

**PENGARUH LAMA FERMENTASI DAN  
KONSENTRASI GLUKOSA TERHADAP  
AKTIVITAS ANTIBAKTERI, POLIFENOL TOTAL  
DAN MUTU KIMIA KEFIR SUSU KACANG MERAH**

*THE EFFECT OF FERMENTATION DURATION AND  
GLUCOSE CONCENTRATION ON  
ANTIBACTERIAL ACTIVITY, TOTAL POLYPHENOL  
AND CHEMICAL QUALITY OF KIDNEY BEAN MILK KEFIR*



**Tesis**  
Untuk memenuhi sebagian persyaratan  
Mencapai derajat S-2

Magister Gizi Masyarakat

Uun Kunaepah  
E4E 006 072

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
AGUSTUS  
2008**

## PENGESAHAN TESIS

Judul Penelitian : Pengaruh Lama Fermentasi Dan Konsentrasi  
Glukosa Terhadap Aktivitas Antibakteri,  
Polifenol Total Dan Mutu Kimia Kefir Susu  
Kacang Merah

Nama Mahasiswa : Uun Kunaepah

Nomor Induk Mahasiswa : E4E 006 072

Telah diseminarkan pada tanggal 12 Agustus 2008  
Dan telah dipertahankan di depan Tim Penguji  
pada tanggal 29 Agustus 2008  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui  
Komisi Pembimbing

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Ir. Anang M. Legowo, MSc.PhD  
NIP. 131 644 276

Ir. Suyatno, M.Kes  
NIP. 132 090 148

Mengetahui  
Program Studi Magister Gizi Masyarakat  
Program Pascasarjana Universitas Diponegoro  
Ketua

Prof. dr. S. Fatimah Muis, MSc, SpGK  
NIP. 130 368 067

Tesis ini telah diuji dan dinilai oleh panitia penguji pada  
Program Studi Magister Gizi Masyarakat  
Program Pascasarjana Universitas Diponegoro  
Pada tanggal 29 Agustus 2008

Moderator : Prof. dr. S. Fatimah Muis, MSc, SpGK

Notulis : Kris Dyah Kurniasari, SE

Penguji : I. Prof. Ir. Anang M. Legowo, MSc.PhD .....

II. Ir. Suyatno, M.Kes .....

III. Ir. Retno Murwani, MSc.MAppSc.PhD .....

IV. Ir. Nurrahman, Msi. ....

## **PERNYATAAN**

Dengan ini saya menyatakan bahwa Tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan sumbernya dijelaskan dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Agustus 2008

Uun Kunaepah

## ABSTRAK

### PENGARUH LAMA FERMENTASI DAN KONSENTRASI GLUKOSA TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI, POLIFENOL TOTAL DAN MUTU KIMIA KEFIR SUSU KACANG MERAH

Uun Kunaepah

Kefir susu kacang merah merupakan salah satu produk fermentasi Bakteri Asam Laktat (BAL). Kefir bermanfaat bagi kesehatan antara lain memperbaiki proses pencernaan dan memproduksi senyawa antibakteri. Tujuan penelitian adalah mengetahui pengaruh lama fermentasi dan konsentrasi glukosa terhadap aktivitas antibakteri, polifenol total dan mutu kimia kefir susu kacang merah.

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap faktorial 3x3 dengan ulangan 3 kali. Materi yang digunakan adalah kacang merah, starter bakteri *Lactobaccillus bulgaricus* dan khamir *Candida kefir* dengan perlakuan konsentrasi glukosa 5%, 10%, 15% dan lama fermentasi 18 jam, 21 jam, 24 jam. Variabel yang diukur adalah aktivitas antibakteri menggunakan difusi agar, polifenol total menggunakan reagen *Folin-Ciocalteu* dengan spektrofotometer *UV-Vis* dan mutu kimia (Total asam, pH, kadar alkohol) kefir susu kacang merah. Analisis data menggunakan Analisis varians (Anova). Apabila ada pengaruh perlakuan terhadap variabel yang diukur, dilanjutkan dengan uji *LSD* pada taraf 5%.

Hasil penelitian menunjukkan ada pengaruh lama fermentasi terhadap aktivitas antibakteri ( $p=0,001$ ) dan mutu kimia (asam laktat,  $p=0,001$ ; pH,  $p=0,001$ ; alkohol,  $p=0,008$ ) kefir susu kacang merah, tetapi tidak berpengaruh terhadap polifenol total ( $p>0,05$ ). Konsentrasi glukosa berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri ( $p=0,001$ ), tetapi tidak berpengaruh terhadap polifenol total dan mutu kimia kefir susu kacang merah ( $p>0,05$ ). Total asam kefir susu kacang merah pada semua perlakuan mengalami peningkatan setelah dilakukan fermentasi 24 jam. Terjadi penurunan pH kefir susu kacang merah pada semua perlakuan setelah fermentasi 24 jam. Kadar alkohol kefir susu kacang merah meningkat pada lama fermentasi 21 jam, tetapi mengalami penurunan setelah dilakukan fermentasi 24 jam.

Simpulan penelitian ini adalah aktivitas antibakteri kefir susu kacang merah paling efektif pada perlakuan lama fermentasi 24 jam dengan konsentrasi glukosa 5% yaitu 1,50 mm. Polifenol total kefir susu kacang merah meningkat setelah fermentasi.

Kata Kunci : Lama fermentasi, konsentrasi glukosa, aktivitas Antibakteri, polifenol total, kefir susu kacang merah.

## ABSTRACT

### **The Effect of Fermentation Duration and Glucose Concentration on Antibacterial Activity, Total Polyphenol, and Chemical Quality of Kidney Bean Milk Kefir**

Uun Kunaepah

Kidney bean milk kefir is one product of Lactate Acid Bacteria (LAB) fermentation. Kefir is very useful for health e.g. recovering digestive process and producing antibacterial compound. The purpose of study is to know the effect of fermentation duration and glucose concentration on antibacterial activity, total polyphenol, and the chemical quality of kidney bean milk kefir.

This study used the completely randomized design with 3 by 3 factorial and 3 repetitions. The materials used were kidney beans, bacteria starter *Lactobacillus bulgaricus* and *Candida kefir* with glucose concentration of 5%, 10%, 15%. The duration of fermentation used were 18, 21 and 24 hours. The variables measured were antibacterial activity (by agar diffusion), total polyphenol (by *Folin-Ciocalteu* with *spectrophotometer UV-Vis*) and chemical quality of kidney bean milk kefir (total acid, pH and alcohol content). Data were analysed using ANOVA technique, which were followed by *LSD*, if there was a treatment effect.

The result of this study showed that there was an effect of the fermentation duration on antibacterial activity ( $p=0.001$ ) and chemical quality (total acid,  $p=0.001$ ; pH,  $p=0.001$ ; alcohol content,  $p=0.008$ ) of kidney bean milk kefir. On the other hand, it had no effect on total polyphenol ( $p>0.05$ ). The glucose concentration showed an effect on antibacterial activity ( $p=0.001$ ), but it had no effect on total polyphenol and chemical quality of kidney bean milk kefir ( $p>0.05$ ). The total acid of kidney bean milk kefir on all treatments increased after 24-hour-fermentation. On all treatment, pH of kidney bean milk kefir decreased after 24 hours fermentation. The alcohol content increased after 21 hours fermentation, but then decreased after 24 hours fermentation.

It was concluded that the most effective antibacterial activity of kidney bean milk kefir was on the 24 hours fermentation and 5% of glucose concentration, which resulted in 1,50 mm. The total polyphenol increased after fermentation.

Keywords: Fermentation duration, glucose concentration, antibacterial activity, total polyphenol, kidney bean milk kefir.

## **RIWAYAT HIDUP**

### **A. IDENTITAS**

Nama : Uun Kunaepah  
Tempat, Tanggal Lahir : Kemurang Wetan, 9 Januari 1971  
Jenis Kelamin : Perempuan  
Agama : Islam  
Alamat : Komplek Bukit Delta Mas Blok D No. 4  
Makassar, Sulawesi Selatan

### **B. RIWAYAT PENDIDIKAN**

1. SDN 2 Kemurang Wetan, tamat tahun 1984
2. SMPN 1 Tanjung, tamat tahun 1987
3. SMAN 2 Brebes, tamat tahun 1990
4. Akademi Gizi Depkes RI Bandung, tamat tahun 1994
5. D-IV Gizi Masyarakat Universitas Brawijaya, Malang, tamat tahun 2002

### **C. RIWAYAT PEKERJAAN**

1. Staf Akademi Gizi Mataram, tahun 1995-1997.
2. Dosen jurusan Gizi Poltekkes Makassar, tahun 1997 sampai sekarang.

### **D. RIWAYAT PELATIHAN**

1. PEKERTI, tahun 2003
2. AA/*Applied Approach*, tahun 2006

## RINGKASAN

### **PENGARUH LAMA FERMENTASI DAN KONSENTRASI GLUKOSA TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI, POLIFENOL TOTAL DAN MUTU KIMIA KEFIR SUSU KACANG MERAH**

Pengolahan pangan dengan berbagai macam teknik pengolahan banyak dilakukan. Salah satu teknik pengolahan pangan adalah fermentasi (Buckle *et al.*, 1985). Kefir merupakan salah satu produk fermentasi yang memiliki rasa, warna dan konsistensi yang menyerupai yoghurt dan memiliki aroma khas *yeasty* (seperti tape). Kelebihan kefir adalah adanya bakteri probiotik yang terbukti dapat memperbaiki proses pencernaan dengan menyediakan mikroflora yang dibutuhkan dan dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen di dalam saluran pencernaan (Sari, 2007).

Kefir biasanya dibuat dari susu hewani atau susu kedelai. Pada umumnya susu sapi digunakan sebagai bahan dasar pembuatan kefir, meskipun harganya relatif mahal. Susu kedelai mempunyai kelemahan yaitu rasa langu yang menyebabkan produk kefir susu kedelai kurang disukai. Alternatif lain sebagai bahan pembuatan kefir adalah kacang merah dan diharapkan dapat menjadi salah satu alternatif produk minuman kesehatan.

Kacang merah merupakan salah satu jenis kacang yang sering digunakan dalam pembuatan makanan di Indonesia dan dunia. Kacang merah adalah sumber karbohidrat kompleks, serat, vitamin B (terutama



asam folat dan vitamin B1), kalsium, fosfor, zat besi dan protein. (Afriansyah, 2007). Kacang merah juga mempunyai kandungan senyawa fungsional golongan polifenol yaitu prosianidin sebanyak 7-9% (Anonim, 2007.A).

Fermentasi kacang merah menjadi kefir menggunakan bakteri asam laktat (BAL) dan khamir *Candida kefir* yang bekerja sama secara simbiosis. Bakteri asam laktat menghasilkan asam laktat dari pemecahan glukosa. Khamir penting dalam proses fermentasi kefir karena menghasilkan senyawa etanol dan komponen pembentuk flavor sehingga menghasilkan cita rasa yang khas (Usmiati, 2007). Kandungan gula alami susu kacang merah yang dapat dimanfaatkan oleh mikroorganisme dalam proses pembuatan kefir sangat terbatas, oleh karena itu perlu dilakukan penambahan gula sebagai sumber karbon. Pemilihan glukosa dikarenakan glukosa adalah gula dalam bentuk sederhana yang dapat langsung dimanfaatkan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhannya, sehingga pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus* dan *Candida kefir* dapat dipacu.

Proses fermentasi kefir hampir sama dengan proses fermentasi pada pembuatan yoghurt. Pada umumnya, proses fermentasi kefir (pada susu sapi) dilakukan dengan penambahan gula 10%, starter 3% dan diinkubasi selama 6 jam pada suhu 43°C (Buckle *et al.*,1987). Menurut Usmiati (2007), fermentasi kefir juga dapat dilakukan pada suhu ruang sekitar 20-24 jam.

Pada proses fermentasi kefir, akan dihasilkan metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer adalah senyawa-senyawa kimia yang dihasilkan oleh mikroba dan dibutuhkan oleh mikroba tersebut untuk pertumbuhannya (Rahman *et al.*, 1992). Metabolit primer antara lain asam laktat dan alkohol. *Lactobacillus bulgaricus* merupakan bakteri *homofermentatif* yang terutama memproduksi asam laktat melalui proses *glikolisis*/pemecahan glukosa, sedangkan *Candida kefir* dalam proses fermentasi akan menghasilkan alkohol dan karbondioksida.

Metabolit sekunder adalah senyawa yang disintesis oleh mikroba tetapi tidak merupakan kebutuhan fisiologis pokok (Pawiroharsono, 2007). Salah satu metabolit sekunder yang dapat berfungsi sebagai antibakteri adalah *bacteriocin*. Penelitian yang dilakukan oleh Todorov dan Dicks (2007), menyebutkan bahwa aktivitas antibakteri berupa *bacteriocin* yang dihasilkan oleh *Lactobacillus pentosus ST712BZ* optimum setelah lama fermentasi 24 jam dengan media pertumbuhan yang ditambahkan 20-40 gram/liter glukosa.

Metabolit sekunder lain yang dihasilkan dalam proses fermentasi adalah polifenol. Penelitian Katina *et al.* (2007) pada *bran* yang difermentasi dengan menggunakan bakteri asam laktat (BAL) menunjukkan peningkatan total fenol. Peningkatan total fenol kemungkinan disebabkan oleh BAL yang mempunyai enzim untuk mendegradasi asam hidroksi sinamat yang biasanya terdapat dalam dinding sel kacang-kacangan atau biji-bijian (Gawel, 2004). Selain itu kefir

juga memiliki enzim tersebut sehingga mampu menghasilkan pula polifenol. Polifenol ini diketahui mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Hal ini dibuktikan oleh hasil penelitian Alberto *et al.* (2006), yang menunjukkan polifenol dari kulit apel dapat menghambat bakteri patogen pada manusia seperti *E. Coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Semakin lama fermentasi dan semakin banyak glukosa yang ditambahkan, mikroorganisme berkembangbiak semakin banyak, sehingga kemampuan mikroba (*Lactobacillus bulgaricus* dan khamir *Candida kefir*) memecah glukosa menghasilkan metabolit primer (asam laktat dan alkohol) dan metabolit sekunder (aktivitas antibakteri dan polifenol), semakin banyak (Astawan, 2008). Tetapi belum diketahui lama fermentasi dan penambahan gula yang optimal pada fermentasi kefir susu kacang merah untuk menghasilkan aktivitas antibakteri yang efektif dan mutu kimia yang sesuai (asam laktat dan alkohol) dengan SNI.

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh lama fermentasi dan konsentrasi glukosa terhadap aktivitas antibakteri, polifenol total dan mutu kimia kefir susu kacang merah. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap faktorial 3 x 3 dan 3 kali ulangan dengan faktor lama fermentasi (6 jam, 8 jam dan 10 jam), konsentrasi glukosa (5%, 10% dan 15%).

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Ilmu Teknologi Pangan (ITP) Jurusan Gizi Poltekes Semarang dan laboratorium Biokimia Nutrisi Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak

Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro pada bulan Mei 2008. Penelitian dilakukan dalam beberapa kegiatan, yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama meliputi pembuatan produk dan pengukuran variabel.

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan yaitu lama fermentasi dan konsentrasi glukosa terhadap aktivitas antibakteri, total polifenol dan mutu kimia (total asam, kadar alkohol, pH) kefir susu kacang merah digunakan uji statistik *Analisis of Variance* (Anova) (Sugiyono,2003). Apabila terjadi pengaruh perlakuan terhadap variabel yang diamati, maka analisis dilanjutkan dengan uji *LSD* pada taraf 5% dengan menggunakan program komputer SPSS versi 11,5.

Pada pembuatan kefir susu kacang merah, starter yang digunakan berasal dari susu sapi yang diinokulasi dengan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan khamir *Candida kefir*, diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Starter yang akan digunakan dihitung terlebih jumlah koloni berdasarkan *Standart Plate Count* (SPC). Dari analisis diperoleh jumlah mikroba sebanyak  $4,025 \times 10^6$  cfu/ml. Jumlah koloni tersebut sesuai menurut Buttock dan Azam (1998), yaitu jumlah bakteri yang diperlukan  $10^6$  cfu/ml, jumlah khamir  $10^6 - 10^7$  cfu/ml agar proses fermentasi dapat berjalan dengan baik. Pembuatan susu kacang merah, untuk 1 kg kacang merah kering, menghasilkan susu kacang merah sebanyak 7500 ml.

Hasil penelitian menunjukkan ada pengaruh lama fermentasi terhadap aktivitas antibakteri dan mutu kimia kefir susu kacang merah

( $p < 0,05$ ), tetapi tidak berpengaruh terhadap total polifenol ( $p > 0,05$ ), Perlakuan konsentrasi glukosa berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri ( $p < 0,05$ ), tetapi tidak berpengaruh terhadap total polifenol dan mutu kimia kefir susu kacang merah ( $p > 0,05$ ).

Pengukuran aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar terhadap bakteri *Escherichia coli* karena bakteri ini merupakan bakteri patogen yang berkaitan erat dengan makanan terutama menyebabkan gangguan masalah pencernaan. Aktivitas antibakteri kefir susu kacang merah yang diukur dengan diameter zona bening adalah 0.30 mm -1,50 mm. Pada penelitian ini, sebelum fermentasi tidak terdapat aktivitas antibakteri.

Berdasarkan hasil uji *Anova* (Lampiran 3), menunjukkan lama fermentasi dan konsentrasi glukosa berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ), serta interaksi antara lama fermentasi dan konsentrasi glukosa menunjukkan berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap aktivitas antibakteri.

Lama fermentasi berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri, karena semakin lama fermentasi, bakteri semakin aktif, semakin banyak jumlahnya, sehingga mempunyai kemampuan untuk memecah substrat semakin besar. Adanya akumulasi asam laktat menyebabkan penurunan pH. Asam laktat yang tinggi dan pH yang rendah mempunyai fungsi sebagai antibakteri yaitu menghambat pertumbuhan bakteri patogen. *E. coli* digunakan sebagai efek penghambatan karena merupakan bakteri patogen yang tumbuh optimum pada pH 6 -7 (Surono, 2004). Pada lama

fermentasi 24 jam, diduga substrat sudah mulai habis ( Fardiaz,1989), sehingga bakteri *Lactobacillus bulgaricus* yang dipakai dalam fermentasi kefir susu kacang merah, memecah substrat yang ada dalam tubuhnya yaitu dalam bentuk aktivitas antibakteri seperti *bacteriocin*.

Konsentrasi glukosa berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri, karena glukosa merupakan substrat yang mudah dicerna dan dimanfaatkan untuk pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus* dalam menghasilkan metabolit sekunder berupa aktivitas antibakteri. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Todorov dan Dick (2007), bahwa aktivitas antibakteri yang dihasilkan oleh *Lactobacillus pentosus* ST71BZ optimum dengan media yang ditambahkan 20-40 gram/liter glukosa.

Pada penelitian ini interaksi antara lama fermentasi dan konsentrasi glukosa menunjukkan berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap aktivitas antibakteri. Hal tersebut mempunyai arti lama fermentasi dan konsentrasi glukosa secara bersama-sama mempengaruhi aktivitas antibakteri. Dalam penelitian ini, aktivitas antibakteri paling besar/efektif adalah pada lama fermentasi 24 jam dan penambahan glukosa 5% yaitu 1,50 mm. Hal tersebut sejalan dengan penelitian Todorov dan Dick (2007), bahwa aktivitas antibakteri yang dihasilkan oleh *Lactobacillus pentosus* ST71BZ optimum setelah lama fermentasi 24 jam dengan media yang ditambahkan 20-40 gram/liter glukosa. Pada penelitian ini glukosa yang ditambahkan

adalah 5% (10 gram/200 ml susu kacang merah) atau 50 gram glukosa dalam 1 liter susu kacang merah yang akan difermentasi.

Pengukuran polifenol total dilakukan dengan menggunakan *spektrofotometer UV-Vis* pada panjang gelombang 760 nm. Pada lama ifermentasi 21 jam polifenol total meningkat tajam, tetapi menurun pada lama fermentasi 24 jam. Hal ini diduga karena kondisi asam yang sesuai. Menurut Shahidi and Nack (1995), pembentukkan senyawa fenol melalui asam hidroksi sinamat dan asam ferulat memerlukan kondisi asam yang sedang dengan nilai pH 4 - 5. Pada lama fermentasi 21 jam, pH kefir susu kacang merah antara 4,09 – 4,16. Total polifenol menurun setelah fermentasi 24 jam, karena proses dekarboksilasi oleh enzim *ferulic acid reductase* dan *vinyl phenol reductase* yang dihasilkan *Lactobacillus bulgaricus* dan *Candida kefir* tidak maksimal. Pada perlakuan lain, polifenol total hampir merata yaitu 0,0039 mg/ml-0,0045 mg/ml.

Berdasarkan hasil uji *Anova* (Lampiran 3), menunjukkan perlakuan lama fermentasi dan konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata ( $p>0,05$ ) terhadap polifenol total dan interaksi lama fermentasi dan konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata ( $p>0,05$ ). Berdasarkan pengukuran polifenol total sebelum fermentasi (0,00033 mg/ml), polifenol total susu kacang merah meningkat setelah mengalami fermentasi. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian Katina *et al.* (2007) pada *bran* yang difermentasi dengan menggunakan bakteri asam laktat (BAL) menunjukkan peningkatan fenol total.

Hal tersebut di atas sesuai dengan pendapat Gawel (2004), kacang-kacangan termasuk kacang merah mempunyai kandungan asam hidroksi sinamat yang teresterifikasi dalam dinding sel polisakarida. Peningkatan polifenol kefir susu kacang merah karena adanya dekarboksilasi asam sinamat (*ferulic acid* dan *coumaric acid*) membentuk *4-vinylphenol*. Dekarboksilasi asam sinamat menjadi *vinyl fenol* terjadi karena aktivitas enzim *vinyl phenol reductase* yang dihasilkan oleh khamir (Beek and Priest, 2000). *Lactobacillus* memiliki pula kemampuan mendegradasi asam ferulat dan asam sinamat yang merupakan komponen polisakarida dinding sel kacang-kacangan melalui aktivitas enzim *ferulic acid reductase* dan *vinyl phenol reductase* menjadi *4-vinyl phenol* dan *4-vinyl guaiacol* (Gawel, 2004).

