

## Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Produk Fermentasi Susu Kedelai dan *Whey* Tahu menggunakan Bakteri Asam Laktat Komersial

Kunti Nadiyahatan S. Muthia<sup>a,\*</sup>, Purbowatiningrum Ria Sarjono<sup>a</sup>, Agustina L. N. Aminin<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Biochemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

\* Corresponding author: [agustina.aminin@live.undip.ac.id](mailto:agustina.aminin@live.undip.ac.id)

Article Info	Abstract
<p>Keywords:</p> <p>antibacterial, antioxidant, fermentation, tofu <i>Whey</i>, soymilk</p>	<p>The potential of antibacterial and antioxidant activity of fermented soy milk and <i>Whey</i> tofu products by lactic acid bacteria (BAL) has been explored in this study. Fermentation was performed using commercial lactic acid bacteria and incubated at 45°C. for 7 hours. Antibacterial activity was observed against pathogenic bacteria <i>Escherichia coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. Antioxidants were tested using the Folin-Ciocalteu Reagent (FCR) method and scavenging DPPH. The results showed fermented product of soy milk in the form of white lumps with pH 5.4 whereas tofu <i>Whey</i> in the form of liquid mixture and yellow cloudy solid with pH 4,7. The fermentation results do not give inhibition to the growth of pathogenic bacteria. Fermented soy milk and <i>Whey</i> tofu products have a FCR antioxidant capacity of 0.07 mg of gallic acid / gram of sample and 0.04 mg of gallic acid / gram of sample. At 90 ppm each product capable of inhibiting free radical DPPH of 12.53% and 11.46% so potentially as an antioxidant.</p>
<p>Kata kunci:</p> <p>Antibakteri, Antioksidan, fermentasi, <i>Whey</i> tahu, susu kedelai</p>	<p><b>Abstrak</b></p> <p>Potensi aktifitas antibakteri dan antioksidan produk fermentasi susu kedelai dan <i>Whey</i> tahu oleh bakteri asam laktat (BAL) telah dieksplorasi dalam penelitian ini. Fermentasi dilakukan menggunakan bakteri asam laktat komersil dan dinkubasi pada 45°C selama 7 jam. Aktifitas antibakteri diamati terhadap bakteri patogen <i>Escherichia coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. Antioksidan diuji dengan metode Folin- Ciocalteu Reagen (FCR) dan peredam DPPH. Hasil penelitian menunjukkan produk fermentasi susu kedelai berupa gumpalan berwarna putih dengan pH 5,4 sedangkan pada <i>Whey</i> tahu berupa campuran cairan dan padatan berwarna kuning keruh dengan pH 4,7. Hasil fermentasi tidak memberikan penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri patogen. Produk fermentasi susu kedelai dan <i>Whey</i> tahu memiliki kapasitas antioksidan FCR sebesar 0,07 mg asam galat/gram sampel dan 0,04 mg asam galat/gram sampel serta pada konsentrasi 90 ppm masing-masing mampu menghambat radikal bebas DPPH sebesar 12,53% dan 11,46% sehingga berpotensi sebagai antioksidan.</p>

### 1. Pendahuluan

*Whey* merupakan produk samping dari proses pembuatan tahu mengandung total protein 0,138%; total pati 0,855% dan total gula 1,128% serta isoflavon sebesar 20,77% relatif terhadap total isoflavon kedelai.

Kandungan nutrisi *Whey* tahu tersebut berpotensi sebagai media pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL) seperti *Lactobacillus plantarum* [1] dan *Lactobacillus paracasei* [2]. Harmayani *dkk.* [3] telah memanfaatkan *Whey* tahu untuk media pertumbuhan bakteri *Pediococcus acidilactici* penghasil bakteriosin.

