

## **Karakterisasi dan Uji Aktivitas Protein Susu Kerbau (*Bubalus bubalis*) Fermentasi sebagai *Angiotension Converting Enzyme (ACE) Inhibitor***

### **(Characterization and Angiotension Converting Enzyme ACE-inhibitory activity of Fermented Buffalo Milk (*Bubalus bubalis*))**

SRI YADIAL CHALID<sup>1\*</sup>, SITI NURBAYTI<sup>2</sup>, ANDHIKA FAJAR PRATAMA<sup>2</sup>

**Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah  
Jakarta, Jl. Ir. H. Djuanda No. 95. Ciputat, Tangerang Selatan 15412.**

**Diterima 21 Mei 2018, Disetujui 10 September 2018**

**Abstrak:** Protein dan peptida tertentu bahan pangan dapat mencegah penyakit hipertensi melalui penghambatan aktivitas *Angiotensin Converting Enzyme (ACE)* atau sebagai ACE inhibitor. Susu kerbau fermentasi atau dadih berpotensi dikembangkan menjadi pangan fungsional sebagai antihipertensi. Penelitian ini bertujuan menentukan waktu fermentasi yang optimum berdasarkan karakteristik fisik dan kualitas kimia yaitu keasaman, kadar protein, derajat hidrolisis dan aktivitas ACE inhibitor. Susu kerbau difermentasi secara spontan selama 0, 1, 2, 3, dan 4 hari, nol hari sebagai kontrol. Protein dadih diekstrak dengan etanol dan difraksinasi menggunakan membran ultrafiltrasi dengan bantuan sentrifugasi dan hasil fraksinasi diuji sebagai ACE inhibitor. Fraksi protein dengan aktivitas inhibitor ACE tertinggi dianalisa komposisi asam amino dengan menggunakan *ultra performance liquid chromatography*. Hasil yang didapatkan adalah waktu fermentasi terbaik adalah 1 hari dengan kadar protein terlarut adalah 912,73 ppm dan aktivitas inhibitor ACE sebesar 87,52% dan derajat hidrolisis 23,38%. Hasil fraksinasi berdasarkan bobot molekul didapatkan nilai ACE inhibitor tertinggi pada fraksi dibawah 3 kDa dengan kemampuan ACE inhibitor sebesar 99,3%. Komposisi asam amino yang didapatkan adalah treonin 0,0249%, prolin 0,039%, alanin 0,045%, fenil alanin kecil dari 0,012% dan asam glutamat 0,158%. Secara umum disimpulkan bahwa dadih mampu menghambat aktivitas ACE dan berpotensi dikembangkan menjadi pangan fungsional.

**Kata kunci:** Dadih, fermentasi, ACE inhibitor, ultrafiltrasi.

**Abstract:** Specific food protein and peptides could prevent hypertension pass through mechanism of inhibition of enzyme activity of angiotensin converting enzyme (ACE) or ACE inhibition. Fermented buffalo milk or dadih has the potential to be developed into antihypertensive food. The purpose of this study was to investigate optimum fermentation time based on characteristics, measure the acidity of dadih, protein extraction, degree of hydrolysis, dissolved protein level and the activity of ACE inhibition. Protein extract was fractionated using ultrafiltration membrane assisted with centrifuge and then do the activity of ACE inhibition as ACE inhibitor. Buffalo milk was fermented for 0, 1, 2, 3 and 4 days, zero day as a control. Protein of dadih was extracted using alcohol solution then was fractionated. The fraction that has the highest the activity was analyzed their amino acid composition using ultra performance liquid chromatograph. The result are the best fermentation time during one day, dissolved protein levels was 912.73 ppm, and the highest ACE inhibitor activity was 87.52% and the degree of hydrolysis was 23.38%. Fractionation results based on molecular weight was below 3 kDa, this molecule have the highest ACE inhibitor activity was 99.3%. The amino acid composition that we got was threonine (0.0249%), proline (0.039%), alanine (0.045%), phenyl alanine smaller than 0.012% and glutamic acid 0.158% respectively. We conclude that dadih can inhibit ACE activity and it has the potential to be developed into functional food.

**Keywords:** Dadih, fermentation, ACE inhibitor, ultrafiltration.

\*Penulis korespondensi: Hp :081380142169

Email: sri.yadial@uinjkt.ac.id

## PENDAHULUAN

HIPERTENSI atau tekanan darah tinggi, termasuk penyakit kardiovaskuler yang banyak menelan korban yaitu sekitar 12,8% dari kematian seluruh dunia<sup>(1)</sup>. Prevalensi hipertensi Nasional berdasarkan Riskesdas 2013 didapatkan sebesar 25,8%, dimana penderita tertinggi ditemukan pada Kepulauan Bangka Belitung (30,9%), sedangkan terendah di Papua sebesar (16,8%)<sup>(2)</sup>. Obesitas, jenis kelamin, riwayat merokok merupakan faktor yang meningkatkan kasus hipertensi<sup>(3)</sup>.

Penatalaksanaan hipertensi dapat dilakukan dengan menggunakan obat-obatan ataupun dengan cara modifikasi gaya hidup<sup>(2)</sup>. Pengobatan hipertensi dengan obat sintetik seperti hidroklorotiazid, kaptopril dan amlodipin merupakan langkah yang efektif, namun obat tersebut mempunyai efek samping seperti sakit kepala, edema pada pergelangan kaki, mual dan peningkatan air seni<sup>(4)</sup>. Pangan fungsional merupakan salah satu alternatif yang aman untuk menjaga tekanan darah tidak naik. Pangan fungsional antihipertensi banyak dikembangkan dari bahan pangan berbasis susu fermentasi<sup>(5)</sup> dan kacang-kacangan<sup>(6)</sup>.

Penduduk Jepang memiliki usia terpanjang di dunia karena mereka menjaga diet seimbang. Sebagian besar penduduk Bulgaria berumur panjang karena kebiasaan mereka konsumsi yogurt sebagai pangan fungsional<sup>(7)</sup>. Klaim suatu pangan mempunyai sifat fungsional harus dibuktikan secara ilmiah baik secara *in vitro* dan *in vivo*<sup>(8)</sup>. Dadih atau susu kerbau fermentasi dapat dikembangkan menjadi pangan fungsional antihipertensi, namun harus dibuktikan dengan penelitian secara *in vitro* dan *in vivo*. Dadih merupakan kearifan lokal khas dari Sumatra Barat dan Riau.

Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa dadih bebas lemak secara *in-vitro* terbukti bersifat sebagai antioksidan yaitu dapat menangkal radikal 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) dengan konsentrasi 44,86 ppm<sup>(9)</sup>. Bakteri yang terlibat pada fermentasi susu kerbau adalah bakteri asam laktat (BAL) indigenus, dari strain *Lactobacillus plantarum* IS-10506 yang berasal dari tabung bambu dan daun pisang sebagai penutup dadih. *L. plantarum* dapat mengasimilasi kolesterol dan mendekonyugasi garam empedu, yaitu lebih besar dibandingkan BAL dari yoghurt. *L. plantarum* IS-10506 juga menunjukkan kemampuan menekan pertumbuhan bakteri patogen dengan signifikan sehingga BAL dadih berpotensi dimanfaatkan sebagai probiotik. Sebanyak 36 strain BAL ditemukan pada dadih berasal dari genus *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, dan *Lactococcus*<sup>(10,11,12)</sup>.

