

Kandungan beta karoten, polifenol total dan aktifitas “merantas” radikal bebas kefir susu kacang hijau (*Vigna radiata*) oleh pengaruh jumlah starter (*Lactobacillus bulgaricus* dan *Candida kefir*) dan konsentrasi glukosa

Teguh Supriyono^{1,2}, Retno Murwani^{2,3}, Nurrahman⁴

ABSTRACT

Background: Kefir is a well known fermented dairy milk product which is functional for gut health. However kefir can also be made from vegetable milk such as soy or mungbean milk.

Objective: To study the chemical and functional property of Mungbean milk (MBM) Kefir

Methods: Mungbean milk was fermented into MBM Kefir using *Lactobacillus bulgaricus* and *Candida kefir*. Three levels of cultures and glucose concentration were tested and a complete randomized design experiment was employed. The resulting MBM Kefir were tested for β -carotene level, total polyphenol content, and free radical scavenging activity. Beta carotene level, total polyphenols and free radicals scavenging activity were determined by spectrophotometry, Folin-Ciocalteu method, and DPPH radical scavenging assay respectively. The data were analyzed by ANOVA and when the result of ANOVA was significant, Tukey's multiple comparison was conducted.

Results: Culture concentration increased β -carotene level ($p = 0.049$), total polyphenol ($p = 0.015$) and free radical scavenging activity ($p = 0.000$) of MBM kefir. Glucose concentration increased total polyphenol ($p = 0.002$), but had no effect on free radical scavenging activity and β -carotene level. However, there were no interaction among treatments at 0.05 significance level. Total acid level ranged from 1.57 to 2.54%, with the highest and level at 15% cultures concentration and 15% glucose concentration. Alcohol level ranged from 0.26 to 0.90% which was in accordance with the maximum standard for kefir (1%).

Conclusion: An optimal product of mungbean milk kefir with highest free radical scavenging activity can be obtained using 15% cultures (*Lactobacillus bulgaricus* and *Candida kefir*) and 10% glucose concentration.

Keywords: *Lactobacillus bulgaricus*, *Candida kefir*, β -carotene, total polyphenol, free radicals scavenging activity.

ABSTRAK

Latar belakang : Fermentasi susu kacang hijau dengan penambahan kultur *Lactobacillus bulgaricus* dan *Candida kefir* dapat meningkatkan sifat fungsionalnya. Sumber energi utama dari kedua mikroorganisme tersebut adalah laktosa, sementara susu kacang hijau tidak mengandung laktosa. Kandungan gula dalam susu kacang hijau sebagai sumber energi bagi mikroorganisme sangat terbatas, sehingga diperlukan penambahan glukosa sebagai sumber energi yang dapat langsung digunakan.

Tujuan : Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh jumlah starter (*Lactobacillus bulgaricus* dan *Candida kefir*) dan konsentrasi glukosa terhadap kadar beta karoten, polifenol total dan aktivitas “merantas” radikal bebas kefir susu kacang hijau.

Metode : Penelitian ini adalah eksperimen murni. Rancangan percobaan disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Kadar beta karoten ditentukan dengan spektrofotometer, polifenol total dianalisis menggunakan reagen Folin-Ciocalteu dan aktivitas “merantas” radikal bebas ditentukan dengan DPPH radical scavenging assay. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji ANOVA, jika ada pengaruh yang signifikan dilanjutkan dengan uji beda Tukey HSD.

Hasil penelitian : Jumlah starter berpengaruh nyata terhadap kadar beta karoten ($p = 0,049$), polifenol total ($p = 0,015$) dan aktivitas “merantas” radikal bebas ($p = 0,000$). Ada pengaruh konsentrasi glukosa terhadap polifenol total ($p = 0,002$), sedangkan aktivitas “merantas” radikal bebas dan kadar beta karoten tidak dipengaruhi oleh konsentrasi glukosa dan tidak ada interaksi pada semua perlakuan. Tingkat signifikansi yang digunakan adalah 0,05. Kadar total asam berkisar 1,57% - 2,54%, dengan kadar tertinggi pada perlakuan jumlah starter 15% dan konsentrasi glukosa 15%, sementara untuk kadar alkohol berkisar 0,26% - 0,90% sesuai dengan literatur yaitu maksimal 1%.

Simpulan : Kefir susu kacang hijau dengan sifat fungsional yang optimal menggunakan jumlah starter (*Lactobacillus bulgaricus* dan *Candida kefir*) 15 % dan konsentrasi glukosa 10 %.

Kata kunci : *Lactobacillus bulgaricus*, *Candida kefir*, beta karoten, polifenol total, aktivitas “merantas” radikal bebas.