BAL dalam pertumbuhannya menghasilkan metabolit primer yaitu asam laktat, CO<sub>2</sub>, diasetil, asetaldehida dan hidrogen peroksida serta metabolit sekunder yaitu bakteriosin yang berpotensi sebagai antibakteri. Adanya asam laktat menyebabkan penurunan pH sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* yang optimum pada pH 6-7. Fermentasi oleh BAL juga menghasilkan bakteriosin yaitu bioaktif peptida atau protein yang memiliki aktifitas antimikroba terutama terhadap bakteri gram positif yang berkaitan dengan kerusakan makanan maupun bakteri patogen [4, 5]. Nurhajati *dkk.* [6] mengemukakan bahwa bakteriosin diproduksi oleh bakteri asam laktat pada awal fase log kemudian mencapai maksimum pada awal fase stasioner dan mengalami penurunan pada akhir fase stasioner hingga fase kematian.

Fermentasi BAL juga mengakibatkan protein kedelai mengalami hidrolisis menjadi peptida-peptida pendek diantaranya Phe-Asp-His-Val-Glu dan Phe-Asn-His-Leu-Asp-His yang mampu meredam radikal bebas DPPH [7]. Fermentasi menyebabkan senyawa isoflavon dalam kedelai mengalami transformasi sehingga diperoleh senyawa isoflavon bebas yaitu aglikon berupa genistein, glisitein dan daidzein yang memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi daripada bentuk terikatnya [7].

Dalam penelitian ini dilakukan fermentasi susu kedelai dan *Whey* tahu dengan menggunakan BAL dan penentuan aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan metode difusi cakram. Uji antioksidan dari ekstrak hasil fermentasi susu kedelai dan *Whey* tahu menggunakan metode Folin-Ciocalteu Reagen (FCR) dan metode peredaman 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

## 2. Metodologi Penelitian

### Bahan

Filtrat *Whey* tahu yang telah dipekatkan yang berasal dari pabrik tahu di kelurahan Beji kecamatan Ungaran Timur, susu kedelai "Bukit Sari", laktosa, BAL (*Bifidobacterium* dan *Lactobacillus acidophilus*), susu sapi segar yang berasal dari KUD Banyumanik, medium nutrient broth, bacto agar, akuades, ampisilin, tetrasiklin, DPPH, kuersetin, metanol, Folin-ciocalteu, asam galat, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, BSA, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*.

### Cara Kerja.

#### Penyiapan Starter BAL

Seratus mililiter BAL komersial yang diketahui mengandung *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacteria* diremajakan terlebih dahulu dalam 1 L susu sapi steril dan diinkubasi pada suhu 45°C [8] selama 4 jam. Sebanyak 10 mL hasil peremajaan ini ditambahkan ke dalam 200 mL susu kedelai steril yang telah ditambahkan laktosa sebanyak 0,5% dan diinkubasi pada suhu 45°C selama 4 jam. Hasil inkubasi BAL dalam susu kedelai ini digunakan untuk starter.

#### Fermentasi Susu Kedelai dan *Whey* Tahu

Susu kedelai dan *Whey* tahu steril masing-masing sebanyak 500 mL ditambahkan dengan laktosa masing-masing sebanyak 2,5 g. Sebanyak 25 mL starter BAL ditambahkan ke dalam masing-masing susu kedelai dan *Whey* tahu pada suhu 45°C. Selanjutnya dilakukan penginkubasian selama 7 jam pada suhu 45°C. Larutan ekstrak hasil fermentasi diperoleh dengan menyentrifus hasil fermentasi pada 5000rpm selama 30 menit.

#### Uji Antibakteri Ekstrak Hasil Fermentasi

Uji antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram dan metode perforasi. Metode difusi cakram yaitu dengan meletakkan cakram kertas yang telah direndam ekstrak hasil fermentasi susu kedelai dan *Whey* tahu oleh BAL masing-masing selama 15 menit ke dalam cawan petri berisi media NA dan bakteri uji. Metode perforasi yaitu dengan menuangkan 10µL ekstrak hasil fermentasi susu kedelai dan *Whey* tahu oleh BAL ke lubang sumur (diameter 6 mm) dalam cawan petri yang berisi media NA (tebal 5 mm) dan bakteri uji [6].

