

**MUTU GIZI KEFIR SUSU KAMBING
BERFORTIFIKASI VITAMIN B₁₂ DAN VITAMIN D₃
SELAMA PENYIMPANAN**

Proposal Penelitian

disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan
studi pada Program Studi Ilmu Gizi Fakultas Kedokteran
Universitas Diponegoro



disusun oleh

ELSA PRISMA DIANTI

22030113130135

**PROGRAM STUDI ILMU GIZI FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2016**

HALAMAN PENGESAHAN

Proposal penelitian dengan judul "Mutu Gizi Kefir Susu Kambing Berfortifikasi Vitamin B₁₂ dan Vitamin D₃ Selama Penyimpanan" telah mendapat persetujuan dari pembimbing.

Mahasiswa yang mengajukan:

Nama : Elsa Prisma Dianti
NIM : 22030113130135
Fakultas : Kedokteran
Program Studi : Ilmu Gizi
Universitas : Diponegoro Semarang
Judul Proposal : Mutu Gizi Kefir Susu Kambing Dengan Fortifikasi Vitamin B₁₂
dan Vitamin D₃ Selama Penyimpanan

Semarang, 15 November 2016

Pembimbing Pertama,

Pembimbing Kedua,

Gemala Anjani, SP, MSi, PhD

NIP. 198006182003122001

Binar Panunggal, S.Gz, MPH

NIP. 198505162014041001

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR TABEL.....	iv
DAFTAR GAMBAR	v
BAB 1 PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan	4
D. Manfaat	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
A. Tinjauan Pustaka	6
B. Kerangka Konsep	20
C. Hipotesis.....	20
BAB III METODE PENELITIAN	
A. Ruang Lingkup Penelitian.....	21
B. Rancangan Penelitian	21
C. Subjek Penelitian.....	23
D. Tahap Penelitian.....	23
E. Variabel Dan Definisi Operasional.....	23
F. Prosedur Penelitian	26
G. Pengumpulan Data	28
H. Pengolahan Dan Analisis Data	28
DAFTAR PUSTAKA	29
LAMPIRAN.....	30

DAFTAR TABEL

Tabel 1 Kandungan gizi susu kambing	12
Tabel 2 Karakteristik kefir berdasarkan <i>codex alimentarius</i>	15
Tabel 3 Kandungan gizi kefir.....	15

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Kerangka konsep penelitian	20
Gambar 2 Rancangan penelitian	22
Gambar 3 Bagan perencanaan penelitian	27

BAB 1

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Diabetes mellitus tipe 2 merupakan penyakit metabolik kompleks yang ditandai dengan tingginya stress oksidatif.¹ Berdasarkan Riskesdas 2013, prevalensi diabetes mellitus penduduk Indonesia usia >15 tahun sebesar 6,9% atau sekitar 12 juta orang, dimana 90% dari total prevalensi merupakan diabetes mellitus tipe 2.² Selain itu, dilaporkan 36,6% penduduk Indonesia usia >15 tahun mengalami keadaan glukosa darah puasa terganggu (GDP), yakni suatu keadaan yang berisiko menjadi diabetes mellitus tipe 2. Penderita diabetes mellitus tipe 2 diprediksi mencapai 23,1 juta orang pada tahun 2030 di Indonesia.^{3,4} Hal tersebut dapat mengakibatkan permasalahan penurunan kualitas sumber daya manusia di masa yang akan datang.

Tingginya stress oksidatif pada pasien diabetes mellitus tipe 2 merupakan konsekuensi dari hiperglikemia dan hiperinsulinemia akibat resistensi insulin kronis.¹ Resistensi insulin merupakan ketidakmampuan sel atau jaringan menggunakan insulin secara efektif untuk mengatur transpor glukosa ke dalam sel atau jaringan target yang mengakibatkan gangguan penyerapan glukosa darah akibatnya terjadi hiperglikemia kronis. Resistensi insulin dapat terjadi sebelum pasien terdiagnosis diabetes Hiperglikemia kronis menyebabkan tingginya radikal bebas dalam tubuh dan memicu kerusakan fungsi dan struktur sel beta pankreas. Radikal bebas akibat hiperglikemia meningkat melalui beberapa mekanisme, seperti: (1) non-enzymatic *glycation* (AGEs) (2) glucose auto-oxidation, and (3) polyol pathway.^{2-6.}⁵ Pembentukan radikal bebas yang meningkat menyebabkan kondisi stress oksidatif. Stres oksidatif inilah yang dapat mengakibatkan patogenesis komplikasi diabetes mellitus tipe 2 karena menginduksi peroksidasi lipid, produksi sitokin proinflamasi, dan menurunkan respon sistem imun.

Perbaikan sensitivitas insulin dapat mengurangi keparahan resistensi insulin, agar kondisi hiperglikemia dan hiperinsulinemia dapat terkontrol. Berdasarkan penelitian, vitamin D3 dan vitamin B12 merupakan vitamin yang dapat mengurangi keparahan resistensi insulin dan mencegah patogenesis

komplikasi diabetes mellitus tipe 2.⁶⁻⁸ Vitamin D3 merupakan prekursor vitamin D yang dapat diperoleh dari paparan sinar UVB dan diet.⁵ Vitamin D3 memegang peranan penting mempengaruhi sensitivitas insulin melalui peningkatan fungsi sel beta pankreas dalam menstimulasi sintesis dan pelepasan insulin.¹⁵ Selain vitamin D3, vitamin B12 juga memegang peranan penting dalam mempengaruhi sensitivitas insulin melalui mekanisme penurunan homosistein. Pemberian vitamin B12 (500µg/hari) bersama dengan folat (5 mg) selama satu bulan dilaporkan dapat membantu memperbaiki sensitivitas insulin pada pasien resistensi insulin melalui mekanisme penurunan jumlah homosistein yang menghambat stimulasi fosforilasi tirosin pada reseptor insulin.^{6,7} Namun, beberapa studi menyebutkan defisiensi vitamin D3 (<50nmol/L) dan vitamin B12 (≤ 148 pmol/l) banyak terjadi pada pasien diabetes mellitus tipe 2. Walaupun Indonesia merupakan negara tropis yang mendapat cukup sinar matahari, gaya hidup *sedentary life style* merupakan faktor risiko terjadinya defisiensi vitamin D. Gaya hidup yang cenderung beraktivitas dalam gedung dari pagi hingga malam, sehingga durasi terkena paparan cahaya matahari kurang dari rekomendasi, idealnya durasi paparan sinar matahari berkisar 450 menit/minggu. Selain itu makanan sumber vitamin D hanya sedikit, seperti ikan salmon, mackerel, ikan cod, jamur shittake, dan kuning telur.^{5,9} Sumber vitamin D terbanyak dapat ditemukan pada ikan laut, namun sayangnya tingkat konsumsi ikan laut masyarakat Indonesia masih rendah.¹⁰ Selain itu, penumpukan jaringan adiposa pada *overweight* dan obesitas menyebabkan vitamin D tersimpan dalam jaringan adiposa sehingga tidak dapat diabsorpsi oleh tubuh.¹⁰ Sedangkan permasalahan defisiensi vitamin B12 pada pasien diabetes mellitus tipe 2 diakibatkan asupan diet yang kurang dan malabsorpsi vitamin B12. Metformin, salah satu jenis obat *biguanides* untuk menurunkan kadar glukosa darah, dilaporkan menghambat absorpsi vitamin B12 karena metformin dapat mengubah motilitas usus untuk pertumbuhan bakteri usus sehingga berlebih dan mengganggu homeostasis kalsium, dimana penyerapan vitamin B12 bergantung dengan adanya kalsium.¹¹⁻¹⁴

Berdasarkan permasalahan tersebut, fortifikasi makanan merupakan salah satu upaya untuk mengatasi defisiensi vitamin B12 dan vitamin D3 pada

pasien diabetes mellitus tipe 2. Adanya sumber makanan kaya vitamin B12 dan vitamin D3 diharapkan memenuhi kebutuhan akan vitamin tersebut. Fortifikasi pangan merupakan penambahan satu atau lebih zat gizi ke dalam bahan pangan dengan tujuan meningkatkan tingkat konsumsi dari zat gizi yang ditambahkan untuk meningkatkan status gizi dan mencegah defisiensi zat gizi.¹⁸ Hasil penelitian konsumsi yogurt berfortifikasi vitamin D3 (1000 IU/hari) selama 12 minggu terbukti memperbaiki status glikemik pasien diabetes mellitus tipe 2, sedangkan fortifikasi vitamin B12 masih jarang dilakukan, namun pemberian vitamin B12 500mcg bersama dengan folat terbukti berkaitan dengan penurunan resistensi insulin.

Susu dan produk olahannya merupakan salah satu media yang baik untuk fortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3.¹⁸ Salah satu olahan produk susu yang memiliki banyak keunggulan untuk kesehatan adalah kefir. Kefir merupakan jenis olahan susu fermentasi dari bibit kefir yang mengandung khamir dan bakteri probiotik yang berasal dari Kaukasus, Rusia. Kefir mengandung kompleks bakteri probiotik, seperti *lactobacilli*, *lactococi*, *leuconostoc*, dan *acetobacteria*.¹⁹ Hasil penelitian yang dilakukan Ostadrahimi et al menunjukkan keunggulan kefir terhadap profil glukosa pada tikus diabetes, yaitu penurunan nilai HbA1c dan kadar glukosa darah puasa dengan cara mencegah kerusakan sel beta pankreas karena adanya aktivitas antioksidan dari probiotik.²⁰ Aktivitas antioksidan probiotik dapat mencegah kerusakan oksidatif dengan cara mencegah peroksidasi lipid dan meningkatkan antioksidan, seperti glutathione peroksidase, katalase, dan *superoxide dismutase* pada tikus diabetes.²¹ Keunggulan kefir lainnya yaitu adanya eksopolisakarida yang disebut kefiran. Kefiran merupakan heteropolisakarida yang larut dalam air, terdiri dari glukosa dan galaktosa dan diproduksi oleh *lactobacillus kefiranofaciens*.²² Kefiran berperan sebagai emulsifier, stabilisator, pengental, pengikat, koagulan, dan pelumas. Kefiran merupakan enkapsulasi alami²³, sehingga diharapkan dapat menjaga kestabilan dari vitamin B12 dan vitamin D3 yang ditambahkan dalam kefir.

Komposisi gizi kefir tergantung pada jenis susu yang difermentasi sehingga komponen bioaktif yang terbentuk secara kuantitas juga berbeda.^{19,24}

Susu kambing merupakan bahan yang unggul untuk diolah menjadi kefir. Kandungan kalsium, magnesium dan fosfor dalam susu kambing lebih tinggi daripada susu sapi. Kualitas protein susu kambing lebih baik daripada susu sapi karena protein susu kambing lebih mudah larut dan dicerna serta risiko alergi yang lebih rendah. Susu kambing mengandung *medium chain fatty acid (MCT)* dengan proporsi yang tinggi, seperti butirrat, laurat, kaproat, palmitat, asam linoleat, dan asam α -linoleat dengan rantai cabang 4-18 atom karbon. Butiran lemak susu kambing memiliki ukuran rata-rata sebesar 2 μm , lebih kecil dari pada ukuran butiran lemak susu sapi yang mencapai 2,5-3,5 μm .²⁵ Hal tersebut membuat lemak susu kambing lebih homogen daripada susu sapi sehingga lebih mudah dicerna. Walaupun banyak keunggulan dari susu kambing, susu kambing memiliki kekurangan, yaitu kandungan vitamin C, D, B6, B12 dan asam folat yang rendah.^{26,27}

Mutu gizi kefir dan kestabilan vitamin B12 dan vitamin D3 dalam kefir merupakan salah satu indikator keefektifan fortifikasi. Fortifikasi vitamin D3 yang pernah dilakukan pada produk keju terbukti efektif karena tidak mengubah karakteristik sensori dan vitamin D3 stabil dalam keju hingga 9 bulan²⁸, sedangkan penelitian tentang fortifikasi vitamin B12 belum banyak diteliti. Kefir merupakan minuman yang sensitif terhadap perubahan mutu gizi selama penyimpanan karena adanya aktivitas metabolisme bakteri dan ragi atau khamir yang aktif. Hasil penelitian melaporkan bahwa terjadi peningkatan CO₂ dan etanol akibat adanya aktivitas *Saccaromyces cervisiae* selama penyimpanan.²⁹ Selain itu aktivitas bakteri asam laktat dan asetat dalam kefir dapat menyebabkan denaturasi lemak,³⁰ peningkatan viskositas, dan penurunan pH³¹ selama penyimpanan. Hasil penelitian melaporkan bahwa kefir masih aman dikonsumsi hingga 1 bulan bahkan hingga 2 bulan walaupun terjadi perubahan komposisi kefir selama penyimpanan.^{29,32} Berdasarkan hal tersebut, terdapat kemungkinan bahwa fortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 dapat berpengaruh terhadap mutu gizi kefir karena kefir rentan mengalami perubahan mutu gizi. Oleh sebab itu, peneliti ingin mengetahui mutu gizi kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3, yang meliputi kandungan vitamin B12, vitamin D3, karbohidrat,

protein, lemak, serat dan total bakteri selama penyimpanan 0, 3, 6, 9, 15, dan 30 hari.

B. Perumusan Masalah

Bagaimana mutu gizi kefir berfortifikasi vitamin D₃ dan vitamin B₁₂ selama masa penyimpanan?

C. Tujuan

1. Tujuan umum

Mengetahui mutu gizi kefir susu kambing berfortifikasi vitamin D₃ dan vitamin B₁₂ selama penyimpanan.

2. Tujuan khusus

- a. Mendeskripsikan kandungan gizi yaitu karbohidrat, protein, lemak, serat pada kefir susu kambing berfortifikasi vitamin D₃ dan vitamin B₁₂ selama penyimpanan.
- b. Mendeskripsikan kandungan kadar vitamin B₁₂ dan vitamin D₃ pada kefir susu kambing berfortifikasi vitamin D₃ dan vitamin B₁₂ selama penyimpanan.
- c. Mendeskripsikan total bakteri pada kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B₁₂ dan vitamin D₃ selama penyimpanan.
- d. Mendeskripsikan nilai pH dan viskositas pada kefir susu kambing berfortifikasi vitamin D₃ dan vitamin B₁₂ selama penyimpanan.