Polifenol sebagai metabolit sekunder proses fermentasi kefir, mempunyai fungsi sebagai antibakteri. Pada penelitian ini lama fermentasi dan konsentrasi glukosa berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri, tetapi tidak berpengaruh terhadap polifenol. Hal ini disebabkan pada aktivitas antibakteri yang besar (pada lama fermentasi 24 jam dan konsentrasi glukosa 5%) tidak menunjukkan polifenol total yang optimal (polifenol total tertinggi pada lama fermentasi 21 jam). Hasil ini menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri yang dihasilkan tidak hanya berasal dari polifenol, tetapi dari metabolit primer terutama asam laktat dan metabolit sekunder yang lain seperti *bacteriocin* (Powel, J.E, 2006).



Aktivitas antibakteri yang paling besar adalah pada lama fermentasi 24 jam dan konsentrasi glukosa 5% dengan total asam tertinggi (2,04%) dan pH terendah (3,94). Hal tersebut sesuai dengan pendapat Surono (2004), bahwa aktivitas antibakteri dihasilkan selama fermentasi terutama asam laktat yang disertai dengan penurunan pH. Adanya penurunan pH akan menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* yang tumbuh optimum pada pH 6 -7.

Total asam kefir susu kacang merah mengalami peningkatan setelah dilakukan fermentasi 24 jam. Berdasarkan hasil uji *Anova* (Lampiran 3), menunjukkan lama fermentasi berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap total asam kefir susu kacang merah, tetapi konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata ( $p > 0,05$ ) serta interaksi lama fermentasi dan konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata ( $p > 0,05$ ) terhadap total asam kefir susu kacang merah.

Lama fermentasi berpengaruh terhadap total asam, karena semakin lama fermentasi, *Lactobacillus bulgaricus* yang digunakan dalam proses fermentasi kefir susu kacang merah semakin aktif sehingga menghasilkan asam laktat semakin banyak (Astawan, 2008). Total asam yang dihasilkan dalam penelitian ini adalah antara 1,64% - 2,04%, sesuai dengan Standar Nasional Indonesia yaitu 0,5% - 2%.

Konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata terhadap total asam disebabkan oleh kemampuan *Lactobaccillus bulgaricus* untuk memanfaatkan glukosa tersebut menjadi asam laktat. Hal ini sesuai

penelitian yang dilakukan oleh Petry *et al.* (2000), bahwa *Lactobacillus bulgaricus* hanya dapat memanfaatkan glukosa sebanyak 2,0 – 3,5 gram/liter dalam *fase eksponensial* dan 8,0 gram/liter pada *fase stasioner*.

Hasil uji *LSD* menunjukkan total asam pada lama fermentasi 18 jam berbeda nyata dengan 21 jam dan 24 jam ( $p < 0,05$ ). Hal ini disebabkan semakin lama fermentasi semakin banyak asam yang dihasilkan dari pemecahan glukosa oleh *Lactobacillus bulgaricus*. Total asam pada lama fermentasi 18 jam adalah 1,64% (terendah), mengalami peningkatan setelah lama fermentasi 21 jam dan 24 jam.

Terjadi penurunan pH kefir susu kacang merah pada semua perlakuan setelah dilakukan fermentasi selama 24 jam. Hal tersebut berhubungan dengan total asam yang dihasilkan. Setelah lama fermentasi 24 jam total asam meningkat. Peningkatan total asam ditunjukkan dengan penurunan pH. Berdasarkan hasil uji *Anova* (Lampiran 3), menunjukkan lama fermentasi berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap pH sedangkan konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata ( $p > 0,05$ ) serta interaksi lama fermentasi dan konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata ( $p > 0,05$ ) terhadap pH kefir susu kacang merah.

Lama fermentasi berpengaruh nyata terhadap pH, karena semakin lama fermentasi semakin banyak mikroorganisme yang aktif, sehingga menghasilkan asam laktat yang lebih banyak. Asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri akan diekskresikan keluar sel sehingga terakumulasi dalam cairan fermentasi (Astawan, 2008). Peningkatan akumulasi asam dalam

kefir menyebabkan penurunan pH. Pada penelitian ini pH kefir susu kacang merah adalah 3,94 – 4,16.

Konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata terhadap pH, karena kemampuan mikroorganisme untuk memanfaatkan glukosa tersebut menjadi asam laktat. Hal ini sesuai penelitian yang dilakukan oleh Petry *et al.* (2000), bahwa *Lactobacillus bulgaricus* hanya dapat memanfaatkan glukosa sebanyak 2,0 – 3,5 gram/liter dalam fase eksponensial dan 8,0 gram/liter pada fase stasioner. Penambahan glukosa tidak berpengaruh terhadap asam laktat yang dihasilkan. Adanya akumulasi asam laktat menyebabkan penurunan pH. Oleh karena itu konsentrasi glukosa tidak berpengaruh terhadap pH. Hasil uji LSD menunjukkan lama fermentasi 18 jam berbeda nyata dengan 24 jam dan lama fermentasi 21 jam berbeda nyata dengan 24 jam ( $p < 0,05$ ). Hal ini sesuai dengan jumlah total asam yang dihasilkan pada lama fermentasi tersebut.

Kadar alkohol kefir susu kacang merah meningkat pada lama fermentasi 21 jam, tetapi mengalami penurunan setelah dilakukan fermentasi 24 jam. Kadar alkohol kefir susu kacang merah berkisar antara 0,47%-0,78%, kadar alkohol tertinggi pada perlakuan lama fermentasi 21 jam dengan konsentrasi glukosa 10% dan kadar terendah pada semua perlakuan lama fermentasi 24 jam.

Berdasarkan hasil uji Anova (Lampiran 3), menunjukkan lama fermentasi berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kadar alkohol, tetapi konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata ( $p > 0,05$ ) serta lama

fermentasi dan konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata ( $p>0,05$ ) terhadap kadar alkohol kefir susu kacang merah.

Lama fermentasi berpengaruh nyata terhadap kadar alkohol karena semakin lama fermentasi semakin banyak mikroorganisme yang aktif, dalam hal ini adalah khamir *Candida kefir*. Pada lama fermentasi 24 jam, kandungan total asam yang tinggi dari *Lactobacillus bulgaricus* akan menghambat pertumbuhan khamir *Candida kefir*, sehingga kemampuan *Candida kefir* untuk menghasilkan alkohol mulai menurun. Kadar alkohol pada penelitian ini adalah 0,47%-0,78%. Hasil penelitian ini sesuai dengan pendapat Surono (2004), bahwa kadar alkohol kefir adalah 0,5% -1,0%.

Konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata terhadap kadar alkohol, karena kemampuan mikroorganisme dalam hal ini adalah khamir *Candida kefir* untuk memecah substrat/glukosa tersebut menjadi alkohol. Hal ini sesuai penelitian yang dilakukan oleh Petry *et al.* (2000), bahwa *Lactobacillus bulgaricus* hanya dapat memanfaatkan glukosa sebanyak 2,0 – 3,5 gram/liter dalam fase eksponensial dan 8,0 gram/liter pada fase stasioner. Diduga keterbatasan kemampuan ini juga terdapat pada khamir. Hasil uji LSD menunjukkan kadar alkohol pada lama fermentasi 18 jam berbeda nyata dengan 21 jam ( $p<0,05$ ) dan lama fermentasi 21 jam berbeda nyata dengan 24 jam ( $p<0,05$ ). Hal ini disebabkan bahwa pada lama fermentasi 21 jam menunjukkan kadar alkohol tertinggi dan pada lama fermentasi 24 jam kadar alkohol mengalami penurunan.

Simpulan penelitian ini aktivitas antibakteri paling besar adalah pada lama fermentasi 24 jam dengan konsentrasi glukosa 5% yaitu 1,50 mm. Polifenol total kefir susu kacang merah mengalami peningkatan setelah dilakukan fermentasi. Total asam kefir susu kacang merah meningkat setelah fermentasi 24 jam, sedangkan pH mengalami penurunan. Kadar alkohol kefir susu kacang merah meningkat pada lama fermentasi 21 jam dan mengalami penurunan pada lama fermentasi 24 jam. Saran yang diajukan adalah perlu penelitian tentang jenis antimikroba yang berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli*.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan pembuatan Tesis yang berjudul Pengaruh lama Fermentasi dan Konsentrasi Glukosa Terhadap Aktivitas Antibakteri, Polifenol Total dan Mutu Kimia Kefir Susu Kacang Merah. Tesis ini penulis ajukan sebagai syarat untuk menyelesaikan pendidikan pada Magister Gizi Masyarakat Program Pascasarjana Universitas Diponegoro Semarang.

Tesis ini dapat diselesaikan atas bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Prof. dr. S. Fatimah Muis, MSc,SpGK selaku Ketua Program Studi Magister Gizi Masyarakat Program Pascasarjana Undip dan moderator pada ujian tesis.
2. Prof. Ir. Anang M. Legowo, MSc.PhD, selaku pembimbing I, yang telah sabar mengoreksi dan banyak memberi arahan.
3. Ir. Suyatno, MKes, selaku pembimbing II, yang telah banyak memberikan saran dan masukan yang berharga.
4. Ir. Retno Murwani, MSc.MappSc. PhD, selaku penguji dan dosen Mata Kuliah Penunjang Tesis yang telah memberikan saran dan masukan berharga dalam pembuatan tesis.
5. Ir. Nurrahman, MSi, selaku penguji, yang telah memberikan masukan yang berharga dalam perbaikan tesis.

6. dr. Martha I. Kartasurya, MSc.PhD, selaku moderator pada ujian proposal yang telah memberikan saran dan koreksi yang berharga.
7. Semua Dosen di Magister Gizi Masyarakat Universitas Diponegoro dan staf yang telah membantu selama menjalani pendidikan.
8. Wiwik Wijaningsih dan Teguh Supriyono yang telah banyak membantu dalam penelitian, Aswita Amir, Thresia Dewi, Sri Dara Ayu, serta rekan-rekan yang tidak dapat disebutkan satu per satu atas kerjasama dan bantuan selama menjalani proses pendidikan.
9. Suamiku tercinta mas Abdul Aziz (Alm) yang telah memberikan segenap pengorbanan, doa, cinta dan kasih sayang yang tulus sampai akhir hayatnya, anak-anakku tercinta Nabila Amalia Aziz, Jihan Mujahidah Aziz, Aulia Fadhilah Aziz dan Iwan Nu'man Aziz yang memberikan semangat dan kekuatan dalam menyelesaikan pendidikan ini.
10. Abah dan mimih, ibu mertuaku, mbak Indon, mas Tanto dan dik Haris beserta keluarga yang banyak memberi dukungan, bantuan dan doa.

Penulis sangat mengharapkan saran demi kesempurnaan Tesis yang disusun. Semoga Tesis ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Semarang, Agustus 2008

Uun Kunaepah

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>PENGESAHAN TESIS</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>ABSTRAK</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>RRIWAYAT HIDUP</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	xxii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xxvi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xxvii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xxviii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Rumusan Masalah .....	5
C. Tujuan Penelitian .....	6
D. Manfaat Penelitian .....	7
E. Keaslian Penelitian .....	7
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	9
A. Kefir .....	9
B. Proses Fermentasi Kefir .....	10
C. Kacang Merah .....	19
D. Aktivitas Antibakteri .....	22
E. Polifenol .....	25



F. Bakteri <i>Escherichia coli</i> ( <i>E.coli</i> ) .....	26
G. Mutu Kimia Kefir.....	27
H. Kerangka Teori .....	28
I. Kerangka Konsep .....	29
J. Hipotesis .....	30
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>31</b>
A. Bahan dan Peralatan .....	31
B. Rancangan Penelitian .....	32
C. Tempat dan Waktu Penelitian .....	34
D. Kegiatan Penelitian .....	34
E. Definisi Operasional .....	41
F. Analisis Data .....	43
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>44</b>
A. Aktivitas Antibakteri Kefir Susu Kacang Merah .....	44
B. Total Polifenol Kefir Susu Kacang Merah .....	47
C. Total Asam Kefir Susu Kacang Merah .....	51
D. pH Kefir Susu Kacang .....	58
E. Kadar Alkohol Kefir Susu Kacang Merah .....	57
<b>BAB V SIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>61</b>
A. Simpulan .....	61
B. Saran .....	61
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>62</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>68</b>

## DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1	Beberapa Penelitian Susu Fermentasi .....	8
2	Standar Nasional Indonesia untuk Yoghurt .....	14
3	Komposisi Gizi Kacang Merah .....	21
4	Rancangan Percobaan .....	33
5	Hasil Uji <i>LSD</i> Total Asam Kefir susu Kacang Merah berdasarkan Lama Fermentasi .....	54
6	Hasil Uji <i>LSD</i> pH Kefir susu Kacang Merah berdasarkan Lama Fermentasi .....	57
7	Hasil Uji <i>LSD</i> Kadar Alkohol Kefir susu Kacang Merah berdasarkan Lama Fermentasi.....	60

## DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1	Fermentasi Glukosa .....	11
2	Kurva Pertumbuhan Mikroba .....	12
3	Kerangka Teori .....	28
4	Kerangka Konsep .....	29
5	Diagram Alir Pembuatan Kefir Susu Kacang Merah.....	37
6	Grafik Aktivitas Antibakteri Kefir Susu Kacang Merah dengan Variasi Lama Fermentasi dan Konsentrasi Glukosa .....	44
7	Grafik Polifenol Total Kefir Susu Kacang Merah dengan Variasi Lama Fermentasi dan Konsentrasi Glukosa .....	48
8	Grafik Total Asam Kefir Susu Kacang Merah dengan Variasi Lama Fermentasi dan Konsentrasi Glukosa .....	52
9	Grafik pH Kefir Susu Kacang Merah dengan Variasi Lama Fermentasi dan Konsentrasi Glukosa .....	54
10	Grafik Kadar Alkohol Kefir Susu Kacang Merah dengan Variasi Lama Fermentasi dan Konsentrasi Glukosa .....	57

## DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Alur Penelitian .....	68
2	Tabel <i>Spesific Gravity Ethanol</i> .....	69
3	Hasil Analisis Data .....	70
4	Foto-foto Penelitian.....	90
5	Surat Keterangan Melakukan Penelitian.....	91

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **A. Latar Belakang**

Pengolahan pangan dengan berbagai macam teknik pengolahan banyak dilakukan. Salah satu teknik pengolahan pangan adalah fermentasi (Buckle *et al.*, 1985). Kefir merupakan salah satu produk fermentasi yang memiliki rasa, warna dan konsistensi yang menyerupai yoghurt dan memiliki aroma khas *yeasty* (seperti tape). Kelebihan kefir adalah adanya bakteri probiotik yang terbukti dapat memperbaiki proses pencernaan dengan menyediakan mikroflora yang dibutuhkan dan dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen di dalam saluran pencernaan. Selain itu kefir memberikan daya tahan alami terhadap infeksi dalam usus, mencegah sembelit, memproduksi vitamin B dan senyawa antimikroba (Sari, 2007).

Kefir biasanya dibuat dari susu hewani atau susu kedelai. Pada umumnya susu sapi digunakan sebagai bahan dasar pembuatan kefir, meskipun harganya relatif mahal. Dewasa ini sering digunakan kedelai sebagai bahan dasar kefir. Susu kedelai mempunyai kelemahan yaitu rasa langu yang menyebabkan produk kefir susu kedelai kurang disukai. Alternatif lain sebagai bahan pembuatan kefir adalah kacang merah dan diharapkan dapat menjadi salah satu alternatif produk minuman kesehatan. Kacang

merah adalah bahan pangan lokal yang mempunyai potensi sebagai bahan baku susu fermentasi karena kandungan zat gizinya yang sangat lengkap. Kacang merah memiliki protein hampir sama dengan protein daging dan merupakan sumber asam folat yang tinggi.

Kacang merah mempunyai kandungan senyawa fungsional golongan polifenol yaitu prosianidin sebanyak 7-9% (Anonim, 2007.A). Polifenol mempunyai peran antara lain sebagai antibakteri yaitu menghambat pertumbuhan bakteri patogen dalam saluran pencernaan. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Alberto *et al.* (2006), bahwa efek antibakteri polifenol dari kulit apel dapat menghambat bakteri patogen pada manusia seperti *E. coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Fermentasi kacang merah menjadi kefir menggunakan bakteri asam laktat (BAL) dan khamir *Candida kefir* yang bekerja sama secara simbiosis. Bakteri asam laktat menghasilkan asam laktat dari pemecahan glukosa yang merangsang pertumbuhan khamir. Sedangkan khamir penting dalam proses fermentasi kefir karena menghasilkan senyawa etanol dan komponen pembentuk flavor sehingga menghasilkan cita rasa yang khas (Usmiati, 2007).

Kandungan gula alami susu kacang merah yang dapat dimanfaatkan oleh mikroorganisme dalam proses pembuatan kefir sangat terbatas, oleh karena itu perlu dilakukan penambahan gula

sebagai sumber karbon. Pemilihan glukosa dikarenakan glukosa adalah gula dalam bentuk sederhana yang dapat langsung dimanfaatkan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhannya. Diharapkan dengan penambahan glukosa pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus* dan *Candida kefir* dapat dipacu.

Proses fermentasi kefir hampir sama dengan proses fermentasi pada pembuatan yoghurt. Pada umumnya, proses fermentasi kefir (pada susu sapi) dilakukan dengan penambahan gula 10%, starter 3% dan diinkubasi selama 6 jam pada suhu 43°C (Buckle *et al.*,1987). Menurut Usmiati (2007), fermentasi kefir juga dapat dilakukan pada suhu ruang sekitar 20-24 jam.

Pada proses fermentasi kefir, akan dihasilkan metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer adalah senyawa-senyawa kimia yang dihasilkan oleh mikroba dan dibutuhkan oleh mikroba tersebut untuk pertumbuhannya (Rahman, 1992). Metabolit primer antara lain asam laktat dan alkohol. *Lactobacillus bulgaricus* merupakan bakteri *homofermentatif* yang terutama memproduksi asam laktat melalui proses *glikolisis*/pemecahan glukosa, sedangkan *Candida kefir* dalam proses fermentasi akan menghasilkan alkohol dan karbondioksida.

Metabolit sekunder adalah senyawa yang disintesis oleh mikroba tetapi tidak merupakan kebutuhan fisiologis pokok (Pawiroharsono, 2007). Salah satu metabolit sekunder yang dapat

berfungsi sebagai antibakteri adalah *bacteriocin* yang dihasilkan pada fase *decay* yaitu fase pada saat substrat mulai habis pada lama fermentasi tertentu. Hal ini sesuai dengan penelitian pada antibiotik *rifamycin* yang dihasilkan oleh *Amycolaptosis mediterranei* (El Enshasy *et al.*, 2008).

Penelitian lain yang dilakukan oleh Todorov dan Dicks (2007), menyebutkan bahwa aktivitas antibakteri berupa *bacteriocin* yang dihasilkan oleh *Lactobacillus pentosus* ST712BZ optimum setelah lama fermentasi 24 jam dengan media pertumbuhan yang ditambahkan 20-40 gram/liter glukosa. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Iqbal (2007) menyebutkan bahwa antibakteri yang berasal dari kefir susu sapi dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen pada manusia antara lain *Escherichia coli* yang dilakukan dengan metode difusi agar.

Metabolit sekunder lain yang dihasilkan dalam proses fermentasi menggunakan starter kefir adalah polifenol. Penelitian Katina *et al.* (2007) pada *bran* yang difermentasi dengan menggunakan bakteri asam laktat (BAL) menunjukkan peningkatan total fenol. Peningkatan total fenol kemungkinan disebabkan oleh BAL yang mempunyai enzim untuk mendegradasi asam hidroksi sinamat yang biasanya terdapat dalam dinding sel kacang-kacangan atau biji-bijian (Gawel, 2004). Selain itu kefir juga memiliki enzim tersebut sehingga mampu menghasilkan pula



polifenol. Polifenol ini diketahui mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Hal ini dibuktikan oleh hasil penelitian Alberto *et al.* (2006), yang menunjukkan polifenol dari kulit apel dapat menghambat bakteri patogen pada manusia seperti *E. Coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Semakin lama fermentasi dan semakin banyak glukosa yang ditambahkan, mikroorganismenya berkembangbiak semakin banyak, sehingga kemampuan mikroba (*Lactobacillus bulgaricus* dan khamir *Candida kefir*) memecah glukosa menghasilkan metabolit primer (asam laktat dan alkohol) dan metabolit sekunder (aktivitas antibakteri dan polifenol), semakin banyak (Astawan, 2008). Tetapi belum diketahui lama fermentasi dan penambahan gula yang optimal pada fermentasi kefir susu kacang merah untuk menghasilkan aktivitas antibakteri yang efektif dan mutu kimia yang sesuai (asam laktat dan alkohol) dengan SNI.

## **B. Rumusan Masalah**

Pembuatan kefir dengan bahan baku kacang merah masih terbatas. Aktivitas antibakteri, polifenol total dan mutu kimia selama fermentasi kefir kacang merah belum diketahui, sehingga perlu dilakukan penelitian aktivitas antibakteri, polifenol total dan mutu kimia kefir susu kacang merah karena perlakuan lama fermentasi dan konsentrasi glukosa.

Berdasarkan hal tersebut di atas, dirumuskan penelitian tentang pengaruh lama fermentasi dan konsentrasi glukosa terhadap aktivitas antibakteri, polifenol total dan mutu kimia kefir susu kacang merah.

### **C. Tujuan Penelitian**

#### **1. Tujuan Umum**

Mengetahui pengaruh lama fermentasi dan konsentrasi glukosa terhadap aktivitas antibakteri, polifenol total dan mutu kimia kefir susu kacang merah.

#### **2. Tujuan Khusus**

- a. Menganalisis pengaruh lama fermentasi terhadap aktivitas antibakteri, polifenol total dan mutu kimia kefir susu kacang merah.
- b. Menganalisis pengaruh konsentrasi glukosa terhadap aktivitas antibakteri, polifenol total dan mutu kimia kefir susu kacang merah.
- c. Menganalisis pengaruh interaksi lama fermentasi dan konsentrasi glukosa terhadap aktivitas antibakteri, polifenol total dan mutu kimia kefir susu kacang merah.