¹ Jurusan Gizi Politeknik Kesehatan Kemenkes Palangka Raya, Indonesia

² Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Indonesia

³ Natural Product Laboratory-Centre of Research and Services Universitas Diponegoro Semarang, Indonesia

⁴ Jurusan Teknologi Pangan, Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Semarang, Indonesia

PENDAHULUAN

Fermentasi merupakan teknik yang tidak saja murah namun juga alami untuk menghasilkan dan mengawetkan makanan. Dalam proses fermentasi dengan adanya aktifitas enzim dari mikroba, komponen-komponen seperti pati, lemak, protein, zat toksik dan senyawa anti gizi dapat dipecah. Teknik fermentasi ini memunculkan banyak ketertarikan untuk diaplikasikan pada bahan pangan kacang – kacang karena adanya efek peningkatan zat gizi dan pengaruh yang baik bagi kesehatan.¹

Produk fermentasi susu dapat berupa yoghurt atau kefir, tergantung dari jenis mikroorganisme yang digunakan selama fermentasi. Kefir adalah produk yang dihasilkan dari fermentasi susu sapi yang telah dipasteurisasi kemudian ditambahkan *starter* berupa butir atau biji kefir (*kefir grain/kefirgranule*).

Kefir dapat pula dibuat menggunakan bahan baku susu nabati yaitu dari kacang-kacangan. Kelebihan susu nabati sebagai bahan baku susu fermentasi adalah kandungan lemak yang rendah dan tidak mengandung kolesterol. Kacang hijau merupakan bahan pangan lokal yang dapat digunakan sebagai bahan baku susu fermentasi. Kacang hijau mengandung senyawa - senyawa fungsional diantaranya β -karoten dan polifenol. Senyawa – senyawa ini telah diketahui memiliki sifat fungsional sebagai antioksidan dan immunomodulator. Kemampuan β -karoten sebagai antioksidan ditunjukkan dalam mengikat radikal oksigen (1O_2), “merantas” atau merapuhkan radikal peroksil dan menghambat oksidasi lipid, sedangkan polifenol mampu “merantas” oksigen dan radikal alkil dengan memberikan donor elektron sehingga terbentuk radikal fenoksil yang relatif stabil.²

Satu hal yang penting pada fermentasi menggunakan bakteri asam laktat (BAL) dengan bahan baku dari susu kacang-kacangan adalah jenis karbohidratnya yang berbeda dengan karbohidrat pada susu sapi. Susu kacang-kacangan mengandung oligosakarida dan polisakarida sedangkan pada susu sapi adalah laktosa.³ Kandungan gula yang terdapat dalam susu kacang hijau yang dapat dimanfaatkan oleh mikroorganisme yang berperan dalam proses pembuatan kefir sangat terbatas, oleh karena itu perlu dilakukan penambahan gula sebagai sumber karbon.

Glukosa adalah gula dalam bentuk sederhana yang dapat langsung dimanfaatkan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhannya. Diharapkan dengan penambahan glukosa pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus* dan *Candida kefir* dapat dipacu. Pembuatan kefir dengan bahan baku susu kacang hijau belum pernah dilakukan sebelumnya, dan perubahan β -karoten dan senyawa polifenol selama fermentasi kefir kacang hijau, serta sifat

fungsional kefir kacang hijau sebagai antioksidan juga belum diketahui, sehingga dilakukan kajian terhadap perubahan kandungan β -karoten, polifenol total dan aktifitas “merantas” radikal bebas kefir susu kacang hijau akibat proses fermentasi.

METODE DAN BAHAN

Materi yang digunakan adalah kacang hijau, air minum, susu sapi segar, kultur murni dari bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan khamir *Candida kefir*.

Produksi susu kacang hijau

Pembuatan Susu Kacang Hijau dilakukan menurut metode Widowati dan Masgiyarta(2007).⁴ Kacang hijau yang telah dipisahkan dari kotoran dan biji rusak direndam dalam air dengan perbandingan air dengan kacang hijau 3 : 1 selama 8 jam. Kacang hijau ditiriskan dan dididihkan selama 20 menit. Kemudian kacang hijau digiling menggunakan *waring blender*. Bubur (*slurry*) kacang hijau yang diperoleh ditambah air mendidih sehingga jumlah air secara keseluruhan mencapai 8 kali lipat bobot kacang hijau kering. Bubur encer disaring dengan kain kasa dan filtratnya merupakan susu kacang hijau. Susu kacang hijau dipasteurisasi pada suhu 85°C selama 30 menit.