D. Manfaat hasil

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi kepada para peneliti dan masyarakat tentang mutu gizi kefir berfortifikasi vitamin B₁₂ dan vitamin D₃. Hasil penelitian juga dapat sebagai referensi penelitian lebih lanjut untuk diuji cobakan ke hewan percobaan dan manusia

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Pustaka

1. Resistensi Insulin dan Diabetes Mellitus

Insulin adalah hormon yang dibuat oleh kelenjar pankreas. Sel-sel beta pankreas membuat insulin dan melepaskannya ke dalam darah. Insulin berperan dalam metabolisme dengan cara membantu sel-sel otot, lemak, dan hati untuk menyerap glukosa yang dibutuhkan untuk energi. Insulin juga merangsang jaringan otot dan hati menyimpan glukosa dalam bentuk glikogen.³³

Diabetes mellitus tipe 2 merupakan penyakit dengan metabolik kompleks, yang ditandai dengan tingginya stres oksidatif dan inflamasi kronis. Stress oksidatif menjadi dasar patofisiologi dari resistensi insulin dan diabetes mellitus tipe 2.^{34,35} Obesitas, penambahan umur, dan kebiasaan hidup tidak sehat berkontribusi menciptakan lingkungan oksidatif. Konsekuensi dari lingkungan oksidatif yaitu perkembangan resistensi insulin, disfungsi sel beta pankreas, kegagalan toleransi glukosa, dan disfungsi mitokondria. Hasil studi menyebutkan bahwa penurunan transport glukosa ke dalam sel adalah akibat adanya *reactive oxygen species (ROS)* yang merupakan produk akhir metabolisme asam lemak bebas. ROS mempengaruhi aktivitas transporter utama glukosa GLUT-4. Penelitian pada tikus yang salah satu allele gen GLUT-4 nya dirusak menghasilkan resistensi insulin yang parah.³⁶ Resistensi insulin merupakan kondisi dimana sel beta pankreas memproduksi insulin, namun sel atau jaringan target tidak merespon dengan baik terhadap insulin dan mengakibatkan gangguan dalam penyerapan glukosa darah. Akibatnya, tubuh membutuhkan insulin lebih banyak untuk menyerap glukosa, sehingga memperberat kerja sel beta pankreas. Resistensi insulin

merupakan *onset* perkembangan diabetes mellitus tipe 2 karena sel beta gagal memenuhi kebutuhan tubuh akan insulin.³³

Pasien diabetes berisiko mengalami defisiensi vitamin B12 dan vitamin D3. Asupan sumber vitamin B12, malabsorpsi vitamin, dan faktor usia berpengaruh terhadap konsentrasi vitamin B12 dalam plasma. Beberapa hasil penelitian melaporkan defisiensi vitamin B12 banyak terjadi pada pasien diabetes mellitus tipe 2 yang mengonsumsi metformin. Penggunaan metformin menyebabkan malabsorpsi vitamin B12 karena metformin dapat mengubah motilitas usus untuk pertumbuhan bakteri usus yang berlebih dan mengganggu homeostasis kalsium, dimana penyerapan vitamin B12 bergantung dengan adanya kalsium.³⁷

Konsentrasi vitamin D3 cenderung rendah pada pasien diabetes mellitus. Serum 25-hydroxyvitamin D (25OHD) adalah standar indikator status vitamin D, yang terdiri dari kolekalsiferol (vitamin D3) dan ergokalsiferol (vitamin D2). Kriteria defisiensi vitamin D yaitu konsentrasi vitamin D dalam plasma kurang dari 30 ng/mL.³⁸ Defisiensi vitamin D3 dikaitkan dengan perkembangan diabetes mellitus, dimana vitamin D3 berperan dalam mengatur sensitivitas insulin.¹⁵ Defisiensi vitamin D3 pada pasien diabetes disebabkan multifaktor, seperti kurangnya paparan sinar matahari, tingginya stress oksidatif, adiposa, aktivitas fisik dan usia. Stress oksidatif berkorelasi negatif terhadap level vitamin D₃ dalam plasma, jika stress oksidatif meningkat, maka vitamin D₃ menurun dalam plasma. Penurunan bioavailabilitas vitamin D3 disebabkan adanya perubahan absorpsi vitamin D3 dalam usus halus atau perubahan metabolisme vitamin D3 dalam tubuh.¹⁵

2. Vitamin D₃ (*Cholecalciferol*)

Vitamin D3 memiliki dua bentuk, yaitu vitamin D2 (ergokalsiferol) dan vitamin D3 (kolekalsiferol), keduanya merupakan senyawa sterol yang berperan sebagai regulator homeostasis kalsium dan fosfor. Vitamin D

memiliki polaritas yang rendah, sehingga vitamin D tidak larut dalam air. Vitamin ini juga sensitif terhadap oksidasi, cahaya, dan panas.³⁹

Vitamin larut lemak ini berperan dalam diferensiasi sel dan sekresi serta metabolisme hormon, termasuk hormon paratiroid dan insulin. Vitamin D₃ disintesis di kulit dengan bantuan sinar ultraviolet dari cahaya matahari dan dapat diperoleh dari diet (kuning telur, hati, dan protein hewani). Vitamin D₂ juga diperoleh dari diet dari tanaman (*ergocalciferol*). Kedua bentuk vitamin tersebut dimetabolisme dengan cara yang sama oleh tubuh, ditinjau dari segi gizi vitamin D₃ dan vitamin D₂ dianggap sama. Vitamin D dimetabolisme dalam hati menjadi 25-hydroxyvitamin (25(OH)D). Kadar serum 25(OH)D dapat menjadi tolak ukur status vitamin D. Dalam ginjal, 25(OH)D diubah menjadi 1,25-dihydroxyvitamin-D (1,25-(OH)₂-D), yang merupakan bentuk aktif vitamin.⁴⁰ 1,25-(OH)₂-D berperan dalam duodenum untuk meningkatkan absorpsi kalsium, vitamin ini juga berperan dalam sel tulang (osteoblas dan osteoklas) untuk mobilisasi kalsium.⁴⁰

Mekanisme absorpsi vitamin D dari saluran pencernaan sama dengan absorpsi lemak. Vitamin D berikatan dengan *micelles* dan bergabung dengan lipid melalui difusi pasif untuk masuk ke dalam enterosit. Adanya lemak di duodenum merangsang pelepasan asam empedu untuk memfasilitasi absorpsi lemak dan vitamin larut lemak. Oleh sebab itu, vitamin D dapat menunjukkan efisiensinya jika dilarutkan dalam minyak, bubuk laktosa, dan bubuk selulosa.⁴¹

Mekanisme vitamin D₃ mempengaruhi sensitivitas insulin, yaitu 1,25(OH)₂D₃ berperan dalam diferensiasi osteoblast dan sensitivitas insulin melalui aktivasi sistem pengaturan endokrin, dimana insulin memberi sinyal untuk akuisisi tulang dan merangsang sekresi *undercarboxylated osteocalcin* yang berperan sebagai hormon pengatur produktivitas dan sensitivitas insulin.¹⁵

Vitamin D₃ stabil dalam susu dan produk olahannya.⁴² Fortifikasi vitamin D₃ di Amerika dan Kanada pada produk susu terbukti

meningkatkan kadar vitamin D3 pada plasma. Rekomendasi vitamin D dalam satu hari yaitu 600 IU (usia 1-70 tahun) dan 800 IU (usia>70 tahun). Berdasarkan FDA 2007, rekomendasi fortifikasi vitamin D3 pada susu yaitu 400IU (10 µg) per *quart* (1 *quart*=946,4 mL).⁴³

Susu merupakan kendaraan yang baik untuk fortifikasi vitamin D3 karena vitamin D3 bersifat larut lemak dan mengandung kalsium yang baik untuk tulang. Hasil penelitian fortifikasi vitamin D3 terhadap keju di Amerika dengan dosis 150 IU/ sajian keju, diperoleh hasil bahwa vitamin D3 tidak menyebabkan perubahan rasa pada keju. Hingga bulan ke 9, vitamin D3 masih stabil dalam keju yang difortifikasi dengan vitamin D.²⁸ Fortifikasi vitamin D3 juga pernah dilakukan terhadap yogurt. Konsumsi yogurt yang difortifikasi vitamin D3 (1000 IU/hari) dan kalsium (600mg/hari) signifikan menurunkan glukosa darah, mengurangi inflamasi, dan meningkatkan regulasi glukosa yang digunakan untuk energi pada pasien diabetes mellitus II.⁸ Suplementasi vitamin D3 pada penderita diabetes mellitus II *African Americans*, level vitamin D3 meningkat dari 25 ng/mL menjadi 34 ng/mL dan signifikan menurunkan hemoglobin A1c dari 9.15% menjadi 7.98%.⁴⁴

3. Vitamin B12 (Kobalamin)

Vitamin B12 (kobalamin) mempunyai struktur cincin yang kompleks (cincin corrin), dimana terkandung kobalt di bagian tengahnya. Sianokobalamin merupakan bentuk yang paling stabil. Sumber vitamin B12 adalah makanan produk hewani, seperti daging, telur, dan susu. Vitamin B12 bersifat larut dalam air, stabil hingga suhu 100⁰C, dipengaruhi kondisi asam atau basa, dan dipengaruhi cahaya. Vitamin B12 stabil terhadap oksigen, larutan asam, namun tidak stabil pada kondisi basa atau alkali dengan suhu >100⁰C, sangat asam, dan mudah terdegradasi oleh cahaya, sehingga sebaiknya disimpan di tempat gelap.⁴⁵

Proses penyerapan vitamin B12 dimulai di dalam lambung, asam klorida dan enzim pepsin melepaskan vitamin B12 dari protein yang

terpasang dalam makanan. Lambung juga juga mengeluarkan molekul yang disebut faktor intrinsik yang mengikat vitamin B12. Faktor intrinsik dan vitamin B12 terikat bersama dan diserap usus kecil, di mana reseptor mengenali kompleks vitamin B12-faktor intrinsik (reseptor tidak mengenali vitamin B12 sendiri tanpa faktor intrinsik.) Vitamin B12 mengikuti rute sirkulasi enterohepatik. Hal ini terus disekresi ke empedu dan dikirim ke usus, di mana vitamin B12 diserap.³⁷

Vitamin B12 berfungsi sebagai bagian dari koenzim methylcobalamin dan deoxyadenocobalamin yang berperan dalam sintesis sel-sel baru, membantu memelihara sel-sel saraf, membantu mengubah folat menjadi bentuk aktif, dan membantu memecah asam lemak dan asam amino. Vitamin B12 juga berperan dalam sintesis monoamino atau neurotransmitter seperti serotonin dan dopamin.¹² Vitamin B12 berperan dalam fungsi fisiologis melalui 2 jalur enzimatik yaitu proses metilasi homosistein menjadi metionin dan konversi dari *methylmalonyl coenzyme A (CoA)* menjadi succinyl-CoA. Vitamin B12 berperan sebagai kofaktor yang memfasilitasi metilasi homosistein menjadi metionin, dimana vitamin melepaskan grup metil ke penerima metil, yaitu myelin, neurotransmitter, dan membran fosfolipid.^{12,46}

Defisiensi vitamin B12 menyebabkan gangguan pada proses metilasi dan peningkatan serum homosistein. Hiperhomosisteinemia berpotensi merusak saraf dan endotelium pembuluh darah. Reaksi ini esensial dalam konversi asam folat (metil-tetrahydrofolat) menjadi tetrahydrofolat, bentuk aktif dalam metabolisme.^{46,47} Kondisi defisiensi vitamin B12 juga mengakibatkan konversi methylmalonyl coenzyme A (CoA) menjadi succinyl-CoA berkurang sehingga terjadi peningkatan serum *methylmalonic acid (MMA)*. Hal ini diikuti dengan sintesis asam lemak dalam membran saraf menjadi terganggu.¹²

Kebutuhan vitamin B12 pada orang dewasa sebanyak 2,4 mcg per hari. Dalam penelitian ini, penambahan vitamin B12 pada kefir susu kambing sebanyak 20 mcg/100 gr kefir.⁴⁸

Kandungan vitamin B12 pada berbagai susu dan olahannya tidak begitu tinggi, namun kontribusi asupan vitamin B12 dari susu dan olahannya signifikan karena dikonsumsi oleh banyak orang. Ketika vitamin B12 (0,25 lg) dicampur pada susu dan dikonsumsi oleh manusia, rata-rata absorpsi oleh tubuh sebesar 55% atau 65%. Vitamin B12 dapat hilang selama proses pengolahan susu, pemanasan selama 2-5 menit dan 30 menit dapat mengakibatkan kehilangan vitamin B12 sebesar 30% hingga 50%.⁴⁹

4. Fortifikasi

Fortifikasi pangan biasanya dianggap sebagai tambahan yang disengaja dari satu atau lebih zat gizi mikro untuk makanan tertentu, sehingga dapat meningkatkan asupan mikronutrien dalam rangka untuk memperbaiki atau mencegah defisiensi zat gizi. Tujuan utama adalah untuk meningkatkan tingkat konsumsi dari zat gizi yang ditambahkan untuk meningkatkan status gizi populasi. Keunggulan fortifikasi yaitu mendukung tubuh menyimpan zat gizi lebih efektif dan efisien daripada suplemen. Fortifikasi makanan juga baik menurunkan risiko defisiensi *multiple* akibat asupan yang buruk.¹⁸

Syarat fortifikan adalah tidak mengubah organoleptik bahan pangan, dapat homogen dengan bahan pangan, bioavailabilitas tinggi dan mudah dicampurkan ke bahan pangan.¹⁸ Syarat bahan pangan yang difortifikasi adalah bahan pangan mudah ditemui, dapat homogen dengan fortifikan, dapat dikonsumsi cukup, teratur, dan konsisten.

