

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI IN VITRO DAN SIFAT  
KIMIA KEFIR SUSU KACANG HIJAU (*Vigna  
radiata*) OLEH PENGARUH JUMLAH  
STARTER DAN LAMA FERMENTASI**

***IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND CHEMICAL  
PROPERTIES OF MUNGBEAN MILK KEFIR (*Vigna radiata*)  
AS AFFECTED BY CULTURES CONCENTRATION AND  
FERMENTATION TIME***



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

**Magister Gizi Masyarakat**

**Wiwik Wijaningsih  
E4E 006 074**

**PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
AGUSTUS  
2008**

## **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

Wiwik Wijaningsih

## ABSTRAK

### AKTIVITAS ANTIBAKTERI IN VITRO DAN SIFAT KIMIA KEFIR SUSU KACANG HIJAU (*Vigna radiata*) OLEH PENGARUH JUMLAH STARTER DAN LAMA FERMENTASI

Wiwik Wijaningsih

Sebelum ini fermentasi susu kacang hijau menjadi kefir belum pernah dilakukan. Fermentasi susu kacang hijau menggunakan kultur bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan khamir *Candida kefir* dapat meningkatkan sifat fungsional kefir sebagai antibakteri. Aktivitas antibakteri kefir dipengaruhi oleh kondisi fermentasi seperti jumlah starter dan lama fermentasi. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh jumlah starter dan lama fermentasi terhadap aktivitas antibakteri dan sifat kimia (pH, total asam, kadar alkohol) kefir susu kacang hijau, menguji aktivitas antibakteri setelah melalui simulasi "gastric juice" dan membandingkannya dengan kefir susu sapi.

Disain penelitian ini adalah eksperimen murni pola faktorial dengan faktor satu adalah jumlah starter (5%, 10%, 15%) dan faktor dua adalah lama fermentasi (6 jam, 8 jam, 10 jam) dengan ulangan 3 kali. Variabel yang diukur adalah 1) aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar 2) aktivitas antibakteri setelah melalui simulasi *gastric juice* dan 3) sifat kimia yaitu pH dengan pHmeter, total asam dengan titrasi dan kadar alkohol dengan destilasi. Analisis data menggunakan Anova (*Analysis of variance*).

Hasil analisis aktivitas antibakteri berkisar antara 0,83 – 2,58 mm, nilai pH 4,07 – 4,40, total asam 1,43 – 1,71% dan kadar alkohol 0,534 – 1,076%. Aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau dipengaruhi oleh jumlah starter. Nilai pH dipengaruhi oleh jumlah starter dan lama fermentasi sedangkan kadar alkohol dipengaruhi hanya oleh lama fermentasi. Bila dibandingkan dengan kefir susu sapi, kefir susu kacang hijau memiliki aktivitas antibakteri lebih tinggi, nilai pH lebih rendah, total asam lebih rendah dan kadar alkohol lebih rendah. Aktivitas antibakteri sesudah melalui simulasi *gastric juice* dapat dipertahankan.

Dapat disimpulkan bahwa untuk pembuatan kefir susu kacang hijau, jumlah starter 10% menunjukkan aktivitas antibakteri paling tinggi sedangkan lama fermentasi dipilih waktu paling singkat yaitu 6 jam. Disarankan untuk dilakukan uji daya terima kefir susu kacang hijau dengan panelis konsumen untuk komersialisasi.

Kata Kunci : Kefir, Aktivitas Antibakteri, Simulasi *Gastric Juice*

## ABSTRACT

### **IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND CHEMICAL PROPERTIES OF MUNGBEAN MILK KEFIR (*Vigna radiata*) AS AFFECTED BY CULTURES CONCENTRATION AND FERMENTATION TIME**

**Wiwik Wijaningsih**

Until now fermentation of mungbean milk into kefir has not been conducted yet. Fermentation using *Lactobacillus bulgaricus* and *Candida kefir* cultures can improve the functional properties as antibacteria. Antibacterial activity of kefir is affected by fermentation condition i.e cultures concentration and fermentation time. This experiment was implemented to study the effect of cultures concentration and fermentation time on antibacterial activity and chemical properties ( pH, total acid, alcohol level) of mungbean milk kefir, and also to assess the antibacterial activity after passing "gastric juice simulation" as compared to milk kefir.

A complete random design with 2x3 factorial was used in this experiment. The first factor was cultures concentration (5%, 10%, 15%), and the second factor was fermentation time (6 , 8 , 10 hours). Antibacterial activity was measured by diffusion agar method, pH by pH metre, total acid by titration and alcohol level by distillation. All data were analysed using analysis of variance (ANOVA).

Antibacterial activity test showed inhibition zone of 0.83 to 2.58 mm, pH value of 4.07 to 4.40, total acid of 1.43 to 1.71% dan alcohol level of 0.534 to 1.076%. Antibacterial activity of mungbean milk kefir is affected by cultures concentration, pH is affected by cultures concentration and fermentation time, while alcohol level is affected only by fermentation time. Mungbean milk kefir has higher level of antibacterial activity, lower pH, lower total acid and lower alcohol compared to milk kefir. Antibacterial activity can be maintained after simulation of gastric juice.

Base on the above results an optimal production of mungbean milk kefir with highest antibacterial activity can be achieved using 10% of cultures concentration and 6 hours of fermentation time. Further studies to evaluate the acceptance of this mungbean milk kefir for commercialisation are recommended.

Keywords: kefir, antibacterial activity, gastric juice simulation.

## RINGKASAN

### AKTIVITAS ANTIBAKTERI IN VITRO DAN SIFAT KIMIA KEFIR SUSU KACANG HIJAU (*Vigna radiata*) OLEH PENGARUH JUMLAH STARTER DAN LAMA FERMENTASI

Saat ini telah terjadi pergeseran filosofi makan. Tujuan makan tidak hanya sekedar mengenyangkan perut, tetapi lebih utama untuk mencapai tingkat kesehatan dan kebugaran yang optimal. Bahan pangan tidak hanya bermanfaat sebagai sumber zat kimiawi bergizi tetapi kandungan zat kimiawi non-gizinya pun sangat strategis dalam menjaga kesehatan dan kebugaran tubuh manusia. Peran komponen-komponen bioaktif ini bagi kesehatan tubuh manusia mendapat banyak sorotan ahli pangan dunia dalam dua dasa-warsa terakhir ini terutama sejak para pakar Jepang meluncurkan konsep yang aslinya dikenal sebagai Food for Specified Health Use (FOSHU) dan saat ini dikenal dengan sebutan 'Pangan Fungsional' (*functional foods*) (Anonim, 2007).

Kefir adalah produk yang dihasilkan dari fermentasi susu sapi yang telah dipasteurisasi menggunakan starter berupa butir atau biji kefir (*kefir grain/kefir granule*), yaitu butiran-butiran putih atau krem dari kumpulan bakteri asam laktat seperti *Lactobacilli*, *Streptococcus* sp dan beberapa jenis ragi/ khamir nonpatogen (Usmiati, 2007). Produk fermentasi tradisional berbeda antara daerah satu dengan lainnya. Hal ini tergantung pada sumber mikroba yang mencerminkan kondisi iklim daerah. Fermentasi susu tradisional suatu daerah dengan iklim suhu dingin mengandung bakteri mesofil seperti *Lactococcus* dan *Leuconostoc spp*,

sedang bakteri termofil seperti *Lactobacillus* dan *Streptococcus* terdapat pada daerah yang panas, subtropis atau tropis (Savadoغو *et al.*, 2004)

Pembuatan kefir dengan bahan baku susu kacang hijau belum banyak dilakukan. Sifat-sifat fungsional dipengaruhi oleh kondisi fermentasi seperti jumlah starter dan lama fermentasi. Menurut Rahman *et al.*, (1992) pembuatan kultur induk yoghurt diinkubasi pada suhu 40 – 45°C, yaitu untuk mempertahankan perbandingan yang tepat antara kedua bakteri. Suhu optimum untuk pertumbuhan *S.thermophilus* adalah 40°C sedangkan *L.bulgaricus* membutuhkan suhu yang lebih tinggi dan waktu inkubasi yang lebih lama. Lamanya waktu inkubasi tergantung dari jumlah inokulum dan aktivitas kultur. Dengan jumlah kultur sebanyak 1% dibutuhkan waktu inkubasi selama 4-5 jam. Sehingga perlu diteliti berapa jumlah starter yang ditambahkan dan lama fermentasi yang diperlukan agar dapat menghasilkan kefir dengan sifat fungsional (antibakteri) dan sifat kimia yang optimal.

Aktivitas antibakteri dipengaruhi oleh asam termasuk keasaman didalam saluran pencernaan, sehingga perlu diteliti apakah aktivitas antibakteri kefir kacang hijau masih optimal setelah melewati saluran pencernaan. Penentuan aktivitas antibakteri *in vivo* menggunakan makhluk hidup sebagai obyek percobaan memakan waktu cukup lama dan membutuhkan biaya yang tinggi. Metode yang lebih praktis adalah metode *in vitro* dimana pengujian dilakukan dengan menggunakan enzim-enzim pencernaan dengan kondisi yang dibuat mirip dengan yang

sesungguhnya terjadi dalam pencernaan tubuh manusia. Metode *in vitro* ini selanjutnya disebut simulasi *gastric juice* (Zakaria *et al.*, 1997). Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh jumlah starter dan lama fermentasi terhadap aktivitas antibakteri dan sifat kimia kefir susu kacang hijau, menguji aktivitas antibakteri setelah melalui simulasi "*gastric juice*" dan membandingkannya dengan kefir susu sapi.

Fermentasi dapat terjadi karena adanya aktivitas mikroba penyebab fermentasi pada substrat organik yang sesuai. Terjadinya fermentasi ini dapat menyebabkan perubahan sifat bahan pangan sebagai akibat dari pemecahan kandungan-kandungan bahan pangan (Winarno *et al.*, 1980). Pada umumnya cara-cara pengawetan pangan ditujukan untuk menghambat atau membunuh mikroba. Sebaliknya fermentasi adalah suatu cara pengawetan yang mempergunakan mikroba tertentu untuk menghasilkan asam atau komponen lainnya yang dapat menghambat mikroba perusak lainnya (Muchtadi, 1989).

Susu dapat difermentasi secara spesifik menghasilkan produk-produk misalnya kefir dan koumiss dengan sifat fermentasi asam dan alkohol, bulgarian (asam tinggi), acidophilus dan yogurt (asam sedang), cultured buttermilk dan cultured cream (asam rendah). Produk-produk tersebut mempunyai cita rasa yang spesifik tergantung dari kultur yang digunakan. Kefir diperoleh melalui proses fermentasi susu pasteurisasi menggunakan starter berupa butir atau biji kefir (*kefir grain/kefir granule*), yaitu butiran-butiran putih atau krem dari kumpulan bakteri, antara lain

*Streptococcus* sp., *Lactobacilli* dan beberapa jenis ragi/khamir nonpatogen. Komponen antimikroba adalah suatu komponen yang bersifat dapat menghambat pertumbuhan bakteri atau kapang (bakteristatik atau fungistatik) atau membunuh bakteri atau kapang (bakterisidal atau fungisidal).

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen di bidang Teknologi Pangan, dilakukan di laboratorium Kimia dan Mikrobiologi Pangan Jurusan Gizi Poltekes Semarang dan laboratorium Biokimia Nutrisi Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak Fakultas Peternakan UNDIP Semarang pada bulan Oktober 2007 sampai dengan Agustus 2008. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap pola Faktorial 2 x 3 dengan faktor 1 adalah jumlah starter dan faktor 2 adalah lama fermentasi. Variabel pengaruh adalah jumlah starter (5%, 10% dan 15%) dan lama fermentasi (6 jam, 8 jam dan 10 jam). Variabel terpengaruh adalah aktivitas antibakteri dan sifat kimia (pH, total asam dan kadar alkohol). Perlakuan diulang tiga kali dan analisis dilakukan secara duplo. Materi yang digunakan adalah kacang hijau, air, susu sapi segar, kultur murni dari bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan khamir *Candida kefir*.

Pelaksanaan penelitian ini terdiri dari tiga tahap yaitu tahap I penelitian pendahuluan, tahap II meliputi pembuatan susu kacang hijau, pembuatan starter, pembuatan kefir susu kacang hijau (dengan variasi jumlah starter dan lama fermentasi) dan pembuatan kefir susu sapi sebagai pembanding. Analisis sampel (kefir) meliputi analisis Mikrobiologi

yaitu aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar dan analisis Kimia yaitu pH, total asam dan kadar alkohol. Penelitian tahap III adalah memilih sampel kefir yang memiliki aktivitas antibakteri paling efektif yaitu sampel yang memiliki diameter zona bening paling lebar dan sampel kefir yang tidak berbeda dengan sampel yang paling efektif dari hasil analisis statistik. Sampel terpilih diuji lebih lanjut aktivitas antibakterinya sesudah melalui simulasi "*gastric juice*".

Metode yang digunakan untuk pengukuran parameter adalah penghitungan Total Bakteri dengan Metode Hitungan Cawan, pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar (Fardiaz, 1987), Simulasi "gastric juice" (Aura, 2005 dan Anna et al, 2007), Pengukuran pH (Sudarmadji, 1989), Pengukuran Total Asam (Asam Laktat) (Ranggana, 1997), Pengukuran Kadar Alkohol (James, 1995). Analisis data aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau, pH, total asam dan kadar alkohol diuji secara statistik dengan ANOVA (*Analysis of Variance*) dua faktor. Bila p value <0.05 maka  $H_0$  ditolak dan  $H_1$  diterima. Jika ada pengaruh dilakukan uji lanjut dengan Tukey. Analisis data aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau sebelum dan sesudah melalui simulasi "gastric juice" diuji secara statistik dengan t-test.

Aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau hasil penelitian dengan variasi jumlah starter 5%, 10%, 15% dan lama fermentasi 6 jam, 8 jam, 10 jam adalah 0,83 – 2, 58 mm dan aktivitas antibakteri kefir susu sapi 2,0 mm. Jumlah starter berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap

aktivitas antibakteri dan uji lanjut Tukey menunjukkan jumlah starter 5% berbeda nyata dengan 10% dan 15%. Lama fermentasi dan interaksi jumlah starter dan lama fermentasi tidak berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri.

Jumlah starter dan lama fermentasi berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap nilai pH dan uji lanjut Tukey menunjukkan jumlah starter 5% tidak berbeda nyata dengan 15%, tetapi 5% dan 15% berbeda nyata dengan 10%. Lama fermentasi 6 jam berbeda nyata dengan 8 jam dan 10 jam. Interaksi jumlah starter dan lama fermentasi tidak berpengaruh terhadap nilai pH.

Jumlah starter, lama fermentasi dan interaksi jumlah starter dan lama fermentasi tidak berpengaruh terhadap total asam. Jumlah starter tidak berpengaruh terhadap kadar alkohol. Lama fermentasi berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kadar alkohol dan uji lanjut Tukey menunjukkan lama fermentasi 6 jam berbeda nyata dengan 8 jam dan 10 jam. Sedangkan interaksi jumlah starter dan lama fermentasi tidak berpengaruh terhadap kadar alkohol.

Jumlah starter tidak berpengaruh terhadap kadar alkohol. Lama fermentasi berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kadar alkohol dan uji lanjut Tukey menunjukkan lama fermentasi 6 jam berbeda nyata dengan 8 jam dan 10 jam. Sedangkan interaksi jumlah starter dan lama fermentasi tidak berpengaruh terhadap kadar alkohol. Aktivitas antibakteri sebelum dan sesudah melalui *gastric juice* menunjukkan adanya penurunan tetapi

tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) baik pada *Escherichia coli* maupun *Staphylococcus aureus*. Kefir susu kacang hijau dibandingkan dengan kefir susu sapi pada perlakuan sama diperoleh hasil sebagai berikut aktivitas antibakteri lebih tinggi kefir susu kacang hijau, nilai pH lebih rendah kefir susu kacang hijau, total asam lebih tinggi kefir susu sapi dan kadar alkohol lebih tinggi kefir susu sapi.

Simpulan dari penelitian ini adalah aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau berkisar antara 0,83 – 2,58 mm, nilai pH 4,07 – 4,40, total asam 1,43 – 1,71% dan kadar alkohol 0,534 – 1,076%. Aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau dipengaruhi oleh jumlah starter (5%, 10% dan 15%) tetapi tidak dipengaruhi lama fermentasi (6 jam, 8 jam dan 10 jam) dan interaksi jumlah starter dan lama fermentasi. Aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* paling tinggi pada perlakuan jumlah starter 10% lama fermentasi 8 jam yaitu sebesar 2,58 mm.

Aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau masih bisa dipertahankan setelah melalui simulasi *gastric juice* dan jika dibandingkan dengan susu sapi aktivitas antibakteri lebih tinggi, nilai pH lebih rendah, total asam lebih rendah dan kadar alkohol lebih rendah.

Jumlah starter berpengaruh terhadap nilai pH sedangkan lama fermentasi berpengaruh terhadap nilai pH dan kadar alkohol. Nilai pH paling rendah pada perlakuan jumlah starter 10%, lama fermentasi 10 jam yaitu 4,07 sedangkan kadar alkohol terendah pada perlakuan jumlah starter 15% dan lama fermentasi 6 jam yaitu 0,534%.

Sifat fungsional aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau dipengaruhi oleh jumlah starter tetapi lama fermentasi tidak berpengaruh sehingga untuk pembuatan kefir susu kacang hijau dipilih jumlah starter yang menunjukkan aktivitas antibakteri paling tinggi yaitu jumlah starter 10% sedangkan lama fermentasi dipilih waktu yang paling singkat yaitu lama fermentasi 6 jam.

Disarankan perlu dilakukan penelitian uji daya terima kefir susu kacang hijau untuk komersialisasi dengan panelis konsumen.

## MOTO DAN PERSEMBAHAN

**“Setiap ilmu pasti ada permulaannya, tetapi sama sekali tidak ada pengakhirannya. Kita harus menyadari dan mengakui bahwa apa yang kita ketahui dari ilmu-ilmu itu jauh lebih sedikit daripada yang tidak diketahui” (Ulama)**

**“Ilmu bisa menyangga rumah yang tidak memiliki penyangga, sedangkan kebodohan mampu meruntuhkan rumah kemuliaan dan keluhuran” (Syair)**

*Kupersembahkan Hasil Karyaku teruntuk :*

*Ibunda, suami dan ananda tercinta Citra dan Izza*

## DAFTAR RIWAYAT HIDUP

### A. Identitas

Nama : Wiwik Wijaningsih, STP  
Tempat, tanggal lahir : Pekalongan, 2 Desember 1964  
Jenis Kelamin : Perempuan  
Agama : Islam

**B. Riwayat Pendidikan** : SDN Sapuro II Pekalongan Tahun 1971 - 1976  
SMPN I Pekalongan Tahun 1976 – 1980  
SMAN Pekalongan Tahun 1980 – 1983  
SPAG Pekalongan Tahun 1983 – 1984  
Akademi Gizi Yogyakarta Tahun 1989 – 1992  
Fakultas Teknologi Pertanian Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi IPB Bogor Tahun 1997 – 1999  
Program Studi Gizi Masyarakat Pascasarjana UNDIP Semarang Tahun 2006 - 2008

**C. Riwayat Pekerjaan** : Staf Pengajar SPAG Pekalongan Tahun 1984 - 1991  
Staf Pengajar Akademi Gizi Depkes Semarang Tahun 1991 – 2001  
Dosen Jurusan Gizi Poltekes Semarang Tahun 2001 - sekarang

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan Rahmat dan Hidayahnya sehingga penulis telah menyelesaikan tugas penulisan tesis yang berjudul " AKTIVITAS ANTIBAKTERI *IN VITRO* DAN SIFAT KIMIA KEFIR SUSU KACANG HIJAU (*Vigna radiata*) OLEH PENGARUH JUMLAH STARTER DAN LAMA FERMENTASI untuk memenuhi persyaratan S-2 Program Studi Magister Gizi Masyarakat Universitas Diponegoro. Penelitian ini adalah salah satu upaya untuk memanfaatkan potensi sumber hayati Nusantara yang tersedia menjadi pangan fungsional untuk membantu meningkatkan derajat kesehatan masyarakat.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan tesis ini, terima kasih kepada:

1. Prof.dr.S.Fatimah Muis, MSc,Sp.GK selaku Ketua Program Studi Magister Gizi Masyarakat Pasca Sarjana Universitas Diponegoro Semarang
2. Ir. Retno Murwani, MSc.MAppSc.PhD selaku pembimbing I atas ilmu dan bimbingannya.
3. Ir. Sri Hetty Susetyorini, MKes selaku pembimbing II atas ilmu dan bimbingannya.

