

Pengaruh pH dan Suhu terhadap Aktivitas Enzim Fibrinolitik Dari Bakteri Asal Yogurt

Fradita Ramadhini NURINDAH¹⁾, Achmad Toto POERNOMO ^{1*)}, M. Faris ADRIANTO¹⁾

¹⁾Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga

^{*)} Corresponding Author, Jl. Dharmawangsa Dalam Surabaya 60286, e-mail : achmad.toto.p@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas enzim fibrinolitik yang berasal dari bakteri asam laktat yogurt. Peneliti menggunakan metode lempeng fibrin dan menggunakan enzim kasar dari sampel yogurt untuk melakukan penapisan. Tes fibrin plate menggunakan agarosa dan 3% fibrin sebagai media. Hasilnya, bakteri asam laktat Yogurt dalam sampel K memiliki enzim intraseluler yang juga mengandung aktivitas fibrinolitik, oleh karena itu sonikasi digunakan untuk menghancurkan sel. Sampel bakteri asam laktat yogurt yang menghasilkan aktivitas fibrinolitik terbesar adalah K. Dari hasil penelitian, terdapat bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* dalam sampel yogurt K. Sampel dipilih untuk dikarakterisasi efek pH dan suhu. Starter dibuat dan dilakukan pemisahan antara supernatan (enzim kasar) dengan pelet untuk digunakan pada karakterisasi. Enzim kasar diperoleh setelah sentrifugasi pada 9000 rpm pada 4 ° C selama 10 menit. Hasil yang diperoleh dari pengaruh pH adalah bahwa keberadaan aktivitas enzim fibrinolitik berada pada pH optimal 6 dan 7. Suhu aktivitas enzim fibrinolitik berada pada suhu optimum 35 dan 40 ° C.

Kata kunci: Fibrinolitik, Pengaruh pH dan Suhu, Bakteri Asam Laktat,

ABSTRACT

This study aims to determine the effect of pH and temperature on the activity of fibrinolytic enzymes derived from yogurt bacteria. The researcher used the fibrin plate method and used a crude enzyme from yogurt samples to perform a screening test. The fibrin plate test uses agarose and 3% of fibrin as a medium. According to the results, Yogurt bacteria in the sample K has an intracellular bacterial that contains fibrinolytic activity also, therefore sonication was used to break the cell. The yogurt samples that produced the largest fibrinolytic activity was K. From the research results, there are *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* bacteria in the sample of yogurt K. The sample was chosen to be characterized for pH and temperature. A starter was made and performed separation between supernatant (crude enzyme) with pellet to be used on characterization. Crude enzyme was obtained after centrifugation at 9000 rpm at 4 ° C for 10 min. The results obtained from the effect of pH is that the existence of specific activity of fibrinolytic enzyme is at an optimum pH 6 and 7. The effect of temperature is that the activity of specific fibrinolytic enzymes is at an optimum temperature of 35 and 40 ° C.

Keywords: Fibrinolytic, effect of pH and temperature, Lactic acid bacterial

PENDAHULUAN

Penyakit kardiovaskular merupakan penyebab kematian pertama di dunia pada setiap tahun. Penyakit kardiovaskular adalah sekelompok penyakit yang mempengaruhi jantung, otak, dan organ lain dalam sistem tubuh manusia (Li, 2015). Salah satu penyebab terjadinya penyakit kardiovaskular adalah terjadi akumulasi fibrin, sehingga terbentuknya trombus di pembuluh darah disebut dengan trombosis. Fibrin merupakan komponen protein yang terbentuk dari fibrinogen oleh aksi trombin dalam proses pembekuan darah. Trombosis dapat dipecah dengan menggunakan agen trombolitik salah satunya adalah enzim fibrinolitik. Penelitian terhadap agen terapi trombus terus diupayakan untuk mendapatkan terapi yang memiliki harga yang terjangkau dan mengurangi efek samping yang tidak diinginkan.

Enzim fibrinolitik dapat berasal dari hasil fermentasi. Kishk merupakan hasil dari fermentasi susu yang berasal dari Egiptian dan juga mempunyai

aktivitas fibrinolitik yang berasal dari *Lactobacillus plantarum* KSK-II (Kotb, 2014). Penelitian yang dilakukan oleh Essam Kotb, 2014 menyatakan bahwa *Lactobacillus plantarum* KSK-II menghasilkan enzim fibrinolitik karena mempunyai sifat seperti protease subtilisin yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* yang bersifat basa dan digunakan sebagai staining darah (Kotb, 2014).