Bioavailabilitas zat gizi atau fortifikan merujuk pada absorpsi dan peran fisiologis dalam tubuh. Faktor yang berkaitan dengan bioavailabilitas, sebagai berikut (1) beberapa vitamin dan mineral mudah diabsorpsi;(2) interaksi antara zat gizi;(3) komponen makanan yang dapat menghambat atau meningkatkan absorpsi; (4) absorpsi zat gizi dipengaruhi status gizi dan kesehatan konsumen.⁴⁵

5. Susu Kambing

Susu kambing memiliki prospek yang sangat baik untuk dikembangkan sebagai minuman kesehatan. Karakteristik warna lebih putih, globula lemak susunya relatif kecil sehingga lebih mudah dicerna, dan mengandung mineral seperti kalsium, fosfor, vitamin A, E, dan B kompleks yang tinggi. Komposisi rata-rata susu kambing adalah air 87,0%, lemak 4,25%, laktosa 4,27%, protein 3,52%, abu 0,86% dan total bahan padat 13,0%.⁵⁰

Susu kambing memiliki ukuran rata-rata butiran lemak sebesar 2 mikrometer, lebih kecil dari pada ukuran butiran lemak susu sapi yang mencapai 2,5-3,5 mikrometer. Ukuran butiran lemak yang lebih kecil dan tingginya kandungan *medium chain trygliserides (MCT)*, membuat lemak susu kambing lebih tersebar dan homogen sehingga lebih mudah dicerna oleh sistem pencernaan manusia.^{27,51} Komponen lemak dalam susu kambing 97% berupa triasilgliserol.²⁵

Protein susu kambing lebih mudah larut dan lebih mudah diserap serta lebih rendah dalam memicu alergi oleh tubuh sehingga kualitas protein susu kambing lebih baik dibandingkan dengan susu sapi.²⁷ Kandungan utama protein susu kambing yaitu β -kasein, sedangkan kandungan protein utama pada susu sapi adalah α -kasein. β -kasein lebih mudah diserap dibandingkan α -kasein yang lama dicerna oleh enzim lambung. Taurin merupakan asam amino bebas yang dominan dalam susu kambing. Peran taurin dalam tubuh, seperti pertumbuhan dan perkembangan otak, formasi asam empedu, modulasi kalsium, dan berperan sebagai penstabil membran dengan cara osmoregulasi.²⁵

Laktosa merupakan karbohidrat utama dalam susu kambing, namun kandungan lebih rendah daripada susu sapi. Laktosa disintesis dari glukosa dan galaktosa dalam kelenjar mamalia. Oligosakarida, glikopeptida, glikoprotein, dan nukleotida merupakan karbohidrat lain

yang ada di susu kambing dalam jumlah yang sedikit. Oligosakarida susu bermanfaat bagi tubuh karena memiliki properti antiinfeksi dan merupakan prebiotik.²⁵

Susu kambing mengandung vitamin dalam jumlah memadai, kecuali vitamin C, D, B6, B12, dan asam folat.²⁶ Kandungan kalsium, magnesium, dan fosfor pada susu kambing lebih tinggi dari susu sapi dan ASI.²⁵

Tabel 1. Kandungan gizi susu kambing per 100 gram⁵²

No	Kandungan	Susu sapi	Susu kambing
1	Total padat (%)	12,01	12,97
2	Energi (kkal)	61	69
3	Protein (%)	3,29	3,56
4	Lemak (%)	3,34	4,14
5	Karbohidrat (%)	4,6	4,45
6	Kadar abu (%)	0,72	0,72
7	Vitamin B12 (mcg)	0,0357	0,065
8	Vitamin D (mcg)	0,03	0,03
9	Asam folat (mcg)	6	1
10	Kalsium	119	134
11	Besi	0,05	0,05
12	Fosfor	93	111
13	Kalium	152	204
14	Natrium	49	50
15	Seng	0,38	0,3
16	Vitamin A	52	44
17	Vitamin C	1	1
18	Vitamin E	0,09	0,03

6. Kefir

Kefir adalah olahan susu fermentasi yang berasal dari penguungan Kaukasus. Fermentasi adalah metode yang telah digunakan ribuan tahun yang lalu untuk memperpanjang umur simpan makanan. Fermentasi merupakan proses kimia dimana enzim memecah substansi organik menjadi lebih kecil, hal inilah yang menyebabkan, lebih mudah dicerna, stabil, dan meningkatkan kualitas gizi.⁴² Kefir dibuat dari aktifitas fermentasi bibit kefir, starter alami yang mengandung beragam bakteri asam laktat, asam asetat, dan ragi di dalam matriks polisakarida. Salah satu fitur dari kefir yang berbeda dari produk susu fermentasi lainnya adalah bibit kefir dapat dipulihkan setelah fermentasi dengan sedikit peningkatan biomassa bibit kefir hingga 25% dari jumlah fermentasi awal.^{53,54} Bibit

kefir berbentuk seperti bunga kol dengan ukuran diameter berkisar 3-20 mm.^{55,56}

Kefir diolah dengan menambahkan secara sengaja bibit kefir dalam susu yang telah dipasteurisasi, diperam dan konsentrasi bibit kefir akan menentukan lama pemeraman dan keasaman yang terbentuk, sehingga akan berpengaruh terhadap kualitas produk akhir yang dihasilkan. pH kefir berkisar antara 4,2 hingga 4,6.⁵⁵ Selama fermentasi 24 jam dengan suhu 20-25⁰C terjadi penurunan jumlah laktosa susu secara perlahan, diikuti juga dengan penurunan pH. Selama fermentasi, bibit kefir bertambah ukuran dan jumlahnya. Bakteri asam laktat dalam bibit kefir membutuhkan enzim yang dihasilkan ragi untuk pertumbuhan, sedangkan ragi menggunakan produk hasil fermentasi bakteri asam laktat sebagai sumber karbon dan energi sehingga bakteri asam laktat dan kefir dapat tumbuh dengan perbandingan yang seimbang. Penambahan bibit kefir 30 gram per liter susu dan lama pemeraman 24 jam pada suhu ruang menghasilkan kefir dengan kualitas yang sesuai dengan standar susu fermentasi.⁵⁴ Beberapa penelitian lain menyebutkan rasio 1:20 hingga 1:50 merupakan rasio optimum antara bibit kefir dan susu.^{24,31,32,54}

Kefir susu kambing merupakan salah satu produk fermentasi susu yang mengandung banyak bakteri probiotik, seperti *lactobacilli*, *lactococi*, *leuconostoc*, dan *acetobacteria*. Susu fermentasi ini mengandung alkohol 0,5 – 1 %. Bakteri yang menyebabkan terbentuknya alkohol adalah *Sacharomyces* kefir dan *Torula* kefir.³¹ Jika disimpan dengan baik, aktivitas bakteri kefir dapat bertahan hingga satu tahun. Selama penyimpanan produksi CO₂ oleh ragi atau bakteri asam laktat heterofermentatif menyebabkan kemasan kefir dapat mengembang, sehingga kemasan kefir perlu diperhatikan.³⁰

Penelitian yang dilakukan Ejtahed et.al melaporkan konsumsi probiotik berpengaruh terhadap glukosa darah puasa, HbA1C dan status antioksidan dalam pasien diabetes tipe 2, dan stres oksidatif yang disebabkan oleh hiperglikemia. Dalam kondisi diabetes mellitus tipe 2,

kegagalan insulin dirangsang karena ketidakefektifan penyerapan glukosa oleh reseptor sel atau jaringan yang menyebabkan konsentrasi glukosa dalam darah tinggi, sehingga produk oksidan tinggi menyebabkan stres oksidatif. Penurunan glukosa darah puasa dan HbA1C terkait dengan aktivitas antioksidan susu probiotik-fermentasi pada beberapa jalur berinteraksi, yang akhirnya berpengaruh pada regulasi glukosa darah⁵⁷

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa kefir mengandung bioaktif yang bersifat terapeutik yang digunakan untuk mendukung pengobatan sindrom metabolik (hipertensi, resistensi insulin, dislipidemia, dan obesitas). Probiotik dapat mempengaruhi resistensi insulin dengan mengurangi respon inflamasi pada diabetes. Kondisi stres oksidatif pada diabetes dapat menyebabkan resistensi insulin dan akibatnya penyerapan glukosa berkurang dalam jaringan perifer. Dalam beberapa tahun terakhir, probiotik digunakan sebagai suplemen alternatif karena memiliki manfaat kesehatan termasuk penurunan serum/plasma kolesterol total, LDL-kolesterol.⁵⁷

a. Komposisi kefir

Kefir mengandung vitamin, mineral, dan asam amino esensial yang bermanfaat untuk kesehatan. Kandungan protein lengkap dalam kefir dan sudah dalam bentuk mudah dicerna oleh tubuh. Triptofan adalah salah satu asam amino esensial yang melimpah dalam kefir. Kalsium dan magnesium melimpah di dalam kefir. Kedua mineral ini berperan mendukung kesehatan saraf. Kefir juga kaya fosfor, yang berperan dalam metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein untuk pertumbuhan sel dan energi.⁵⁵

Tabel 2. Kandungan gizi kefir⁵⁵

Komponen gizi	Per 100 gram	Komponen gizi	Per 100 gram
Energi	65	Vitamin B1	0,04
Lemak (%)	3,5	Vitamin B2	0,17
Protein (%)	3,3	Vitamin B6	0,05
Laktosa (%)	4	Kalsium	0,12
Air (%)	87,5	Fosfor	0,10
Asam susu (g)	0,8	Magnesium	12
Etil alkohol (g)	0,9	Kalium	0,15
Asam laktat (g)	1	Natrium	0,05
Kolesterol (mg)	13	Klorida	0,1
Phosphatateds (mg)	40	Mineral	
Asam amino esensial		Besi	0,05
Triptofan	0,35	Tembaga	12
Fenilalanin + tirosin	0,35	Molibdenum	5,5
Leusin	0,34	Mangan	5
Isoleusin	0,21	Seng	0,36
Treonin	0,17	Vitamin B12	0,5
Metionin, <i>cystine</i>	0,12	Niasin	0,09
Lisin	0,27	Vitamin C	1
Valin	0,22	Vitamin D	0,08
Vitamin A	0,06	Vitamin E	0,11
Karoten	0,02		

Tabel 3. Karakteristik kefir berdasarkan *Codex Alimentarius*⁵⁸

Komposisi Kefir	Kandungan gizi dalam kefir
Protein susu	Minimal 2,7%
Lemak susu	Kurang dari 10 %
% asam laktat	Minimal 0,6%
Jumlah mikroorganisme (cfu/g)	Minimal 10 ⁷
Ragi	Minimal 10 ⁴

b. Kefiran

Eksopolisakarida atau *extracellular polysaccharides*, didefinisikan sebagai polimer karbohidrat yang dapat diproduksi oleh mikroorganisme. Eksopolisakarida merupakan polimer yang memiliki rantai cabang panjang dan mengandung glukosa, galaktosa, asam glukuronik.²² Biopolimer ini digunakan sebagai emulsifier, stabiliser, pengental, pengikat, koagulan, dan pelumas. Eksopolisakarida dapat digunakan dalam suspensi atau film. Industri makanan menggunakan biopolimer untuk mengubah tekstur, viskositas, dan elastisitas makanan. Eksopolisakarida diproduksi oleh mikroorganisme banyak digunakan dalam industri makanan, farmasi dan kimia, dan berfungsi sebagai *biofloculants*, *bioabsorbent*, agen penghapusan logam berat, agen pengiriman obat, dll.

Kefir mengandung eksopolisakarida yang disebut kefiran. Kefiran merupakan heteropolisakarida yang larut dalam air, terdiri dari glukosa dan galaktosa dan diproduksi oleh *Lactobacillus kefiranofaciens*.²² Peran biologis kefiran, mirip dengan EPS bakteri lain, yaitu melindungi sel bakteri dari kondisi yang merugikan, menciptakan lingkungan untuk bakteri, dan bersifat kontra terhadap biosintesis homopolisakarida karena formasi kefiran terdiri dari banyak enzim yang terlibat dan bergantung bakteri dalam metabolisme karbohidrat dan pertumbuhan bakteri dalam fermentasi. Kefiran dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri dan antitumor, memodulasi sistem imun dan melindungi sel epitel melawan faktor *exocellular Bacillus cereus*.⁵⁹

Kefiran dapat digunakan sebagai pengubah tekstur makanan dan meningkatkan sifat reologi, seperti meningkatkan elastisitas dan viskositas susu fermentasi.⁶⁰ Contoh polisakarida yang umum digunakan sebagai bahan aditif dalam industri yang adalah *dekstran, xanthan, gellan, pullulan, ragi glukon* dan bakteri alginat.^{19,59} Eksopolisakarida yang terdapat dalam kefir atau kefiran menunjukkan stabilitas flokulasi yang sama seperti xanthan tapi lebih baik daripada guar gum dengan titik leleh 93,38 °C yang lebih rendah dari gum xanthan (153,4 °C) dan guar gum (490,11 °C). Kefiran berpotensi sebagai pengemulsi, dibandingkan dengan heteropolisakarida lain yang tersedia secara komersial seperti xanthan, kefiran menunjukkan kemampuan pengemulsi jauh lebih baik.⁵⁹

c. Pengaruh lama penyimpanan

Waktu simpan merupakan kriteria kualitas produk yang penting dalam ketentuan standar produksi. Penyimpanan kefir pada suhu rendah harus dilakukan dengan tujuan untuk menghambat aktivitas bakteri asam laktat berlanjut sehingga keasaman kefir stabil. Kefir biasanya disimpan pada suhu 4°C agar kualitasnya dapat dipertahankan.⁵⁴

Ada tiga cara penyimpanan dingin berdasarkan perbedaan suhu yaitu suhu kamar (26-28° C), suhu rendah (5-10°C) dan suhu beku (di bawah suhu 0°C). Semakin rendah suhu penyimpanan mengakibatkan

daya simpannya bertambah lama. Penyimpanan pada suhu rendah menyebabkan terhambatnya pertumbuhan bakteri sehingga menghambat terjadinya perubahan biokimia, fisik dari produk pangan sehingga dapat memperpanjang umur simpannya.²⁴

Hasil penelitian tentang pengaruh suhu dan lama penyimpanan kefir terhadap kadar alkohol dan keasaman kefir melaporkan bahwa lama penyimpanan menunjukkan peningkatan kadar asam laktat dan kadar alkohol namun terjadi penurunan nilai pH. Kadar asam laktat berada pada kisaran normal 0,6-1,1% pada suhu kamar selama 4 hari dan 10 hari pada penyimpanan suhu rendah.²⁴ Lama penyimpanan juga menyebabkan kadar asam laktat kefir semakin tinggi karena kandungan laktosa susu akan dirubah oleh bakteri asam laktat. Mutu kefir yang baik diperoleh dari kadar asam laktat kefir berkisar antara 0,6-1,1%. Hasil penelitian terkait lama penyimpanan dengan mutu kefir terbaik diperoleh hasil yang beragam, ada penelitian yang menyebutkan penyimpanan suhu rendah pada hari ke-10 dengan kadar asam laktat sebesar 1,08%, merupakan mutu kefir terbaik, penelitian lain yang dilakukan oleh Sokolinska et al.(2008) melaporkan kefir yang disimpan selama 7 hari merupakan kefir dengan kualitas terbaik.²⁴ Hasil penelitian yang berbeda ditemukan pada penelitian terhadap kefir Norwegia yang menyebutkan selama satu bulan penyimpanan terjadi penurunan bakteri asam laktat dan peningkatan jumlah ragi. Hasil metabolisme ragi yaitu CO₂ dan etanol yang meningkat selama penyimpanan.²⁹ Penelitian lain yang serupa juga menyebutkan bakteri asam laktat mengalami penurunan sekitar 1.5 log unit antara penyimpanan hari ke-7 hingga hari ke-14, dan stabil setelah penyimpanan hari ke 14.⁶¹

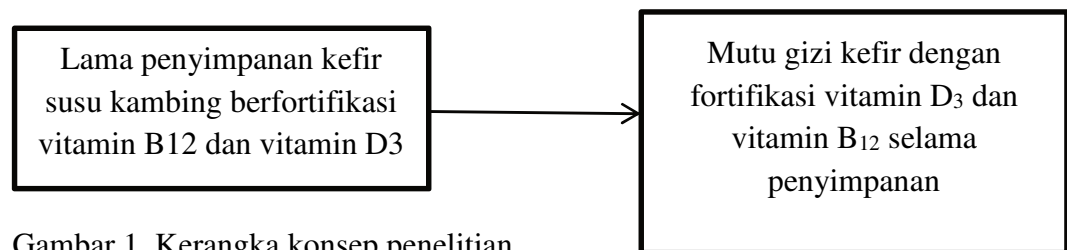
Penelitian tentang karakteristik kimia dan mikrobiologi kefir *Brazilia* selama fermentasi dan penyimpanan 2, 7, 14, dan 28 hari diperoleh hasil pH laktosa, asam sitrat pada kefir menurun, diikuti dengan peningkatan glukosa, galaktosa, etanol, asam laktat, asetat, butir, dan

asam propionat. Mikrobiologi dan karakteristik kimia berkontribusi terhadap rasa dan aroma kefir yang unik.