4. Dosen-dosen di Program Studi Magister Gizi Masyarakat Universitas Diponegoro atas ilmu dan bimbingan selama penulis menjalani pendidikan.
5. Mas Teguh Supriyono dan Mbak Uun Kunaepah teman satu team penelitian atas kerjasama dan bantuannya.
6. Suami tercinta Mas Bambang Supangkat dan anak-anakku tersayang Citra Adityadewi dan Izzati Ishamina yang telah memberikan dorongan dan semangat serta pengorbanan dan doanya.
7. Staf Prodi Mbak Fifi, Mbak Kris, Mas Sam dan Mas Hary atas bantuannya selama penulis menjalani pendidikan.
8. Rekan-rekan S2 Angkatan 2006 : Mbak Ayi, Pak Ichsan, Pak Djuli, Mbak Ita, Mbak Dewi F, Mbak Dyah U, Mbak Diah K, P Bayu, Mbak Shila, Mbak Eny, Mbak Wahyu dan Mbak Dewi atas kerjasama sebagai teman baik suka maupun duka.
9. Mbak Surati, Bu Yatin dan Mas Umar yang telah membantu selama penelitian di Laboratorium.
10. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Semarang, Agustus 2008

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN TESIS .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN PENGUJI .....	iii
HALAMAN PERNYATAAN .....	iv
ABSTRAK/ ABSTRACT .....	v
RINGKASAN .....	vii
HALAMAN MOTTO DAN PERSEMBAHAN .....	xv
DAFTAR RIWAYAT HIDUP .....	xvi
KATA PENGANTAR .....	xvii
DAFTAR ISI .....	xix
DAFTAR TABEL .....	xxii
DAFTAR GAMBAR .....	xxiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xxiv
BAB I      PENDAHULUAN .....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Perumusan Masalah .....	4
C. Tujuan Penelitian .....	5
D. Manfaat Penelitian .....	6
E. Keaslian Penelitian .....	6

BAB II	TINJAUAN PUSTAKA .....	8
	A. Fermentasi .....	8
	B. Susu Fermentasi .....	14
	C. Kefir .....	21
	1. Pengertian .....	21
	2. Nilai Gizi dan Khasiat .....	23
	3. Proses Pembuatan .....	24
	D. Kacang Hijau .....	26
	1. Senyawa Bioaktif dan Sifat Fungsional .....	27
	2. Susu Kacang Hijau .....	28
	E. Aktivitas Antibakteri .....	29
	F. Simulasi Gastric Juice .....	35
	G. Kerangka Teori .....	38
	H. Kerangka Konsep .....	39
	I. Hipotesis .....	40
BAB III	METODE PENELITIAN .....	41
	A. Ruang Lingkup Penelitian .....	41
	B. Tempat dan Waktu Penelitian .....	41
	C. Rancangan Penelitian .....	42
	D. Tahapan Penelitian .....	44
	E. Bahan dan Alat.....	48
	F. Prosedur .....	50
	G. Analisis Data .....	57

	H. Definisi Operasional .....	58
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN .....	60
	A. Kefir Susu Sapi .....	60
	B. Aktivitas Antibakteri .....	61
	C. Aktivitas Antibakteri Kefir Susu Kacang Hijau setelah melalui Simulasi Gastric Juice .....	67
	D. Nilai pH .....	71
	E. Total Asam .....	76
	F. Kadar Alkohol .....	78
	G. Rekapitulasi Hasil .....	82
BAB V	SIMPULAN DAN SARAN .....	86
	DAFTAR PUSTAKA .....	88
	LAMPIRAN .....	94

**DAFTAR TABEL**

Nomor	Halaman
1. Beberapa penelitian susu fermentasi .....	7
2. Komposisi Gizi Kacang Hijau .....	28
3. Rancangan Percobaan .....	43
4. Hasil Analisis Kefir Susu Sapi .....	60
5. Hasil Analisis Keragaman Aktivitas Antibakteri .....	63
6. Hasil Uji Tukey Aktivitas Antibakteri .....	64
7. Hasil Analisis uji beda Aktivitas antibakteri sebelum dan sesudah melalui gastric juice .....	68
8. Hasil Analisis Keragaman nilai pH .....	73
9. Hasil Uji Lanjut Tukey nilai pH untuk jumlah starter .....	73
10. Hasil Uji Lanjut Tukey nilai pH untuk lama fermentasi .....	74
11. Hasil Analisis Keragaman Total asam .....	77
12. Hasil Analisis Keragaman Kadar Alkohol .....	80
13. Hasil Uji Tukey Kadar Alkohol untuk lama fermentasi .....	80
14. Rekapitulasi Hasil Penelitian .....	82

**DAFTAR GAMBAR**

Nomor	Halaman
1. Kurva Pertumbuhan Kultur Mikroba .....	10
2. Hubungan Antara Jumlah Asam Dan Pertumbuhan Mikroba susu .....	12
3. Jalur EMP .....	18
4. Bagar Alur Pelaksanaan Penelitian .....	47
5. Aktivitas Antibakteri Kefir Susu Kacang Hijau Dengan Variasi Jumlah Starter Dan Lama Fermentasi .....	61
6. Aktivitas Antibakteri Kefir Susu Kacang Hijau dengan <i>E.coli</i> ....	67
7. Aktivitas Antibakteri Kefir Susu Kacang Hijau dengan <i>S.aureus</i> .....	68
8. Nilai pH Kefir Dengan Variasi Jumlah Starter Dan Lama Fermentasi .....	72
9. Total Asam Kefir Susu Kacang Hijau Dengan Variasi Jumlah Starter Dan Lama Fermentasi .....	77
10.Kadar Alkohol Kefir Susu Kacang Hijau Dengan Variasi Jumlah Starter Dan Lama Fermentasi .....	79

**DAFTAR LAMPIRAN**

Nomor	Halaman
1. Tabel Specific Gravity Ethanol .....	94
2. SNI Yoghurt .....	95
3. Hasil Anova Antibakteri .....	96
4. Hasil Anova pH .....	99
5. Hasil Anova Total Asam .....	102
6. Hasil Anova Kadar Alkohol .....	105
7. Hasil Analisis Uji t .....	108
8. Foto Kegiatan Penelitian .....	109

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

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

Saat ini telah terjadi pergeseran filosofi makan. Tujuan makan tidak hanya sekedar mengenyangkan perut, tetapi lebih utama untuk mencapai tingkat kesehatan dan kebugaran yang optimal. Bahan pangan tidak hanya bermanfaat sebagai sumber zat kimiawi bergizi tetapi kandungan zat kimiawi non-gizinya pun sangat strategis dalam menjaga kesehatan dan kebugaran tubuh manusia. Peran komponen-komponen bioaktif ini bagi kesehatan tubuh manusia mendapat banyak sorotan ahli pangan dunia dalam dua dasa-warsa terakhir ini terutama sejak para pakar Jepang meluncurkan konsep yang aslinya dikenal sebagai *Food for Specified Health Use* (FOSHU) dan saat ini dikenal dengan sebutan "Pangan Fungsional" (*functional foods*) (Anonim a, 2007).

Salah satu produk pangan fungsional yang sedang populer di masyarakat adalah susu fermentasi, terutama yoghurt. Hal tersebut terkait dengan bukti ilmiah bahwa susu fermentasi dipercaya mengandung nutrisi yang baik serta memiliki khasiat terhadap kesehatan manusia, terutama bagi saluran pencernaan. Bakteri probiotik dalam susu fermentasi telah terbukti secara klinis dapat menyehatkan saluran pencernaan manusia. Bakteri probiotik sendiri berarti suplemen mikroba hidup yang memberikan efek positif terhadap manusia dan hewan dengan memperbaiki

keseimbangan mikroorganismenya usus. Habitat asli bakteri probiotik yaitu usus manusia maupun hewan. Umumnya bakteri tersebut merupakan bakteri asam laktat (Sari, 2007). Kultur bakteri asam laktat (BAL) dipakai sebagai inokulan untuk memproduksi probiotik komersial dalam bentuk minuman seperti kefir, yoghurt, yakult dan lain-lain.

Kefir adalah produk yang dihasilkan dari fermentasi susu sapi yang telah dipasteurisasi menggunakan starter berupa butir atau biji kefir (*kefir grain/kefir granule*), yaitu butiran-butiran putih atau krem dari kumpulan bakteri asam laktat seperti *Lactobacilli*, *Streptococcus* sp dan beberapa jenis ragi/ khamir nonpatogen (Usmiati, 2007). Produk fermentasi tradisional berbeda antara daerah satu dengan lainnya. Hal ini tergantung pada sumber mikroba yang mencerminkan kondisi iklim daerah. Fermentasi susu tradisional suatu daerah dengan iklim suhu dingin mengandung bakteri mesofil seperti *Lactococcus* dan *Leuconostoc spp*, sedang bakteri termofil seperti *Lactobacillus* dan *Streptococcus* terdapat pada daerah yang panas, subtropis atau tropis (Savadogo, *et al*, 2004)

Disamping susu sapi sebagai bahan dasar pembuatan susu fermentasi dibuat juga dari susu nabati. Susu kedelai merupakan susu nabati yang sangat umum ditemukan dipasaran, sementara susu dari kacang - kacangan yang lain belum banyak ditemukan. Kacang hijau merupakan sumber energi, protein, vitamin, mineral dan serat makanan yang baik. Konsumsi kacang-kacangan sebagai sumber protein selalu dihadapkan pada masalah kandungan inhibitor protease, lektin, gossipol,

fitat yang merupakan senyawa antigizi yang umum pada hampir semua kacang-kacangan. Meskipun demikian khusus kacang hijau antigizinya paling rendah.

Pengolahan susu kacang hijau menjadi kefir diharapkan menjadi salah satu alternatif minuman kesehatan yang perlu tersedia di pasaran dan dapat menjadi pilihan minuman kesehatan bagi masyarakat. Pembuatan kefir dengan bahan baku susu kacang hijau belum banyak dilakukan. Sifat-sifat fungsional dipengaruhi oleh kondisi fermentasi seperti jumlah starter dan lama fermentasi. Menurut Rahman *et al.*, (1992) pembuatan kultur induk yoghurt diinkubasi pada suhu 40 – 45°C, yaitu untuk mempertahankan perbandingan yang tepat antara kedua bakteri. Suhu optimum untuk pertumbuhan *S.thermophilus* adalah 40°C sedangkan *L.bulgaricus* membutuhkan suhu yang lebih tinggi dan waktu inkubasi yang lebih lama. Lamanya waktu inkubasi tergantung dari jumlah inokulum dan aktivitas kultur. Dengan jumlah kultur sebanyak 1% dibutuhkan waktu inkubasi selama 4-5 jam. Sehingga perlu diteliti berapa jumlah starter yang ditambahkan dan lama fermentasi yang diperlukan agar dapat menghasilkan kefir dengan sifat fungsional (antibakteri) dan sifat kimia yang optimal.

Aktivitas antibakteri dipengaruhi oleh asam termasuk keasaman didalam saluran pencernaan, sehingga perlu diteliti apakah aktivitas antibakteri kefir kacang hijau masih optimal setelah melewati saluran pencernaan. Penentuan aktivitas antibakteri *in vivo* menggunakan

mahluk hidup sebagai obyek percobaan memakan waktu cukup lama dan membutuhkan biaya yang tinggi. Metode yang lebih praktis adalah metode *in vitro* dimana pengujian dilakukan dengan menggunakan enzim-enzim pencernaan dengan kondisi yang dibuat mirip dengan yang sesungguhnya terjadi dalam pencernaan tubuh manusia. Metode *in vitro* ini selanjutnya disebut simulasi *gastric juice* (Zakaria *et al.*, 1997).

## **B. Perumusan Masalah**

Kefir susu sapi dan kefir dari kacang-kacangan salah satunya adalah susu kacang kedelai sudah banyak dilakukan penelitian dan terbukti berkhasiat untuk mengatasi berbagai masalah kesehatan. Kacang hijau dibuat kefir belum banyak diteliti sehingga perlu dilakukan penelitian untuk melihat faktor-faktor yang berpengaruh antara lain jumlah starter dan lama fermentasi.

Berdasarkan hal tersebut dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut :

1. Apakah ada pengaruh jumlah starter dan lama fermentasi terhadap aktivitas antibakteri dan sifat kimia kefir susu kacang hijau.
2. Apakah ada perubahan aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau setelah melalui simulasi *gastric juice*.
3. Apakah kefir susu kacang hijau mempunyai aktivitas antibakteri dan sifat kimia yang sama dengan kefir susu sapi .

## **C. Tujuan Penelitian**

### **1. Tujuan Umum**

Mengetahui pengaruh jumlah starter dan lama fermentasi terhadap aktivitas antibakteri dan sifat kimia kefir susu kacang hijau, menguji aktivitas antibakteri setelah melalui simulasi *gastric juice* dan membandingkannya dengan kefir susu sapi.

### **2. Tujuan Khusus**

- a. Mendeskripsikan aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau dengan diameter zona bening.
- b. Menganalisis pengaruh jumlah starter dan lama fermentasi terhadap aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau dengan diameter zona bening .
- c. Menganalisis pengaruh jumlah starter dan lama fermentasi terhadap sifat kimia (pH, total asam dan kadar alkohol) kefir susu kacang hijau.
- d. Membandingkan aktivitas antibakteri dan sifat kimia kefir susu kacang hijau dengan kefir susu sapi.
- e. Mendeskripsikan aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau dengan diameter zona bening sebelum dan sesudah melalui simulasi *gastric juice*.

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

Penelitian ini diharapkan dapat membuktikan dan memberikan informasi secara ilmiah tentang khasiat kefir susu kacang hijau sebagai bahan pangan fungsional dan peran fungsional kefir susu kacang hijau tersebut khususnya aktivitas antibakterinya.

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

Telah banyak penelitian yang dilakukan mengenai susu fermentasi dan pemanfaatannya. Namun dari beberapa penelitian tersebut belum ada penelitian tentang pembuatan dan manfaat kefir dari susu kacang hijau. Pada Tabel 1 dapat dilihat beberapa penelitian tentang susu fermentasi yang dilakukan sebelumnya.

Tabel 1. Beberapa Penelitian Susu Fermentasi

No.	Susu Fermentasi	Perlakuan	Desain	Subyek	Hasil	Pustaka
1	Yogurt susu sapi	Pemberian <i>Lactobacillus gasseri</i> CECT 5714, <i>L. coryniformis</i> CECT 5711,	<i>Experimental randomized double blind placebo controlled</i>	30 orang sehat dewasa	Probiotik berpengaruh pada peningkatan produksi asam lemak rantai pendek usia dewasa	Olivares. 2006
2	Kefir susu sapi	Pemberian kefir < 2%	Experimental	Hewan tikus	Meningkatkan respon immune dengan pemberian toksin kholera	Karine, Douglas, 2001
3	Kefir susu sapi	Pemberian Kefir	Experimental	Hewan tikus	Mencegah kanker, meningkatkan resistensi mukosa thd infeksi gastrointestinal dengan merusak sel tumor apoptotic	Liu. 2002
4	Susu nabati (kacang hijau, kacang merah, kacang tanah, kacang tunggak, kacang kedelai)	Pemberian Bakteri Asam Laktat (BAL) dalam Pembuatan Produk Fermentasi Berbasis Protein/ Susu Nabati	Experimental	Susu nabati	BAL paling efektif secara berurutan pada susu kacang hijau, merah, tanah, tunggak, kedelai	Widowati dan Masgiyarta. 2007

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Fermentasi

Fermentasi dapat terjadi karena adanya aktivitas mikroba penyebab fermentasi pada substrat organik yang sesuai. Terjadinya fermentasi ini dapat menyebabkan perubahan sifat bahan pangan sebagai akibat dari pemecahan kandungan-kandungan bahan pangan (Winarno *et al.*, 1980). Pada umumnya cara-cara pengawetan pangan ditujukan untuk menghambat atau membunuh mikroba. Sebaliknya fermentasi adalah suatu cara pengawetan yang mempergunakan mikroba tertentu untuk menghasilkan asam atau komponen lainnya yang dapat menghambat mikroba perusak lainnya. Fermentasi secara teknik dapat didefinisikan sebagai suatu proses oksidasi anaerob atau *partial anaerobic* dari karbohidrat dan menghasilkan alkohol serta beberapa asam. Namun banyak proses fermentasi yang menggunakan substrat protein dan lemak (Muchtadi, 1989).

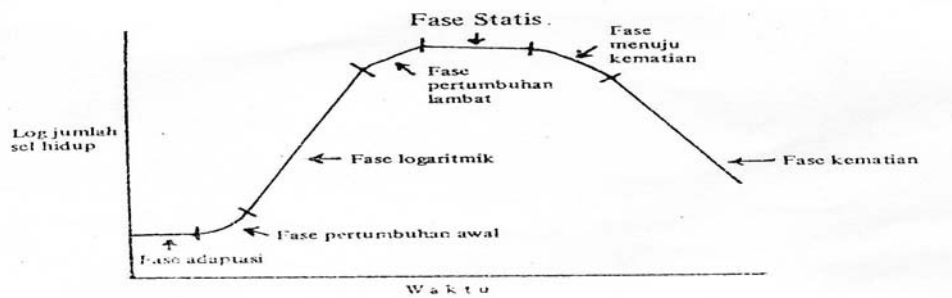
Hasil dari fermentasi terutama tergantung pada berbagai faktor yaitu jenis bahan pangan (substrat), macam mikroba dan kondisi di sekelilingnya yang mempengaruhi pertumbuhan dan metabolisme mikroba tersebut. Mikroba yang bersifat fermentatif dapat mengubah karbohidrat dan turunan-turunannya terutama menjadi alkohol, asam dan CO<sub>2</sub>. Mikroba proteolitik dapat memecah protein dan komponen-komponen

nitrogen lainnya sehingga menghasilkan bau busuk yang tidak diinginkan sedangkan mikroba lipolitik akan memecah atau menghidrolisa lemak, fosfolipida dan turunannya dengan menghasilkan bau yang tengik (Winarno *et al.*, 1980). Bila alkohol dan asam yang dihasilkan oleh mikroba fermentatif cukup tinggi maka pertumbuhan mikroba proteolitik dan lipolitik dapat dihambat. Prinsip fermentasi sebenarnya adalah mengaktifkan pertumbuhan dan metabolisme dari mikroba pembentuk alkohol dan asam, dan menekan pertumbuhan mikroba proteolitik dan lipolitik. Faktor- faktor yang mempengaruhi fermentasi yaitu jumlah mikroba, lama fermentasi, pH (keasaman), substrat (medium), suhu, alkohol, oksigen, garam dan air.

#### A. Mikroba

Fermentasi dilakukan dengan menggunakan kultur murni atau starter. Banyaknya mikroba (starter/inokulum) yang ditambahkan berkisar antara 3–10 % dari volume medium fermentasi. Penggunaan inokulum yang bervariasi ini dapat menyebabkan proses fermentasi dan mutu produk selalu berubah-ubah. Inokulum adalah kultur mikroba yang diinokulasikan ke dalam medium fermentasi pada saat kultur mikroba tersebut berada pada fase pertumbuhan eksponensial. Kriteria untuk kultur mikroba agar dapat digunakan sebagai inokulum dalam proses fermentasi adalah (a) sehat dan berada dalam keadaan aktif sehingga dapat mempersingkat fase adaptasi (b) tersedia cukup sehingga dapat

menghasilkan inokulum dalam takaran yang optimum (c) berada dalam bentuk morfologi yang sesuai (d) bebas kontaminasi (e) dapat mempertahankan kemampuannya membentuk produk (Rachman,1989). Menurut Fardiaz (1988), pertumbuhan mikroba di dalam suatu kultur mempunyai kurva seperti terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan kultur mikroba (Fardiaz, 1988)

## B. Lama Fermentasi

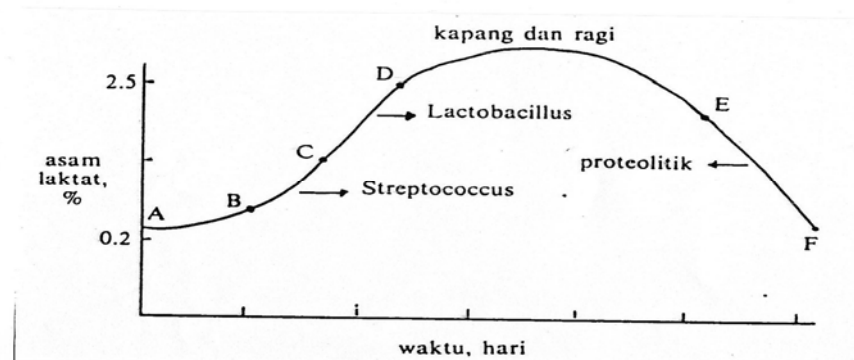
Menurut Buckle *et al.*, (1985) bila suatu sel mikroorganisme diinokulasikan pada media nutrisi agar, pertumbuhan yang terlihat mula-mula adalah suatu pembesaran ukuran, volume dan berat sel. Ketika ukurannya telah mencapai kira-kira dua kali dari besar sel normal, sel-sel tersebut membelah dan menghasilkan dua sel. Sel-sel tersebut kemudian tumbuh dan membelah diri menghasilkan empat sel. Selama kondisi memungkinkan, pertumbuhan dan pembelahan sel berlangsung terus sampai sejumlah besar populasi sel terbentuk.

Waktu antara masing-masing pembelahan sel berbeda-beda tergantung dari spesies dan kondisi lingkungannya, tetapi untuk kebanyakan bakteri waktu ini berkisar antara 10 – 60 menit. Tipe pertumbuhan yang cepat ini disebut pertumbuhan logaritmis atau eksponensial karena bila log jumlah sel digambarkan terhadap waktu dalam grafik akan menunjukkan garis lurus. Tetapi pada kenyataannya tipe pertumbuhan eksponensial ini tidak langsung terjadi pada saat sel dipindahkan ke medium pertumbuhan dan tidak terjadi secara terus menerus (Rachman, 1989).

#### C. pH (keasaman)

Makanan yang mengandung asam biasanya tahan lama, 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. Sebagai contoh misalnya susu segar pada umumnya akan ditumbuhi dengan beberapa macam mikroba, mula-mula adalah *Streptococcus lactis* akan menghasilkan asam laktat. Tetapi pertumbuhan selanjutnya dari bakteri ini akan terhambat oleh keasaman yang dihasilkannya sendiri. Selanjutnya bakteri menjadi inaktif sehingga akan tumbuh bakteri jenis *Lactobacillus* yang lebih toleran terhadap asam. *Lactobacillus* juga akan menghasilkan asam lebih banyak lagi sampai jumlah tertentu yang dapat menghambat pertumbuhannya. Selama pembentukan asam tersebut pH

susu akan turun sehingga terbentuk "curd" susu. Pada keasaman yang tinggi *Lactobacillus* akan mati dan kemudian tumbuh ragi dan kapang yang lebih toleran terhadap asam. Kapang akan mengoksidasi asam sedangkan ragi akan menghasilkan hasil-hasil akhir yang bersifat basa dari reaksi proteolisis, sehingga keduanya akan menurunkan asam sampai titik di mana bakteri pembusuk proteolitik dan lipolitik akan mencerna "curd" dan menghasilkan gas serta bau busuk. Hubungan antara pertumbuhan mikroba dan jumlah asam ini dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hubungan antara jumlah asam dan pertumbuhan mikroba pada susu (Winarno *et al.*, 1980)

#### D. Suhu

Tiap-tiap mikroorganisme memiliki suhu pertumbuhan maksimal, minimal dan optimal yaitu suhu yang memberikan pertumbuhan terbaik dan memperbanyak diri tercepat. Mikroorganisme dapat diklasifikasikan menjadi tiga kelompok berdasarkan suhu pertumbuhan yang

diperlukannya yaitu golongan psikrofil, tumbuh pada suhu dingin dengan suhu optimal 10 – 20°C, golongan mesofil tumbuh pada suhu sedang dengan suhu optimal 20 – 45°C dan golongan termofil tumbuh pada suhu tinggi dengan suhu optimal 50 – 60°C (Gaman and Sherrington, 1992). Suhu fermentasi sangat menentukan macam mikroba yang dominan selama fermentasi.

Bakteri bervariasi dalam hal suhu optimum untuk pertumbuhan dan pembentukan asam. Kebanyakan bakteri dalam kultur laktat mempunyai suhu optimum 30°C, tetapi beberapa kultur dapat membentuk asam dengan kecepatan yang sama pada suhu 37°C maupun 30°C. Suhu yang lebih tinggi dari 40°C pada umumnya menurunkan kecepatan pertumbuhan dan pembentukan asam oleh bakteri asam laktat, kecuali kultur yang digunakan dalam pembuatan yoghurt yaitu *L.bulgaricus* dan *S.thermophilus* memiliki suhu optimum 40 - 45°C (Rahman *et al.*, 1992). Inkubasi dengan suhu 43°C selama 4 jam terjadi peningkatan produksi berbagai enzim dari *L.bulgaricus* dan *S.thermophilus* antara lain enzim laktase dan 8 orthonitrophenol  $\beta$ -d-galaktopyranosid.

#### E. Oksigen

Tersedianya oksigen dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme. Jamur bersifat aerobik (memerlukan oksigen) sedangkan khamir dapat bersifat aerobik atau anaerobik tergantung pada kondisinya. Bakteri diklasifikasikan menjadi empat kelompok yaitu aerob obligat

(tumbuh jika persediaan oksigen banyak), aerob fakultatif (tumbuh jika oksigen cukup, juga dapat tumbuh secara anaerob), anaerob obligat (tumbuh jika tidak ada oksigen) dan anaerob fakultatif (tumbuh jika tidak ada oksigen juga dapat tumbuh secara aerob) (Gaman and Sherrington, 1992).

## **B. Susu fermentasi**

Beberapa jenis produk susu yang difermentasi diantaranya adalah yoghurt, susu asidofilus, kefir, dan koumiss. Namun, tidak semuanya beredar di Indonesia dalam bentuk siap minum. Bakteri *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* sebagai kultur starter, memfermentasi susu menghasilkan yoghurt yang selama ini sering dikonsumsi dan banyak tersedia di pasaran.

