



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SUSU KEDELAI HASIL FERMENTASI
OLEH *Lactobacillus casei* DAN *Lactococcus lactis***

SKRIPSI

Oleh

**Eriani Eleganty
NIM 111810401007**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2016**



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SUSU KEDELAI HASIL FERMENTASI
OLEH *Lactobacillus casei* DAN *Lactococcus lactis***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Ilmu Biologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

**Eriani Eleganty
NIM 111810401007**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2016**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. kedua orang tua saya, Ibunda Eri Binari dan Ayahanda Achmad Yani, atas segala dukungan dan doa yang terus terpanjat dalam setiap sujudnya;
2. kedua saudara saya Prima Dananjaya dan Lalena Ramadhani, atas dukungan dan motivasinya;
3. guru-guru dan dosen-dosen sejak sekolah dasar hingga perguruan tinggi, atas bimbingannya;
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTTO

“Hanya dia yang mempunyai keberanian yang sesungguhnya. yang mampu menanggung beban dari pengalaman yang seburuk-buruknya yang bisa dialami manusia dengan sikap bijaksana”
(William Shakespeare)^{*)}

“Ada kearifan pikiran dan ada kearifan hati”
(Charles Dickens)^{**)}

“Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan, sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (dari suatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain, dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap.”
(Surah Al-Insyirah (94): 5-8)^{***)}

^{*)} The World's Poetry Archive. 2012. *William Shakespeare Poems*. PoemHunter.Com-The World's Poetry Archive.

^{**)} Dalmane, Razak. 1994. A Mere Question of Figures: Measures, Mystery, and Metaphor in Hard Times. *Dickens Studies Annual : Essay on Victorian Fiction* 23: 62-137.

^{***)} Departemen Agama Republik Indonesia. 1987. *Terjemahan dan Tafsir Al Qur'an*. Medinah Munawwarah: Mujamma' Khadim al Haramain asy Syarifain Fahd ibn 'Abd al 'Aziz Al Sa'ud.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Eriani Eleganty

NIM : 111810401007

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Aktivitas Antioksidan Susu Kedelai Hasil Fermentasi Oleh *Lactobacillus casei*. Dan *Lactococcus lactis*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini merupakan proyek penelitian yang dibiayai oleh Esti Utarti, S.P., M.Si. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 30 Mei 2016

Yang menyatakan,

Eriani Eleganty

NIM 111810401007

SKRIPSI

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SUSU KEDELAI HASIL FERMENTASI
OLEH *Lactobacillus casei* DAN *Lactococcus lactis***

Oleh

Eriani Eleganty

NIM 111810401007

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Drs. Siswanto, M.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : Kahar Muzakhar, S.Si., Ph.D.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Aktivitas Antioksidan Susu Kedelai Hasil Fermentasi Oleh *Lactobacillus casei* Dan *Lactococcus lactis*” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas
Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Drs. Siswanto, M.Si.
NIP. 196012161993021001

Anggota I,

Drs. Rudju Winarsa, M.Kes.
NIP. 19600816119890210001

Sekretaris,

Kahar Muzakhar, S.Si., Ph.D.
NIP. 196805031994011001

Anggota II,

Dra. Mahriani, M.Si.
NIP. 195703151987022001

Mengesahkan
Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D.
NIP. 196102041987111001

RINGKASAN

Aktivitas Antioksidan Susu Kedelai Hasil Fermentasi Oleh *Lactobacillus casei* Dan *Lactococcus lactis*”; Eriani Eleganty; 111810401007; 2016; 46 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Di dalam tubuh radikal bebas terbentuk sebagai hasil dari proses metabolisme sel. Radikal bebas dapat berasal dari dalam (endogen) maupun luar tubuh (eksogen). Sistem pertahanan tubuh secara alami menghasilkan senyawa antioksidan endogen intrasel berupa enzim-enzim seperti superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT) dan glutathion peroksidase (GPX) untuk mengimbangi terbentuknya radikal bebas, sehingga mencegah timbulnya efek negatif dari radikal bebas (Sanmugapriya dan Venkataraman, 2006). Peningkatan jumlah radikal bebas dalam tubuh yang tidak diimbangi dengan jumlah antioksidan endogenous akan mengakibatkan terjadinya tekanan oksidatif sehingga dapat menyebabkan penyakit degeneratif (Nurrahman *et al.*, 2012).

Salah satu cara yang dilakukan untuk mengatasi tekanan oksidatif adalah dengan menggunakan antioksidan eksogenous yang diaplikasikan melalui bahan makanan. Menurut Saija *et al.*, (1995), salah satu bahan pangan yang menghasilkan antioksidan alami adalah kedelai. Sumber antioksidan terbesar dalam kedelai adalah isoflavon dan tokoferol (Vitamin E) (Borodin *et al.*, 2011).

