimia  
FMIPA Universitas Lampung

  
**Dr. Nurhasanah, M.Si.**  
NIP 19741211 199802 2 001

**MENGESAHKAN**

1. Tim Penguji

Ketua : **Dr. Nurhasanah, M.Si.**



Sekretaris : **Dr. Sudibyo, S.T., M.Sc.**



Penguji Bukan Pembimbing

Anggota : **Dr. Neneng Windayani, M.Pd.**



Anggota : **Dr. Agung Abadi Kiswandono, M.Sc.**

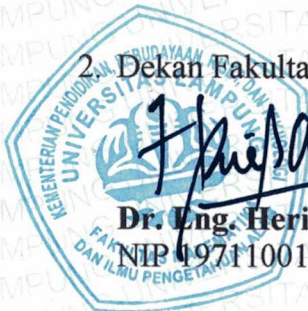


Anggota : **Dr. Eng. Heri Satria, M.Si.**



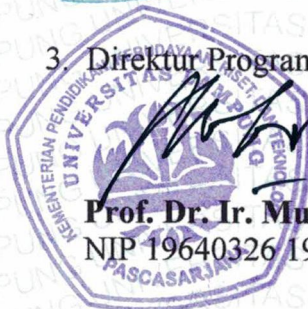
2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

**Dr. Eng. Heri Satria, M.Si.**  
NIP 19711001 200501 1 002



3. Direktur Program Pascasarjana

**Prof. Dr. Ir. Muhadi, M.Si.**  
NIP 19640326 198902 1 001



Tanggal Lulus Ujian Tesis: **28 Juli 2023**

## SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Siwi Meutia Sadewi  
Nomor Pokok Mahasiswa : 2127011013  
Program Studi : Magister Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa tesis saya yang berjudul “Analisis Kimia dan Identifikasi Peptida Bioaktif Kefir Susu Kambing Etawa Serta Uji Bioaktivitasnya” adalah benar karya saya sendiri dan saya tidak melakukan penjiplakan (*plagiarism*) atas karya penulis lain dengan cara yang tidak sesuai dengan tata etika ilmiah yang berlaku. Hak intelektual karya ilmiah ini saya serahkan kepada Universitas Lampung dan saya tidak keberatan jika data tesis ini dikemudian hari dipergunakan oleh pihak dosen atau Prodi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya dicantumkan.

Atas pernyataan ini, apabila dikemudian hari ditemukan adanya ketidakbenaran maka saya bersedia menerima sanksi sesuai hukum yang berlaku.

Bandar Lampung, 31 Juli 2023



buat Pernyataan,

  
Siwi Meutia Sadewi  
NPM. 2127011013

## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Bandar Lampung, 14 Februari 1997, sebagai anak pertama dari empat bersaudara yang merupakan putri dari pasangan Bapak Muhrodi S.Pd. dan Ibu Sriyati (Almh)/Ibu Evi Chandra Tika. Penulis mengawali jenjang pendidikan di TK Al- Azhar 6 Jatimulyo diselesaikan pada tahun 2002. Kemudian menyelesaikan pendidikan di SD Negeri 2 Jatimulyo pada tahun 2008. Penulis melanjutkan sekolah di Madrasah Tsanawiyah (MTs) dan Madrasah Aliyah (MA) di Pondok Pesantren Islam Al-Muhsin Metro hingga tahun 2014. Pada tahun 2014-2015 penulis melaksanakan tugas Wiyata Bhakti di Pondok Pesantren Al-Mujtama' Jati Agung. Pada tahun 2015 penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung melalui jalur SBMPTN (Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri). Penulis melanjutkan Pendidikan Pascasarjana Kimia pada tahun 2021 melalui seleksi beasiswa *Research and Teaching Assistant* Universitas Lampung. Pada tahun 2022 penulis menjadi presenter dalam acara Seminar Nasional Ilmu Lingkungan (SnaIL) ke-3 dan Seminar International Conference on Sustainable Industrial Agriculture. Pada tahun yang sama penulis juga mengikuti kegiatan pengabdian masyarakat sebagai narasumber dalam acara Pemberdayaan Ibu Balita dan Kader Posyandu Dalam Pembuatan Susu Kefir Untuk Pencegahan Stunting di Desa Cipadang, Pesawaran. Penulis juga pernah menjadi asisten praktikum biokimia untuk jurusan kimia dan biologi pada tahun 2022. Pada tahun 2023 penulis menjadi presenter dalam acara The 4<sup>th</sup> International Conference Food Security and Sustainable Agriculture In The Tropics.



## SANWACANA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas limpahan rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis yang berjudul “**Analisis Kimia Dan Identifikasi Peptida Bioaktif Kefir Susu Kambing Etawa Serta Uji Bioaktivitasnya**”. Tesis ini adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Penulis menyadari bahwa tesis ini tidak mungkin terselesaikan tanpa adanya bimbingan, dorongan, nasihat, serta bantuan dari berbagai pihak, sehingga penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Dr. Nurhasanah, M.Si. selaku Ketua Program Studi Magister Kimia dan Pembimbing I penelitian atas segala bimbingan, dukungan, dan motivasi serta saran yang selalu diberikan kepada penulis sehingga penulis dapat menjalani dan menyelesaikan tesis ini dengan lancar.
2. Dr. Sudiby, S.T.,M.Sc. selaku Pembimbing II penelitian atas bimbingan dan arahnya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dengan baik.
3. Dr.Neneng Windayani, M.Pd., Dr. Agung Abadi Kiswandono, M.Si., dan Dr. Eng. Heri Satria, M.Sc. selaku pembahas pada penelitian yang telah memberikan kritik dan sarannya kepada penulis sehingga tesis ini dapat terselesaikan dengan baik.
4. Seluruh dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah memberikan banyak ilmu pengetahuan dan motivasi sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

5. Bapak Subandi, S.Pd. selaku laboran Laboratorium THP Politeknik Negeri Lampung dan Ibu Oni Mastuti, S.Si. selaku laboran Laboratorium Mikrobiologi Universitas Lampung yang telah banyak membantu dalam menyediakan alat dan bahan untuk penelitian penulis
6. Ayah dan Bunda selaku kedua orang tua atas kasih sayang yang telah diberikan selama ini serta segala doa, dukungan, nasihat, dan motivasinya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
7. Sahabatku Mentari, terimakasih atas persaudaraan, kebersamaan, serta kehangatan dalam suka dan duka yang telah dilewati bersama penulis, semoga persahabatan ini terus terjalin hingga surga kelak.
8. Pejuang nilai biokimia, kak Hanisa terima kasih sudah menemani masa-masa perkuliahan penulis.
9. Teman-teman S2 Kimia angkatan 2021 terimakasih atas kebersamaan dan keceriaan yang mewarnai kehidupan kampus.
10. Semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu yang telah mendukung dan memotivasi penulis untuk menyelesaikan tesis ini dan menyelesaikan studi sebagai mahasiswi S2 Kimia.

Semoga Allah *subhanahu wa taala* membalas kebaikan yang telah diberikan kepada penulis. Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan, akan tetapi penulis berharap agar tesis ini dapat berguna dan bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan. Aamiin.

Bandar Lampung, 28 Juli 2023

Penulis,

**Siwi Meutia Sadewi**

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>DAFTAR ISI</b> .....	i
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	iv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	v
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	5
1.3. Manfaat Penelitian.....	5
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
2.1. Kefir.....	7
2.2. Susu Kambing.....	7
2.3. Madu.....	8
2.4. Manfaat Kefir.....	9
2.5. Peptida Bioaktif.....	10
2.6. Antioksidan.....	11
2.7. Antibakteri.....	12
2.8. Prinsip Pengujian .....	13
2.8.1. Metode 2,2- <i>diphenyl-1-picrylhydrazyl</i> (DPPH).....	13
2.8.2. <i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> .....	14
2.8.3. <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> (UPLC).....	15
2.8.4. <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i> (LCMS).....	15

<b>III. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>17</b>
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	17
3.2. Alat dan Bahan.....	17
3.3. Prosedur Penelitian .....	18
3.3.1. Sterilisasi Alat.....	18
3.2.2. Pembuatan Kefir Susu Kambing Etawa .....	18
3.3.3. Pembuatan Media dan Larutan Stok.....	19
3.3.3.1. Pembuatan Media <i>Nutrient Agar</i> .....	19
3.3.3.2. Pembuatan Larutan NaOH 45 %.....	19
3.3.3.3. Pembuatan Larutan HCl 0,1 N.....	19
3.3.3.4. Pembuatan Larutan NaOH 0,1 N.....	19
3.3.3.5. Pembuatan Larutan DPPH 40 ppm.....	19
3.3.3.6. Pembuatan Larutan Buffer Fosfat 0,01 M pH 7 .....	20
3.3.4. Analisis Kadar Air, Abu, dan Karbohidrat Susu Kambing Etawa.....	20
3.3.4.1. Analisis Kadar Air.....	20
3.3.4.2. Analisis Kadar Abu.....	20
3.3.4.3. Analisis Kadar Karbohidrat.....	20
3.3.5. Analisis Kadar Protein.....	21
3.3.6. Analisis Kadar Lemak.....	21
3.3.7. Analisis Kadar Asam Laktat.....	22
3.3.8. Analisis Kadar Alkohol.....	23
3.3.9. Analisis Organoleptik.....	23
3.3.10. Analisis Antioksidan.....	23
3.3.11. Analisis Antibakteri.....	24
3.3.12. Identifikasi Peptida Kefir Susu Kambing Etawa.....	24
3.3.12.1. Analisis Berat Peptida dengan <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> <i>Poliacrilimide Gel Electrophoresis</i> .....	24
3.3.12.1. Analisis <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> (UPLC).....	25
3.3.12.1. Analisis <i>Liquid Chromatograph Mass Spectrometry</i> (LCMS).....	25
3.4. Diagram Alir Penelitian.....	26

<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	27
4.1. Susu Kambing Etawa.....	27
4.2. Kefir Susu Kambing Etawa.....	28
4.3. Komposisi Kimia Kefir Susu Kambing Etawa .....	30
4.3.1. Kadar Protein Kefir Susu Kambing Etawa.....	30
4.3.2. Kadar Lemak Kefir Susu Kambing Etawa.....	32
4.3.3. Kadar Total Asam Laktat Kefir Susu Kambing Etawa.....	35
4.3.4. Kadar Alkohol Kefir Susu Kambing Etawa.....	37
4.4. Nilai Organoleptik.....	39
4.4.1. Rasa Kefir Susu Kambing Etawa.....	39
4.4.2. Aroma Kefir Susu Kambing Etawa.....	40
4.4.3. Tekstur Kefir Susu Kambing Etawa.....	41
4.4.4. Warna Kefir Susu Kambing Etawa.....	41
4.5. Aktivitas Antibakteri Kefir Susu Kambing Etawa.....	42
4.6. Aktivitas Antioksidan Kefir Susu Kambing Etawa.....	44
4.7. Peptida Bioaktif <i>Curd</i> dan <i>Whey</i> Kefir Susu Kambing Etawa.....	46
<b>V. SIMPULAN DAN SARAN</b> .....	50
5.1. Simpulan.....	50
5.2. Saran .....	50
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	51
<b>LAMPIRAN</b> .....	60

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kandungan rata-rata gizi pada susu kambing (Park <i>et al.</i> , 2007).....	7
2. Hasil Analisis Kimia Susu Kambing Etawa.....	28
3. Kadar Protein Kefir Susu Kambing Etawa.....	31
4. Kadar Lemak Kefir Susu Kambing Etawa.....	33
5. Kadar Total Asam Laktat (TAL) Kefir Susu Kambing Etawa.....	35
6. Kadar Alkohol Kefir Susu Kambing Etawa.....	37
7. Nilai Organoleptik <i>Whey</i> dan <i>Curd</i> Kefir Susu Kambing Etawa.....	39
8. Diameter zona bening <i>whey</i> dan <i>curd</i> kefir terhadap bakteri <i>Bacillus cereus</i> ..	43
9. Diameter zona bening <i>whey</i> dan <i>curd</i> kefir terhadap bakteri <i>Escherichia coli</i> ..	43
10. Nilai IC <sub>50</sub> Kefir Susu Kambing Etawa.....	45
11. Asam Amino Peptida <i>Curd</i> Kefir Susu Kambing Etawa.....	48