#### **D. Manfaat Penelitian**

##### **1. Masyarakat**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi secara ilmiah tentang kefir susu kacang merah sebagai pemanfaatan kacang merah yang lebih luas dan salah satu alternatif pangan fungsional yang dibuat dari bahan pangan nabati yang mempunyai kandungan senyawa polifenol.

##### **2. Ilmu Pengetahuan**

Memberikan sumbangan pengetahuan melalui penelitian dengan adanya produk baru yang memiliki sifat fungsional dan dapat dijadikan masukan bagi peneliti selanjutnya untuk melihat aspek yang lain dari fermentasi kefir susu kacang merah.

#### **E. Keaslian Penelitian**

Penelitian yang dilakukan mengenai susu fermentasi dan manfaatnya telah dilakukan, tetapi dari beberapa penelitian tersebut belum ada penelitian tentang pengaruh lama fermentasi dan konsentrasi glukosa terhadap aktivitas antibakteri, polifenol total dan mutu kimia kefir susu kacang merah . Pada Tabel 1 dapat dilihat beberapa penelitian tentang susu fermentasi yang telah dilakukan.

Tabel 1.  
Beberapa Penelitian Susu Fermentasi

No.	Judul	Perlakuan	Subyek	Desain	Hasil	Pustaka
1	Pembuatan minuman kefir dari susu kacang merah dengan menggunakan kultur starter <i>Lactobacillus bulgaricus</i> dan <i>Saccharomyces cereviceae</i>	Pemberian kultur <i>Lactobaccillus bulgaricus</i> dan <i>Saccharomyces cereviceae</i>	Kacang merah	Eksperimen	Kefir susu kacang merah yang mendekati SII dengan konsentrasi starter 3% dan lama inkubasi 48 jam untuk pH dan kadar alkohol	Siswanto (2007)
2	Efektivitas bakteri asam laktat (BAL) dalam pembuatan produk fermentasi berbasis protein/susu nabati	Pemberian Bakteri Asam Laktat (BAL) dalam produk fermentasi berbasis protein/susu nabati	Susu nabati	Eksperimen	BAL paling efektif dalam produksi asam laktat secara berurutan pada susu kacang hijau, kacang merah, kacang tanah dan kacang kedelai)	Widowati dan Masgiyarta (2007)
3	<i>Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor mice</i>	Pemberian Kefir	Hewan Tikus	Eksperimen	Mencegah kanker, meningkatkan resistensi mukosa thd infeksi gastrointestinal	Liu (2002)
4	<i>Kefir milk enhances intestinal immunity in young but not old rat</i>	Pemberian kefir kurang dari 2 %	Hewan tikus	Eksperimen	Meningkatkan respon imun sistem	Karine dan Douglas (2001)

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Kefir

Kefir merupakan produk susu yang difermentasikan dengan menggunakan bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* bersama ragi dan menghasilkan asam dan alkohol. Pada tahap akhir proses dilakukan pematangan dalam kemasan tertutup agar terbentuk karbonat (Albaarri dan Murti, 2003).

Kefir berasal dari Kaukasian sebelah utara atau sebelah Timur Laut Mongolia, dan telah diproduksi dalam skala rumah tangga secara tradisional. Bahan untuk pembuatan kefir biasanya adalah susu sapi atau susu kambing. Kefir diproduksi di negara-negara di Rusia dan hanya sedikit diproduksi di negara-negara Eropa. Kefir mengandung 0,5 – 1,0 % alkohol dan 0,9 – 1,1 % asam laktat (Surono, 2004).

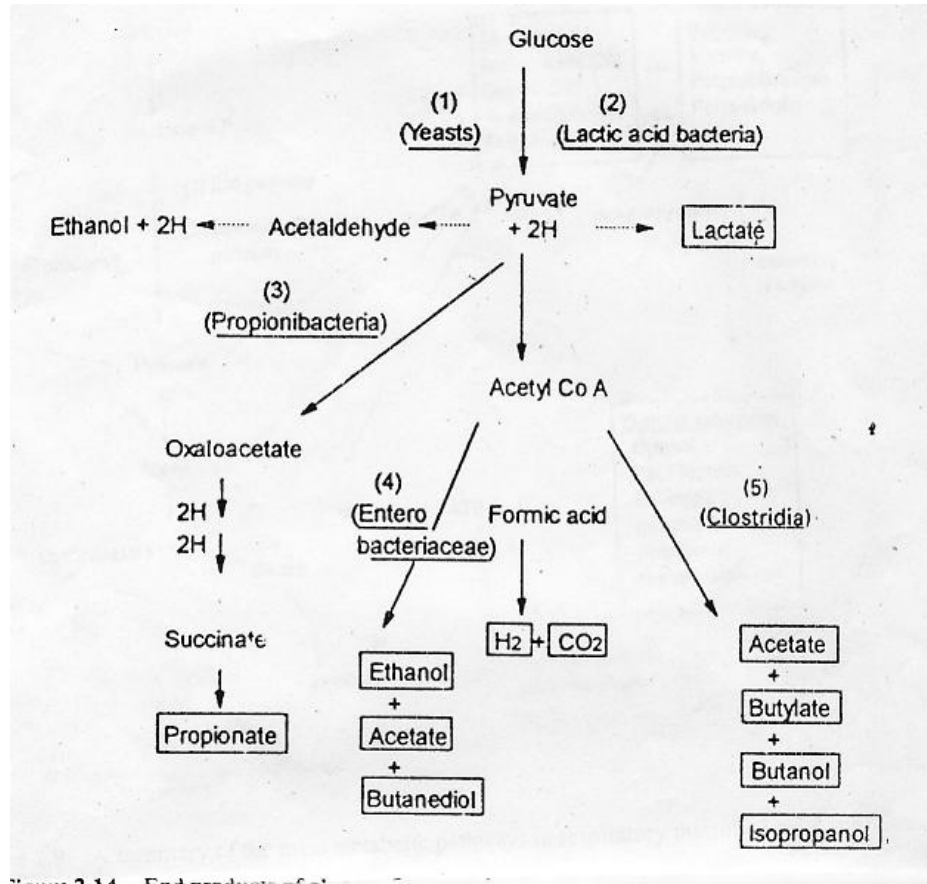
Nilai gizi kefir hampir sama dengan susu yang digunakan sebagai bahan kefir tetapi ada beberapa kelebihan apabila dibandingkan dengan susu segar. Kelebihan tersebut adalah asam yang terbentuk dapat memperpanjang masa simpan, mencegah pertumbuhan mikroorganisme pembusuk dan patogen sehingga meningkatkan keamanan produk kefir (Anonim, 1997). Selain itu meningkatkan ketersediaan vitamin dan mineral (B2, B12, asam

folat, fosfor dan kalsium) yang baik untuk tubuh, mengandung asam amino esensial/tryptopan (Surono, 2004).

## **B. Proses Fermentasi Kefir**

Tahap awal proses fermentasi adalah membuat inokulum. Tujuannya adalah menyediakan inokulum yang berada dalam keadaan aktif, sehingga dapat mempersingkat fase adaptasi (*lag fase*) pada waktu fermentasi. Lama fase adaptasi dipengaruhi oleh volume inokulum dan kondisi fisiologisnya. Fase ini dapat dikurangi sampai serendah-rendahnya apabila komposisi inokulum yang digunakan sama dengan komposisi medium fermentasi (Rachman, 1989).

Pada proses fermentasi kefir gula dipecah menjadi asam piruvat. Piruvat oleh khamir *Candida kefir* diubah menjadi Acetaldehida menjadi etanol, sedangkan oleh *Lactobacillus bulgaricus* diubah menjadi asam laktat, seperti pada Gambar 1. Bakteri dan jamur serta beberapa macam khamir mampu memecah gula (glukosa) menjadi karbondioksida dan air. Khamir juga merupakan pengubah aldehyd menjadi alkohol yang paling efisien. Khamir *Saccharomyces ellipsoideus* adalah organisme yang penting dalam industri alkohol. Walaupun organisme lain juga mampu menghasilkan alkohol, tetapi alkohol yang dihasilkan masih tercampur dengan aldehyd, asam dan ester sehingga pemisahannya menjadi sulit (Rahman *et al.*, 1992).

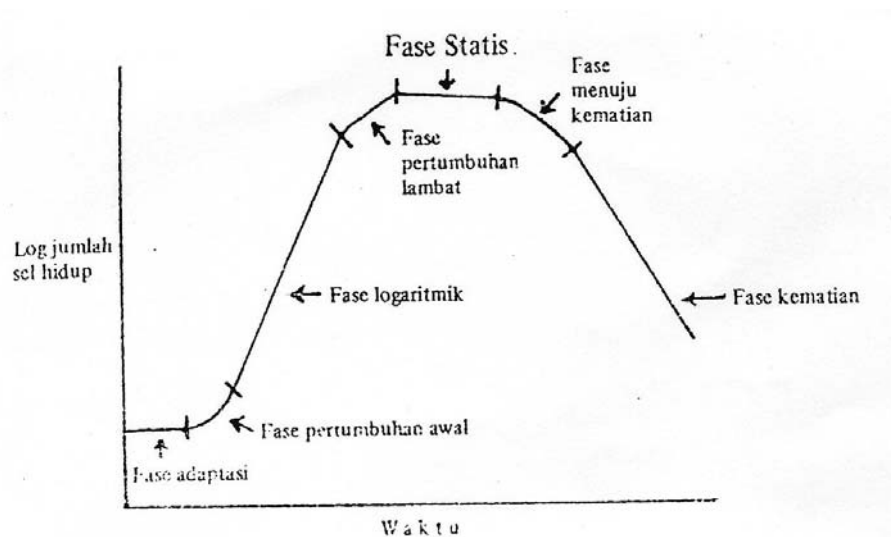


Gambar 1. Fermentasi Glukosa (Lee, 1996)

Lama fermentasi berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroba. Pertumbuhan awal yang terlihat apabila suatu sel mikroorganisme diinokulasikan pada nutrisi agar adalah pembesaran ukuran, volume dan berat sel. Sel-sel terus membelah secara eksponensial/ secara cepat. Selama kondisi memungkinkan,

pertumbuhan dan pembelahan sel berlangsung sampai sejumlah besar populasi sel terbentuk (Buckle *et al.*, 1985)

Waktu antara pembelahan sel berbeda-beda tergantung spesies bakteri dan kondisi lingkungannya. Tipe pertumbuhan yang cepat ini disebut juga pertumbuhan *logaritmik* karena apabila jumlah log sel digambarkan terhadap waktu akan menunjukkan garis lurus. Tetapi tipe pertumbuhan *logaritmik* ini tidak langsung terjadi pada saat sel dipindahkan pada nutrien agar dan tidak terjadi secara terus menerus. Pertumbuhan bakteri/mikroba dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Mikroba (Fardiaz, 1988).

Lama fermentasi dan penambahan glukosa akan berpengaruh terhadap metabolit primer yang dihasilkan dalam



proses fermentasi seperti asam laktat dan alkohol. Hal ini disebabkan semakin lama fermentasi, mikroba berkembang biak dan jumlahnya bertambah sehingga kemampuan untuk memecah substrat/glukosa yang ada menjadi asam laktat dan alkohol semakin besar. Pada saat substrat mulai habis (*fase decay*/menuju kematian), mikroba menghasilkan aktivitas antibakteri untuk mempertahankan kondisi fisiologis.

Untuk memenuhi persyaratan mutu, kefir yang dihasilkan dibandingkan dengan persyaratan mutu yoghurt . SNI kefir belum ada, maka kefir disesuaikan dengan produk susu fermentasi lain yang hampir sama yaitu yoghurt. Standar Nasional Indonesia untuk yoghurt disajikan pada Tabel 2.

Proses fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor – faktor yang mempengaruhi fermentasi adalah :

#### **1. Substrat (Medium)**

Substrat/medium fermentasi menyediakan zat gizi yang diperlukan oleh mikroba untuk memperoleh energi, pertumbuhan, bahan pembentuk sel dan biosintesa produk-produk metabolisme. Berbagai macam substrat dapat dipakai untuk melangsungkan fermentasi yaitu sereal, pati, laktosa, glukosa dan sukrosa sebagai sumber karbon, sedangkan asam amino, protein, nitrat, garam amonium, tepung kedelai dan sisa fermentasi sebagai sumber nitrogen. Selain untuk memenuhi pertumbuhan sel dan

pembentukan produk fermentasi, medium yang digunakan akan berpengaruh terhadap pH (Rahman, 1989).

Tabel 2.  
Standar Nasional Indonesia untuk Yoghurt

Kriteria uji	Persyaratan
Keadaan penampakan	Cairan kental/semi padat
Bau	Normal/khas
Rasa	Khas/asam
Konsistensi	Homogen
Lemak (% b/b)	Maksimum 3,8
Berat kering tanpa lemak (BKTL) (% b/b)	8,2
Protein (% b/b)	Min 3,5
Abu (% b/b)	Maks 1,0
Jumlah asam (dihitung sebagai laktat) (% b/b)	0,5-2,0
Cemaran logam (mg/kg)	
Timbal (Pb)	Maksimum 0,3
Tembaga (Cu)	Maksimum 20
Timah (Sn)	Maksimum 40
Raksa (Hg)	Maksimum 0,03
Arsen (As)	Maksimum 0,1
Cemaran mikroba	
Bakteri coliform (angka paling mungkin)	Maksimum 10
<i>Escheria coli</i>	< 3
<i>Salmonella</i>	Negatif

Sumber: Dewan Standardisasi Nasional (1992).

## 2. Suhu

Suhu fermentasi menentukan jenis mikroba yang dominan selama fermentasi. Contohnya *Lactobacillus bulgaricus* yang termasuk dalam kelompok Bakteri Asam laktat, pada umumnya suhu pertumbuhan optimum 40° - 45°C, sedangkan khamir mempunyai suhu pertumbuhan optimum pada 20° - 30°C mempunyai pertumbuhan optimum fermentasi pada pembuatan

sayur asin sangat sensitif terhadap perubahan suhu. Jika konsentrasi asam yang diinginkan telah tercapai, maka suhu dapat dinaikkan untuk menghentikan fermentasi (Rahman, 1989).

### 3. Asam

Makanan yang mengandung asam pada umumnya dapat bertahan lama. Beberapa hasil fermentasi terutama asam dapat mencegah pertumbuhan mikroba yang beracun di dalam makanan misalnya *Clostridium botulinum* yang pada pH di bawah 4,6 tidak dapat tumbuh dan membentuk toksin. Tetapi jika oksigen cukup jumlahnya dan kapang dapat tumbuh serta fermentasi berlangsung terus, maka daya awet dari asam tersebut akan hilang. Pada keadaan ini mikroba proteolitik dan lipolitik dapat berkembang biak (Rahman, 1989).

Contohnya adalah pada proses fermentasi susu. Susu segar pada umumnya akan terkontaminasi dengan beberapa macam mikroba dan yang dominan mula-mula adalah *Streptococcus lactis*, sehingga dapat menghasilkan asam laktat. Tetapi pertumbuhan selanjutnya dari bakteri ini akan terhambat oleh keasaman yang dihasilkannya sendiri. Oleh karena itu bakteri tersebut akan menjadi inaktif sehingga kemudian akan tumbuh bakteri jenis *Lactobacillus* yang lebih toleran terhadap asam daripada *Streptococcus*. *Lactobacillus* juga akan menghasilkan

asam lebih banyak lagi sampai jumlah tertentu yang dapat menghambat pertumbuhannya, karena pada keasaman yang tinggi *Lactobacillus* akan mati, kemudian tumbuh khamir yang lebih toleran terhadap asam.

#### 4. Oksigen

Oksigen selama proses fermentasi diatur untuk memperbanyak atau menghambat pertumbuhan mikroba tertentu. Setiap mikroba memerlukan oksigen yang jumlahnya berbeda pertumbuhan atau membentuk sel-sel baru, dan untuk fermentasi. Misalnya ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) akan tumbuh lebih baik pada keadaan aerobik, tetapi akan melakukan fermentasi terhadap gula jauh lebih cepat pada keadaan anaerobik (Winarno *et al.*, 1980). *Candida kefir* merupakan salah satu khamir yang melakukan fermentasi secara anaerob, sedangkan *Lactobacillus bulgaricus* merupakan bakteri yang bersifat fakultatif anaerob.

#### 5. Mikroba

Proses Fermentasi pada umumnya dilakukan dengan menggunakan kultur murni. Kultur ini dapat disimpan dalam keadaan kering atau dibekukan, misalnya kultur murni dari bakteri asam laktat untuk membuat keju. Kadang-kadang tidak digunakan kultur murni untuk fermentasi, tetapi menggunakan starter atau

laru (Winarno *et al.*, 1980). Mikroba yang digunakan dalam proses fermentasi kefir antara lain bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan khamir *Candida kefir*.

**a. Bakteri Asam Laktat (BAL)**

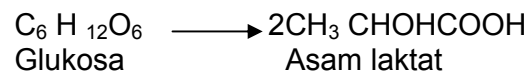
Bakteri asam laktat (BAL) dikelompokkan sebagai bakteri gram positif, bentuk kokus atau batang yang tidak berspora dengan asam laktat sebagai produk utama fermentasi karbohidrat. BAL terdiri dari empat genus yaitu *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* dan *Pediococcus*. *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* atau biasa disebut BAL atau *L. Bulgaricus*.

BAL merupakan bakteri yang sering digunakan sebagai starter kultur untuk susu fermentasi, berpotensi sebagai antikolesterol yang diduga karena adanya Eksopolisakarida/EPS (Malaka dan Laga, 2005). BAL mampu untuk bersaing dengan bakteri lain dalam proses fermentasi alami karena memiliki ketahanan terhadap pH yang tinggi sampai rendah. Bakteri ini juga dinyatakan sebagai bakteri *asidurik* atau *asidofilik*, karena memerlukan pH yang relatif rendah (sekitar 5,4 - 4.6) supaya tumbuh dengan baik., *Lactobacillus bulgaricus* memproduksi asetaldehida yang membentuk aroma pada yoghurt (Balows *et al.*, 1991).

BAL dibagi menjadi dua kelompok yaitu bakteri *homofermentatif* dan bakteri *heterofermentatif*. Bakteri *homofermentatif* dengan produk utama adalah asam laktat melalui

glikolisis dan bakteri *heterofermentatif* memproduksi asam laktat dan sejumlah etanol, asam asetat, melalui jalur 6-phosphoglukanat/phosphoketolase.

*Lactobacillus bulgaricus* termasuk dalam kelompok bakteri asam laktat (BAL) *homofermentatif* dengan asam laktat sebagai produk utama fermentasi karbohidrat melalui fermentasi 1 mol glukosa menjadi 2 mol asam laktat sebagai berikut:

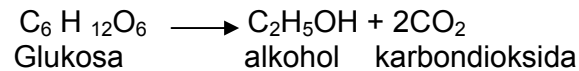


*Lactobacillus bulgaricus* merupakan bakteri gram positif, bentuk kokus atau batang yang tidak berspora. Suhu optimum pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus* adalah 40°C - 45°C.

#### **b. Khamir**

Khamir adalah organisme uniseluler yang bereproduksi secara aseksual dengan spora. Khamir mempunyai peran penting dalam industri pangan dengan memproduksi enzim yang membantu terjadinya reaksi kimia seperti pembentukan alkohol sebagai metabolit primer maupun senyawa antibakteri sebagai metabolit sekunder. Khamir juga mempunyai peran penting pada fermentasi produk dari susu, karena menyediakan nutrisi untuk pertumbuhan mikroba lain seperti asam amino, vitamin, dan mengkondisikan pH. Pada proses fermentasi anaerob khamir

memecah glukosa menjadi alkohol dan karbondioksida sebagai berikut:



Sebagian besar khamir memerlukan oksigen untuk pertumbuhannya. Selain oksigen, substrat yang utama dari khamir adalah gula. Khamir menghasilkan etil alkohol dan karbondioksida dari gula sederhana seperti glukosa dan fruktosa. Khamir pada umumnya toleran terhadap asam dan dapat tumbuh pada pH 4,0 – 4,5, selain itu rentang suhu pertumbuhan khamir sangat luas yaitu dari 0°C – 50°C, dengan suhu optimum 20°C – 30°C (Rahman *et al.*, 1992)

Khamir pada kefir belum banyak dipelajari dibanding dengan bakteri pada kefir. Khamir yang terdapat pada kefir antara lain *Candida kefir*. *Candida kefir* dalam bentuk aseksual adalah *Kluyveromyces marxianus* yang digunakan untuk memproduksi enzim laktase, termasuk jenis khamir yang dapat memfermentasi laktosa (Farnworth, 2005).

### C. Kacang Merah

Kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L) termasuk dalam *Famili Leguminoseae* alias polong-polongan, satu keluarga dengan kacang hijau, kacang kedelai dan kacang tolo. Kacang merah merupakan salah satu jenis kacang yang sering digunakan dalam pembuatan

makanan di Indonesia dan dunia. Kacang merah mudah didapatkan karena sudah ditanam di seluruh propinsi di Indonesia. Daerah sentra penghasil kacang merah adalah Jawa Barat, Jawa Tengah, Yogyakarta, Sulawesi Selatan, Bengkulu dan Nusa Tenggara Timur (Rukmana, 1998).

Kacang merah kering adalah sumber karbohidrat kompleks, serat, vitamin B (terutama asam folat dan vitamin B1), kalsium, fosfor, zat besi dan protein. (Afriansyah, 2007). Kacang merah merupakan sumber serat yang baik. Setiap 100 gram kacang merah kering menyediakan serat sekitar 24 gram, yang terdiri dari campuran serat larut dan tidak larut air. Serat larut dapat menurunkan konsentrasi kolesterol dan gula darah. Serat larut air difermentasi dalam usus besar menghasilkan asam lemak rantai pendek, yang dapat menghambat sintesis kolesterol hati (Afriansyah, 2007).

Kacang merah juga merupakan salah satu jenis kacang yang mengandung senyawa bioaktif polifenol dalam bentuk prosianidin sekitar 7%-9% terutama pada kulitnya. Polifenol antara lain mempunyai aktivitas antibakteri yaitu menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Pada Tabel 3 diperlihatkan komposisi gizi kacang merah (Anonim, 2007.A).