Penelitian tentang pengaruh lama penyimpanan terhadap kandungan asam lemak kefir menunjukkan hasil bahwa kadar lemak total tidak mengalami perubahan selama penyimpanan, namun lama penyimpanan berpengaruh terhadap komposisi asam lemak. Proses desaturase yang terjadi mengakibatkan peningkatan asam lemak tidak jenuh (*monounsaturated fatty acid* dan asam oleat) dan penurunan kadar lemak jenuh. Keasaman dan protein meningkat saat proses fermentasi, sedangkan lama penyimpanan kefir tidak terlalu berpengaruh terhadap tingkat keasaman dan protein.³⁰

Hasil penelitian lain melaporkan bahwa lama penyimpanan kefir susu kambing pada suhu refrigerator memiliki pengaruh terhadap nilai viskositas yang lebih tinggi dan terjadi peningkatan asam laktat, tetapi tidak ada perbedaan kualitas profil protein terlarut kefir susu kambing. Kefir susu kambing masih layak untuk dikonsumsi oleh konsumen hingga 28 hari penyimpanan.³¹

B. Kerangka Konsep



Gambar 1. Kerangka konsep penelitian

C. Hipotesis

Ada perbedaan mutu gizi kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 selama penyimpanan..

BAB III

METODE PELAKSANAAN

A. Ruang Lingkup Penelitian

1. Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup penelitian termasuk dalam lingkup Ilmu Teknologi Pangan terkait *food production*.

2. Ruang Lingkup Tempat

Penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro.

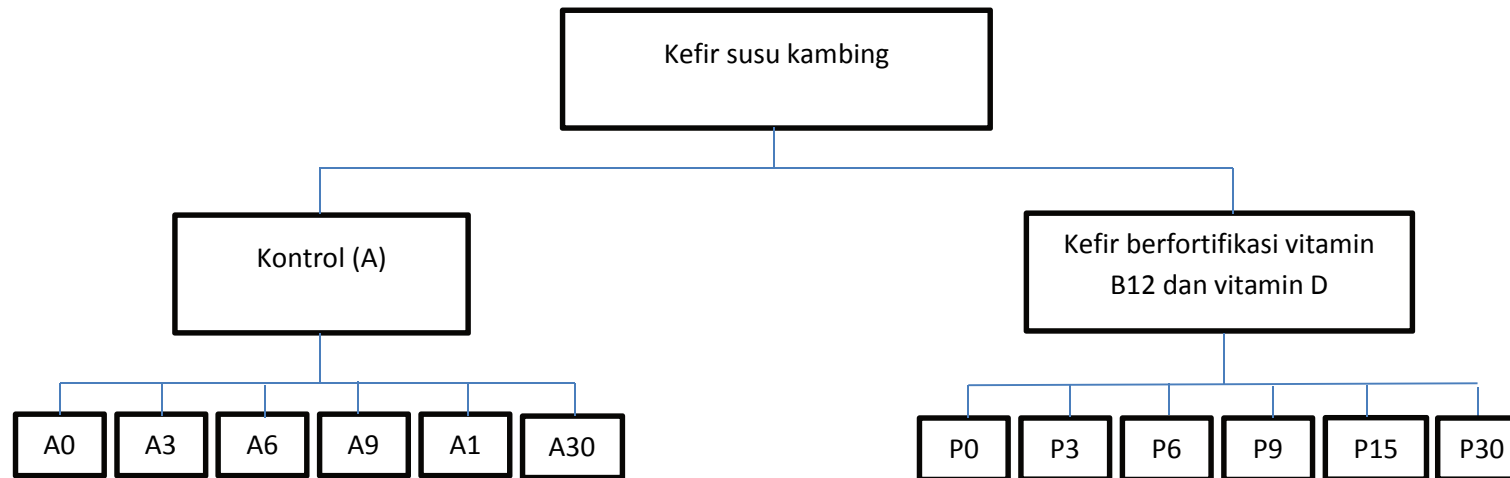
3. Ruang Lingkup Waktu

- a. Pembuatan Proposal : November- Desember 2016
- b. Penelitian : Januari-Februari 2017
- c. Pengolahan Data : Februari 2017
- d. Penulisan Laporan : Maret 2017

B. Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam jenis penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan penelitian acak lengkap. Berdasarkan rumus $(r-1)(t-1) \geq 15$, didapatkan bahwa jumlah pengulangan (r) adalah $r \geq 4$.

Rancangan acak lengkap (RAL) dalam penelitian ini terdiri dari enam perlakuan. Enam perlakuan tersebut antara lain : penyimpanan kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 hari ke-0 (P0), hari ke-3 (P3), hari ke-6 (P6), hari ke-9 (P9), hari ke-15 (P15), hari ke-30 (P30). Dalam penelitian ini, akan diuji kandungan vitamin B12, vitamin D3, karbohidrat, protein, lemak, serat, dan total mikroba. Selain itu, akan dilakukan analisis SEM (*Scanning Electron Microscopy*) untuk melihat morfologi dan komposisi kefir. Uji tambahan dalam penelitian ini yaitu pH dan viskositas untuk mengetahui kualitas kefir.



Bagan 2. Perencanaan penelitian

Keterangan :

- | | | |
|----------------------|------------------------|------------------------|
| A : Kelompok kontrol | A15 : Kefir hari ke-15 | P3 : Kefir hari ke-3 |
| A0 : Kefir hari ke-0 | A30 : Kefir hari ke-30 | P6 : Kefir hari ke-6 |
| A3 : Kefir hari ke-3 | | P9 : Kefir hari ke-9 |
| A6 : Kefir hari ke-6 | P : kelompok perlakuan | P15 : Kefir hari ke-15 |
| A9 : Kefir hari ke 9 | P0 : Kefir hari ke-0 | P30 : Kefir hari ke-30 |

C. Objek Penelitian

Objek dalam penelitian ini adalah mutu gizi kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D₃ berdasarkan lama penyimpanannya.

D. Variabel Penelitian

Variabel independen pada penelitian ini adalah lama penyimpanan, sedangkan variabel dependennya adalah mutu gizi kefir selama 0, 3, 6, 9, 15, dan 30 hari yang meliputi kandungan vitamin B12, vitamin D₃, uji karbohidrat, lemak, protein, dan serat serta uji total mikroba.

E. Definisi Operasional

1. Kefir susu kambing

Kefir susu kambing merupakan minuman fermentasi yang dibuat dengan penambahan bibit kefir. Penambahan bibit kefir sebesar 5% dan fermentasi berlangsung selama 24 jam.⁵⁴

Hasil ukur : mL

Skala : rasio

2. Fortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3

Fortifikasi atau penambahan vitamin B12 dan vitamin D₃ ke dalam kefir susu kambing saat proses fermentasi. Fortifikasi vitamin B12 sebesar 20 µg /100 mL kefir, sedangkan vitamin D₃ sebesar 42 IU/100mL.⁴³

Hasil ukur : µg /mL

Skala : rasio

3. Lama penyimpanan

Pengaruh lama penyimpanan kefir susu kambing kontrol dan kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan D₃ dibedakan menjadi 6 kelompok, yaitu penyimpanan hari ke 0,3,6,9, 15, dan 30.

Hasil ukur : hari

Skala : nominal

4. Kandungan gizi

a. Kadar vitamin B12

Kandungan vitamin B12 yang terkandung dalam kefir susu kambing kelompok kontrol dan perlakuan selama penyimpanan hari ke 0, 3, 6, 9, 15, 30. Analisis dilakukan dengan metode spektrofotometri.

Hasil ukur : μg

Skala : rasio

b. Kadar Vitamin D3

Hasil analisis kadar Vitamin D₃ yang terkandung dalam kefir susu kambing kelompok kontrol dan perlakuan selama penyimpanan hari ke 0, 3, 6, 9, 15, 30. Analisis dilakukan dengan metode spektrofotometri.

Hasil ukur : μg

Skala : rasio

c. Kadar Karbohidrat

Karbohidrat adalah senyawa yang terdiri dari unsur karbon, hidrogen, dan oksigen.⁷⁰ Kadar karbohidrat total ditentukan dengan metode *by difference*.

Hasil ukur : %

Skala : rasio

d. Kadar Lemak

Lemak merupakan senyawa ester asam lemak dengan alkohol dan sukar larut dalam air.⁷⁰ Kadar lemak dapat ditentukan dengan metode ekstraksi soxhletasi.

Hasil ukur : %

Skala : rasio

e. Kadar Protein

Senyawa organik kompleks yang merupakan polimer dari monomer asam amino yang dihubungkan satu sama lain dengan ikatan peptida.⁷⁰ Kadar protein dapat ditentukan dengan metode Kjeldahl.

Hasil ukur : %

Skala : rasio

f. Kadar Serat

Serat kasar adalah komponen sisa hasil hidrolisis suatu bahan pangan dengan asam kuat selanjutnya dihidrolisis dengan basa kuat sehingga terjadi kehilangan selulosa sekitar 50 % dan hemiselulosa 85 %.⁷⁰ Kandungan serat diukur menggunakan metode penentuan kadar serat kasar AOAC1995.

Hasil ukur : %

Skala : rasio

g. Uji total Mikroba

Uji total mikroba menggunakan angka Lempeng Total atau disebut juga TPC (Total Plate Count). Prinsip pengujian Angka Lempeng Total menurut metode Analisis Mikrobiologi (MA PPOM 61/MIK/06) yaitu pertumbuhan koloni bakteri aerob mesofil setelah bahan diinokulasikan pada media lempeng dengan cara dituang dan diinkubasi pada suhu yang sesuai.

Hasil ukur : angka dalam koloni (cfu) per ml/g atau koloni/100ml

Skala : rasio

5. Analisis SEM (Scanning Electron Microscope)

Analisis menggunakan mikroskop elektron untuk melihat permukaan, morfologi, dan komposisi dari kefir berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 dengan mutu gizi yang terbaik.

Hasil ukur : -

Skala : rasio

6. Uji tambahan

a. Viskositas

Viskositas adalah kekentalan dari zat cair. Pengukuran viskositas menggunakan *viscometer*.

Hasil ukur : cPs

Skala : rasio

b. Nilai pH (derajat keasaman)

Nilai pH (derajat keasaman) merupakan hasil analisis kadar asam kefir susu kambing pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, diukur dengan pH meter.

Hasil ukur : 1. Asam= <7
2. Netral= 7
3. Basa= >7

Skala : Interval

F. Prosedur penelitian

1. Pembuatan kurva standar

Tahapan penelitian dimulai dari pembuatan kurva standar vitamin B12 dan vitamin D3 dengan menggunakan metode spektrofotometri (metode terlampir).

2. Pembuatan Kefir

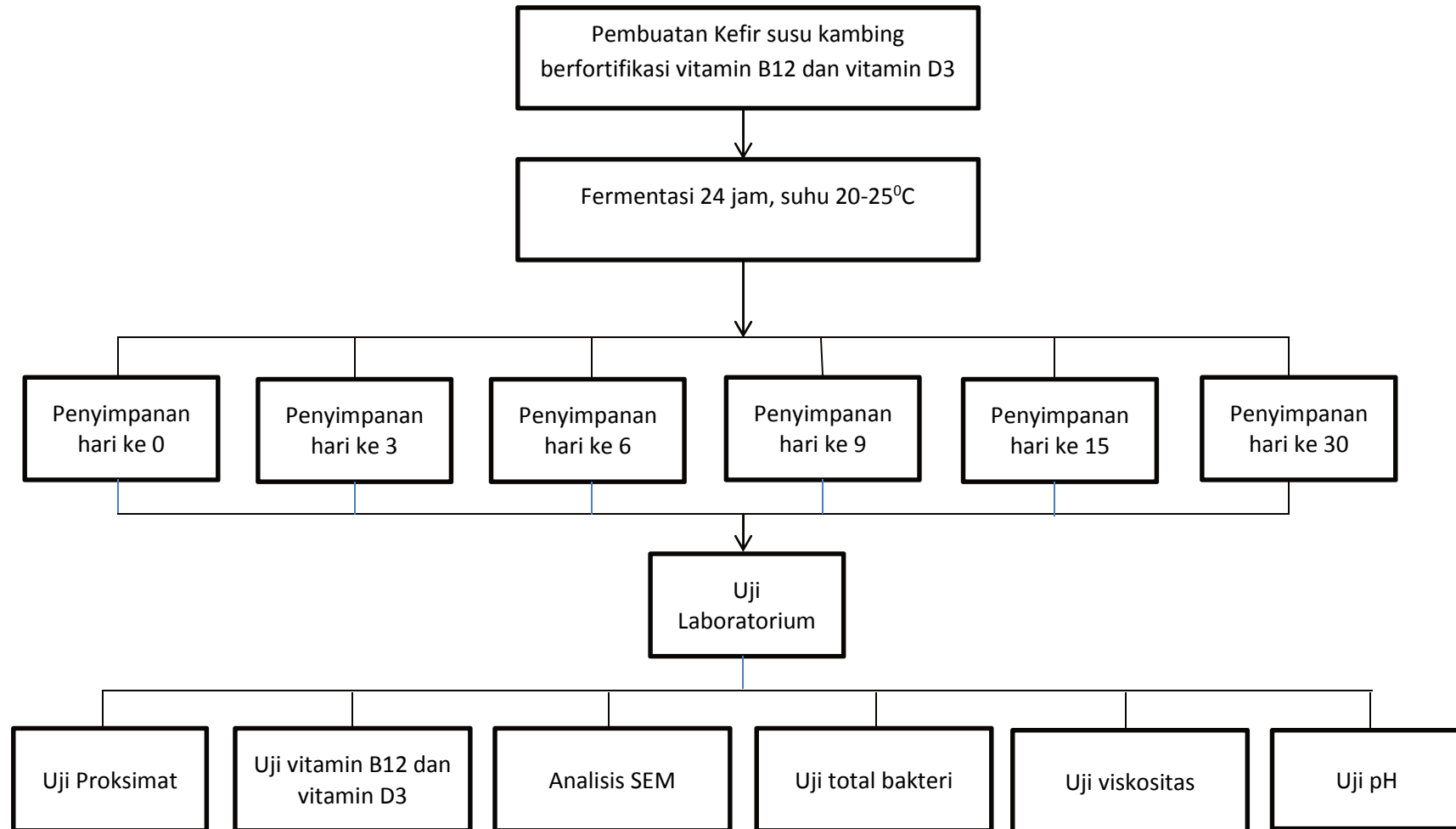
Bahan utama yang digunakan untuk pembuatan kefir susu kambing adalah bibit kefir, susu kambing, vitamin D3, dan vitamin B12. Susu kambing dari peranakan Etawa, diperoleh dari peternak kambing di Ungaran. Bibit kefir diperoleh dari Omah Kefir Ungaran.