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bibit Kefir.....	6
2. Diagram Alir penelitian.....	26
3. Susu Kambing Etawa.....	27
4. Kefir susu kambing Etawa: a) <i>whey</i> dan <i>curd</i> sebelum dipisahkan; b) <i>whey</i> ; dan c) <i>curd</i> .....	29
5. Kefir <i>whey</i> dan <i>curd</i> dengan madu 40 % (v/v): a) <i>Whey</i> + madu dan b) <i>Curd</i> + madu.....	30
6. Kadar protein sebelum dan sesudah fermentasi.....	31
7. Kadar lemak sebelum dan sesudah fermentasi.....	33
8. Kadar total asam laktat <i>whey</i> dan <i>curd</i> kefir susu kambing Etawa.....	36
9. Kadar alkohol <i>whey</i> dan <i>curd</i> kefir susu kambing Etawa.....	38
10. Berat peptida kefir susu kambing Etawa: M) <i>Spectra multicolor broad range protein ladder 26634</i> ; A) <i>whey</i> ; B) <i>curd</i> ; C) <i>whey</i> + madu; D) <i>curd</i> + madu.....	47

## I. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Susu adalah salah satu minuman bergizi tinggi karena di dalam susu mengandung berbagai zat makanan lengkap dan seimbang seperti protein, lemak, karbohidrat, mineral, dan vitamin (Park *et al.*, 2007). Disisi lain tidak semua orang dapat mengonsumsi susu terutama penderita intoleransi laktosa. Hal ini disebabkan karena laktosa yang terdapat pada susu tidak bisa tercerna menjadi komponen sederhana yang dapat diserap oleh tubuh seperti glukosa dan galaktosa, sehingga menimbulkan gangguan pada sistem pencernaan. Proses hidrolisis laktosa dibantu oleh enzim laktase yang terdapat di usus halus. Defisiensi enzim laktase dapat menyebabkan intoleransi laktosa namun, penderita intoleransi laktosa dapat diatasi dengan mengonsumsi susu hasil fermentasi karena melalui proses ini fermentasi kandungan laktosa pada susu dapat diurai menjadi produk yang lebih sederhana (Heyman, 2006; Demir, *et al.*, 2020). Menurut Ibrahim *et al.* (2021) susu fermentasi diketahui memiliki berbagai manfaat untuk kesehatan dan dapat mengatasi masalah intoleransi laktosa. Produk olahan susu hasil fermentasi telah banyak diketahui seperti, yakult, yoghurt dan kefir (Kristiandi dkk., 2021).

Kefir merupakan salah satu minuman probiotik dengan bahan baku berupa susu yang diolah melalui tahap fermentasi. Kefir memiliki efek terapeutik karena mengandung komponen bioaktif dan dapat berpotensi menjaga kesehatan tubuh seperti membantu mencegah kanker usus besar dan menurunkan kadar kolesterol dalam darah (Ganatsios *et al.*, 2021). Kefir memiliki rasa asam dan aroma khas hasil fermentasi. Fermentasi kefir dibuat dengan menambahkan bibit kefir yang mengandung berbagai macam bakteri asam laktat seperti, genus *Lactobacillus*



(*L. achidophilus*, *L. brevis*, *L. helveticus*, *L. kefir*), genus *Leuconostoc* (*Leuconostoc mesenteroides*), genus *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium lactis*) dan khamir (*Kluyveromyces lactis*, *K. Marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*) (Brien *et al.*, 2016). Bakteri dan khamir menguraikan laktosa yang terdapat pada susu dan mengubahnya menjadi asam laktat dan etanol. Hal ini yang menyebabkan kefir memff iliki rasa asam yang berasal dari hasil akhir proses fermentasi dengan kandungan laktosa yang lebih rendah (Taylor *et al.*, 2013).

Beberapa cara dilakukan untuk meningkatkan cita rasa dan mengurangi rasa asam yang timbul dari kefir, pada penelitian sebelumnya telah memadukan kefir dengan menambahkan bahan perasa lain untuk meningkatkan cita rasa, seperti penambahan sari buah jambu biji merah dengan konsentrasi 30 % setelah fermentasi pada kefir susu kambing (Rahayu dkk., 2020). Penelitian lain melakukan optimasi penambahan jus buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) terhadap kefir susu kambing sehingga dapat meningkatkan kualitas organoleptik dan antioksidan (Ningsih dan Haris, 2022). Selain itu dilakukan juga penambahan madu sebesar 40 % (v/v) terhadap kefir susu kambing dapat meningkatkan nilai organoleptik pada panelis yaitu rasa dan kesukaan, namun tidak dilaporkan efek penambahan madu terhadap kandungan protein, lemak, asam laktat, dan alkohol (Jaya dkk., 2017). Penambahan madu selain dapat meningkatkan cita rasa yang lebih baik juga memiliki banyak manfaat dan kegunaan bagi manusia misalnya, memiliki sifat antibakteri dan antioksidan (Rio dkk., 2012).

Proses pembuatan kefir menghasilkan dua bagian yang disebut *curd* dan *whey*. Kefir yang berasal dari lapisan atas (*curd*) disebut dengan kefir prima, sedangkan berasal dari bagian bawah (cair) disebut dengan *whey* kefir. Adapun jenis kefir yang dibuat tanpa proses pemisahan lapisan atas dan bawah pada saat fermentasi disebut kefir optima (Julianto *et al.*, 2016). Ragam dan manfaat dari produk olahan kefir telah banyak diteliti, dikembangkan, dan dibuat dari berbagai macam susu sebagai bahan dasar, seperti susu sapi (Yirmibesoglu and Ozturk, 2020), kolostrum sapi (Nurhasanah dkk., 2019), sari nabati seperti kedelai (Gamba *et al.*, 2020) ataupun susu kambing (Ersan *et al.*, 2016).

Susu kambing merupakan salah satu pangan fungsional alami yang memiliki kandungan kimia yang berbeda dengan susu sapi. Karakteristik susu kambing lebih unggul dibanding susu sapi, yaitu memiliki kandungan  $\beta$ -laktoglobulin yang lebih rendah dan memiliki ukuran globula lemak yang lebih kecil, sehingga memudahkan lemak dicerna oleh saluran pencernaan (Mahdi *et al.*, 2017). Susu kambing juga memiliki gizi lengkap, beberapa kandungan seperti kalsium dan mineral lebih tinggi dibandingkan susu sapi. Susu kambing juga memiliki protein yang lebih mudah dicerna, tetapi kurang disukai karena memiliki bau tidak enak (*goaty flavour*) yang berasal dari asam lemak rantai pendek dan sedang, misalnya asam kaprat, asam kaproat, dan asam kaprilat (Ceballos *et al.*, 2009). Salah satu jenis kambing di Indonesia yaitu kambing Etawa yang memiliki beberapa keunggulan diantaranya menghasilkan susu dengan kandungan gizi lebih tinggi dibandingkan dengan jenis kambing lain. Pada kambing Etawa terkandung 5,3 % protein dan 4,6 % lemak, sedangkan pada susu kambing kacang memiliki 3,6 % protein dan 4,2 % lemak (Caesar dkk., 2016).

Adanya pengolahan susu menjadi susu fermentasi adalah salah satu cara untuk meningkatkan nilai nutrisi, varian minuman probiotik, dan untuk menghilangkan aroma bau “amis” pada semua susu segar (Baarri dkk., 2003). Pada penelitian Purwaningsih dkk. (2019) menggunakan susu kambing Etawa dalam pembuatan kefir dengan optimalisasi bibit yang digunakan dan penambahan perasa sukrosa. Kefir susu kambing Etawa yang terbuat dengan penambahan bakteri *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 berpengaruh ( $p \leq 0,05$ ) terhadap penurunan pH, kadar alkohol dan peningkatan bakteri asam laktat (Martharini *and* Indratiningsih, 2017). Pada penelitian Ningsih dan Haris (2022) kefir susu kambing Etawa dengan penambahan jus buah naga 45% (v/v) dapat meningkatkan kualitas warna, aroma, rasa, dan memiliki aktivitas antioksidan sebesar 79,24%. Selain kandungan kimia tersebut, susu kambing Etawa yang dihidrolisis dengan enzim mengandung peptida bioaktif yang memiliki aktivitas antibakteri (Diana dan Giordan, 2020).

Peptida bioaktif merupakan kumpulan dari 2-50 asam amino yang terikat satu sama lain dengan ikatan peptida yang memiliki manfaat bagi kesehatan. Peptida bioaktif dapat dibebaskan dari protein induknya melalui hidrolisis oleh enzim proteolitik atau melalui proses fermentasi (Taniguchi *et al.*, 2018). Peptida bioaktif yang dihasilkan pada saat fermentasi memiliki aktivitas seperti antihipertensi, antibakteri, antioksidan, antimikroba, dan antiinflamasi. Peptida bioaktif juga memiliki fungsi yang baik untuk kesehatan tubuh seperti aktivitas biologis dalam sistem pencernaan, kekebalan, dan saraf (Chai *et al.*, 2020; Rubak *et al.*, 2021).

Penelitian terkait peptida biokatif dari produk susu dan olahannya telah dilaporkan seperti peptida bioaktif penghasil antioksidan dari hidrosilat protein susu kedelai. Hasil analisis SDS PAGE menunjukkan adanya fragmen-fragmen peptida pada kisaran 3-15 kDa. Fragmen peptida hasil fraksinasi memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai  $IC_{50}$  281,74 ppm (Septiana, 2019). Susu kambing yang diolah menjadi yoghurt mengandung asam glutamat yang merupakan salah satu penyusun peptida bioaktif yang memiliki fungsi antioksidan dengan komposisi asam amino Val-Lys-Glu-Ala-Met-Pro-Lys (Mahdi *et al.*, 2017). Pada penelitian Falcao *et al.* (2017) menjelaskan bahwa kandungan peptida bioaktif pada kefir dari susu domba memiliki aktivitas antioksidan dan antibakteri. Beberapa penelitian yang telah dilaporkan di atas menunjukkan pentingnya peptida bioaktif yang terkandung pada produk fermentasi susu. Sampai saat ini laporan terkait peptida bioaktif masih terbatas pada peptida kefir secara umum, belum ada yang melakukan analisis peptida kefir *whey* dan *curd* hasil fermentasi susu kambing Etawa serta penambahan madu pada bioaktivitasnya.

Berdasarkan latar belakang dari uraian di atas, pada penelitian ini dilakukan analisis kimia dan identifikasi peptida bioaktif dari produk fermentasi kefir berupa *whey* dan *curd* yang diduga memiliki kandungan peptida bioaktif yang bermanfaat. Selain itu, untuk meningkatkan cita rasa pada produk kefir *whey* dan *curd* dilakukan penambahan madu sebanyak 40 % (v/v).

## **1.2. Tujuan Penelitian**

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mendapatkan nilai komposisi kimia dan nilai organoleptik *whey* dan *curd* kefir hasil fermentasi susu kambing Etawa.
2. Mengetahui aktivitas antioksidan dan antibakteri *whey* dan *curd* kefir hasil fermentasi susu kambing Etawa.
3. Mengetahui identitas peptida bioaktif dari *whey* dan *curd* hasil fermentasi kefir susu kambing Etawa berdasarkan berat molekul.