Pemanfaatan kacang merah menjadi produk susu nabati atau susu nabati terfermentasi seperti halnya kedelai belum banyak dilakukan. Pembuatan susu kacang merah hampir sama dengan



pembuatan susu yang berasal dari bahan baku kacang-kacangan lain seperti susu kedelei dan susu kacang hijau (Widowati dan Misgiyarta, 2007 ).

Tabel 3.  
Komposisi Gizi Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris*)

Zat Gizi	Satuan	Nilai per 100 gram
Proksimat		
Air	g	11,75
Energi	Kkal	330
Energi	KJ	1381
Protein	g	24,37
Lemak	g	0,25
Abu	g	3,83
Karbohidrat	g	59,80
Serat	g	24,9
Mineral		
Kalsium, Ca	mg	195
Besi, Fe	mg	9,35
Magnesium, Mg	mg	160
Phospor, P	mg	405
Kalium, K	mg	1490
Natrium Na	mg	11
Seng, Zn	mg	2,55
Tembaga, Cu	mg	1,100
Mangan, Mn	mg	1,000
Selenium, Se	µg	3,2
Vitamin		
Vitamin C, total asam askorbat	mg	4,5
Thiamin	mg	0,529
Riboflavin	mg	0,219
Niacin	mg	2,060
Asam pantotenat	mg	0,780
Vitamin B-6	mg	0,397
Folat (total)	µg	394
Vitamin B-12	µg	0,00
Vitamin A, IU	IU	8

Sumber : USDA, 2007

#### D. Aktivitas Antibakteri

Antibakteri merupakan suatu zat atau komponen yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri atau kapang (*bakteristatik* atau *fungistatik*) atau membunuh bakteri atau kapang (*bakterisidal* atau *fungisidal*) (Ardiansyah, 2007). Zat aktif yang terkandung dalam berbagai jenis ekstrak tumbuhan dapat menghambat beberapa mikroba patogen maupun perusak makanan seperti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Bacillus cereus*.

Senyawa antibakteri dalam pangan antara lain berasal dari tumbuhan maupun dari proses fermentasi. Antibakteri tumbuhan dapat berasal dari biji, buah, batang, daun dan umbi. Contoh bahan pangan yang mengandung antibakteri dengan kandungan komponen aktifnya adalah bawang putih, kunyit dan rempah-rempah.

Senyawa antibakteri sebagai hasil proses fermentasi adalah asam organik, hidrogen peroksida, acetaldehyd, diacetyl, karbokdioksida dan alkohol sebagai metabolit primer. Asam organik yang dihasilkan antara lain asam laktat. Dengan adanya asam laktat menyebabkan penurunan pH sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* yang optimum pada pH 6 – 7 (Surono, 2004).

Senyawa antibakteri yang dihasilkan melalui proses fermentasi sebagai metabolit sekunder antara lain *bacteriocin*. Metabolit sekunder adalah senyawa yang dihasilkan oleh mikroorganisme tetapi

bukan merupakan kebutuhan pokok fisiologis dari mikroorganismenya tersebut. Senyawa antibakteri *bacteriocin* dihasilkan pada fase *decay* atau pada fase *stationer*, yaitu pada saat substrat mulai habis pada lama fermentasi tertentu. Pada saat substrat mulai habis, akan merangsang terbentuknya enzim-enzim yang berperan untuk pembentukan metabolit sekunder. Penelitian lain yang dilakukan oleh Todorov dan Dicks (2007), menyebutkan bahwa aktivitas antibakteri berupa *bacteriocin* yang dihasilkan oleh *Lactobacillus pentosus* ST712BZ optimum setelah lama fermentasi 24 jam dengan media pertumbuhan yang ditambahkan 20-40 gram/liter glukosa.

Salah satu kriteria pemilihan antibakteri untuk diaplikasikan dalam bahan pangan adalah keefektifan penghambatannya. Semakin kuat penghambatannya, semakin efektif digunakan (Ardiansyah, 2007) Mekanisme penghambatan mikroorganismenya oleh senyawa antibakteri antara lain disebabkan oleh beberapa faktor antara lain :

1. Mengganggu pembentukan dinding sel

Mekanisme ini disebabkan karena adanya akumulasi komponen limfophilat yang terdapat pada dinding atau membran sel sehingga menyebabkan perubahan komposisi penyusun dinding sel. Efek penghambatan senyawa antibakteri lebih efektif terhadap bakteri gram positif daripada bakteri gram negatif. Hal ini disebabkan perbedaan komponen penyusun dinding sel kedua kelompok bakteri tersebut.

## 2. Bereaksi dengan membran sel

Mengganggu dan mempengaruhi integritas membran sitoplasma sehingga mengakibatkan kebocoran materi intraseluler.

## 3. Menginaktivasi enzim

Mekanisme yang terjadi menunjukkan kerja enzim terganggu dalam mempertahankan kelangsungan aktivitas mikroba, sehingga mengakibatkan enzim akan memerlukan energi dalam jumlah besar untuk aktivitasnya. Akibatnya energi untuk pertumbuhan menjadi berkurang, sehingga aktivitas mikroba menjadi terhambat dan inaktif apabila berlangsung lama.

## 4. Menginaktivasi fungsi material genetik

Merusak materi genetik sehingga mengganggu proses pembelahan sel untuk pembiakan.

Ada beberapa cara yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dalam produk makanan fermentasi antara lain dengan metode sumur agar dan metode difusi agar. Prinsip dari kedua metode tersebut adalah sama yaitu dengan melihat adanya zona bening di sekitar sumur atau cakram. Semakin besar diameter zona bening di sekitar sumur atau cakram menunjukkan aktivitas antibakteri yang tinggi (Iqbal, 2007).

## E. Polifenol

Polifenol adalah kelompok zat kimia yang ditemukan pada tumbuhan. Zat ini mempunyai tanda khas yaitu banyak gugus fenol dalam molekulnya. Senyawa fenol dalam tanaman dibagi dalam 3 kelompok besar yaitu asam fenol, flavonoid dan tanin. Flavonoid mempunyai fungsi memberi warna (merah, jingga, kuning dan hijau) dan rasa pada sayur-sayuran (Maulana, 2005). Flavonoid termasuk senyawa polifenol yang banyak ditemukan pada tanaman teh (48%), bawang merah (29%) dan apel (7%).

Flavonoid sebagai bagian dari senyawa polifenol juga mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Berdasarkan penelitian Alberto *et al.* (2006), efek antibakteri dari polifenol pada kulit apel dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen pada manusia yaitu *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan beberapa bakteri patogen lainnya. Penelitian lain menyebutkan bahwa aktivitas antibakteri dari polifenol pada fermentasi teh dapat melawan bakteri *Streptococcus mutans* (Sasaki *et al.*, 2004).

Mekanisme penghambatan antibakteri polifenol antara lain adalah dengan cara :

1. Mengganggu pembentukan dinding sel. Terjadinya akumulasi senyawa antibakteri dipengaruhi oleh bentuk tak terdisosiasi. Pada konsentrasi rendah, molekul fenol lebih hidrofobik, dapat

mengikat daerah hidrofobik membran protein dan dapat melarut pada fase lipid dari membran bakteri.

2. Bereaksi dengan membran sel. Komponen bioaktif fenol dapat mengakibatkan lisis sel dan menyebabkan denaturasi protein, menghambat pembentukan protein sitoplasma dan asam nukleat serta menghambat ikatan ATP-ase pada membran sel.

#### **F. Bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*)**

*Escherichia coli* (*E.coli*) ditemukan oleh Theodor Escherich adalah spesies utama bakteri gram negatif, berbentuk batang, bersifat fakultatif anaerob dan termasuk dalam golongan *Enterobacteriaceae*, mempunyai pertumbuhan yang sangat cepat. Suatu stereotip tertentu bersifat patogen dan sering menyebabkan keracunan makanan. Bakteri ini sering menyebabkan gangguan masalah kesehatan pencernaan yaitu diare, muntaber dan masalah pencernaan lainnya. Bakteri ini banyak terdapat pada tempat persiapan makanan melalui bahan baku dan masuk dalam makanan melalui tangan (Anonim.2008.B). Menurut Surono (2004), *E.coli* mempunyai pertumbuhan yang optimum pada pH 6 -7.

## G. Mutu Kimia Kefir

Kefir dapat dinilai berdasarkan mutu kimia sesuai SNI antara lain total asam, PH dan kadar alkohol. Ketiga parameter tersebut merupakan salah satu parameter susu fermentasi.

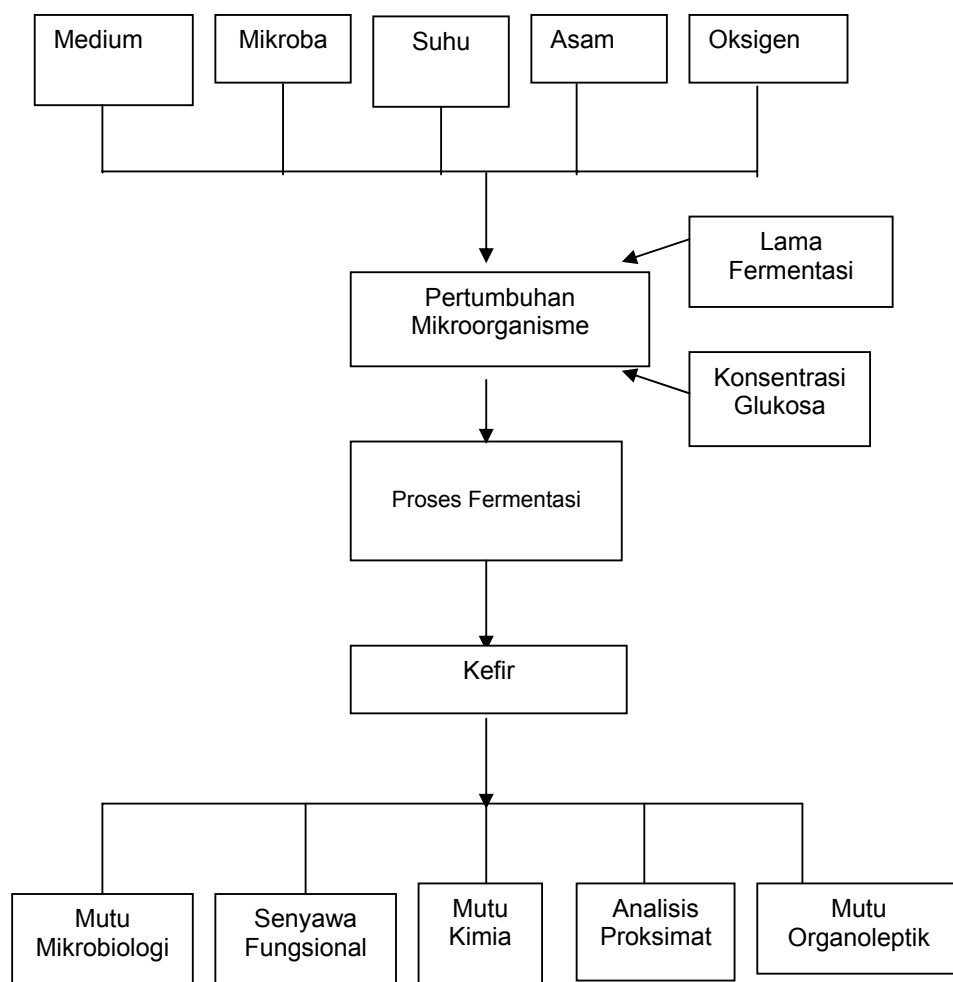
Total asam pada kefir dihitung sebagai asam laktat. Asam merupakan metabolit primer dalam proses fermentasi kefir yang dihasilkan dari pemecahan glukosa oleh bakteri *Lactobacillus bulgaricus* sebagai bakteri *homofermentatif* (Azizah, 2004). Salah satu cara untuk memnentukan jumlah asam laktat adalah dengan metode titrasi. Titrasi merupakan cara analisis dengan mengukur jumlah larutan yang diperlukan untuk bereaksi secara tepat dengan zat yang terdapat dalam larutan lain (Ranggana, 1997).

Tingkat keasaman atau pH adalah jumlah konsentrasi ion  $H^+$  dalam larutan yang ditunjukkan dengan skala 1-14. Skala pH merupakan suatu cara yang tepat untuk menggambarkan konsentrasi ion-ion hidrogen dalam larutan. Makin besar konsentrasi ion hidrogen, maka larutan semakin asam. Dalam proses fermentasi kefir, pH yang rendah mengindikasikan adanya akumulasi asam laktat (Azizah, 2004).

Kadar Alkohol dalam kefir merupakan metabolit primer dalam proses fermentasi yang dihasilkan oleh khamir *Candida kefir*. Alakohol dihasilkan dari pemecahan glukosa. Kadar alkohol yang terbentuk dalam fermentasi tergantung pada kandungan gula di dalam substrat, macam khamir, suhu fermentasi dan jumlah oksigen (Rahman *et al*,

1992). Salah satu cara pengukuran kadar alkohol adalah dengan metode destilasi. Hasil destilasi ditimbang menggunakan alat yaitu *piknometer* (James, 1995).

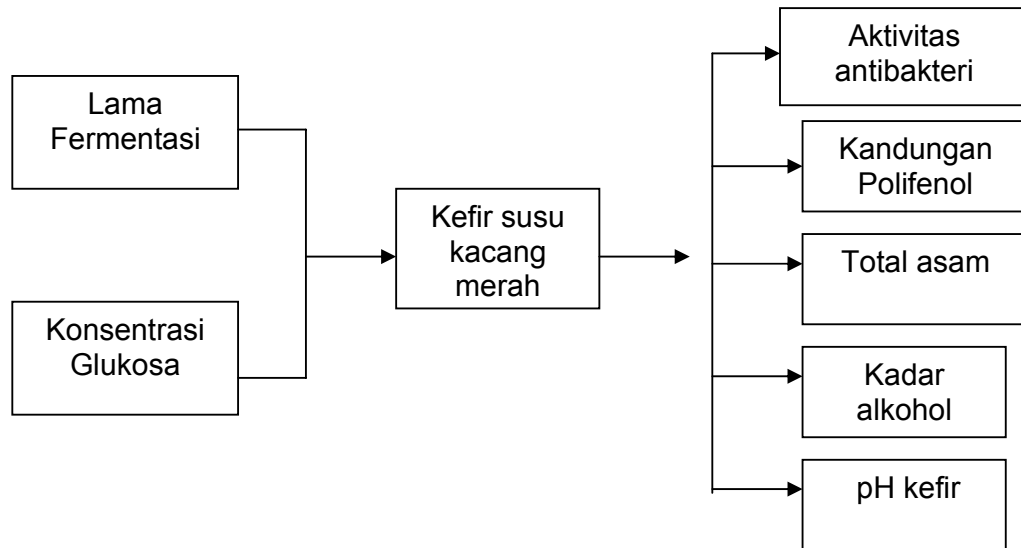
## H. Kerangka Teori



Gambar 3  
Kerangka Teori Penelitian



## I. Kerangka Konsep



Gambar 4  
Kerangka Konsep Penelitian

Berdasarkan Kerangka Teori (Gambar 3) dan Kerangka Konsep (Gambar 4), pertumbuhan mikroorganisme dipengaruhi beberapa faktor yaitu medium, mikroba, suhu, asam dan oksigen, lama fermentasi dan konsentrasi glukosa. Pertumbuhan mikroorganisme akan berpengaruh terhadap fermentasi kefir atau kefir yang dihasilkan. Tetapi peneliti membatasi pada faktor lama fermentasi dan konsentrasi glukosa.

Kefir dapat dibuat dari susu sapi, susu kambing maupun susu nabati. Pada penelitian ini, dibuat kefir dari susu nabati yaitu susu kacang merah. Kualitas kefir yang dihasilkan dapat dilihat dari

berbagai aspek baik mutu mikrobiologis, senyawa fungsional, mutu kimia, analisis proksimat dan mutu organoleptik.

Pada penelitian ini, peneliti membatasi pada aspek mutu mikrobiologis yaitu dengan menganalisis aktivitas antibakteri, polifenol total serta mutu kimia dengan menganalisis total asam, kadar alkohol dan nilai pH.

#### **J. Hipotesis**

Ada pengaruh lama fermentasi dan konsentrasi glukosa terhadap aktivitas antibakteri, polifenol total dan mutu kimia kefir susu kacang merah.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Bahan dan Peralatan Penelitian**

##### **1. Bahan**

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah kacang merah, susu sapi segar, glukosa, kultur murni dari bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan khamir *Candida Kefir*, yang diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta.

Bahan-bahan yang digunakan dalam analisis aktivitas antibakteri adalah Kultur bakteri *E.coli*, media Nutrient Agar (NA), kefir susu kacang merah. Bahan-bahan yang digunakan untuk analisis polifenol total adalah kefir susu kacang merah, reagen *Folin–Ciocalteu*, sodium karbonat jenuh, aquades, asam tanat. Bahan-bahan yang digunakan untuk analisis mutu kimia adalah kefir susu kacang merah, NaOH 0,1 dan indikator PP (*Phenol Ptyalin*).

##### **2. Peralatan**

Alat yang digunakan untuk membuat starter adalah pemanas listrik, tabung reaksi, labu erlemeyer, pengaduk kaca, pipet ukur, timbangan analitik digital (*Sartorius, Germany*), otoklaf dan inkubator, *beaker glass*, corong, lampu bunsen dan aluminium

foil. Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan susu kacang merah adalah kompor gas, panci, blender, saringan, gelas ukur (Pyrex). Alat – alat yang digunakan dalam pembuatan kefir susu kacang merah adalah labu erlemeyer 250 ml, timbangan analitik digital, gelas ukur 25 ml, lambu bunsen dan aluminium foil .

Alat-alat yang digunakan dalam analisis aktivitas antibakteri adalah cawan petri, autoklaf, inkubator, jangka sorong, kertas cakram. Alat-alat yang digunakan dalam analisis polifenol total adalah labu ukur 100 ml, pipet ukur 1 ml, 5 ml dan 10 ml, gelas ukur 25 ml, aluminium foil, pipet, fortex dan spektrofotometer UV-Vis 1201. Alat-alat yang digunakan dalam analisis mutu kimia adalah biuret, labu erlemeyer, labu ukur 100 ml, pipet tetes, pipet ukur 10 ml, labu destilasi, piknometer, pH meter.

## **B. Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap pola faktorial 3 x 3 dengan 3 kali ulangan. Faktor I adalah lama fermentasi (18 jam, 21 jam dan 24 jam) dan Faktor II adalah konsentrasi glukosa (5%, 10% dan 15%). Dari kedua Faktor diperoleh kombinasi perlakuan seperti pada Tabel 4.

Tabel 4.  
Rancangan Percobaan

Konsentrasi Glukosa	Lama Fermentasi		
		F1	F2
G1	F1G1	F2G1	F3G1
G2	F1G2	F2G2	F3G2
G3	F1G3	F2G3	F3G3

Keterangan:

F1G1: Lama fermentasi 18 jam konsentrasi glukosa 5 %

F1G2: Lama fermentasi 18 jam konsentrasi glukosa 10 %

F1G3: Lama fermentasi 18 jam konsentrasi glukosa 15 %

F2G1: Lama fermentasi 21 jam konsentrasi glukosa 5 %

F2G2: Lama fermentasi 21 jam konsentrasi glukosa 10 %

F2G3: Lama fermentasi 21 jam konsentrasi glukosa 15 %

F3G1: Lama fermentasi 24 jam konsentrasi glukosa 5 %

F3G2: Lama fermentasi 24 jam konsentrasi glukosa 10 %

F3G3: Lama fermentasi 24 jam konsentrasi glukosa 15 %

Model Matematis yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_k + AB_{ik} + \Sigma_{ijk}$$

Keterangan :

$Y_{ijk}$  : Nilai pengamatan

$\mu$  : nilai tengah populasi

- $A_i$  : pengaruh perlakuan lama fermentasi pada taraf ke-i
- $B_k$  : pengaruh perlakuan konsentrasi glukosa pada taraf ke-k
- $AB_{ik}$  : pengaruh interaksi perlakuan lama fermentasi pada taraf ke-i dengan konsentrasi glukosa pada taraf ke-k
- $\Sigma_{ijk}$  : pengaruh galat percobaan lama fermentasi pada taraf ke-i, konsentrasi glukosa pada taraf ke-k, ulangan ke-j
- $i = 1, 2, 3, \dots, a$      $j = 1, 2, 3, \dots, u$      $k = 1, 2, 3, \dots, b$

### C. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Ilmu Teknologi Pangan (ITP) Jurusan Gizi Poltekes Semarang dan laboratorium Biokimia Nutrisi Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro. Waktu penelitian dilakukan bulan April sampai Mei 2008 dan pengolahan data dilakukan pada bulan Juni sampai Juli 2008.

### D. Kegiatan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa kegiatan, yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama meliputi pembuatan produk dan pengukuran variabel. Adapun pelaksanaannya adalah:

#### 1) Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan dengan tujuan untuk standarisasi pembuatan susu kacang merah, menentukan perbandingan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dengan khamir *Candida Kefir*, menentukan waktu/lama fermentasi, suhu, konsentrasi glukosa dan jumlah starter yang sesuai untuk memastikan agar proses fermentasi berjalan dengan baik. Penelitian pendahuluan dilakukan pada bulan April 2008.

Pada penelitian pendahuluan dilakukan percobaan pembuatan susu kacang merah melalui perendaman selama 8 jam dengan perbandingan air dengan kacang merah adalah 4 : 1, direbus 45 menit, diblender dan ditambahkan air dengan perbandingan kacang merah : air=1:7. Perbandingan *Lactobacillus bulgaricus* dengan khamir *Candida Kefir* 1:1 dan diuji total bakterinya  $10^6$ , lama fermentasi adalah 6 jam pada inkubator dan 24 jam pada suhu ruang dengan penambahan glukosa 10%, penambahan starter 10%.

Hasil pengukuran variabel terhadap kefir susu kacang merah yang dihasilkan pada penelitian pendahuluan adalah : pH 4,28, total asam 1,29%, kadar alkohol 0,54% dan polifenol total 0,0039 mg/ml.