Langkah awal yang dilakukan dalam pembuatan kefir adalah pasteurisasi susu kambing hingga suhu 70⁰C. Selanjutnya, kefir didiamkan hingga suhu 25⁰C, lalu diinokulasi dengan bibit kefir yang diberikan sebesar 5% dari total susu, lalu ditambahkan vitamin B12 20mcg/100mL dan vitamin D3 42 IU/100mL. Fermentasi kefir berlangsung selama 24 jam dengan suhu 25⁰C.⁵⁵

Kefir yang telah mengalami fermentasi kemudian disaring untuk memisahkan kefir dengan bibit kefir. Selanjutnya, kefir dibagi ke dalam 6 kelompok perlakuan penyimpanan yaitu kefir hari ke-0, 3, 6, 9, 15, dan 30. Mutu gizi kefir pada hari ke-0 akan digunakan sebagai kontrol terhadap mutu gizi kefir dengan lama penyimpanan yang berbeda.

3. Pengujian mutu gizi kefir

Kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan D3 ini akan diuji kandungan gizi vitamin B12, vitamin D3 menggunakan spektrofotometri, uji protein menggunakan metode Kjeldahl, uji karbohidrat menggunakan *by difference*, uji lemak menggunakan metode soxhletasi sedangkan serat menggunakan metode analisis serat AOAC 1995, dan uji total bakteri menggunakan *total plate count (TPC)*. Penjelasan tentang prosedur penelitian dapat dilihat dalam bagan.



Bagan 3. Prosedur penelitian

G. Pengumpulan Data

Data primer dalam penelitian ini diperoleh dari hasil penelitian yang meliputi kandungan vitamin B12, vitamin D3, karbohidrat, lemak, protein, serat, dan hasil uji total bakteri, serta pH dan viskositas. Sedangkan data sekunder diperoleh dari jurnal ilmiah dan *codex alimentarius*.

H. Pengolahan Data

1. Analisis Univariat

Analisis data untuk menganalisis data per variabel cara dengan menghitung rata-rata dari hasil pengukuran kandungan vitamin B12 dan vitamin D3, kadar karbohidrat, lemak, protein, dan total serat, serta total bakteri. Uji kenormalan data diukur menggunakan Shapiro-wilk.

2. Analisis bivariat

Analisis data untuk melihat apakah ada perbedaan mutu kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 berdasarkan lama penyimpanannya. Uji statistik yang digunakan adalah ANOVA satu arah bila data berdistribusi normal.. Uji dilakukan dengan derajat kepercayaan 95% dan $\alpha = 0.05$. Ho diterima jika nilai p value > 0.05 , berarti tidak ada perbedaan yang bermakna dari mutu gizi kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 selama penyimpanan 0, 3, 6, 9, 15, dan 30 hari. Apabila p value < 0.05 maka Ho ditolak, berarti ada perbedaan yang bermakna dari mutu gizi kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 selama penyimpanan 0, 3, 6, 9, 15, dan 30 hari.

DAFTAR PUSTAKA

1. Folli F, Corradi D, Fanti P, Davalli A, Paez A, Giaccari A, et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro- and macrovascular complications: avenues for a mechanistic-based therapeutic approach. *Journal Current Diabetes Review*. 2011;7(4):313–24.
2. Badan Penelitian dan Pengembangan Kementerian Kesehatan RI. *Riset Kesehatan Dasar*. 2013; p xvi.
3. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Journal Diabetes Research Clinical Practice*. 2014;103(2):137–49.
4. Wild Sarah, Roglic Gojka, Green Anders, Sicree Richard, Hilary K. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projection for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27(5):1047–53.
5. Zhang R, Naughton DP. Vitamin D in health and disease: Current perspectives. *Nutrition Journal*. 2010;9(1):65.
6. Emanuela Setola LDM, Galluccio E, Palloshi A, Fragasso G, Paroni, Rita et al. Insulin resistance and endothelial function are improved after folate and vitamin B12 therapy in patients with metabolic syndrome: relationship between homocysteine levels and hyperinsulinemia. *European Journal of Endocrinology*. 2004;(151):483–489.
7. Najib S dan Margale VS. Homocysteine thiolactone inhibits insulin signaling, and glutathione has a protective effect. *J Mol Endocrinol*. 2001;27:85–91.
8. Shab-Bidar S, Neyestani TR, Djazayeri A, Eshraghian M-R, Houshiarrad A, Gharavi A, et al. Regular consumption of vitamin D-fortified yogurt drink (Doogh) improved endothelial biomarkers in subjects with type 2 diabetes: a randomized double-blind clinical trial. *BMC Med*. 2011;9(1):125.
9. Holick MF. Vitamin D Deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2007;266–81.
10. Jia Li, Byrne M, Chang E, Jiang Y, Donkin SS, Buhman KK et al, Byrne ME, Chang E, Jiang Y, Donkin SS, Buhman KK, et al. $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D hydroxylase in adipocytes. *Journal of Steroid Biochemical Molecular Biology*. 2008;112(1–3):122–6.

11. Evatt ML, Terry PD, Ziegler TR, Oakley GP. Association between vitamin B12-containing supplement consumption and prevalence of biochemically defined B12 deficiency in adults in NHANES III (third national health and nutrition examination survey). *Public Health Nutrition*. 2010;13(1):25–31.
12. Kibirige D, Mwebaze R. Vitamin B12 deficiency among patients with diabetes mellitus: is routine screening and supplementation justified? *Journal of Diabetes Metabolism Disorder*. 2013;12(1):17.
13. Liu KW, Dai LK, Jean W. Metformin-related vitamin B12 deficiency. *Journal of Age Ageing*. 2006;35(2):200–1.
14. Mandy Ho, Jocelyn H. Halim, Megan L. Gow, Nouhad El-Haddad, Teresa Marzulli, Louise A. Baur CTC and SPG. Vitamin B12 in Obese Adolescents with Clinical Features of Insulin Resistance. *Nutrients Journal*. 2014;6:5611–8.
15. Ying-ying Wu et al. 1,25(OH)2D3 inhibits the deleterious effects induced by high glucose on osteoblasts through undercarboxylated osteocalcin and insulin signaling. *Journal of Steroid Biochemical Molecular Biology*. 2012;113(132):112–9.
16. Bito T, Misaki T, Yabuta Y, Ishikawa T, Kawano T, Watanabe F. Vitamin B12 deficiency results in severe oxidative stress, leading to memory retention impairment in *Caenorhabditis elegans*. *Redox Biology Journal*. 2016;11:21–9.
17. Saha P, Dasgupta S, Sen S, Kumar A, Biswas UK. Patients with type 2 diabetes have reduced levels of plasma vitamin D3 and are well correlated with the oxidative stress parameters. *Asian Journal Medical Science*. 2016;7(3):35.
18. Allen L, Benoist B de, Dary O, Hurrell R, editor. Zinc, folate, vitamin B12, vitamin C, vitamin D, calcium, selenium, fluoride. In: *Guidelines on food fortification with micronutrients*. WHO, Food and Agricultural Organization of the United Nation; 2006. p. 126–30.
19. Maria R. Prado, Lina Marcela Blandón LPSV, Cristine Rodrigues, Guillermo R. Castro² VT-S and, Soccol CR. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Journal of Microbiology*. 2015;6:1177.

20. Urdaneta E, Barrenetxe J, Aranguren P, Irigoyen A, Marzo F, Ibáñez FC. Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats. *Journal Nutrition Research*. 2007;27(10):653–8.
21. Yadav H, Jain S SP. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing probiotic *Lactobacillus acidophillus* in high fructose fed rats. *Nutrition Journal*. 2007;23(1):62–8.
22. Hamet MF, Piermaria JA, Abraham AG. Selection of EPS-producing *Lactobacillus* strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks. *LWT - Food ScienceTechnology*. 2015;63(1):129–35.
23. Jenab A, Roghanian R, Emtiazi G. Encapsulation of platelet in kefir polymer and detection of bioavailability of immobilized platelet in probiotic kefir as a new drug for surface bleeding. *J Med Bacteriol*. 2015;4(3):55–66.
24. Usmiati SRI, Sunarlim R. Pengaruh suhu dan lama penyimpanan terhadap keasaman dan kadar alkohol kefir. *Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Bogor*. P 528–33.
25. Zenebe T, Ahmed N, Kabeta T, Kebede G, Medicine V, Box PO. Review on medicinal and nutritional values of goat milk. *Acad J Nutr*. 2014;3(3):30–9.
26. Johansson S. Goat Milk-Nutrition and health aspects. 2011. p 2-10.
27. Mayer HK, Fiechter G. Physicochemical characteristics of goat's milk in Austria-seasonal variations and differences between six breeds. *Journal Dairy Science Technology*. 2012;92(2):167–77.
28. Ganesan B., Brothersen C MDJ. Fortification of cheddar cheese with vitamin D does not alter cheese flavor perception. *Dairy Science Journal*. 2011;94(7):3708–14.
29. Grønnevik H, Falstad M, Narvhus JA. Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*. 2011;21(9):601–6.
30. Vieira CP, Álvares TS, Gomes LS, Torres AG, Paschoalin VMF, Conte CA. Kefir grains change fatty acid profile of milk during fermentation and storage. *PLoS One*. 2015;10(10):1–18.
31. Rup Mal, Radiati LE dan P. Effect of Storage Duration in Refrigerator

- Temperature on pH Value, Viscosity, Total Lactic Acid and Profiles Protein Dissolved of Goat Milk Kefir (Skripsi).Malang; 2013.
32. Mayer HK, Fiechter G. Physicochemical characteristics of goat's milk in Austria-seasonal variations and differences between six breeds. *Journal Dairy Science Technology*. 2012;92(2):167–77.
 33. Grønnevik H, Falstad M, Narvhus JA. Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*. 2011;21(9):601–6.
 34. Vieira CP, Álvares TS, Gomes LS, Torres AG, Paschoalin VMF, Conte CA. Kefir grains change fatty acid profile of milk during fermentation and storage. *PLoS One*. 2015;10(10):1–18.
 35. Rup Mal, Radiati LE dan P. Effect of Storage Duration in Refrigerator Temperature on pH Value, Viscosity, Total Lactic Acid and Profiles Protein Dissolved of Goat Milk Kefir. Malang; 2013.
 36. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;50(5):567–75.
 37. Meigs JB. Association of oxidative stress , insulin resistance, and diabetes risk phenotypes. *Epidemiol Serv Res*. 2007;30(10):1–12.
 38. Kahn B, Flier J. Obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 2000;106(4):473–81.
 39. Bauman WA, William, Jayatilleke E, Spungen AM H V. Increased intake of calcium reverses vitamin B 12 malabsorption induced by metformin. *Diabetes Care*. 2000;23(9).
 40. Dawson-hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ. Defining the optimal 25 (OH) D level. 2005;25(58):1–7.
 41. Hasanvand E, Fathi M, Bassiri A, Javanmard M, Abbaszadeh R. Novel starch based nanocarrier for Vitamin D fortification of milk: production and characterization. *Journal Food and Bioproducts Processing*. 2015;96:264–77.
 42. Tom D. Thacher, MD, and Bart L. Clarke M. Vitamin D Insufficiency. *Mayo Clin Proc*. 2011;55905(1):248–54.
 43. Grossmann RE, Tangpricha V. Evaluation of vehicle substances on vitamin D bioavailability: A systematic review. *Mol Nutr Food Res*. 2011;54(8):1055–

61.

44. Hashemi Gahrue H, Eskandari MH, Mesbahi G, Hanifpour MA. Scientific and technical aspects of yogurt fortification: A review. *Food Sci Hum Wellness*.2015;4(1):1–8.
45. Calvo MS, Whiting SJ. Survey of current vitamin D food fortification practices in the United States and Canada. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013;136:211–3.
46. Green et al. Maintenance of long term adequate levels of vitamin D lowers HbA1c in African American patients with type 2 diabetes. *Ethn Dis*. 2014;24:335–9.
47. WHO. Zinc, folate and other B vitamins, vitamin C, vitamin D, calcium, selenium and fluoride. In: *Guidelines on food fortification with micronutrients*. WHO; 2006. hal. 128–30.
48. Sadeghian S, Fallahi F, Salarifar M, Davoodi G, Mahmoodian M, Fallah N, et al. Homocysteine, vitamin B12 and folate levels in premature coronary artery disease. *BMC Cardiovasc*. 2006;6:38.
49. Selhub J, Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH. Folate – vitamin B-12 interaction in relation to cognitive impairment , anemia , and biochemical indicators of vitamin B-12 deficiency. *Am J Clin Nutr*. 2009;89:702–7.
50. Nurliyani.,E.Harmayani. S. Antidiabetic potential of kefir combination from goat milk and soy milk in rats induced with Streptozotocin-Nicotinamide. *Korean Journal Food Science*. 2015;35(6):847–58.
51. Aristya, Amanda Liana, Legowo, M. Al-Baarri. Karakteristik fisik, kimia, dan mikrobiologis kefir susu kambing dengan penambahan jenis dan konsentrasi gula yang berbeda. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 2013;2(3):139–42.
52. Ceballos LS, Morales ER, de la Torre Adarve G, Castro JD, Martínez LP, Sampelayo MRS. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2009;22(4):322–9.
53. Hanlein, WGF. The Nutritive Value of Sheep Milk. *International Journal Animal Science*. 2001;160(2):253–68.