Susu asidofilus menggunakan bakteri *Lactobacillus acidophilus*, sedangkan kefir diproduksi dengan bantuan beberapa mikroorganisme antara lain *Lactobacillus kefir*, beberapa genera dari *Leuconostoc*, *Lactococcus*, dan *Acetobacter*, serta beberapa jenis ragi yaitu *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae*, dan *Saccharomyces exiguus*. Koumiss dihasilkan dari proses fermentasi oleh *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan *Kluyveromyces marxianus*. Disamping mikroba-mikroba utama penghasil susu fermentasi tersebut, tidak jarang dilakukan suplementasi bakteri yang bersifat sebagai probiotik ke dalam susu fermentasi untuk

meningkatkan nilai fungsional produk akhir. Beberapa spesies yang sering digunakan antara lain *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, dan *Lactobacillus casei*.

Susu yang difermentasi memiliki rasa dan aroma yang khas tergantung dari mikroorganisme yang dipakai. Karakteristik fisik dari beberapa jenis susu fermentasi berbeda-beda. Yoghurt mempunyai tekstur yang agak kental sampai kental atau semi padat dengan konsistensi yang homogen akibat dari penggumpalan protein karena asam organik yang dihasilkan oleh kultur *starter*. Susu asidofilus, kefir, dan koumiss memiliki konsistensi cair seperti krim asam yang sedikit lebih kental dibanding susu segar karena hanya sedikit protein yang terkoagulasi oleh asam yang dihasilkan oleh mikroba. Kefir dan koumiss memiliki rasa seperti minuman berkarbonasi atau *effervescent* yang khas karena adanya CO<sub>2</sub> yang dihasilkan dari fermentasi alkohol oleh khamir. Kandungan alkohol pada kefir berkisar antara 0.5-1%, sedangkan pada koumiss berkisar antara 0.7-2.5% (Surono, 2004).

Bakteri yang digunakan dalam fermentasi susu mempunyai beberapa peranan yang pada dasarnya adalah 1). Memproduksi asam laktat, 2). Sekresi metabolit yang berhubungan dengan karakteristik flavor dari produk fermentasi susu tertentu dan 3). Modifikasi substrat agar perubahan-perubahan biokimiawi yang diinginkan dapat berlangsung. Seleksi bakteri yang sesuai untuk suatu produk tertentu memegang peranan penting dan karakteristik mikroba yang dipilih dapat digunakan

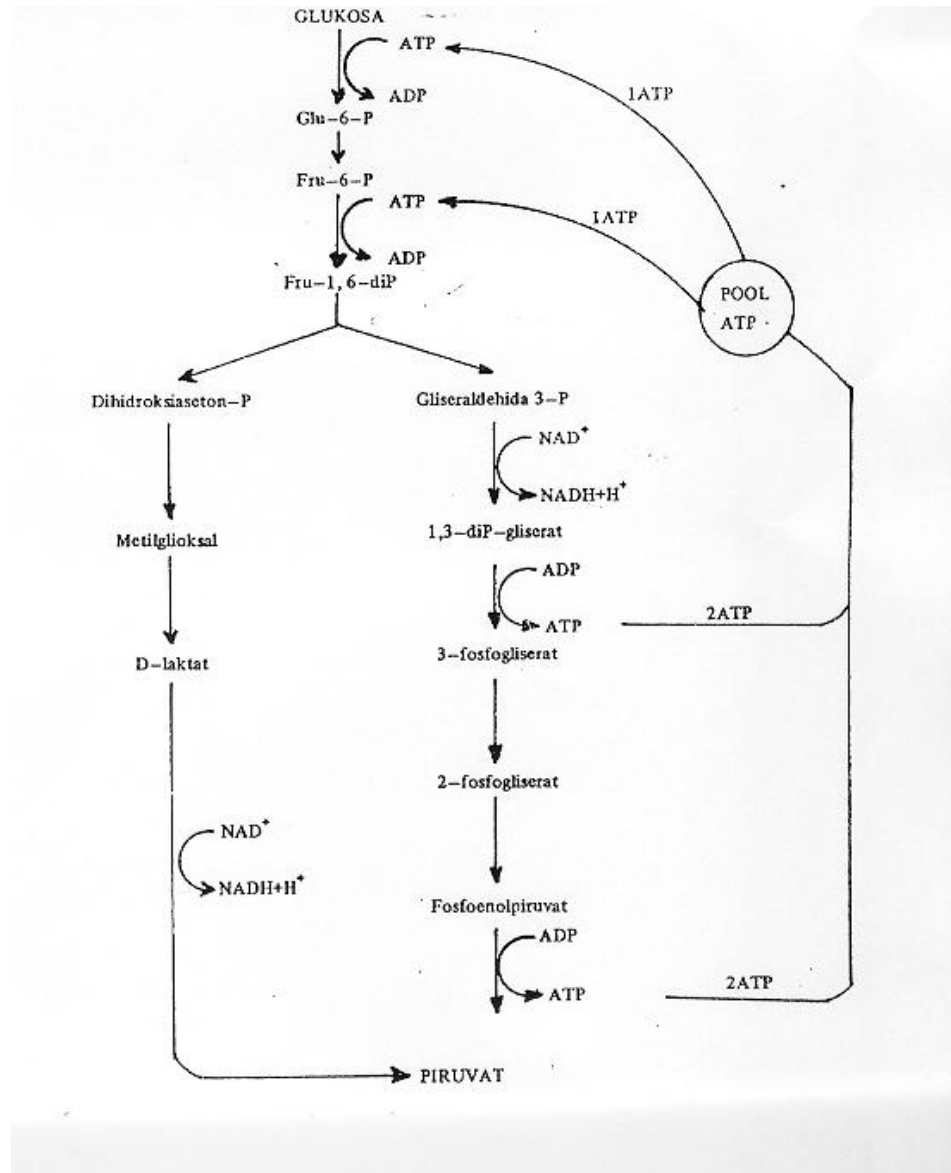
sebagai parameter dalam proses fermentasi (Rachman, 1989). Mikroba yang paling banyak digunakan dalam fermentasi susu adalah bakteri asam laktat. Bakteri ini umum digunakan dalam produksi berbagai keju, susu asam, yogurt, susu asidophilus dan produk fermentasi susu lainnya.

### **1. Bakteri Asam Laktat**

Bakteri asam laktat dapat dibedakan atas dua kelompok yaitu yang bersifat homofermentatif dan heterofermentatif. Pada kelompok homofermentatif, glukosa difermentasi menghasilkan asam laktat sebagai satu-satunya produk. Bakteri yang tergolong homofermentatif misalnya *Streptococcus*, *Pediococcus* dan beberapa *Lactobacillus*. Bakteri asam laktat heterofermentatif selain menghasilkan asam laktat juga memproduksi senyawa-senyawa lainnya yaitu etanol/asam asetat. Bakteri asam laktat yang tergolong heterofermentatif misalnya *Leuconostoc* dan beberapa spesies *Lactobacillus*. Bakteri pembentuk asam laktat bervariasi dalam kemampuannya membentuk asam laktat dan dalam sifat-sifat lainnya. Beberapa galur memproduksi asam sangat cepat sedangkan galur lainnya lebih lambat. Bakteri pembentuk laktat yang digunakan dalam kultur campuran biasanya dipilih berdasarkan kecepatannya dalam memproduksi asam serta tidak membentuk komponen-komponen yang tidak diinginkan (Rachman, 1989).

Berbagai monosakarida dimetabolisme oleh bakteri asam laktat menjadi glukose-6-phosphate atau fructose-6-phosphate dan kemudian

terjadi metabolisme melalui jalur EMP (Gambar 3). Jalur *Embden Meyerhoff Parnas* (EMP) merupakan urutan reaksi oksidasi glukosa menjadi piruvat yang paling umum terjadi pada kebanyakan bakteri, tanaman, hewan dan bahkan manusia pada reaksi katabolismenya. Bakteri asam laktat homofermentatif menggunakan jalur EMP untuk menghasilkan piruvat kemudian direduksi menjadi asam laktat melibatkan enzim laktase dehidrogenase menggunakan kelebihan NADH (Surono, 2004).



Gambar 3. Jalur *Embden-Meyerhof-Parnas* (EMP) (Lee, 1996)

## 2. Khamir

Khamir dapat dibedakan atas dua kelompok berdasarkan sifat metabolismenya yaitu yang bersifat fermentatif dan oksidatif. Khamir

fermentatif dapat melakukan fermentasi alkohol, yaitu memecah glukosa melalui jalur glikolisis (*Embden Meyerhoff-Parnas*). Khamir yang bersifat fermentatif 70% dari glukosa di dalam substrat akan diubah menjadi karbondioksida dan alkohol, sedangkan sisanya 30% tanpa adanya nitrogen akan diubah menjadi produk simpanan sebagai cadangan yang akan digunakan kembali melalui fermentasi endogenous jika glukosa di dalam medium sudah habis. Khamir yang bersifat oksidatif kuat tidak dapat melakukan fermentasi alkohol. Khamir semacam ini bersifat aerobik karena membutuhkan oksigen untuk pertumbuhannya (Fardiaz, 1989).

Sifat khamir *Candida* yang penting dalam mikrobiologi pangan maupun industri adalah tumbuh membentuk pseudomiselium atau hifa yang mengandung banyak sel-sel tunas atau disebut blastospora dan mungkin membentuk khlamidospora. Kebanyakan spesies pertumbuhannya membentuk film pada permukaan dan sering merusak makanan-makanan yang mengandung garam dan asam dalam jumlah tinggi. Selain menyebabkan kerusakan makanan, beberapa spesies *Candida* juga digunakan dalam industri. Sebagai contoh *C.krusei* sering ditambahkan pada kultur laktat untuk mempertahankan aktivitas bakteri asam laktat (Fardiaz, 1989).

### **3. Kultur Susu Fermentasi**

Susu dapat difermentasi secara spesifik menghasilkan produk-produk misalnya kefir dan koumiss dengan sifat fermentasi asam dan alkohol, bulgarian (asam tinggi), acidophilus dan yogurt (asam sedang),

cultured buttermilk dan cultured cream (asam rendah). Produk-produk tersebut mempunyai cita rasa yang spesifik tergantung dari kultur yang digunakan.

Kefir dan koumiss adalah produk fermentasi susu yang dibuat dengan cara fermentasi menggunakan beberapa spesies bakteri yaitu *Lactobacillus bulgaricus*, *L.laktis* dan *L.helveticus*. Fungsi ketiga spesies bakteri ini dalam fermentasi kefir dan koumiss adalah sebagai penghasil asam dan cita rasa (Rachman, 1989).

*Lactobacillus bulgaricus* memfermentasi susu dan memproduksi asam laktat yang membantu mengawetkan susu. Ketika susu difermentasi, *Lactobacillus bulgaricus* memproduksi asetaldehida yang membentuk aroma pada yoghurt (Balow *et al.*, 1991). Agar fermentasi yang menghasilkan asam laktat berjalan dengan baik jumlah bakteri asam laktat yang diperlukan adalah lebih dari  $10^6$  cfu/ml (Buttock and Azam, 1998). Salah satu khamir yang terdapat pada kefir adalah *Candida kefir*. Bentuk aseksual (*teleomorph*) dari *Candida kefir* adalah *Kluyveromyces marxianus* yang secara komersial digunakan untuk memproduksi enzim laktase. Dengan demikian khamir ini termasuk jenis yang dapat memfermentasi laktosa (Seyis and Aksoz, 2004). Populasi khamir yang diperlukan untuk inokulasi adalah  $10^6 - 10^7$  cfu/ml (Buttock and Azam, 1998).

## C. Kefir

### 1. Pengertian

Kefir adalah susu yang difermentasi dan berasal dari Caucasus. Kefir dibuat dengan menginokulasi susu sapi, kambing atau domba dengan biji kefir. Kefir tradisional dibuat dalam kantong kulit yang tergantung dekat pintu masuk/keluar dan kantong diketuk oleh setiap orang yang melintas untuk membantu susu dan biji kefir tercampur dengan baik (Anonim b, 2007). Menurut Albaarri dan Murti ( 2003) kefir adalah produk susu yang difermentasikan dengan menggunakan bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, dengan ragi dalam proses fermentasi tersebut menghasilkan asam dan alkohol. Pada tahap akhir proses dilakukan dalam kemasan tertutup untuk tujuan produksi karbonat.

Kefir berasal dari pegunungan Kaukasian sebelah utara atau sebelah timur laut Mongolia, dan telah diproduksi selama ratusan tahun dalam skala rumah tangga secara tradisional dalam kantong kulit, atau dalam tembikar. Bahan untuk pembuatan kefir biasanya adalah susu sapi atau susu kambing. Kefir ini diproduksi di negara-negara di Rusia dan hanya sedikit diproduksi di negara-negara Eropa (Surono, 2004). Kefir mengandung 0.5 – 1,0 % alkohol dan 0,9 – 1,1 % asam laktat. Produk ini sangat populer di Uni Soviet, dimana konsumsi kefir mencapai 4,5 kg per kapita per tahun (Rahman *et al.*, 1992).

Kefir diperoleh melalui proses fermentasi susu pasteurisasi menggunakan starter berupa butir atau biji kefir (*kefir grain/kefir granule*), yaitu butiran-butiran putih atau krem dari kumpulan bakteri, antara lain *Streptococcus* sp., *Lactobacilli* dan beberapa jenis ragi/khamir nonpatogen. Bakteri berperan menghasilkan asam laktat dan komponen *flavor*, sedangkan ragi menghasilkan gas asam arang atau karbon dioksida dan sedikit alkohol. Itulah sebabnya rasa kefir di samping asam juga sedikit ada rasa alkohol dan soda, yang membuat rasa kefir lebih segar, dan kombinasi karbon dioksida dan alkohol menghasilkan buih yang menciptakan karakter mendesis pada produk (Usmiati, 2007).

Fermentasi susu menjadi kefir menghasilkan senyawa metabolit yang bermanfaat bagi kesehatan yaitu eksopolisakarida dan peptida bioaktif. Kedua senyawa tersebut akan menstimulasi sistem kekebalan tubuh. Polisakarida yang terbentuk pada kefir juga berperan sebagai antitumor. Senyawa lain yang terdapat pada kefir adalah kandungan  $\beta$ -galactosidase yang baik untuk penderita laktose intoleran. Komponen antibakteri juga dihasilkan selama fermentasi kefir seperti asam organik (asam laktat dan asetat), karbondioksida, hidrogen peroksida, etanol, diasetil dan peptida (bakteriosin) yang tidak hanya berguna untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan bakteri pembusuk selama pengolahan dan penyimpanan makanan, tetapi dapat pula digunakan untuk pencegahan beberapa gangguan pencernaan dan infeksi (Farnworth, 2005).

## 2. Nilai Gizi dan Khasiat

Kandungan zat gizi kefir hampir sama dengan susu yang digunakan sebagai bahan kefir namun memiliki berbagai kelebihan bila dibandingkan dengan susu segar. Kelebihan tersebut yaitu adanya 1) asam yang terbentuk dapat memperpanjang masa simpan, mencegah pertumbuhan mikroorganisme pembusuk sehingga mencegah pertumbuhan mikroorganisme patogen sehingga meningkatkan keamanan produk kefir (Fardiaz, 1997). 2) meningkatkan ketersediaan vitamineral (B2, B12, asam folat, fosfor dan kalsium) yang baik untuk tubuh, 3) mengandung mineral dan asam amino esensial (tryptopan) yang berfungsi sebagai unsur pembangun, pemelihara, dan memperbaiki sel yang rusak, 4) fosfor dari kefir membantu karbohidrat, lemak dan protein dalam pembentukan sel serta untuk menghasilkan tenaga, 5) mengandung kalsium (Ca) dan magnesium (Mg), Chromium (Cr) sebagai unsur mineral mikro esensial (Surono, 2004).

Kefir mengandung sekitar 0,8% asam laktat dan 1% alkohol. Ditinjau dari kandungan gizi minuman ini hampir sama dengan susu asalnya kecuali pada laktosanya agak rendah (Harris dan Karmas, 1989). Beberapa efek kesehatan yang dapat diperoleh dari bakteri asam laktat sebagai probiotik antara lain dapat memperbaiki daya cerna laktosa, mengendalikan jumlah bakteri patogen dalam usus, meningkatkan daya tahan alami terhadap infeksi dalam usus, menurunkan serum kolesterol, menghambat tumor, antimutagenik dan antikarsinogenik, meningkatkan

sistem imun, mencegah sembelit, memproduksi vitamin B dan bakteriosin (senyawa antimikroba) dan inaktivasi berbagai senyawa racun dan menghasilkan metabolit-metabolit seperti  $H_2O_2$  dan asam laktat (Sari, 2007).

### 3. Proses Pembuatan

Bibit atau inokulan dalam pembuatan kefir disebut biji kefir. Biji tersebut berwarna putih kekuningan dan tidak dapat larut dalam air maupun beberapa pelarut lainnya. Bila biji kefir dimasukkan dalam susu maka biji tersebut akan mengembang karena menyerap air dan warnanya berubah menjadi putih. Biji kefir mengandung 24% polisakarida yang bersifat lengket (antara lain mengandung amilopektin) serta mikroba simbiotik yaitu khamir (*Saccharomyces kefir* dan *Torula kefir*), *Lactobacilli* (*Lactobacillus caucasicus*), *Leuconostocs* serta *Streptokoki laktat* (Rahman *et al.*, 1992).

Bibit kefir dapat dipakai ulang beberapa kali dan bibit ini diperoleh dengan cara pemisahan melalui penyaringan. Kemudian biji kefir dicuci dan direndam dalam air dingin dan disimpan pada suhu 4°C. Penyimpanan dengan cara basah ini hanya tahan satu minggu. Bila akan disimpan dalam jangka waktu yang lama, biji kefir harus dikeringkan dengan cara dibungkus kain bersih selama 36 – 48 jam pada suhu kamar, kemudian disimpan pada suhu 4°C. Biji kefir kering ini dapat dipertahankan aktivitasnya lebih dari satu tahun (Rahman *et al.*, 1992).

Bahan baku pembuatan kefir adalah susu, baik susu sapi, domba maupun kambing. Susu dipanaskan pada suhu 85 °C selama 30 menit atau 95°C selama 5 menit. Tujuan pemanasan untuk membunuh mikroba yang tidak diinginkan dan denaturasi protein untuk meningkatkan viskositas produk. Kemudian susu didinginkan (22 – 23 °C) dan ditambahkan biji kefir, diinkubasi pada suhu 22 – 23 °C selama kurang lebih 20 jam atau pada suhu 10 °C selama 1 – 3 hari. Pada akhir fermentasi produk mengandung alkohol 0,5 – 1,0 % dan asam laktat 0,9 – 1,1 % dan gas CO<sub>2</sub>. Biji kefir dipisahkan dari produk, dicuci dan dipersiapkan untuk produksi selanjutnya. Untuk meningkatkan stabilitas maka kefir didinginkan pada suhu 5 °C selama beberapa jam untuk pematangan sehingga diperoleh kefir yang baik mutunya (Rahman *et al.*, 1992).

#### **D. Kacang Hijau**

Kacang hijau atau *Phaseolus aureus* / *Vigna radiata* berasal dari *Famili Leguminoseae* alias polong-polongan disebut juga mung, moong dan greengram di India dan mungo di Filipina. Kandungan proteinnya cukup tinggi yaitu 24 % atau nomor dua setelah kacang kedelai, dan merupakan sumber mineral penting, antara lain; kalsium dan fosfor yang sangat diperlukan tubuh. Sedangkan kandungan lemaknya merupakan asam lemak tak jenuh, sehingga aman dikonsumsi oleh orang yang memiliki masalah kelebihan berat badan. Untuk makanan kacang hijau

dipersiapkan dengan cara dimasak, difermentasi, ditepung atau dikecambahkan (Lien, 1992). Kacang hijau mengandung 230 – 260 g/kg protein dan sekitar 0.7-1.0 g/kg lemak dan mempunyai zat anti gizi yang sangat rendah. Profil dari asam amino kacang hijau setara dengan kacang kedelai dan juga kaya akan vitamins A, B1, B2, C and niacin (Robinson and Singh, 2001).

Kadar lemak yang rendah dalam kacang hijau menyebabkan bahan makanan/minuman yang terbuat dari kacang hijau tidak mudah tengik. Lemak kacang hijau tersusun atas 73% asam lemak tak jenuh dan 27% asam lemak jenuh. Umumnya kacang-kacangan memang mengandung lemak tak jenuh tinggi. Asupan lemak tak jenuh tinggi penting untuk menjaga kesehatan jantung. Kacang hijau mengandung 27% protein dan sekitar 16 MJ/kg energi. Kacang hijau tidak mengandung kadar antigizi yang berarti sehingga tidak diperlukan perlakuan khusus pada saat pengolahan (Singh, 1999). Komposisi gizi kacang hijau dapat dilihat pada Tabel 2.

### **1. Senyawa Bioaktif dan Sifat Fungsional**

Komponen fitokimia ditemukan pada kacang-kacangan termasuk kacang hijau. Fitokimia antara lain berfungsi sebagai antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri penyebab penyakit (Arnelia, 2004). Akan tetapi informasi komponen spesifik dari kacang hijau yang bersifat sebagai antibakteri belum banyak dipublikasikan. Komponen

bioaktif lain yang penting pada kacang hijau adalah asam oleanolik (*Oleanolic acid*) (Wu and Zhang, 2003) dan biochanin A (Dweck, 2006). Penelitian terbaru menunjukkan bahwa asam oleanolik berperan dalam penghambatan penyakit kardiovaskuler, antihiperlipidemi, antioksidan (glutathione peroksidase/G-Px dan SOD) dan antihipertensi (Somova, 2003), selain itu asam oleanolik juga bisa meningkatkan sistem imun (Raphael and Kuttan, 2003).

**Tabel 2. Komposisi Gizi Kacang Hijau**

Kandungan Gizi per 100 gram		
Zat Gizi	Jumlah	Satuan
Energi	347.000	Kkal
Protein	23.860	g
Lemak	1.150	g
Karbohidrat	62.620	g
Lemak jenuh	0,348	g
Lemak tak jenuh tunggal	0,161	g
Lemak tak jenuh ganda	0,384	g
Kolesterol	0,000	mg
Sodium	15.000	mg
Serat	16.300	g
Vitamin A	11.000	RE
Asam Askorbat	4.800	mg
Tiamin	0,621	mg
Riboflavin	0,233	mg
Niasin	2.251	mg
Vitamin B6	0,382	mg
Folasin	624.900	µg
Vitamin B12	0,000	µg
Potasium	1246.000	mg
Kalsium	132.000	mg
Fosfor	367.000	mg
Magnesium	189.000	mg
Besi	6.740	mg
Zink	2.680	mg
Asam pantotenat	1.910	mg
Copper	0,941	mg
Magnesium	1.035	mg
Abu	3.320	g
Air	9,050	g

Sumber : Singh, 1999

## 2. Susu Kacang Hijau

Saat ini pemanfaatan kacang hijau untuk diolah menjadi produk susu nabati seperti halnya kedelai yang diolah menjadi susu kedelai belum banyak dilakukan. Pembuatan susu kacang hijau hampir sama dengan pembuatan susu kacang-kacangan lain (Widowati, 2007 ). Hanya saja ekstraksi kacang hijau tidak memerlukan perlakuan khusus seperti pada pembuatan susu kedelai untuk mengurangi bau langu.