Pembuatan Starter Kefir

Medium yang digunakan untuk membuat *starter* kefir yaitu susu sapi yang dipasteurisasi pada suhu 85°C selama 30 menit. Susu didinginkan sampai suhu ruang dan kemudian ditambahkan kultur murni dari bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan khamir *Candida kefir* dengan rasio 1 : 1. Susu diinkubasi pada suhu ruang selama 20 jam dandidinginkan pada suhu 10°C selama 2 hari untuk pematangan. Jumlah mikroorganisme pada *starter* (CFU/ml) dihitung dengan metode TPC (*Total Plate Count*) sehingga diketahui jumlah mikroorganisme yang akan ditambahkan. *Starter* yang digunakan memiliki jumlah mikroorganisme $4,0 \times 10^6$ cfu/ml.

Pembuatan Kefir Susu Kacang Hijau

Susu kacang hijau dipanaskan pada suhu 85°C selama 30 menit, dan ditambahkan glukosa sesuai perlakuan yaitu 5%, 10% dan 15%. Susu kacang hijau selanjutnya didinginkan pada suhu ruang. Setelah dingin ditambahkan *starter* kefir yang mengandung kultur murni *Lactobacillus bulgaricus* dan *Candida kefir* sesuai perlakuan yaitu sebanyak 5 %, 10 % dan 15 %. Susu kacang hijau yang telah ditambahkan dengan *starter* diinkubasi pada suhu 43,5°C selama 6 jam dalam inkubator. Kefir susu kacang hijau yang dihasilkan kemudian didinginkan pada suhu 10°C selama 2 hari untuk menghambat pembentukan alkohol oleh khamir. Setelah itu kefir susu kacang hijau langsung dianalisis.

Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap pola faktorial 2 x 3, dimana masing-masing satuan percobaan diulang sebanyak 3 kali. Faktor I adalah jumlah *starter* dan Faktor II adalah konsentrasi glukosa, masing-masing faktor terdiri dari 3 (tiga) level. Untuk melihat pengaruh perlakuan yaitu jumlah *starter* dan konsentrasi glukosa terhadap β -karoten, polifenol total, dan aktifitas "merantas" radikal bebas kefir susu kacang hijau, data diuji statistik menggunakan *Analysis of Varians* (ANOVA) dan software SPSS 11.5. Apabila diantara perlakuan terdapat pengaruh nyata maka dilanjutkan dengan uji beda dengan menggunakan uji Tukey *Honestly Significance Difference* (HSD) pada taraf 5 %.⁵

Pengukuran kadar β -carotene⁶

Sampel kefir sebanyak 1 ml ditambah aquades 8 ml dan dihomogenkan dengan vortex. Dua ml dari campuran diambil 2 ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 ml alkohol 96% dan 10 ml petroleum eter (PE). Setelah dikocok selama 2 menit dengan vortex, dipisahkan menggunakan sentrifus. Lapisan PE diambil dan sisanya diekstrak kembali dengan PE 10 ml dan dipisahkan kembali seperti sebelumnya. Kedua lapisan PE disatukan dan diambil 2 ml untuk dibaca pada Spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm. Kadar β -karoten ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$) ditentukan dengan rumus $(A \times F \times 100/0.04) \times 0,5$. A adalah absorbansi dalam pelarut PE dan F adalah faktor konversi.

Pengukuran kadar polifenol total⁷

Sampel kefir sebanyak 1 ml ditambah aquades 75 ml. Kemudian ditambahkan reagen Folin-Ciocalteu sebanyak 5 ml. Selanjutnya ditambahkan sodium karbonat jenuh sebanyak 10 ml dan 100 ml aquades. Larutan dihomogenkan menggunakan shaker. Sampel selanjutnya dibaca pada Spektrofotometer pada panjang gelombang 760 nm. Sebagai standar digunakan asam tanat dengan konsentrasi 0-9 mg/ml.

Pengukuran Aktifitas merantas radikal bebas⁸

Sampel kefir sebanyak 200 ml ditambah dengan 1 ml etanol dan 800 ml buffer Tris-HCl 100 mM pH 7. Kemudian ditambahkan 1 ml DPPH 500mM. Larutan campuran dikocok sampai homogen dan didiamkan selama 20 menit dalam ruang gelap. Selanjutnya larutan dibaca absorbansinya pada spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm. Sebagai standar antioksidan digunakan asam askorbat dengan konsentrasi 0,16-1,28 mg/ml. Aktifitas merantas sampel (%) dihitung dengan rumus $(1 - \frac{A_{\text{sampel } 517\text{nm}}}{A_{\text{blanko } 517\text{ nm}}}) \times 100$

Pengukuran Total Asam dan Kadar Alkohol⁹

Seluruh sampel diukur total asamnya (asam laktat)¹⁰ dan kadar alkohol dengan metode distilasi.⁹

HASIL

Kadar β -Caroten

Kadar beta karoten kefir susu kacang hijau oleh pengaruh jumlah *starter* (*L. bulgaricus* dan *C. kefir*) dan konsentrasi glukosa disajikan pada Gambar 2. Kadar beta karoten kefir susu kacang hijau berkisar antara 18,24–46,75 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$. Secara umum terjadi peningkatan kadar beta karoten setelah fermentasi dibandingkan sebelum susu kacang hijau difermentasi (17 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$) dan lebih tinggi dibandingkan dengan kefir susu sapi (12,75 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$).