## **1.3. Manfaat Penelitian**

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah untuk mengembangkan pemanfaatan susu kambing Etawa dan varian yang dihasilkan sebagai salah satu pangan fungsional serta memperkenalkan kepada masyarakat tentang manfaat minuman probiotik kefir untuk kesehatan. Peptida yang berhasil diidentifikasi dapat dikembangkan lebih lanjut dalam bidang yang relevan seperti untuk pengembangan di dunia farmasi dan bioteknologi.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kefir

Kefir merupakan minuman susu fermentasi yang diproduksi dengan menggunakan bibit kefir. Perbedaan utama antara kefir dan produk susu fermentasi lainnya adalah penggunaan bibit kefir yang disebut *kefir grains* atau biji kefir. Bibit kefir berukuran dari 2 hingga 20 mm atau lebih dan terlihat kecil seperti kembang kol bentuk dan warnanya (Kesenkas *et al.*, 2017).



**Gambar 1.** Bibit Kefir

Bibit kefir terdiri kumpulan berbagai bakteri asam laktat (*Lactobacillus*, *Streptococcus sp*, *Bifidiobacterium*) dan khamir (*Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*). Mikroorganisme yang berada dalam bibit kefir menunjukkan kompleks hubungan simbiosis dan beberapa spesies telah diidentifikasi, termasuk *L. brevis*, *L. helveticus*, *L. kefir*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Kluyveromyces. lactis*, *K. marxianus*, dan *Pichia fermentans* (Amorima *et al.*, 2019).

Pembuatan kefir melalui proses fermentasi menghasilkan padatan yang disebut *curd* dan lapisan yang bening berupa cairan disebut dengan *whey*. Kefir yang

berasal dari lapisan *curd* disebut dengan kefir prima, sedangkan kefir yang berasal dari bagian cair disebut dengan *whey* kefir. Adapun kefir yang terbuat dari *curd* dan *whey* yang dicampurkan setelah dipisahkan dari bibit kefir disebut dengan kefir optima (Julianto *et al.*, 2016). Fermentasi susu menggunakan bakteri asam laktat yang terdapat pada bibit kefir sering digunakan untuk menghasilkan susu fermentasi dan diyakini memberikan manfaat kesehatan serta menyembuhkan beberapa penyakit (Mahdi *et al.*, 2017).

## 2.2 Susu Kambing

Susu kambing merupakan salah satu pangan fungsional alami yang memiliki karakteristik kimia yang berbeda dengan susu sapi. Laktosa dan protein yang terkandung dalam susu kambing hampir sama dengan susu sapi, namun terdapat beberapa perbedaan pada struktur dan proteinnya. Susu kambing juga mengandung beberapa asam lemak rantai tengah dan lipid globular yang relatif kecil dibandingkan dengan susu sapi. Produk olahan pangan dengan bahan dasar susu kambing telah dikembangkan sebagai produk pangan obat atau biomedis yang bermanfaat bagi kesehatan (Mahdi *et al.*, 2017). Susu kambing selain memiliki rantai asam lemak pendek juga memiliki protein yang lebih mudah dicerna (Ceballos *et al.*, 2009).

Susu kambing memiliki kandungan gizi lengkap, diketahui beberapa kandungan yang terdapat pada susu kambing dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan rata-rata gizi pada susu kambing (Park *et al.*, 2007).

<b>Kandungan</b>	<b>Jumlah (%)</b>
Lemak	3,8
Protein	3,4
Laktosa	4,1
Kasein	2,4
Abu	0,8
Padatan non lemak	8,9
Kalori/100 ml	70

Berdasarkan Tabel 1 susu kambing memiliki nilai gizi yang lengkap, namun kurang disukai karena memiliki bau yang tidak enak (*goaty flavour*) berasal dari asam lemak rantai pendek dan sedang, misalnya asam kaprat (102,53 mg/100g), asam kaproat (210,18 mg/100g), asam laurat (1648,51 mg/100g), dan asam kaprilat (119,90 mg/100g) (Ceballos *et al.*, 2009).

Kambing di Indonesia memiliki beragam jenis, seperti kambing sapera, anglo nubian, kacang, dan Etawa (Rusdiana *et al.*, 2016). Kambing Etawa yang memiliki beberapa keunggulan diantaranya menghasilkan susu dengan kandungan gizi lebih tinggi dibandingkan dengan jenis kambing lain. Pada kambing Etawa terkandung 5,3 % protein dan 4,6 % lemak, sedangkan pada susu kambing kacang memiliki 3,6 % protein dan 4,2 % lemak (Caesar dkk., 2016).

Adanya pengolahan susu menjadi susu fermentasi adalah salah satu cara untuk meningkatkan nilai nutrisi, varian minuman probiotik, dan untuk menghilangkan aroma bau “amis” pada semua susu segar (Baarri dkk., 2003). Pada penelitian Sulmiyati dkk. (2018) dilakukan uji kandungan pada kefir susu kambing, diperoleh bahwa kandungan susu kambing yang terbaik dengan karakteristik kefir pH 3,89, persentase asam laktat 0,14 dan kadar etanol 0,72 %, namun pada penelitian ini tidak dijelaskan jenis kambing yang digunakan.

### **2.3. Madu**

Madu merupakan cairan yang dihasilkan oleh lebah (*Apis mellifera*). Penyusun utama madu adalah monosakarida 75 – 80 % (fruktosa 38,2 % dan glukosa 31,3 %), disakarida (1,31 % sukrosa, 7,11 % laktosa, dan 7,31 % maltosa), dan air (15 – 23 %). Madu memiliki osmolaritas yang tinggi dan memiliki pH antara 3,4 hingga 6,1 (Bogdanova *et al.*, 2004). Madu dapat digunakan sebagai makanan dan obat tradisional, karena memiliki banyak manfaat dan kegunaan bagi kesehatan manusia. Madu mengandung nektar atau gula eksudat dari tanaman yang dikumpulkan oleh lebah madu dan menjadi salah satu obat tradisional untuk kesehatan. Salah satu manfaat madu memiliki sifat antibakteri dan antioksidan.

Manfaat antibakteri berasal kandungan flavonoid yang ada dalam madu dan memiliki mekanisme antibakteri yang terdiri dari tekanan osmotik madu, keasaman, dan adanya senyawa penghambat dalam madu (Rio dkk., 2012). Penggunaan madu dalam kefir akan mengurangi rasa asam dan meningkatkan nilai organoleptik dari kefir. Madu mengandung karbohidrat sederhana seperti glukosa dan fruktosa. Kedua karbohidrat sederhana memiliki gugus hidroksil bebas yang aktif. Gugus hidroksil yang aktif bereaksi dengan kandungan asam kefir membentuk senyawa ester dan air. Reaksi ini menghasilkan pengurangan jumlah total asam. Peningkatan viskositas kefir disebabkan oleh kemampuan madu untuk mengikat air. Kondisi ini akan mempengaruhi sifat kimia kefir yang sudah jadi. Perubahan sifat produk dapat diketahui secara tidak langsung oleh konsumen melalui perubahan selera atau nilai kesukaan (Padauleng *et al.*, 2021).

#### **2.4. Manfaat Kefir**

Kefir merupakan salah satu minuman probiotik yang memiliki banyak manfaat untuk kesehatan dan mengandung metabolit yang baik untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh. Kefir memiliki efek terapeutik seperti membantu pengobatan *lactose intolerance*, mencegah kanker usus besar, dan menurunkan kadar kolestrol dalam darah (Ganatsios *et al.*, 2021). Pada saat proses fermentasi berlangsung laktosa akan terhidrolisis oleh bakteri dan ragi yang terdapat pada bibit kefir (Pogacic *et al.*, 2013).

Kefir termasuk salah satu produk makanan fungsional, yaitu makanan yang berfungsi sebagai sumber nutrisi dan juga berkhasiat terapeutik karena mengandung komponen bioaktif, sehingga berpotensi menjaga kesehatan tubuh. Aktivitas mikroba dalam kefir mampu menghasilkan komponen metabolit asam organik, protein, peptida aktif dan polisakarida yang berperan sebagai komponen bioaktif antimikroba, antioksidan dan mempunyai nilai tambah terhadap peningkatan fungsional produk (Diana dan Giordan, 2020). Pada saat fermentasi kefir berlangsung, dihasilkan peptida dan bakteri eksopolisakarida, yang telah terbukti memiliki sifat bioaktif. Hasil uji *in vivo* pada hewan diketahui bahwa



kefir memiliki sifat antioksidan, antikanker, antimutagenetik, dan antibakteri (Farnworth, 2005).

Kefir memiliki nutrisi yang tinggi untuk dikonsumsi karena efeknya dapat meningkatkan kesehatan. Kefir yang difermentasi memiliki kandungan peptida yang lebih tinggi dibandingkan dengan susu yang tidak difermentasi. Hal ini dikarenakan adanya mikroflora yang terdapat pada biji kefir. Peptida bioaktif tersebut memiliki fungsi sebagai inhibitor *Angiotensin Converting Enzim* (ACE), antimikroba, imunomodulasi, pengikatan mineral, antioksidan, dan efek antitrombotik (Ebner *et al.*, 2015).

## 2.5. Peptida Bioaktif

Peptida bioaktif merupakan produk hidrolisis protein pangan yang memiliki fungsi biologis pada pengaturan fungsi tubuh dan kesehatan. Peptida bioaktif di dalam susu diketahui memiliki berbagai macam fungsi yang bermanfaat bagi kesehatan tubuh seperti imunomodulator, imunostimulator, antihipertensi, antihiperkolesterol, serta berbagai manfaat lainnya. Peptida bioaktif terikat pada prekursor protein pangan dan akan dilepaskan melalui proses hidrolisis melalui beberapa cara: 1. Melalui enzim proteolisis disaluran pencernaan; 2. Secara *in-vitro* menggunakan enzim proteolisis yang diisolasi dari tumbuhan atau mikroorganisme; 3. Melalui proses fermentasi (Guha *et al.*, 2021). Beberapa peptida bioaktif telah diisolasi dan diidentifikasi dari berbagai sumber pangan, seperti susu instan, telur, daging sapi, ayam, produk susu fermentasi, ikan dan kedelai. Salah satu sumber utama peptida bioaktif adalah susu. Sifat fungsional peptida bioaktif ditentukan oleh komposisi asam amino dari peptida bioaktif, misalnya peptida dengan komposisi asam amino Val-Lys-Glu-Ala-Met-Pro-Lys memiliki fungsi antioksidan (Mahdi *et al.*, 2017).

Makanan yang memiliki kandungan protein tinggi diketahui sebagai sumber peptida bioaktif. Susu dan produk olahan susu, termasuk susu fermentasi, telah diidentifikasi sebagai sumber peptida bioaktif (Tagliazucchi, *et al.*, 2019). Proses

fermentasi adalah salah satu cara untuk menghasilkan peptida bioaktif dari proses hidrolisis protein susu menggunakan mikroba. Bakteri yang dominan terlibat selama proses hidrolisis protein menjadi asam amino adalah Bakteri Asam Laktat (BAL). Peptida yang dilepaskan bervariasi dalam jumlah dan urutan peptida, dan di antaranya adalah peptida bioaktif (Rubak *et al.*, 2021).

Peptida bioaktif memiliki urutan asam amino pendek, biasanya 2 sampai 20 residu, memiliki berat molekul rendah dibandingkan dengan berat protein. Selain itu, peptida bioaktif memiliki residu asam amino N-terminal dan C-terminal (Clara *et al.*, 2016). Peptida bioaktif adalah fragmen protein spesifik yang memberikan berbagai manfaat pada tubuh manusia yang dapat mempengaruhi kesehatan. Hal tergantung pada sifat struktural dan komposisi asam amino dan urutannya (Chai *et al.*, 2020). Peptida bioaktif memiliki berbagai aktivitas fungsional, antara lain antimikroba, antihipertensi, aktivitas hipoglikemik, imunomodulasi, dan antioksidan (Koopman *et al.*, 2009).