Salah satu makanan hasil fermentasi Bakteri Asam Laktat yang terdapat di Indonesia adalah yoghurt. Yogurt terbuat dari susu kedelai ataupun sapi. Susu sapi memiliki kandungan gizi yang tinggi karena memiliki kadar lemak 3,1%, protein 2,8%, bahan kering 11,2%, bahan kering tanpa lemak 8,1%. Enzim utama yang terkandung dalam yoghurt adalah enzim proteolitik. Enzim proteolitik tersebut berasal dari Bakteri Asam Laktat (BAL) yang berada dalam yogurt. Bakteri asam laktat dapat menghasilkan enzim proteolitik di sekitar dinding sel, membran sitoplasma, atau di dalam sel. Pertumbuhan bakteri asam laktat dengan cara

menghidrolisis kasein dengan menggunakan protease yang berada disekitar permukaan dinding sel (Putranto, 2007).

Pada penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas enzim fibrinolitik dari yogurt, dan dilakukan karakterisasi enzim fibrinolitik dengan melihat pengaruh pH dan suhu. Enzim dapat berkerja optimal pada kondisi tertentu. Kondisi tersebut melihat pH dan suhu optimal dari setiap bakteri yogurt yang dicoba. Perubahan pH dapat terjadi apabila terjadi perubahan gugus ionik enzim pada sisi aktif secara tidak langsung sehingga dapat mempengaruhi sisi lainnya atau sisi ionisasi (Murray, et al., 2006). Sedangkan suhu dapat berperan penting dalam reaksi enzim karena dapat berpengaruh dalam kestabilan enzim, aktivitas reaksi, dan substrat. Apabila pH dan suhu tersebut terlalu rendah atau tinggi akan mengakibatkan perubahan yang bersifat permanen, sehingga ikatan kimia pada enzim akan terputus, terjadi perubahan pada bentuk spesifiknya, dan terjadi inaktivasi enzim (Dennison, 2002).

Berdasarkan paparan diatas, Penelitian kali ini ingin membuktikan adanya aktivitas proteolitik dan fibrinolitik dalam Bakteri Asam Laktat (BAL) yang terdapat pada yogurt dan memperoleh pH dan suhu optimum aktivitas enzim fibrinolitik dari bakteri yogurt tersebut

METODE PENELITIAN

Bahan :

Beberapa yogurt yang terkandung berbagai macam bakteri fermentasi di dalamnya, nutrient broth, susu skim mengandung kasein tinggi, fibrin bovine blood dari SIMAGCHEN®, asam fosfat pa, asam fosfat pa, metilen blue, aquadest, tirosin, TCA for analysis dari Merck, dan agar dari sigma, NaCl dan natto.

Alat :

Mikropipet, tabung sentrifus, zentrifugen Rotofix 32A, autoclave HL-340 series vertical type steam sterilizer, pH meter handylab pH 11 Schott®, shaker wiseShake, ultrasonic cleanser Branson® 1210, kawat Öse, pinset, dan magnetic stirrer, spektrofotometer thermosiecetific GENESYS-20 vortex maxi mix II IKA® genius 3, timbangan digital.

1. Peremajaan Bakteri Yogurt

Media ini dibuat dengan melarutkan 20 gram agar dan 8 gram MRS agar dalam 1 L aquabidest dengan pemanasan, lalu dimasukkan dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 8 mL dan disterilkan menggunakan autoklaf dengan temperatur 121°C selama 15 menit. Media agar steril dimiringkan dan ditunggu hingga dingin dan memadat. Bakteri yang menunjukkan hasil positif pada uji aktivitas proteolitik dan fibrinolitik dilakukan peremajaan pada media dengan cara mengambil bakteri dengan Öse dan menggoreskan secara aseptis pada media agar miring. Kemudian diinkubasi pada inkubator suhu 37 oC selama 24 jam.