Jumlah beta karoten yang ada menurun karena telah digunakan dalam reaksi penetralan radikal bebas tersebut. Hal ini juga berhubungan dengan total fenol yang menurun pada jumlah *starter* yang semakin banyak (Tabel 2.). Analisis statistik menunjukkan bahwa jumlah *starter* berpengaruh terhadap kadar beta karoten ($p = 0.049$) dan jumlah glukosa tidak berpengaruh. Kadar beta karoten meningkat pada jumlah *starter* 10 % dan menurun pada jumlah *starter* 15 %. Kadar beta karoten yang tertinggi didapat pada perlakuan dengan jumlah starter 10% dan konsentrasi glukosa 10% dibandingkan dengan perlakuan lain.

Polifenol Total

Polifenol total kefir susu kacang hijau oleh pengaruh jumlah *starter* (*L. bulgaricus* dan *C. kefir*) dan konsentrasi glukosa disajikan pada Gambar 2. Polifenol total kefir susu kacang hijau berkisar 0,0384 mg/ml – 0,054 mg/ml. Terjadi peningkatan polifenol total selama fermentasi dibandingkan dengan susu kacang hijau sebelum fermentasi (0,035 mg/ml) dan lebih tinggi dibandingkan dengan kefir susu sapi (0,017 mg/ml). Analisis statistik menunjukkan bahwa jumlah *starter* dan jumlah glukosa berpengaruh terhadap kadar total polifenol ($p = 0,015$).

Aktifitas "Merantas" Radikal Bebas

Aktifitas "merantas" radikal bebas (*free radical scavenging activity*) adalah kemampuan antioksidan sebagai "scavenger" radikal bebas seperti peroksida, hidroperoksida atau peroksil lipid sehingga menghambat mekanisme oksidasi (Prakash, 2001). Aktifitas "merantas" radikal bebas kefir susu kacang hijau oleh pengaruh jumlah starter (*L. bulgaricus* dan *C. kefir*) dan konsentrasi glukosa disajikan pada Gambar 3. Analisis statistik menunjukkan bahwa jumlah *starter* berpengaruh terhadap kadar total polifenol ($p = 0,015$) dan jumlah glukosa tidak berpengaruh.

Tabel 1. Total Asam Kefir Susu Kacang Hijau

Jumlah Starter (%)	Konsentrasi Glukosa		
	5%	10%	15%
5 %	1,57 ± 0,11590	1,76 ± 0,47260	2,07 ± 0,22743
10 %	1,64 ± 0,03055	1,80 ± 0,19468	2,15 ± 0,07095
15 %	1,96 ± 0,15100	2,06 ± 0,07638	2,54 ± 0,29094
Rata-rata	1,72 ± 0,20280	1,87 ± 0,17770	2,25 ± 0,23286

Tabel 2. pH Kefir Susu Kacang Hijau

Jumlah Starter (%)	Konsentrasi Glukosa		
	5%	10%	15%
5 %	4,35 ± 0,08000	4,22 ± 0,10693	3,90 ± 0,18502
10 %	4,27 ± 0,10017	4,16 ± 0,19296	3,82 ± 0,19672
15 %	4,01 ± 0,10970	3,96 ± 0,06658	3,74 ± 0,05508
Rata-rata	4,21 ± 0,17741	4,11 ± 0,16417	3,82 ± 0,15425

Total Asam

Tabel 1 dan 2 menunjukkan total asam kefir kacang hijau akibat perlakuan jumlah starter (*Lactobacillus bulgaricus* dan *Candida kefir*) dan konsentrasi glukosa. Pada kefir kacang hijau, selain *Lactobacillus bulgaricus* yang membentuk asam – asam organik, *Candida kefir* juga mempunyai kontribusi dalam pembentukan asam organik seperti asam asetat dan asam laktat, sehingga pH kefir susu kacang hijau menjadi rendah. Sebagian besar, total asam kefir susu kacang hijau memenuhi Standar Nasional Indonesia (SNI) yang dalam hal ini mengacu pada SNI yoghurt karena SNI untuk kefir belum ada. Analisis statistik menunjukkan bahwa jumlah starter dan jumlah glukosa tidak berpengaruh terhadap total asam dan pH.