54. Satir G, Guzel-Seydim ZB. How kefir fermentation can affect product composition? *Small Ruminant Research*. 2016;134:1–7.
55. Farnworth ER. Kefir – a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*. 2005;2(1):1–17.
56. Otles S, Cagindi O. Kefir: a probiotic dairy-composition , nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*.2003;2(2):54–9.
57. Kıvanç M. Kefir as a probiotic dairy beverage : determination lactic acid bacteria and yeast. *International Journal of Food Engineering*. 2015;1(1):55–60.
58. Kıvanç M. Kefir as a probiotic dairy beverage : determination lactic acid bacteria and yeast. *International Journal of Food Engineering*. 2015;1(1):55–60.
59. Leite AMO, Leite D, Del Aguila E, Alvares T, Peixoto R, Miguel M, et al. Microbiological and chemical characteristics of brazilian kefir during fermentation and storage processes. *Journal Dairy Science*. 2013;96(7):4149–59.
60. Ostadrahimi A, Taghizadeh A, Mobasser M, Farrin N, Payahoo L, Beyramalipoor Gheshlaghi Z, et al. Effect of probiotic fermented milk (Kefir) on glycemic control and lipid profile in type 2 diabetic patients: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Iran J Public Health*. 2015;44(2):228–37.
61. FAO dan WHO. *Codex Alimentarius Milk and Milk Products*. Codex Alimentarius. Roma; 2011. p 56-58.
62. Wang Y, Ahmed Z, Feng W, Li C, Song S. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *International Journal Biology Macromolecules*. 2008;43(3):283–8.
63. Dimitreli G, Exarhopoulos S, Goulas A, Antoniou KD, Raphaelides SN. Effect of kefir and milk proteins addition on the rheological behavior of glucono-delta-lactone induced milk gels. *Journal Food Research*. 2016;5(1):121.
64. Irigoyen A, Arana I, Castiella M, Torre P, Ibáñez FC. Microbiological,

physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*. 2005;90(4):613–20.

65. Association of Official Agricultural Chemists. *AOAC: Official Method of Analysis*. Helrich K, editor. Virginia: AOAC; 1995.

**MUTU GIZI DAN MIKROBIOLOGI
KEFIR SUSU KAMBING
BERFORTIFIKASI VITAMIN B₁₂ DAN VITAMIN D₃
SELAMA PENYIMPANAN**

Artikel Penelitian

disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi pada

Program Studi Ilmu Gizi Fakultas Kedokteran

Universitas Diponegoro



disusun oleh :

ELSA PRISMA DIANTI

22030113130135

**PROGRAM STUDI ILMU GIZI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG**

2017

PENGESAHAN ARTIKEL PENELITIAN

**Mutu Gizi dan Mikrobiologi Kefir Susu Kambing
Berfortifikasi Vitamin B12 dan Vitamin D3 selama Penyimpanan**

Disusun Oleh:

Elsa Prisma Dianti

22030113130135

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji
pada tanggal 14 Juni 2017
dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Semarang, **19 JUN 2017**

DEWAN PENGUJI

PEMBIMBING I

Gemala Anjan, S.P.,M.Si,Ph.D
NIP. 198006182003122001

PEMBIMBING II

Binar Panunggal, S.Gz, MPH
NIP. 198505162014041001

PENGUJI

Dr. Diana Nur Afifah S.TP,M.Si
NIP. 198007312008012011

Mengetahui

Ketua Departemen Ilmu Gizi
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

Dra. Ani Margawati, M.Kes, PhD
NIP.196505251993032001

Mutu Gizi dan Mikrobiologi Kefir Susu Kambing Berfortifikasi Vitamin B₁₂ dan Vitamin D₃ Selama Penyimpanan

Elsa Prisma Dianti¹, Gemala Anjani¹, Binar Panunggal¹

ABSTRAK

Latar belakang : Fortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 dapat mempengaruhi keseimbangan ekosistem kompleks bakteri dan khamir dalam kefir susu kambing. Mutu gizi dan mikrobiologi kefir dapat berubah selama penyimpanan akibat adanya aktivitas bakteri dan khamir yang aktif.

Tujuan : Menganalisis mutu gizi dan mikrobiologi susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 selama penyimpanan.

Metode : Penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian acak lengkap (RAL) yang terdiri dari lima perlakuan, yaitu penyimpanan dengan suhu 5⁰C pada hari ke-0, 3, 6, 9, dan 15. Kandungan vitamin B12, vitamin D3, protein diuji menggunakan spektrofotometri, lemak dengan metode *babcock*, total bakteri asam laktat menggunakan metode *total plate count*, pH dengan pH meter, dan viskositas menggunakan metode *ostwald*.

Hasil : Tidak ada perbedaan kandungan vitamin B12, protein, lemak, dan viskositas kefir (($p > 0,05$) selama penyimpanan 15 hari. Terdapat perbedaan konsentrasi vitamin D3 ($p = 0,038$), total bakteri asam laktat ($p = 0,0001$), dan pH ($p = 0,023$). Konsentrasi vitamin D3 mengalami penurunan antara hari ke-9 dan 15. Total bakteri asam laktat mengalami peningkatan hingga hari ke 9 ($6161 \pm 1,296 \times 10^7$ cfu/ml), namun terjadi penurunan hingga 24% pada hari ke 15 ($150 \pm 7,78 \times 10^7$ cfu/ml). pH kefir cenderung fluktuatif selama penyimpanan dengan nilai pH tertinggi 4,38 pada hari ke-3, dan terendah 4,13 pada hari ke-9.

Simpulan : Kandungan vitamin B12, protein, lemak, dan viskositas stabil selama penyimpanan. Nilai pH memenuhi ph standar kefir, yaitu 4,2-4,6. Vitamin D3 dan total bakteri asam laktat kefir menurun pada hari ke-15.

Kata kunci : kefir susu kambing, fortifikasi vitamin B12 dan D3, penyimpanan

¹Program Studi Ilmu Gizi Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

Nutrition Quality and Microbiology of Goat Milk Kefir Fortified with Vitamin B₁₂ and Vitamin D₃ during Storage

Elsa Prisma Dianti¹, Gemala Anjani¹, Binar Panunggal¹

ABSTRACT

Background: Fortification of vitamin B12 and vitamin D3 can affect the balance of complex ecosystems of bacteria and yeasts in goat milk kefir. The quality of nutrition and microbiology of kefir may change during storage due to active bacterial and yeast activity.

Objective : To analyze the nutritional quality and microbiology of goat milk kefir fortified with vitamin B12 and vitamin D3 during storage.

Methods : This research was experimental design with completely randomized design. Completely randomized design in this study consisted of five treatments, ie storage day 0 (P0), 3rd day (P3), 6th day (P6), 9th(P9), and 15th (P15). In this study, vitamin B12, vitamin D3, protein, were analyzed using spectrophotometric, fat using babcock method, total lactic acid bacteria using total plate count, pH with pH meter, and viscosity using ostwald method.

Results : During 15 days in refrigerated storage, there was no significant difference ($p > 0.05$) of vitamin B12 concentration, protein, fat, and viscosity of kefir. There was a significant difference to vitamin D3 concentration ($p=0,038$), pH ($p=0,023$), and total lactic acid of kefir ($p=0,0001$). Vitamin D3 concentrations decreased between day 9 and 15. Total lactic acid bacteria increased until 9 days of storage ($6161 \pm 1.296 \times 10^7$ cfu / ml), but decreased to 24% on day 15 ($150 \pm 7.78 \times 10^7$ cfu / ml). pH kefir tends to fluctuate during storage with the highest pH value of 4.38 on day-3, and lowest 4.13 on day-9.

Conclusion : Vitamin B12, protein, fat, and viscosity kefir were stable during storage. pH value according to standard of kefir 4,2-4,6. There were a decrease of vitamin D3 and total lactic acid bacteria at day-15.

Keywords : Goat milk kefir, fortification vitamin B12 and vitamin D3, storage.

¹Nutrition Science Program, Medical Faculty, Diponegoro University

PENDAHULUAN

Resistensi insulin merupakan ketidakmampuan sel atau jaringan menggunakan insulin secara efektif untuk mengatur transpor glukosa ke dalam sel atau jaringan target yang mengakibatkan gangguan penyerapan glukosa darah.¹ Resistensi insulin merupakan salah satu fase perkembangan diabetes mellitus.¹ Riskesdas 2013 melaporkan 36,6% penduduk Indonesia usia >15 tahun mengalami keadaan glukosa darah puasa terganggu (GDP), yakni suatu keadaan hiperglikemia yang berisiko menjadi diabetes mellitus tipe 2.² Beberapa studi menyebutkan pasien resistensi insulin memiliki kecenderungan mengalami defisiensi vitamin D3 (<50 nmol/L) dan vitamin B12 (\leq 148 pmol/l). Defisiensi vitamin D3 telah menjadi pandemik, banyak faktor yang dapat mempengaruhi konsentrasi vitamin D3 dalam tubuh, seperti lokasi geografis, etnis, musim, gaya hidup, dan asupan.³⁻⁵ Permasalahan defisiensi vitamin B12 pada pasien resistensi insulin diakibatkan asupan diet yang kurang dan malabsorpsi vitamin B12.⁶⁻⁷ Metformin, salah satu jenis obat *biguanides* untuk menurunkan kadar glukosa darah, dilaporkan menghambat absorpsi vitamin B12 karena metformin dapat mengubah motilitas usus untuk pertumbuhan bakteri usus sehingga berlebih dan mengganggu homeostasis kalsium, dimana penyerapan vitamin B12 bergantung dengan adanya kalsium.⁸⁻⁹

Berdasarkan hasil penelitian, kecukupan vitamin D3 dan vitamin B12 dapat mengurangi keparahan resistensi insulin dan mencegah patogenesis komplikasi diabetes mellitus tipe 2.¹⁰⁻¹² Vitamin D3 memegang peranan penting mempengaruhi sensitivitas insulin melalui peningkatan fungsi sel beta pankreas dalam menstimulasi sintesis dan pelepasan insulin.¹⁰ Hasil studi menyebutkan peningkatan asupan vitamin D dapat meningkatkan sensitivitas insulin. Studi lain menyebutkan suplementasi vitamin D meningkatkan sensitivitas insulin hingga 54%.¹³ Sedangkan, vitamin B12 mempengaruhi sensitivitas insulin melalui mekanisme penurunan homosistein yang menghambat stimulasi fosforilasi tirosin pada reseptor insulin.¹²

Fortifikasi makanan merupakan salah satu upaya untuk mencegah defisiensi vitamin B12 dan vitamin D3 dengan menyediakan makanan yang kaya

kedua vitamin tersebut. Berhasilnya fortifikasi bergantung pada pilihan media fortifikasi. Media fortifikasi harus mudah didapat, harga terjangkau, dan mengandung nilai gizi yang tinggi.¹⁵

Kefir susu kambing merupakan salah satu media yang baik untuk fortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 karena memiliki nilai gizi yang tinggi dan telah terbukti memiliki banyak manfaat kesehatan, seperti menjaga keseimbangan mikroflora usus, memperkuat sistem imun, menurunkan gula darah, serta kolesterol.¹⁶ Kefir merupakan jenis olahan susu fermentasi dari bibit kefir yang mengandung kompleks bakteri probiotik, seperti *lactobacilli*, *lactococi*, *leuconostoc*, dan *acetobacteria* serta khamir.¹⁷ Minuman probiotik ini dapat dibuat dari susu kambing maupun susu sapi. Susu kambing memiliki keunggulan kaya mineral kalsium, fosfor, magnesium, vitamin A, vitamin C serta *medium chain trygliserides (MCT)* daripada susu sapi. Namun, kandungan vitamin B12 dan vitamin D yang terkandung hanya sedikit. Berdasarkan hal tersebut, maka susu kambing dipilih sebagai bahan baku pembuatan kefir dalam penelitian ini.¹⁸

Fortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 dapat mempengaruhi mutu gizi dan mikrobiologi karena di dalam kefir susu kambing terkandung kompleks bakteri probiotik dan khamir yang aktif dan sensitif terhadap perubahan lingkungannya. Sejauh ini, fortifikasi vitamin D3 yang pernah dilakukan pada produk keju terbukti efektif karena tidak mengubah karakteristik sensori dan vitamin D3 stabil dalam keju hingga 9 bulan, sedangkan penelitian tentang fortifikasi vitamin B12 belum banyak diteliti.¹⁹ Hasil penelitian melaporkan bahwa terjadi peningkatan CO₂ dan etanol akibat adanya aktivitas *Saccaromyces cerevisiae* selama penyimpanan.²⁰ Selain itu, aktivitas bakteri asam laktat dan asetat dalam kefir dapat menyebabkan denaturasi lemak, peningkatan viskositas, dan penurunan pH selama penyimpanan.^{21,22} Kefir masih aman dikonsumsi hingga 1 bulan walaupun terjadi perubahan komposisi kefir selama penyimpanan.²² Adanya aktivitas metabolisme bakteri dan khamir yang aktif serta interaksi dengan vitamin B12 dan vitamin D3 dapat mempengaruhi mutu gizi dan mikrobiologi kefir selama penyimpanan, oleh sebab itu peneliti ingin mengetahui mutu gizi kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3, yang

meliputi kandungan vitamin B12, vitamin D3, karbohidrat, protein, lemak, dan total bakteri selama penyimpanan 0, 3, 6, 9, dan 15.

METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro pada bulan Maret hingga April 2017. Bahan utama yang digunakan untuk pembuatan kefir susu kambing adalah bibit kefir, susu kambing, vitamin D3, dan vitamin B12. Susu kambing diperoleh dari peranakan Etawa, peternak kambing di Ungaran, sedangkan bibit kefir diperoleh dari Omah Kefir Ungaran. Vitamin B12 berasal dari produk *nutrition support Blackmores* Vitamin B12, sedangkan vitamin D3 diperoleh dari produk vitamin D3 1000 IU *Healthy Care*.

Langkah awal yang dilakukan dalam pembuatan kefir adalah pasteurisasi susu kambing hingga suhu 70⁰C. Selanjutnya, kefir didiamkan hingga suhu 25⁰C, lalu diinokulasi dengan bibit kefir yang diberikan sebesar 5% dari total susu. Fermentasi kefir berlangsung selama 24 jam dengan suhu 25⁰C dan setiap 6 jam sekali dilakukan pengadukan.¹⁶ Fortifikasi vitamin B12 20mcg/100mL dan vitamin D3 42 IU/100mL dilakukan pada jam ke 12, hal ini berdasarkan hasil penelitian tentang waktu fortifikasi yang telah dilakukan sebelumnya.^{24, 25} Setelah terfermentasi 24 jam, kemudian kefir disaring untuk memisahkan kefir dengan bibit kefir. Selanjutnya, kefir dibagi ke dalam 5 kelompok perlakuan penyimpanan yaitu kefir hari ke-0, 3, 6, 9, dan 15 untuk diuji kandungan vitamin B12, vitamin D3, protein, lemak, total bakteri asam laktat, pH, dan viskositas.