## 2) Pembuatan Produk

### a) Pembuatan Starter

Susu sapi dipasteurisasi pada suhu 85°C selama 30 menit. Didinginkan sampai suhu ruang. Ditambahkan kultur murni dari bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan khamir *Candida Kefir* dengan ratio 1 : 1. Diinkubasi pada suhu ruang selama 20 jam. Sebelum digunakan, starter yang telah siap dihitung terlebih jumlah koloni berdasarkan Standart Plate Count (SPC). Dari analisis diperoleh jumlah mikroba sebanyak  $4,025 \times 10^6$  cfu/ml. Jumlah koloni tersebut sesuai menurut Buttock dan Azam (1998), yaitu jumlah bakteri yang diperlukan  $10^6$  cfu/ml, jumlah khamir  $10^6 - 10^7$  cfu/ml agar proses fermentasi dapat berjalan dengan baik.

### b) Pembuatan Susu Kacang Merah

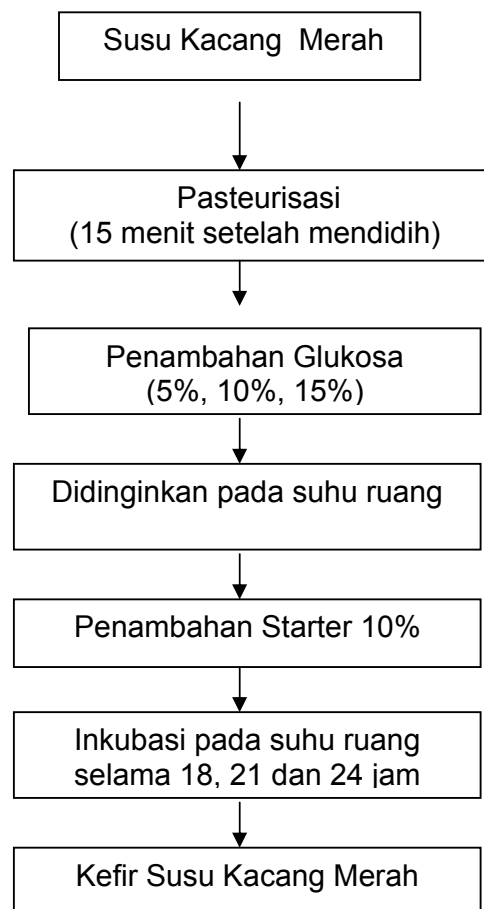
Kacang merah disortasi (dipisahkan dari kotoran dan biji rusak), direndam dalam air dengan perbandingan air dengan kacang merah adalah 4 : 1 selama 8 jam. Kacang direbus selama 45 menit. Kacang merah digiling menggunakan *blender* dengan penambahan air secara keseluruhan mencapai 7 kali lipat berat kacang merah kering. Bubur encer disaring dengan saringan dan filtratnya adalah susu kacang merah. Susu kacang merah dipasteurisasi 15 menit setelah



mendidih. Untuk 1 (satu) kg kacang merah kering menghasilkan 7500 ml susu kacang merah.

### c) Pembuatan Kefir Susu Kacang Merah

Proses pembuatan kefir susu kacang merah dapat disajikan pada Gambar 5. Foto kefir susu kacang merah dapat dilihat pada Lampiran 4.



Gambar 5  
Diagram Alir Pembuatan Kefir Susu Kacang Merah

### 3) Pengukuran Variabel

#### a. Pengukuran Aktivitas Antibakteri (Fardiaz, 1987)

Kultur bakteri *E. coli* sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam cawan petri, dituangkan media agar (NA) sebanyak 20 ml, dibiarkan membeku. Dimasukkan kertas cakram dengan diameter 6 mm yang telah dicelup dalam sampel (kefir) Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati zona bening yang terbentuk dengan cara diukur diameter di luar cakram dengan satuan mm. Semakin lebar diameter zona bening menunjukkan efek penghambatan yang baik. Foto pengujian aktivitas antibakteri dengan difusi agar dapat dilihat pada Lampiran 4.

#### b. Pengukuran Total Polifenol (Khadambi, 2007)

Diambil Larutan sampel (kefir) sebanyak 1 ml ditambahkan dengan aquades 70 ml dalam labu ukur 100 ml. Ditambahkan reagen *Folin-Ciocalteu* sebanyak 5 ml. Setelah 1 menit dimasukkan sodium karbonat jenuh sebanyak 15 ml. Ditambahkan aquades sampai tepat 100 ml, kemudian dilakukan homogenisasi dengan *shaker*. Sampel didiamkan selama 2 jam. Sampel dibaca dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 760 nm. Cara yang sama dilakukan terhadap larutan

standar dari asam tanat sebanyak 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 dan 9 ml. Untuk standar asam tanat digunakan 10 mg asam tanat dilarutkan dengan aquades sampai tepat 100 ml, kemudian dipipet sesuai dengan standar yang akan dibuat. Total polifenol dinyatakan dalam mg/ml. Foto-foto persiapan dan pembacaan uji total polifenol dapat dilihat pada Lampiran 4.

**c. Pengukuran Total Asam (Asam Laktat) (Ranggana, 1997).**

Sebanyak 10 ml sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, ditambahkan aquades sampai tanda batas lalu dihomogenkan dan disaring. Filtrat diambil 10 ml dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Ditambahkan indikator PP 2 sampai 3 tetes. Kemudian dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N sampai terbentuk warna merah muda, pembacaan skala pada saat warna merah muda terbentuk yang pertama kali dan bertahan sampai beberapa saat.

Kadar total asam diperoleh dari rumus perhitungan :

Total Asam (%) adalah :

$$\frac{\text{volume NaOH} \times N \text{ NaOH} \times 100/10 \times 90}{\text{Volume bahan (ml)}} \times 100 \%$$

**d. Pengukuran Kadar Alkohol (James, 1995)**

Sebanyak 25 ml sampel ditambahkan 50 ml aquades kemudian dimasukkan dalam labu destilasi. Dalam wadah

penampung diisi 25 ml aquades. Destilasi dilakukan sampai volume di wadah penampung terisi 50 ml.

Lalu dilakukan pengukuran berat jenis sampel :

$$\text{Berat jenis : } \frac{X2 - X1}{X3 - X1}$$

Dimana :

X1 : berat piknometer kosong

X2 : berat piknometer + sampel

X3 : berat piknometer + aquades

Setelah itu dilakukan pembacaan kadar etanol berdasarkan berat jenis sampel pada tabel *specific gravity ethanol* (% b/v)

#### e. Pengukuran pH (Sudarmadji *et al.*, 1984)

##### 1). Standarisasi pH meter

Alat pH meter dinyalakan dan dibiarkan stabil selama 15-30 menit. Pengatur suhu pH-meter diset sesuai dengan suhu larutan buffer. Elektroda pH-meter dibilas dengan larutan buffer atau aquades, kemudian dikeringkan dengan kertas tisu jika digunakan aquades. Elektroda dicelupkan dalam larutan buffer, pH-meter diset pada pengukuran pH. Dibiarkan beberapa saat sampai jarum pH-meter stabil, kemudian tombol kalibrasi diputar sampai jarum pH-meter menunjukkan angka yang sama dengan pH larutan buffer. Standarisasi dilakukan pada pH 4 dan 7.

## 2). Pengukuran pH contoh

Suhu contoh diukur dan pengatur suhu pH-meter diset pada suhu terukur. Elektroda dibilas dengan aquades dan dikeringkan dengan kertas tisu. Elektroda dicelupkan pada contoh dan pH-meter diset pada pengukuran pH. Elektroda dibiarkan beberapa saat sampai jarum pH-meter stabil. Jarum pH-meter menunjukkan pH contoh.

## E. Definisi Operasional

### 1) Kefir Susu Kacang Merah

Kefir Susu Kacang merah adalah hasil fermentasi susu kacang merah menggunakan biakan murni *Lactobacillus bulgaricus* dan khamir *Candida Kefir* dengan lama fermentasi dan konsentrasi glukosa yang berbeda.

### 2) Lama Fermentasi

Lama proses pembuatan susu kacang merah menjadi kefir dengan perbedaan perlakuan yaitu 18 jam, 21 jam dan 24 jam pada suhu ruang.

Skala data : rasio

### 1) Konsentrasi Glukosa

Jumlah glukosa yang ditambahkan dalam susu kacang merah sebagai sumber karbon untuk aktivitas *Lactobacillus bulgaricus*

dan *Candida Kefir* sebanyak 5 %, 10 %, 15 % dari volume susu kacang merah.

Skala data : rasio

## 2) **Aktivitas Antibakteri**

Kemampuan kefir susu kacang merah menghambat pertumbuhan bakteri patogen (*Escherichia coli*), dianalisis dengan metode difusi agar, diukur dengan diameter zona bening, dengan satuan mm.

Skala data : rasio.

## 3) **Polifenol Total**

Jumlah senyawa polifenol yang terdapat dalam sampel (kefir) menggunakan reagen *Folin-Ciocalteu*, diukur dengan *spektrofotometer UV-Vis* pada panjang gelombang 760 nm, dengan satuan mg/ml.

Skala data : rasio.

## 4) **Total Asam**

Persentase asam laktat yang terdapat pada kefir susu kacang merah yang diukur dengan metode titrasi, dalam persen.

Skala data : rasio

## 5) **Kadar Alkohol**

Persentase etanol yang diukur dengan metode destilasi dan dibaca dengan menggunakan tabel *specific gravity ethanol*

(% b/v), dalam persen.

Skala data : rasio

**6) pH**

pH kefir susu kacang merah yang diukur dengan menggunakan alat pH meter.

Skala data : rasio.

**F. Analisis Data**

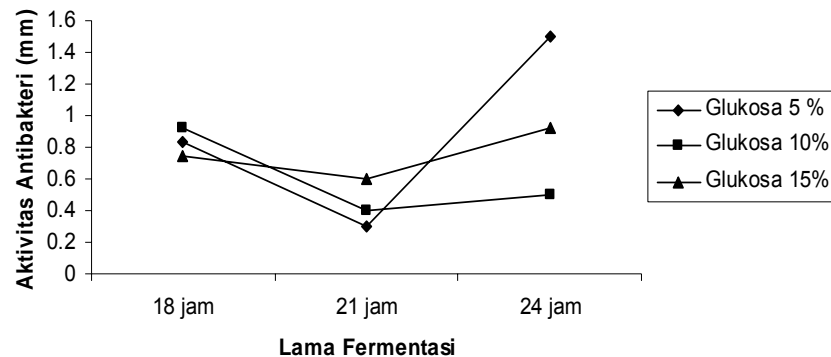
Untuk mengetahui pengaruh perlakuan yaitu lama fermentasi dan konsentrasi glukosa terhadap aktivitas antibakteri, polifenol total dan mutu kimia (total asam, kadar alkohol, pH) kefir susu kacang merah digunakan program komputer SPSS versi 11,5 dengan uji statistik *Analysis of Variance* (*Anova*) (Sugiyono, 2003). Apabila terjadi pengaruh lama fermentasi dan konsentrasi glukosa terhadap aktivitas antibakteri, polifenol total dan mutu kimia (total asam, kadar alkohol, pH) kefir susu kacang merah, maka analisis dilanjutkan dengan uji *LSD* pada taraf 5% (Yitnosumarto, 1993) untuk mengetahui perlakuan yang berbeda.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Aktivitas Antibakteri Kefir Susu Kacang Merah

Pengukuran aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar terhadap bakteri *Escherichia coli* karena bakteri ini merupakan bakteri patogen yang berkaitan erat dengan makanan terutama menyebabkan gangguan masalah pencernaan. Hasil pengukuran aktivitas antibakteri disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6.  
Grafik Aktivitas Antibakteri Kefir Susu Kacang Merah dengan Variasi Lama Fermentasi dan Konsentrasi Glukosa.

Berdasarkan Gambar 6, terjadi peningkatan aktivitas antibakteri setelah dilakukan fermentasi 24 jam pada konsentrasi glukosa 5%, 10% dan 15%. Hal ini diduga substrat mulai habis, sehingga *Lactobacillus bulgaricus* memproduksi senyawa antibakteri untuk mempertahankan kondisi fisiologisnya. Untuk



mengetahui beda rerata aktivitas antibakteri kefir susu kacang merah, dapat dilihat pada Lampiran 3. Aktivitas antibakteri kefir susu kacang merah yang diukur dengan diameter zona bening adalah 0.30 mm -1,50 mm. Pada penelitian ini, sebelum fermentasi tidak terdapat aktivitas antibakteri. Dengan demikian aktivitas antibakteri dihasilkan setelah fermentasi. Hal ini sesuai dengan pendapat Iqbal (2007), bahwa kefir yang difermentasi secara anaerob dapat menghasilkan efek antibakteri. Penelitian kefir susu kacang merah juga dilakukan dengan kondisi anaerob.

Berdasarkan hasil uji *Anova* (Lampiran 3), menunjukkan lama fermentasi dan konsentrasi glukosa berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ), serta interaksi antara lama fermentasi dan konsentrasi glukosa menunjukkan berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap aktivitas antibakteri.

Lama fermentasi berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri, karena semakin lama fermentasi, maka bakteri semakin aktif artinya berkembang biak, semakin banyak jumlahnya, sehingga mempunyai kemampuan untuk memecah substrat semakin besar. Pada lama fermentasi 18 jam, asam laktat yang dihasilkan sebagai metabolit primer masih terbatas, kemudian mengalami peningkatan pada lama fermentasi 21 jam dan asam laktat tertinggi adalah pada lama fermentasi 24 jam. Adanya akumulasi asam laktat menyebabkan penurunan pH. Asam laktat yang tinggi dan pH yang

rendah mempunyai fungsi sebagai antibakteri yaitu menghambat pertumbuhan bakteri patogen. *E. coli* digunakan sebagai efek penghambatan karena merupakan bakteri patogen yang tumbuh optimum pada pH 6 -7 (Surono, 2004).

Pada lama fermentasi 24 jam, diduga substrat sudah mulai habis ( Fardiaz,1989), sehingga bakteri *Lactobacillus bulgaricus* yang dipakai dalam fermentasi kefir susu kacang merah, memecah substrat yang ada dalam tubuhnya yaitu dalam bentuk aktivitas antibakteri (*bacteriocin*). Hal ini sesuai dengan penelitian pada antibiotik *rifamycin* yang dihasilkan oleh *Amycolatopsis mediterranei* (El Enshasy *et al.*,2008), bahwa aktivitas antibakteri dihasilkan pada *fase decay*.

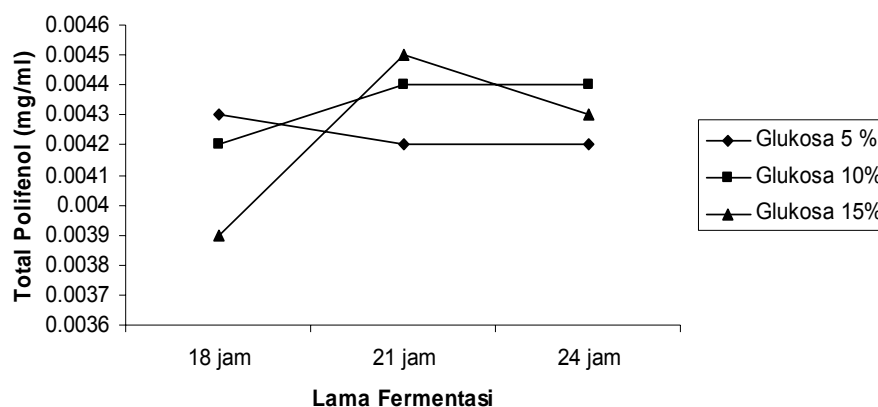
Konsentrasi glukosa berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri, karena glukosa merupakan substrat yang mudah dicerna dan dimanfaatkan untuk pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus* dalam menghasilkan metabolit sekunder berupa aktivitas antibakteri. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Todorov dan Dick (2007), bahwa aktivitas antibakteri yang dihasilkan oleh *Lactobacillus pentosus ST71BZ* optimum dengan media yang ditambahkan 20-40 gram/liter glukosa.

Interaksi antara lama fermentasi dan konsentrasi glukosa menunjukkan berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap aktivitas antibakteri. Hal tersebut mempunyai arti lama fermentasi dan konsentrasi glukosa secara bersama-sama mempengaruhi aktivitas antibakteri. Dalam penelitian ini aktivitas antibakteri paling besar/efektif adalah pada lama fermentasi 24 jam dan penambahan glukosa 5% yaitu 1,50 mm seperti beda rerata aktivitas antibakteri kefir susu kacang merah pada Lampiran 3.

Hal tersebut di atas sejalan dengan penelitian Todorov dan Dick (2007), bahwa aktivitas antibakteri yang dihasilkan oleh *Lactobacillus pentosus* ST71BZ optimum setelah lama fermentasi 24 jam dengan media yang ditambahkan 20-40 gram/liter glukosa. Pada penelitian ini glukosa yang ditambahkan adalah 5% (10 gram/200 ml susu kacang merah) atau 50 gram glukosa dalam 1 liter susu kacang merah yang akan difermentasi.

## **B. Polifenol Total Kefir Susu Kacang Merah**

Pengukuran polifenol total dilakukan menggunakan reagen *Folin-Ciocalteu* dengan *spektrofotometer UV-Vis* pada panjang gelombang 760 nm. Hasil pengukuran polifenol total disajikan pada Gambar 7.



Gambar 7.  
Grafik Polifenol Total Kefir Susu Kacang Merah dengan Variasi Lama Fermentasi dan Konsentrasi Glukosa.

Berdasarkan Gambar 7, pada konsentrasi glukosa 15% setelah difermentasi 21 jam polifenol total meningkat tajam, tetapi menurun pada lama fermentasi 24 jam. Hal ini diduga karena kondisi asam yang sesuai. Menurut Shahidi and Nack (1995), pembentukan senyawa fenol melalui asam hidroksi sinamat dan asam ferulat memerlukan kondisi asam yang sedang dengan nilai pH 4 - 5. Pada lama fermentasi 21 jam, pH kefir susu kacang merah antara 4,09 – 4,16. Pada lama fermentasi 24 jam total polifenol menurun, karena proses dekarboksilasi oleh enzim *ferulic acid reductase* dan *vinyl phenol reductase* yang dihasilkan *Lactobacillus bulgaricus* dan *Candida kefir* tidak maksimal. Pada perlakuan lain, polifenol total hampir merata yaitu 0,0039 mg/ml-0,0045 mg/ml dalam beda rerata polifenol total kefir susu kacang merah pada Lampiran 3.

Berdasarkan hasil uji *Anova* (Lampiran 3), menunjukkan perlakuan lama fermentasi dan konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata ( $p>0,05$ ) terhadap polifenol total dan interaksi lama fermentasi dan konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata ( $p>0,05$ ). Hal ini disebabkan polifenol merupakan metabolit sekunder, sehingga glukosa yang ditambahkan dimanfaatkan oleh *Lactobacillus bulgaricus* untuk menghasilkan metabolit primer berupa asam laktat. Glukosa oleh khamir *Candida kefir* diubah menjadi alkohol dan karbondioksida pada lama fermentasi tertentu. Selain itu polifenol dihasilkan karena adanya asam hidroksi sinamat yang teresterifikasi dalam dinding sel polisakarida kacang merah melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh *Lactobacillus bulgaricus* dan *Candida kefir*.

Berdasarkan pengukuran polifenol total sebelum fermentasi (0,00033 mg/ml), polifenol total susu kacang merah meningkat setelah mengalami fermentasi. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian Katina *et al.* (2007) pada *bran* yang difermentasi dengan menggunakan bakteri asam laktat (BAL) menunjukkan peningkatan fenol total.

Peningkatan polifenol kefir susu kacang merah kemungkinan karena adanya dekarboksilasi asam sinamat (*ferulic acid* dan *coumaric acid*) membentuk *4-vinylphenol*. Dekarboksilasi asam sinamat menjadi *vinyl phenol* terjadi karena aktivitas enzim *vinyl*

*phenol reductase* yang dihasilkan oleh khamir (Beek and Priest, 2000). *Lactobacillus* memiliki pula kemampuan mendegradasi asam ferulat dan asam sinamat melalui aktivitas enzim *ferulic acid reductase* dan *vinyl phenol reductase* menjadi *4-vinyl phenol* dan *4-vinyl guaiacol* (Gawel, 2004). Kacang-kacangan termasuk kacang merah mempunyai kandungan asam hidroksi sinamat yang teresterifikasi dalam dinding sel polisakarida.

Polifenol sebagai metabolit sekunder proses fermentasi kefir, mempunyai fungsi sebagai antibakteri. Pada penelitian ini lama fermentasi dan konsentrasi glukosa berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri, tetapi tidak berpengaruh terhadap polifenol. Hal ini disebabkan pada aktivitas antibakteri yang besar (pada lama fermentasi 24 jam dan konsentrasi glukosa 5%) tidak menunjukkan polifenol total yang optimal (polifenol total tertinggi pada lama fermentasi 21 jam). Hasil ini menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri yang dihasilkan tidak hanya berasal dari polifenol, tetapi dari metabolit primer terutama asam laktat dan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh aktivitas starter seperti misalnya *bacteriocin* (Powel, J.E, 2006).

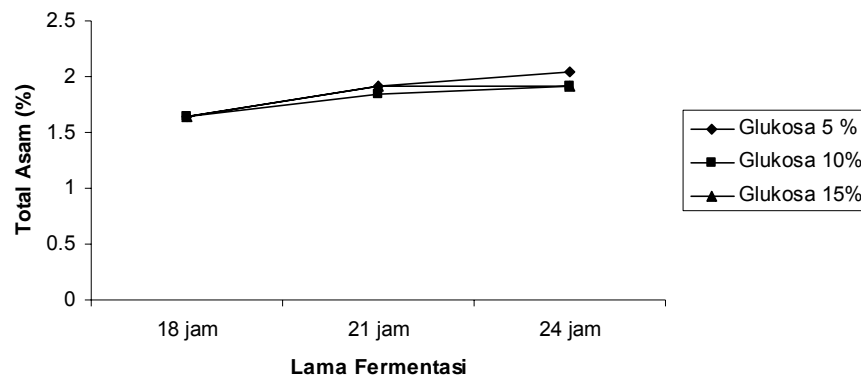
Aktivitas antibakteri yang paling besar adalah pada lama fermentasi 24 jam dan konsentrasi glukosa 5% dengan total asam tertinggi (2,04%) dan pH terendah (3,94). Hal tersebut sesuai dengan pendapat Surono (2004), bahwa aktivitas antibakteri

dihasilkan selama fermentasi terutama asam laktat yang disertai dengan penurunan pH. Adanya penurunan pH akan menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* yang tumbuh optimum pada pH 6 -7.