### E. Aktivitas Antibakteri

Komponen antimikroba adalah suatu komponen yang bersifat dapat menghambat pertumbuhan bakteri atau kapang (bakteristatik atau fungistatik) atau membunuh bakteri atau kapang (bakterisidal atau fungisidal). Zat aktif yang terkandung dalam berbagai jenis ekstrak tumbuhan diketahui dapat menghambat beberapa mikroba patogen maupun perusak makanan. Zat aktif tersebut dapat berasal dari bagian tumbuhan seperti biji, buah, rimpang, batang, daun, dan umbi. Berbagai bahan pangan secara alami memiliki aktivitas antibakteri seperti misalnya komponen aktif yang terdapat dalam bawang putih mempunyai efek penghambatan terhadap beberapa mikroba patogen seperti *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, dan *Bacillus cereus* dan menghambat produksi toksin dari *Clostridium botulinum* tipe A dengan menurunkan produksi toksinnya sebanyak 3 log cycle (Ardiansyah, 2007).

Mekanisme penghambatan mikroorganisme oleh senyawa antimikroba dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain: (1) gangguan pada senyawa penyusun dinding sel, (2) peningkatan permeabilitas membran sel yang dapat menyebabkan kehilangan komponen penyusun sel, (3) menginaktivasi enzim, dan (4) destruksi atau kerusakan fungsi material genetik. Kemampuan senyawa antimikroba untuk menghambat aktivitas pertumbuhan mikroba dalam sistem pangan dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya temperatur, pH (keasaman), ketersediaan oksigen, dan interaksi/sinergi antara beberapa faktor tersebut (Ardiansyah, 2007). Efek antagonistik atau antibakteri bakteri asam laktat ada dua kelompok besar yaitu berupa metabolit primer yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat seperti asam laktat, CO<sub>2</sub>, diasetil, asetaldehida dan hidrogen peroksida dan bakteriosin suatu senyawa protein yang menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri sejenis (Surono, 2004).

Kefir dapat memperbaiki proses pencernaan dengan menyediakan mikroorganisme yang diperlukan dalam proses pencernaan. Kefir memberikan nutrisi yang berkualitas tinggi dan seimbang yang diperlukan sebagai bahan untuk memperbaiki sel yang rusak, maupun untuk menjalankan fungsi tubuh secara seimbang sehingga organ tubuh dapat kembali berfungsi dengan normal. Kefir memiliki antibiotika alami yang dihasilkan mikroba (*human friendly/beneficial microflora*) serta derajat

keasaman tinggi yang akan menekan pertumbuhan bakteri patogen (Ensminger, 1995)

Beberapa sumbangan yang diberikan bakteri dalam kefir antara lain *Streptococcus lactis* dapat menghidrolisis protein susu, meningkatkan daya cerna susu, memperbaiki pencernaan lambung, menghambat pertumbuhan mikroorganisme berbahaya, memproduksi bakteriolysin. *Streptococcus cremoris* sama seperti *S. lactis*, lebih tahan terhadap phages dibandingkan dengan *S. lactis* dan meningkatkan citarasa kefir. *Lactobacillus plantarum* antagonis terhadap aktivitas *Listeria monocytogenes*, memproduksi plantaricin, bakteriocin yang menghambat mikroorganisme pembusuk, mentoleransi konsentrasi garam empedu yang tinggi, menempel pada mukosa usus. *Lactobacillus casei* membentuk koloni di saluran cerna, menempel pada mukosa usus, menciptakan lingkungan yang sesuai bagi keseimbangan mikrobial, membatasi pembusukan di usus sehingga dapat mengontrol produksi racun dan akibat berbahaya bagi organ vital dan sel tubuh, menghambat bakteri patogen, mengurangi efek laktosa intoleran (Ensminger, 1995)

### **1. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* adalah salah satu jenis spesies utama bakteri gram negatif. Bakteri ini hidup pada tinja, dan dapat menyebabkan masalah kesehatan pada manusia, seperti diare, muntaber dan masalah pencernaan lainnya. *E.coli* banyak digunakan dalam teknologi rekayasa

genetika. Digunakan sebagai vektor untuk menyisipkan gen-gen tertentu yang diinginkan untuk dikembangkan. *E.coli* dipilih karena pertumbuhannya sangat cepat dan mudah dalam penanganannya. *E.coli* mempunyai karakteristik unik yang membedakan satu dengan lainnya. Perbedaan ini sering dapat ditemukan hanya pada tingkatan molekular, menghasilkan perubahan pada fisiologi atau daur hidup bakteri. Sebagai contoh, strain memperoleh kemampuan untuk menggunakan suatu sumber karbon, kemampuan untuk tinggal pada ekologi tertentu atau kemampuan untuk melawan antimikrobia. *E.coli* sebagai host-specific, digunakan untuk menentukan sumber fecal pencemaran pada sampel (Anonim c, 2008)

## **2. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram Positif, tidak bergerak, tidak berspora dan mampu membentuk kapsul, berbentuk kokus dan tersusun seperti buah anggur. Ukuran *Staphylococcus* berbeda-beda tergantung pada media pertumbuhannya. Apabila ditumbuhkan pada media agar, *Staphylococcus* memiliki diameter 0,5-1,0 mm dengan koloni berwarna kuning. Dinding selnya mengandung asam teikoat, yaitu sekitar 40% dari berat kering dinding selnya. Asam teikoat adalah beberapa kelompok antigen dari *Staphylococcus*. Asam teikoat mengandung aglutinogen dan N-asetilglukosamin.

*Staphylococcus aureus* adalah bakteri aerob dan anaerob, fakultatif yang mampu menfermentasikan manitol dan menghasilkan enzim *koagulase, hyalurodinase, fosfatase, protease dan lipase*. *Staphylococcus aureus* mengandung *lysostaphin* yang dapat menyebabkan lisisnya sel darah merah. Toksin yang dibentuk oleh *Staphylococcus aureus* adalah haemolysin alfa, beta, gamma delta dan epsilon. Toksin lain ialah leukosidin, enterotoksin dan eksfoliatin. Enterotoksin dan eksoenzim dapat menyebabkan keracunan makanan terutama yang mempengaruhi saluran pencernaan. Leukosidin menyerang leukosit sehingga daya tahan tubuh akan menurun. Eksofoliatin merupakan toksin yang menyerang kulit dengan tanda-tanda kulit terkena luka bakar.

Suhu optimum untuk pertumbuhan *Staphylococcus aureus* adalah  $35^{\circ} - 37^{\circ} \text{C}$  dengan suhu minimum  $6,7^{\circ} \text{C}$  dan suhu maksimum  $45,4^{\circ} \text{C}$ . Bakteri ini dapat tumbuh pada pH 4,0 – 9,8 dengan pH optimum 7,0 – 7,5. Pertumbuhan pada pH 9,8 hanya mungkin bila substratnya mempunyai komposisi yang baik untuk pertumbuhannya. Bakteri ini membutuhkan asam nikotinat untuk tumbuh dan akan distimulir pertumbuhannya dengan adanya thiamin. Pada keadaan anaerobik, bakteri ini juga membutuhkan urasil. Untuk pertumbuhan optimum diperlukan sebelas asam amino, yaitu valin, leusin, threonin, phenilalanin, tirosin, sistein, metionin, lisin, prolin, histidin dan arginin (Anonim d, 2008).

### 3. Struktur Bakteri

Struktur bakteri terbagi menjadi dua yaitu: struktur dasar (dimiliki oleh hampir semua jenis bakteri) meliputi: dinding sel, membran plasma, sitoplasma, ribosom, DNA, dan granula penyimpanan dan struktur tambahan (dimiliki oleh jenis bakteri tertentu) meliputi kapsul, flagelum, pilus, fimbria, klorosom, Vakuola gas dan endospora. Fungsi dinding sel pada prokaryota, adalah melindungi sel dari tekanan turgor yang disebabkan tingginya konsentrasi protein dan molekul lainnya dalam tubuh sel dibandingkan dengan lingkungan di luarnya.

Dinding sel bakteri berbeda dari organisme lain. Dinding sel bakteri mengandung peptidoglikan yang terletak di luar membran sitoplasmik. *Peptidoglikan* yaitu gabungan protein dan polisakarida *Peptidoglikan* berperan dalam kekerasan dan memberikan bentuk sel. Ada dua tipe utama bakteri berdasarkan kandungan *peptidoglikan* dinding selnya yaitu Gram positif dan Gram negatif. Dinding sel Gram positif mempunyai karakteristik utamanya adalah tebalnya lapisan *peptidoglikan* pada dinding sel. Dinding sel Gram positif biasa ditemukan pada *Actinobacteria* dan *Firmicutes*. Dinding sel Gram negatif tidak seperti dinding sel Gram positif, dinding sel Gram negatif memiliki lapisan *peptidoglikan* yang tipis.

*Endospora* adalah bentuk istirahat (laten) dari beberapa jenis bakteri gram positif dan terbentuk didalam sel bakteri jika kondisi tidak menguntungkan bagi kehidupan bakteri. Endospora mengandung sedikit sitoplasma, materi genetik, dan ribosom. Dinding endospora yang tebal

tersusun atas protein dan menyebabkan endospora tahan terhadap kekeringan, radiasi cahaya, suhu tinggi dan zat kimia. Jika kondisi lingkungan menguntungkan endospora akan tumbuh menjadi sel bakteri baru (Anonim e, 2008).

#### **F. Simulasi *Gastric Juice***

Simulasi *gastric juice* memberikan gambaran berlangsungnya proses pencernaan bahan pangan di lambung dan usus. Untuk mengetahui apakah aktivitas antibakteri kefir kacang hijau masih optimal setelah melewati saluran pencernaan, digunakan metode *in vitro* dimana pengujian dilakukan dengan menggunakan enzim-enzim pencernaan dengan kondisi yang dibuat mirip dengan yang sesungguhnya terjadi dalam pencernaan tubuh manusia. Metode *in vitro* ini selanjutnya disebut simulasi "gastric juice" (Zakaria *et al.*, 1997). Enzim yang digunakan dalam percobaan adalah enzim pepsin yang merupakan golongan dari enzim endopeptidase, yang dapat menghidrolisis ikatan-ikatan peptida pada bagian tengah sepanjang rantai polipeptida dan bekerja optimum pada pH 2 dan stabil pada pH 2-5. Enzim ini dihasilkan dalam bentuk pepsinogen yang belum aktif di dalam getah lambung. Pepsin berada dalam keadaan inaktif sempurna pada keadaan netral dan alkalis. Enzim ini bekerja dengan memecah protein menjadi proteosa dan pepton .

Pencernaan adalah proses perubahan makanan menjadi komponen-komponen sederhana di dalam alat-alat pencernaan yaitu

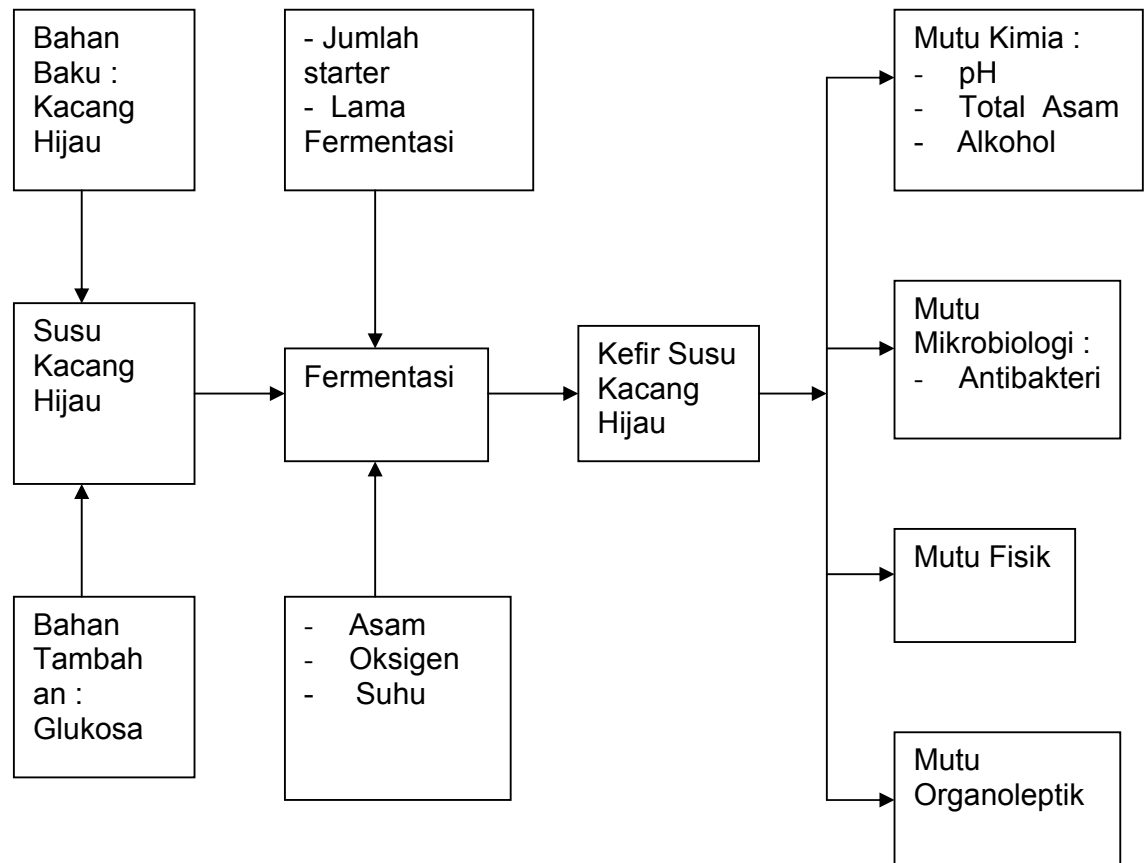
mulut, lambung dan usus. Pencernaan yang terjadi melalui dua proses : mekanis dan kimia. Proses mekanis adalah dimana makanan dipecah-pecah menjadi bagian yang kecil melalui pengunyahan dan dengan gerakan peristaltis makanan digerakkan ke saluran pencernaan bagian bawah . Proses kimia yaitu , sifat makanan yang dikonsumsi diubah oleh enzim-enzim pencernaan. Setelah makanan diubah menjadi unit-unit sederhana, diserap melalui dinding usus kecil. Dari sini unit-unit tersebut ditransportasikan ke darah atau limfa, yang akan membawanya ke sel-sel tubuh. Sebagian besar proses penyerapan terjadi dalam dinding usus kecil dan sebagian kecil dalam lambung dan usus besar, tetapi ada pula yang terjadi dalam mulut walaupun dalam jumlah yang kecil (Muchtadi *et al.*, 1993).

Cairan pencernaan disekresikan oleh organ-organ pencernaan dan sebagian besar cairan ini menghambat bakteri dari mulut ke usus besar. Air liur disekresikan dari kelenjar air liur mengandung enzim ptyalin optimum pada pH 6,7 dan sekresinya dikendalikan oleh sistem syaraf. Asam lambung disekresikan berupa asam hidroklorat, mukus dan enzim pepsin sebagai penghidrolisis protein yang optimum pada pH 1,5 – 2,5. Getah pankreas disekresikan ke dalam usus dua belas jari mengandung enzim pencernaan seperti  $\alpha$ -amilase, pepsin, tripsin dsb (Surono, 2004).

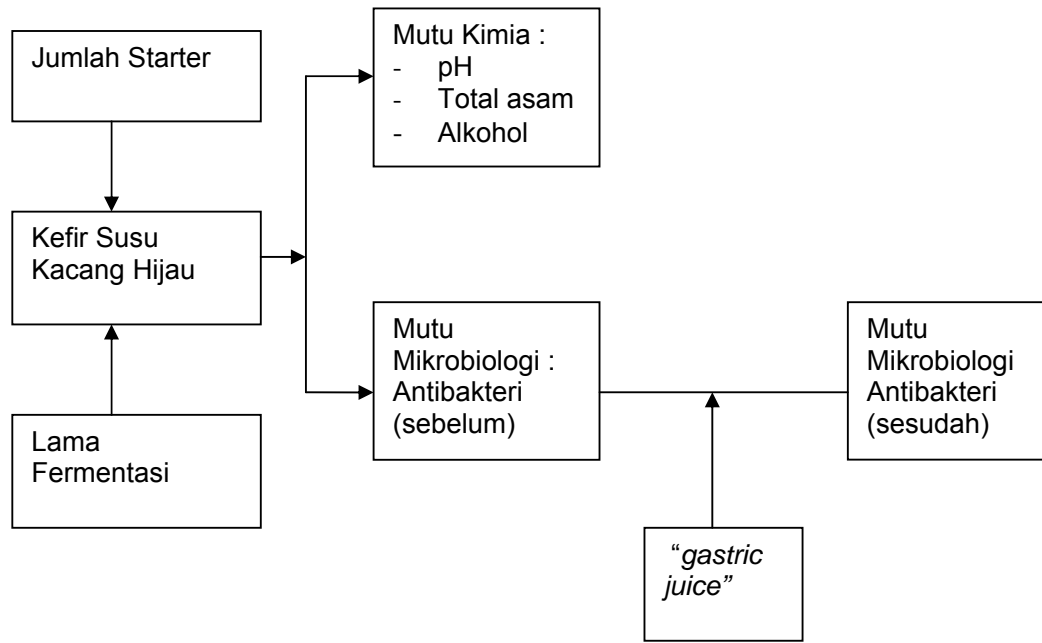
Pepsin *gastric* diproduksi didalam *chief cells* dalam bentuk zimogen inaktif yaitu pepsinogen kemudian diaktifkan oleh HCl menjadi pepsin,

secara otokalistik pepsin yang terbentuk dapat mengaktifkan sisa pepsinogen. Enzim pepsin mengubah protein asli menjadi proteosa dan pepton yang merupakan turunan protein bermolekul besar. Cairan pankreas adalah cairan yang tidak kental, mirip saliva mengandung beberapa jenis protein serta senyawa organik dan anorganik terutama  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  dan  $\text{SO}_4^{2-}$ , pH cairan pankreas antara 7,5 – 8,0 atau lebih (Muchtadi *et al.*, 1993)

## G. Kerangka Teori



## H. Kerangka Konsep



Proses penelitian dimulai dengan pembuatan susu kacang hijau yang kualitasnya dipengaruhi oleh bahan baku maupun bahan tambahan sehingga harus dikendalikan dengan kualitas dan kuantitas bahan baku maupun bahan tambahan yang sama. Selanjutnya dilakukan penambahan starter pada susu kacang hijau kemudian diinkubasi. Kefir yang dihasilkan akan bervariasi tergantung dari berbagai faktor tetapi peneliti membatasi faktor jumlah starter dan lama fermentasi yang dijadikan sebagai variabel pengaruh.

Kualitas kefir yang dihasilkan dapat dilihat dari berbagai aspek baik mutu kimia, fisik, mikrobiologi maupun organoleptik. Namun pada

penelitian ini peneliti membatasi pada aspek mutu mikrobiologi dengan menganalisis aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar dan aspek mutu kimia dengan menganalisis pH, total asam dan kadar alkohol pada penelitian tahap II. Penelitian tahap III adalah memilih sampel yang mempunyai aktivitas antibakteri paling efektif untuk diuji melalui simulasi "*gastric juice*" kemudian diuji lagi aktivitas antibakterinya. Selain kefir susu kacang hijau dibuat juga kefir susu sapi untuk dianalisis dan dibandingkan dengan kefir susu kacang hijau.

#### **I. Hipotesis**

1. Ada pengaruh jumlah starter dan lama fermentasi terhadap aktivitas antibakteri dan sifat kimia (pH, total asam dan kadar alkohol) kefir susu kacang hijau.
2. Ada perbedaan aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau sebelum dan sesudah melalui simulasi "*gastric juice*"

### **BAB III**

#### **METODE PENELITIAN**

##### **A. Ruang Lingkup Penelitian**

Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimen di bidang Teknologi Pangan.

##### **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

###### **1. Tempat**

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia dan Mikrobiologi Pangan Jurusan Gizi Poltekes Semarang dan laboratorium Biokimia Nutrisi Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak Fakultas Peternakan UNDIP Semarang.

###### **2. Waktu**

Penelitian dilakukan secara bertahap yaitu :

- a. Penyusunan proposal : Oktober 2007– Pebruari 2008
- b. Presentasi proposal : Pebruari 2008
- c. Pelaksanaan penelitian : Pebruari - Mei 2008
- d. Pengolahan data : Juni 2008
- e. Penyusunan tesis : Juni - Agustus 2008

### C. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian adalah Rancangan Acak Lengkap pola Faktorial 2 x 3 dengan faktor 1 adalah jumlah starter dan faktor 2 adalah lama fermentasi. Variabel pengaruh adalah jumlah starter (5%, 10% dan 15%) dan lama fermentasi (6 jam, 8 jam dan 10 jam). Variabel terpengaruh adalah aktivitas antibakteri dan sifat kimia (pH, total asam dan kadar alkohol). Perlakuan diulang tiga kali dan analisis dilakukan secara duplo. Materi yang digunakan adalah kacang hijau, air, susu sapi segar, kultur murni dari bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan khamir *Candida kefir*. Rancangan penelitian disajikan pada Tabel 3.

Model Matematis yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \sum (ij)_k$$

$Y_{ijk}$  = Nilai pengamatan

$\mu$  = Nilai tengah populasi

$A_i$  = Pengaruh perlakuan jumlah starter pada taraf ke i

$B_j$  = Pengaruh perlakuan lama fermentasi pada taraf ke j

$(AB)_{ij}$  = Pengaruh kombinasi perlakuan jumlah starter pada taraf ke-i dengan lama fermentasi pada taraf ke-j.