Kadar Alkohol

Pengaruh jumlah starter (*Lactobacillus bulgaricus* dan *Candida kefir*) dan konsentrasi glukosa terhadap kadar alkohol kefir kacang hijau disajikan pada Tabel 3. Analisis statistik menunjukkan bahwa jumlah starter dan jumlah glukosa tidak berpengaruh terhadap kadar alkohol.

PEMBAHASAN

Peningkatan kadar beta karoten setelah fermentasi kemungkinan berasal dari beta karoten yang diproduksi oleh *Candida kefir*. *Candida kefir* merupakan khamir seperti fungi (*yeast like fungi*) yang bersifat *chromogenic* dan menghasilkan berbagai pigmen antara lain pigmen hijau, kuning, oranye, dan hitam.^{13,18} Diantara khamir yang digunakan dalam fermentasi makanan adalah khamir dari famili *Ascomycetous*, khamir dari genus *Candida* dan genus *Saccharomyces cerevisiae*. Kecenderungan penurunan kadar beta karoten dengan semakin banyaknya jumlah

starter karena fermentasi melibatkan beragam tipe reaksi kimia termasuk proses oksidasi.¹¹ Semakin banyak jumlah starter semakin meningkatkan reaksi oksidasi sehingga semakin banyak pula hasil samping oksidasi berupa radikal bebas seperti singlet oksigen. Beta karoten yang ada kemudian berperan sebagai antioksidan untuk meredam hasil samping reaksi oksidasi tersebut dan bereaksi dengan radikal bebas menjadi senyawa yang lebih stabil. Selain itu bakteri asam laktat juga menghasilkan hidrogen peroksida (H₂O₂) yang berperan sebagai prekursor pembentukan radikal bebas selama fermentasi.

Peningkatan kadar polifenol susu kacang hijau selama fermentasi oleh mikroba kefir menandakan bahwa mikroba kefir mampu memproduksi polifenol sebagai metabolit sekunder.

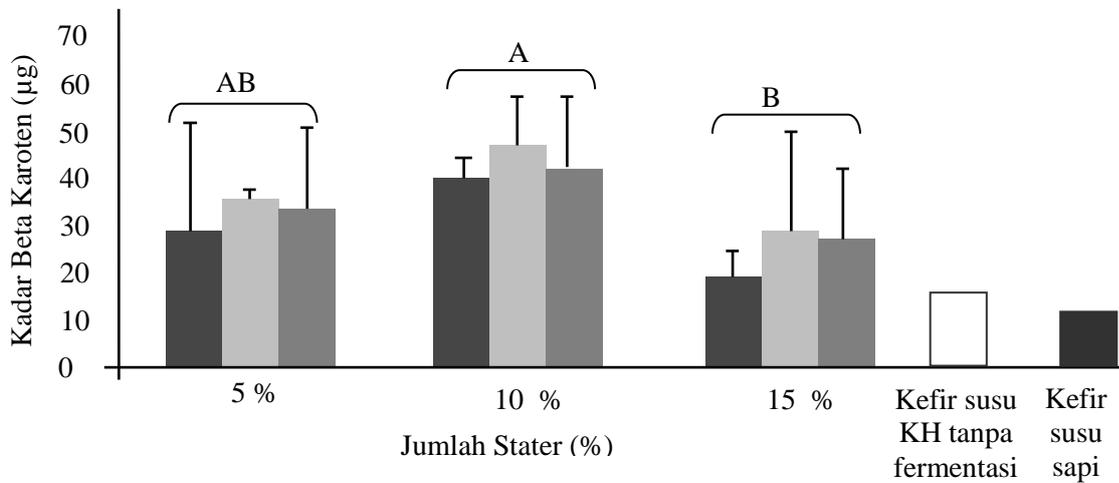
Total polifenol meningkat pada jumlah starter 10% dan sedikit menurun pada jumlah starter 15%. Penurunan polifenol total kemungkinan disebabkan kondisi asam yang semakin meningkat dengan semakin banyaknya penambahan jumlah starter dan konsentrasi glukosa. Asam yang terbentuk dihasilkan oleh *Lactobacillus bulgaricus* yaitu dengan mengkonversi glukosa menjadi asam laktat. Selain itu *Candida kefir* juga dapat mengkonversi glukosa menjadi asam laktat dan asetat.