Pengujian vitamin menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 530 nm untuk vitamin B12 dan 264 nm untuk vitamin D3. Penentuan kadar protein menggunakan metode *Bradford* lalu diuji dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 595 nm. Lemak menggunakan metode *babcock*, total bakteri asam laktat dengan metode *total plate count* menggunakan MRSA, viskositas dengan metode *ostwald*, dan pH dengan menggunakan pH meter.

Seluruh data yang telah dikumpulkan diolah menggunakan *software* statistik. Sebelum diolah, data diuji normalitasnya menggunakan uji *Saphiro-Wilk*,

selanjutnya data diuji dengan uji *oneway anova*, uji *Kruskall Wallis*, dan uji *Mann Whitney* berdasarkan hasil uji normalitasnya.

HASIL

Vitamin B12

Berdasarkan hasil analisis, kandungan vitamin B12 kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 tidak berbeda selama penyimpanan ($p=0,261$). Hal tersebut berarti kandungan vitamin B12 kefir stabil hingga 15 hari penyimpanan.

Tabel 1. Hasil analisis kandungan vitamin B12 berdasarkan lama penyimpanan

Lama Penyimpanan	Median vitamin B12 (μg)	Nilai minimum	Nilai maksimum	Nilai p
Hari ke-0	678,12	560,00	941,56	0,261*
Hari ke-3	609,06	577,19	658,12	
Hari ke-6	560,62	526,56	609,69	
Hari ke-9	836,25	666,88	837,19	
Hari ke-15	867,81	576,62	880,94	

*Pengujian dengan *Kruskall Wallis*

Vitamin D3

Berdasarkan hasil analisis, diperoleh hasil terdapat perbedaan konsentrasi vitamin D3 selama penyimpanan ($p=0,038$). Perbedaan terjadi diantara hari ke-0 hingga hari ke-3 dan hari ke-9 sampai 15, dimana terjadi penurunan kandungan vitamin D3.

Tabel 2. Hasil analisis kandungan vitamin D3 berdasarkan lama penyimpanan

Lama Penyimpanan	Konsentrasi vitamin D3 (IU)	Nilai p
Hari ke-0	57,63 \pm 9,590 ^a	0,038*
Hari ke-3	44,83 \pm 1,1946 ^{ab}	
Hari ke-6	41,16 \pm 4,3787 ^b	
Hari ke-9	45,58 \pm 6,0774 ^{ab}	
Hari ke-15	27,33 \pm 6,3024 ^c	

Keterangan: Angka yang diikuti huruf *superscript* berbeda (a,b,c,d) menunjukkan beda nyata

*Pengujian dengan *Kruskall Wallis*

Protein

Berdasarkan hasil analisis, kandungan protein kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 tidak berbeda selama penyimpanan. ($p=0,190$). Hal tersebut berarti kandungan protein kefir masih stabil hingga 15 hari penyimpanan.

Tabel 3. Hasil analisis kandungan protein berdasarkan lama penyimpanan

Lama Penyimpanan	Kadar Protein (%)	Nilai p
Hari ke-0	2,320 ± 0,268	0,190*
Hari ke-3	1,880 ± 0,1149	
Hari ke-6	1,595 ± 0,3517	
Hari ke-9	1,615 ± 0,5567	
Hari ke-15	1,449 ± 0,3911	

*Pengujian dengan *oneway anova*

Lemak

Berdasarkan hasil analisis, tidak ada perbedaan kandungan lemak kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 selama penyimpanan ($p=0,259$). Nilai kandungan lemak berkisar antara $7,0443 \pm 0.43935\%$ hingga $8.0151 \pm 0.6965\%$. Nilai kandungan lemak tersebut memenuhi syarat kefir dalam *Codex Alimentarius*, yakni $<10\%$.⁴³

Tabel 4. Hasil analisis kandungan lemak berdasarkan lama penyimpanan

Lama penyimpanan	Lemak (%)	Nilai p
Hari ke-0	7,0443 ± 0.43935	0,259*
Hari ke-3	8,0028 ± 2.3191	
Hari ke-6	8.0151 ± 0.6965	
Hari ke-9	7.3100 ± 1.1399	
Hari ke-15	7,9505 ± 0.8298	

*Pengujian dengan *oneway anova*

Total Bakteri Asam Laktat

Berdasarkan hasil analisis, total bakteri asam laktat berkisar antara $5,45 \times 10^7$ sampai dengan $6,982 \times 10^{10}$ cfu/ml. Total bakteri asam laktat kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 sesuai dengan standar dari *Codex Alimentarius* yaitu minimal 1×10^7 cfu/ml.⁴³ Berdasarkan uji *Post hoc*, terdapat perbedaan jumlah bakteri asam laktat selama penyimpanan. Jumlah bakteri asam laktat meningkat hingga hari ke 6, kemudian stabil hingga hari ke 9, dan terjadi penurunan pada hari ke-15.

Tabel 5. Hasil analisis total bakteri asam laktat berdasarkan lama penyimpanan

Lama Penyimpanan	Total BAL (10^7 cfu/mL)	Nilai p
Hari ke-0	5,41 ± 4,419 ^{ad}	0,000*
Hari ke-3	53,38 ± 6,301 ^{ad}	
Hari ke-6	6982 ± 8,732 ^b	
Hari ke-9	6161 ± 1,296 ^{bc}	
Hari ke-15	150 ± 7,78 ^d	

Keterangan: Angka yang diikuti huruf *superscript* berbeda (a,b,c,d) menunjukkan beda nyata

*Pengujian dengan *oneway Anova*

Derajat keasaman (pH)

Berdasarkan hasil analisis, terdapat perbedaan pH selama penyimpanan 15 hari. Nilai pH berbeda nyata pada hari ke-0 dengan hari ke-3. Peningkatan pH terjadi pada hari ke 3, dimana nilai pH meningkat 0,1 menjadi 4,38. Selanjutnya pH turun hingga hari ke 9, namun terjadi kenaikan pH pada hari ke 15.

Tabel 6. Hasil analisis pH berdasarkan lama penyimpanan

Lama Penyimpanan	Ph	Nilai p
Hari ke-0	4,28 ± 0,0461 ^a	0,023*
Hari ke-3	4,38 ± 0,05774 ^b	
Hari ke-6	4,30 ± 0,0288 ^{ac}	
Hari ke-9	4,13 ± 0,0346 ^d	
Hari ke-15	4,26 ± 0,0416 ^{ac}	

Keterangan: Angka yang diikuti huruf *superscript* berbeda (a,b,c,d) menunjukkan beda nyata
*Pengujian dengan *Kruskall Wallis*

Viskositas

Berdasarkan hasil analisis, viskositas kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 tidak berbeda selama penyimpanan ($p=0,129$). Hal tersebut berarti nilai viskositas stabil selama penyimpanan.

Tabel 7. Hasil analisis viskositas berdasarkan lama penyimpanan

Lama penyimpanan	Median Viskositas (cm ² /s)	Nilai minimum (cm ² /s)	Nilai maksimum (cm ² /s)	Nilai p
Hari ke-0	0,0429	0,0393	0,0466	0,129*
Hari ke-3	0.0500	0,0464	0,0572	
Hari ke-6	0.0535	0,0466	0,0621	
Hari ke-9	0.0470	0,0428	0,0544	
Hari ke-15	0.0446	0,0429	0,0446	

*Pengujian dengan *Kruskall Wallis*

PEMBAHASAN

Vitamin B12

Vitamin B12 memiliki struktur yang kompleks dan hanya dapat diproduksi atau biosintesis dari fermentasi bakteri.²⁶ Peran vitamin B12 adalah sebagai kofaktor esensial dalam asam lemak, asam amino, karbohidrat, dan asam nukleat.²⁷

Berdasarkan hasil penelitian, kefir susu kambing yang telah difortifikasi vitamin B12 sebesar 20µg per 100mL, diperoleh hasil kandungan vitamin B12 yang lebih tinggi hingga 40 kali lipat dari jumlah fortifikasi, hal ini terjadi karena

adanya vitamin B12 yang sudah terkandung dalam susu kambing serta bakteri *Propionibacterium shermani* B369 dan bakteri *Propionibacterium freudenreichi spp* yang memproduksi vitamin B12 saat fermentasi.²⁸

Kandungan vitamin B12 dalam kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 tidak berbeda selama penyimpanan. Bila dibandingkan dengan kefir tidak berfortifikasi, fase atau grafik naik turunnya kandungan vitamin B12 antara kefir terfortifikasi dengan kontrol sebenarnya sama, dimana pada hari ke 6 kandungan vitamin B12 turun kemudian meningkat di hari ke 9 dan stabil hingga hari ke 15 (grafik perbandingan dapat dilihat pada lampiran 3).

Kestabilan kandungan vitamin B12 dipengaruhi oleh peningkatan *propionic acid bacteria* yang memproduksi vitamin B12 selama penyimpanan. Peningkatan *propionic acid bacteria* diiringi juga dengan peningkatan etanol, asam asetat, asam butirat, glukosa, dan galaktosa.²⁹

Vitamin D3

Vitamin D memiliki dua bentuk yaitu vitamin D2 dan vitamin D3. Vitamin D2 (ergokalsiferol) lebih banyak ditemukan pada tanaman, sedangkan vitamin D3 (kolekalsiferol) diperoleh dari cahaya matahari. Perbedaan kedua vitamin terletak pada gugus methyl yang hanya dimiliki vitamin D2 saja. Berdasarkan hasil penelitian, vitamin D3 lebih aktif dan efektif meningkatkan 25(OH)D dalam plasma dibandingkan vitamin D2.³⁰ Oleh sebab itu, vitamin D3 yang digunakan sebagai fortifikan dalam penelitian ini,

Berdasarkan hasil analisis, kandungan vitamin D3 dalam kefir berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 berbeda selama penyimpanan, dimana vitamin D3 menurun pada hari ke-15. Konsentrasi vitamin D3 tertinggi pada hari ke-0 ($57,63 \pm 9,590$ IU) dan terendah pada hari ke-15 ($27,33 \pm 6,3024$ IU). Bila dibandingkan dengan kefir tidak berfortifikasi, kandungan vitamin D3 pada kefir terfortifikasi lebih tinggi selama penyimpanan, walaupun pada hari ke 15, terjadi penurunan kandungan vitamin D3 (grafik perbandingan dapat dilihat pada lampiran 3). Hasil penelitian ini berbeda dengan fortifikasi vitamin D3 pada yogurt, dimana vitamin D3 stabil hingga 4 minggu penyimpanan.³¹ Vitamin D3

lebih stabil dalam yogurt karena bakteri yang terdapat dalam kefir lebih banyak daripada yogurt. Kompleks bakteri dan khamir dalam kefir yang aktif bersifat proteolisis dan lipolisis, hal tersebut yang dapat mempengaruhi kestabilan vitamin D3.¹⁶

Dalam kefir, vitamin D berikatan dengan β -laktoglobulin A dan β -kasein (peptida protein). β -laktoglobulin A and β -kasein melimpah dalam whey protein dan kasein, hal inilah yang mempengaruhi stabilitas dan bioavailabilitas vitamin D3 di dalam kefir.³² β -laktoglobulin A dan β -kasein mengikat kuat vitamin D3 dan interaksi antara vitamin D3 dengan protein susu saling bergantung. Vitamin D3 tetap dapat berikatan dengan β -laktoglobulin A dalam lingkungan asam lambung.³³ Berdasarkan hasil penelitian, β -kasein mengalami proteolisis menjadi asam amino arginin dan glutamin karena adanya etanol yang berpengaruh terhadap kestabilan vitamin D3.^{21,44} Hal ini berkaitan dengan hasil total bakteri asam laktat menurun yang mengindikasikan adanya peningkatan aktivitas khamir yang menghasilkan etanol. Selain protein, faktor lain yang mempengaruhi stabilitas vitamin D3 yaitu paparan cahaya karena vitamin D3 sensitif terhadap cahaya dan lipolisis oleh khamir, dimana vitamin D3 merupakan vitamin yang larut lemak, sehingga pemecahan lemak dapat mengganggu kestabilan vitamin D3.³⁴

Protein

Kadar protein terlarut atau yang sering disebut daya cerna protein merupakan kemampuan suatu protein untuk dihidrolisis menjadi asam amino oleh enzim pencernaan. Daya cerna protein merupakan salah satu faktor yang menentukan mutu protein karena menunjukkan ketersediaan asam amino secara biologis.³⁵ Dalam penelitian ini, kandungan protein terlarut kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 stabil selama penyimpanan 15 hari. Hasil penelitian ini sesuai dengan studi pada kefir tanpa fortifikasi yang menyebutkan tidak ada perbedaan kandungan protein selama penyimpanan.²² Hal ini terjadi karena perubahan yang terjadi (proteolisis) relatif kecil.

Selama fermentasi, telah terjadi hidrolisis protein oleh aktivitas enzim proteolitik yang memecah protein menjadi fraksi-fraksi protein yang lebih kecil atau peptida. Laktoglobulin dan laktalbumin serta komponen lain yang terdapat didalam whey akan dirubah menjadi beberapa peptida. Laktoglobulin yang merupakan komponen utama whey dirubah menjadi β -laktoglobulin-A, β -laktoglobulin-B dan angiotensin converting enzyme (ACE). Pemecahan protein menjadi fraksi yang lebih kecil saat fermentasi, menyebabkan nilai kandungan protein terlarut kefir stabil selama penyimpanan karena sudah terdegradasi saat fermentasi.^{35,36}

Lemak

Selama penyimpanan 15 hari, lemak kefir susu kambing tidak mengalami perubahan yang signifikan. Kandungan lemak tetap stabil, walaupun ada peningkatan bakteri asam laktat hingga hari ke-9. Secara teori, pertumbuhan bakteri asam laktat akan menyebabkan lipolisis lemak menjadi asam lemak bebas.³⁷ Hasil penelitian ini berbeda dengan hasil studi lain yang menyebutkan lama penyimpanan dapat mengakibatkan penurunan lemak serta viskositas.²¹ Kandungan lemak menurun hingga 7.9% pada hari ke 14, kondisi ini terjadi karena pertumbuhan bakteri dan khamir yang bersifat lipolisis..^{37,39} Jenis dan kualitas susu merupakan faktor yang mempengaruhi kestabilan lemak sehingga diperoleh hasil yang berbeda dengan penelitian sebelumnya.³⁷ Semakin tinggi lemak yang terkandung, maka dadih kefir (warna putih) lebih banyak. Hal tersebut dapat berpengaruh terhadap kekentalan kefir.