Peptida bioaktif dengan susunan asam amino Val-Lys-Glu-Ala-Met-Ala-Pro-Lys memiliki fungsi fisiologis sebagai antioksidan (Ledesma *et al.*, 2004). Pada penelitian isolasi peptida bioaktif antioksidan dari susu kambing dengan proses fermentasi menggunakan bakteri *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, diperoleh urutan asam aminonya: Ala-Arg-His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met (Ricci-cabello *et al.*, 2012).

## **2.6. Antioksidan**

Antioksidan merupakan senyawa pendonor elektron atau reduktan. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat proses oksidasi dengan mengikat radikal bebas serta molekul yang sangat reaktif (Kesenkas *et al.*, 2011). Radikal bebas adalah suatu senyawa atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital luarnya. Adanya elektron tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan,

dengan cara menyerang dan mengikat elektron yang berada di sekitarnya sehingga dapat memicu timbulnya penyakit (Khaira, 2010).

Ada dua kelompok sumber antioksidan, yaitu antioksidan sintetis (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia) dan antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami atau yang terkandung dalam bahan alami).

Antioksidan alami berasal dari senyawa fenolik seperti golongan flavonoid. Flavonoid adalah suatu golongan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman (Saija *et al.*, 1995).

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menunda, memperlambat, dan mencegah proses oksidasi lipid. Antioksidan juga dapat didefinisikan sebagai zat yang dapat mencegah terbentuknya reaksi radikal bebas (peroksida) dalam oksidasi lipid. Antioksidan sintetis diketahui memiliki efek samping yang besar antara lain menyebabkan kerusakan hati seperti BHA (*butylated hidroxy aniline*) dan BHT (*butylated hidroxy toluen*) (Elias *et al.*, 2008).

Salah satu sumber antioksidan berasal dari produk olahan fermentasi seperti kefir. Kefir memiliki sifat antioksidan yang berbeda-beda bergantung pada bahan dasar susu yang digunakan. Pada penelitian Falcao *et al* (2017) menggunakan susu domba sebagai bahan pembuatan kefir diperoleh antioksidan antara 18,39-72,41 %. Sedangkan pada penelitian lain menggunakan campuran susu kambing dan susu sapi sebagai bahan dasar yang akan difermentasi dengan berbagai *strain* bibit kefir (*L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* and *L. acidophilus*). Hasil antioksidan terbaik pada susu fermentasi menggunakan *L. acidophilus* (Biadala and Adzahan, 2021).

## **2.7. Antibakteri**

Kefir bermanfaat bagi kesehatan antara lain memperbaiki proses pencernaan dan memproduksi senyawa antibakteri. Komponen antibakteri yang dihasilkan selama fermentasi kefir seperti asam organik (asam laktat dan asetat), karbondioksida, hidrogen peroksida, etanol, diasetil dan peptida (bakteriosin) yang tidak hanya

berguna untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan bakteri pembusuk selama pengolahan dan penyimpanan makanan, tetapi dapat pula digunakan untuk pencegahan beberapa gangguan pencernaan dan infeksi (Farnworth, 2005).

Bakteri asam laktat merupakan mikroorganisme yang terdapat di dalam minuman fermentasi, salah satunya kefir. Bakteri asam laktat merupakan kelompok organisme probiotik yang memiliki efek antibakteri. Sifat antibakteri ini dapat memberikan perlindungan terhadap mikroorganisme patogen dan non patogen (Azizkhani *et al.*, 2020).

Pada penelitian (Hanum *et al.*, 2021) diketahui bahwa kefir susu kambing memiliki sifat antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* membentuk zona hambat antara 8,17 hingga 9,50 mm. Penelitian lain melaporkan bahwa kefir susu kambing menunjukkan aktivitas penghambatan pada bakteri *Staphylococcus aureus* (Diana dan Giordan, 2020). Pada penelitian Sulmiyati *et al.*, (2019) diketahui bahwa kefir susu kambing berpotensi sebagai antibakteri terhadap patogen *E.coli* ATCC 8739 dan *Salmonella enteric subsp. enterica serovar typhimurium* ATCC 14028.

## **2.8. Prinsip Pengujian**

### **2.8.1. Metode 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)**

Prinsip kerja metode DPPH yaitu adanya atom hidrogen berasal senyawa antioksidan yang berikatan dengan elektron bebas di senyawa radikal sehingga menyebabkan perubahan dari radikal bebas (*diphenylpicrylhydrazyl*) menjadi senyawa non-radikal (*diphenylpicrylhydrazine*). Hal ini ditandai adanya perubahan warna dari ungu menjadi kuning (senyawa radikal bebas tereduksi oleh adanya antioksidan). Pada metode DPPH digunakan parameter  $IC_{50}$  yaitu konsentrasi sampel yang diharapkan dapat menangkap radikal DPPH sebanyak 50 % (Molyneux, 2004).

Peptida bioaktif memiliki fungsi tertentu sesuai dengan asam amino penyusunnya. Asam amino yang memiliki muatan positif seperti lisin, arginin dan histidin dapat

mendonorkan muatannya terhadap radikal bebas. Pada pengujian ini peptida bioaktif yang memiliki fungsi sebagai antioksidan akan mengikat radikal pada DPPH dengan ditandai adanya perubahan warna ungu menjadi kuning (Guha, *et al.*, 2021). Pada penelitian Biadala dan Adzahan (2021) menggunakan metode DPPH untuk membandingkan kandungan antioksidan pada kefir susu sapi dan kefir susu kambing. Hasil yang diperoleh bahwa pada susu kambing memiliki kadar antioksidan lebih tinggi dari kefir susu sapi yaitu antara 25,71- 56,98 %.

### **2.8.2. Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis**

Elektroforesis SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) adalah metode yang digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan ukuran berat molekulnya. Protein didenaturasi dengan menambahkan SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) untuk memisahkan protein secara spesifik sesuai dengan berat molekul. Elektroforesis SDS PAGE termasuk ke dalam kelompok elektroforesis zona, yaitu kelompok elektroforesis yang dibedakan berdasarkan medium penyangganya. Elektroforesis SDS PAGE menggunakan gel buatan sebagai medium penyangga. Gel yang digunakan terbentuk dari polimerisasi akrilamida dengan N, N'- metilena bis akrilamida. Protein dapat dipisahkan dari protein jenis lainnya berdasarkan ukuran, kelarutan, muatan dan afinitas electron (Baroni *et al.*, 2002).

Penggunaan SDS PAGE bertujuan untuk memberikan muatan negatif pada protein yang akan dianalisis. Protein yang terdenaturasi sempurna akan mengikat SDS dalam jumlah yang setara dengan berat molekul protein tersebut (Zong *et al.*, 2019). Denaturasi protein dilakukan dengan merebus sampel dalam buffer yang mengandung  $\beta$ - merkaptoetanol (berfungsi untuk mereduksi ikatan disulfida), gliserol dan SDS (Wilson and Walker, 2000). Pada penelitian Mahdi *et al.* (2019) menggunakan SDS PAGE untuk menentukan berat peptida pada sampel yoghurt susu kambing dan diperoleh berat molekul kurang dari 3 kDa yang diketahui sebagai antioksidan. Sedangkan pada penelitian Soenarno *et al* (2013) menggunakan elektroforesis SDS PAGE untuk mengetahui berat molekul

peptida pada sampel dadih dan dangke. Hasil berat molekul pada dadih yaitu 56,91 kDa dan diperoleh dua berat molekul dangke yaitu 12,38 kDa dan 9,12 kDa.

### **2.8.3. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)**

Analisa kandungan asam amino menggunakan *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* dengan mekanisme pemisahan yang dilakukan secara prakolom diikuti oleh pemisahan fase terbalik dengan menggunakan detektor fluoresensi sehingga akan menghasilkan analisis dalam bentuk kromatogram. Prinsip pemisahan HPLC didasarkan pada distribusi senyawa sampel antara fase gerak dengan adanya tekanan dan fase diam (dalam kolom) (Wilson *and* Walker, 2000).

*Ultra Performance Liquid Chromatography* merupakan pengembangan alat HPLC. Mekanisme pemisahan pada HPLC dan UPLC sama, namun instrumen UPLC memiliki kelebihan yaitu waktu analisis lebih cepat, sensitivitas dan selektivitasnya lebih tinggi, pelarut yang digunakan sedikit dan resolusinya lebih tinggi (Reddy *et al.*, 2012).

Pada penelitian Kustiawan dkk. (2010) menggunakan metode HPLC untuk menganalisa kandungan asam amino pada produk olahan susu fermentasi dangke dari bahan baku susu sapi dan diperoleh hasil tertinggi kandungan asam glutamat. Pada pembuatan yogurt dengan adanya variasi penambahan susu skim yang dilakukan uji kandungan asam amino dengan metode HPLC memiliki komposisi asam glutamat tertinggi pada setiap variasinya (Farida dkk., 2020).

### **2.8.4. Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS)**

*Liquid Chromatograph Mass Spectrometry (LCMS)* merupakan satu-satunya teknik kromatografi cair dengan detektor spectrometer massa. Penggunaan LCMS untuk penelitian bio-analisis dimulai pada akhir 1980. Sampel yang akan dianalisis dengan LCMS pertama-tama dilewatkan melalui kromatografi cair untuk memisahkan komponen-komponen yang ada pada sampel. Selanjutnya,

komponen-komponen atau molekul tersebut akan dilanjutkan ke spektrometri massa. Molekul tersebut akan melalui proses ionisasi yang dapat dilakukan dengan berbagai cara. Salah satu teknik ionisasi yang palings sering digunakan adalah *electrospray ionisation* (ESI) (Mechmeche, 2019).

Pada penelitian (Limbad *et al.*, 2023) menggunakan LCMS untuk identifikasi asam amino pada *whey* kefir dan diperoleh kandungan asam amino tertinggi pada asam glutamat yaitu 85 % dari total asam amino pada *whey* kefir. Penelitian lain menggunakan LCMS untuk mengidentifikasi profil peptida pada sampel fermentasi susu kambing dengan bakteri *Lactobacillus delbrueckii ssp. delbrueckii* BD7 berdasarkan kemiripan residu asam amino pada C-terminal diperoleh 28 peptida penghambat ACE (*Angiotensin Converting Enzyme*), 19 peptida antioksidan, dan 10 peptida antimikroba (Rubak *et al.*, 2021).

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2022 sampai dengan Mei 2023 bertempat di Laboratorium Biokimia, Universitas Lampung. Analisis kimia (protein, lemak, total asam laktat, alkohol, dan organoleptik) dilakukan di Laboratorium THP Politeknik Negeri Lampung. Analisis antioksidan dilakukan di Laboratorium Terpadu Sentra Informasi dan Teknologi Universitas Lampung dan analisis antibakteri di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Lampung. Identifikasi peptida bioaktif yang meliputi penentuan berat molekul SDS PAGE dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjajaran dan analisis komposisi asam amino dengan UPLC dan LCMS dilakukan di Laboratorium Saraswanti Indo Genetech.

#### **3.2. Alat dan Bahan**

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas (*Pyrex*), autoklaf (*Gea*), oven (*Memmert*), timbangan digital (*Ohaus*), seperangkat alat kjedahl (*Velp Scientifica*), batu didih, vortex (*Boeco*), pH meter (*Eutech*), toples kaca, saringan (*Yukata*), inkubator (*Memmert*), seperangkat alat sokhletasi (*Buchi*), alkoholmeter (*Boeco*), cawan petri (*Normax*), paper disk (*Advantec*), standar Mc farland (*Remel*), spektrofotometri Uv-Vis (*Shimadzu*), LCMS (*Shimadzu*), dan UPLC (*Drawell*).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu susu kambing Etawa yang diambil dari peternakan Telaga Risqi (Metro Timur), bibit kefir (UIN Sunan



Gunung Djati Bandung), madu komersil (*Ghaliban*), akuades, asam klorida (*Merck*), natrium hidroksida (*Merck*),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (*Merck*),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat (*Merck*), *n*-heksan (*Merck*), metanol (*Merck*), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), NaCl (*Merck*), biakan bakteri *Salmonella* dan *Escherichia coli*, media *Nutrient Agar* (*Merck*), kloramfenikol (*Forma mart*), *Bovine Serum Albumin* (*Sigma Aldrich*), *Sodium Dodesil Sulfat* (*Sigma Aldrich*), larutan akrilamid (*Merck*), stacking buffer Tris-HCl 0,5 M pH 6.8 (*Sigma Aldrich*), resolving buffer Tris-HCl 1,5 M pH 8.8 (*Sigma Aldrich*), ammonium persulfat APS (*Sigma Aldrich*), tetrametiletilendiamin TEMED (*Serva*), dan *coomassie blue* (*Himedia*).