Polifenol dalam kacang merah adalah prosianidin (Anonim, 1997), merupakan turunan dari catechin. Catechin banyak terdapat dalam teh dan termasuk dalam flavanol (bagian dari flavonoid). Flavonoid merupakan kelompok polifenol yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri (Purwo S, 2006). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Alberto *et al.* (2006), bahwa efek antibakteri polifenol dari kulit apel dapat menghambat bakteri patogen pada manusia seperti *E. coli* dan *Staphylococcus aureus*. Penelitian lain yang dilakukan oleh Sasaki *et al.* (2004) menyebutkan bahwa aktivitas antibakteri polifenol diperoleh dari proses fermentasi.

### **C. Total Asam Kefir Susu Kacang Merah**

Hasil pengukuran total asam yang dinilai sebagai total asam laktat disajikan pada Gambar 8.



Gambar 8.  
Grafik Total Asam kefir Susu Kacang Merah dengan Variasi Lama Fermentasi dan Konsentrasi Glukosa.

Berdasarkan Gambar 8, total asam kefir susu kacang merah mengalami peningkatan setelah dilakukan fermentasi 24 jam. Hal ini disebabkan semakin lama fermentasi, mikroba semakin banyak jumlahnya, sehingga kemampuan menghasilkan asam laktat semakin tinggi. Hal tersebut sesuai dengan beda rerata asam laktat kefir susu kacang merah yaitu total asam laktat tertinggi adalah pada lama fermentasi 24 jam yaitu 2,04%.

Berdasarkan hasil uji *Anova* (Lampiran 3), menunjukkan lama fermentasi berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap total asam kefir susu kacang merah, tetapi konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata ( $p > 0,05$ ) serta interaksi lama fermentasi dan konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata ( $p > 0,05$ ) terhadap total asam kefir susu kacang merah.



Asam laktat merupakan salah satu metabolit primer yang dihasilkan dalam proses fermentasi. Menurut Rachman (1989), metabolit primer adalah senyawa-senyawa kimia yang dihasilkan oleh mikroba dan dibutuhkan oleh mikroba tersebut untuk pertumbuhannya. Menurut Rahman (1992) *Lactobacillus bulgaricus* merupakan bakteri *homofermentatif* yang terutama memproduksi asam laktat.

Lama fermentasi berpengaruh terhadap total asam, karena semakin lama fermentasi, *Lactobacillus bulgaricus* yang digunakan dalam proses fermentasi kefir susu kacang merah semakin aktif, berkembangbiak, sehingga kemampuan untuk memecah substrat semakin banyak dan menghasilkan asam laktat yang semakin meningkat (Astawan, 2007). Total asam yang dihasilkan dalam penelitian ini adalah antara 1,64% - 2,04%, sesuai dengan Standar Nasional Indonesia (1992) yaitu 0,5% - 2%.

Konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata terhadap total asam disebabkan oleh kemampuan *Lactobaccillus bulgaricus* untuk memanfaatkan glukosa tersebut menjadi asam laktat. Hal ini sesuai penelitian yang dilakukan oleh Petry *et al.* (2000), bahwa *Lactobacillus bulgaricus* hanya dapat memanfaatkan glukosa sebanyak 2,0 – 3,5 gram/liter dalam *fase eksponensial* dan 8,0 gram/liter pada *fase stasioner*. Dengan demikian penambahan glukosa tidak berpengaruh terhadap asam laktat yang dihasilkan.

Hasil uji *LSD* menunjukkan total asam pada lama fermentasi 18 jam berbeda nyata dengan 21 jam dan 24 jam ( $p < 0,05$ ). Hal ini disebabkan semakin lama fermentasi semakin banyak asam yang dihasilkan dari pemecahan glukosa oleh *Lactobacillus bulgaricus*. Total asam pada lama fermentasi 18 jam adalah 1,64% (terendah), mengalami peningkatan pada lama fermentasi 21 jam dan 24 jam. Hasil uji selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.

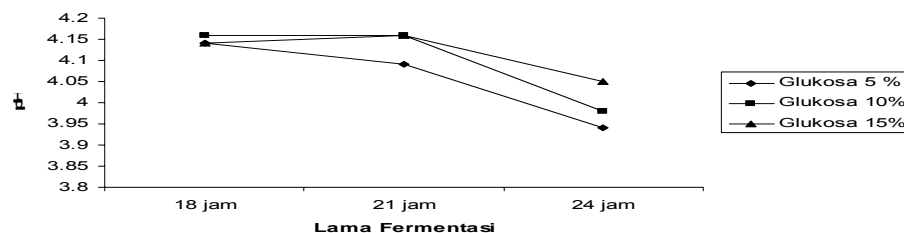
Tabel 5  
Hasil Uji *LSD* Total Asam Kefir Susu Kacang Merah Berdasarkan Lama Fermentasi

Lama Fermentasi	18 jam	21 jam	24 jam
18 jam	–	0,001*	0,001*
21 jam	0,001*	–	0,260
24 jam	0,001*	0,260	–

$p < 0,05$

#### D. pH Kefir Susu Kacang Merah

pH kefir susu kacang merah yang diukur menggunakan pH meter disajikan pada Gambar 9.



Gambar 9  
Grafik pH Kefir Susu Kacang Merah dengan Variasi Lama Fermentasi dan Konsentrasi Glukosa

Berdasarkan Gambar 9, pH kefir susu kacang merah pada semua perlakuan mengalami penurunan setelah dilakukan fermentasi selama 24 jam. Hal tersebut berhubungan dengan total asam yang dihasilkan. Semakin lama fermentasi, mikroba berkembang biak semakin banyak jumlahnya, sehingga kemampuan menghasilkan asam laktat meningkat. Peningkatan asam laktat dapat diukur dengan penurunan pH. Hal ini sesuai dengan beda rerata pH kefir susu kacang merah yang disajikan pada Lampiran 3.

Berdasarkan hasil uji *Anova* (Lampiran 3), menunjukkan lama fermentasi berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap pH sedangkan konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata ( $p > 0,05$ ) serta interaksi lama fermentasi dan konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata ( $p > 0,05$ ) terhadap pH kefir susu kacang merah dan

Lama fermentasi berpengaruh nyata terhadap pH, karena semakin lama fermentasi semakin banyak mikroorganisme yang aktif, berkembangbiak dan jumlahnya bertambah. Dengan bertambah banyaknya bakteri yang terbentuk dan berkembangbiak, maka kemampuan memecah substrat semakin baik, sehingga menghasilkan asam laktat yang lebih banyak. Asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri akan diekskresikan keluar sel sehingga terakumulasi dalam cairan fermentasi (Astawan, 2007). Dengan

meningkatnya jumlah asam dalam substrat, maka keasaman kefir meningkat. Peningkatan akumulasi asam dalam kefir diketahui dengan penurunan pH. Pada penelitian ini pH kefir susu kacang merah adalah 3,94 – 4,16.

Konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata terhadap pH, karena jumlah mikroba yang ditambahkan dalam fermentasi kefir susu kacang merah adalah sama yaitu 10%, sehingga diduga dengan penambahan konsentrasi glukosa yang berbeda tidak berpengaruh terhadap kemampuan mikroorganisme untuk memanfaatkan glukosa tersebut menjadi asam laktat. Hal ini sesuai penelitian yang dilakukan oleh Petry *et al.* (2000), bahwa *Lactobacillus bulgaricus* hanya dapat memanfaatkan glukosa sebanyak 2,0 – 3,5 gram/liter dalam *fase eksponensial* dan 8,0 gram/liter pada *fase stasioner*. Dengan demikian penambahan glukosa tidak berpengaruh terhadap asam laktat yang dihasilkan. Adanya akumulasi asam laktat menyebabkan penurunan pH. Oleh karena itu konsentrasi glukosa tidak berpengaruh terhadap pH.

Hasil uji *LSD* menunjukkan lama fermentasi 18 jam berbeda nyata dengan 24 jam dan lama fermentasi 21 jam berbeda nyata dengan 24 jam ( $p < 0,05$ ). Hal ini sesuai dengan jumlah total asam yang dihasilkan pada lama fermentasi tersebut. Semakin lama fermentasi semakin banyak asam yang terakumulasi menyebabkan penurunan pH. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 6.

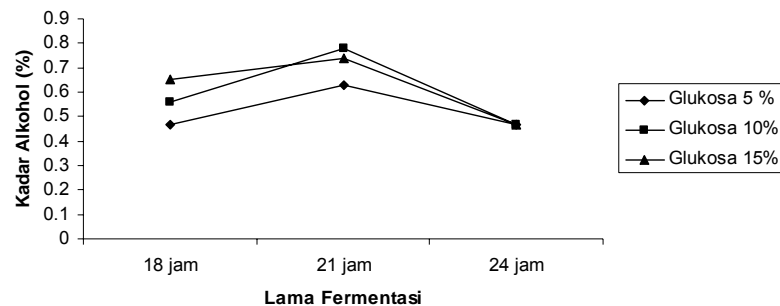
Tabel 6  
 Hasil Uji LSD pH Kefir Susu Kacang Merah  
 Berdasarkan Lama Fermentasi

Lama Fermentasi	18 jam	21 jam	24 jam
18 jam	–	0,724	0,001*
21 jam	0,724	–	0,001*
24 jam	0,001*	0,001*	–

\*  $p < 0,05$

#### E. Kadar Alkohol Kefir Susu Kacang Merah

Hasil pengukuran kadar alkohol yang dilakukan dengan metode destilasi disajikan pada Gambar 10.



Gambar 10  
 Grafik Kadar Alkohol Kefir Susu Kacang Merah dengan  
 Variasi Lama Fermentasi dan Konsentrasi Glukosa.

Berdasarkan Gambar 10, kadar alkohol kefir susu kacang merah meningkat pada lama fermentasi 21 jam, tetapi mengalami penurunan setelah dilakukan fermentasi 24 jam. Hal ini sesuai dengan beda rerata kadar alkohol kefir susu kacang merah pada

Lampiran 3. Kadar alkohol kefir susu kacang merah berkisar antara 0,47%-0,78%, kadar alkohol tertinggi pada perlakuan lama fermentasi 21 jam dengan konsentrasi glukosa 10% dan kadar terendah pada semua perlakuan lama fermentasi 24 jam.

Berdasarkan hasil uji *Anova* (Lampiran 3), menunjukkan lama fermentasi berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kadar alkohol, tetapi konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata ( $p > 0,05$ ) serta lama fermentasi dan konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata ( $p > 0,05$ ) terhadap kadar alkohol kefir susu kacang merah.

Lama fermentasi berpengaruh nyata terhadap kadar alkohol karena semakin lama fermentasi semakin banyak mikroorganisme yang aktif, dalam hal ini adalah khamir *Candida kefir*. Menurut Rahman (1989), khamir akan memecah gula sederhana menjadi alkohol dan karbondioksida. Dalam pembentukan etanol/alkohol, mula-mula terjadi pemecahan glukosa menjadi asam piruvat. Asam piruvat mengalami dekarboksilasi menjadi acetaldehida. Acetaldehida tereduksi menjadi etanol. Khamir merupakan mikroorganisme *heterofermentatif*, yaitu mampu mengubah substrat menghasilkan lebih dari satu senyawa.

Hal ini diduga, pada lama fermentasi tertentu, dalam penelitian ini adalah 24 jam, kandungan total asam yang tinggi dari *Lactobacillus bulgaricus* akan menghambat pertumbuhan

mikroorganisme yang melakukan proses fermentasi termasuk khamir *Candida kefir*. Dengan demikian *Candida kefir* tidak dapat memecah substrat seperti pada awal fermentasi, sehingga kemampuan *Candida kefir* untuk menghasilkan alkohol mulai menurun setelah lama fermentasi 24 jam. Kadar alkohol pada penelitian ini adalah 0,47%-0,78%. Hasil penelitian ini sesuai dengan pendapat Surono (2004), bahwa kadar alkohol kefir adalah 0,5% -1,0%.

Konsentrasi glukosa tidak berpengaruh nyata terhadap kadar alkohol, karena jumlah mikroba yang ditambahkan dalam fermentasi kefir susu kacang merah adalah sama yaitu 10%, sehingga diduga dengan penambahan konsentrasi glukosa yang berbeda dan jumlah starter sama, maka tidak berpengaruh terhadap kemampuan mikroorganisme dalam hal ini adalah khamir *Candida kefir* untuk memecah substrat/glukosa tersebut menjadi alkohol/etanol.

Hal tersebut diatas sesuai dengan pendapat Rachman (1989), bahwa mikroba (aktivitas mikroba), termasuk jumlahnya mempunyai peran yang penting dalam kemampuan memecah substrat. Hal ini sesuai penelitian yang dilakukan oleh Petry *et al.* (2000), bahwa *Lactobacillus bulgaricus* hanya dapat memanfaatkan glukosa sebanyak 2,0 – 3,5 gram/liter dalam *fase eksponensial* dan 8,0 gram/liter pada *fase stasioner*. Diduga keterbatasan

kemampuan ini juga terdapat pada khamir, sehingga dengan penambahan glukosa 5%, 10% dan 15% tidak berpengaruh terhadap kadar alkohol.

Hasil uji *LSD* pada Tabel 7 menunjukkan kadar alkohol pada lama fermentasi 18 jam berbeda nyata dengan 21 jam ( $p < 0,05$ ) dan lama fermentasi 21 jam berbeda nyata dengan 24 jam ( $p < 0,05$ ). Hal ini disebabkan bahwa pada lama fermentasi 21 jam menunjukkan kadar alkohol tertinggi dan pada lama fermentasi 24 jam kadar alkohol mengalami penurunan.

Tabel 7  
Hasil Uji *LSD* Kadar Alkohol Kefir Susu Kacang Merah  
berdasarkan Lama Fermentasi

Lama Fermentasi	18 jam	21 jam	24 jam
18 jam	–	0,037*	0,212
21 jam	0,037*	–	0,002*
24 jam	0,212	0,002*	–

\* $p < 0,05$



## BAB V

### SIMPULAN DAN SARAN

#### C. Simpulan

Lama fermentasi berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri dan mutu kimia (total asam, pH, kadar alkohol) kefir susu kacang merah, tetapi tidak berpengaruh terhadap total polifenol kefir susu kacang merah. Konsentrasi glukosa berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri kefir susu kacang merah, tetapi tidak berpengaruh terhadap total polifenol dan mutu kimia (total asam, pH, kadar alkohol) kefir susu kacang merah.

Aktivitas antibakteri paling besar adalah pada lama fermentasi 24 jam dengan konsentrasi glukosa 5% yaitu 1,50 mm. Polifenol total kefir susu kacang merah mengalami peningkatan setelah dilakukan fermentasi.

Total asam kefir susu kacang merah meningkat setelah fermentasi 24 jam, sedangkan pH mengalami penurunan. Kadar alkohol kefir susu kacang merah meningkat pada lama fermentasi 21 jam dan mengalami penurunan pada lama fermentasi 24 jam.

#### D. Saran

Perlu penelitian tentang jenis antimikroba yang berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Albaarri, AN dan Murti, W. 2003. *Analisa pH, Keasaman dan Kadar Laktosa pada Yakult, Yoghurt, Kefir* dalam Proceeding Simposium Nasional Hasil-hasil Penelitian di Unika Soegijapranata, Semarang 22 Maret 2003.
- Alberto M.R., Canavosio M.A.R., Nadra M.C.M. 2006. *Antimikrobia Effect of Polifenol from Apple Skins on Human Bacterial Pathogen*. Electronic journal of Biotechnology. Pontificia Universidad Catolica de Valparaiso-Chile.
- Ardiansyah. 2007. *Antimikroba Dari Tumbuhan*. Artikel IPTEK. <http://www.beritaiptek.com>. Diakses Oktober 2007.
- Anonim. 1997. *Kefir, Susu Asam Berkhasiat*. (<http://www.indonesia.com/intisari/1997/nov/kefir.htm>) Diakses 24 September 2007
- Afriansyah N. 2007. *Kacang Merah Turunkan Kolesterol dan Gula Darah*. (<http://www.fmipa.ipb.ac.id>) Diakses 29 April 2008
- Anonim.2007.A. *Sayuran dan Buah-buahan Pencegah Penyakit Jantung*. (<http://www.blogger.com>) Diakses 28 April 2008.
- Anonim.2007.B. *Antioksidan dan Peranannya Bagi Kesehatan*. (<http://www.seafast.ipb.ac.id>) Diakses 29 April 2008
- Anonim. 2008.A *Fermentasi dan Mikrobial yang Terlibat* (<http://Permimalang.wordpress.com>). Diakses 3 Juli 2008.
- Anonim.2008.B. *Escherichia coli*. (<http://wikipedia.org>). Diakses 15 Agustus 2008.
- Astawan M.2008. *Brem*. (<http://cybermed.cbn.net>). Diakses 2 Juli 2008.
- Azizah U. 2004. *Larutan Asam Basa*. Proyek Pengembangan Kurikulum Diknas

- Ballows, A., H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer. 1991. *The Prokaryotes*. 2<sup>nd</sup> Edition, A handbook on the Biology of Bacteria, Chapter 70.
- Beek, S.V. and F.G. Priest, 2000. *Decarboxylation of Substituted Cinnamic Acid by Lactic Acid Bacteria Isolated during Malt Whisky Fermentation*. Applied And Environmental Microbiology, Des. 2000 : 5322 - 5328.
- Bisson, L. 2001. Section 3: *The Alcoholic Fermentation*. University of California at Davis, University Extension: 91- 92 .
- Buttock, M. and S. Azam-Ali. 1998. *Basic Principles of Fermentation*. FAO Agricultural Services Bulletin No. 134. Intermediate Technology, Schumacher Centre for Technology and Development, Bourton Hall, Bourton On Dunsmore, Rugby, Warwickshire, UK.
- Buckle, K. A., R. A. Edward, G.H. Fleet and M. Wooton, 1985. *Ilmu Pangan* (diterjemahkan oleh Purnomo, H dan Adiono). UI Press. Jakarta.
- Dewan Standardisasi Nasional. 1992. *SNI Yoghurt (SNI 01-2981-1992.1992)*. Dewan Standardisasi Nasional, Jakarta
- Farnworth, E.R. 2005. *Kefir – a complex probiotic*. Food Research and Development Centre, Agriculture and Agri-food Canada, St. Hyacinthe, Quebec, Canada J2S 8E3. Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods 2 (1) 1-17.
- Fardiaz, S. 1987. *Penuntun Praktek: Mikrobiologi Pangan*. Lembaga Sumberdaya Informasi. IPB
- Fardiaz, S. 1989. *Mikrobiologi Pangan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. IPB
- Gawel, R. 2004. *Brettanomyces Character in Wine*. The Australian Society of Wine Education National Convention. Hunter Valley, Australia. 4th-6th of June 2004. <http://www.aswe.org.au>. Diakses 19 Mei 2008.
- El Enshasy H.A., El Baz, A.F. and Ammar, E.M. 2008. *Simultaneous production and decomposition of different rifamycins during Amycolatopsis mediterranei growth in shake flask and in*

*stirred tank bioreactor*. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. A. Mendez-Vilas (Ed).

- Iqbal M. 2007. *Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Penghasil Antimikroba*. [http://\(http://mochammadiqbal.wordpress.com](http://(http://mochammadiqbal.wordpress.com). Diakses 2 Mei 2008.
- James, C. S. 1995. *Analysis Chemistry of Food*. Blackie Academic and Professional. Great Britain.
- Karine T and Douglas L.S. 2001. *Kefir milk enhances intestinal immunity in Young but not old rat*. Journal of Nutritional. ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) Diakses Oktober 2007.
- Katina, K., Laitila A., Juvonen, R., Liukkonen, K.H, Kariluoto, S, Piironen, V., Landberg, R., Aman, P. and Poutanen, K. 2007. *Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye*. Food Microbiology . April 2007 :Vol. 24, issue 2: 175-186
- Khadambi TN, 2007. *Extraction of phenolic compound and quantification of the total phenol and condensed tannin content of bran fraction of condensed tannin and condensed tannin free sorghum varieties*. Thesis. University of Pretoria etd
- Koroleva, N.S. 1982. *Special Product (kefir, koumis, etc)*. proceedings XXI International Dairy Congress, Moscow 2: 146-151.
- Lee, B.H. 1996. *Fundamental of Food Biotechnology*. VCH Publishers.Inc. 337 7<sup>th</sup> Avenue New York.
- Liu J.R. 2002. *Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor mice*. Nutrition Cancer 2002; 44 (2): 183-7 ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Diakses Oktober 2007.
- Malaka R. dan Laga A. 2005. *Isolasi dan Identifikasi Lactobacillus Bulgaricus Strain Ropy dari Yoghurt Komersial*. Sains & Teknologi, April 2005, Vol. 5 No. 1: 50 – 58.
- Maulana H. 2005. *Pengaruh Ekstrak Benalu Teh (Scurrula oortiana) sebagai Alternatif Aditif Antibiotik Klortetrasiklin terhadap Titer Antibodi dan serum pada Ayam Broiler*. Skripsi. Fakultas peternakan Universitas Diponegoro. Semarang.