#### Uji Antioksidan Metode FCR

Penentuan aktivitas antioksidan metode FCR dilakukan dengan cara 0,2 mL larutan uji direaksikan dengan 15,8 mL akuades dan 1 mL reagen Folin-Ciocalteu, kemudian dikocok dan didiamkan selama 8 menit. Sebanyak 3 mL larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20% dalam akuades ditambahkan ke dalam larutan tersebut kemudian dikocok hingga larutan homogen dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Pengukuran absorbansi larutan dilakukan pada panjang gelombang 765 nm. Standar yang digunakan adalah asam galat

#### Uji Antioksidan Metode DPPH

Penentuan aktivitas antioksidan metode DPPH dilakukan dengan cara pembuatan variasi konsentrasi larutan uji 10, 30, 50, 70, dan 90 µg/mL. Sebanyak 0,2 mL masing-masing konsentrasi larutan uji ditempatkan dalam botol vial dan ditambahkan dengan 3,8 mL larutan DPPH 50 µM. Campuran dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit di ruangan gelap. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 515 nm. Sebagai standar digunakan kuersetin [9].

## 3. Hasil dan Pembahasan

#### Fermentasi Susu Kedelai dan *Whey* Tahu

Hasil pengamatan susu kedelai dan *Whey* tahu sesudah fermentasi pada susu kedelai berupa padatan berwarna putih dengan pH 5,4 sedangkan pada *Whey* tahu berupa campuran cairan dan padatan berwarna kuning keruh dengan pH 4,7. Menurut Tamime dan Robinson [10] katabolisme dari kultur starter BAL akan menghasilkan asam laktat yang menyebabkan penurunan pH sehingga terjadi koagulasi. Koagulasi pada susu kedelai menunjukkan tekstur yang kompak sedangkan koagulasi pada *Whey* tahu hanya menunjukkan peningkatan padatan yang bercampur dengan cairan. Hal ini terjadi karena protein susu kedelai lebih banyak daripada *Whey* tahu.

**Uji antibakteri**

Uji antibakteri dengan metode difusi cakram maupun metode perforasi memberikan hasil yang negatif seperti tampak pada tabel 1.

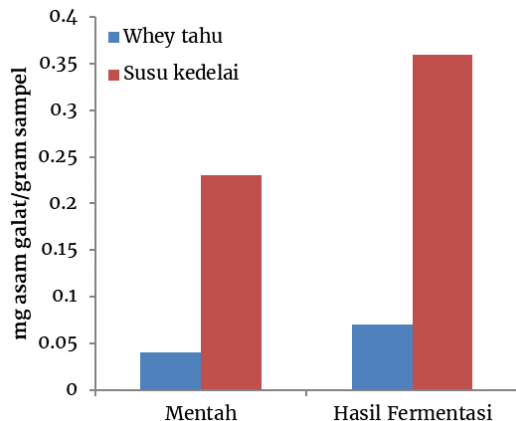
Tabel 1. Uji antibakteri

Bakteri Uji	Hasil Fermentasi	
	Susu kedelai	Whey tahu
<i>Escherichia coli</i>	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-