Reaksi oksidasi dari proses fermentasi ini juga menghasilkan hasil samping berupa radikal bebas seperti yang telah dikemukakan sebelumnya. Polifenol juga akan beraksi sebagai antioksidan seperti halnya beta karoten untuk menetralkan hasil samping reaksi oksidasi tersebut. Namun disini penurunan ini kecil sekali dibandingkan penurunan yang terjadi pada kadar beta karoten (Gambar 1). Hasil ini menandakan bahwa beta karoten digunakan lebih banyak atau lebih tersedia sebagai antioksidan sistem pangan kefir. Untuk pengaruh kadar glukosa terhadap kadar polifenol hanya terjadi pada jumlah starter 5%. Pada

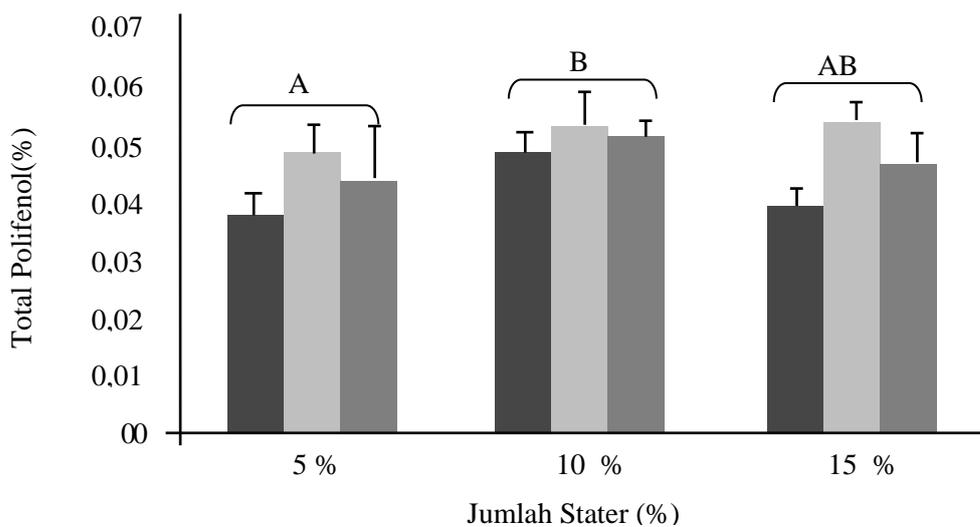
jumlah starter 5% ini, kadar polifenol total meningkat dari jumlah glukosa 5% ke 10% namun kemudian menurun kembali. Perubahan kadar total polifenol ini berhubungan dengan jumlah substrat yang semakin tersedia dengan jumlah glukosa yang meningkat. Penurunan kembali pada jumlah glukosa 15% karena jumlah starter yang hanya 5% tidak dapat meningkatkan penggunaan substrat glukosa yang ada sehingga jumlah polifenol sebagai metabolit sekunder juga menurun kembali.

Pada yoghurt, kemampuan “merantas” terhadap radikal bebas dari *Lactobacillus bulgaricus* lebih besar dibanding dengan *Streptococcus thermophilus*.¹²

Gambar 3 menunjukkan aktifitas merantas radikal bebas kefir susu kacang hijau oleh pengaruh jumlah starter (*Lactobacillus bulgaricus* dan *Candida kefir*) dan konsentrasi glukosa. Semakin banyak jumlah starter menyebabkan kemampuan “merantas” radikal bebas juga semakin besar. Aktifitas “merantas” radikal bebas tertinggi didapat pada perlakuan dengan jumlah starter 15%. Hal ini karena sel dari kultur bakteri asam laktat sendiri memiliki kemampuan “merantas” radikal bebas. Sebagian besar komponen antioksidan pada kefir terakumulasi pada biji kefir (*kefir grain*).¹⁴



Gambar 1. Kadar B-caroten Kefir Susu Kacang Hijau oleh Pengaruh Jumlah Starter (*Lactobacillus bulgaricus* dan *Candida kefir*) dan Konsentrasi Glukosa, dibandingkan dengan kefir susu kacang hijau tanpa fermentasi dan kefir susu sapi. Matriks huruf besar yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata jumlah starter.



Gambar 2. Total Polifenol Kefir Susu Kacang Hijau oleh Pengaruh Jumlah Konsentrasi Glukosa. Matriks huruf besar yang berbeda, menunjukkan perbedaan nyata jumlah starter. Matriks huruf kecil yang berbeda, menunjukkan perbedaan nyata kadar glukosa. Ket : ■ = Glukosa 5 %, ■ = Glukosa 10 %, ■ = Glukosa 15 %

Pada yoghurt, *Lactobacillus bulgaricus* memiliki efek sebagai antioksidan, “merantas” hidroksil radikal, hidrogen peroksida dan malonaldehid pada reaksi oksidasi. Jumlah sel *Lactobacillus bulgaricus* sebanyak 10^8 cfu/ml menghasilkan kemampuan yang tinggi dalam menghambat oksidasi asam lemak.¹² Sedangkan *Candida kefir* adalah khamir probiotik yang berperan menyediakan nutrisi seperti asam amino dan vitamin serta mengkondisikan pH untuk pertumbuhan mikroorganisme lain,¹³ karena khamir mempunyai kemampuan lebih besar dalam mencerna substrat dibanding dengan bakteri asam laktat.¹⁴