2. Optimasi Sonikasi Bakteri Yogurt

Pada preparasi sampel dilakukan pengenceran, vortex, sonikasi pada berbagai waktu, yaitu 5, 10, 15, 20 dan 25 menit, kemudian sampel tersebut disentrifugasi selama 10 menit. Optimasi sonikasi menggunakan media susu skim dan agar. Komposisi susu skim 5% dan agar 1,5% b/v dilarutkan dalam aquabidest, lalu di pasteurisasi dengan cara dipanaskan pada suhu 80°C selama 30 menit di atas hotplate dan diambil 15 ml dengan spet dan dimasukkan ke dalam cawan petri, diratakan dan ditunggu hingga memadat (Kumaran, et al., 2011). Bakteri yang sudah di preparasi di masukan pada lubang media susu skim agar (Skim Milk Agar) . Dengan cara meneteskan 50 µL hasil peremajaan bakteri pada media padat dengan mikropipet dan diinkubasi 32oC selama 24 jam. Zona jernih yang terbentuk mengindikasikan adanya bakteri penghasil enzim proteolitik. Diukur diameter zona jernih dan ditentukan indeks proteolitiknya dan di replikasi sebanyak 3 kali (Kumaran, et al., 2011)).

Indeks proteolitik (IP) = R/r

Keterangan :

R : Diameter zona jernih (mm)

r : Diameter koloni bakteri (mm)

3. Uji Aktivitas Proteolitik

Pada preparasi sampel dilakukan pengenceran, vortex, sonikasi pada waktu terpilih, yaitu 5 menit, kemudian sampel tersebut disentrifugasi selama 10 menit. Optimasi sonikasi menggunakan media susu skim dan agar. Komposisi susu skim 5% dan agar 1,5% b/v dilarutkan dalam aquabidest, lalu di pasteurisasi dengan cara dipanaskan pada suhu 80°C selama 30 menit di atas hotplate dan diambil 15 ml dengan spet dan dimasukkan ke dalam cawan petri, diratakan dan ditunggu hingga memadat (Kumaran, et al., 2011). Bakteri yang sudah di preparasi di masukan pada lubang media susu skim agar (Skim Milk Agar) . Dengan cara meneteskan 50 µL hasil peremajaan bakteri pada media padat dengan mikropipet dan diinkubasi 32oC selama 24 jam. Zona jernih yang terbentuk mengindikasikan adanya bakteri penghasil enzim proteolitik. Diukur diameter zona jernih dan ditentukan indeks proteolitiknya dan di replikasi sebanyak 3 kali (Kumaran, et al., 2011)).

Indeks proteolitik (IP) = R/r

Keterangan :

R : Diameter zona jernih (mm)

r : Diameter koloni bakteri (mm)

4. Uji Aktivitas Fibrinolitik (Fibrin Plate)

Skrining enzim fibrinolitik diuji pada media fibrin plate dilakukan dengan membuat larutan 3% fibrin dan dilarutkan dalam dapar borat 0,1 M pH 7,8 dicampur dengan agar sebanyak 1,7% kemudian dipanaskan. Kemudian diambil 20 mL media dan dituang ke cawan petri dan menambahkan 200 µL metilen blue. Diberi metilen blue untuk melihat adanya zona jernih.

Kemudian media didiamkan hingga memadat. Kemudian dibuat 6 lubang untuk enzim dan 1 lubang untuk standar nattokinase (Kumaran, et al., 2011). Dimasukkan 50 μ L inokulum bakteri proteolitik yogurt yang telah diremajakan pada 6 lubang dan 1 lubang diberi standar natto. Sampel tersebut dimasukkan pada fibrin plate yang telah dibuat, kemudian diinkubasi pada suhu 32 oC selama 24 jam pada pH 7. Aktivitas fibrinolitik ditunjukkan dengan adanya zona jernih disekitar lubang dan perbandingan antara diameter zona bening dengan diameter lubang (Kumaran, et al., 2011).