### **3.3. Prosedur Penelitian**

#### **3.3.1. Sterilisasi Alat**

Sterilisasi dilakukan dengan cara membungkus alat-alat kaca menggunakan kertas, kemudian di masukkan kedalam autoklaf selama 30 menit pada suhu 120 °C dengan tekanan 1 atm. Alat-alat di oven dengan suhu 80 °C. Ruang dan meja kerja harus dibersihkan sebelum memulai penelitian dengan menggunakan alkohol, hal ini dilakukan supaya menghindari adanya kontaminan dari lingkungan sekitar (Safitri dan Swarastuti, 2013).

#### **3.3.2. Pembuatan Kefir Susu Kambing Etawa**

Pembuatan kefir susu kambing Etawa dilakukan dengan cara yaitu susu kambing Etawa dipasteurisasi pada suhu 72 °C selama 15 detik, kemudian susu kambing Etawa dibiarkan pada suhu ruang hingga suhunya mencapai  $\pm 30$  °C (Magalhaes *et al.*, 2011). Susu kambing Etawa yang telah dipasteurisasi diambil sebanyak 1L ditambahkan dengan 10 % bibit kefir. Susu kefir yang dibuat difermentasi pada suhu 37 °C selama 48 jam (Nurhasanah *et al.*, 2019). Setelah fermentasi ditambahkan dengan madu sebanyak 40 % (v/v) (Jaya *et al.*, 2017).

### **3.3.3. Pembuatan Media dan Larutan Stok**

#### **3.3.3.1. Pembuatan Media *Nutrient Agar***

Pembuatan media diawali dengan menimbang 7 g *Nutrient Agar* dan dilarutkan ke dalam 250 mL akuades. Media yang telah dibuat dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 15 mL dan didiamkan sampai mengeras.

#### **3.3.3.2. Pembuatan Larutan NaOH 45 %**

Akuades 100 mL ditambahkan ke dalam gelas ukur, lalu masukkan 45 gram NaOH dan aduk hingga larut sempurna. Larutan NaOH tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL dan dikocok hingga homogen. Larutan dapat digunakan untuk pengujian.

#### **3.3.3.3. Pembuatan Larutan HCl 0,1 N**

Akuades 250 mL dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL kemudian ditambahkan dengan HCl pekat 2 mL. Larutan HCl dikocok hingga homogen. Gelas ukur dan aduk hingga larut sempurna. Larutan HCl 0,1 N dapat digunakan untuk pengujian.

#### **3.3.3.4. Pembuatan Larutan NaOH 0,1 N**

Akuades 500 mL ditambahkan ke dalam gelas ukur, lalu masukkan 2 gram NaOH dan aduk hingga larut sempurna. Larutan NaOH tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer 750 mL dan dikocok hingga homogen. Larutan dapat digunakan untuk pengujian.

#### **3.3.3.5. Pembuatan Larutan DPPH 40 ppm**

DPPH sebanyak 4 mg kemudian dilarutkan dengan 100 mL etanol 96 % dalam gelas ukur dan aduk hingga larut sempurna. Larutan NaOH tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL dan dikocok hingga homogen. Larutan dapat digunakan untuk pengujian.

### 3.3.3.6. Pembuatan Larutan Buffer Fosfat 0,01 M pH 7

Larutan kalium dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,01 M sebanyak 50 mL dicampur dengan natrium hidroksida (NaOH) 0,01 M sebanyak 39,1 mL. Larutan dicampurkan dan ditambahkan akuades hingga 200 mL. Larutan tersebut diukur pH-nya menggunakan pH meter sampai pH 7.

### 3.3.4. Analisis Kadar Air, Abu, dan Karbohidrat Susu Kambing Etawa

#### 3.3.4.1. Analisis Kadar Air

Analisis kadar air menggunakan metode gravimetri (AOAC, 2015). Pada prinsipnya, metode gravimetri dilakukan dengan mengukur selisih berat sebelum pemanasan dengan berat sampel setelah proses pemanasan. Metode ini dapat dilakukan dengan menggunakan alat oven. Sampel ditimbang sebanyak 2 g di dalam wadah porselen. Sampel dikeringkan di dalam oven pada suhu 105 °C selama 30 menit. Kadar air ditentukan dengan rumus berikut:

$$\% \text{ Air} = \frac{(\text{Berat cawan+sampel awal}) - (\text{Berat cawan+sampel akhir}) (g)}{\text{Sampel (g)}} \times 100 \%$$

#### 3.3.4.2. Analisis Kadar Abu

Analisis kadar abu menggunakan metode gravimetri (AOAC, 2015). Cawan porselen kosong ditimbang terlebih dahulu, kemudian sampel ditimbang sebanyak 2 g. Sampel tersebut dikeringkan dengan tanur pada suhu 550 °C selama 3 jam. Setelah itu, tanur dimatikan dan ditunggu sampai dingin dan ditimbang berat akhirnya. Kadar abu dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Abu} = \frac{(\text{Berat cawan+abu}) - (\text{Berat cawan awal}) (g)}{\text{Sampel (g)}} \times 100 \%$$

#### 3.3.4.3. Analisis Karbohidrat

Analisis kadar karbohidrat menggunakan metode *by difference*. Perhitungan *Carbohydrate by Difference* adalah penentuan karbohidrat dalam bahan makanan secara kasar dan hasilnya dicantumkan dalam daftar komposisi bahan makanan

yang diperoleh dengan mengurangi 100% dengan kadar protein, air, abu dan lemak (AOAC, 2015). Kadar karbohidrat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ karbohidrat} = 100 \% - (\text{kadar air} + \text{kadar abu} + \text{kadar protein} + \text{kadar lemak}) \%$$

### 3.3.5. Analisis Kadar Protein

Analisis kadar protein bertujuan untuk mengetahui kadar protein kasar yang terdapat dalam sampel kefir susu kambing Etawa menggunakan metode *kjeldahl* sesuai dengan standar SNI 2981: 2009. Sampel ditimbang sebanyak 1 g dan dimasukkan ke dalam labu *kjeldahl*, ditambahkan 1 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat, 10 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat (97 %), dan batu didih. Kemudian dilakukan destruksi di atas pemanas listrik dalam lemari asam, pemanasan diakhiri setelah cairan putih menjadi jernih tak berwarna lagi. Perlakuan blanko dilakukan hal yang sama.

Setelah campuran dingin dimasukkan ke dalam labu *kjeldahl* akuades 100 mL, serta larutan NaOH 45 % sampai cairan bersifat basa (40 mL), kemudian labu *kjeldahl* dipasang pada alat destilasi. Labu *kjeldahl* dipanaskan sampai ammonia menguap semua, destilat ditampung dalam erlenmeyer berisi 50 mL HCl 0,1 N yang sudah diberi 3 tetes indikator PP 1 %. Destilasi diakhiri setelah destilat tertampung sebanyak 150 mL. Kelebihan HCl 0,1 N dalam destilat dititrasi dengan larutan basa standar (larutan NaOH 0,1 N).

$$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(\text{ml NaOH blanko} - \text{ml NaOH sampel}) \times N \text{ NaOH} \times 14,007}{\text{mg sampel}} \times 100 \%$$

$$\text{Kadar protein \%} = \% \text{ Nitrogen} \times \text{faktor konversi (6,38)} \times 100 \%$$

14,007 : Berat atom nitrogen

6,38 : Faktor protein untuk susu

### 3.3.6. Analisis Kadar Lemak

Analisis kadar lemak bertujuan untuk mengetahui kadar lemak yang terdapat dalam sampel kefir susu kambing Etawa. Analisis kadar lemak dilakukan dengan

menggunakan metode sokhletasi (Nielsen, 2010). Sampel ditimbang 5 g, kemudian dibungkus dengan kertas saring dan dikeringkan di dalam oven pada suhu 112 °C selama 30 menit, lalu dimasukkan dalam tabung ekstraksi sokhlet. Cawan lemak yang telah diketahui beratnya dipasangkan sebagai penampung. Pasang tabung ekstraksi pada alat sokhlet, diisikan pelarut *n*-heksan hingga turun ke cawan lemak. Ekstraksi dilakukan selama 4-5 jam. Keringkan cawan yang berisi lemak pada oven dengan suhu 105 °C selama 30 menit. Berat residu dalam cawan lemak dinyatakan sebagai berat lemak.

$$\% \text{ lemak} = \frac{B-C}{A} \times 100\%$$

A = Berat sampel

B = Cawan + lemak (setelah disokhletasi)

C = Cawan + lemak (setelah dioven)

### 3.3.7. Analisis Kadar Asam Laktat

Analisis kadar asam laktat bertujuan untuk mengetahui jumlah total asam laktat yang terdapat dalam sampel kefir susu kambing Etawa. Analisis total asam dihitung sebagai asam laktat menurut standar SNI 2981: 2009. Sebanyak 5 g sampel diencerkan dengan 100 mL akuades. Sampel diambil 25 mL setelah pengenceran dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Sampel ditambahkan 3 tetes indikator PP (*phenolphthalein*). Campuran kemudian dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N sampai terbentuk warna merah muda membayang. Adapun persamaan untuk menentukan kadar asam laktat adalah sebagai berikut :

$$\text{Total asam (\%)} = \frac{V \times N \times 90 \times \text{faktor pengenceran}}{W} \times 100\%$$

W = Berat Contoh (mg)

V = Volume Larutan NaOH (mL)

N = Normalitas Larutan NaOH

90 = Berat Setara Asam Laktat

Faktor pengenceran = 4

### 3.3.8. Analisis Kadar Alkohol

Pengujian alkohol dilakukan untuk menentukan kadar alkohol pada *whey* dan *curd* dengan menggunakan alkohol meter. Sampel dimasukkan ke dalam gelas ukur kapasitas 100 mL lalu didinginkan pada suhu 20 °C. Alkohol meter dimasukkan ke dalam gelas ukur lalu dicatat hasil pengukurannya (Nayak *et al.*, 2008).

### 3.3.9. Analisis Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan dengan metode hedonik (Purwaningsih *et al.*, 2019). Analisis organoleptik dilakukan untuk pengujian tingkat kesukaan panelis terhadap sampel yang diujikan. Sampel disajikan dalam wadah *cup* kemudian panelis diminta untuk menilai kesukaan terhadap masing-masing sampel dengan memberi nilai (skor) berdasarkan skala *numeric* (1-5 skala) pada lembar uji. Penilaian kesukaan terdiri atas rasa keasaman, aroma, tekstur, dan warna. Panelis pada uji organoleptik berjumlah 15 orang yang merupakan peneliti ahli. Hasil dari uji organoleptik ini akan diperoleh bahwa adanya penambahan madu sebanyak 40 % (v/v) terhadap kefir dapat memberikan pengaruh nyata atau tidak ( $p > 0,05$ ).