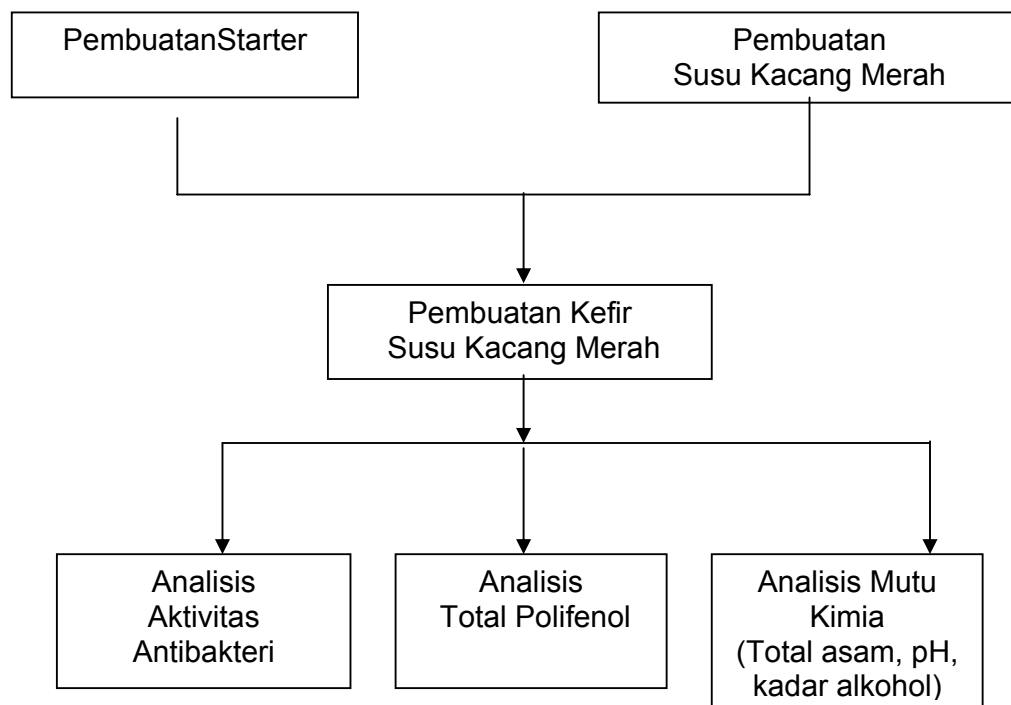
- Mokgope, L. B. 2006. *Cowpea Seed Coats and Their Extracts : Phenolic Composition and Use as Antioxidants in Sunflower Oil*. Department of Food Science. University of Pretoria. South Africa.
- Muchtadi, T. 1989. *Teknologi Proses Pengolahan Pangan*. Depdikbud. PAU IPB. Bogor.
- Pawiroharsono S. 2007. Artikel. *Prospek dan Manfaat Isoflavon untuk Kesehatan*. Direktorat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi.
- Petry S, Furlan S, Crepeau MJ, Cerning J, Desmazeaud M, 2000. Factors Affecting Exocellular Polysaccharide Production by *Lactobacillus delbueckri subsp. Bulgaricus* Grown in a Chemically Defined Medium. *Appl. EnvironMicrobial*, 66 (8): 3427-3431.
- Powel, J.E, 2006. *Bacteriocin and Bacteriocin Producers Present in Kefir Grains*. Tesis. Departement of Food Science, Faculty of Agriscience. Stellenbosch University.
- Purwo S, 2006. *Peran Polyphenol dalam Industri Coklat*. Food Review, vol 1 no. 11, Desember 2006.
- Rahman, A. 1989. *Pengantar Teknologi Fermentasi*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. IPB. Bogor
- Rahman, A., S. Fardiaz, W.P. Rahaju, Suliantari dan C.C. Nurwitri. 1992. *Bahan Pengajaran Teknologi Fermentasi Susu*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor
- Ranggana, S. 1997. *Manual Of Analysis of Fruit and Vegetables Product*. Tata. MC. Graw Publishing Company Limited. New Delhi.
- Robinson, R.K dan Tamime, A.Y.1985, *Yoghurt, Science and Technology*, Pergamon Press Ltd.
- Rukmana, 1998. *Bertanam Buncis*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Sabita,D. 1990. *Pedoman Analisis Zat Gizi*. DepKes RI Direktorat Bina Gizi Masyarakat dan Pusat Penelitian dan Pengembangan Gizi.

- Shahidi, F. And M. Nazck. 1995. *Food Phenolic*. Technomic Publishing Company, Inc. Lancaster – Basel : 292 – 293.
- Sari, N.K. 2007. *Tren dan Potensi Susu Sapi*. Food Review . Maret 2007;32-36. PT. Media Pangan Indonesia,
- Sasaki H., Matsumoto M., Tanaka T., Maeda., Nakai M., Hamada S., Ooshima T., 2004. *Antibacterial Activity of Poliphenol Component in Oolong Tea Extract against Streptococcus mutans*. Journal Caries Research 2004; 38: 2 – 8.
- Siswanto E. 2007. *Pembuatan Minuman Kefir Dari Susu Kacang Merah Dengan menggunakan Kultur Starter Lactobacillus bulgaricus dan Saccharomyces cereviceae, Kajian Pengaruh Konsentrasi Starter Dan Lama Inkubasi*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian UNTAG. Semarang.
- Sudarmadji, S. 1989. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada. Liberty. Yogyakarta.
- Sugiyono, 2003, *Statistika Untuk Penelitian*, CV. Alfabeta, Bandung.
- Surono, I. S. 2004. *Probiotik, Susu Fermentasi dan Kesehatan*. Yayasan Pengusaha Makanan dan Minuman Seluruh Indonesia (YAPMMI). TRICK. Jakarta.
- Todorov, SD and Dicks, L.M.T. 2007. *Bacteriocin production by Lactobacillus pentosus ST712BZ isolated from boza*. Brazilian Journal of Microbiology. Vol 38 no. 1.
- USDA (United States Department of Agriculture), 2007. *.Beans, kidney, California red, mature seeds, raw*. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 20 (2007).
- Usmiati, S. 2007. *Kefir, Susu Fermentasi dengan Rasa Menyegarkan*. Warta Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian Vol. 29, No.2, 2007. Bogor.

- Widowati, S dan Misgiyarta. 2007. *Efektifitas Bakteri Asam Laktat (BAL) dalam Pembuatan Produk Fermentasi Berbasis Protein/Susu Nabati*. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Jakarta.
- Winarno, FG., S. Fardiaz, D. Fardiaz. 1980. *Pengantar Teknologi Pangan*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Yitnosumarto S, 1993. *Percobaan, Perancangan, Analisis dan Interpretasinya*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Yusmarini dan R. Efendi. 2004. *Evaluasi Mutu Soygurt yang dibuat dengan Penambahan beberapa Jenis Gula*. Jurnal Natur Indonesia 6(2): 104-110 (2004).

## Lampiran 1

## Alur Penelitian





**Lampiran 2. Tabel *Specific Gravity Ethanol***

### Lampiran 3 . Hasil Analisis Data

#### Beda Rerata Aktivitas Antibakteri Kefir Susu Kacang Merah

Lama Fermentasi	Konsentrasi Glukosa		
	5%	10%	15%
18 jam	0,83± 0,144 <sup>ax</sup>	0,92± 0,144 <sup>ax</sup>	0,75± 0,001 <sup>ax</sup>
21 jam	0,30± 0,173 <sup>ay</sup>	0,40± 0,173 <sup>ay</sup>	0,60± 0,173 <sup>ax</sup>
24 jam	1,50± 0,001 <sup>az</sup>	0,50± 0,001 <sup>by</sup>	0,92± 0,144 <sup>cxy</sup>

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf  $\alpha$  5%.

#### Beda Rerata Polifenol Total Kefir Susu Kacang Merah

Lama Fermentasi	Konsentrasi Glukosa		
	5%	10%	15%
18 jam	0,0043±3x10 <sup>-4</sup> <sup>ax</sup>	0,0042±2,6x10 <sup>-4</sup> <sup>ax</sup>	0,0039±3,2x10 <sup>-4</sup> <sup>ax</sup>
21 jam	0,0042±2,1x10 <sup>-4</sup> <sup>ax</sup>	0,0044±2,0x10 <sup>-4</sup> <sup>ax</sup>	0,0045±1,5x10 <sup>-4</sup> <sup>ay</sup>
24 jam	0,0042±3,8x 10 <sup>-4</sup> <sup>ax</sup>	0,0044±3,5x10 <sup>-4</sup> <sup>ax</sup>	0,0043±1,5x10 <sup>-4</sup> <sup>axy</sup>

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf  $\alpha$  5%.

#### Beda Rerata Total Asam Kefir Susu Kacang Merah

Lama Fermentasi	Konsentrasi Glukosa		
	5%	10%	15%
18 jam	1,64± 0,001 <sup>ax</sup>	1,64± 0,001 <sup>ax</sup>	1,64± 0,001 <sup>ax</sup>
21 jam	1,91± 0,231 <sup>ay</sup>	1,84± 0,001 <sup>ay</sup>	1,91± 0,231 <sup>ax</sup>
24 jam	2,04± 0,001 <sup>ay</sup>	1,91± 0,115 <sup>ay</sup>	1,91± 0,115 <sup>ax</sup>

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf  $\alpha$  5%.

## Beda Rerata pH Kefir Susu Kacang Merah

Lama Fermentasi	Konsentrasi Glukosa		
	5%	10%	15%
18 jam	4,14± 0,436 <sup>ax</sup>	4,16± 0,021 <sup>ax</sup>	4,14± 0,038 <sup>ax</sup>
21 jam	4,09± 0,042 <sup>ax</sup>	4,16± 0,030 <sup>by</sup>	4,16± 0,016 <sup>bx</sup>
24 jam	3,94± 0,117 <sup>axy</sup>	3,97± 0,100 <sup>az</sup>	4,05± 0,035 <sup>az</sup>

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf  $\alpha$  5%.

## Beda Rerata Kadar Alkohol Kefir Susu Kacang Merah

Lama Fermentasi	Konsentrasi Glukosa		
	5%	10%	15%
18 jam	0,47± 0,001 <sup>ax</sup>	0,56± 0,156 <sup>ax</sup>	0,65± 0,156 <sup>ax</sup>
21 jam	0,63± 0,271 <sup>ax</sup>	0,78± 0,271 <sup>ax</sup>	0,74± 0,001 <sup>ax</sup>
24 jam	0,47± 0,001 <sup>ax</sup>	0,47± 0,001 <sup>ax</sup>	0,47± 0,001 <sup>ay</sup>

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf  $\alpha$  5%.

## Lama fermentasi 18 jam

### Descriptives

	N	Mean	d. Deviatid	td. Error	Confidence Interval		Minimum	Maximum
					Mean	Mean		
aktifitas anti	3	.8333	.14434	.08333	.4748	1.1919	.75	1.00
5 %	3	.9167	.14434	.08333	.5581	1.2752	.75	1.00
10 %	3	.7500	.00000	.00000	.7500	.7500	.75	.75
15 %	3	.8333	.12500	.04167	.7372	.9294	.75	1.00
Tota	9	.8333	.12500	.04167	.7372	.9294	.75	1.00
total polifeno	3	.004300	.0003000	.001732	.003555	.005045	.0040	.0046
5 %	3	.004200	.0002646	.001528	.003543	.004857	.0039	.0044
10 %	3	.003933	.0003215	.001856	.003135	.004732	.0037	.0043
15 %	3	.004144	.0003046	.001015	.003910	.004379	.0037	.0046
Tota	9	.004144	.0003046	.001015	.003910	.004379	.0037	.0046
total asam	3	1.6400	.00000	.00000	1.6400	1.6400	1.64	1.64
5 %	3	1.6400	.00000	.00000	1.6400	1.6400	1.64	1.64
10 %	3	1.6400	.00000	.00000	1.6400	1.6400	1.64	1.64
15 %	3	1.6400	.00000	.00000	1.6400	1.6400	1.64	1.64
Tota	9	1.6400	.00000	.00000	1.6400	1.6400	1.64	1.64
pH	3	4.1400	.04359	.02517	4.0317	4.2483	4.11	4.19
5 %	3	4.1633	.02082	.01202	4.1116	4.2150	4.14	4.18
10 %	3	4.1433	.03786	.02186	4.0493	4.2374	4.10	4.17
15 %	3	4.1489	.03257	.01086	4.1238	4.1739	4.10	4.19
Tota	9	4.1489	.03257	.01086	4.1238	4.1739	4.10	4.19
kadar alkoho	3	.4700	.00000	.00000	.4700	.4700	.47	.47
5 %	3	.5600	.15588	.09000	.1728	.9472	.47	.74
10 %	3	.6500	.15588	.09000	.2628	1.0372	.47	.74
15 %	3	.5600	.13500	.04500	.4562	.6638	.47	.74
Tota	9	.5600	.13500	.04500	.4562	.6638	.47	.74

### Lama fermentasi 18 jam

#### ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
aktifitas antibakte	Between Groups	.042	2	.021	1.500	.296
	Within Groups	.083	6	.014		
	Total	.125	8			
total polifenol	Between Groups	.000	2	.000	1.228	.357
	Within Groups	.000	6	.000		
	Total	.000	8			
total asam	Between Groups	.000	2	.000	.	.
	Within Groups	.000	6	.000		
	Total	.000	8			
pH	Between Groups	.001	2	.000	.381	.699
	Within Groups	.008	6	.001		
	Total	.008	8			
kadar alkohol	Between Groups	.049	2	.024	1.500	.296
	Within Groups	.097	6	.016		
	Total	.146	8			

**Lama fermentasi 18 jam**  
**Post Hoc Tests**

**Multiple Comparisons**

LSD

Dependent Variable: (I) Konsentrasi (J) Konsentrasi		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
aktivitas antibi	5 %	10 %	-.0833	.09623	.420	-.3188	.1521
		15 %	.0833	.09623	.420	-.1521	.3188
	10 %	5 %	.0833	.09623	.420	-.1521	.3188
		15 %	.1667	.09623	.134	-.0688	.4021
	15 %	5 %	-.0833	.09623	.420	-.3188	.1521
		10 %	-.1667	.09623	.134	-.4021	.0688
total polifenol	5 %	10 %	.000100	.002419	.694	-.000492	.000692
		15 %	.000367	.002419	.180	-.000225	.000959
	10 %	5 %	.000100	.002419	.694	-.000692	.000492
		15 %	.000267	.002419	.313	-.000325	.000859
	15 %	5 %	.000367	.002419	.180	-.000959	.000225
		10 %	.000267	.002419	.313	-.000859	.000325
pH	5 %	10 %	-.0233	.02893	.451	-.0941	.0475
		15 %	-.0033	.02893	.912	-.0741	.0675
	10 %	5 %	.0233	.02893	.451	-.0475	.0941
		15 %	.0200	.02893	.515	-.0508	.0908
	15 %	5 %	.0033	.02893	.912	-.0675	.0741
		10 %	-.0200	.02893	.515	-.0908	.0508
kadar alkohol	5 %	10 %	-.0900	.10392	.420	-.3443	.1643
		15 %	-.1800	.10392	.134	-.4343	.0743
	10 %	5 %	.0900	.10392	.420	-.1643	.3443
		15 %	-.0900	.10392	.420	-.3443	.1643
	15 %	5 %	.1800	.10392	.134	-.0743	.4343
		10 %	.0900	.10392	.420	-.1643	.3443

## Lama fermentasi 21 jam

### Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	% Confidence Interval		Minimum	Maximum
					Mean	Mean		
aktifitas antib	3	.3000	.17321	.10000	-.1303	.7303	.20	.50
10 %	3	.4000	.17321	.10000	-.0303	.8303	.20	.50
15 %	3	.6000	.17321	.10000	.1697	1.0303	.50	.80
Total	9	.4333	.20000	.06667	.2796	.5871	.20	.80
total polifenol	3	.04233	.0002082	.001202	.003716	.004750	.0040	.0044
10 %	3	.04400	.0002000	.001155	.003903	.004897	.0042	.0046
15 %	3	.04533	.0001528	.000882	.004154	.004913	.0044	.0047
Total	9	.04389	.0002088	.000696	.004228	.004549	.0040	.0047
total asam	3	1.9067	.23094	.13333	1.3330	2.4804	1.64	2.04
10 %	3	1.8400	.00000	.00000	1.8400	1.8400	1.84	1.84
15 %	3	1.9067	.23094	.13333	1.3330	2.4804	1.64	2.04
Total	9	1.8844	.16667	.05556	1.7563	2.0126	1.64	2.04
pH	3	4.0933	.04163	.02404	3.9899	4.1968	4.06	4.14
10 %	3	4.1600	.03000	.01732	4.0855	4.2345	4.13	4.19
15 %	3	4.1633	.01155	.00667	4.1346	4.1920	4.15	4.17
Total	9	4.1389	.04314	.01438	4.1057	4.1720	4.06	4.19
kadar alkohol	3	.6267	.27135	.15667	-.0474	1.3007	.47	.94
10 %	3	.7833	.27135	.15667	.1093	1.4574	.47	.94
15 %	3	.7400	.00000	.00000	.7400	.7400	.74	.74
Total	9	.7167	.20427	.06809	.5597	.8737	.47	.94

### ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
aktifitas antibakte	Between Groups	.140	2	.070	2.333	.178
	Within Groups	.180	6	.030		
	Total	.320	8			
total polifenol	Between Groups	.000	2	.000	1.906	.229
	Within Groups	.000	6	.000		
	Total	.000	8			
total asam	Between Groups	.009	2	.004	.125	.885
	Within Groups	.213	6	.036		
	Total	.222	8			
pH	Between Groups	.009	2	.005	5.072	.051
	Within Groups	.006	6	.001		
	Total	.015	8			
kadar alkohol	Between Groups	.039	2	.020	.400	.687
	Within Groups	.295	6	.049		
	Total	.334	8			

## Lama fermentasi 21 jam

### Post Hoc Tests

#### Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable: (I) Konsentrasi (J) Konsentrasi		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
aktifitas antibi	5 %	10 %	-.1000	.14142	.506	-.4460	.2460
		15 %	-.3000	.14142	.078	-.6460	.0460
	10 %	5 %	.1000	.14142	.506	-.2460	.4460
		15 %	-.2000	.14142	.207	-.5460	.1460
	15 %	5 %	.3000	.14142	.078	-.0460	.6460
		10 %	.2000	.14142	.207	-.1460	.5460
total polifenol	5 %	10 %	.000167	.001540	.321	-.000543	.000210
		15 %	.000300	.001540	.099	-.000677	.000077
	10 %	5 %	.000167	.001540	.321	-.000210	.000543
		15 %	.000133	.001540	.420	-.000510	.000243
	15 %	5 %	.000300	.001540	.099	-.000077	.000677
		10 %	.000133	.001540	.420	-.000243	.000510
total asam	5 %	10 %	.0667	.15396	.680	-.3101	.4434
		15 %	.0000	.15396	1.000	-.3767	.3767
	10 %	5 %	-.0667	.15396	.680	-.4434	.3101
		15 %	-.0667	.15396	.680	-.4434	.3101
	15 %	5 %	.0000	.15396	1.000	-.3767	.3767
		10 %	.0667	.15396	.680	-.3101	.4434
pH	5 %	10 %	-.0667*	.02480	.036	-.1273	-.0060
		15 %	-.0700*	.02480	.030	-.1307	-.0093
	10 %	5 %	.0667*	.02480	.036	.0060	.1273
		15 %	-.0033	.02480	.897	-.0640	.0573
	15 %	5 %	.0700*	.02480	.030	.0093	.1307
		10 %	.0033	.02480	.897	-.0573	.0640
kadar alkohol	5 %	10 %	-.1567	.18090	.420	-.5993	.2860
		15 %	-.1133	.18090	.554	-.5560	.3293
	10 %	5 %	.1567	.18090	.420	-.2860	.5993
		15 %	.0433	.18090	.819	-.3993	.4860
	15 %	5 %	.1133	.18090	.554	-.3293	.5560
		10 %	-.0433	.18090	.819	-.4860	.3993

\*.The mean difference is significant at the .05 level.



## Lama fermentasi 24 jam

### Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	% Confidence Interval		Minimum	Maximum
					Mean	Mean		
aktifitas antib	3	1.5000	.00000	.00000	1.5000	1.5000	1.50	1.50
10 %	3	.5000	.00000	.00000	.5000	.5000	.50	.50
15 %	3	.9167	.14434	.08333	.5581	1.2752	.75	1.00
Total	9	.9722	.44096	.14699	.6333	1.3112	.50	1.50
total polifenol	3	0.04233	.0003786	.002186	.003293	.005174	.0038	.0045
10 %	3	0.04400	.0003464	.002000	.003539	.005261	.0042	.0048
15 %	3	0.04333	.0001528	.000882	.003954	.004713	.0042	.0045
Total	9	0.04322	.0002774	.000925	.004109	.004535	.0038	.0048
total asam	3	2.0400	.00000	.00000	2.0400	2.0400	2.04	2.04
10 %	3	1.9067	.11547	.06667	1.6198	2.1935	1.84	2.04
15 %	3	1.9067	.11547	.06667	1.6198	2.1935	1.84	2.04
Total	9	1.9511	.10541	.03514	1.8701	2.0321	1.84	2.04
pH	3	3.9433	.11676	.06741	3.6533	4.2334	3.84	4.07
10 %	3	3.9767	.10017	.05783	3.7278	4.2255	3.90	4.09
15 %	3	4.0500	.03464	.02000	3.9639	4.1361	4.03	4.09
Total	9	3.9900	.09192	.03064	3.9193	4.0607	3.84	4.09
kadar alkohol	3	.4700	.00000	.00000	.4700	.4700	.47	.47
10 %	3	.4700	.00000	.00000	.4700	.4700	.47	.47
15 %	3	.4700	.00000	.00000	.4700	.4700	.47	.47
Total	9	.4700	.00000	.00000	.4700	.4700	.47	.47

### ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
aktifitas antibakte	Between Groups	1.514	2	.757	109.000	.000
	Within Groups	.042	6	.007		
	Total	1.556	8			
total polifenol	Between Groups	.000	2	.000	.221	.808
	Within Groups	.000	6	.000		
	Total	.000	8			
total asam	Between Groups	.036	2	.018	2.000	.216
	Within Groups	.053	6	.009		
	Total	.089	8			
pH	Between Groups	.018	2	.009	1.078	.398
	Within Groups	.050	6	.008		
	Total	.068	8			
kadar alkohol	Between Groups	.000	2	.000		
	Within Groups	.000	6	.000		
	Total	.000	8			

## Lama fermentasi 24 jam

### Post Hoc Tests

#### Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable: (I) Konsentrasi (J) Konsentrasi		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
aktifitas antibi	5 %	10 %	1.0000*	.06804	.000	.8335	1.1665
		15 %	.5833*	.06804	.000	.4168	.7498
	10 %	5 %	-1.0000*	.06804	.000	-1.1665	-.8335
		15 %	-.4167*	.06804	.001	-.5832	-.2502
	15 %	5 %	-.5833*	.06804	.000	-.7498	-.4168
		10 %	.4167*	.06804	.001	.2502	.5832
total polifenol	5 %	10 %	.000167	.002524	.534	-.000784	.000451
		15 %	.000100	.002524	.706	-.000718	.000518
	10 %	5 %	.000167	.002524	.534	-.000451	.000784
		15 %	.000067	.002524	.801	-.000551	.000684
	15 %	5 %	.000100	.002524	.706	-.000518	.000718
		10 %	.000067	.002524	.801	-.000684	.000551
total asam	5 %	10 %	.1333	.07698	.134	-.0550	.3217
		15 %	.1333	.07698	.134	-.0550	.3217
	10 %	5 %	-.1333	.07698	.134	-.3217	.0550
		15 %	.0000	.07698	1.000	-.1884	.1884
	15 %	5 %	-.1333	.07698	.134	-.3217	.0550
		10 %	.0000	.07698	1.000	-.1884	.1884
pH	5 %	10 %	-.0333	.07434	.670	-.2152	.1486
		15 %	-.1067	.07434	.201	-.2886	.0752
	10 %	5 %	.0333	.07434	.670	-.1486	.2152
		15 %	-.0733	.07434	.362	-.2552	.1086
	15 %	5 %	.1067	.07434	.201	-.0752	.2886
		10 %	.0733	.07434	.362	-.1086	.2552

\*.The mean difference is significant at the .05 level.