5. Pembuatan Starter

Hasil peremajaan bakteri fibrinolitik diberi larutan 10 mL NaCl 0,9 % dan divorteks hingga bakteri terlepas dari mediana ($\pm$ 15 menit). Kemudian larutan dibuat pengenceran pada eppendorf dan diukur hingga didapatkan transmittan 25 %. Kemudian sebanyak 5 ml suspensi dengan transmittan 25 % dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer berisi 50 mL MRS broth. Labu Erlenmeyer diinkubasi dengan shaker inkubator dengan kecepatan 90 rpm selama 24 jam pada suhu 28oC. Hasil inkubasi ini digunakan sebagai starter untuk pengujian berikutnya. Pembuatan produksi enzim fibrinolitik dilakukan dalam kondisi yang sama seperti proses pengambilan sampel, yaitu hasil starter diambil 20 mL kemudian dimasukan ke eppenorf besar kemudian di sonikasi selama 5 menit dan dilakukan sentrifus dengan kecepatan 9000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Kemudian memisahkan antara supernatan (crude enzyme) dan pelet. Lalu diambil crude enzyme dan

dimasukan pada eppendorf besar lain dan disimpan pada freezer lemari pendingin, untuk menjaga kestabilan bakteri.

6. Karakterisasi pH dan Suhu Optimum

Bakteri Hasil produksi enzim dipisahkan antara supernatan (crude enzyme) dengan pelet. Mengambil crude enzyme dan dilakukan uji penentuan suhu. Media terdiri dari berbagai macam pH dapar, yaitu pH 4,5,6,7 dan 8 kemudian ditambahkan agar dan fibrin sebanyak 3 %. Lalu diinkubasi pada suhu 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 60°C. Diamati zona jernih yang terdapat pada plate selama 24 jam. Kemudian mengukur indeks fibrinolitik setiap pH dan suhu yang dicoba.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kerja enzim dipengaruhi oleh kondisi lingkungan di sekitarnya. Apabila kondisi lingkungan berbeda, maka dapat mempengaruhi kerja enzim secara keseluruhan. Enzim akan bekerja secara maksimal bila berada pada kondisi lingkungan yang optimum. Oleh karena itu perlu dilakukan karakterisasi secara biokimiawi untuk mengetahui kondisi optimum pada setiap enzim. Optimasi aktivitas enzim fibrinolitik pada *Lactobacillus plantarum* sudah pernah dilakukan dan menunjukan bahwa pH dan suhu memiliki pengaruh terhadap aktivitas enzim (Kotb, 2014). Digunakan sekitar 20 sampel probioyitik untuk diuji aktivitas proteolitik dan fibrinolitik. Optimasi sonikasi sampel yogurt terpilih adalah sonikasi selama 5 menit..

Tabel 1. Harga indeks proteolitik optimasi sonikasi 5 menit

Sampel	Diameter zona jernih (mm)	Diameter sumur (mm)	Indeks proteolitik
Sampel A	9,38	5,8	1,62
Sampel B	Tidak ada	5,8	Tidak ada
Sampel C	8,93	5,8	1,54
Sampel D	9,02	5,8	1,56
Sampel E	Tidak ada	5,8	Tidak ada
Sampel F	Tidak ada	5,8	Tidak ada
Sampel G	Tidak ada	5,8	Tidak ada
Sampel H	Tidak ada	5,8	Tidak ada
Sampel I	9,05	5,8	1,56
Sampel J	7,81	5,8	1,35
Sampel K	10,03	5,8	1,73
Sampel L	Tidak ada	5,8	Tidak ada
Sampel M	Tidak ada	5,8	Tidak ada
Sampel N	Tidak ada	5,8	Tidak ada