Total Bakteri Asam Laktat

Kefir dan bibit kefir mengandung aneka ragam bakteri asam laktat yang sudah teridentifikasi melalui uji fisiologi dan kimia, terdapat *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. paracasei subsp. paracasei*, *Lb. delbrueckii subsp*, *Lb. Helveticus*, *Lb. kefiri*, *Lb. kefiranofaciens*, *Lb. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides subsp.*, *Lactococcus lactis subsp*, *Streptococcus thermophilus*.³⁸

Total bakteri asam laktat tertinggi diperoleh pada hari ke 6 ($6,96 \times 10^{10}$ cfu/mL) dan terendah pada hari ke 0 ($5,31 \times 10^7$ cfu/mL). Peningkatan bakteri

asam laktat yang drastis berdampak pada penampakan fisik kefir, yaitu adanya pemisahan campuran (kuning bening dan putih susu) yang menunjukkan bahwa degradasi komponen zat gizi makro kefir oleh bakteri asam laktat.¹⁷ Saat hari ke 0, bakteri asam laktat cenderung sedikit karena pada awal fermentasi bakteri asam laktat masih dalam fase adaptasi.²² Populasi bakteri asam laktat mulai meningkat pada hari ke-3, bakteri asam laktat mampu beradaptasi dan memanfaatkan sumber energi dari laktosa yang ada pada kefir, khamir juga akan mengambil kesempatan menghidrolisis laktosa, sehingga menghasilkan CO₂ dan alkohol. Senyawa OH⁻ dari alkohol akan bereaksi dengan senyawa H⁺ dari asam laktat.^{17,22} Peningkatan populasi bakteri asam laktat berlanjut hingga hari ke 6 dan 9, namun pada hari ke 15 terjadi penurunan bakteri asam laktat karena adanya aktivitas metabolisme khamir yang mendegradasi laktosa.²⁰ Hasil ini sejalan dengan penelitian lain yang menyebutkan bahwa bakteri asam laktat mengalami penurunan pada hari ke 7 hingga hari ke 14 karena peningkatan khamir.³⁹

pH

Berdasarkan hasil analisis, pH kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 berbeda selama penyimpanan. Walaupun berbeda signifikan, pH kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 masih tergolong baik dan memenuhi standar pH kefir yang berkisar antara 4,2-4,6.¹⁶ Stabilitas nilai pH dipengaruhi oleh bakteri asam laktat. Semakin banyak populasi bakteri asam laktat, maka nilai pH akan semakin turun.³⁹

Perbedaan nilai pH terjadi sejak 3 hari pertama. Terjadi peningkatan pH kefir dari 4,28 pada hari ke-0 menjadi 4,38 pada hari ke-3. Hal tersebut terjadi karena adanya aktivitas khamir yang mendegradasi laktosa menjadi alkohol.³² Berdasarkan hasil penelitian, populasi khamir dalam kefir meningkat pada 7 hari pertama.³⁹

Selanjutnya, pH kefir berbeda nyata pada hari ke 6 dan 9, dimana terjadi penurunan pH. Hal tersebut terjadi karena asam laktat yang terbentuk semakin banyak, sehingga menyebabkan pH kefir semakin turun. pH kembali meningkat (4,13 menjadi 4,26) pada hari ke 15. Penurunan populasi bakteri asam laktat dan

meningkatnya aktivitas khamir yang mendegradasi laktosa menjadi alkohol inilah yang mempengaruhi peningkatan pH.

Hasil penelitian lain menyebutkan, penurunan pH terjadi selama 7 hari pertama, selanjutnya pH kefir konstan hingga hari ke-14.³⁹ Hal tersebut dipengaruhi oleh keseimbangan bakteri asam laktat dan khamir yang terkandung dalam kefir.⁴⁰

Viskositas

Viskositas kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 tidak berbeda selama penyimpanan ($p > 0,05$). Viskositas kefir berkisar antara 0,0393-0,0544 cm^2/s . Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya, dimana terjadi penurunan viskositas selama penyimpanan 14 hari.⁴¹

Viskositas dipengaruhi oleh bakteri asam laktat, total padatan, lemak, dan protein yang terdapat dalam kefir.⁴² Peningkatan viskositas kefir terjadi saat proses fermentasi 24 jam. Bibit kefir yang mengandung bakteri asam laktat dan khamir yang dapat meningkatkan viskositas produk karena adanya *exopolysaccharide* atau kefiran. *Exopolysaccharide* dalam kefir diproduksi oleh berbagai macam bakteri asam laktat yaitu *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, dan *Leuconostoc*. Bakteri asam laktat *S.thermophilus* menghasilkan *texturising agents eksoselular exopolysaccharide* dan berinteraksi dengan protein susu sehingga meningkatkan viskositas, begitu juga dengan *L.bulgaricus* yang tidak hanya menghasilkan asam laktat, namun juga sebagai *texturising agents*.^{38,45}

SIMPULAN

Kandungan vitamin B12, protein, lemak, dan viskositas kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan D3 stabil selama penyimpanan 15 hari. Nilai pH kefir masih masuk dalam range standar pH kefir, yaitu 4,2-4,6. Hal ini menunjukkan kefir masih layak dikonsumsi. Namun, terjadi penurunan vitamin D3 dan total bakteri asam laktat pada hari ke-15. Walaupun total bakteri asam laktat mengalami penurunan, namun masih memenuhi standar SNI, yaitu 10^7 cfu/ml.

SARAN

Perlu adanya penelitian lanjutan efek konsumsi kefir susu kambing berfortifikasi vitamin B12 dan vitamin D3 pada tikus dengan kondisi hiperglikemia dan pengembangan kefir sebagai pangan fungsional yang dapat disukai dan diterima masyarakat terutama penderita resistensi insulin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan kelancaran dalam penyusunan artikel penelitian ini. Penulis mengucapkan terimakasih kepada dosen pembimbing, tim penelitian kefir, dan laboran Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro yang telah mendukung proses penelitian dari awal hingga akhir.

DAFTAR PUSTAKA

1. Folli F, Corradi D, Fanti P, Davalli A, Paez A, Giaccari A, et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro- and macrovascular complications: avenues for a mechanistic-based therapeutic approach. *Journal Current Diabetes Review*. 2011;7(4):313–24.
2. Badan Penelitian dan Pengembangan Kementerian Kesehatan RI. *Riset Kesehatan Dasar*. 2013; p xvi.
3. Holick MF. Vitamin D Deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2007;266–81.
4. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 6th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2013. Available from: <http://www.idf.org/diabetesatlas>.
5. James WP. 22nd Marabou Symposium: The changing faces of vitamin D. *Nutr Rev*. 2008;66:286–290.
6. Evatt ML, Terry PD, Ziegler TR, Oakley GP. Association between vitamin B12-containing supplement consumption and prevalence of biochemically defined B12 deficiency in adults in NHANES III (third national health and nutrition examination survey). *Journal of Public Health Nutrition*. 2010;13(1):25–31.
7. Kibirige D, Mwebaze R. Vitamin B12 deficiency among patients with diabetes mellitus: is routine screening and supplementation justified? *Journal of Diabetes Metabolism Disorder*. 2013;12(1):17.
8. Liu KW, Dai LK, Jean W. Metformin-related vitamin B12 deficiency. *Journal of Age Ageing*. 2006;35(2):200–1.
9. Mandy Ho, Jocelyn H. Halim, Megan L. Gow, Nouhad El-Haddad, Teresa Marzulli, Louise A. Baur CTC and SPG. Vitamin B12 in Obese Adolescents with Clinical Features of Insulin Resistance. *Nutrients Journal*. 2014;6:5611–8.

10. Wu Y, Yu T, Zhanga X, Liua Y, Feng Li, Wanget Y, et al. 1,25(OH)₂D₃ inhibits the deleterious effects induced by high glucose on osteoblasts through undercarboxylated osteocalcin and insulin signaling. *Journal of Steroid Biochemical Molecular Biology*. 2012;113(132):112–9.
11. Setola E, Monti LD, Galluccio E, Pallosi A, Fragasso G, Paroni R, et al. Insulin resistance and endothelial function are improved after folate and vitamin B12 therapy in patients with metabolic syndrome: relationship between homocysteine levels and hyperinsulinemia. *European Journal of Endocrinology*. 2004;(151):483–9.
12. Najib S dan Margale VS. Homocysteine thiolactone inhibits insulin signaling, and glutathione has a protective effect. *Journal Molecule Endocrinology*. 2001;27:85–91.
13. Talaei A, Mohamadi M, Adgi Z. The effect of Vitamin D on insulin resistance in patients with type 2 diabetes. *Journal of Diabetology and Metabolic Syndrome*. 2013;5-8.
14. Zhang R dan Naughton DP. Vitamin D in health and disease : Current perspectives. *Nutrition Journal*. 2010;9(1):65.
15. Allen L, Benoist B, Dary O, Hurrell R, editor. Zinc, folate, vitamin B12, vitamin C, vitamin D, calcium, selenium, fluoride. In: *Guidelines on food fortification with micronutrients*. WHO, Food and Agricultural Organization of the United Nation. 2006. p. 126–30.
16. Farnworth ER. Kefir a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*. 2005;2(1):1–17.
17. Urdaneta E, Barrenetxe J, Aranguren P, Irigoyen A, Marzo F, Ibáñez FC. Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats. *Journal Nutrition Research*. 2007;27(10):653–8.
18. Zenebe T, Ahmed N, Kabeta T, Kebede G, Medicine V, Box PO. Review on medicinal and nutritional values of goat milk. *Academic Journal of Nutrition*. 2014;3(3):30–9.

19. Ganesan B, Brothersen C. Fortification of cheddar cheese with vitamin D does not alter cheese flavor perception. *Dairy Science Journal*. 2011;94(7):3708–14.
20. Grønnevik H, Falstad M, Narvhus JA. Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*. 2011;21(9):601–6.
21. Vieira CP, Álvares TS, Gomes LS, Torres AG, Paschoalin VMF, Conte CA. Kefir grains change fatty acid profile of milk during fermentation and storage. *PLoS One*. 2015;10(10):1–18.
22. Mal R, Radiati LE. Pengaruh lama penyimpanan pada suhu refrigerator terhadap nilai pH, viskositas, total asam laktat, dan profil protein terlarut kefir susu kambing. (Skripsi). Malang; Universitas Brawijaya. 2013.
23. Mayer HK, Fiechter G. Physicochemical characteristics of goat's milk in Austria-seasonal variations and differences between six breeds. *Journal Dairy Science Technology*. 2012;92(2):167–77.
24. Sadeghian S, Fallahi F, Salarifar M, Davoodi G, Mahmoodian M, Fallah N, et al. Homocysteine, vitamin B12 and folate levels in premature coronary artery disease. *BMC Cardiovasc*. 2006;6:38.
25. Grossmann RE, Tangpricha V. Evaluation of vehicle substances on vitamin D bioavailability: A systematic review. *Mol Nutr Food Res*. 2011;54(8):1055–61.
26. Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF, dan Sinderen DV. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*. 2005; 16:198–203.
27. Fang H, Kang J, Zhang D. Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives. *Journal Microbial Cell Factories*. 2017;16:15.
28. Bruinenberg PG, Smid EJ. Vitamin B12 production in fermented milk products. European Patent Office. 2006.

29. Leite AMO, Leite DCA, Aguila EMD, Alvares TS, Peixoto RS, Miguel MAL, et al. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. *Journal Dairy Science*. 2011;96:4149-59.
30. Lehmann U, Hirche F, Stangl GI, Hinz K, Westphal S, Dierkes J. Bioavailability of vitamin D(2) and D(3) in healthy volunteers, a randomized placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98(11):4339-45.
31. Leskauskaite D, Jasutiene I, Malinauskyte E, Kersiene M, Matusевичius P. Fortification of dairy products with vitamin D3. *International Journal of Dairy Technology*. 2015; 177–83
32. Forrest SA, Yada RY, Rousseau D. Interactions of vitamin D3 with bovine β -lactoglobulin A and β -casein. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 2005; 53, 8003–9.
33. Bulgari O, Caroli AM, Chessa S, Rizzi R, dan Gigliotti C. Variation of Vitamin D in Cow's Milk and Interaction with β -Lactoglobulin. *Journal Molecules*. 2013; 18;10122-31.
34. Kazmi SA, Vieth R, Rousseau D. Vitamin D3 fortification and quantification in processed dairy products. *International Dairy Journal*. 2007; 753–9.
35. Kitts DD, Weiler KA. Bioactive proteins and peptides from food sources application of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*. 2003;1309-23.
36. Belkaaloul K, Chekroun A, Abdessalam A, Saidi AD, Kheroua O. Growth, Acidification and proteolysis Performance of Two Co-Cultures (*Lactobacillus Plantarum* *Bifidobacterium Longum* and *Streptococcus Thermophilus Bifidobacterium Longum*). *Afr. Journal Biotechnology*. 2010; 9 (10): 1463-69.
37. Antonioua KD , Topalidoua S, Tsavaliaa G, Dimitreli G. Effect of Starter Culture, Milk Fat and Storage Time on the Rheological

Behaviour of Kefir [Skripsi]. Department of Food Technology ATEI of Thessaloniki.

38. Simova E, Beshkova D, Angelov A, Hristozova TS, Frengova G, Spasov G. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2002; 28, 1–6.
39. Irigoyen A, Arana I, Castiella M, Torre P, Ibanez FC. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Journal Food Chemistry*. 2005; 613-20
40. Viljoen BC. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*. 2001;69: 37-44.
41. Magra TI, Antoniou KD, Psomas EI. Effect of milk fat, kefir grain inoculum and storage time on the flow properties and microbiological characteristic of kefir. *Journal of Texture Studies*. 2012;1-9.
42. Yoo SH, Seong KS, Yoon S. Physicochemical Properties of Kefir Manufactured by a Two-Step Fermentation. *Korean J. Food Sci. An*. 2013;33(6); 744-51.
43. FAO dan WHO. *Codex Alimentarius Milk and Milk Products*. Codex Alimentarius. Roma; 2011. p 56-58.
44. Semo E, Kesselman E, Danino D, Livney YD. Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Journal of Food hydrocolloids*. 2007;21;936-42.
45. Beshkova DM., Simova ED. Pure cultures for making kefir. *Journal Food Microbiology*. 2002;19:537-44.