Sepuluh strain BAL dadih bersifat asam dan toleran terhadap asam empedu secara *in-vitro* sehingga strain ini berpotensi sebagai antimutagenik dan hipokolesterolemik<sup>(11,13)</sup>. Penelitian terkait protein dan peptida bioaktif dari bahan pangan fermentasi seperti susu telah banyak dilakukan, dimana sifat fungsional susu ditemukan pada protein kasein dan *whey*<sup>(14,15)</sup>. Penelitian yang terkait dengan karakter protein atau peptida serta potensi dadih sebagai minuman fungsional antihipertensi belum ada yang melaporkan.

Sifat bioaktif peptida dari susu sebagai antihipertensi diperankan oleh protein kasein yang mempunyai aktivitas penghambatan *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE). Sekuen asam amino sebagai agent antihipertensi adalah Phe-Pro-Glu-Val-, Phe-Glu-Lys-, Asn-Leu-His-Leu-Pro-, Leu-Pro-Leu-Leu, Leu-Asn-Val-Pro-Gly dan glu- Ile-Val-glu<sup>(16)</sup>. Peptida antihipertensi bertindak sebagai inhibitor ACE, yaitu enzim sistem renin-angiotensin. ACE mengubah angiotensin I menjadi angiotensin II, penghambatan ACE mempunyai efek antihipertensi melalui penurunan angiotensin II dan peningkatan bradikinin<sup>(17)</sup>.

Inhibitor ACE sintetik seperti Captopril® dan Lisinopril® dapat meningkatkan bradikinin dan mereduksi angiotensin II, namun penggunaan obat antihipertensi sintetik yang dikonsumsi secara rutin dalam jangka waktu lama memberikan efek samping seperti buang air kecil terlalu sering, tubuh terasa lemas dan ingin pingsan, serta denyut jantung yang abnormal<sup>(18)</sup>. Sebanyak 36% pasien mengeluhkan efek samping katopril dan sebanyak 45% untuk obat amlodipin<sup>(19)</sup>.

Bakteri asam laktat memiliki sistem proteolitik yang menghidrolisis protein susu menghasilkan peptida aktif sebagai ACE inhibitor<sup>(20)</sup>. Peptida ACE inhibitor atau antihipertensi yang berasal dari susu biasanya mengandung 10 asam amino dan mayoritas bersifat sebagai ACE inhibitor sedang (moderat) dengan rentang IC<sub>50</sub> sebesar 100-500 µmol/L<sup>(21)</sup>, dan berasal dari strain spesifik<sup>(22)</sup>. Penelitian ini untuk mengangkat dadih mejadi pangan atau minuman fungsional antihipertensi. Dadih merupakan kearifan lokal dari Sumatra Barat, klaim dadih sebagai minuman fungsional antihipertensi perlu didukung oleh data ilmiah secara *in vitro* dan *in vivo*.

Susu kerbau difermentasi secara spontan dalam tabung bambu dengan variasi waktu fermentasi 0, 1, 2, 3 dan 4 hari. Pemilihan waktu fermentasi pada penelitian ini didasarkan pada tradisi konsumsi dadih di daerah Bukittinggi dan bentuk fisik dadih (warna, rasa dan kekentalan). Umumnya masyarakat Sumatra Barat menyukai dadih yang difermentasi 1 sampai 6 hari. Warna dadih yang disukai adalah dadih

dengan warna putih-butek sampai kuning-butek. Warna dan kekentalan dadih untuk masing-masing waktu fermentasi berbeda-beda, begitu juga tingkat keasaman serta citarasa.

Tujuan penelitian ini adalah menentukan waktu fermentasi terbaik berdasarkan bentuk fisik meliputi warna dan bau, rasa dan kekentalan dilanjutkan mengukur tingkat keasaman, derajat hidrolisis, ekstraksi protein, penentuan kadar protein terlarut dan kemampuan ekstrak protein untuk menghambat ACE. Dadih dengan nilai ACE maksimal dilakukan uji proksimat yang meliputi analisa kadar air, abu, lemak dan protein, kemudian dilakukan fraksinasi protein dengan membran ultrafiltrasi untuk dadih dengan kadar protein dan derajat hidrolisis tertinggi.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah susu dari satu ekor kerbau betina yang berusia  $\pm 4$  tahun, kerbau berasal dari peternak kerbau di desa Gaduik, Bukittinggi, Sumatra Barat. Susu kerbau difermentasi secara spontan di dalam tabung bambu selama 1, 2, 3, 4 hari, dan nol hari sebagai kontrol. Bahan kimia yang digunakan adalah enzim *Angiotension Converting Enzyme* (ACE) dari paru-paru kelinci dari Sigma-Aldrich (EC 3.4.15.1, 1U/mg-1), *hippuryl-histidyl-leucine* (Hip-His-Leu) dari Sigma-Aldrich, hidrogen klorida (HCl), natrium hidroksida (NaOH) dari Merck, alkohol absolut dari Merck, *bovine serum albumin* (BSA) dari Sigma-Aldrich, *Trichloro Asetat Acid* (TCA), *coomasie brilliant blue G-250* dari Merck,  $\alpha$  *Aminobutyric Acid* (AABA) dari Sigma-Aldrich. Bakteri asam laktat (BAL) yang terdapat pada dadih adalah bakteri indigenus dari strain *Lactobacillus plantarum* IS-10506 dan dari genus *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, dan *Lactococcus*.

**Alat.** Peralatan yang digunakan adalah spektrofotometer UV-VIS (Parkin Elmer, tipe Lamda 25) *freeze dryer* alpha 1-2 Ldplus dari Martin Christ, *freezer-Hard-20 °C* tipe *upright* dari Lloyd, pH meter dari Sigma, timbangan analitik Ohaus model PA214, *vortex-mixer* 110 V MX-F, termometer air raksa, blender Philips HR 2116, membran filtrasi (Amicon Centricon Ultra 15 *cut-off* 100, 50, 30, 10 dan 5 kDa), alat gelas laboratorium, mikropipet 5  $\mu$ L hingga 1000  $\mu$ L dari Socorex, kertas saring Whatman No.1, kertas saring biasa, *shaking water bath* tipe SWBR17, evaporator, UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography* dari Waters dengan kondisi: kolom ACCQ-TagUltra C18, suhu 49 °C, fase gerak; sistem komposisi gradient dengan laju alir 0,7 mL/menit, detektor PDA panjang gelombang 260 nm dan

volume injeksi 1  $\mu$ L.

**METODE.** Penelitian ini terbagi menjadi empat tahap. Tahap pertama adalah fermentasi susu kerbau. Pemilihan waktu fermentasi terbaik berdasarkan karakter dadih dilakukan oleh 10 orang panelis tidak terlatih. Tahap kedua adalah pengukuran tingkat keasamaan dadih, ekstraksi protein. Tahap ketiga adalah uji derajat hidrolisis, uji proksimat untuk dadih dengan kadar protein tertinggi. Tahap keempat adalah uji ACE inhibitor, fraksinasi dengan membran ultrafiltrasi dan analisis komposisi asam amino.

**Fermentasi Susu Kerbau.** Susu kerbau diperah dari satu ekor kerbau betina yang sedang laktasi. Susu kerbau dituangkan ke dalam tabung bambu sebagai wadah dan difermentasi secara spontan (tanpa *starter* bakteri) masing-masing selama 0, 1, 2, 3, 4 hari (n=3). Sebanyak 180-200 mL susu kerbau (Tabel 1). Tabung bambu terlebih dahulu dibersihkan dengan kain bersih sebelum dimasukkan susu kerbau.