Tabel 2. Harga indeks fibrinolitik

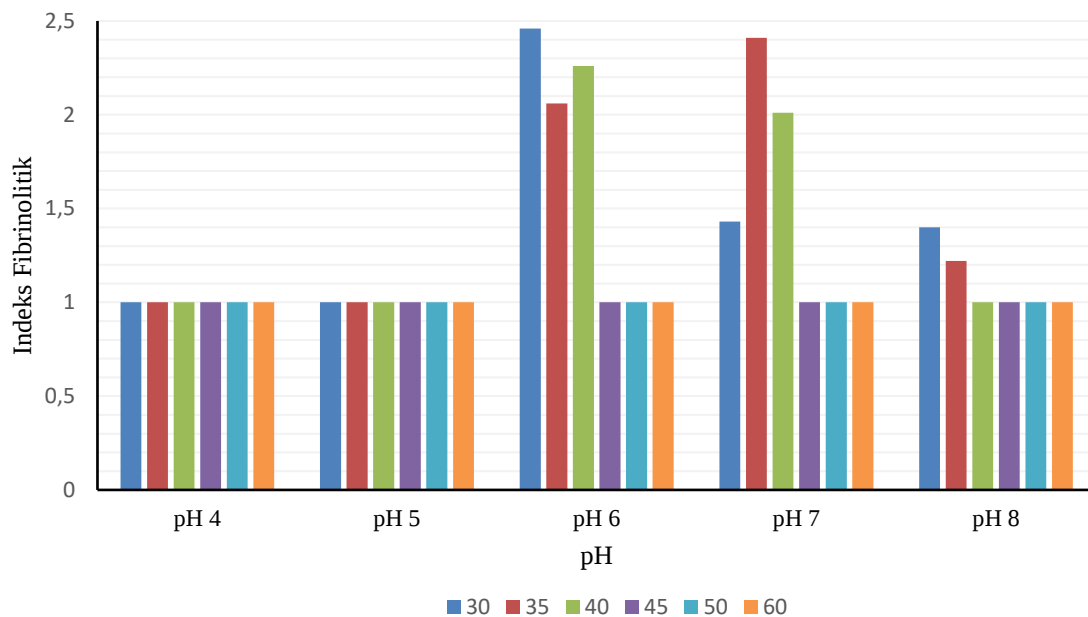
Item	Diameter zona jernih (mm)	Diameter sumur (mm)	Indeks fibrinolitik (Unit)
Sampel A	16,55	8	2,07
Sampel C	16,50	8	2,06
Sampel D	14,00	8	1,75
Sampel K	19,75	8	2,47
Kontrol negatif	-	8	-
Kontrol positif	18,50	8	2,31

Hasil dari Uji proteolitik yaitu terpilih empat sampel yogurt yang memiliki diameter zona jernih terbesar. Sampel yang dapat menghasilkan zona jernih yaitu sampel A, C, D dan K.

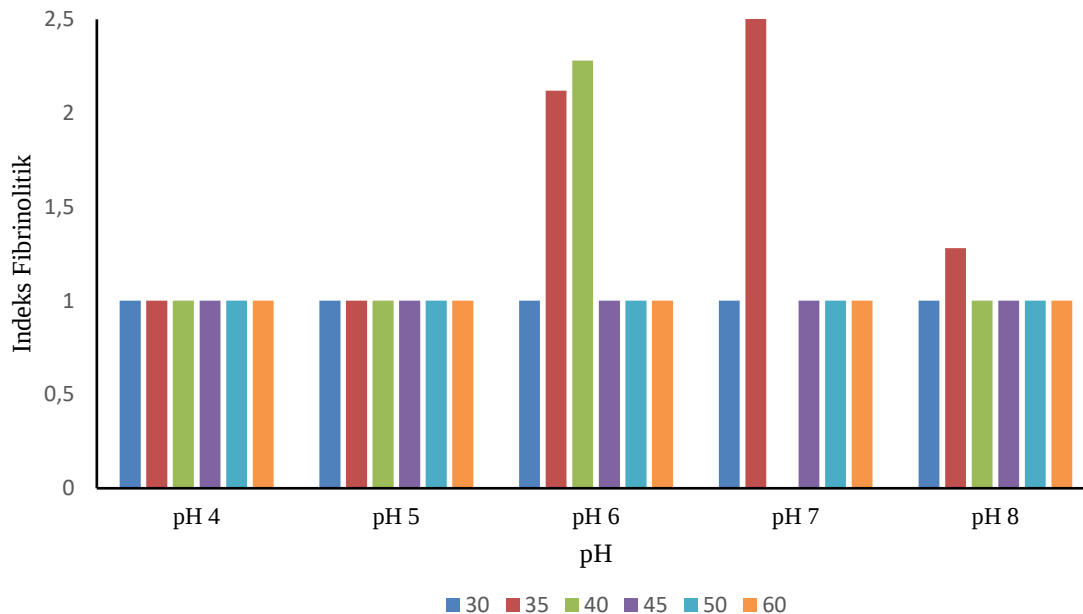
Hasil skrining enzim proteolitik menghasilkan zona jernih di sekitar koloni yang menunjukkan bahwa bakteri yogurt menghasilkan enzim proteolitik. Terbentuk zona jernih yang berarti terhidrolisisnya protein kasein oleh enzim proteolitik membentuk asam amino yang lebih larut dalam media. Sedangkan warna

putih dari susu yang dihasilkan adalah ikatan kompleks kalsium-protein. Dari keempat sampel bakteri yogurt yang diuji, semua menghasilkan diameter zona jernih yang berbeda-beda.