Dalam penelitian ini diperoleh hasil ekstrak hasil fermentasi susu kedelai dan *Whey* tahu dengan pH 5,4 dan pH 4,7 tidak memberikan penghambatan pertumbuhan *E. coli*, *S. aureus* dan *P. aeruginosa* karena pH nya masih diatas pH minimum bakteri tersebut. Jordan dkk. [11] menyatakan bahwa nilai pH minimum pertumbuhan *E. coli* adalah 4,3-4,4. *S. aureus* memiliki pH optimum 6-7 walaupun masih dapat tumbuh pada kisaran pH 4-10. Menurut Lambert dan Stratford [12] *P. aeruginosa* memiliki pH minimum 4,6. *Staphylococcus aureus* dan *P. aeruginosa* memiliki toleransi terhadap kisaran lingkungan yang luas. *P. aeruginosa* memiliki keragaman genetik yang tinggi dan memiliki plasmid yang mengkode enzim pada jalur metabolisme khusus, sehingga mampu beradaptasi pada kondisi lingkungan yang ekstrim, seperti pada medium yang cukup asam. *S. aureus* memiliki plasmid yang membawa gen untuk kekebalan terhadap senyawa antibakteri. pH kurang asam diperkirakan karena waktu fermentasi yang relatif singkat yaitu hanya 7 jam. Pada suhu 45°C cepat terjadi penggumpalan dalam waktu 7 jam namun diperkirakan belum mencapai tahap maksimal. Selain itu juga fermentasi oleh BAL pada suhu cukup tinggi yaitu 45°C diperkirakan pertumbuhan BAL belum mencapai fase stasioner sehingga belum memproduksi bakteriosin.

**Uji Antioksidan Metode FCR**

Kapasitas antioksidan FCR susu kedelai terukur tinggi seperti terlihat dalam gambar 1, karena susu kedelai diketahui merupakan suplemen makanan yang mengandung senyawa fenolik dan isoflavon. Senyawa fenolik dan isoflavon bersifat larut air sehingga mampu terukur dengan baik menggunakan metode FCR.

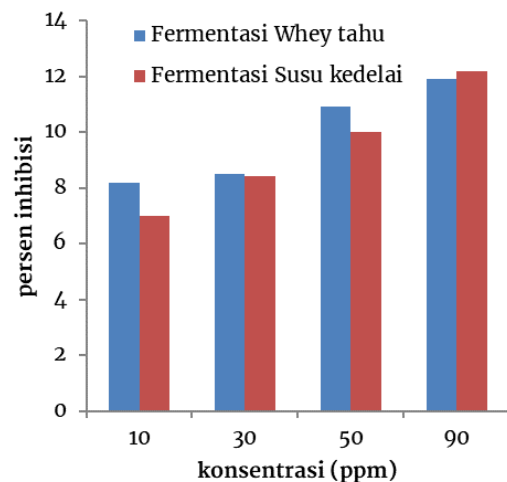


Gambar 1. Kapasitas antioksidan dengan metode FCR

*Whey* tahu memiliki kapasitas antioksidan 53,49% dari total kapasitas antioksidan susu kedelai serta ekstrak hasil fermentasi *Whey* tahu oleh BAL memiliki kapasitas antioksidan 57,14% dari total kapasitas antioksidan ekstrak hasil fermentasi susu kedelai oleh BAL. Hal ini membuktikan bahwa *Whey* tahu dan ekstrak hasil fermentasi *Whey* tahu oleh BAL berpotensi sebagai antioksidan. *Whey* tahu merupakan produk samping dari pembuatan tahu yang diketahui mengandung isoflavon yaitu anggota flavonoid yang mengandung senyawa polifenol.

**Uji Antioksidan metode peredaman DPPH**

Gambar 2 menunjukkan perbandingan persentase inhibisi susu kedelai dan *Whey* tahu serta ekstrak hasil fermentasi susu kedelai dan *Whey* tahu oleh BAL. Persentase inhibisi dalam tiap sampel dengan konsentrasi yang sama menunjukkan rata-rata persentase inhibisi *Whey* tahu lebih besar dibandingkan dengan susu kedelai serta ekstrak hasil fermentasi *Whey* tahu lebih besar dibandingkan ekstrak hasil fermentasi susu kedelai.