## Konsentrasi glukosa 5%

### Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
aktifitas anti	18 jar	3	.8333	.14434	.08333	.4748	1.1919	.75	1.00
	21 jar	3	.3000	.17321	.10000	-.1303	.7303	.20	.50
	24 jar	3	1.5000	.00000	.00000	1.5000	1.5000	1.50	1.50
	Total	9	.8778	.53275	.17758	.4683	1.2873	.20	1.50
total polifeno	18 jar	3	.04300	.0003000	.001732	.003555	.005045	.0040	.0046
	21 jar	3	.04233	.0002082	.001202	.003716	.004750	.0040	.0044
	24 jar	3	.04233	.0003786	.002186	.003293	.005174	.0038	.0045
	Total	9	.04256	.0002651	.000884	.004052	.004459	.0038	.0046
total asam	18 jar	3	1.6400	.00000	.00000	1.6400	1.6400	1.64	1.64
	21 jar	3	1.9067	.23094	.13333	1.3330	2.4804	1.64	2.04
	24 jar	3	2.0400	.00000	.00000	2.0400	2.0400	2.04	2.04
	Total	9	1.8622	.21082	.07027	1.7002	2.0243	1.64	2.04
pH	18 jar	3	4.1400	.04359	.02517	4.0317	4.2483	4.11	4.19
	21 jar	3	4.0933	.04163	.02404	3.9899	4.1968	4.06	4.14
	24 jar	3	3.9433	.11676	.06741	3.6533	4.2334	3.84	4.07
	Total	9	4.0589	.11062	.03687	3.9739	4.1439	3.84	4.19
kadar alkoho	18 jar	3	.4700	.00000	.00000	.4700	.4700	.47	.47
	21 jar	3	.6267	.27135	.15667	-.0474	1.3007	.47	.94
	24 jar	3	.4700	.00000	.00000	.4700	.4700	.47	.47
	Total	9	.5222	.15667	.05222	.4018	.6426	.47	.94

### ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
aktifitas antibakte	Between Groups	2.169	2	1.084	64.000	.000
	Within Groups	.102	6	.017		
	Total	2.271	8			
total polifenol	Between Groups	.000	2	.000	.048	.953
	Within Groups	.000	6	.000		
	Total	.000	8			
total asam	Between Groups	.249	2	.124	7.000	.027
	Within Groups	.107	6	.018		
	Total	.356	8			
pH	Between Groups	.063	2	.032	5.504	.044
	Within Groups	.035	6	.006		
	Total	.098	8			
kadar alkohol	Between Groups	.049	2	.025	1.000	.422
	Within Groups	.147	6	.025		
	Total	.196	8			

## Konsentrasi glukosa 5%

### Post Hoc Tests

#### Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) lama ferme	(J) lama ferme	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	5% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
aktifitas antiba	18 jam	21 jam	.5333*	.10628	.002	.2733	.7934
		24 jam	-.6667*	.10628	.001	-.9267	-.4066
	21 jam	18 jam	-.5333*	.10628	.002	-.7934	-.2733
		24 jam	-1.2000*	.10628	.000	-1.4601	-.9399
	24 jam	18 jam	.6667*	.10628	.001	.4066	.9267
		21 jam	1.2000*	.10628	.000	.9399	1.4601
total polifenol	18 jam	21 jam	.000067	.002480	.797	-.000540	.000673
		24 jam	.000067	.002480	.797	-.000540	.000673
	21 jam	18 jam	.000067	.002480	.797	-.000673	.000540
		24 jam	.000000	.002480	1.000	-.000607	.000607
	24 jam	18 jam	.000067	.002480	.797	-.000673	.000540
		21 jam	.000000	.002480	1.000	-.000607	.000607
total asam	18 jam	21 jam	-.2667*	.10887	.050	-.5331	-.0003
		24 jam	-.4000*	.10887	.010	-.6664	-.1336
	21 jam	18 jam	.2667*	.10887	.050	.0003	.5331
		24 jam	-.1333	.10887	.267	-.3997	.1331
	24 jam	18 jam	.4000*	.10887	.010	.1336	.6664
		21 jam	.1333	.10887	.267	-.1331	.3997
pH	18 jam	21 jam	.0467	.06194	.480	-.1049	.1982
		24 jam	.1967*	.06194	.019	.0451	.3482
	21 jam	18 jam	-.0467	.06194	.480	-.1982	.1049
		24 jam	.1500	.06194	.052	-.0016	.3016
	24 jam	18 jam	-.1967*	.06194	.019	-.3482	-.0451
		21 jam	-.1500	.06194	.052	-.3016	.0016
kadar alkohol	18 jam	21 jam	-.1567	.12792	.267	-.4697	.1563
		24 jam	.0000	.12792	1.000	-.3130	.3130
	21 jam	18 jam	.1567	.12792	.267	-.1563	.4697
		24 jam	.1567	.12792	.267	-.1563	.4697
	24 jam	18 jam	.0000	.12792	1.000	-.3130	.3130
		21 jam	-.1567	.12792	.267	-.4697	.1563

\*.The mean difference is significant at the .05 level.

## Konsentrasi glukosa 10%

### Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	% Confidence Interval		Minimum	Maximum
					Mean	Mean		
aktifitas antibakterial	18 jar	.9167	.14434	.08333	.5581	1.2752	.75	1.00
	21 jar	.4000	.17321	.10000	-.0303	.8303	.20	.50
	24 jar	.5000	.00000	.00000	.5000	.5000	.50	.50
	Total	.6056	.26273	.08758	.4036	.8075	.20	1.00
total polifenol	18 jar	.004200	.0002646	.001528	.003543	.004857	.0039	.0044
	21 jar	.004400	.0002000	.001155	.003903	.004897	.0042	.0046
	24 jar	.004400	.0003464	.002000	.003539	.005261	.0042	.0048
	Total	.004333	.0002598	.000866	.004134	.004533	.0039	.0048
total asam	18 jar	1.6400	.00000	.00000	1.6400	1.6400	1.64	1.64
	21 jar	1.8400	.00000	.00000	1.8400	1.8400	1.84	1.84
	24 jar	1.9067	.11547	.06667	1.6198	2.1935	1.84	2.04
	Total	1.7956	.13333	.04444	1.6931	1.8980	1.64	2.04
pH	18 jar	4.1633	.02082	.01202	4.1116	4.2150	4.14	4.18
	21 jar	4.1600	.03000	.01732	4.0855	4.2345	4.13	4.19
	24 jar	3.9767	.10017	.05783	3.7278	4.2255	3.90	4.09
	Total	4.1000	.10677	.03559	4.0179	4.1821	3.90	4.19
kadar alkohol	18 jar	.5600	.15588	.09000	.1728	.9472	.47	.74
	21 jar	.7833	.27135	.15667	.1093	1.4574	.47	.94
	24 jar	.4700	.00000	.00000	.4700	.4700	.47	.47
	Total	.6044	.20977	.06992	.4432	.7657	.47	.94

### ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
aktifitas antibakterial	Between Groups	.451	2	.225	13.295	.006
	Within Groups	.102	6	.017		
	Total	.552	8			
total polifenol	Between Groups	.000	2	.000	.522	.618
	Within Groups	.000	6	.000		
	Total	.000	8			
total asam	Between Groups	.116	2	.058	13.000	.007
	Within Groups	.027	6	.004		
	Total	.142	8			
pH	Between Groups	.068	2	.034	9.035	.015
	Within Groups	.023	6	.004		
	Total	.091	8			
kadar alkohol	Between Groups	.156	2	.078	2.392	.172
	Within Groups	.196	6	.033		
	Total	.352	8			

## Konsentrasi glukosa 10%

### Post Hoc Tests

#### Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) lama ferme	(J) lama ferme	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	5% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
aktifitas antiba	18 jam	21 jam	.5167*	.10628	.003	.2566	.7767
		24 jam	.4167*	.10628	.008	.1566	.6767
	21 jam	18 jam	-.5167*	.10628	.003	-.7767	-.2566
		24 jam	-.1000	.10628	.383	-.3601	.1601
	24 jam	18 jam	-.4167*	.10628	.008	-.6767	-.1566
		21 jam	.1000	.10628	.383	-.1601	.3601
total polifenol	18 jam	21 jam	.000200	.002261	.410	-.000753	.000353
		24 jam	.000200	.002261	.410	-.000753	.000353
	21 jam	18 jam	.000200	.002261	.410	-.000353	.000753
		24 jam	.000000	.002261	1.000	-.000553	.000553
	24 jam	18 jam	.000200	.002261	.410	-.000353	.000753
		21 jam	.000000	.002261	1.000	-.000553	.000553
total asam	18 jam	21 jam	-.2000*	.05443	.010	-.3332	-.0668
		24 jam	-.2667*	.05443	.003	-.3999	-.1335
	21 jam	18 jam	.2000*	.05443	.010	.0668	.3332
		24 jam	-.0667	.05443	.267	-.1999	.0665
	24 jam	18 jam	.2667*	.05443	.003	.1335	.3999
		21 jam	.0667	.05443	.267	-.0665	.1999
pH	18 jam	21 jam	.0033	.05026	.949	-.1196	.1263
		24 jam	.1867*	.05026	.010	.0637	.3096
	21 jam	18 jam	-.0033	.05026	.949	-.1263	.1196
		24 jam	.1833*	.05026	.011	.0604	.3063
	24 jam	18 jam	-.1867*	.05026	.010	-.3096	-.0637
		21 jam	-.1833*	.05026	.011	-.3063	-.0604
kadar alkohol	18 jam	21 jam	-.2233	.14752	.181	-.5843	.1376
		24 jam	.0900	.14752	.564	-.2710	.4510
	21 jam	18 jam	.2233	.14752	.181	-.1376	.5843
		24 jam	.3133	.14752	.078	-.0476	.6743
	24 jam	18 jam	-.0900	.14752	.564	-.4510	.2710
		21 jam	-.3133	.14752	.078	-.6743	.0476

\*.The mean difference is significant at the .05 level.

## Konsentrasi Glukosa 15%

### Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
aktifitas antibakterial								
18 jar	3	.7500	.00000	.00000	.7500	.7500	.75	.75
21 jar	3	.6000	.17321	.10000	.1697	1.0303	.50	.80
24 jar	3	.9167	.14434	.08333	.5581	1.2752	.75	1.00
Total	9	.7556	.17756	.05919	.6191	.8920	.50	1.00
total polifenol								
18 jar	3	.003933	.0003215	.001856	.003135	.004732	.0037	.0043
21 jar	3	.004533	.0001528	.000882	.004154	.004913	.0044	.0047
24 jar	3	.004333	.0001528	.000882	.003954	.004713	.0042	.0045
Total	9	.004267	.0003279	.001093	.004015	.004519	.0037	.0047
total asam								
18 jar	3	1.6400	.00000	.00000	1.6400	1.6400	1.64	1.64
21 jar	3	1.9067	.23094	.13333	1.3330	2.4804	1.64	2.04
24 jar	3	1.9067	.11547	.06667	1.6198	2.1935	1.84	2.04
Total	9	1.8178	.18559	.06186	1.6751	1.9604	1.64	2.04
pH								
18 jar	3	4.1433	.03786	.02186	4.0493	4.2374	4.10	4.17
21 jar	3	4.1633	.01155	.00667	4.1346	4.1920	4.15	4.17
24 jar	3	4.0500	.03464	.02000	3.9639	4.1361	4.03	4.09
Total	9	4.1189	.05862	.01954	4.0738	4.1639	4.03	4.17
kadar alkohol								
18 jar	3	.6500	.15588	.09000	.2628	1.0372	.47	.74
21 jar	3	.7400	.00000	.00000	.7400	.7400	.74	.74
24 jar	3	.4700	.00000	.00000	.4700	.4700	.47	.47
Total	9	.6200	.14230	.04743	.5106	.7294	.47	.74

### ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
aktifitas antibakterial	Between Groups	.151	2	.075	4.443	.065
	Within Groups	.102	6	.017		
	Total	.252	8			
total polifenol	Between Groups	.000	2	.000	5.600	.042
	Within Groups	.000	6	.000		
	Total	.000	8			
total asam	Between Groups	.142	2	.071	3.200	.113
	Within Groups	.133	6	.022		
	Total	.276	8			
pH	Between Groups	.022	2	.011	11.904	.008
	Within Groups	.006	6	.001		
	Total	.027	8			
kadar alkohol	Between Groups	.113	2	.057	7.000	.027
	Within Groups	.049	6	.008		
	Total	.162	8			

## Konsentrasi Glukosa 15%

### Post Hoc Tests

#### Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable (I)	lama fermentasi (J)	lama fermentasi (K)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
aktivitas antibiogram	18 jam	21 jam	.1500	.10628	.208	-.1101	.4101
		24 jam	-.1667	.10628	.168	-.4267	.0934
	21 jam	18 jam	-.1500	.10628	.208	-.4101	.1101
		24 jam	-.3167*	.10628	.025	-.5767	-.0566
	24 jam	18 jam	.1667	.10628	.168	-.0934	.4267
		21 jam	.3167*	.10628	.025	.0566	.5767
total polifenol	18 jam	21 jam	.000600*	.001826	.017	-.001047	-.000153
		24 jam	.000400	.001826	.071	-.000847	.000047
	21 jam	18 jam	.000600*	.001826	.017	.000153	.001047
		24 jam	.000200	.001826	.315	-.000247	.000647
	24 jam	18 jam	.000400	.001826	.071	-.000047	.000847
		21 jam	.000200	.001826	.315	-.000647	.000247
total asam	18 jam	21 jam	-.2667	.12172	.071	-.5645	.0312
		24 jam	-.2667	.12172	.071	-.5645	.0312
	21 jam	18 jam	.2667	.12172	.071	-.0312	.5645
		24 jam	.0000	.12172	1.000	-.2978	.2978
	24 jam	18 jam	.2667	.12172	.071	-.0312	.5645
		21 jam	.0000	.12172	1.000	-.2978	.2978
pH	18 jam	21 jam	-.0200	.02480	.451	-.0807	.0407
		24 jam	.0933*	.02480	.009	.0327	.1540
	21 jam	18 jam	.0200	.02480	.451	-.0407	.0807
		24 jam	.1133*	.02480	.004	.0527	.1740
	24 jam	18 jam	-.0933*	.02480	.009	-.1540	-.0327
		21 jam	-.1133*	.02480	.004	-.1740	-.0527
kadar alkohol	18 jam	21 jam	-.0900	.07348	.267	-.2698	.0898
		24 jam	.1800*	.07348	.050	.0002	.3598
	21 jam	18 jam	.0900	.07348	.267	-.0898	.2698
		24 jam	.2700*	.07348	.010	.0902	.4498
	24 jam	18 jam	-.1800*	.07348	.050	-.3598	-.0002
		21 jam	-.2700*	.07348	.010	-.4498	-.0902

\*.The mean difference is significant at the .05 level.



**AKTIVITAS ANTIBAKTERI****Between-Subjects Factors**

		Value Label	N
lama fermentasi	1	18 jam	9
	2	21 jam	9
	3	24 jam	9
Konsentrasi Glukosa	1	5 %	9
	2	10 %	9
	3	15 %	9

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: aktifitas antibakteri

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3.105 <sup>a</sup>	8	.388	22.903	.000
Intercept	15.038	1	15.038	887.481	.000
LAMAFERM	1.409	2	.705	41.579	.000
GLUKOSA	.335	2	.167	9.874	.001
LAMAFERM * GLUKOSA	1.361	4	.340	20.079	.000
Error	.305	18	.017		
Total	18.447	27			
Corrected Total	3.410	26			

a. R Squared = .911 (Adjusted R Squared = .871)

**POLIFENOL TOTAL****Between-Subjects Factors**

		Value Label	N
lama fermentasi	1	18 jam	9
	2	21 jam	9
	3	24 jam	9
Konsentrasi Glukosa	1	5 %	9
	2	10 %	9
	3	15 %	9

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: total polifenol

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6.807E-07 <sup>a</sup>	8	8.509E-08	1.166	.370
Intercept	.000	1	.000	6795.173	.000
LAMAFERM	2.874E-07	2	1.437E-07	1.970	.168
GLUKOSA	3.185E-08	2	1.593E-08	.218	.806
LAMAFERM * GLUKOS	3.615E-07	4	9.037E-08	1.239	.330
Error	1.313E-06	18	7.296E-08		
Total	.000	27			
Corrected Total	1.994E-06	26			

a. R Squared = .341 (Adjusted R Squared = .049)

## TOTAL ASAM

### Between-Subjects Factors

	Value Label	N
lama fermentasi	1 18 jam	9
	2 21 jam	9
	3 24 jam	9
Konsentrasi Glukosa	1 5 %	9
	2 10 %	9
	3 15 %	9

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: total asam

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.527 <sup>a</sup>	8	.066	4.450	.004
Intercept	89.945	1	89.945	6071.296	.000
LAMAFERM	.483	2	.241	16.300	.000
GLUKOSA	.021	2	.010	.700	.510
LAMAFERM * GLUKOS	.024	4	.006	.400	.806
Error	.267	18	.015		
Total	90.739	27			
Corrected Total	.794	26			

a. R Squared = .664 (Adjusted R Squared = .515)

## Post Hoc Tests

### Lama fermentasi

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: total asam

LSD

(I) lama fermentasi	(J) lama fermentasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
18 jam	21 jam	-.2444*	.05738	.000	-.3650	-.1239
	24 jam	-.3111*	.05738	.000	-.4317	-.1906
21 jam	18 jam	.2444*	.05738	.000	.1239	.3650
	24 jam	-.0667	.05738	.260	-.1872	.0539
24 jam	18 jam	.3111*	.05738	.000	.1906	.4317
	21 jam	.0667	.05738	.260	-.0539	.1872

Based on observed means.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

## pH

#### Between-Subjects Factors

		Value Label	N
lama fermentasi	1	18 jam	9
	2	21 jam	9
	3	24 jam	9
Konsentrasi Glukosa	1	5 %	9
	2	10 %	9
	3	15 %	9

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: pH

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.171 <sup>a</sup>	8	.021	6.117	.001
Intercept	452.231	1	452.231	129620.5	.000
LAMAFERM	.143	2	.071	20.428	.000
GLUKOSA	.017	2	.008	2.428	.117
LAMAFERM * GLUKOSA	.011	4	.003	.805	.538
Error	.063	18	.003		
Total	452.465	27			
Corrected Total	.234	26			

a. R Squared = .731 (Adjusted R Squared = .612)

### Post Hoc Tests

#### Lama fermentasi

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: pH

LSD

(I) lama fermentasi	(J) lama fermentasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
18 jam	21 jam	.0100	.02784	.724	-.0485	.0685
	24 jam	.1589*	.02784	.000	.1004	.2174
21 jam	18 jam	-.0100	.02784	.724	-.0685	.0485
	24 jam	.1489*	.02784	.000	.0904	.2074
24 jam	18 jam	-.1589*	.02784	.000	-.2174	-.1004
	21 jam	-.1489*	.02784	.000	-.2074	-.0904

Based on observed means.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

## KADAR ALKOHOL

### Between-Subjects Factors

		Value Label	N
lama fermentasi	1	18 jam	9
	2	21 jam	9
	3	24 jam	9
Konsentrasi Glukosa	1	5 %	9
	2	10 %	9
	3	15 %	9

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: kadar alkohol

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.368 <sup>a</sup>	8	.046	2.116	.089
Intercept	9.153	1	9.153	420.555	.000
LAMAFERM	.280	2	.140	6.444	.008
GLUKOSA	.050	2	.025	1.142	.341
LAMAFERM * GLUKOSA	.038	4	.010	.439	.779
Error	.392	18	.022		
Total	9.913	27			
Corrected Total	.760	26			

a. R Squared = .485 (Adjusted R Squared = .256)

## Post Hoc Tests

### Lama fermentasi

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: kadar alkohol

LSD

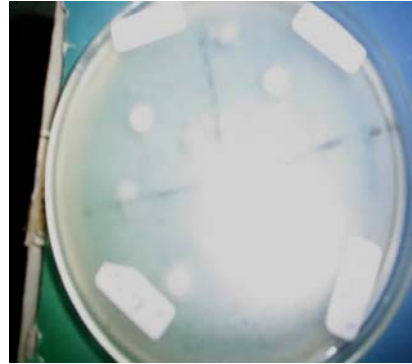
(I) lama fermentasi	(J) lama fermentasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
18 jam	21 jam	-.1567*	.06954	.037	-.3028	-.0106
	24 jam	.0900	.06954	.212	-.0561	.2361
21 jam	18 jam	.1567*	.06954	.037	.0106	.3028
	24 jam	.2467*	.06954	.002	.1006	.3928
24 jam	18 jam	-.0900	.06954	.212	-.2361	.0561
	21 jam	-.2467*	.06954	.002	-.3928	-.1006

Based on observed means.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

**Lampiran 4. Foto-foto Penelitian**

Kefir Susu Kacang Merah



Uji Aktivitas Antibakteri



Persiapan Uji Total Polifenol



Pembacaan Total Polifenol