**Tabel 1. Lama fermentasi dan volume susu kerbau dalam tabung bambu.**

| Lama fermentasi (hari) | Volume susu kerbau (mL) | Kode sampel |
|------------------------|-------------------------|-------------|
| 0                      | 180 $\pm$ 0,707         | Kontrol (K) |
| 1                      | 180 $\pm$ 1,414         | S1          |
| 2                      | 197 $\pm$ 0,707         | S2          |
| 3                      | 200 $\pm$ 0,707         | S3          |
| 4                      | 180 $\pm$ 1,414         | S4          |

Ket: K = kontrol, S= dadih

Pemerahan susu kerbau dilakukan setiap hari pada pukul 07.00-08.00 selama 5 hari berturut-turut. Ambing susu kerbau dibersihkan dengan kain bersih yang sudah dibasahi dengan air hangat. Pakan kerbau selama proses pemerahan adalah rumput dan daun jagung muda. Waktu fermentasi susu kerbau selama 0, 1, 2, 3 dan 4 hari. Hari ke-0 merupakan kontrol, yaitu tanpa fermentasi dimana susu kerbau perahan langsung disimpan ke dalam *freezer*. Susu kerbau yang difermentasi 1 hari dihentikan fermentasi tepat pada jam 08.00 keesokan harinya dengan cara menyimpan dadih ke dalam *freezer*. Sampel dengan variasi fermentasi 2 hari dan selanjutnya dilakukan dengan hal yang sama yaitu fermentasi dihentikan pada dua, tiga dan empat hari setelah susu dimasukkan ke dalam bambu. Masing-masing sampel diberi kode S dan K untuk kontrol.

**Keasaman Dadih (AOAC 2005).** pH sampel diukur menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan buffer pH 4,0 dan pH 7,0 sesuai kisaran yogurt. Ditimbang sebanyak 10

gram dadih dimasukkan ke dalam beker gelas dan tambahkan akudes mencapai volume 10 mL sambil dihancurkan. Elektroda pH meter dicelupkan ke dalam media dadih dan ditunggu hingga skala pH meter stabil untuk mendapatkan nilai keasaman yang akurat.

**Analisis Komposisi Kimia Dadih (Uji Proksimat).** Meliputi kadar air, abu, lemak dan protein<sup>(23)</sup>.

**Ekstraksi Protein Terdiri Dari Tahapan. Deffacting (Pembebasan Lemak).** Penghilangan lipid dilakukan dengan cara merendam dadih dengan larutan *n*-heksan dengan perbandingan 1:5 (sampel:*n*-heksan) selama 1 jam pada suhu kamar sambil diaduk. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 8000xg, selama 15 menit, suhu 4 °C. Supernatan dibuang dan endapan diulangi proses penambahan heksan sambil diaduk dan disentrifuse (8000xg, 15 menit, 4 °C). Tepung bebas lemak dikumpulkan dan dikering anginkan untuk membebaskan sisa heksan sehingga didapatkan tepung dadih<sup>(24)</sup>.

**Ekstraksi Protein.** Ekstraksi protein dadih dilakukan dengan menggunakan larutan etanol secara bertingkat. Tepung dadih bebas lemak sebanyak 5 g disuspensikan ke dalam 100 mL etil alkohol absolut dimana protein tidak larut dalam etanol absolut. Presipitat dikumpulkan melalui sentrifugasi pada 6000 g, selama 15 menit dan 4 °C. Presipitat disuspensikan kembali ke dalam 100 mL etil alkohol 70%, lalu divortek sampai larut dan dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 6000 g, selama 15 menit dan suhu 4 °C. Supernatan (fraksi larut etil alkohol 70%) dikumpulkan dan diuapkan dengan evaporator berputar, dikering bekukan sehingga didapatkan ekstrak atau hidrolisat protein dadih<sup>(25)</sup>.

**Penentuan Derajat Hidrolisis (DH).** Derajat hidrolisis dihitung dengan metode SN-TCA<sup>(26)</sup>. Sebanyak 20 mg hidrolisat dadih ditambahkan 20 mL TCA 10% (b/v) dan divortek. Campuran kemudian didiamkan selama 30 menit agar terjadi pengendapan, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7.800 rpm, selama 15 menit. Supernatan dianalisis kadar nitrogen menggunakan metode Kjeldahl<sup>(23)</sup>. Derajat hidrolisis

$$\text{Derajat Hidrolisis (\%)} = \frac{\text{Nitrogen terlarut dalam 10\% TCA}}{\text{Nitrogen total sampel}} \times 100\%$$

dihitung dengan rumus:

**Uji Kadar Protein Terlarut.** Sampel hidrolisat dadih 0,5 mg dilarutkan dengan 100 mL dengan akuades, divortek sampai larut dan disaring dengan kertas saring dan diambil filtrat. Sebanyak 100 µL filtrat protein ditambahkan dengan 5 mL reagen *Bradford*, diaduk dan biarkan selama 5 menit sampai 1 jam (warna biru stabil dalam range waktu ini). *Bovine*

serum albumin (BSA) digunakan sebagai standar<sup>(27)</sup>.

**Fraksinasi Protein.** Hidrolisat protein dadih dengan kadar protein optimal difraksinasi dengan menggunakan membran ultrafiltrasi secara bertahap yaitu larutan protein dihomogenisasi terlebih dahulu dan disentrifuse dengan kecepatan 15.000xg selama 5 menit, 4 °C. Supernatan disaring dengan *amicon centricon ultra (cut-off 100 kDa)* dengan bantuan sentrifugasi pada kecepatan 13.000xg selama 30 menit dan suhu 4 °C. Supernatan yang melewati membran kemudian disaring dengan membran filter 0,45 dan 0,22 µm, sedangkan yang tertahan (permeat) dikumpulkan. Rententat dilanjutkan fraksinasi dengan membran ultrafiltrasi 50 kDa dengan bantuan sentrifugasi 13000xg selama 30 menit suhu 4 °C. Fraksi dengan berat molekul kecil dari 50 kDa dilanjutkan fraksinasi dengan 30, 10 dan 5 kDa dengan cara yang sama. Semua permeat dan rententat yang didapatkan dikumpulkan untuk dilakukan uji kadar protein terlarut dan uji ACE inhibitor<sup>(28,29,30)</sup>.

**Uji Aktivitas ACE Inhibitor.** Uji ini berdasarkan pembebasan asam hipurat dari substrat Hip-His-Leu yang dikatalisis oleh ACE. Protein dadih hasil ekstraksi dan fraksinasi sebanyak 15 µL ditambahkan dengan 125 µL *buffer* Na-borat 100 mM (pH 8.3) yang mengandung 7,6 mM Hip-His-Leu dan 608 mM NaCl, kemudian dipreinkubasi selama 5 menit pada suhu 37 °C. Reaksi dimulai dengan penambahan 50 µL enzim ACE 50 mU yang dilarutkan dalam air destilat. Campuran diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C dan sebagai blanko digunakan air destilata sebanyak 50 µL. Reaksi dihentikan dengan penambahan 125 µL HCl 1N. Asam hipurat yang dilepaskan oleh ACE, diekstrak dengan menambahkan 750 µL etil asetat ke dalam campuran dan segera divorteks, disentrifugasi pada kecepatan 13760xg selama 10 menit. Sebanyak 500 µL lapisan atas dari supernatan (asam hipurat) dikumpulkan dan dikeringkan pada suhu 90 °C selama 30 menit di dalam oven. Asam hipurat yang didapatkan dilarutkan dengan 1 mL air destilat dan diukur absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 228 nm<sup>(29,30)</sup>. Aktivitas ACE inhibitor dihitung menurut persamaan:

% Aktivitas penghambatan = [(C-A) / (C-B)] x 100 %  
Dimana: A= absorbansi sampel, B= absorbansi blanko, dan C=absorbansi kontrol.