Lalu diambil sampel K yang memiliki diameter zona jernih terbesar untuk uji karakterisasi pH dan suhu. Hasil skrining enzim fibrinolitik sampel K memiliki indeks fibrinolitik rata-rata 2,47. Nattokinase sebagai kontrol positif memberikan zona jernih dengan indeks fibrinolitik rata-rata 2,31. Setelah terbukti bahwa hasil



Gambar 1. Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas fibrinolitik. Perlakuan sample menggunakan sonikasi



Gambar 3. Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas fibrinolitik. Perlakuan sample tanpa sonikasi

Bakteri asam laktat dari sampel K memiliki aktivitas fibrinolitik pada uji fibrin plate, selanjutnya dilakukan produksi enzim fibrinoliti dan dilakukan karakterisasi terhadap pH dan suhu. Aktivitas enzim bekerja pada daerah stabilitas pH yang spesifik. Variasi pH rendah atau tinggi juga dapat menyebabkan enzim mengalami denaturasi dan memberikan efek pada struktur ion dari enzim, substrat atau keduanya. Efek yang terjadi berupa perubahan gugus ionik enzim pada sisi aktif secara tidak langsung. Perubahan ionisasi juga terhadap juga dialami pada substrat atau kompleks enzim-substrat, sehingga dapat mempengaruhi aktivitas enzim (Murray et al., 2006). Penetapan pH optimum enzim dilakukan pada variasi pH. Variasi pH yang dilakukan adalah 4, 5, 6, 7 dan 8. Dapar pH yang digunakan adalah dapar sitrat untuk pH 4-5, dapar fosfat untuk pH 6, 7, dan 8. Hal tersebut didukung dari data statistik yaitu uji normalitas lebih dari 0,05 yang berarti kelompok distribusi tersebut normal. Pada Post hoc test memiliki nilai significant lebih kecil dari 0,05 dan memiliki nilai mean terbesar yang berada pada suhu 35°C, namun untuk melihat perbedaan bermakna diantara varian suhu digunakan homogeneous subset. Pada pH 4, 5 dan 8 termasuk pada satu kolom yang berarti tidak ada perbedaan bermakna di antara ketiga pH dan pada pH 6 dan 7 juga termasuk pada satu kolom yang berarti tidak terdapat perbedaan bermakna, Sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa pH optimum berada pada pH 6 dan 7. Suhu dapat berperan penting dalam reaksi enzim karena dapat berpengaruh dalam kestabilan enzim, aktivitas reaksi dan substrat. Pada Penetapan suhu optimum enzim dilakukan pada variasi suhu. Variasi suhu yang dilakukan adalah 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C dan 60°C. Pengaruh suhu optimum untuk aktivitas enzim fibrinolitik adalah sekitar pH 35°C dan 40°C. Aktivitas

fibrinolitik dari hasil fermentasi bakteri yogurt sampel K memiliki suhu optimum pada suhu 35°C dan 40°C. Kemudian terjadi penurunan aktivitas pada suhu 45°C. Hal tersebut didukung dari data statistik yaitu uji normalitas lebih dari 0,05 yang berarti kelompok distribusi tersebut normal. Pada Post hoc test memiliki nilai significant lebih kecil dari 0,05 dan memiliki nilai mean terbesar yang berada pada suhu 35°C, namun untuk melihat perbedaan bermakna diantara varian suhu digunakan homogeneous subset. Pada suhu 35°C dan 40°C terdapat pada subset satu kolom yang berarti tidak ada perbedaan bermakna di antara kedua suhu yaitu pada, Sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa suhu optimum berada pada 35°C dan 40°C. Bakteri yang terdapat pada sampel K memiliki pengaruh terhadap aktivitas enzim fibrinolitik yaitu menunjukkan aktivitas optimal pH 6 dan 7 dan suhu 35 dan 40°C. Hasil tersebut didukung dari data pada uji univariate antara pH media dan suhu inkubasi memiliki nilai F hitung = 3,845 yang lebih besar dari F tabel pada taraf kemaknaan 0,05 dan memiliki nilai significant kurang dari 0,05. KESIMPULAN Enzim yang berasal dari sampel yogurt K memiliki aktivitas enzim fibrinolitik. Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas enzim

KESIMPULAN

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak air (serbuk kering) kelopak bunga rosella 1,0 %, larutan madu mangga 50,0 %, dan kombinasinya pada perbandingan 1:9 terhadap *Streptococcus mutans* masing-masing adalah 0,6% (v/v), 17,5% (v/v), dan 25% (v/v).