### 3.3.10. Uji Antioksidan

Uji antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (Dallas *et al.*, 2016). Sampel sebanyak 5 mL dilarutkan dengan 5 mL metanol yang digunakan sebagai larutan induk. Larutan induk 100 ppm dibuat deret sampel dengan konsentrasi 100, 80, 60, 40, 20 ppm. Larutan sampel dengan masing-masing konsentrasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 mL DPPH 40 ppm. Larutan sampel divorteks sampai homogen dan diinkubasi selama 30 menit dalam ruang gelap, lalu diamati perubahan warna dari ungu menjadi kuning. Kemudian, diukur nilai absorbansi larutan sampel dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 512-520 nm. Larutan blanko yang digunakan yaitu 2 mL metanol dan 2 mL DPPH 40 ppm. Presentase nilai inhibisi dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A \text{ blanko} - A \text{ sampel}}{A \text{ blanko}} \times 100$$

### 3.3.11. Uji Antibakteri

Uji antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar. Suspensi bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus* dimasukkan ke dalam 0,9 mL NaCl, lalu divortex dan disamakan dengan standar Mc Farland. Media agar yang telah disiapkan ditambahkan 0,1 mL suspensi bakteri, lalu diratakan dengan diswab. Kemudian diletakkan cakram yang telah ditetesi sampel dan kontrol positif lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Kontrol positif yang digunakan yaitu kloramfenikol 0,0025 g/mL. Zona bening disekitar kertas cakram menunjukkan uji positif. Zona bening yang terbentuk diukur dan dibandingkan dengan antibiotik kloramfenikol (Azizkhani *et al.*, 2020).

### 3.3.12. Identifikasi Peptida Kefir Susu Kambing Etawa

#### 3.3.12.1. Analisis Berat Peptida Dengan *Sodium Dodecyl Sulphate*

##### *Poliacrilimide Gel Electrophoresis*

*Sodium Dodecyl Sulphate Poliacrilimide Gel Electrophoresis* (SDS PAGE) dapat digunakan untuk menentukan berat molekul dari peptida yang akan dianalisis (Mahdi *et al.*, 2017). Sampel protein hasil fermentasi didenaturasi dengan buffer (Tris-HCl 1 M pH 6.8, SDS 20 %, NO<sub>3</sub>) dengan perbandingan protein dan buffer 2:1, dan dididihkan pada suhu 90 °C selama 10 menit serta disentrifugasi selama 5 menit. Alat elektroforesis disiapkan, Gel poliakrilamid dibuat dari larutan akrilamid (48 %) dan bisakrilamid (1,5 %), stacking buffer (Tris-HCl 0,5 M pH 6.8), resolving buffer (Tris-HCl 1,5 M pH 8.8), 10 % SDS, APS dan TEMED sebagai katalis. Setelah gel bagian bawah (*resolving gel*) terbentuk, *stacking gel* dimasukkan di bagian atasnya dan dibuat cetakan untuk menempatkan protein sampel. Elektroforesis sampel dilakukan pada tegangan 150 volt selama 60 menit. Staining protein digunakan *coomassie blue*. Hasil staining dicuci dalam larutan destaining (Clara *et al.*, 2016).

### 3.3.12.2. Analisis *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC)

Analisis kandungan asam amino yang terdapat pada sampel menggunakan metode *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) (Waters, 2012). Sampel sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam *vial head space* 20 mL, kemudian sampel dihidrolisis dengan 10 mL HCl 0,1 N dan dipindahkan ke dalam labu ukur 50 mL. Akuabides ditambahkan ke dalam labu ukur sampai tanda tera lalu dihomogenkan. Larutan uji disaring dengan *syringe filter* 0,2  $\mu\text{m}$  dan fitrat ditampung. Internal standar ditambahkan dan diinjeksikan ke dalam sistem UPLC. Perhitungan kadar asam amino sampel dengan menggunakan rasio area analit dengan internal standar, dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar Asam Amino (ppm, mg/Kg, mg/L)} = \frac{\text{Rasio sampel}}{\text{Rasio Standar}} \times \frac{C_{\text{Std}}}{1000000} \times \text{BM} \times V_a \times \text{FP} \\ \text{W}_{\text{Spl}} \text{ atau } V_{\text{Spl}}$$

BM = berat molekul asam amino (g/mol)

$C_{\text{Std}}$  = konsentrasi larutan standar asam amino (pmol/ $\mu\text{L}$ )

$V_a$  = volume akhir larutan uji ( $\mu\text{L}$ )

FP = faktor pengenceran

$W_{\text{Spl}}$  = berat penimbangan porsi uji (g)

$V_{\text{Spl}}$  = volume pemipetan porsi uji (mL)

### 3.3.12.3. Analisis *Liquid Chromatograph Mass Spectrometry* (LCMS)

Asam amino sistein dan metionin dianalisis menggunakan instrumen LCMS yang dilengkapi dengan *electrospray ionisation* (ESI). Fraksi sampel sebanyak 10  $\mu\text{L}$  di suntikkan ke dalam alat LCMS dan diionisasi dengan mode ESI *electrospray ionization*. Berat molekul sampel dianalisis berdasarkan spektrum massa yang dihasilkan selanjutnya diolah datanya menggunakan metode *protein deconvolution* (Limbad *et al.*, 2023). Perhitungan kadar asam amino sampel dengan menggunakan rasio area analit dengan internal standar, dengan rumus sebagai berikut:

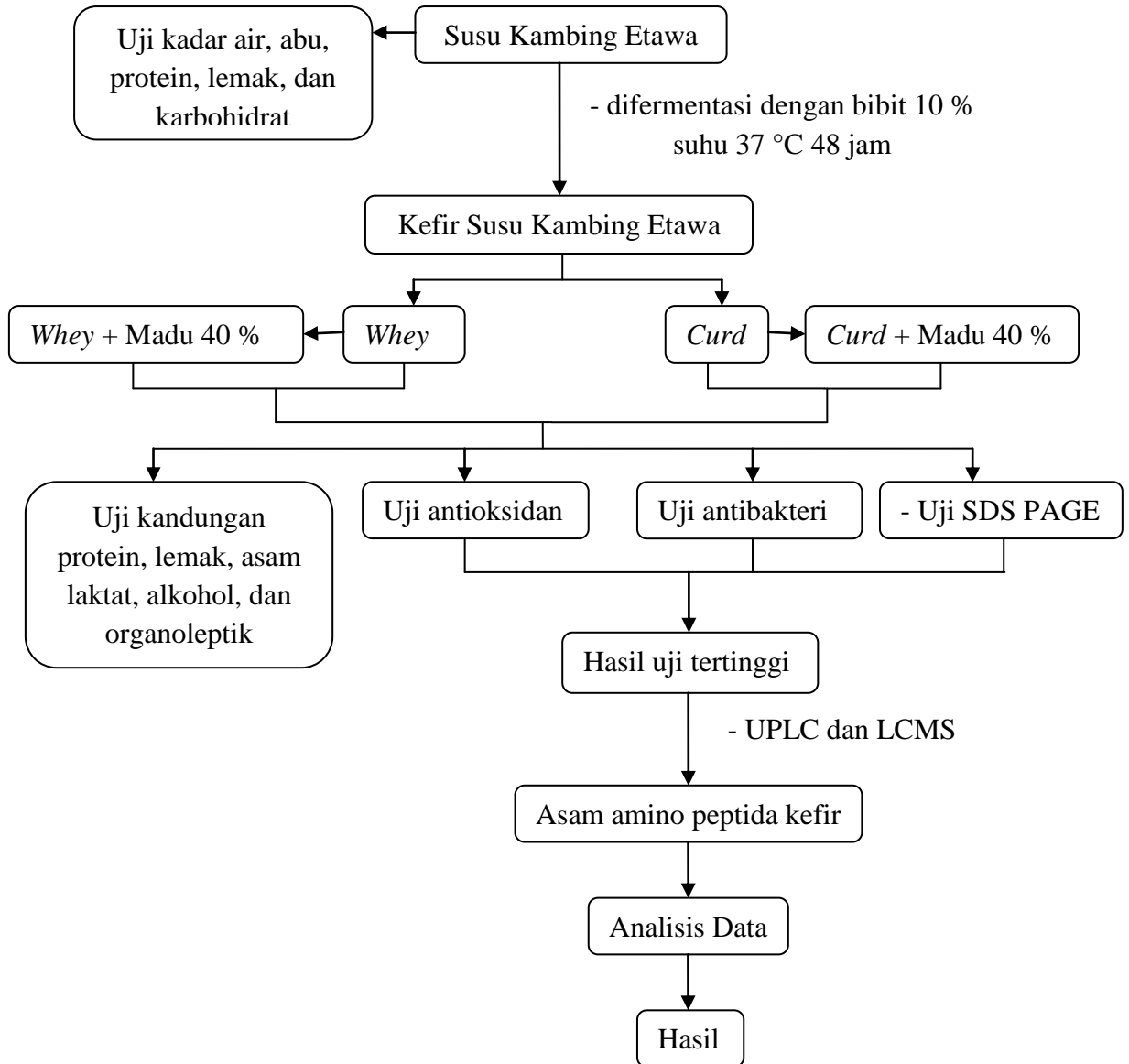
$$\text{Asam amino (mg/kg)} = \frac{(\text{Area} - \text{Intercept})}{\text{Slope} \times \text{FP} \times V_{\text{akhir}} \times \text{Faktor konversi}} \div \text{Bobot sampel}$$

$F_p$  = faktor pengenceran    Faktor konversi = sistein (0,71) dan metionin (0,82)



### 3.4. Diagram Alir Penelitian

Adapun diagram alir keseluruhan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:



Gambar 2. Diagram alir penelitian.

## V. SIMPULAN

### 5.1. Simpulan

Berdasarkan pembahasan yang telah dipaparkan, maka diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Komposisi protein, lemak, total asam laktat, dan alkohol relatif lebih baik pada *curd* kefir yaitu 7,08 %; 1,46 %; 0,93 %; dan 0,45 %. Penambahan madu 40 % (v/v) berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap peningkatan nilai rasa, aroma, tekstur dan warna pada *whey* dan *curd* kefir susu kambing Etawa.
2. Aktivitas antibakteri dan antioksidan pada *curd* kefir susu kambing Etawa memiliki aktivitas lebih tinggi dibandingkan dengan *whey* kefir. Aktivitas antibakteri *curd* terhadap *Bacillus cereus* termasuk kategori antibakteri kuat dan terhadap *Escherichia coli* termasuk kategori antibakteri sedang. Aktivitas antioksidan pada *curd* dengan penambahan madu memiliki  $IC_{50}$  sebesar 40,03 ppm termasuk golongan antioksidan sangat kuat.
3. Berat molekul peptida kefir pada *whey* dan *curd* memiliki tiga pita utama yaitu 10 kDa, 15 kDa, dan 33 kDa. Pada *curd* kefir terdapat satu pita dengan berat 24 kDa yang memiliki intensitas cukup tinggi.