**Analisis Komposisi Asam Amino.** Fraksi dengan nilai ACE inhibitor yang tertinggi dianalisis komposisi asam amino. Sampel hasil fraksinasi sebanyak 0,1 gram ditimbang dan dilarutkan dengan 5 mL larutan HCl 6 N. Larutan lalu dihidrolisis selama 22 jam pada suhu 110 °C. Larutan yang sudah dihidrolisis didinginkan dan dipindahkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian ditera dengan akuabides hingga

tanda batas. Larutan disaring dengan filter 0,45  $\mu\text{m}$ . Sebanyak 500  $\mu\text{L}$  larutan dipipet dan ditambah dengan 40  $\mu\text{L}$   $\alpha$  Aminobutyric Acid (AABA) dan 460  $\mu\text{L}$  akuabides sambil dihomogenisasi. Larutan yang telah homogen dipipet sebanyak 10  $\mu\text{L}$  dan ditambahkan AccQ fluor borate serta 20  $\mu\text{L}$  pereaksi Fluor A dan dihomogenkan kembali. Larutan didiamkan selama 1 menit dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 55  $^{\circ}\text{C}$ . Sebanyak 10  $\mu\text{L}$  sampel diinjeksikan ke alat UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*)<sup>(31)</sup>.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Karakteristik Dadih.** Uji karakteristik dadih adalah uji organoleptik berdasarkan Standar Nasional Indonesia untuk *yogurt* yaitu SNI 2981:2009 karena standar untuk dadih belum ada. Karakter fisik yang diamati adalah warna, aroma, rasa, tekstur dan kekentalan. Uji organoleptik ini dilakukan oleh 10 orang panelis tidak terlatih namun terbiasa konsumsi dadih (Tabel 2). Kualitas kimia ditentukan dari uji kadar protein, lemak, air, tingkat keasaman dan abu (Tabel 3).

Hasil pengamatan fisik dadih adalah berwarna putih kekuning-kuningan, kental atau mengumpal

**Tabel 2. Hasil pengujian organoleptik dadih variasi waktu fermentasi.**

| No | Kriteria penilaian | Waktu fermentasi (hari) |   |   |   |   |
|----|--------------------|-------------------------|---|---|---|---|
|    |                    | 0                       | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1  | Warna              | 0                       | 3 | 4 | 2 | 1 |
| 2  | Aroma              | 1                       | 2 | 3 | 2 | 2 |
| 3  | Rasa               | 0                       | 3 | 3 | 2 | 2 |
| 4  | Tekstur            | 1                       | 2 | 3 | 3 | 1 |
| 5  | Kekentalan         | 0                       | 2 | 2 | 4 | 2 |

Ket: Uji berdasarkan SNI 2981:2009

**Tabel 3. Hasil uji proksimat susu kerbau fermentasi 1 hari (n=2).**

| Parameter | Kadar (%)        |
|-----------|------------------|
| Air       | 76,05 $\pm$ 1,21 |
| Abu       | 0,83 $\pm$ 0,09  |
| Lemak     | 13,62 $\pm$ 0,27 |
| Protein   | 6,04 $\pm$ 0,08  |

(*curd*). Warna dadih selama 3 dan 4 hari fermentasi lebih kuning daripada dadih yang difermentasi selama 1 atau 2 hari. Rasa dadih berbeda-beda untuk tiap waktu fermentasi. Dadih tanpa fermentasi atau nol hari memberikan rasa ambar atau rasa asli susu kerbau

sedangkan fermentasi selama 1 hari mulai terasa asam. Fermentasi selama 2 dan 3 rasa asam lebih kuat sedangkan fermentasi selama 4 hari rasa asam paling kuat (berasa lebih asam). Kami menyimpulkan bahwa semakin lama waktu fermentasi rasa asam semakin kuat atau semakin tajam. Panelis lebih menyukai warna, aroma, rasa, tekstur dan kekentalan susu kerbau yang difermentasi selama 2 hari.

Pembatasan lama fermentasi pada penelitian ini adalah hari ke-4 yaitu berdasarkan kebiasaan konsumsi dadih di daerah Bukittinggi. Konsumen lebih cenderung menyukai dadih yang difermentasi antara 2 sampai 4 hari. Panelis lebih banyak memilih warna dadih hasil fermentasi 2 hari yaitu warna kuning butek, warna dadih dengan waktu fermentasi 4 hari terlihat kuning kusam dan bau asam lebih tajam serta sensasi di mulut juga tidak se enak fermentasi 1, 2, dan 3 hari. Fermentasi memberikan banyak manfaat, antara lain untuk mengawetkan makanan, memberi cita rasa atau *flavour* yang disukai, menghasilkan produk dengan tekstur tertentu<sup>(32)</sup>.

Lama fermentasi susu kerbau yang paling baik adalah selama 2 hari dan suhu 45  $^{\circ}\text{C}$ <sup>(33)</sup>. Umumnya masyarakat Sumatra Barat terutama daerah kabupaten Agam, Solok, Tanah Datar dan Lima Puluh Kota memeram susu kerbau selama 3 atau 4 hari, biasanya dijadikan bahan lauk-pauk sebagai pelengkap makan nasi. Dadih disajikan dengan cara memindahkan dadih ke dalam wadah atau piring yang telah ditaburi garam dan irisan bawang merah, diaduk sampai rata. Penyajian dadih dilengkapi dengan sambal cabe merah rebus yang digiling halus dan diasamkan dengan jeruk nipis atau dicampur dengan rebusan terong.

Beberapa daerah di Sumatra Barat menikmati dadih dengan cara mencampurkan dadih dengan beras emping yang terbuat dari beras pulut (ketan) dan ditambahkan air gula aren atau gula merah sebagai pemberi rasa manis. Secara tradisional konsumsi dadih saat pesta pernikahan dan sambil memberi yang terhormat pada Datuk atau kepala suku dan dianggap menambah nafsu makan sehingga sering dihidangkan untuk orang-orang yang selera makan berkurang atau baru sembuh dari sakit<sup>(34)</sup>. Dadih juga merupakan makanan yang digemari pada waktu tertentu misalnya pada waktu lebaran atau libur sekolah dimana banyak para perantau Minang pulang ke kampung.

Pada penelitian ini kadar protein susu kerbau yang difermentasi 1 hari pada suhu ruang didapatkan sebesar 6,04%, nilai ini tidak berbeda jauh dengan penelitian<sup>(33)</sup> yang mendapatkan kadar protein susu kerbau fermentasi selama 1 hari adalah 6,34% namun fermentasi dilakukan pada suhu 45  $^{\circ}\text{C}$ . Kadar protein dadih sedikit berbeda bila wadah fermentasi yang digunakan berbeda yaitu wadah bambu sebesar 6,81%

sedangkan wadah plastik sebesar 6,34%.

Semakin lama waktu fermentasi maka rasa, aroma, warna dan kesukaan juga menurun<sup>(34)</sup>. Kadar protein susu kerbau diperkirakan dipengaruhi oleh pakan, umur kerbau, periode laktasi, iklim, musim, dan kondisi kesehatan kerbau. Menurut Surono, kerbau diberi makan dengan rumput alami, bebas dari antibiotik sehingga tidak ditemukan residu antibiotik pada susu kerbau, berkemungkinan memberikan efek penghambatan pada pertumbuhan starter dan penyebab kegagalan produk dadih<sup>(35)</sup>. Komposisi kimia susu kerbau fermentasi 1 hari disajikan pada Tabel 3.

**Tingkat Keasaman (pH).** Bakteri asam laktat (BAL) adalah bakteri indogenus dari strain *Lactobacillus plantarum* IS-10506 yang didapatkan pada dadih, selain *L. plantarum* juga didapatkan 36 strain BAL dadih dari genus *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, dan *Lactococcus* yang mempunyai aktivitas sebagai pengurai gula laktosa menjadi asam laktat<sup>(36,37,38)</sup>. BAL dari genus *Lactobacillus* menghasilkan enzim yang dapat merombak gula susu menjadi asam laktat. Nilai pH dadih berkisar antara 5,5 sampai 4,4, dapat disimpulkan bahwa dadih bersifat asam (Tabel 4).