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Bapak Bakir yang

telah membantu preparasi alat gelas.

DAFTAR PUSTAKA

- Amani., 2016. *The effect of proteolytic activity of starter cultures on technologically important properties of yogurt*. Iran; Wiley Periodicals, Inc.
- Ashipala, O. K., & He, Q., 2008. *Optimization of fibrinolytic enzyme production by Bacillus subtilis DC-2 in aqueous two-phase system (poly-ethylene glycol 4000 and sodium sulfate)*. *Bioresource Technology*, 99, volume 10, p. 4112–4119.
- Brix, K. Stöcker, W. 2013. *Proteases ; Structure and Function*. New York ; Springer Science
- Buchholz, K & Collins, J. 2014. *Concept in Biotechnology*. USA ; John Wiley & Sons, Inc.
- Chandan., 2013. *Dairy Processing and Quality Assurance*. Wiley-Blackwell. A John Wiley & Sons, Ltd, Publication, New Delhi
- Dennison, C., 2002. *A Guide to Protein Isolation*. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic Publishers. Page: 19-21.
- Dib, W., 2014. *Characterization of a new isolate of Lactobacillus brevis WD19 from Algerian goat milk with proteolytic activity*. France ; Global Advanced Research Journals
- Grandlic, C.J., 2008. *Plant growth-promoting bacteria for phytostabilization of mine tailings*. *Environmental Science & Technology* ;42:2079–2084.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>.
September 2016
https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Enzyme/Active_Site[diakses pada tanggal 20 Januari 2017 pukul 08.00 wib]. Surabaya.
- Hultman, K., 2014. *Plasmin deficiency leads to fibrin accumulation and a compromised inflammatory response in the mouse brain*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 12(5), pp.701–712.
- Kayser, F.H., 2005. *Medical Microbiology*, New York, USA: Thieme New York.
- Kim, W., 1996. *Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced from Bacillus sp. strain CK 11-4 Screened from Chungkook-Jang.*, 62(7), pp.2482–2488.
- Kotb, E., 2014. *Activity assessment of microbial fibrinolytic enzymes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, volume 15, p. 6647–6665.
- Kumaran, S, Palani, P, Chellaram, C, Prem, T, Kaviyarsan, V. 2011. *Screening Of Fibrinolytic From South Indian Isolates Of Ganoderma Lucidum*. India; ISSN 0975-6299. Vol 2/Issue 1/ Jan-Mar 2011
- Kunaepah, U., 2008. *Pengaruh Lama Fermentasi dan Konsentrasi Glukosa terhadap Aktivitas Antibakteri, Polifenol Total dan Mutu Kimia Kefir Susu Kacang Merah*. (Tesis). Semarang. Universitas Diponegoro.
- Leskovacs, V., 2004. *Comprehensive Enzyme Kinetics*. New York : Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Li, Y.R., 2015. *Cardiovascular Diseases From Molecular Pharmacology to Evidence-Based Therapeutics*,
- Lippi, G., Franchini, M. & Targher, G., 2011. *Arterial thrombus formation in cardiovascular disease*. *Nature reviews. Cardiology*, 8(9), pp.502–512.
- Luthana, Y. K., 2008. *Yoghurt*. www.yoghurt«yis'sfoodentertaining.htm. (diakses tanggal 19 september 2016)
- Mandal, S., Puniya, A. K. and Singh, K., 2006. *Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated Lactobacillus casei NCDC-298*. *International Dairy Journal* 16(10): 1190-1195.
- Marathe, M.Y & J.S Ghosh. 2009. *Study of Proteinase activity of Lactobacillus plantarum NCIM 2083*. *International J. Genetics & Molecular Bio*. 1(1): 1-5.
- Mendis, S., Puska, P. & Norrving, B., 2011. *Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control*. , p.164.
- Meydani SN., 2016. *Long-term moderate calorie restriction inhibits inflammation without impairing cell-mediated immunity: a randomized controlled trial in non-obese humans*. *Aging Epub ahead of print*
- Muisristanto, D.W.I. & Poernomo, A.T., 2015. *Isolasi dan Penapisan Fibrinolitik Jamur Tanah Hutan Mangrove Wonorejo Surabaya*. *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*, 4(2), pp.11–17.
- Murray, R. K., & Davis, J. C., 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry. Molecular Physiology* (Vol. 16).
- Nelson, D. L., & COx, M. M., 2008. *Lehninger Principles of biochemistry 5th ed*. New York : W. H. Freeman and Company.
- Nelson, D. L., & COx, M. M., 2013. *Lehninger Principles of biochemistry 6th ed*. New York : W. H. Freeman and Company.
- Noviyanti, T & Ardiningsih, P., 2013. *Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Daun Sansakang (Pycnarrhena cauli flora Diels)*. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 1(1), p.1–6.
- Pangesti, N.W.I., Pangastututi, A., & Retnaningsih, E., 2012. *Pengaruh Penambahan Molase Pada Produksi Enzim Xilanase Oleh Fungi Aspergillus niger Dengan Substrat Jerami Padi*. *Bioteknologi*, 9(2), p.35–72.
- Pelczar, M.J. et al., 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Penerjemah: Ratna Siri, dkk. Cetakan pertama. Jilid Dua. Jakarta: Penerbit UI Press.
- Poernomo, A.T & Isaeni., 2015. *Aktivitas Invitro Enzim Fibrinolitik Ekstrak Tempe Hasil Fermentasi Rhizopus oligosporus ATCC 6010 Pada Substrat Kedelai Hitam*, 4(2), pp.18-24
- Pratiwi, ST., 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Yogyakarta: Penerbit Erlangga.
- Puniya, A. K. 2016. *Fermented Milk and Dairy Products*. Boca Raton; Taylor & Francis Group, LLC
- Putranto, W., 2007. *Aktivitas Proteolitik Lactobacillus acidophilus dalam Fermentasi Susu Sapi*