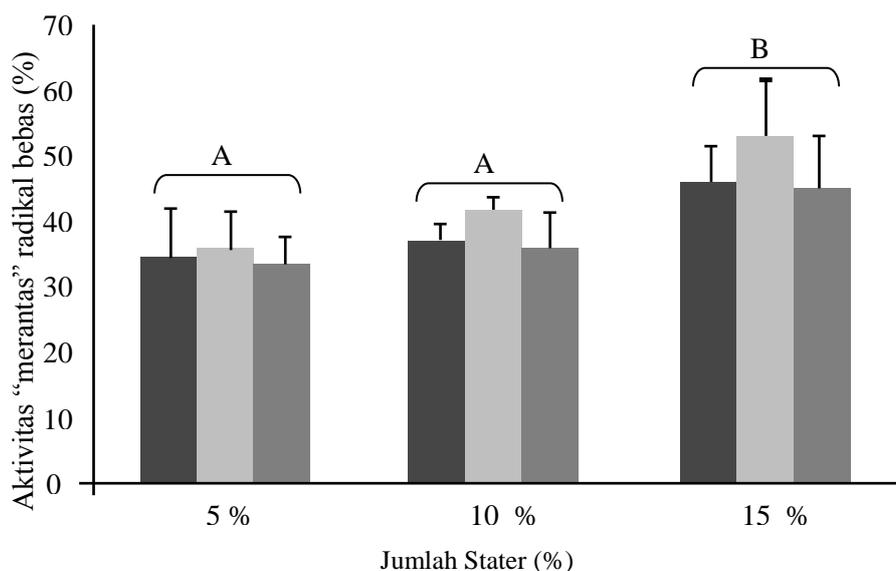
Hanya saja pada perlakuan konsentrasi glukosa 15%, total asam kefir susu kacang hijau diatas rata-rata SNI. Hal ini disebabkan konsentrasi glukosa yang lebih tinggi akan menyebabkan produksi asam-asam organik semakin meningkat. Semakin banyak sumber gula yang dapat dimetabolisme maka semakin banyak pula asam-asam organik yang dihasilkan sehingga pH juga akan semakin rendah.¹⁵

Sebagian besar khamir memerlukan oksigen untuk pertumbuhannya dan dengan mengontrol oksigen pertumbuhan khamir dapat dikendalikan¹³. Alkohol yang terbentuk selama fermentasi susu kacang hijau

menjadi kefir dihasilkan oleh *Candida kefir*. *Candida kefir* adalah golongan khamir yang mampu memfermentasi laktosa menjadi glukosa dan galaktosa karena dapat mensintesa enzim laktase dan menghasilkan alkohol dan CO₂.¹⁶ Pada pembuatan kefir susu kacang hijau, fermentasi dilakukan dalam keadaan tertutup. Hal ini dilakukan agar aktifitas khamir dapat dikendalikan sehingga dengan pembatasan oksigen dapat menghambat *Candida kefir* mengkonversi glukosa yang ditambahkan menjadi alkohol. Selain itu, setelah diinkubasi selama 6 jam pada suhu 43,5°C, kefir susu kacang hijau langsung dimasukkan kedalam pendingin pada suhu 10°C. Perlakuan ini juga dimaksudkan untuk menghambat aktifitas *Candida kefir* sehingga alkohol yang dihasilkan selama fermentasi dapat dikendalikan,¹⁹ kefir harus disimpan pada suhu rendah agar khamir tidak menghasilkan alkohol dan CO₂ yang berlebihan. Kadar alkohol kefir susu kacang hijau memiliki kisaran 0,26–0,90 %. Kadar alkohol pada susu fermentasi dalam Standar Nasional Indonesia (SNI) belum ada, menghasilkan kadar alkohol kefir sebanyak 0,5–1,0 %.¹¹

Tabel 3. Kadar Alkohol (%) Kefir Susu Kacang Hijau

Jumlah Starter (%)	Konsentrasi Glukosa		
	5%	10%	15%
5 %	0,26 ± 0,03055	0,36 ± 0,02517	0,49 ± 0,03055
10 %	0,53 ± 0,02517	0,63 ± 0,03000	0,72 ± 0,03215
15 %	0,62 ± 0,02517	0,81 ± 0,01528	0,90 ± 0,02646
Rata-rata	0,47 ± 0,16508	0,60 ± 0,20012	0,70 ± 0,18121