### 5.2. Saran

Penelitian selanjutnya perlu dilakukan pemisahan fraksi peptida agar dapat diketahui urutan asam amino yang berfungsi sebagai antioksidan dan antibakteri.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amorima, F. G., Coitinhob, L. B., Dias, A. T., Friquesa, A. G. F., Monteiro, B. L., Rezended, L. C. D., Pereira, Bianca, T. M. C., Campagnaro, P., Pauwe, E. D., Vasqueza, E. C., and Quinton, L. 2019. Identification of New Bioactive Peptides From Kefir Milk Through Proteopeptidomics: Bioprospection of Antihypertensive Molecules. *Food Chem.* **282**(12), 109–119.
- Andaru, D.P., and Rizqiati, H. 2019. The Effect of Different Fermentation Duration to Total Lactat Acid Bacteria, Alcohol, Total Acidity, and Organoleptic Kefir Whey. *JTP.* **3**(2), 199–203.
- AOAC Association Official Analytical Chemistry. 2015. *Official Method of Analysis Chemist 18<sup>th</sup> Ed.* Horwitz William Publisher. Washington DC.
- Azizkhani, M., Saris, P E J., and Baniasadi, M. 2020. An In-vitro Assessment of Antifungal and Antibacterial Activity of Cow, Camel, Ewe, and Goat Milk Kefir and Probiotic Yogurt. *J. Food Meas. Charact.* **25**(1), 1-9.
- Baari, A. N., Legowo, A. M., dan Murti, T. W. 2003. Fermentasi Sebagai Upaya Menghilangkan Aroma “Prengus” Susu Kambing. *J. Indones. Trop. Anim. Agric.* **28**(4), 230-238.
- Baroni M.V., Chiabrando G. A., Costa C., and Wunderlin D.A. 2002. Assessment of The Floral Origin of Honey By SDS-PAGE Immunoblot Techniques. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1362–1367.
- Bayu, M. K., Rizqiati, H., and Nurwantoro. 2017. Analisis Total Padatan Terlarut, Keasaman, Kadar Lemak, dan Tingkat Viskositas Pada Kefir Optima Dengan Lama Fermentasi Yang Berbeda. *Jurnal Teknologi Pangan*, **1**(2), 33–38.
- Biadala, A and Adzahan, N. M. 2021. Storage Stability of Antioxidant in Milk Products Fermented with Selected Kefir Grain Microflora. *Molecules.* **26**, 1–10.

- Bogdanova, S., Ruoff, K., and Oddo, L. P. 2004. Physicochemical methods for the characterisation of unifloral honeys : a review. *Apidologie*. **35**, 4–17.
- Bottazi, V., Zacconi, C., Sarra, P. G., Dallvalle, P., and Parisi, M. G. 2003. Kefir Microbiologia, Chimica, and Etecnologia. *Lindustria Latte*. **30**, 41–62.
- Brien, K. V. O., Aryana, K. J., Prinyawiwatkul, W., Ordonez, K. M. C., and Boeneke, C. A. 2016. Short Communication : The Effects of Frozen Storage on The Survival of Probiotic Microorganisms Found In Traditionally and Commercially Manufactured Kefir. *J. Dairy Sci.* **99**(9), 7043–7048.
- Caesar, C. A., Hanum, L., dan Cholissodin, I. 2016. Perbandingan Metode Ann-Pso dan Ann-Ga dalam Pemodelan Kandungan Gizi ( Studi Kasus pada UPT Pembibitan Ternak dan Hijauan Makanan Ternak Singosari-Malang ). *JTIHK*. **3**(3), 216–225.
- Ceballos, L. S., Morales, E R., Adarve, G. T., Castro, J. D., MartInez, L P., and Sampelayo, M R S. 2009. Composition of Goat and Cow Milk Produced Under Similar Conditions and Analyzed by Identical Methodology. *J. Food Compos. Anal.* **22**(4), 322–329.
- Chai, K. F., Voo, A. Y. H., and Chen, W. N. 2020. Bioactive Peptides From Food Fermentation : A Comprehensive Review of Their Sources, Bioactivities, Applications , and Future Development. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **9**, 3825–3885.
- Clara, A. S., Nardo, E. F., Anon, M. C., and Scilingo, A. 2016. Amaranth Peptides With Antithrombotic Activity Released by Simulated Gastrointestinal Digestion. *J. Funct. Foods*. **20**, 204–214.
- Dallas, D. C., Citerne, F., Tian, T., Silva, V. L. M., Kalanetra, K. M., Frese, S. A., Robinson, R. C., Mills, D. A., and Barile, D. 2016. Peptidomic Analysis Reveals Proteolytic Activity of Kefir Microorganisms on Bovine Milk Protein. *Food Chem.* **197**, 273–284.
- Diana, L dan Giordan, E. 2020. Peptida Bioaktif Kasein Susu Kambing Sebagai Agen Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. *J. Agroindustri Halal*. **6**(1), 28–38.
- Dianti, E. P. Anjani, G., Rustanti, N., and Panunggal, B. 2018. Nutrition Quality and Microbiology of Goat Milk Kefir Fortified with Vitamin B 12 and Vitamin D 3 during Storage Nutrition Quality and Microbiology of Goat Milk Kefir Fortified with Vitamin B 12 and Vitamin D 3 during Storage. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* **116**, 1–6.

- Ebner, J. Fedorova, M., Hoffmann, R., Kucukcetin, A., and Pischetsrieder, M. 2015. Science Direct Peptide profiling of Bovine Kefir Reveals 236 Unique Peptides Released From Caseins During Its Production by Starter Culture or Kefir Grain. *J. Proteom.* **17**(2), 27-36.
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., and Decker, E. A. 2008. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **48**(5), 430–441.
- Ersan, L. Y., Ozcan, T., Akpınar, B. A., and Sahin S. 2016. The Antioxidative Capacity of Kefir Produced from Goat Milk, *Int. J. Chem. Eng.* **7**(1), 22–26.
- Falcao, S., Afonso, R., Fernandes, M., Alberto, P., Marcos, R., Brandao, P., Antonio, J., Teixeira, C., Lucia, A., Porto, F., Taciana, M., and Cavalcanti, H. 2017. Brazilian Kefir-Fermented Sheep's Milk, a Source of Antimicrobial and Antioxidant Peptides. *Probiotics & Antimicro. Prot.* **17**, 12-21.
- Farag, M. A., Jomaa, S. A., Abd, A. W., and Seedi, H. R. 2020. The Many Faces of Kefir Fermented Dairy Products : Quality Characteristics, Flavour Chemistry, Nutritional Value, Health Benefits, and Safety. *Nutrients.* **12**(346), 1–21.
- Farida, T., Suhartono., dan Kartika, I.R. 2020. Pengaruh Variasi Komposisi Susu Skim Terhadap Kadar Asam Amino pada Yogurt Sari Jagung Manis(Zea mays L. saccharata). *JRSKT.* **9**(1), 33–44.
- Farnworth, E. R. 2005. Kefir – a Complex Probiotic, *Food Sci. Technol. Bull.* **1**, 1–17.
- Gamba, R. R., Yamamoto, S., Hamid, M. A., Sasaki, T., Michihata, T., Koyanagi, T. and Enomoto, T.. 2020. Chemical, Microbiological, and Functional Characterization of Kefir Produced from Cow's Milk and Soy Milk. *Int. J. Microbiol.* **2020**, 1-11.
- Ganatsios, V., Nigam, P., Plessas, S., and Terpou, A. 2021. Kefir as a Functional Beverage Gaining Momentum towards Its Health Promoting Attribute, *Beverages.* **7**, 1–15.
- Gonzalez, J.J., Amil, F., Zazzu, S., Sanchez-Lucas, R., Fuentes-Almagro, C.A., and Rodríguez-Ortega, M J .2019. Proteomic Analysis of Goat Milk Kefir: Profiling The Fermentation Time Dependent Protein Digestion and Identification of Potential Peptides With Biological Activity. *Food Chem.* **295**(5), 456–465.
- Goulding, D.A., Fox, P.F., and O'Mahony, J.A. 2020. Milk Proteins From Expression to Food Chapter 2- Milk Proteins: An Overview (3<sup>rd</sup> ed). Elsevier. Amsterdam.

- Guha, S., Sharma, H., Deshwal, G. K. R., and Rao, P S. 2021. A Comprehensive Review on Bioactive Peptides Derived From Milk and Milk Products of Minor Dairy Species. *J. Food Process.* **3**(1), 145-157.
- Hanum, G. R. 2016. Pengaruh Waktu Inkubasi dan Jenis Inokulum Terhadap Mutu Kefir Susu Kambing. *Stigma.* **9**(2),12–15.
- Hanum, Z., Fitri, C.A., dan Yurliasni. 2021. Goat Milk Kefir With The Addition Ethanol Extract Of Butterfly Pea (*Clitoria ternatea*) Has A Strong Potential As An Antioxidants And Antibacterials. *J. Vet.* **22**(36), 406–413.
- Hardiansyah, A. 2020. Identifikasi Nilai Gizi Dan Potensi Manfaat Kefir Susu Kambing Kaligesing. *J. Am. Coll. Nutr.* **9**(3), 208–214.
- Heyman, M. B. Lactose Intolerance in Infants, Children, and Adolescents. *Pediatrics.* 118(3), 1279-1286.
- Ibrahim, S. A., Gyawali, R., Awaisheh, S.S., Ayivi, R.D., Silva, R.C., Subedi, K., Aljaloud, S.O., Anusha, Siddiqui. S., and Krastanov, A. 2021. Fermented Foods and Probiotics: An Approach to Lactose Intolerance. *J. Dairy Sci.* **88**(1), 357–365.
- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., and Sansawa, H. 2003. Blood pressure Lowering Effect Of A Novel Fermented Milk Containing  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in Mild Hypertensives. *Eur. J. Clin. Nutr.* **57**, 490.
- Jamarun, N., Welan, R., Arief, A., Yanti, G., and Pazla, R. 2022. Nutrition Evaluation of Etawa Crossbreed Dairy Goat's Milk as Human Food to Increase Immunity During The Covid-19 Pandemic. *ICHB 2021.* **47**, 114–118.
- Jaya, F., Purwadi., dan Widodo, W N. 2017. Penambahan Madu Pada Minuman Whey Kefir Ditinjau Dari Mutu Organoleptik, Warna, dan Kekeruhan, *JITEK.* **12**(1), 16–21.
- Julianto, B., Rossi, E., and Yusmarini. 2016. Chemical and Microbiology Characteristics of Kefir. *JOM Faperta.* **3**(1), 1–9.
- Kesekas, H., Dinkci, N., Seckin, K., and Kinik, O. 2011. Antioxidant Properties of Kefir Produced from Different Cow and Soy Milk Mixtures, *J. Agric. Sci.* **17**(2), 253–259.
- Khaira, K. 2010 Menangkal Radikal Bebas dengan Antioksidan, *JPS.* **2**(2),183-187.
- Kinteki, G.A., Rizqiati, H. dan Hintono, A. 2018. Pengaruh Lama Fermentasi Kefir Susu Kambing Terhadap Mutu Hedonik, Total Bakteri Asam Laktat (BAL), Total Khamir, dan pH. *JTP.* **3**(1), 42–50.