- (*Proteolytic Activity of Lactobacillus acidophilus in Fermentation of Dairy Cow Milk*). Bandung ; Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran
- Resty, A. 2014. *Pengaruh Suhu, pH, Logam dan Inhibitor Terhadap Aktivitas Enzim Fibrinolitik Tempe Kacang Koro Pedang (Canavalia Ensiformis) Hasil Fermentasi Rhizopus oryzae FNCC 6078*. Surabaya ; Universitas Airlangga
- Saranya, N. Devi, P. Nithiyanantham, S. Jeyalaxmi, R. 2014. *Cell Disruption by Ultrasonication*. New York ; Springer Science
- Sugiyono. 2014. *Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif dan R&D*. Bandung : Alfabeta.
- Suhartono MT. 2000. *Pemahaman Karakteristik Biokimia Enzim Protease dalam Menunjang Industri Berbasis Bioteknologi*. Buku Orasi Ilmiah Guru Besar Ilmu Dasar-Dasar Biokimia Dasar. Fateta IPB. Bogor.
- Riadi,Lieke.,2013. *Teknologi Fermentasi*. Eds.2.Graha Ilmu:Yogyakarta.
- Sumi, H., 1987. *Short Communications A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto ; a typical and popular soybean food in the Japanese diet Short Communications A survey of 3-dehydreretinal as a visual pigment chromophore in various species o. , 43, pp.1110–1111.*
- Tamang J.P., 2016. *Functional Properties Of Micoorganisms in Fermented Foods*. Korea ; Frontiers in Microbiology
- Ul-Haq, & Mukhtar, H. 2006. *Biosynthesis of protease from Lactobacillus paracasei ; Kinetic analysis of fermentation parameter*. Pakistan; Indian Journal of Biochemistry & Biophysics Vol. 43, pp. 377-381
- Underkoler, L. Barton, R, Rennert, S. 1957. *Production of Microbial Enzymes and Their Application*. New Jersey ; Miles Labotaories.
- Vij, S., ati, S. & Yadav, D., 2011. *Biofunctionality of Probiotic Soy Yoghurt*. Food and Nutrition Sciences, 2(July), pp.502–509
- Voet D & Voet Judith., 2011. *Biochemistry*. USA ;John wiley & sons, inc