$\sum (ij)_k$  = galat percobaan pada satuan percobaan ulangan ke-j, dalam perlakuan ke-i

i = perlakuan ke-i (1,2j)

j = ulangan ke-j (1,2,3, ...n)

**Tabel 3. Rancangan Percobaan**

Perlakuan		Ulangan			Rata-rata
Jumlah Starter (%)	Lama Fermentasi (jam)	I	II	III	
A1 (5)	B1 (6 )	A1 B11	A1 B12	A1 B13	CB1
	B2 (8)	A1 B21	A1 B22	A1 B23	CB2
	B3 (10)	A1 B31	A1 B32	A1 B33	CB3
Rata-rata		C11	C12	C13	C1
A2 (10)	B1 (6 )	A2 B11	A2 B12	A2 B13	CB1
	B2 (8 )	A2 B21	A2B22	A2B23	CB2
	B3 (10)	A2 B31	A2B32	A2B33	CB3
Rata-rata		C21	C22	C23	C2
A3 (15)	B1 (6)	A3 B11	A3 B12	A3 B13	CB1
	B2 (8 )	A3 B21	A3B22	A3B23	CB2
	B3 (10)	A3 B31	A3B32	A3B33	CB3
Rata-rata		C31	C32	C33	C3
Total		CA1	CA2	CA3	C

Keterangan :

A1 B11-3 : Jumlah Starter 5%, lama fermentasi 6 jam, ulangan 1-3

A1 B21-3 : Jumlah Starter 5%, lama fermentasi 8 jam, ulangan 1-3

A1 B31-3 : Jumlah Starter 5%, lama fermentasi 10 jam, ulangan 1-3

A2 B11-3 : Jumlah Starter 10%, lama fermentasi 6 jam, ulangan 1-3

A2 B21-3 : Jumlah Starter 10%, lama fermentasi 8 jam, ulangan 1-3

A2 B31-3 : Jumlah Starter 10%, lama fermentasi 10 jam, ulangan 1-3

A3 B11-3 : Jumlah Starter 15%, lama fermentasi 6 jam, ulangan 1-3

A3 B21-3 : Jumlah Starter 15%, lama fermentasi 8 jam, ulangan 1-3

A3 B31-3 : Jumlah Starter 15%, lama fermentasi 10 jam, ulangan 1-3

#### **D. Tahapan Penelitian**

Pelaksanaan penelitian ini terdiri dari tiga tahap yaitu :

##### **1. Tahap I : Penelitian Pendahuluan (Pra Penelitian)**

Penelitian pendahuluan ditujukan untuk standarisasi pembuatan susu kacang hijau, menentukan rasio bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dengan khamir *Candida Kefir*, menentukan waktu, suhu, glukosa dan jumlah starter yang sesuai untuk memastikan proses fermentasi berjalan dengan baik. Hasil yang diperoleh pada penelitian pendahuluan sebagai berikut :

##### **a. Perbandingan starter *L. bulgaricus* dan *C. kefir***

Dilakukan percobaan dengan kombinasi *L. bulgaricus* dan *C. kefir* 1:1, 1:2, 1:3 dan sebaliknya. Pengamatan secara fisik dan organoleptik pada perbandingan 1:2,1:3, 2:1 dan 3:1 dihasilkan produk kefir susu kacang hijau dengan aroma yang sangat tajam baik aroma asam maupun aroma alkohol dan dengan rasa sangat asam cenderung pahit, maka disimpulkan perbandingan tersebut terlalu tinggi. Sehingga digunakan perbandingan *L. bulgaricus* dan *C. Kefir* 1:1 dengan pertimbangan produk yang dihasilkan memiliki keasaman yang cukup, konsistensi yang baik, aroma alkohol yang tidak tajam dan tidak berasa pahit.

### **b. Lama Fermentasi**

Inkubasi awal pembuatan produk kefir susu kacang hijau, waktu yang digunakan mengacu pada pembuatan kefir susu sapi, yaitu 4 jam pada suhu 43,5°. Akan tetapi setelah dilakukan pengamatan, fermentasi belum berjalan dengan optimal ditandai dengan aroma yang masih asli susu kacang hijau dan konsistensi produk yang masih sangat encer seperti susu kacang hijau sebagai bahan dasar. Hasil pengamatan tersebut menjadi dasar untuk memperpanjang waktu inkubasi menjadi 6 jam. Berdasarkan hal ini, maka digunakan lama fermentasi dengan rentang 2 jam yaitu 6 jam, 8 jam dan 10 jam.

### **c. Jumlah starter dan konsentrasi glukosa**

Starter yang digunakan pada awal percobaan adalah 3%, 5% dan 10%. Hasil pengamatan diperoleh bahwa inkubasi yang dilakukan pada suhu 43,5°C (inkubator) selama 6 jam dan suhu ruang selama 20 jam menunjukkan jumlah starter 3% belum menunjukkan fermentasi berlangsung dengan baik ditandai dengan konsistensi kefir susu kacang hijau masih encer dan aroma masih dominan susu kacang hijau. Berdasarkan hal ini, maka digunakan jumlah starter dengan rentang 5% yaitu 5%, 10% dan 15%. Sementara untuk konsentrasi glukosa yang digunakan, awal percobaan digunakan glukosa 10%, hal ini berdasarkan literatur pembuatan yoghurt susu kedelai dengan penambahan glukosa 3% - 10%. Akan tetapi pada konsentrasi glukosa 3% fermentasi belum

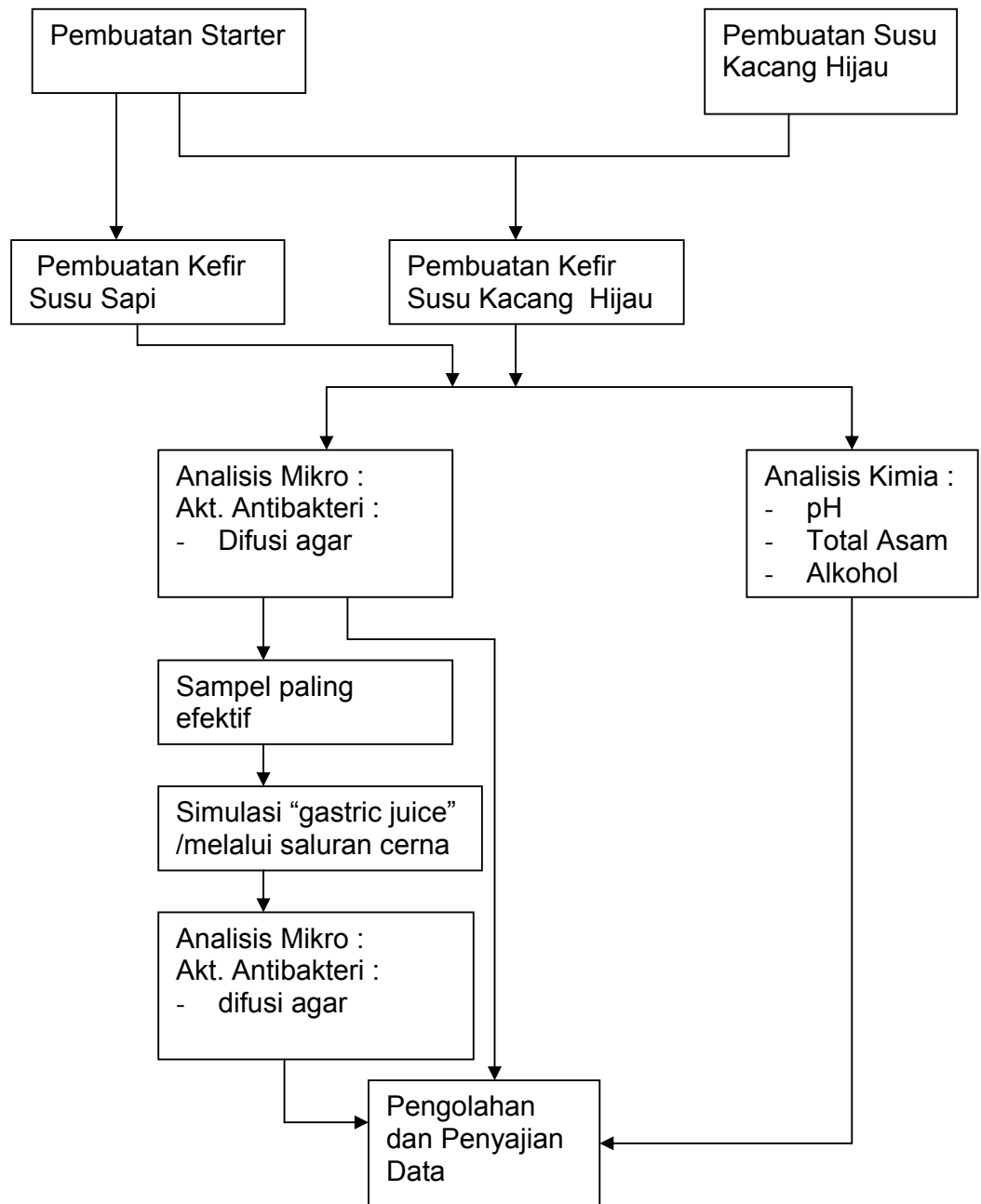
berjalan dengan baik. Berdasarkan hal ini, maka digunakan glukosa 10%.

## **2. Penelitian Tahap II**

Penelitian tahap II meliputi pembuatan susu kacang hijau, pembuatan starter, pembuatan kefir susu kacang hijau (dengan variasi jumlah starter dan lama fermentasi) dan pembuatan kefir susu sapi sebagai pembanding. Analisis sampel (kefir) meliputi analisis Mikrobiologi yaitu aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar dan analisis Kimia yaitu pH, total asam dan kadar alkohol. Sebagai pembanding aktivitas antibakteri digunakan antibiotik ampicilin 10% yang diukur juga dengan difusi agar.

## **3. Penelitian Tahap III**

Penelitian tahap III adalah memilih sampel kefir yang memiliki aktivitas antibakteri paling efektif yaitu sampel yang memiliki diameter zona bening paling lebar dan sampel kefir yang tidak berbeda nyata dengan sampel yang paling efektif dari hasil analisis statistik. Sampel terpilih diuji lebih lanjut aktivitas antibakterinya sesudah melalui simulasi "*gastric juice*". Adapun tahapan penelitian lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Bagan Alur Pelaksanaan Penelitian

## **E. Bahan dan Alat**

### **1. Pembuatan Susu Kacang Hijau**

- a. Bahan : Kacang hijau, air
- b. Alat : Timbangan, gelas ukur, blender, panci, tampah, kompor, pengaduk, saringan plastik

### **2. Pembuatan Starter**

- a. Bahan : susu sapi segar, kultur murni dari bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan khamir *Candida kefir*, larutan pengencer
- b. Alat : Tabung reaksi, jarum ose, vortex, saringan plastik, *hot plate*, beaker glass, corong, lampu bunsen, aluminium foil.

### **3. Penghitungan Total Bakteri Metode Hitungan Cawan**

- a. Bahan : Sampel (starter), larutan pengencer, media PCA
- b. Alat : cawan petri, tabung reaksi, inkubator

### **4. Pembuatan kefir**

- a. Bahan : Susu Kacang Hijau, glukosa, starter kefir
- b. Alat : Panci, pengaduk, saringan plastic, kompor, lampu Bunsen, corong, beaker glass, aluminium foil.

### **5. Pengujian Aktivitas Antibakteri metode difusi agar**

a. Bahan : Kultur bakteri *Escherichia coli* (gram-negatif) berumur 18 – 24 jam dalam Nutrien Broth (NB), media Nutrien Agar (NA), sampel (kefir)

b. Alat : Cawan Petri, inkubator, jangka sorong

#### **6. Simulasi "gastric juice" (In vitro)**

a. Bahan : enzim pepsin 50g/L, 2000 FIB-U/g, aquades, HCl 2N, sodium asetat, NaOH 1N, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, (MgCl<sub>2</sub>, 0.06 mol/L CaCl<sub>2</sub> 0.3 mol/L), enzim pankreatinin 40 g/L 8x USP

b. Alat : tabung reaksi, beaker glass, pengaduk, pipet, inkubator

#### **7. Pengukuran pH**

a. Bahan : Sampel (kefir), aquades, buffer pH 4, buffer pH 7, kertas tissue

b. Alat : pH meter

#### **8. Pengukuran Total Asam**

a. Bahan : Sample (kefir), aquades, indikator PP, NaOH 0.1N

b. Alat : Labu ukur, buret, erlenmeyer, pipet tetes

#### **9. Pengukuran Kadar Alkohol**

a. Bahan : Sampel (kefir), aquades

b. Alat : Labu ukur, labu destilasi

## **F. Prosedur**

### **1. Pembuatan Susu Kacang Hijau**

Proses pembuatan dimulai dengan kacang hijau disortasi (dipisahkan dari kotoran dan biji rusak) untuk mendapatkan kacang hijau yang berkualitas bagus. Kemudian direndam dalam air dengan rasio air dengan kacang hijau adalah 3 : 1 selama 8 jam, perendaman ini bertujuan untuk mengurangi energi penggilingan, padatan terdispersi dan tersuspensi lebih baik selama ekstraksi, produksi susu lebih tinggi dan waktu pemasakan lebih singkat (Kanetro dan Hastuti, 2006). Setelah direndam kacang hijau ditiriskan dan dididihkan selama 20 menit dengan tujuan untuk melunakkan kacang hijau, menghilangkan bau langu (*off flavor*) dan mengurangi zat antigizi. Kemudian kacang hijau digiling menggunakan blender ditambah air mendidih sehingga jumlah air secara keseluruhan mencapai 8 kali lipat bobot kacang hijau kering. Penambahan air panas untuk mempermudah proses pelumatan dan menghilangkan bau langu (Mudjajanto dan Kusuma, 2005). Bubur encer disaring dengan saringan plastik dan filtratnya merupakan susu kacang hijau. Susu kacang hijau dipasteurisasi pada suhu 85°C selama 30 menit.

### **2. Pembuatan Starter**

Starter yang digunakan untuk pembuatan kefir susu kacang hijau berasal dari susu sapi dengan inokulan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan khamir *Candida kefir* yang diperoleh dari laboratorium PAU Pangan

Universitas Gajah Mada (UGM) Yogyakarta. Kultur murni bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dari agar miring diambil 1 ose dimasukkan dalam 2 ml larutan pengencer kemudian di vortex, demikian juga untuk khamir *Candida kefir*. Pindahan kultur ke larutan pengencer bertujuan agar mudah dituang pada media susu sapi. Susu sapi dipasteurisasi pada suhu 85°C selama 30 menit untuk membunuh mikroba kontaminan sehingga mikroba dalam kultur dapat tumbuh lebih leluasa (Rahman *et al.*, 1992). Kemudian susu didinginkan sampai suhu ruang dengan tujuan agar kultur murni yang ditambahkan tidak mati. Setelah agak dingin ditambahkan kultur murni dari bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan khamir *Candida kefir*, kemudian diinkubasi pada suhu 22–23°C selama 20 jam. Kemudian didinginkan pada suhu 10°C selama 2 hari untuk pematangan agar diperoleh starter dengan kualitas optimal..

Sebelum digunakan starter yang telah siap dihitung terlebih dahulu jumlah mikrobanya dengan metode Hitungan Cawan dan jumlah koloni dihitung berdasarkan Standart Plate Count (SPC). Dari analisis diperoleh jumlah mikroba sebanyak  $4,025 \times 10^6$  cfu/ml. Jumlah tersebut sesuai dengan Buttock and Azam (1998) bahwa jumlah bakteri asam laktat yang diperlukan  $10^6$  dan jumlah khamir  $10^6 - 10^7$  cfu/ml agar fermentasi berjalan dengan baik. Starter yang dihasilkan berwarna putih, tekstur kental, aroma asam khas kefir.

### 3. Penghitungan Total Bakteri Metode Hitungan Cawan

Sampel diencerkan dengan cara diambil 1 ml dimasukkan dalam tabung berisi 9 ml larutan pengencer ( $10^{-1}$ ) kemudian diambil 1 ml dimasukkan dalam 9 ml larutan pengencer ( $10^{-2}$ ) demikian seterusnya sampai pengenceran  $10^{-5}$ . Pengenceran secara desimal memudahkan dalam perhitungan jumlah koloni. Mulai pengenceran  $10^{-3}$  diambil 1 ml dituang pada cawan petri kemudian dituangkan PCA, digoyang dan dibiarkan padat., diinkubasi pada suhu  $30 - 32^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Jumlah koloni dihitung berdasarkan Standart Plate Count (SPC) (Fardiaz, 1987)

### 4. Pembuatan Kefir

Susu kacang hijau dipanaskan pada suhu  $85^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit dengan tujuan untuk membunuh mikroba kontaminan sehingga mikroba dalam kultur dapat tumbuh lebih leluasa (Rahman *et al.*, 1992). Kemudian ditempatkan pada erlenmeyer sebanyak 200 ml ditambah glukosa 20 gram atau 10% (b/v). Penambahan glukosa bertujuan untuk menyediakan nutrisi yang dibutuhkan mikroba untuk memperoleh energi, pertumbuhan, bahan pembentuk sel dan biosintesa produk-produk metabolisme (Rahman, 1989). Susu didinginkan sampai suhu ruang, ditambahkan starter sebanyak 5 %, 10 % dan 15 % (v/v). Diinkubasi pada suhu  $43^{\circ}\text{C}$ , karena suhu optimum untuk pertumbuhan kultur yoghurt adalah  $40 - 45^{\circ}\text{C}$  (Rahman *et al.*, 1992) . Waktu inkubasi selama 6 jam, 8 jam dan 10 jam. Pematangan kefir pada suhu  $10^{\circ}\text{C}$  selama 2 hari. Selain kefir susu

kacang hijau dibuat juga kefir susu sapi sebagai pembandingan dengan prosedur sama dengan kefir susu kacang hijau.

Kefir yang dihasilkan secara fisik hampir sama untuk semua perlakuan, warna coklat kehijauan lebih terang dibanding susu kacang hijau sebelum fermentasi, tekstur kental lebih kental dibanding sebelumnya, aroma asam khas kefir. Kefir yang telah dimatangkan kemudian dianalisis antibakteri, pH, total asam dan alkohol.

#### **5. Pengujian Aktivitas Antibakteri (Fardiaz, 1987)**

Analisis aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar menggunakan bakteri *Escherichia coli* (gram-negatif) berumur 24 jam dalam Nutrien Broth (NB). Kultur bakteri *E. coli* sebanyak 1ml dimasukkan ke dalam cawan petri. Dituangkan media Nutrient Agar (NA) sebanyak 20 ml, dibiarkan membeku. Dimasukkan kertas cakram dengan diameter 6 mm yang telah dicelup dalam sampel (kefir susu kacang hijau, kefir susu sapi dan antibiotik ampicilin). Diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Diamati daerah zona bening yang terbentuk dan diukur diameternya.

#### **6. Simulasi "gastric juice" (In Vitro) (Aura, 2005 dan Anna et al., 2007)**

Sampel (kefir) sebanyak 5 ml dimasukkan dalam beaker glass, ditambah 1 ml enzim pepsin kemudian pH diatur sampai 1.5 dengan HCl

2N dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2 jam. Selama diinkubasi sampel diaduk setiap 10 menit. Setelah inkubasi dengan pepsin, sampel ditambah 10 ml buffer sodium asetat (pH 5.0, 0.5 mol/L) dan pH diatur sampai 7.0 dengan NaOH 1 N. Kedalam beaker ditambahkan 125 µL MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, 125 µL pankreatin dan 0.05 L aquadest kemudian ditutup dengan parafilm diinkubasi pada suhu 40 °C dengan pemutaran konstan 100 rpm selama 3 jam. Setelah perlakuan tersebut kefir diuji lagi aktivitas antibakterinya. Untuk simulasi gastric juice aktivitas antibakteri diuji dengan 2 macam bakteri yaitu *Escherichia coli* (gram negatif) dan *Staphylococcus aureus* (gram positif). Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan terhadap bakteri-bakteri dari kelompok patogen penyebab keracunan makanan seperti *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Selain itu *E. coli* merupakan bakteri penyebab infeksi saluran pencernaan, sedangkan *S. aureus* merupakan bakteri penyebab impetigo (pembengkakan pada lapisan epidermis kulit), furuncle (radang di jaringan sub kutan), dan carbuncle (peradangan yang meluas dan mengenai folikel rambut) (Ardiansah, 2005)

## **7. Pengukuran pH (Sudarmadji , 1989)**

### **a). 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.

b). 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 (kefir susu kacang hijau dan kefir susu sapi) dan pH-meter diset pada pengukuran pH. Elektroda dibiarkan beberapa saat sampai jarum pH-meter stabil. Jarum pH-meter menunjukkan pH contoh.

### **8. Pengukuran Total Asam (Asam Laktat) (Ranggana, 1997)**

Sampel (kefir susu kacang hijau dan kefir susu sapi) sebanyak 10 ml 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 – 3 tetes. Dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N (yang distandarisasi terlebih dahulu dengan HCl diperoleh hasil NaOH 0,1058 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 di bawah ini :

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

### 9. Pengukuran Kadar Alkohol (James 1995)

Sampel (kefir susu kacang hijau dan kefir susu sapi) sebanyak 25 ml ditambah 50 ml aquades. 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

Pembacaan kadar etanol berdasarkan berat jenis sampel pada tabel *specific gravity ethanol* (% b/V) (Lampiran 1).

## **G. Analisis Data**

### **1. Penelitian Tahap I**

Hasil uji pendahuluan dianalisis dengan pengamatan secara organoleptik untuk menentukan produk yang digunakan dalam penelitian tahap II.

### **2. Penelitian Tahap II**

Data aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau, pH, total asam dan kadar alkohol diuji secara statistik dengan *Analisis of Varians* (ANOVA) dengan menggunakan software SPSS 11,5. Bila p value <0.05 maka  $H_0$  ditolak dan  $H_1$  diterima. Apabila diantara perlakuan terdapat pengaruh nyata maka dilanjutkan dengan uji Tukey *Honestly Significance Difference* (HSD) pada taraf 5% (Steel dan Torrie, 1993). Data sifat kimia yang meliputi pH, total asam juga dibandingkan dengan Standar Nasional Indonesia (SNI) Yoghurt (Lampiran 2)

### **3. Penelitian Tahap III**

Analisis data aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau sebelum dan sesudah melalui simulasi *gastric juice* diuji secara statistik dengan *t-test*.

## **H. Definisi Operasional**

### **1. Kefir Susu Kacang Hijau :**

Adalah susu kacang hijau yang telah difermentasi dengan starter yang terdiri *Lactobacillus bulgaricus* dan khamir *Candida kefir* dengan jumlah starter dan lama fermentasi yang berbeda.

## **2. Jumlah Starter :**

Adalah suspensi yang terdiri dari kultur murni *Lactobacillus bulgaricus* dan khamir *Candida kefir* sebanyak 5%, 10%, 15% dari volume susu kacang hijau yang digunakan untuk memfermentasi susu kacang hijau menjadi kefir .

## **3. Lama Fermentasi**

Adalah lama proses fermentasi susu kacang hijau menjadi kefir setelah penambahan starter dibedakan 6 jam, 8 jam dan 10 jam pada suhu 43°C.

## **4. Aktivitas Antibakteri**

Adalah kemampuan kefir menghambat pertumbuhan mikroba patogen (*Escherichia coli* dan *Staphilococcus aureus*) dianalisis dengan metode difusi agar dengan cara mengukur diameter zona bening dengan satuan mm.

## **5. Simulasi *gastric juice* (In vitro)**

Adalah simulasi pencernaan untuk mengetahui aktivitas antibakteri setelah melalui saluran pencernaan dengan menggunakan enzim pencernaan yaitu pepsin dan pankreatin.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Kefir Susu Sapi

Kefir susu sapi dibuat dengan jumlah glukosa 10%, jumlah starter 10% dan lama fermentasi 8 jam. Kefir susu sapi digunakan sebagai standar/pembanding, hasil analisis dapat dilihat pada Tabel 4.