Suasana asam pada dadih ini diperkirakan berasal dari perombakan gula susu (laktosa) oleh enzim bakteri asam laktat menjadi asam laktat. Hal ini dikuatkan oleh pernyataan bahwa rasa asam pada susu dan produk susu berasal dari gula susu atau laktosa yang dirombak menjadi asam laktat (*lactic acid*) dengan bantuan enzim bakteri homofermentatif. Bakteri homofermentatif mampu memproduksi asam laktat dari glukosa sebanyak lebih dari 85-90%<sup>(39)</sup>.

Hasil pengukuran tingkat keasaman dadih pada beberapa variasi waktu fermentasi dapat disimpulkan bahwa semakin lama waktu fermentasi semakin rendah nilai pH atau semakin tinggi konsentrasi asam atau konsentrasi ion hidrogen yang dihasilkan pada dadih.

Disimpulkan bahwa BAL yang terdapat di dalam dadih diperkirakan punya aktivitas tinggi mengubah laktosa menjadi asam laktat, ditandai dengan makin tingginya keasaman dadih. Hal ini juga berkemungkinan akibat terjadinya peningkatan kadar asam laktat yang diproduksi oleh BAL, dimana semakin lama waktu fermentasi maka makin banyak jumlah bakteri yang hidup dan semakin banyak produk asam laktat yang dihasilkan. Menurut Sunarlim perpanjangan waktu inkubasi atau waktu fermentasi dapat menurunkan nilai pH kefir dan penambahan konsentrasi gula dapat meningkatkan nilai pH kefir susu kambing<sup>(40)</sup>.

Sepuluh strain BAL dadih bersifat asam dan

toleran terhadap asam empedu secara *in vitro* sehingga *strain* ini berpotensi sebagai antimutagenik dan hipokolesterolemik<sup>(39),(40)</sup>. BAL dadih bersifat antimutagenik dan hipokolesterol yaitu menurunkan secara signifikan total kolesterol, LDL serum dan total asam empedu<sup>(36)</sup>. Tikus yang diberi pakan kolesterol tinggi dan kemudian diberi pakan mengandung dadih ternyata mampu menurunkan kolesterol serum tikus sebesar 39,7%<sup>(41)</sup>.

**Ekstrak Protein Dadih.** Protein hasil ekstraksi dengan pelarut alkohol, disentrifuse dengan kecepatan 13.000 g selama 15 menit pada suhu 4 °C dan dihasilkan supernatan. Supernatan dikeringkan dengan cara *freeze drying* sehingga didapatkan tepung dadih atau hidrolisat. Hidrolisat protein dilarutkan dengan akuades, disentrifuse dan ditentukan kadar protein dengan metode *Bradford*. Kadar protein yang didapatkan dari penelitian ini cenderung meningkat sejalan dengan bertambah lamanya waktu fermentasi namun kadar protein optimal didapatkan pada fermentasi selama 1 hari (Tabel 4).

Peningkatan kadar protein susu kerbau yang difermentasi selama 1 hari diperkirakan terjadi akibat aktivitas enzim protease yang dapat membuka lipatan-

**Tabel 4. Hasil pengukuran nilai pH dadih pada berbagai waktu fermentasi (n=2).**

| Kode sampel | Lama fermentasi (hari) | Nilai pH   |
|-------------|------------------------|------------|
| K           | 0                      | 5,5 ± 0,43 |
| S1          | 1                      | 4,8 ± 0,00 |
| S2          | 2                      | 4,2 ± 0,56 |
| S3          | 3                      | 4,5 ± 0,28 |
| S4          | 4                      | 4,4 ± 0,21 |

Ket: K = kontrol, S= sampel dadih

lipatan struktur sekunder polipeptida atau memutuskan ikatan peptida di dalam molekul protein sehingga asam amino seperti residu asam amino dengan rantai samping aromatik (tirosin, triptofan, dan fenilalanin) atau bersifat basa (arginin, histidin, dan leusin) membentuk kompleks dengan pewarna commasie brilliant blue G-250. Asam amino ini membentuk kompleks berwarna biru, semakin banyak jumlah asam amino aromatik yang dihasilkan maka makin pekat warna biru yang terbentuk sehingga kadar protein juga meningkat. Hal yang sama juga didapatkan oleh Daswati, dimana waktu fermentasi selama 12, 24, 36 dan 48 jam menunjukkan peningkatan kadar protein yaitu 6,34:7,73:8,82 dan 9,96% untuk masing-masing waktu fermentasi sedangkan kadar air menurun dengan bertambah lamanya waktu fermentasi<sup>(33)</sup>.

Peningkatan ini juga dapat terjadi karena BAL berfungsi sebagai sumber protein *single cell*. BAL

mampu melakukan biosintesis sumber asam amino eksogen seperti isoleusin, leusin, valin, histidin dan metionin atau peptida yang digunakan untuk pertumbuhan<sup>(42)</sup>. Protein dari BAL dilepaskan ke dalam media pertumbuhan yaitu dadih, namun kadar protein menurun pada hari ke-2 sampai hari ke-4, hal ini diperkirakan karena kematian BAL sehingga tidak dapat menyumbangkan atau melepaskan protein lagi ke dalam media fermentasi. Kadar protein pada hari kedua sampai hari keempat turun, hal ini diduga karena protein dadih digunakan BAL sebagai sumber nutrisi.

Peningkatan nilai pH atau keasaman dapat menginaktivkan enzim protease sehingga jumlah protein yang dihidrolisis terhenti. pH optimal kerja enzim renin dan papain dari BAL pada media susu sapi adalah 5,45 dan 5,05<sup>(43)</sup>, sedangkan pH dadih pada penelitian ini didapatkan 4,8: 4,2: 4,5 dan 4,4 masing-masing untuk fermentasi hari ke 1, 2, 3, dan 4. Nilai pH semakin rendah dengan semakin bertambahnya waktu fermentasi. Asam amino atau protein yang dihasilkan bakteri dilepaskan ke dalam susu sebagai media fermentasi sehingga berpotensi mempengaruhi nilai gizi dan nilai biologis produk fermentasi. Asam amino tidak secara langsung mempengaruhi rasa dan aroma susu fermentasi, namun bertindak sebagai prekursor untuk sejumlah reaksi yang menghasilkan senyawa karbonil<sup>(44)</sup>.

*Lactobacillus acidophilus* merupakan kelompok BAL yaitu *friendly bacteria* yang merupakan kelompok bakteri yang banyak dimanfaatkan dalam industri fermentasi susu, baik dalam pembuatan *yogurt* maupun keju. Bakteri asam laktat mengekskresikan enzim proteolitik untuk menghidrolisis kasein susu. Aktivitas kerja enzim ekstraseluler dari *Lactobacillus acidophilus* berlangsung optimal pada pH 5,5<sup>(45)</sup>. Peran proteinase BAL mendegradasi protein susu pada ikatan spesifik menghasilkan lebih dari seratus oligopeptida yang berbeda mulai 4-18 residu asam amino dengan sebagian besar mengandung 4-8 residu asam amino<sup>(46)</sup>.