Gambar 1. Kapasitas antioksidan dengan metode peredaman DPPH

Penghambatan radikal DPPH terbesar yaitu pada konsentrasi 90 ppm. Susu kedelai dan *Whey* tahu pada konsentrasi 90 ppm masing-masing mampu menghambat radikal bebas DPPH sebesar 23,16% dan 19,26%. Ekstrak hasil fermentasi susu kedelai dan *Whey* tahu pada konsentrasi 90 ppm masing-masing mampu menghambat radikal bebas DPPH sebesar 12,53% dan 11,46% sehingga berpotensi sebagai antioksidan

**4. Kesimpulan**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Fermentasi susu kedelai dan *Whey* tahu oleh bakteri asam laktat pada suhu 45°C selama 7 jam menghasilkan asam-asam organik yang menyebabkan susu kedelai mengalami koagulasi membentuk padatan berwarna putih dan *Whey* tahu

membentuk padatan bercampur cairan berwarna kuning keruh serta ditandai penurunan pH

164 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00646.x>

2. Ekstrak hasil fermentasi susu kedelai dan Whey tahu tidak memberikan terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*
3. Ekstrak hasil fermentasi susu kedelai dan Whey tahu berpotensi sebagai antioksidan

## 5. Daftar Pustaka

- [1] W. Ben Ounis, C. P. Champagne, J. Makhlof, L. Bazinet, Utilization of tofu whey pre-treated by electromembrane process as a growth medium for *Lactobacillus plantarum* LB17, *Desalination*, 229, 1, (2008) 192-203  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2007.08.019>
- [2] Lê Nguyen Thi, Claude P. Champagne, Byong H. Lee, Jacques Goulet, Growth of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* on tofu whey, *International Journal of Food Microbiology*, 89, 1, (2003) 67-75  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00109-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00109-0)
- [3] Eni Harmayani, Endang S. Rahayu, Titiek F. Djaafar, Citra Argaka Sari, Tri Marwati, Pemanfaatan Kultur *Pediococcus Acidilactici* F-11 Penghasil Bakteriosin Sebagai Penggumpal pada Pembuatan Tahu, *Jurnal Pascapanen*, 6, 1, (2009) 10-20
- [4] J. R. Tagg, A. S. Dajani, L. W. Wannamaker, Bacteriocins of gram-positive bacteria, *Bacteriological Reviews*, 40, 3, (1976) 722-756
- [5] Todd R. Klaenhammer, Bacteriocins of lactic acid bacteria, *Biochimie*, 70, 3, (1988) 337-349  
[http://dx.doi.org/10.1016/0300-9084\(88\)90206-4](http://dx.doi.org/10.1016/0300-9084(88)90206-4)
- [6] Jetty Nurhajati, Chrysanti, Ida Indrawati, Novi Syaftika, Antibacterial Activity of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* Soygurt Cultures, 3rd ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology, Thailand, (2008).
- [7] Issoufou Amadou, Olasunkanmi S. Gbadamosi, Yong Hui Shi, Mohamed T. Kamara, Sun Jin, Guo-Wei Le, Identification of Antioxidative Peptides from *Lactobacillus plantarum* Lp6 Fermented Soybean Protein Meal, *Research Journal of Microbiology*, 5, 5, (2010) 372-380  
<http://dx.doi.org/10.3923/jm.2010.372.380>
- [8] Marman Wahyudi, Proses pembuatan dan analisis mutu yoghurt, *Buletin Teknik Pertanian*, 11, 1, (2006) 12-16
- [9] Philip Molyneux, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 2, (2004) 211-219
- [10] Adnan Y Tamime, Richard Kenneth Robinson, *Yoghurt: science and technology*, Woodhead Publishing, 1999.
- [11] Kieran N. Jordan, Lynn Oxford, Conor P. O'Byrne, Survival of Low-pH Stress by *Escherichia coli* O157:H7: Correlation between Alterations in the Cell Envelope and Increased Acid Tolerance, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 7, (1999) 3048-3055
- [12] R. J. Lambert, M. Stratford, Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response, *Journal of Applied Microbiology*, 86, 1, (1999) 157-