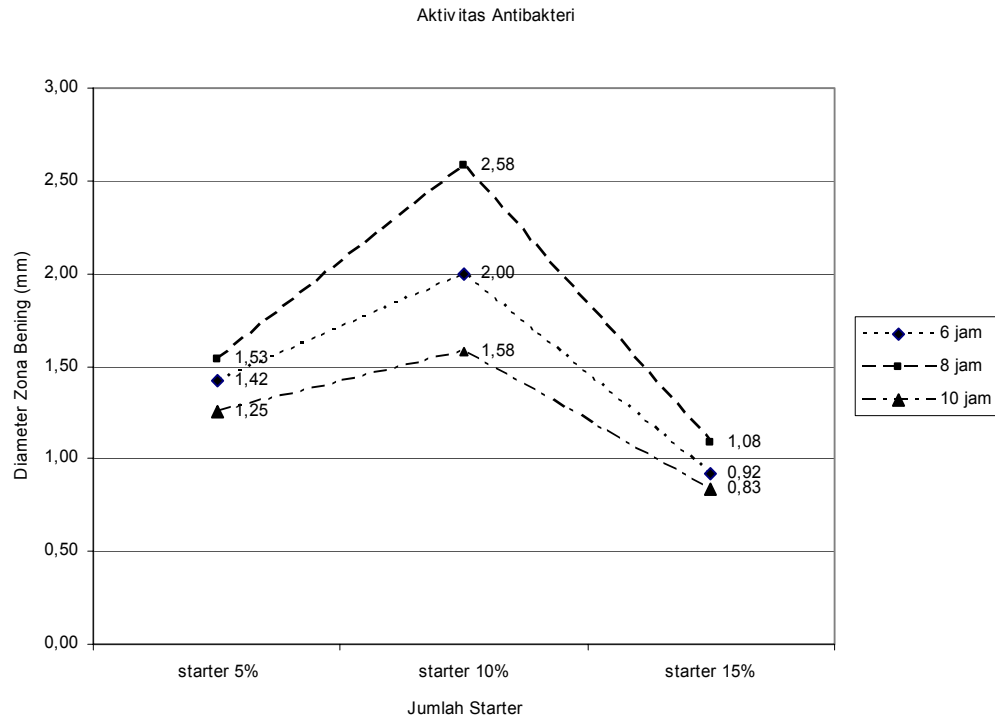
Tabel 4. Hasil Analisis Kefir Susu Sapi

<b>Parameter</b>	<b>Nilai</b>	<b>Satuan</b>
Aktivitas Antibakteri	2,00	mm
pH	4,54	-
Total asam	1,85	%
Kadar Alkohol	0,986	%

Hasil analisis kefir susu sapi untuk aktivitas antibakteri adalah 2,00 mm, pH sebesar 4,54, total asam sebesar 1,85% dan kadar alkohol sebesar 0,986%. Hasil analisis ini digunakan sebagai pembanding dari kefir susu kacang hijau yang dibuat dengan variasi jumlah starter dan lama fermentasi. Kefir susu sapi digunakan sebagai pembanding dengan alasan bahwa kefir yang beredar di pasaran yang sudah bisa diterima masyarakat luas adalah kefir dari susu sapi, apakah kefir susu kacang hijau mempunyai aktivitas antibakteri dan sifat kimia yang sama dengan kefir susu sapi.

## B. Aktivitas Antibakteri

Analisis aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar. Hasil analisis aktivitas antibakteri kefir ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau dengan variasi jumlah starter dan lama fermentasi

Aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau yang diukur dengan diameter zona bening berkisar antara 0,83 – 2,58 mm. Pada perlakuan jumlah starter 10% lama fermentasi 8 jam zona penghambatannya berdiameter paling tinggi yaitu 2,58 mm dan jumlah starter 15% lama fermentasi 10 jam zona penghambatan terendah dengan diameter 0,83 mm. Sebagai pembanding digunakan kefir susu sapi diameter zona

bening sebesar 2,0 mm. Hasil-hasil ini menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau lebih baik dari susu sapi pada perlakuan yang sama. Menurut Ardiansyah (2005) ketentuan kekuatan antibakteri adalah sebagai berikut : daerah hambatan 20 mm atau lebih berarti sangat kuat, daerah hambatan 10 - 20 mm (kuat), 5 -10 mm (sedang), dan daerah hambatan 5 mm atau kurang (lemah). Hasil penelitian jika dibandingkan dengan standar tersebut masuk kategori aktivitas antibakteri lemah, baik kefir susu sapi maupun kefir susu kacang hijau.

Untuk membandingkan antibakteri dalam sistem pangan dan antibakteri sebagai pengobatan maka digunakan antibiotik murni yaitu antibiotik ampicilin dengan konsentrasi 10% yang diuji pula aktivitas antibakterinya. Hasil pengukuran menunjukkan antibiotik ampicilin memiliki daerah hambatan sebesar 25 mm jika dibandingkan dengan standar masuk kategori sangat kuat.

Aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau masuk kategori lemah sedangkan antibiotik ampicilin masuk kategori sangat kuat, hal ini menunjukkan bahwa antibakteri dalam kefir yang merupakan sistem pangan tidak sama dengan antibiotik yang digunakan untuk pengobatan. Menurut Surono (2004), penggunaan antibiotik yang bertujuan untuk membunuh bakteri jahat, akan membunuh bakteri baik pula. Hal ini akan menyebabkan ketidakseimbangan mikroflora usus, yang akan berakibat terjadinya diare berkepanjangan, sedangkan konsumsi kefir yang

mengandung bakteri asam laktat berperan positif menjaga keseimbangan mikroflora usus serta membantu meningkatkan sistem kekebalan tubuh yang dikenal sebagai efek probiotik.

Aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau lebih tinggi dibanding kefir susu sapi, kemungkinan disebabkan kandungan karbohidrat kacang hijau lebih tinggi dibanding susu sapi. Menurut Muchtadi dan Sugiyono (1992) kandungan karbohidrat total kacang hijau 58% dan kandungan karbohidrat susu sapi yang utama adalah laktosa sebesar 4,8%. Hidrolisa karbohidrat baik oleh asam atau enzim akan menyebabkan menurunnya pH sehingga semakin banyak karbohidrat yang dihidrolisis akan semakin rendah pH akan menyebabkan aktivitas antibakteri akan lebih tinggi.

Tabel 5. Hasil Analisis Keragaman Aktivitas Antibakteri

No.	Variabel	F hitung	p
1.	Jumlah Starter	14,62	0,00
2.	Lama Fermentasi	3,07	0,07
3.	Jumlah Starter, Lama Fermentasi	0,71	0,59

Hasil analisis keragaman (Tabel 5) menunjukkan bahwa jumlah starter berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap aktivitas antibakteri. Sedangkan lama fermentasi dan interaksi jumlah starter dan lama fermentasi tidak berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri. Hasil uji HSD

(Tabel 6) menunjukkan jumlah starter 5% dan 15% tidak berbeda nyata, sedangkan 5% dan 15% berbeda nyata terhadap jumlah starter 10%.

Tabel 6. Uji Tukey (HSD) Aktivitas Antibakteri

Jumlah Starter (%)	Aktivitas Antibakteri (mm)	HSD ( $\alpha = 0,05$ )
5	1,40 <sup>a</sup> ( $\pm 0,41$ )	Sig. 0,09 <sup>1</sup>
10	2,06 <sup>b</sup> ( $\pm 0,56$ )	Sig. 1,00 <sup>2</sup>
15	0,94 <sup>a</sup> ( $\pm 0,41$ )	Sig. 0,09 <sup>1</sup>

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

Jumlah starter berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri, semakin banyak starter yang ditambahkan maka semakin banyak asam laktat yang terbentuk sampai batas tertentu. Dari hasil penelitian jumlah starter 10% menunjukkan aktivitas antibakteri paling tinggi, sedangkan jumlah starter 15% lebih rendah. Hal ini dapat disebabkan oleh asam laktat yang dihasilkan terlalu banyak maka akan membunuh sebagian bakteri sehingga asam laktat yang dihasilkan lebih sedikit, pada jumlah starter 5% asam yang dihasilkan juga rendah karena jumlah awal yang ditambahkan sedikit. Kondisi semacam ini seperti yang terjadi pada pertumbuhan mikroba susu yang dikemukakan Winarno *et al*, 1980, susu segar pada umumnya mengandung beberapa macam mikroba, pada awalnya oleh *Streptococcus lactis* sehingga dapat menghasilkan asam laktat. Tetapi pertumbuhan akan terhambat oleh keasaman yang dihasilkannya sendiri, kemudian tumbuh bakteri *Lactobacillus* yang lebih toleran terhadap asam.

*Lactobacillus* menghasilkan asam lebih banyak lagi sehingga dapat menghambat pertumbuhannya.

Lama fermentasi tidak berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri, hal ini menunjukkan peningkatan lama fermentasi 2 jam belum ada beda aktivitas antibakteri dan kemungkinan jika waktu fermentasi diperpanjang lebih 10 jam akan diperoleh aktivitas antibakteri yang maksimal seperti hasil penelitian Enshasy *et al*, 2007 bahwa aktivitas antibakteri dihasilkan pada fase *decay* yaitu fase pada saat substrat mulai habis, penelitian pada antibiotik rifamycin yang dihasilkan oleh *Amycolaptosis mediterranei*. 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 pada suhu 30°C dengan media pertumbuhan yang ditambahkan 20-40 gram/L glukosa.

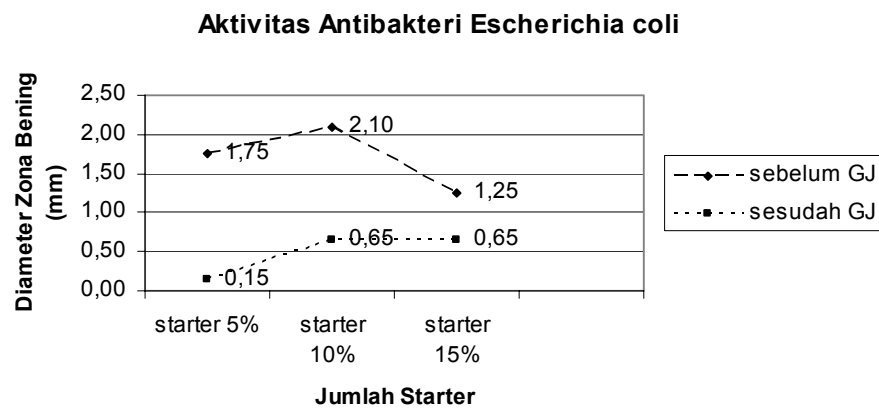
Hasil tersebut berbeda dengan penelitian Kunaepah (2008) pada kefir susu kacang merah menunjukkan lama fermentasi berpengaruh nyata terhadap aktivitas antibakteri dengan diameter zona bening paling tinggi 1,5 mm pada perlakuan lama fermentasi 24 jam suhu ruang dan jumlah glukosa 5%, hal ini kemungkinan disebabkan oleh suhu dan waktu yang berbeda, pada penelitian dilakukan pada suhu 43,5°C dan waktu 6, 8 dan 10 jam berbeda dengan 24 jam sehingga ada waktu lebih lama dalam memproduksi asam yang berpengaruh terhadap aktivitas antibakterinya.

Sedangkan penelitian Supriyono (2008) pada kefir susu kacang hijau menunjukkan jumlah starter dan konsentrasi glukosa berpengaruh nyata terhadap total polifenol dengan nilai paling tinggi 0,054 mg/ml pada perlakuan jumlah starter 10% dan jumlah glukosa 10%. Hasil tersebut sama dengan aktivitas antibakteri hasil penelitian paling tinggi pada perlakuan jumlah starter 10% dengan jumlah glukosa 10%, hal ini menunjukkan bahwa polifenol juga berfungsi sebagai antibakteri dimana antibakteri diperoleh dari asam laktat yang dihasilkan oleh *L. bulgaricus* dan *C. kefir* sebagai starter. Sedangkan total polifenol berasal dari senyawa asam hidroksi sinamat maupun asam ferulat yang didekarboksilasi menjadi senyawa fenol oleh enzim dari *L. bulgaricus* dan *C. kefir*.

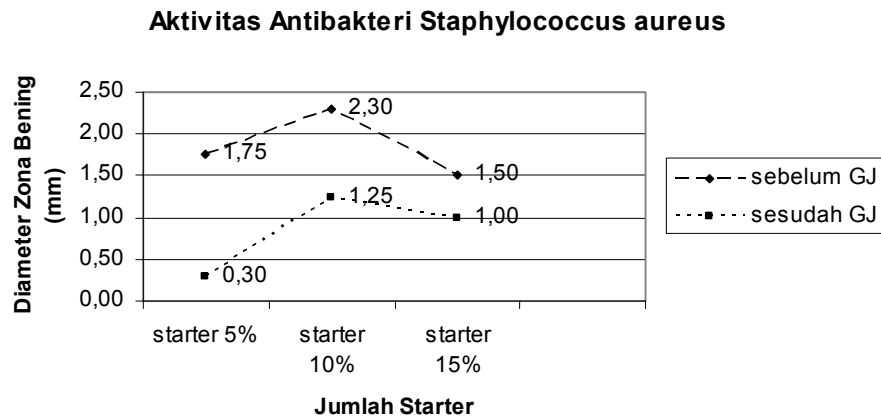
Interaksi jumlah starter dan lama fermentasi tidak berpengaruh nyata terhadap aktivitas antibakteri, hal ini kemungkinan disebabkan kombinasi jumlah starter dan lama fermentasi dalam penelitian tidak sebanding seperti yang dikemukakan oleh Rahman *et al.*, (1992) bahwa lamanya waktu inkubasi tergantung dari jumlah inokulum dan aktivitas kultur. Sehingga dapat disimpulkan aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau pada penelitian ini dipengaruhi oleh jumlah starter dengan aktivitas antibakteri paling tinggi pada perlakuan jumlah starter 10%, sedangkan lama fermentasi dan interaksi jumlah starter dan lama fermentasi tidak berpengaruh.

### C. Aktivitas Antibakteri Kefir Susu Kacang Hijau Setelah Melalui Simulasi *Gastric Juice*

Aktivitas antibakteri paling efektif dari perlakuan sebelumnya diuji dengan simulasi *gastric juice* untuk mengetahui aktivitasnya setelah melalui saluran pencernaan. Berdasarkan hasil analisis keragaman yang telah disebutkan sebelumnya menunjukkan jumlah starter berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri sehingga perlakuan yang diuji dengan simulasi *gastric juice* adalah jumlah starter 5%, 10% dan 15% dengan lama fermentasi 8 jam. Bakteri untuk analisis antibakteri digunakan *Escherichia coli* (gram negatif) dan *Staphylococcus aureus* (gram positif). Hasil analisis ditunjukkan pada Gambar 6 dan 7.



Gambar 6. Aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau dengan *Escherichia coli* sebelum dan sesudah *gastric juice*(GJ)



Gambar 7. Aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau dengan *Staphylococcus aureus* sebelum dan sesudah *gastric juice*(GJ)

Gambar 6 dan 7 menunjukkan ada penurunan aktivitas antibakteri sesudah melalui simulasi *gastric juice*, baik pada uji terhadap *E.coli* maupun *S.aureus*. Hasil analisis uji t menunjukkan tidak ada beda nyata ( $p > 0,05$ ) aktivitas antibakteri sebelum dan sesudah melalui *gastric juice* untuk bakteri gram negatif maupun gram positif ( $p > 0,05$ ) dengan hasil selengkapnya ditunjukkan pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Analisis uji beda Aktivitas Antibakteri sebelum dan sesudah melalui *gastric juice*.

No.	Bakteri	T hitung	p
1.	<i>Escherichia coli</i>	3,90	0,06
2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	3,63	0,07

Aktivitas antibakteri sebelum dan sesudah melalui *gastric juice* tidak berbeda nyata (Tabel 7) sehingga dapat disimpulkan aktivitas

antibakteri sesudah melalui *gastric juice* masih efektif. Aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau terhadap *Staphylococcus aureus* (gram positif) lebih tinggi dari pada *Escherichia coli* (gram negatif). Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Hartini (2004) bahwa aktivitas antibakteri campuran ekstrak buah adas dan kulit batang pulosari terhadap *Staphylococcus aureus* lebih besar dibanding *Escherichia coli*, demikian juga penelitian Ardiansyah (2005) menunjukkan aktivitas antibakteri ekstrak daun beluntas paling tinggi terhadap *Salmonella* diikuti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas fluorescens* dengan diameter zona hambatan masuk kategori sedang (5 – 10 mm) serta penelitian lain (Ulusoy *et al.*, 2007) bahwa aktivitas antibakteri kefir yang diinkubasi 24 dan 28 jam paling luas adalah *S.aureus* diikuti *E.coli*, *B.cereus*, *S.entereditas* dan *L.monosigenes*.

Hasil-hasil penelitian tersebut menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *S.aureus* (gram positif) lebih tinggi dibanding *E.coli* (gram negatif). Hal ini kemungkinan karena keduanya mempunyai dinding sel yang berbeda. Dinding sel bakteri mengandung peptidoglikan yang terletak di luar membran sitoplasmik. *Peptidoglikan* yaitu gabungan protein dan polisakarida. *Peptidoglikan* berperan dalam kekerasan dan memberikan bentuk sel. Pada bakteri gram positif 90% dinding selnya terdiri atas lapisan *peptidoglikan* selebihnya adalah asam teikoat, sedangkan bakteri gram negatif komponen dinding selnya hanya mengandung 5 – 20% *peptidoglikan* selebihnya terdiri dari protein,

lipopolisakarida dan lipoprotein (Ardiansyah, 2007). *Peptidoglikan* pada kedua jenis bakteri merupakan komponen yang menentukan rigiditas pada gram positif dan berperan pada integritas gram negatif. Oleh karena itu gangguan pada sintesis komponen ini dapat menyebabkan sel lisis dan dapat menyebabkan kematian sel (Huda, 2008).

Kefir susu kacang hijau yang difermentasi oleh *Lactobacillus bulgaricus* dan *Candida kefir* ini diharapkan memiliki efek probiotik. Syarat-syarat sebagai probiotik adalah mampu menempel pada mukosa usus, mampu berkolonisasi, dapat berinteraksi (*cross talk*) dengan sel epitel usus, sehingga dapat menstimulir sistem imun dan dapat mengusir bakteri patogen. Untuk itu didalam penelitian dilakukan simulasi *gastric juice* untuk mengetahui apakah kefir susu kacang hijau yang dihasilkan aktivitas antibakterinya masih dapat bertahan setelah sampai didalam saluran pencernaan.

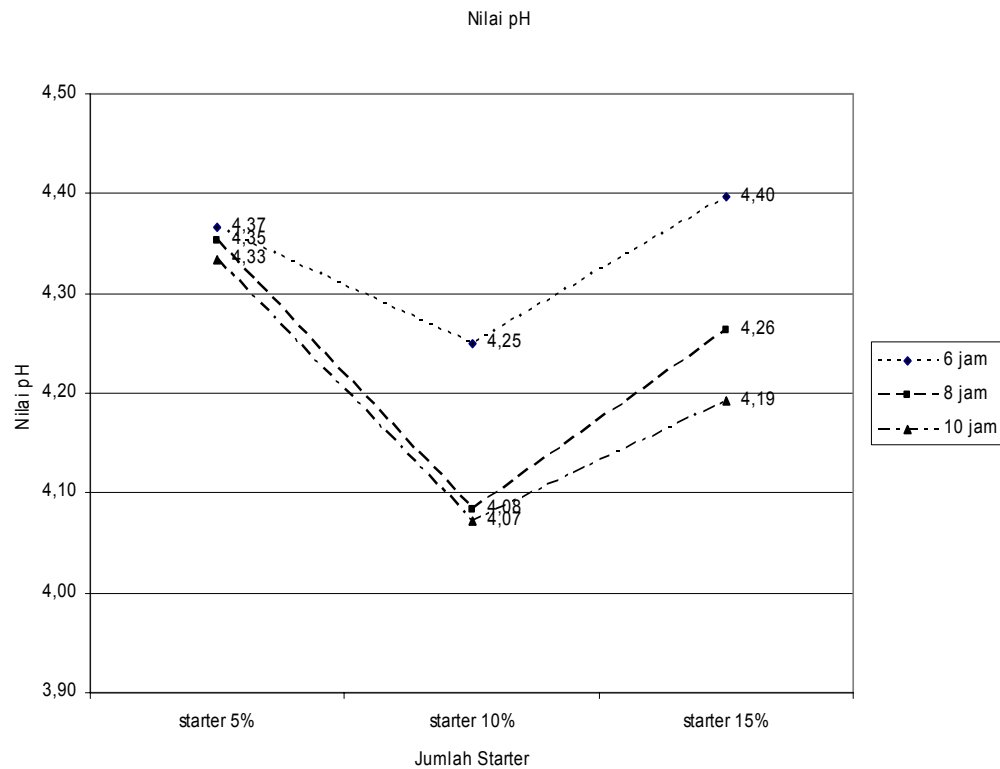
Menurut Surono (2004), banyak rintangan harus dihadapi oleh mikroba dalam saluran pencernaan mulai dari mulut sampai anus. Pada perjalanan melintasi berbagai sistem pencernaan, khususnya dari mulut hingga usus halus hambatan yang dijumpai diantaranya enzim lisozim pada air liur, asam lambung, garam empedu yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yaitu asam laktat. Bakteri probiotik harus mampu bertahan dalam menghadapi rintangan-rintangan tersebut agar dapat mencapai

usus dalam keadaan tetap hidup dalam jumlah yang memadai untuk berkembang biak dan menyeimbangkan mikrobiota dalam usus.

Aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau masih dapat dipertahankan sesudah melalui simulasi *gastric juice* dimana telah terpapar enzim pepsin pada pH 1,5 dan enzim pankreatin pada pH 7. Hal ini kemungkinan bakteri asam laktat dalam kefir maupun senyawa-senyawa aktif dalam kefir susu kacang hijau mampu bertahan dalam asam lambung, garam empedu dan enzim-enzim pencernaan sehingga tetap dapat menunjukkan aktivitasnya melawan bakteri patogen yang digunakan sebagai bakteri uji yaitu *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Kondisi tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan Kar dan Misra (2007) bahwa jumlah sel hidup dari minuman fermentasi *wheyghurt* dalam usus tikus setelah 2 – 3 jam pencernaan paling tinggi yang ada di lambung dan terendah di duodenum. Ini berkaitan dengan garam empedu dalam duodenum yang dapat menyerap air dan gas sel bakteri sehingga menghambat pertumbuhan mikroba tersebut, hal ini menunjukkan mikroba dalam *wheyghurt* dapat melawan organisme dalam lambung setelah 3 jam pemberian makan.

#### **D. Nilai pH**

Nilai pH kefir susu kacang hijau diukur dengan pH meter, hasil pengukuran dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Nilai pH kefir susu kacang hijau dengan variasi jumlah starter dan lama fermentasi

Nilai pH berkisar antara 4,07 – 4,40 dengan nilai tertinggi pada perlakuan jumlah starter 15% lama fermentasi 6 jam dan nilai terendah pada perlakuan jumlah starter 10% lama fermentasi 10 jam. Sebagai pembandingan kefir susu sapi nilai pH adalah 4,54. Hasil ini menunjukkan bahwa nilai pH kefir susu kacang hijau lebih rendah dibanding kefir susu sapi pada perlakuan yang sama.

Tabel 8. Hasil Analisis Keragaman nilai pH

No.	Variabel	F hitung	p
1.	Jumlah Starter	16,46	0,00
2.	Lama Fermentasi	6,97	0,00
3.	Jumlah Starter, Lama Fermentasi	1,20	0,34

Hasil analisis keragaman (Tabel 8) menunjukkan bahwa jumlah starter berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap nilai pH. Lama fermentasi juga berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap nilai pH. Sedangkan interaksi jumlah starter dan lama fermentasi tidak berpengaruh pada nilai pH. Jumlah starter 5% tidak berbeda nyata dengan 10%, sedangkan jumlah starter 5% dan 10% berbeda nyata terhadap 15%. Lama fermentasi 6 jam berbeda nyata dengan 8 jam dan 10 jam, hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 9 dan 10.