**Aktivitas ACE Inhibitor Protein Dadih.** Angiotensin-I converting enzyme (EC 3.4.15.1) merupakan enzim yang memainkan peran fisiologis penting dalam pengaturan tekanan darah yaitu mengubah angiotensin I menjadi angiotensin II, suatu vasokonstriktor kuat, oleh karena itu penghambatan aktivitas ACE merupakan target utama dalam pencegahan hipertensi. Pencarian inhibitor ACE alami telah dikembangkan sebagai alternatif obat sintetik yang diketahui mempunyai efek negatif. Senyawa baru yang berpotensi sebagai ACE inhibitor adalah protein, peptida, derivatif *chitooligosaccharide* (COS) dan *phlorotannins* dari organisme laut.

Kemampuan protein dadih menghambat aktivitas ACE pada variasi waktu fermentasi lain ditampilkan pada Tabel 5. Hasil pengujian kadar protein dan aktivitas ACE inhibitor dilakukan untuk semua ekstrak protein. Hasil uji penghambatan terhadap enzim ACE atau ACE inhibitor dari ekstrak protein susu kerbau fermentasi didapatkan nilai tertinggi sebesar 87,52%, nilai ini didapatkan pada susu kerbau yang difermentasi selama 1 hari. Aktivitas penghambat ACE dari tepung *whey* yang dicerna oleh enzim papain didapatkan sebesar 86,5% dan 95,7% untuk enzim proteinase-K<sup>(47)</sup>. Pada penelitian ini kadar protein terlarut tertinggi didapatkan sebesar 781,69 mg/L yaitu kadar protein pada susu kerbau yang difermentasi selama 1 hari. Data ini menunjukkan bahwa terdapat korelasi positif antara aktivitas ACE inhibitor dengan kadar protein terlarut. Menurut Yurliansi penambahan kultur khamir 1% sebagai kultur sekunder terhadap nilai nutrisi dadih mampu meningkatkan kadar protein sebesar 14%<sup>(48)</sup>.

Aktivitas ACE inhibitor protein dadih dipengaruhi oleh waktu fermentasi dan kandungan protein dadih (Tabel 5). Susu kerbau tanpa fermentasi (waktu nol hari) hanya mampu menghambat ACE sebesar 22,22%, ini menunjukkan bahwa susu kerbau non fermentasi mempunyai aktivitas antihipertensi. Susu tanpa hidrolisis dengan enzim protease mempunyai kemampuan menurunkan tekanan darah tikus *Spontaneously Hypertensive Rat* (SHR) sebesar 38% sedangkan penambahan enzim protease menunjukkan aktivitas penghambatan ACE sebesar 58,2%<sup>(47)</sup>.

Fermentasi selama 1 dan 2 hari menghasilkan penghambatan ACE sebesar 87,52 dan 72,75%, namun untuk fermentasi selama 3 hari terjadi penurunan aktivitas penghambatan ACE, dimana besar penghambatan sebesar 69,35%, nilai ini diperkirakan enzim proteolitik bekerja tidak optimal pada fermentasi selama 3 hari. Besarnya aktivitas penghambatan ACE dari susu sapi yang difermentasi dengan BAL selama 24 jam adalah 87,6% dan 87,8% masing-masing tanpa pengaturan pH dan dengan pengaturan pH<sup>(48)</sup>. Beberapa dekade terakhir terjadi peningkatan perhatian dan minat terhadap makanan olahan susu untuk mencegah penyakit hipertensi. Efek biologis ini terutama disebabkan oleh peptida bioaktif hasil pemecahan protein susu oleh bakteri asam laktat dan harus dibuktikan secara *in-vitro* dan *in-vivo*<sup>(49)</sup>.

Derivatif penghambatan aktivitas ACE atau ACE inhibitor dapat dikembangkan sebagai nutrasetikal, obat-obatan dan pangan fungsional<sup>(50)</sup>. Protein dan peptida makanan merupakan bahan pangan yang berpotensi sebagai ACE inhibitor, dapat dikemas menjadi pangan fungsional. Susu kerbau atau susu kerbau fermentasi merupakan salah satu produk

pangan yang dapat diaplikasikan sebagai pangan fungsional antihipertensi. Protein susu fermentasi terbukti sebagai antihipertensi yang strategis untuk penderita hipertensi<sup>(51)</sup>. Peptida atau protein dengan kemampuan penghambatan enzim ACE yang tinggi diharapkan mampu menjaga tekanan darah penderita hipertensi. Peptida bioaktif terbukti dapat menghambat enzim ACE secara *in vitro* dan dapat menurunkan tekanan darah pada tikus SHR (*Spontaneously Hypertensive Rat*)<sup>(47)</sup>. Efek biologis ini disebabkan oleh peptida bioaktif yang dihasilkan dari protein susu selama fermentasi oleh BAL atau enzim saluran pencernaan<sup>(52)</sup>. Peptida secara fungsional aktif diproduksi dari beberapa protein makanan selama pencernaan pada gastrointestinal<sup>(53)</sup>

Konsumsi susu fermentasi terbukti dapat memenuhi kebutuhan gizi<sup>(54)</sup> terutama protein<sup>(55)</sup>. Susu fermentasi mempunyai sifat fungsional probiotik dan prebiotik, peptida yang dihasilkan bersifat sebagai ACE inhibitor<sup>(56,57)</sup>. Saat ini banyak penelitian yang dikembangkan pada peptida bioaktif yang dapat mengurangi tekanan darah pada penderita hipertensi<sup>(56)</sup>. Degradasi protein susu dengan proteinase dari *L. helveticus* menghasilkan peptida dengan aktivitas ACE inhibitor penting sebagai antihipertensi pada tikus hipertensi spontan (SHR). Efek yang sama juga diamati pada susu fermentasi yang mengandung *L. helveticus*<sup>(58)</sup>.

**Komposisi Asam Amino.** Analisa asam amino dilakukan untuk mengetahui jenis dan kadar asam amino yang terdapat pada fraksi <3kDa dari protein

**Tabel 5. Nilai kadar protein terlarut dan aktivitas ACE inhibitor protein dadih (n=2).**

| No | Waktu fermentasi (hari) | Kadar protein (mg/L) | Aktivitas penghambatan (%) |
|----|-------------------------|----------------------|----------------------------|
| 1  | 0                       | 560,39 ± 2,16        | 22,22 ± 0,35               |
| 2  | 1                       | 781,69 ± 1,48        | 87,52 ± 0,16               |
| 3  | 2                       | 744,97 ± 1,84        | 72,75 ± 1,78               |
| 4  | 3                       | 780,19 ± 1,22        | 69,35 ± 0,69               |
| 5  | 4                       | 643,54 ± 1,00        | 71,53 ± 0,35               |

dadih fermentasi 1 hari. Hasil analisa komposisi asam amino fraksi dadih yang memiliki aktivitas ACE inhibitor tertinggi disajikan pada Tabel 6.

Berdasarkan hasil analisis dengan UPLC, didapatkan komposisi asam amino dadih fraksi <3 kDa yaitu threonin kecil dari 0,239%, prolin 0,387%, alanin 0,445%, fenilalanin kecil dari 0,117%, dan asam glutamat 1,581%, sebagai pembandingan didapatkan kandungan asam amino tertinggi pada dadih dan

dangke adalah asam glutamat yaitu sebesar 2,69% dari protein dadih dan yang terendah adalah glisin sebesar 0,29% dari keseluruhan protein dadih<sup>(59)</sup>. Inhibitor ACE terbentuk pada susu selama fermentasi adalah peptida yang bertindak sebagai inhibitor kompetitif seperti Ile-Pro-Pro dan Val-Pro-Pro<sup>(60)</sup>, Ile-Tyr<sup>(41)</sup>, Lys-Val- dan Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro, Leu-Pro-Val-Pro<sup>(61)</sup>.