- Koopman, R., Crombach, N., Gijsen, A. P., Fauquant, J., Kies, A. K., Lemosquet, S., Saris, W H M., Boirie, Y., and Loon, L J C V. 2009. Ingestion of a Protein Hydrolysate is Accompanied by an Accelerated In vivo Digestion and Absorption Rate when Compared with Its. *Am. J. Clin. Nutr.* **1**(2), 106–115.
- Kristiandi, K., Lusiana, S A., Ayunin, N A Q Ramdhini, R N., Marzuki, I., Rezeki, S., Erdiandini, I, Yuniarto, A E., Lestari, S D., Ifadah, R A, Kushargina, R., Yuniarti, T., dan Pasanda, O S R. 2021. *Teknologi Fermentasi*. Yayasan Kita Menulis. Medan.
- Kustiawan, E., Purnomo, H., dan Radiati, L. E. 2010. Pengaruh Pemanasan Dan Lama Penyimpanan Pasca Fermentasi Terhadap Konsentrasi Laktoferin Susu Kambing dan Kefir. *JITEK.* **5**(2), 1–8.
- Ladesma, B. H., Cobtreras, M., and Recio. 2004. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity in Commercial Fermented Products. Formation of Peptides under. *Agric. Food Chem.* **7**(5), 1504–1510.
- Lengkey, H.A.W., Siwi, J.A., and Balia, R.L. 2013. The Effect of Various Starter Dosages on Kefir Quality. *Lucrari Stiintifice-Seria Zootehnie.* **59**, 113–116.
- Lestari, I. 2015. Pengaruh Penambahan Susu, Madu, Minuman Bersoda dan Minuman Energi Terhadap Kadar Alkohol Pada Minuman Keras. *J Kes Prim.* **1**(1), 1383–1390.
- Limbad, M., Gutierrez Maddox, N., Hamid, N., Kantono, K., Liu, T., and Young, T. 2023. Microbial and Chemical Changes during Fermentation of Coconut Water Kefir Beverage. *Appl. Sci.* **13**. 7257.
- Madureira A. R, Tavares, T., and Gomes A.M.,. 2010. Invited Review: Physiological Properties of Bioactive Peptides Obtained From Whey Proteins. *J Dairy Sci.* **93**, 437–455
- Mahdi, C., Untari, H., dan Erika, M. 2019. Identification and Characterisation of Bioactive peptides of Fermented Goat Milk as a Sources of Natural Product For Medicine. *SIHC.* 109–114.
- Mahdi, C., Untari, H., and Padaga, M. C. 2017. Identification and Characterization of Bioactive Peptides of Fermented Goat Milk as a Sources of Antioxidant as a Therapeutic Natural Product. *Int. Conf. Chem. Material Sci.* **299**, 1-7.
- Magalhaes, K T., Pereira, G V M., Campos, C R., Dragone, G and Schwan, R F. 2011. Brazilian Kefir: Structure, Microbial Communities and Chemical Composition. *Braz. J. Microbiol.* **42**, 693–702.
- Mangga, M., Tambipi, S., and Arwati, N. 2019. The Effects of Adding Forest Honey on The Quality of Sweet Corn (*Zea mays l*) Yogurt. *Jurnal Ilmiah dr Aloe Saboe*, 8(1)

- Martharini, D dan Indratiningsih, I. 2017. Kualitas Mikrobiologis dan Kimiawi Kefir Susu Kambing dengan Penambahan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 dan Tepung Kulit Pisang Kepok (*Musa paradisiaca*). *Agritech*. **37**(1), 22–29.
- Mardhiati, R., Marliyati, S.A., Martianto, D., Madanijah, S., dan Wibawan, W.T. 2020. Karakteristik dan Beberapa Kandungan Zat Gizi Pada Lima Sampel Madu Yang Beredar di Supermarket. *Indones.J. Nutrition Assoc.* **43**(1), 49–56.
- Mariam, S.H. 2021. Isolation and Characterization of Gram-Negative Bacterial Species from Pasteurized Dairy Products : Potential Risk to Consumer Health. *J. Food Qual.* **21**, 3–12.
- Mechmeche, M., Ksontini, H., Hamdi, M., and Kachouri, F. 2019. Production of Bioactive Peptides In Tomato Seed Protein Isolate Fermented by Water Kefir Culture: Optimization of The Fermentation Conditions. *Int J Pept Res Ther.* **25**(1), 137–150.
- Mukhlisah, A. N and Irfan, M. 2023. Amino Acid Content of Dangke With Different Levels of Papain Enzyme and Heating Duration. *NHJ.* **2**(9), 185–190.
- Molyneux, P. 2004. The Use of Stable Free Radikal Diphenyl Picrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *J. Science of Technology.* **26** (2), 211-219.
- Nayak, M. B., Kerr, W., Greenfield, T. K., and Pillai, A. 2008. Not All Drinks Are Created Equal : Implications for Alcohol Assessment in India. *Alcohol Alcohol.* **43**(6), 713–718.
- Nielsen, S.S. 2010. *Food Analysis Laboratory Manual 2nd Edition*. Springer. New York.
- Ningsih, F dan Haris, M.I. 2022. Kualitas Organoleptik dan Kadar Antioksidan Kefir Susu Kambing dengan Penambahan Jus Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*) Level Berbeda. *JPLTrop.* **5**(1), 17–20.
- Nurhasanah, Sadewi, S. M., Supriyanto., dan Laila, A. 2019. Analisis Kadar Protein, Lemak, dan Total Asam Laktat Dari Fermentasi Kefir Berbahan Baku Kolostrum Sapi. *Analit.* **4**(2), 30–41.
- Padauleng, A ., Anwar, M., Maruddin, F., Yuliati, F N., and Tashi J.. 2021. The Physiochemical Properties of Kefir Using Honey Concentrations. *Food Sci. Nutr.* **4**(1), 8–16.
- Pan, X., Chen, F., Wu, T., Tang, H., and Zhao, Z. 2009. The acid, Bile tolerance and antimicrobial propertie of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *J Food Cont.* **20**, 598-602.



- Park, Y. W., Ju, M., Ramos, M., and Haenlein, G. F. W. 2007. Physico-Chemical Characteristics of Goat and Sheep Milk. *Small Rumin. Res.* **68**(2), 88–113.
- Pogacic, T., Sinko, S., Zamberlin, S., and Samarzija, D. 2013. Microbiota of Kefir Grains. *Mljekarstvo.* **63**(1), 3–14.
- Purwaningsih, Sulasmi, Djaafar, T F., dan Marwati, T. 2019. Sifat Organoleptik Kefir Susu Kambing Peranakan Etawa: Pengaruh Level Granula Kefir Komersial dan Sukrosa. *Agroista.* **3**(2), 149–159.
- Putu, N., Hastuti, E. D., and Widodo, S. S. A., 2017. Kualitas Madu Lokal dari Beberapa Wilayah di Kabupaten Temanggung The Local Honey Quality of Some Areas in Temanggung. *J. Anatomi FIS.* **2**(1), 58–66.
- Rahayu, W. E., Sa'diyah, S. H., dan Romalasari, A. 2020. Pengaruh Waktu Aplikasi dan Konsentrasi Penambahan Sari Buah Jambu Biji Merah (*Psidium guajava L.*) Terhadap Kefir Susu Kambing. *Agromix.* **11**(1), 1–8.
- Reddy, E. A., Shaw, A. V., and Crump, J. A. 2012. Community-acquired Bloodstream Infections In Africa: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Lancet Infect Dis.* **10**, 417–432.
- Ricci-cabello, I., Herrera, M. O., and Artacho, R. 2012. Possible Role of Milk-Derived Bioactive Peptides In The Treatment and Prevention of Metabolic Syndrome. *Nutr. Rev.* **70**(4), 241–255.
- Rio, Y. B. P., Djamal, A., dan Asterina. 2012. Penelitian Perbandingan Efek Antibakteri Madu Asli Sikabu dengan Madu Lubuk Minturun terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara In Vitro. *J. Kesehat. Masy. Andalas.* **1**(2), 59–62.
- Rizqiati, H., Nurwantoro., Febrisiantosa, A., Shauma, C.A., dan Khasanah, R. 2020. Pengaruh Isolat Protein Kedelai Terhadap Karakteristik Fisik dan Kimia Kefir Bubuk. *JPA.* **8**(3),111–121.
- Rizqiati, H., Susanti, S., Nurwantoro, Albaarri, A. N., dan Slamet, Y.B. (2021) Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kualitas Fisik dan Kimia Kefir Whey Susu Kambing. *Warta IHP.* **38**(1),54-60.
- Rubak, Y T., Nuraida, L., Iswantini, D., Prangdimurti, E., and Sanam, M U E. 2021. Peptide Profiling of Goat Milk Fermented by *Lactobacillus delbrueckii ssp. delbrueckii* BD7 : Identification of potential biological activity. *Biodiversitas.* **22**(8), 3136–3145.
- Rusdiana, S., Praharani, L. and Sumanto, S. 2016. Kualitas Dan Produktivitas Susu Kambing Perah Persilangan Di Indonesia. *JPPP.* **34**(2), 79–85.
- Safitri, M. F dan A. Swarastuti. 2013. Kualitas Kefir Berdasarkan Konsentrasi Kefir Grain. *J. Apl. Teknol. Pangan.* **2**(2), 1-6.

- Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F. and Castelli, F. 1995. Flavonoids as Antioxidant Agents: Importance of Their Interaction with Biomembranes. *Free. Radic. Biol. Med.* **19**(4), 481–486.
- Septiana, A. 2019. *Karakteristik Peptida Bioaktif Antioksidan dari Hidrolisat Protein Susu Kedelai*. Skripsi. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Shamsudin, S., Selamat, J., Shomad, M. A., Faris, M., Aziz, A. M., Akanda, J. H. 2022. Antioxidant Properties and Characterization of Heterotrigena itama Honey from Various Botanical Origins according to Their Polyphenol Compounds. *J. Food Qual.* **22**(7), 1-14.
- Silva, Y. P., Bernardi, A and Frozza, R.L. 2020. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut Brain Communication. *Front.Endocrinol.* **11**(25).
- Slavin, Y. N, Asnis, J, Hafeli, U. O., Bach, H. 2017. Metal Nanoparticles: Understanding The Mechanisms Behind Antibacterial Activity. *J Nanobiotechnology.* **15**(1), 65-74.
- Soenarno, M. S., Polii, B. N., Febriantosa, A., dan Hanifah, R. 2013. Identifikasi Peptida Bioaktif dari Olahan Susu Fermentasi Tradisional Indonesia Sebagai Bahan Pangan Fungsional Untuk Kesehatan. *Ilmu Produksi dan teknologi hasil Peternakan.* **1**(3), 191–195.
- Sulmiyati., Said, N. S., Fahrodi, D. U., Malaka, R., dan Fatma. 2018. Perbandingan Kualitas Fisiokimia Kefir Susu Kambing dengan Kefir Susu Sapi. *Veternier.* **19**(2), 263–268.
- Sulmiyati, Said, N. S., Fahrodi, D U., Malaka, R., and Fatma.. 2019. Assessment of The Antibacterial Activity of Goat Milk Kefir on *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Salmonella enteric subsp. Enterica serovar typhimurium* ATCC 14028 using a Well Diffusion Method Assessment of The Antibacterial Activity of Goat Milk Kefir. *ICAST.* **1**, 1-10.
- Tagliazucchi, D., Martini, S., and Solieri, L. 2019. Bioprospecting For Bioactive Peptide Production by Lactic Acid Bacteria Isolated From Fermented Dairy Food. *Fermentation.* **5**(4), 1-34.
- Taniguchi, M., Aida, R., Saito, K., Ochiai, A., Takesono, S., and Saitoh, E. 2018. Identification and Characterization of Multifunctional Cationic Peptides From Traditional Japanese Fermented Soybean Natto Extracts. *J. Biosci. Bioeng.* **127**(4), 472–478.
- Taylor, P., Guzel-seydim, Z. B., Koktas, T., Greene, A. K., and Seydim, A. C. 2013. Review : Functional Properties of Kefir Review : Functional Properties of Kefir. *Nature.* **5**(4), 37–41.
- Wilson, K and Walker, J. 2000. *Principle and Technique of Practical Biochemistry* Edisi ke- 5. Cambridge University Press. London.

- Vardjan, T., Lorbeg, P. Mohar., Rogelj, I., and Manjhenic, A. C. 2013. Characterization and Stability of *Lactobacilli* And Yeast Microbiota In Kefir Grains. *J. Dairy Sci.* **96**, 1–8.
- Yirmibesoglu, S. S. S., and Ozturk, B. E. T. 2020. Comparing Microbiological Profiles, Bioactivities, and Physicochemical and Sensory Properties of Donkey Milk Kefir and Cow Milk Kefir. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* **44**(4), 774–781.
- Yurliasni, Hanum, Z., dan Hikmawan, R. 2019. Potensi Madu dalam Meningkatkan Kualitas Kefir. *JITEK*.**14**(1), 50–59.
- Zakaria, Y., Helmy, M.Y., dan Safara, Y. 2011. Analisa Kualitas Susu Kambing Etawa Yang Disterilkan Pada Suhu dan Waktu Yang Berbeda. *Agripet.* **11**(1), 29-31.
- Zong, C., Zhang, X., Yang, F., Zhou, Y., Chen., and Yang, Z. 2019. Biotransformation of a Crizotinib Intermediate Using a Mutant Alcohol Dehydrogenase of *Lactobacillus* Kefir Coupled With Glucose Dehydrogenase. *Prep Biochem Biotech.* **13**(4), 1–6.