Kedelai serta olahannya telah banyak dikonsumsi oleh masyarakat, salah satunya adalah susu kedelai. Menurut *Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Food* (2002), susu kedelai memiliki kandungan total isoflavon yang cukup besar yaitu 9,56 mg/100gr, sedangkan tokoferol yang merupakan antioksidan terbesar setelah isoflavon menurut Borodin *et al.*, (2011), memiliki kandungan sebesar 21 µg/g.

Pada penelitian sebelumnya oleh Wang *et al.*, (2006), menemukan bahwa pada susu kedelai yang difermentasi oleh BAL *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacteria longum* menghasilkan aktivitas antioksidan yang tinggi. Menurut

Gilliand (1989), BAL diklasifikasikan sebagai GRAS (*Generally Regocnized as Safe*) untuk digunakan sebagai bahan tambahan pada makanan oleh US FDA (*Food and Drug Administration*). BAL penting dalam industri makanan dan digunakan sebagai starter pada berbagai proses fermentasi (Piekarczyk, 2013). *Lactobacillus casei* dan *Lactococcus lactis* adalah jenis BAL yang sering digunakan dalam proses fermentasi makanan. Proses fermentasi oleh BAL diharapkan dapat meningkatkan kadar antioksidan eksogenous dalam susu kedelai. Melalui penelitian ini, maka diharapkan susu kedelai yang difermentasi menggunakan Bakteri Asam Laktat (BAL) *L. casei* dan *Lac. lactis* dapat meningkatkan kandungan antioksidan eksogenous sebagai sumber antioksidan alami.

Prosedur dalam penelitian ini diawali dengan pembuatan kurva pertumbuhan BAL *L. casei*. dan *Lac. lactis* untuk menentukan fase logaritmik atau fase eksponensial. Kemudian dilanjutkan dengan pembuatan starter BAL yang digunakan untuk fermentasi susu kedelai. Susu kedelai yang telah difermentasi selanjutnya diekstraksi dan diuji *scavenging* radikal bebas dengan metode DPPH.

Hasi penelitian menunjukkan bahwa susu kedelai yang difermentasi dengan BAL dapat meningkatkan kadar antioksidan eksogenous. Aktivitas penangkapan radikal bebas oleh *Lac. lactis* selama waktu fermentasi 24 jam sebesar 15% dan mengalami peningkatan menjadi 35% untuk waktu fermentasi 48 jam. Sementara itu, aktivitas penangkapan radikal susu kedelai hasil fermentasi *L. casei* selama 24 jam sebesar 21% dan mengalami penurunan menjadi 11% dengan lama fermentasi 48 jam. Susu kedelai hasil fermentasi oleh campuran BAL *L. casei* dan *Lac. lactis* memiliki aktivitas antioksidan tertinggi yaitu pada lama fermentasi 48 jam penangkapan radikal bebas sebesar 58% sedangkan pada lama fermentasi 24 jam aktivitas penangkapan radikal bebas sebesar 42%.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT, yang telah memberikan limpahan rahmat, nikmat serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aktivitas Antioksidan Susu Kedelai Hasil Fermentasi Oleh *Lactobacillus casei* Dan *Lactococcus lactis*” Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu prasyarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bimbingan, bantuan, dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Drs. Siswanto, M.Si. selaku dosen pembimbing utama yang dengan penuh kesabaran telah meluangkan waktu, pikiran, saran serta motivasi dalam penyusunan skripsi ini;
2. Kahar Muzakhar, S.Si., Ph.D. selaku dosen pembimbing anggota yang telah memberikan bimbingan dan saran dalam penyusunan skripsi ini;
3. Drs. Rudju Winarsa, M.Kes. selaku dosen penguji yang telah memberikan banyak kritik dan saran yang sangat membangun dalam penyusunan skripsi ini;
4. Dra. Mahriani, M.Si. selaku dosen penguji dan dosen pembimbing akademik yang dengan penuh kesabaran telah meluangkan waktu, memberikan motivasi dan semangat yang tiada hentinya serta memberikan banyak kritik dan saran yang sangat membangun dalam penyusunan skripsi ini;
5. Esti Utarti, S.P., M.Si. selaku pemilik proyek, terima kasih telah mengizinkan penulis bergabung dalam proyek penelitian. Terima kasih pula atas saran, dukungan, dan motivasi yang sangat membangun skripsi ini;