Beberapa penelitian *in vivo* telah membuktikan bahwa susu yang difermentasi dengan strain lactococcal dapat menurunkan tekanan darah sistolik pada tikus spontan hipertensi (SHR) setelah pemberian secara oral dengan cara sonde<sup>(47)</sup>. Pengaruh yang hampir sama juga ditemukan pada konsumsi susu setiap hari pada pasien hipertensi selama 21 minggu<sup>(62)</sup>. Susu yang difermentasi dengan 5 strain BAL dan diikuti dengan hidrolisis dengan enzim protease dari mikroba

**Tabel 6. Hasil analisis kadar asam amino susu kerbau fermentasi 1 hari fraksi <3kDa.**

| Asam Amino    | Kadar asam amino (%w/w) | Kadar asam amino (%w/w) <sup>(40)</sup> |
|---------------|-------------------------|---|
| Histidin      | -                       | 0,3                                     |
| Threonin      | < 0,024                 | 0,56                                    |
| Prolin        | 0,039                   | (tidak dianalisa)                       |
| Tirosin       | -                       | 0,64                                    |
| Leusin        | -                       | (tidak dianalisa)                       |
| Asam aspartat | -                       | 0,96                                    |
| Lisin HCl     | -                       | 0,95                                    |
| Glisin        | -                       | 0,29                                    |
| Arginin       | -                       | 0,33                                    |
| Alanin        | 0,045                   | 0,4                                     |
| Valin         | -                       | 0,74                                    |
| Isoleusin     | -                       | 1,12                                    |
| Fenilalanin   | < 0,012                 | 0,64                                    |
| Asam glutamat | 0,158                   | 2,69                                    |
| Serin         | -                       | 0,67                                    |
| Metionin      | -                       | 0,3                                     |
| Sistin        | -                       | (tidak dianalisa)                       |
| Triptofan     | -                       | (tidak dianalisa)                       |

Ket: pembandingan hasil penelitian<sup>(60)</sup>.

menunjukkan peningkatan aktivitas penghambatan ACE dibandingkan dengan susu fermentasi hanya dengan BAL saja secara *in vitro*. Susu fermentasi yang bersifat antihipertensi ini dikemas dalam bentuk makanan konvensional, suplemen dan makanan fungsional<sup>(63)</sup>.

## SIMPULAN

Dadiah atau susu kerbau fermentasi secara spontan berpotensi dikembangkan menjadi pangan fungsional yaitu minuman fungsional asli Indonesia yaitu minuman antihipertensi. Besarnya penghambatan ACE atau ACE inhibitor didapatkan sebesar 87,52%, kadar protein 781,69 mg/L untuk dadiah yang difermentasi selama 1 hari. Panelis lebih menyukai



susu kerbau fermentasi dibandingkan susu kerbau tanpa fermentasi. Dadih mengandung asam amino esensial dan nonessensial yaitu threonin, prolin, alanin fenilalanin dan asam glutamat sehingga dadih berpotensi dikembangkan menjadi pangan fungsional.

### TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Rektor Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta yang telah membiayai penelitian ini melalui dana bantuan Penelitian Berbasis Publikasi Nasional tahun 2016.

### DAFTAR PUSTAKA

- World Health Organization. A Global brief on hypertension: silent killer, global public health crisis. 2013. Diambil dari [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/publication/global\\_brief\\_hypertension/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publication/global_brief_hypertension/en/) diakses pada 2 Maret 2018. Pukul 18.48
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. Infodatin hipertensi. Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI, Jakarta. 2014. hal 4-8
- Lasianjayani T and Martini S. The relationship between obesity and smoking to hypertension incidence. *Jurnal Berkala Epidemiologi*. 2014. 2(3):286-96.
- Guerra GM, Lopes HF, Freitas EO, Marciano F, Consolim-Colombo PSL, et al. Approach by health professionals to the side effects of antihypertensive therapy: strategies for Improvement of adherence. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2018. 6:340-9.
- Beltrán-Barrientos LM, Hernández-Mendoza A, Torres-Llanez MJ, González-Córdova A, Vallejo-Córdova B. Invited review: Fermented milk as antihypertensive functional food. *Journal of dairy science*, 2016. 99(6):4099-110.
- Zeng YW, Du J, Pu XY, Yang S M, Yang T, and Jia P. Strategies of functional food for hypertension prevention in China. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011. 5(24):5671-6.
- Hieda K, Sunagawa Y, Katanasaka Y, Hasegawa K and Morimoto T. Antihypertensive effects of foods. *World J Hypertension*. 2015. 5(2):53-62.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan. Peraturan kepala badan pengawas obat dan makanan Republik Indonesia tentang ketentuan pokok pengawasan pangan fungsional. 2005. hal 9-14.
- Chalid SY dan Hartiningsih F. Potensi dadih susu kerbau fermentasi sebagai antioksidan dan antibakteri. *Prosiding SEMIRATA BKS-MIPA*. Lampung 19-12 Mei, 2013:123-6
- Ngatirah A, Harmayanti ES dan Utami T. Seleksi bakteri asam laktat sebagai agensia probiotik yang berpotensi menurunkan kolesterol. In *Prosiding Seminar Nasional Industri Pangan*. PATPI (II): 2000. 63-70.
- Surono IS and Nurani D. Exploration of indigenous dadih lactic bacteria for probiotic and starter cultures. Domestic research collaborative grant-URGE-IBRD World Bank Project 2000-2001. Republic of Indonesia: Research Report. Directorate General of Higher Education, Ministry of Education and Culture. 2002.
- Pato U. Potensi bakteri asam laktat yang diisolasi dari dadih untuk menurunkan resiko penyakit kanker. *Jurnal Natur Indonesia*. 2003.5(2):162-6.
- Surono IS. Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan. 2004. YAPMMI, Jakarta.
- Clare DA, Swaisgood HE. Bioactive milk peptides: a prospectus. *J Dairy Sci*. 2000.83:1187-95.
- Phelan M, Aheme A, FitzGerald R and O'Brien N. Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International dairy journal*. 2009.19(11):643-54.
- Vasiljevic T, Shah NP. Probiotics from Metchnik off to bioactives. *International Dairy Journal*. 2008. 18 (7):714-28.
- Meisel H. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *BioFactors*. 2004. 21.55-61.
- Hameed MA, Tebbit L, Jacques N, Thomas M, and Dasgupta I. Non-adherence to antihypertensive medication is very common among resistant hypertensives: results of a directly observed therapy clinic. *Journal of human hypertension*. 2016. 30 (2):83-6.
- Putri K. Efektivitas dan efek samping penggunaan obat antihipertensi pada pasien hipertensi di puskesmas Kalirungkut Surabaya. *Calyptra: Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universitas Surabaya*. 2015. 4(2).
- Amamoto N, Ejiri M, Mizuno S. Biogenic peptides and their potential use. *Current Pharmaceutical Design*. 2003. 9(16):1345
- Hayes M, Stanton C, Slattery H, O'sullivan O, Hill C, Fitzerld GF and Ross RP. Casein fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 contains a range of novel propeptide angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. 73(14):4658-67.
- Donkor O N, Henriksson A, Vasiljevic T, Shah NP. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Lait*, 2007. 87. 21-38.
- Association Official Analytical Chemist'(AOAC) Authors. Official methods of analysis proximate analysis and calculations crude protein meat and meat products including pet foods. Association of Analytical Communities, Gaithersburg MD, 17th ed. 2006. Reference data: Method 992.15(39.1.16).
- Liu C, Wang H, Cui Z, He X, Wang X, Zeng and Ma H. Optimization of Extraction and Isolation for 11S and 7S Globulins of Soybean Seed Storage Protein. *Food Chemistry* 2007.102:1310-6.
- Ye, Ran, and Federico Harte. Casein maps: effect of ethanol, pH, temperature, and CaCl<sub>2</sub> on the particle size of reconstituted casein micelles. *Journal of dairy*