Gambar 3. Aktifitas “Merantas” Radikal Bebas Kefir Susu Kacang Hijau oleh Pengaruh Jumlah Starter (*Lactobacillus bulgaricus* dan *Candida kefir*) dan Konsentrasi Glukosa. Matriks huruf besar yang berbeda, menunjukkan perbedaan nyata jumlah starter. Ket: ■ = Glukosa 5 %, ■ = Glukosa 10 %, ■ = Glukosa 15 %

SIMPULAN

Kefir susu kacang hijau memiliki aktifitas merentas radikal bebas maksimal pada jumlah *starter* 15% dan jumlah glukosa 10% dengan akhir pH 3,96 dan kadar alkohol 0,81%. Meskipun pada kondisi *starter* dan kadar glukosa tersebut kadar beta karoten rendah namun kadar polifenolnya tetap tinggi dan menggambarkan bahwa beta karoten digunakan lebih banyak oleh mikroba kefir sebagai senyawa penetral radikal bebas yang muncul selama proses oksidasi (fermentasi).

DAFTAR PUSTAKA

1. Khalil AA. Nutritional Improvement of an Egyptian Breed of Mung Bean by Probiotic Lactobacilli. *African Journal of Biotechnology*. 2006;5 (2): 206-212.
2. Mokgope LB. Cowpea Seed Coats and Their Extracts : Phenolic Composition and Use as Antioxidants in Sunflower Oil. South Africa: Department of Food Science. University of Pretoria; June 2006.
3. Yusmarini dan Efendi. Evaluasi Mutu Soygurt yang dibuat dengan Penambahan beberapa Jenis Gula. *Jurnal Natur Indonesia*. 2004; 6(2): 104-110.
4. Widowati, S dan Misgiyarta. Efektifitas Bakteri Asam Laktat (BAL) dalam Pembuatan Produk Fermentasi Berbasis Protein/Susu Nabati. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman*. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian; 2007.
5. Steel RGD, Torrie JH. Prinsip dan Prosedur Statistika: Suatu Pendekatan Biometrik. Edisi Kedua. Dialihbahasakan oleh Bambang Sumantri. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama; 1993.
6. Nielsen SS. *Introduction to the Chemical Analysis of Food*. New York: Chapman and Hall; 1995.
7. Shahidi F, Nazck M. *Food Phenolics*. Basel: Technomic Publishing Company, Inc; 1995.
8. Othman A, Ismail A, Ghani NA, Adenan I. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*. 2007; 100: 1523-1530.
9. James CS. *Analysis Chemistry of Food*. Great Britain: Blackie Academic and Professional; 1995.
10. Ranggana S. *Manual Of Analysis of Fruit and Vegetables Product*. Tata. New Delhi: MC. Graw Publishing Company Limited; 1997.
11. Rahman A, Fardiaz S, Rahaju WP, Suliantari, Nurwitri CC. *Teknologi Fermentasi Susu*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor; 1992.
12. Lin MY, Yen CL. Reactive Oxygen Species and Lipid Peroxidation Product-Scavenging Ability of Yogurt Organisms. Department of Food Science, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan. *Journal Dairy Science*. 2004; 82:1629–1634.
13. Battcock M, Azam-Ali S. *Basic Principles of Fermentation*. FAO Agricultural Services Bulletin No. 134. United Kingdom: Intermediate Technology, Schumacher Centre for Technology and Development; 1998.
14. Liu JR, Chen MJ, Lin CW. Antimutagenic and Antioxidant Properties of Milk–Kefir and Soymilk–Kefir. Department of Animal Science, National Taiwan University and Institute of BioAgricultural Sciences. 2004; 1 – 8.
15. Rahman A. *Pengantar Teknologi Fermentasi*. IPB Bogor: Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi; 1989.
16. Yusmarini, Efendi R. Evaluasi Mutu Soygurt yang dibuat dengan Penambahan beberapa Jenis Gula. *Jurnal Natur Indonesia*. 2004; 6(2): 104-110.
17. Seyis I, Aksoz N. Production of Lactase By *Trichoderma Sp.*, *Food Technol. Biotechnol.* 2004; 42 (2): 121–124.
18. Baumgartner C, Freydiere AM, Gille Y. Direct Identification and Recognition of Yeast Species from Clinical Material by Using Albicans ID and CHROM agar Candida Plates. *Journal Of Clinical Microbiology*. 1996; 34(2): 454–456.
19. Surono IS. *Probiotik, Susu Fermentasi dan Kesehatan*. Jakarta: Yayasan Pengusaha Makanan dan Minuman Seluruh Indonesia (YAPMMI). TRICK; 2004.