Tabel 9. Uji Tukey (HSD) pH (jumlah starter)

Jumlah Starter (%)	pH	HSD ( $\alpha = 0,05$ )
5	4,35 <sup>b</sup> ( $\pm 0,08$ )	Sig. 0,21 <sup>2</sup>
10	4,14 <sup>a</sup> ( $\pm 0,09$ )	Sig. 1,00 <sup>1</sup>
15	4,28 <sup>b</sup> ( $\pm 0,11$ )	Sig. 0,21 <sup>2</sup>

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

Tabel 10. Uji Tukey (HSD) pH (lama fermentasi)

Lama Fermentasi (jam)	pH	HSD ( $\alpha = 0,05$ )
6	4,33 <sup>b</sup> ( $\pm 0,10$ )	Sig. 1,00 <sup>2</sup>
8	4,23 <sup>a</sup> ( $\pm 0,14$ )	Sig. 0,68 <sup>1</sup>
10	4,20 <sup>a</sup> ( $\pm 0,12$ )	Sig. 0,68 <sup>1</sup>

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

Jumlah starter berpengaruh terhadap pH kefir, jumlah starter 10% menunjukkan pH paling rendah, ini berarti lebih asam dibanding jumlah starter 5% dan 15%. Semakin banyak starter yang ditambahkan maka semakin banyak asam yang dihasilkan tetapi pada penelitian ini asam yang dihasilkan paling optimal dengan jumlah starter 10%. Hal ini kemungkinan karena dengan jumlah starter 15% jumlah mikroba terlalu banyak sehingga asam yang dihasilkan akan membunuh sebagian mikroba sehingga asam yang dihasilkan lebih sedikit hal ini sama dengan pengaruh jumlah starter terhadap aktivitas antibakteri.

Lama fermentasi berpengaruh terhadap pH kefir, lama fermentasi 10 jam menunjukkan pH paling rendah dibanding 6 jam dan 8 jam. Semakin lama waktu fermentasi maka semakin banyak asam yang dihasilkan sehingga pH semakin turun. Keadaan ini kemungkinan tidak berlaku seterusnya karena kurva pertumbuhan bakteri melalui fase-fase seperti dikemukakan Fardiaz (1988). Lama fermentasi 10 jam kemungkinan masih masuk pada fase logaritmik sehingga asam yang

dihasilkan lebih banyak, jika lama fermentasi diperpanjang kemungkinan akan masuk fase pertumbuhan lambat kemudian fase statis dan akhirnya mati. Disamping fase pertumbuhan mikroba berpengaruh terhadap asam yang dihasilkan juga disebabkan kultur bakteri dalam keadaan pertumbuhan yang seimbang akan menyerupai reaksi kimia katalitik order pertama dimana kecepatan pertumbuhannya akan sesuai dengan jumlah sel atau massa sel per satuan waktu yang disebut dengan laju pertumbuhan spesifik (Fardiaz, 1988).

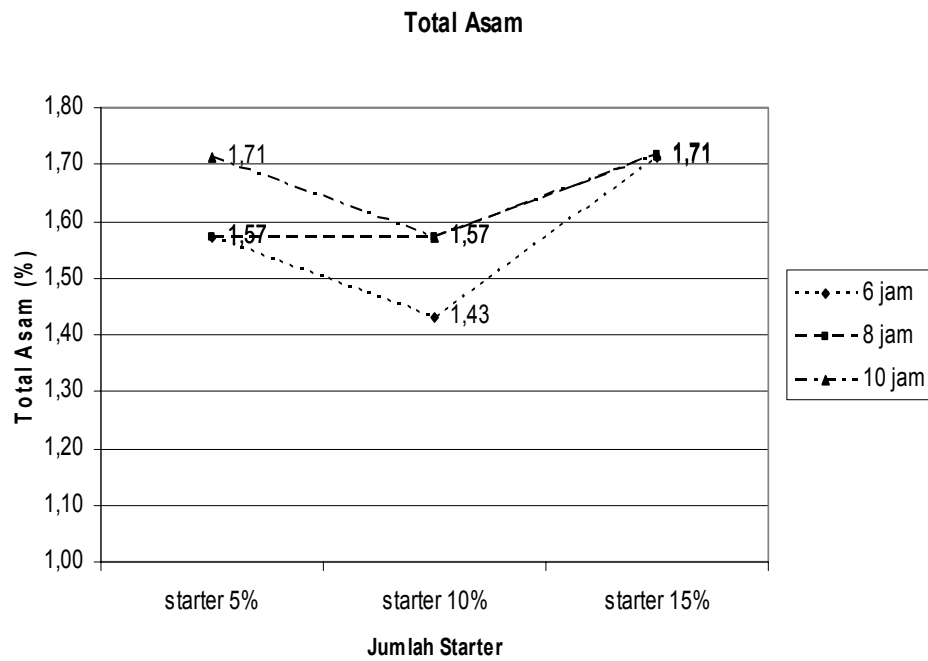
Kefir dibuat dengan kultur bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan khamir *Candida kefir*, simbiosis ini dapat mempercepat proses fermentasi. Bakteri asam laktat dan khamir bekerja sama secara mutualisme yaitu saling menguntungkan, dimana asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri asam laktat lebih lanjut, akan dimanfaatkan oleh khamir, dan  $H_2O_2$  yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat akan disingkirkan oleh katalase yang dihasilkan oleh khamir. Selanjutnya khamir akan menghasilkan senyawa yang menstimulir pertumbuhan bakteri asam laktat (Surono, 2004).

Menurut Albaarri dan Murti (2003) produk fermentasi dipengaruhi oleh kemampuan starter dalam membentuk asam laktat yang ditentukan oleh jumlah dan jenis starter yang digunakan. Ditambahkan pula bahwa untuk simbiosis akan menghasilkan pH yang lebih rendah dan keasaman setara asam laktat yang lebih tinggi daripada kultur tunggal. Penggumpalan pada susu fermentasi dapat terjadi akibat tercapainya titik

isoelektrik pada pH 4,6 saat casein berubah strukturnya menjadi gel. Pendapat ini mendukung adanya kenyataan bahwa tekstur susu fermentasi kefir adalah menggumpal, karena mendekati titik isoelektrik. Hasil analisis pH kefir susu kacang hijau adalah berkisar 4,07 hingga 4,40. Data yang didapat, sesuai dengan Albaarri dan Murti (2003), bahwa susu yang diinokulasi *Lactobacillus bulgaricus* dari berbagai strain dapat menghasilkan pH berkisar 3,73 sampai 5,10.

#### **E. Total Asam**

Pengukuran total asam sebagai asam laktat dengan metode titrasi menurut Ranggana (1997) dapat dilihat pada Gambar 9. Total asam berkisar antara 1,43 – 1,71 dengan nilai yang hampir merata pada semua perlakuan. Hasil ini sesuai dengan SNI yoghurt jumlah asam berkisar antara 0,5 – 2,0. Sebagai pembanding kefir susu sapi total asam adalah 1,85 . Hasil ini menunjukkan bahwa total asam kefir susu kacang hijau lebih rendah dibanding kefir susu sapi pada perlakuan yang sama.



Gambar 9. Total asam kefir susu kacang hijau dengan variasi jumlah starter dan lama fermentasi

Tabel 11. Hasil Analisis Keragaman total asam

No.	Variabel	F hitung	p
1.	Jumlah Starter	2,40	0,12
2.	Lama Fermentasi	0,60	0,56
3.	Jumlah Starter, Lama Fermentasi	0,30	0,87

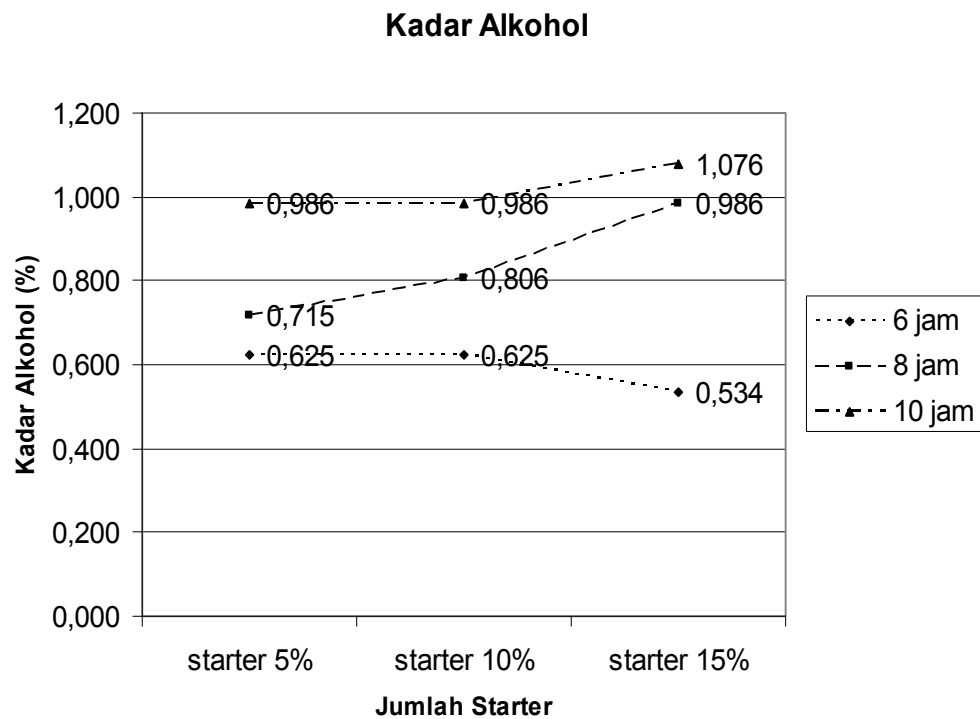
Hasil analisis keragaman (Tabel 11 ) menunjukkan bahwa jumlah starter ( $p 0,12 > 0,05$ ), lama fermentasi ( $p 0,56 > 0,05$ ) dan interaksi jumlah starter dan lama fermentasi ( $p 0,87 > 0,05$ ) tidak berpengaruh nyata terhadap total asam. Total asam kefir susu kacang hijau paling tinggi

pada jumlah starter 15% karena semakin banyak mikroba yang ditambahkan maka semakin banyak asam yang dihasilkan tetapi dengan peningkatan jumlah starter 5% belum menunjukkan ada beda jumlah asamnya.

Asam yang terbentuk dipengaruhi oleh penambahan glukosa. Pada tahap pertama glukosa akan dipecah menjadi asam piruvat melalui Jalur Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (Lee, 1996). Pada tahap kedua fermentasi asam piruvat akan diubah menjadi asam laktat (Fardiaz, 1988). Glukosa yang ditambahkan dalam pembuatan kefir untuk semua perlakuan sama yaitu sebanyak 10% dari volume susu kacang hijau sehingga dapat disimpulkan jumlah tersebut telah mencukupi untuk berlangsungnya fermentasi menjadi asam laktat, jika glukosa kurang maka reaksi akan merubah piruvat menjadi acetyl CoA kemudian menjadi asetat atau piruvat menjadi etanol atau acetoin (Morr and Richter dalam Wong *et al.*,1979).

#### **F. Kadar Alkohol**

Kadar alkohol dianalisis dengan pengukuran berat jenis metode James (1995) dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Kadar alkohol kefir susu kacang hijau dengan variasi jumlah starter dan lama fermentasi

Kadar alkohol berkisar antara 0,534% – 1,076% dengan nilai tertinggi pada perlakuan jumlah starter 15% lama fermentasi 10 jam dan nilai terendah pada perlakuan jumlah starter 15% lama fermentasi 6 jam, hasil ini sesuai dengan yang dikemukakan Rahman *et al.*, (1992) yaitu berkisar 0,5 – 1,0%. Sebagai pembandingan kefir susu sapi, kadar alkohol adalah 0,986. Hasil ini menunjukkan bahwa kadar alkohol kefir susu kacang hijau lebih rendah dibanding kefir susu sapi pada perlakuan yang sama.

Tabel 12. Hasil Analisis Keragaman kadar alkohol

No.	Variabel	F hitung	p
1.	Jumlah Starter	1,16	0,34
2.	Lama Fermentasi	24,67	0,00
3.	Jumlah Starter, Lama Fermentasi	1,67	0,20

Hasil analisis keragaman (Tabel 12 ) menunjukkan bahwa lama fermentasi berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kadar alkohol. Sedangkan jumlah starter dan interaksi jumlah starter dan lama fermentasi tidak berpengaruh terhadap kadar alkohol. Hasil uji HSD menunjukkan lama fermentasi 6 jam berbeda nyata dengan 8 jam dan 10 jam dan lama fermentasi 8 jam berbeda nyata dengan 10 jam hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 13.

Tabel 13. Uji Tukey (HSD) Kadar Alkohol (lama fermentasi)

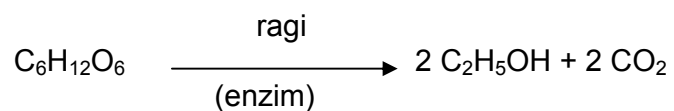
Lama Fermentasi (jam)	Kadar Alkohol	HSD ( $\alpha = 0,05$ )
6	0,59 <sup>a</sup> ( $\pm 0,12$ )	Sig. 1,00 <sup>1</sup>
8	0,83 <sup>b</sup> ( $\pm 0,16$ )	Sig. 1,00 <sup>2</sup>
10	1,01 <sup>c</sup> ( $\pm 0,12$ )	Sig. 1,00 <sup>3</sup>

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

Jumlah starter tidak berpengaruh terhadap kadar alkohol, kemungkinan peningkatan jumlah starter sebanyak 5% belum dapat menunjukkan beda nyata terhadap kadar alkohol sehingga dengan

penambahan jumlah starter sebanyak 5%, 10% dan 15% menghasilkan alkohol yang hampir merata, kemungkinan lain karena kondisi fermentasi sama yaitu anaerob hal ini sesuai yang dikemukakan Buckle *et al.*, (1985) bahwa bakteri asam laktat umumnya menghasilkan sejumlah besar asam laktat dari fermentasi substrat energi karbohidrat, bila tumbuh anaerobik kebanyakan khamir cenderung memfermentasikan substrat karbohidrat untuk menghasilkan etanol bersama sedikit produk akhir lainnya.

Lama fermentasi berpengaruh terhadap kadar alkohol kefir, lama fermentasi 10 jam menunjukkan kadar alkohol paling tinggi dibanding 6 jam dan 8 jam. Semakin lama waktu fermentasi semakin tinggi kadar alkohol, alkohol ini dihasilkan oleh adanya khamir *Candida kefir*, glukosa akan dimetabolisme oleh khamir menjadi piruvat, acetaldehyde kemudian menjadi etanol (Lee, 1996). Menurut Winarno *et al.*, (1980) fermentasi gula oleh ragi dapat menghasilkan etil alkohol (etanol) dan CO<sub>2</sub> melalui reaksi sebagai berikut :



## G. Rekapitulasi Hasil

Hasil penelitian secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 14.

Tabel 14. Rekapitulasi Hasil Penelitian

<b>Perlakuan</b>	<b>Antibakteri (mm)</b>	<b>pH</b>	<b>Total Asam (%)</b>	<b>Alkohol (%)</b>
Starter 5%, 6 jam	1,42	4,37	1,57	0,625
Starter 5%, 8 jam	1,53	4,35	1,57	0,715
Starter 5%, 10 jam	1,25	4,33	1,71	0,986
Starter 10%, 6 jam	2,00	4,25	1,43	0,625
Starter 10%, 8 jam	2,58	4,08	1,57	0,806
Starter 10%, 10 jam	1,58	4,07	1,57	0,986
Starter 15%, 6 jam	0,92	4,40	1,71	0,534
Starter 15%, 8 jam	1,08	4,26	1,71	0,986
Starter 15%, 10 jam	0,83	4,19	1,71	1,076

Aktivitas antibakteri paling tinggi pada jumlah starter 10%, demikian juga nilai pH paling rendah pada jumlah starter 10%. Aktivitas antibakteri diperoleh karena adanya asam yang dihasilkan selama fermentasi terutama asam laktat. Proses fermentasi yang melibatkan bakteri asam laktat mempunyai ciri khas yaitu terakumulasinya asam organik yang disertai dengan penurunan pH. Jenis dan jumlah asam organik tergantung spesies bakteri asam laktat, komposisi kultur dan kondisi pertumbuhan. Efek antimikroba dari asam organik merupakan akibat dari turunnya nilai pH dan juga bentuk tidak terdisosiasi dari molekul asam organik. pH eksternal yang rendah mengakibatkan asidifikasi sel sitoplasma, sementara asam yang tidak terdisosiasi akan melumpuhkan elektrokimia

proton gradient atau dengan mengubah permeabilitas sel membrane yang akan mengganggu system transport substrat (Surono, 2004).

Asam laktat merupakan senyawa metabolit utama pada fermentasi bakteri asam laktat, yang dalam keseimbangan dengan bentuk terdisosiasi dan tidak terdisosiasi dan kelankitan disosiasi tergantung pada pH. Pada pH rendah sejumlah besar asam laktat dalam bentuk tidak terdisosiasi dan menjadi racun bagi banyak bakteri, kapang dan khamir. Asam laktat akan menurunkan pH sekitar saluran usus menjadi 4 - 5 sehingga menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk dan *E.coli* yang membutuhkan pH optimum 6 – 7. Sejumlah asam volatile juga memberikan efek antimikroba dalam kondisi redoks potensial yang rendah (Surono, 2004).

Jika dilihat aktivitas antibakteri dan kadar alkohol tidak sesuai, aktivitas antibakteri paling tinggi pada jumlah starter 10% sedangkan kadar alkohol paling tinggi pada jumlah starter 15%. Alkohol juga bersifat sebagai antibakteri jika kadar alkohol tinggi maka aktivitas antibakteri juga tinggi tetapi hasil penelitian tidak demikian. Hal ini kemungkinan karena alkohol yang dihasilkan tinggi tetapi jumlah tersebut belum dapat berfungsi sebagai antibakteri karena kefir merupakan sistem pangan sehingga alkohol yang dihasilkan diharapkan hanya untuk flavor yang khas dari kefir yaitu *yeasty*.

Kandungan alkohol yang terbentuk selama fermentasi tergantung pada kandungan gula di dalam substrat, macam ragi, suhu fermentasi dan jumlah oksigen. Seperti mikroba lainnya yang menghasilkan asam, ragi tidak tahan terhadap alkohol dalam kadar tertentu. Kebanyakan ragi tidak tahan pada konsentrasi alkohol 12 – 15%. Jika hasil fermentasi mengandung 9 – 13% alkohol maka belum cukup digunakan sebagai pengawet (antimikroba) sehingga harus ditambahkan alkohol untuk mencapai konsentrasi 20% (Winarno *et al.*, 1980)

Nilai pH dan total asam tidak sesuai, nilai pH paling rendah pada jumlah starter 10% sedangkan total asam paling tinggi pada jumlah starter 15%. Jika jumlah asam tinggi maka nilai pH rendah tetapi hasil penelitian tidak demikian, kemungkinan karena total asam dipengaruhi oleh jumlah dan jenis mikroba juga dipengaruhi jumlah glukosa dimana pada penelitian ini jumlah glukosa untuk semua perlakuan adalah sama sehingga total asam yang dihasilkan juga hampir sama.

Menurut Azizah, 2004. pada dasarnya skala/tingkat keasaman suatu larutan bergantung pada konsentrasi ion  $H^+$  dalam larutan. Makin besar konsentrasi ion  $H^+$  makin asam larutan tersebut. pH yang merupakan konsentrasi ion hidronium dalam larutan ditunjukkan dengan skala secara matematis dengan nomor 0 sampai 14. Skala pH merupakan suatu cara yang tepat untuk menggambarkan konsentrasi ion-ion hidrogen dalam larutan yang bersifat asam, dan konsentrasi ion-ion hidroksida dalam larutan basa. Sedangkan total asam ditentukan dengan titrasi

dimana titrasi adalah cara analisis tentang pengukuran jumlah larutan yang diperlukan untuk bereaksi secara tepat dengan zat yang terdapat dalam larutan lain, dalam penelitian ini adalah asam laktat dari kefir susu kacang hijau dengan NaOH.

Secara keseluruhan hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah starter mempengaruhi aktivitas antibakteri dan nilai pH, sedangkan lama fermentasi mempengaruhi nilai pH dan kadar alkohol. Hasil uji simulasi *gastric juice* sebelum dan sesudah tidak ada beda, ini menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau masih efektif. Kefir susu kacang hijau dibandingkan dengan kefir susu sapi pada perlakuan sama diperoleh hasil sebagai berikut aktivitas antibakteri lebih tinggi, nilai pH lebih rendah, total asam lebih rendah dan kadar alkohol lebih rendah.

## BAB V SIMPULAN DAN SARAN

### A. Simpulan

Hasil analisis aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau berkisar antara 0,83 – 2,58 mm, nilai pH 4,07 – 4,40, total asam 1,43 – 1,71% dan kadar alkohol 0,534 – 1,076%. Aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau dipengaruhi oleh jumlah starter (5%, 10% dan 15%) tetapi tidak dipengaruhi lama fermentasi (6 jam, 8 jam dan 10 jam) dan interaksi jumlah starter dan lama fermentasi. Aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* paling tinggi pada perlakuan jumlah starter 10% lama fermentasi 8 jam yaitu sebesar 2,58 mm.

Aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau masih bisa dipertahankan setelah melalui simulasi *gastric juice* dan jika dibandingkan dengan susu sapi, mempunyai aktivitas antibakteri lebih tinggi, nilai pH lebih rendah, total asam lebih rendah dan kadar alkohol lebih rendah.

Jumlah starter berpengaruh terhadap nilai pH sedangkan lama fermentasi berpengaruh terhadap nilai pH dan kadar alkohol. Nilai pH paling rendah pada perlakuan jumlah starter 10%, lama fermentasi 10 jam yaitu 4,07 sedangkan kadar alkohol terendah pada perlakuan jumlah starter 15% dan lama fermentasi 6 jam yaitu 0,534%.

Sifat fungsional aktivitas antibakteri kefir susu kacang hijau dipengaruhi oleh jumlah starter tetapi lama fermentasi tidak berpengaruh sehingga untuk pembuatan kefir susu kacang hijau dipilih jumlah starter

yang menunjukkan aktivitas antibakteri paling tinggi yaitu jumlah starter 10% sedangkan lama fermentasi dipilih waktu yang paling singkat yaitu lama fermentasi 6 jam.