- science 2013. 96(2):799–805.
26. Hoyle NT, Merritt JH. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). Journal of Food Science. 1994. 59: 76-9.
  27. Bradford, M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle dye binding. Analytical of Biochemistry. 1976. 72: 248-54.
  28. Arakawa T, Ejima D and Akuta T. Protein aggregation under high concentration/density state during chromatographic and ultrafiltration processes. International journal of biological macromolecules. 2017. 95. 1153-1158.
  29. Cheung HS, Cushman D. Inhibition of homogeneous angiotensin-converting enzyme of rabbit lung by synthetic venom peptides of *Bothrops jararaca*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology. 1973. 293(2), 451-463.
  30. Arihara K, Nakashima Y, Mukai T, Ishikawa S, Itoh M. Peptide Inhibitors for Angiotensin I-converting Enzyme from Enzymatic Hydrolysates of Porcine Skeletal Muscle Proteins. Meat Science. 2001.57(3): 319-324.
  31. Lame ME, Chambers EE, Blatnik M. Quantitation of amyloid beta peptides A $\beta$ 1–38, A $\beta$ 1–40, and A $\beta$ 1–42 in human cerebrospinal fluid by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Analytical biochemistry. 2011.419 (2):133-139.
  32. Dinata DI, Bioteknologi Pemanfaatan Mikroorganisme & Teknologi Bioproses. EGC. Penerbit Buku Kedokteran.2012. p. 221-31
  33. Daswati, E.. Kualitas Dadih Susu Kerbau Dengan Lama Pemeraman Yang Berbeda. Jurnal Peternakan. 2009. 6(1).
  34. Sisriyenni D, Zurriyati Y. Kajian kualitas dadih susu kerbau di dalam tabung bambu dan tabung plastik. Jurnal Pengkajian dan Pengembangan Teknologi Pertanian. 2014. 7(2).
  35. Surono IS, Indonesian Dadih Indigenous probiotics from Dadih. In: Puniya A, editor. Fermented Milk and Dairy Products. Boca Raton: CRC Press; pp. 377-395.
  36. Ngatirah A, Harmayanti ES dan Utami T. Seleksi bakteri asam laktat sebagai agensia probiotik yang berpotensi menurunkan kolesterol. In Prosiding Seminar Nasional Industri Pangan. PATPI (II): 2000. 63-70.
  37. Surono IS and Nurani D. Exploration of Indigenous Dadih Lactic Bacteria for Probiotic and Starter Cultures. Domestic research collaborative grant-URGE-IBRD World Bank Project 2000-2001. Republic of Indonesia: Research Report. Directorate General of Higher Education, Ministry of Education and Culture. 2002.
  38. Pato U. Potensi bakteri asam laktat yang diisolasi dari dadih untuk menurunkan resiko penyakit kanker. Jurnal Natur Indonesia. 2003. 5(2): 162 – 166.
  39. Surono, IS. (2004). Probiotik susu fermentasi dan kesehatan. YAPMMI, Jakarta. hal 145-55.
  40. Sunarlim, Roswita. Potensi lactobacillus sp. asal dari dadih sebagai starter pada pembuatan susu fermentasi khas Indonesia. Buletin Teknologi Pasca Panen. 2016: 5.169-76.
  41. Lestari LA, Hannayani E, Marsono Y. Efek hipokolesterolemik yogurt yang disuplementasi probiotik indigenous pada tikus sprague dawley Rats. Agrosains. 2004. 17.
  42. Papadimitriou CG, Mastrojiannaki AV, Silva AV, Gomes AM, Malcata FX, Alichanidis E. Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. Food Chem. 2007. 105:647-656.
  43. Miskiyah S, Usmiati, Mulyorini. Pengaruh enzim proteolitik dengan bakteri asam laktat probiotik terhadap karakteristik dadih susu sapi. JITV. 2011. 16(4): 304-311.
  44. Considine T, Healy A, Kelly AL, McSweeney PLH. Proteolytic specificity of elastase on bovine  $\alpha$ 1 casein. Food Chem. 2000. 69:19-26.
  45. Putranto, Wendry S. Purifikasi dan karakterisasi protease yang dihasilkan *Lactobacillus acidophilus* dalam fermentasi susu sapi perah. Seminar Nasional Bioteknologi Capturing Opportunities through Biotechnology Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI. 2006 (Abstrak).
  46. Kunji ERS, Mierau I, Hagting A, Poolman B, Konnigs WN. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. 1996. (70):187-221.
  47. Abubakar A. Isolation of anti hypertensive peptides from milk protein. J.Indon. Trop. Anim. Agric. 2004. 29(3):121-8.
  48. Yurliansyah Y, Zakaria Y dan Usman Y. Nilai nutrisi dadih yang ditambahkan khamir asal dadih. Jurnal Agripet. 2014. 14(2):139-45.
  49. Beltrán-Barrientos LM, Hernández-Mendoza A, Torres-Llanez MJ, González-Córdova A F, and Vallejo-Córdoba B. Invited review: fermented milk as antihypertensive functional food. Journal of dairy science. 2016. 99(6):4099-110.
  50. Wijesekera I and Kim SK. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources prospects in the pharmaceutical industry. Review Mar. Drugs. 2010. 1080-93
  51. Campbell D.J. The renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems. The International Journal of Biochemistry Cell Biology. 2003. 35. 784-91.
  52. Beltrán-Barrientos LM, Hernández-Mendoza A, Torres-Llanez MJ, González-Córdova AF and Vallejo-Córdoba B. Invited review: Fermented milk as antihypertensive functional food. Journal of dairy science. 2016. 99(6):4099-110.
  53. Tamang JP, Shin DH, Jung SJ, Chae SW. Functional properties of microorganisms in fermented foods. Front Microbiol. Frontiers. 2016. 7. 578.
  54. Srianta I dan Trisnawati CY. Pengantar Teknologi pengolahan minuman. Pustaka Pelajar: 2015. 160-72.
  55. Chairunnisa H, Putranto W S dan Lepa S J. Characterization of fermented products made from caprine milk in combination with soy extract, corn

- extract or coconut extra. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 2010. 21(1):91.
56. Fitzgerald RJ, Murray BA. Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*. 2006. 59(2):118-25.
57. Argyri AA, Zoumpopoulou G, Karatzas KAG, Tsakalidou E, Nychas GJE, Panagou EZ and Tassou CC. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food microbiology*. 2013. 33(2):282-91.
58. Tuomilehto J, Lindström J, Hyyrynen J, Korpela R, Karhunen ML, Mikkola L, Nissinen, A. Effect of ingesting sour milk fermented using *Lactobacillus helveticus* bacteria producing tripeptides on blood pressure in subjects with mild hypertension. *Journal of human hypertension*. 2004. 18(11):795-801.
59. Soenarno MS, Polli, BN, Febriantosa A, Hanifah, R. Identifikasi peptida bioaktif dari olahan susu fermentasi tradisional Indonesia sebagai bahan pangan fungsional untuk kesehatan. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan*, 2017. 1(3):191-5.
60. Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Okubo A, Yamazaki S, Takano T. Purification and characterization of angiotensin converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science*. 1995. 78.777-783.
61. Maeno M, Yamamoto N, Takano, T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*. 1996. 79(8):1316-21.
62. Seppo L, Jauhiainen T, Poussa T, Korpela R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *The American journal of clinical nutrition*. 2003. 77(2):326-30.
63. Chen GW, Tsai JS, Pan BS. Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. *International Dairy Journal*. 2007. 17(6):641-7.