#### **B. Saran**

Perlu dilakukan penelitian uji daya terima kefir susu kacang hijau untuk komersialisasi dengan panelis konsumen.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anna K. E. A. kerberg, Helena G. M. Liljeberg, Yvonne E. Granfeldt, Anders W. Drews and Inger M. E. Bjo" rck. 2007. *An In Vitro Method, Based on Chewing, To Predict Resistant Starch Content in Foods Allows Parallel Determination of Potentially Available Starch and Dietary Fiber*. Department of Applied Nutrition and Food Chemistry, Center for Chemistry and Chemical Engineering,
- Anonim a. 2007. *Pangan Fungsional* <http://teknofood.blogspot.com/2007/05>
- Anonim b, 2007. *Kefir*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Kefir> Oktober 2007
- Anonim c, 2008. *E.coli*. <http://en.wikipedia.org/wiki/E.coli>
- Anonim d, 2008. <http://queenofsheeba.wordpress.com/2008/07/22/bakteri-staphylococcus-aureus/>
- Anonim e, 2008. [http://www.e-dukasi.net/mapok/mp\\_full.php?id= 255&fname= materi02.html](http://www.e-dukasi.net/mapok/mp_full.php?id= 255&fname= materi02.html)
- Aura, A. M. 2005. *In Vitro Digestion Models for Dietary Phenolic Compounds*. Disertasi Doktor Teknologi Kimia Universitas Helsinki Finlandia.
- Albaarri, AN dan Murti, T.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.
- Ardiansyah, 2005. *Daun Beluntas Sebagai Bahan Antibakteri dan Antioksidan*. Artikel Iptek - Bidang Biologi, Pangan, dan Kesehatan
- \_\_\_\_\_, 2007. *Antimikroba Dari Tumbuhan*. Artikel IPTEK. <http://www.beritaiptek.com>. Oktober 2007
- Arnelia, 2004. *Fitokimia Komponen Ajaib, PJK,DM dan Kanker*. <http://www.kimia.net>. Oktober 2007
- Azizah, U.2004. Larutan Asam dan Basa. Proyek Pengembangan Kurikulum Diknas

- Balows, A, HG. Truper, M. Dworkin, W. Harar and KH. Schleifer. 1991. *The Prokaryotes*, 2<sup>nd</sup> edition, A Handbook on the Biology of Bacteria Chapter 70 pg 1547.
- Buckle, K. A., R. A. Edward, G.H. Fleet and M. Wooton, 1985. *Ilmu Pangan* (diterjemahkan oleh Purnomo, H dan Adiono). UI Press. Jakarta.
- Buttock, M and S. A. 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.
- Enshasy, H.A.El, Baz, A.F.El dan Ammar, E.M. 2007. *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.
- Ensminger, 1995. *The concise encyclopedia of foods and Nutrition*, CRC Press, London.
- Farnworth, E.R. 2005. *Kefir – a complex probiotic*. Food Research and Development Centre, Agriculture and Agri-food Canada, St. Hyacinthe, Quebec, Canada J2S 8E3.
- James, C. S. 1995. *Analysis Chemistry of Food*. Blackie Academic and Professional. Great Britain.
- Fardiaz, S. 1987. *Penuntun Praktek: Mikrobiologi Pangan*. Lembaga Sumberdaya Informasi. IPB
- \_\_\_\_\_. 1988. *Fisiologi Fermentasi*. PAU IPB bekerja sama dengan Lembaga Sumberdaya Informasi IPB p 15-16, 23
- \_\_\_\_\_. 1989. Mikrobiologi Pangan. PAU Pangan dan Gizi .IPB p133, 136, 206-207
- \_\_\_\_\_. 1997. *Kefir, Susu Asam Berkhasiat*.  
<http://www.indonesia.com/intisari/1997/november/kefir.htm>  
 . Oktober 2007

- Gaman, P.M. dan Sherrington, K.B. 1992. *Ilmu Pangan, Pengantar Ilmu Pangan Nutrisi dan Mikrobiologi*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Harris, R.S., dan Karmas E. 1989. *Evaluasi Gizi Pada Pengolahan Bahan Pangan*. ITB, Bandung.
- Hartini, Y.S. C.J., Soegihardjo, Ayu I.C.P, Maria I.A, Donny K. *Daya Antibakteri Campuran Ekstrak Etanol Buah Adas (Foeniculum vulgare Mill) Dan Kulit Batang Pulasari (Alyxia reinwardtii BL)* UGM Yogyakarta
- Huda, R. 2008. *Antimikroba*. <http://F/antimikroba/antibiotik.htm>.
- Kanetro, B dan Hastuti, S. 2006. *Ragam Produk Olahan Kacang-kacangan*. Unwama Press. Yogyakarta. p. 44-45
- Karine T, Douglas L.S. 2001. *Kefir milk enhances intestinal immunity in Young but not old rat*. Journal of Nutritional. 2001. ([www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?itool=abstractplus&db=pubmed&cmd=ret](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?itool=abstractplus&db=pubmed&cmd=ret) 2/13/2007)
- Kar T dan Misra, A.K. 2007. *Therapeutic Properties of Whey Used As Fermented Drink*. Department of Dairy Bacteriology, Faculty of Dairy Technology, West Bengal University of Animal and Fishery Sciences, Mohanpur, Nadia, West Bengal, India
- Kunaepah, U. 2008. *Pengaruh Lama Fermentasi Dan Konsentrasi Glucosa Terhadap Aktivitas Antibakteri, Polifenol Total Dan Mutu Kimia Kefir Susu Kacang Merah*. Tesis Magister Gizi Masyarakat UNDIP Semarang.
- Lee, B.H. 1996. *Fundamental of Food Biotechnology*. VCH Publishers. Inc. 337 7th Avenue New Cork.
- Lee, K. G., A. E. Mitchell and T. Shibamoto, 2000. *Determination of Antioxidant Properties of Aroma Extracts from Various Beans*. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 4817-4820
- Lien, N.T.H., 1992. *Mungbean Varietal Trial*. AVRDC Thailand Outreach Program. Kasetsart University. Thailand.

- LIU J.R. 2002. *Antitumor activity of milk kéfir & soy milk kéfir in tumor mice*. NutritionCancer2002;44(2):183-7. ([www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=abstract/2/20/2007](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=abstract/2/20/2007))
- Muchtadi, T. 1989. *Teknologi Proses Pengolahan Pangan*. Depdikbud. PAU IPB. Bogor
- Muchtadi, D, Palupi, NS dan Astawan, M. 1993. *Metabolisme Zat Gizi*. Pustaka Sinar Harapan. Jakarta.
- Mudjajanto, E.S dan Kusuma, F.R. 2005. *Susu Kedele Susu Nabati Yang Menyehatkan*. PT Agro Media Pustaka. Jakarta. p 40 - 41
- Olivares, M. 2006. *Oral administration of two probiotics strain; L. gaserri CECT5714 & L. coryniformis CECT5711 enhances the intestinal function of healthy adults*. International Journal Food Microbiology 2006, March 15; 107(2) 104-11. ([www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?itool=abstractplus&db=pubmed&cmd=ret/2/13/2007](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?itool=abstractplus&db=pubmed&cmd=ret/2/13/2007))
- Rachman, A. 1989. *Pengantar Teknologi Fermentasi*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor p 88
- 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 p 43
- Ranggana, S. 1997. *Manual Of Analysis of Fruit and Vegetables Product*. Tata. MC. Graw Publishing Company Limited. New Delhi.
- Raphael, T.J and G. Kuttan, 2003. *Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system*. *Phytomedicine*; 2003; 10, 6/7; ProQuest Agriculture Journals pg. 483
- Robinson, D. and DN. Singh, 2001. *Alternative Protein Sources for Lying Hens*. A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Queensland Poultry Research and Development Centre.
- Sari, N.K. 2007. *Tren dan Potensi Susu Sapi dalam Food Review bulan Maret 2007*. PT Media Pangan Indonesia

- Savadogo, A, Cheik A.T.O, Paul W. S, Nicolas B, Aboubacar S. O, Alfred S.T. 2004. *Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples*. African Journal of Biotechnology Vol. 3 (3), pp. 189-194
- Seyis I and N. Akzos. 2004. Production of Lactase By Trichoderma Sp Food Technol Biotechnol. 42 (2) 121 – 124 (2004).
- Singh, D. 1999. *Mung bean levels for pig diets*. Department of Primary Industries and Fisheries. The State of Queensland.
- Steel, R.G.D dan J.H. Torrie. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika: Suatu Pendekatan Biometrik*. Edisi Kedua. Dialihbahasakan oleh Bambang Sumantri, PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, 168 - 835
- Sudarmadji, S. 1989. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada. Liberty. Yogyakarta.
- Supriyono, T. 2008. *Pengaruh Jumlah Starter (Lactobacillus bulgaricus dan Candida kefir) Dan Konsentrasi Glukosa Terhadap Aktivitas "Merantas" Radikal Bebas, Kadar Beta Karoten dan Total Polifenol Kefir Susu Kacang Hijau (Vigna Radiata)*. Tesis Magister Gizi Masyarakat UNDIP Semarang.
- Surono, I.S. 2004. *Probiotik, Susu Fermentasi dan Kesehatan*. Yayasan Pengusaha Makanan dan Minuman Seluruh Indonesia (YAPMMI). TRICK. Jakarta. p 31-32
- Somova, L. O., A. Nadar, P. Rammanan and F O Shode, 2003. *Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension*. *Phytomedicine*; Mar 2003; 10, 2/3; ProQuest Agriculture Journals pg. 115.
- Todorov, S.D and Dicks, L.MT. 2007. *Bacteriocin production by Lactobacillus pentosus ST712BZ isolated from boza*. Brazilian Journal of Microbiology vol. 38 no. 1.Sao.
- Ulusoy, B.H., Hilal C, Hamparsun H, Mehmet E. E. 2007. *An in vitro study on the antibacterial effect of kefir against some food-borne pathogens*

- Usmiati, S. 2007. *Kefir, Susu Fermentasi dengan Rasa Menyegarkan*. Warta Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian Vol. 29, No.2, 2007. Bogor.
- White, P. J. and Xing, Y. 1997. *Antioxidants from cereals and legumes*. In *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications*; Shahidi, F., Ed.; AOAC Press: Champaign, IL, 1997; pp 25-63.
- 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.
- Winarno, FG, Fardiaz,S, Fardiaz D. 1980. *Pengantar Teknologi Pangan*. PT Gramedia. Jakarta p 63 – 64
- Wong, Noble P, Jenness, Robert, Keeney, Mark and Marth, Elmer H. 1979. *Fundamental of Dairy Chemistry*. Van Nostrand Renhold. New York. Third edition.
- Wu Bo and Zhang Han-Jun, 2003. *Determination of Content of Oleanolic Acid in Mung Bean, Red Bean, Lotus Seed and Jujube Respectively by HPLC*. Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China
- Zakaria F, D. Muchtadi, M. Astawan, S. Yasni, S. Koswara, E. Prangdimurti, A. Hartoyo. 1997. *Petunjuk Praktikum Evaluasi Nilai Biologis Pangan dan Gizi* Jur. TPG Fak. Tek. Pertanian. IPB, Bogor.

### Lampiran 3. Analysis of Variance Aktivitas Antibakteri

#### Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Jumlah starter	1	5%	9
	2	10%	9
	3	15%	9
Lama fermentasi	1	6 Jam	9
	2	8 Jam	9
	3	10 Jam	9

#### Descriptive Statistics

Dependent Variable: Antibakteri

Jumlah starter	Lama fermentasi	Mean	Std. Deviation	N
5%	6 Jam	1,4167	,38188	3
	8 Jam	1,5333	,20207	3
	10 Jam	1,2500	,66144	3
	Total	1,4000	,41382	9
10%	6 Jam	2,0000	,43301	3
	8 Jam	2,5833	,14434	3
	10 Jam	1,5833	,52042	3
	Total	2,0556	,55590	9
15%	6 Jam	,9167	,52042	3
	8 Jam	1,0833	,28868	3
	10 Jam	,8333	,52042	3
	Total	,9444	,41037	9
Total	6 Jam	1,4444	,60953	9
	8 Jam	1,7333	,69327	9
	10 Jam	1,2222	,59219	9
	Total	1,4667	,64465	27

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Antibakteri

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7,348 <sup>a</sup>	8	,919	4,783	,003
Intercept	58,080	1	58,080	302,442	,000
starter	5,616	2	2,808	14,621	,000
l_fermen	1,182	2	,591	3,078	,071
starter * l_fermen	,551	4	,138	,717	,591
Error	3,457	18	,192		
Total	68,885	27			
Corrected Total	10,805	26			

a. R Squared = ,680 (Adjusted R Squared = ,538)

## Post Hoc Tests Jumlah starter

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Antibakteri

Tukey HSD

(I) Jumlah start	(J) Jumlah star	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
5%	10%	-,6556*	,20658	,014	-1,1828	-,1283
	15%	,4556	,20658	,097	-,0717	,9828
10%	5%	,6556*	,20658	,014	,1283	1,1828
	15%	1,1111*	,20658	,000	,5839	1,6383
15%	5%	-,4556	,20658	,097	-,9828	,0717
	10%	-1,1111*	,20658	,000	-1,6383	-,5839

Based on observed means.

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

## Homogeneous Subsets

### Antibakteri

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

Jumlah starter	N	Subset	
		1	2
15%	9	,9444	
5%	9	1,4000	
10%	9		2,0556
Sig.		,097	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,192.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

b. Alpha = ,05.

## Lama fermentasi

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Antibakteri

Tukey HSD

(I) Lama fermentasi	(J) Lama fermentasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
6 Jam	8 Jam	-,2889	,20658	,363	-,8161	,2383
	10 Jam	,2222	,20658	,541	-,3050	,7494
8 Jam	6 Jam	,2889	,20658	,363	-,2383	,8161
	10 Jam	,5111	,20658	,058	-,0161	1,0383
10 Jam	6 Jam	-,2222	,20658	,541	-,7494	,3050
	8 Jam	-,5111	,20658	,058	-1,0383	,0161

Based on observed means.

## Homogeneous Subsets

### Antibakteri

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

Lama fermentasi	N	Subset
		1
10 Jam	9	1,2222
6 Jam	9	1,4444
8 Jam	9	1,7333
Sig.		,058

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,192.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

b. Alpha = ,05.

## Lampiran 4. Analysis of Variance pH

### Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Jumlah starter	1	5%	9
	2	10%	9
	3	15%	9
Lama fermentasi	1	6 Jam	9
	2	8 Jam	9
	3	10 Jam	9

### Descriptive Statistics

Dependent Variable: pH

Jumlah starter	Lama fermentasi	Mean	Std. Deviation	N
5%	6 Jam	4,3667	,06110	3
	8 Jam	4,3533	,15308	3
	10 Jam	4,3333	,01528	3
	Total	4,3511	,08403	9
10%	6 Jam	4,2500	,01732	3
	8 Jam	4,0833	,03786	3
	10 Jam	4,0767	,09018	3
	Total	4,1367	,09849	9
15%	6 Jam	4,3967	,13503	3
	8 Jam	4,2633	,05033	3
	10 Jam	4,1933	,03512	3
	Total	4,2844	,11620	9
Total	6 Jam	4,3378	,10035	9
	8 Jam	4,2333	,14500	9
	10 Jam	4,2011	,12160	9
	Total	4,2574	,13286	27

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: pH

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,340 <sup>a</sup>	8	,043	6,461	,001
Intercept	489,389	1	489,389	74316,662	,000
starter	,217	2	,108	16,462	,000
I_fermen	,092	2	,046	6,976	,006
starter * I_fermen	,032	4	,008	1,204	,343
Error	,119	18	,007		
Total	489,848	27			
Corrected Total	,459	26			

a. R Squared = ,742 (Adjusted R Squared = ,627)

## Post Hoc Tests Jumlah starter

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: pH  
Tukey HSD

(I) Jumlah start	(J) Jumlah start	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
5%	10%	,2144*	,03825	,000	,1168	,3121
	15%	,0667	,03825	,217	-,0310	,1643
10%	5%	-,2144*	,03825	,000	-,3121	-,1168
	15%	-,1478*	,03825	,003	-,2454	-,0501
15%	5%	-,0667	,03825	,217	-,1643	,0310
	10%	,1478*	,03825	,003	,0501	,2454

Based on observed means.

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

## Homogeneous Subsets

pH

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

Jumlah starter	N	Subset	
		1	2
10%	9	4,1367	
15%	9		4,2844
5%	9		4,3511
Sig.		1,000	,217

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,007.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

b. Alpha = ,05.

## Lama fermentasi

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: pH  
Tukey HSD

(I) Lama fermentasi	(J) Lama fermentasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
6 Jam	8 Jam	,1044*	,03825	,035	,0068	,2021
	10 Jam	,1367*	,03825	,006	,0390	,2343
8 Jam	6 Jam	-,1044*	,03825	,035	-,2021	-,0068
	10 Jam	,0322	,03825	,682	-,0654	,1299
10 Jam	6 Jam	-,1367*	,03825	,006	-,2343	-,0390
	8 Jam	-,0322	,03825	,682	-,1299	,0654

Based on observed means.

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

## Homogeneous Subsets

pH

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

Lama fermentasi	N	Subset	
		1	2
10 Jam	9	4,2011	
8 Jam	9	4,2333	
6 Jam	9		4,3378
Sig.		,682	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,007.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

b. Alpha = ,05.

## Lampiran 5. Analysis of Variance Total Asam

### Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Jumlah starter	1	5%	9
	2	10%	9
	3	15%	9
Lama fermentasi	1	6 Jam	9
	2	8 Jam	9
	3	10 Jam	9

### Descriptive Statistics

Dependent Variable: Total Asam

Jumlah starter	Lama fermentasi	Mean	Std. Deviation	N
5%	6 Jam	1,5700	,24249	3
	8 Jam	1,5700	,24249	3
	10 Jam	1,7100	,00000	3
	Total	1,6167	,18520	9
10%	6 Jam	1,4300	,24249	3
	8 Jam	1,5700	,24249	3
	10 Jam	1,5700	,24249	3
	Total	1,5233	,22136	9
15%	6 Jam	1,7100	,00000	3
	8 Jam	1,7100	,00000	3
	10 Jam	1,7100	,00000	3
	Total	1,7100	,00000	9
Total	6 Jam	1,5700	,21000	9
	8 Jam	1,6167	,18520	9
	10 Jam	1,6633	,14000	9
	Total	1,6167	,17794	27

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Total Asam

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,235 <sup>a</sup>	8	,029	,900	,537
Intercept	70,567	1	70,567	2160,230	,000
starter	,157	2	,078	2,400	,119
l_fermen	,039	2	,020	,600	,559
starter * l_fermen	,039	4	,010	,300	,874
Error	,588	18	,033		
Total	71,391	27			
Corrected Total	,823	26			

a. R Squared = ,286 (Adjusted R Squared = -,032)

## Post Hoc Tests Jumlah starter

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Total Asam

Tukey HSD

(I) Jumlah start	(J) Jumlah star	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
5%	10%	,0933	,08520	,529	-,1241	,3108
	15%	-,0933	,08520	,529	-,3108	,1241
10%	5%	-,0933	,08520	,529	-,3108	,1241
	15%	-,1867	,08520	,100	-,4041	,0308
15%	5%	,0933	,08520	,529	-,1241	,3108
	10%	,1867	,08520	,100	-,0308	,4041

Based on observed means.

## Homogeneous Subsets

### Total Asam

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

Jumlah starter	N	Subset
		1
10%	9	1,5233
5%	9	1,6167
15%	9	1,7100
Sig.		,100

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,033.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

b. Alpha = ,05.

## Lama fermentasi

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Total Asam

Tukey HSD

(I) Lama fermentasi	(J) Lama fermentasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
6 Jam	8 Jam	-,0467	,08520	,849	-,2641	,1708
	10 Jam	-,0933	,08520	,529	-,3108	,1241
8 Jam	6 Jam	,0467	,08520	,849	-,1708	,2641
	10 Jam	-,0467	,08520	,849	-,2641	,1708
10 Jam	6 Jam	,0933	,08520	,529	-,1241	,3108
	8 Jam	,0467	,08520	,849	-,1708	,2641

Based on observed means.

## Homogeneous Subsets

### Total Asam

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

Lama fermentasi	N	Subset
		1
6 Jam	9	1,5700
8 Jam	9	1,6167
10 Jam	9	1,6633
Sig.		,529

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,033.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

b. Alpha = ,05.

## Lampiran 6. Analysis of Variance Kadar Alkohol

### Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Jumlah starter	1	5%	9
	2	10%	9
	3	15%	9
Lama fermentasi	1	6 Jam	9
	2	8 Jam	9
	3	10 Jam	9

### Descriptive Statistics

Dependent Variable: Kadar Alkohol

Jumlah starter	Lama fermentasi	Mean	Std. Deviation	N
5%	6 Jam	,62467	,157039	3
	8 Jam	,71533	,157039	3
	10 Jam	,98600	,155885	3
	Total	,77533	,211922	9
10%	6 Jam	,62467	,157039	3
	8 Jam	,80600	,000000	3
	10 Jam	,98600	,155885	3
	Total	,80556	,191627	9
15%	6 Jam	,53400	,000000	3
	8 Jam	,98600	,155885	3
	10 Jam	1,07600	,000000	3
	Total	,86533	,263336	9
Total	6 Jam	,59444	,119941	9
	8 Jam	,83578	,162713	9
	10 Jam	1,01600	,119059	9
	Total	,81541	,218877	27

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Kadar Alkohol

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,952 <sup>a</sup>	8	,119	7,290	,000
Intercept	17,952	1	17,952	1099,971	,000
starter	,038	2	,019	1,157	,337
l_fermen	,805	2	,403	24,671	,000
starter * l_fermen	,109	4	,027	1,666	,202
Error	,294	18	,016		
Total	19,198	27			
Corrected Total	1,246	26			

a. R Squared = ,764 (Adjusted R Squared = ,659)

## Post Hoc Tests Jumlah starter

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kadar Alkohol

Tukey HSD

(I) Jumlah start	(J) Jumlah star	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
5%	10%	-,03022	,060223	,871	-,18392	,12348
	15%	-,09000	,060223	,317	-,24370	,06370
10%	5%	,03022	,060223	,871	-,12348	,18392
	15%	-,05978	,060223	,591	-,21348	,09392
15%	5%	,09000	,060223	,317	-,06370	,24370
	10%	,05978	,060223	,591	-,09392	,21348

Based on observed means.

## Homogeneous Subsets

### Kadar Alkohol

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

Jumlah starter	N	Subset
		1
5%	9	,77533
10%	9	,80556
15%	9	,86533
Sig.		,317

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,016.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

b. Alpha = ,05.

## Lama fermentasi

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kadar Alkohol

Tukey HSD

(I) Lama fermentasi	(J) Lama fermentasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
6 Jam	8 Jam	-,24133*	,060223	,002	-,39503	-,08764
	10 Jam	-,42156*	,060223	,000	-,57525	-,26786
8 Jam	6 Jam	,24133*	,060223	,002	,08764	,39503
	10 Jam	-,18022*	,060223	,020	-,33392	-,02652
10 Jam	6 Jam	,42156*	,060223	,000	,26786	,57525
	8 Jam	,18022*	,060223	,020	,02652	,33392

Based on observed means.

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

## Homogeneous Subsets

### Kadar Alkohol

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

Lama fermentasi	N	Subset		
		1	2	3
6 Jam	9	,59444		
8 Jam	9		,83578	
10 Jam	9			1,01600
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,016.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

b. Alpha = ,05.

## Lampiran 7. Hasil analisis T-Test

### Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Antibakteri sebelum GJ	1,7000	3	,42720	,24664
	Antibakteri sesudah GJ	,4833	3	,28868	,16667

### Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Antibakteri sebelum GJ & Antibakteri sesudah GJ	3	-,101	,935

### Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	Antibakteri sebelum GJ & Antibakteri sesudah GJ	,21667	,53929	,31136	-,12300	2,55634	3,908	2	,060

## T-Test

### Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Antibakteri sebelum GJ	1,8500	3	,40927	,23629
	Antibakteri sesudah GJ	,8500	3	,49244	,28431

### Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Antibakteri sebelum GJ & Antibakteri sesudah GJ	3	,453	,701

### Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	Antibakteri sebelum GJ & Antibakteri sesudah GJ	,00000	,47697	,27538	-,18486	2,18486	3,631	2	,068

**Lampiran 8. Foto Kegiatan Penelitian**

Kefir Susu Kacang Hijau



Uji Aktivitas Antibakteri



Simulasi Gastric Juice



Uji nilai pH



Uji Total Asam



Uji Alkohol