6. bapak dan ibu dosen serta seluruh staf di lingkungan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember, atas segala ketulusan dan keikhlasannya dalam membantu selama masa perkuliahan;
7. ibunda Eri Binari, Ayahanda Achmad Yani, kakakku Prima Dananjaya dan adikku Lalena Ramadhani, yang telah memberikan semangat dan doa serta dukungan hingga terselesaikannya skripsi ini;
8. rekan seperjuangan dan berbagi pendapat, Okky Rofiqoh dan Siti Nur Halimah, terima kasih atas segala dukungan, motivasi serta bantuannya selama ini;
9. teman-teman Biologi 2011 yang tergabung dalam “Amphibi”, Yuvi Yuanditra, Izzay Afkarina, Ika Novitasari, Zakiyatul Khoiriyah, Suci Ummi R.Q., dan yang lainnya, terimakasih atas keceriaan, motivasi dan dukungannya selama ini;
10. serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 30 Mei 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Masalah	2
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Antioksidan dan Radikal Bebas	4
2.1.1 Antioksidan	4
2.1.2 Radikal Bebas.....	6
2.2 Kandungan Susu Kedelai	8
2.3 Bakteri Asam Laktat	15
2.3.1 <i>Lactobacillus casei</i>	17
2.3.2 <i>Lactococcus lactis</i>	18
BAB 3. METODE PENELITIAN	19
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.2 Alat dan Bahan.....	19

3.3	Prosedur Penelitian	19
3.3.1	Pembuatan Kurva Pertumbuhan BAL <i>Lactobacillus casei</i> dan <i>Lactococcus lactis</i>	19
3.3.2	Pembuatan starter <i>Lactobacillus casei</i> dan <i>Lactococcus lactis</i>	20
3.3.4	Fermentasi Susu Kedelai dengan Isolat BAL	21
3.3.5	Ekstraksi dan Preparasi Sampel	21
3.3.6	Uji Scavenging Radikal Bebas dengan Metode DPPH.....	21
3.4	Analisis Data.....	22
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	23
4.1	Pola Pertumbuhan <i>Lactobacillus casei</i> dan <i>Lactococcus lactis</i>	23
4.2	Susu Kedelai Hasil Fermentasi oleh <i>Lactobacillus casei</i> dan <i>Lactococcus lactis</i>	25
4.3	Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas dengan Metode DPPH.....	26
BAB 5.	PENUTUP	32
5.1	Kesimpulan	32
5.2	Saran	32
DAFTAR PUSTAKA.....		33
LAMPIRAN.....		40

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1.1. Kandungan Antioksidan Kedelai dan Hasil Olahannya.....	8
Tabel 1.2 Komposisi Susu Kedelai, Susu Sapi, dan Air Susu Ibu per 100 gram....	9



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Biosintesis Isoflavon	11
Gambar 2.2 Struktur Kimia Senyawa Genistin, Glisitin dan Daidzin.....	12
Gambar 2.3 Struktur Kimia Senyawa Isoflavon Aglikon.....	13
Gambar 2.4 Struktur tokoferol	14
Gambar 2.5 Jalur Homofermentatif	16
Gambar 2.6 Jalur Heterofermentatif	17
Gambar 4.1 Pola Pertumbuhan <i>Lactobacillus casei</i>	23
Gambar 4.2 Pola Pertumbuhan <i>Lactococcus lactis</i>	24
Gambar 4.3 Hasil <i>freeze drying</i> susu kedelai	26
Gambar 4.4 Reaksi DPPH dengan antioksidan	27
Gambar 4.5 Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH	28

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Alur Penelitian	40
B. Komposisi Bahan.....	41
C. Hasil Perhitungan Pembuatan Kurva Pertumbuhan.....	41
C.1 Hasil Perhitungan Kurva Pertumbuhan <i>Lactobacillus casei</i>	41
C.2 Hasil Perhitungan Kurva Pertumbuhan <i>Lactococcus lactis</i>	42
D. Perhitungan % Inhibisi Radikal DPPH	42
E. Susu Kedelai Hasil Fermentasi oleh <i>Lactobacillus casei</i> dan <i>Lactococcus lactis</i>	43
F. Kurva Pertumbuhan BAL dalam Media Susu kedelai	43
F.1 Kurva Pertumbuhan <i>Lactobacillus casei</i> dalam Media Susu Kedelai.....	43
F.2 Hasil Perhitungan Kurva Pertumbuhan <i>Lactobacillus casei</i> dalam Media Susu Kedelai.....	44
F.3 Kurva Pertumbuhan <i>Lactococcus lactis</i> dalam Media Susu Kedelai...	44
F.4 Hasil Perhitungan Kurva Pertumbuhan <i>Lactococcus lactis</i> dalam Media Susu Kedelai.....	45
F.5 Kurva Pertumbuhan Campuran <i>Lactobacillus casei</i> dan <i>Lactococcus lactis</i> dalam Media Susu Kedelai.....	45
F.6 Hasil Perhitungan Kurva Pertumbuhan Campuran <i>Lactobacillus casei</i> dan <i>Lactococcus lactis</i> dalam Media Susu Kedelai.....	46

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Di dalam tubuh radikal bebas terbentuk sebagai hasil dari proses metabolisme sel. Radikal bebas dapat berasal dari dalam (endogen) maupun luar tubuh (eksogen). Sistem pertahanan tubuh secara alami menghasilkan senyawa antioksidan endogen intrasel berupa enzim-enzim seperti superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT) dan glutathion peroksidase (GPX) untuk mengimbangi terbentuknya radikal bebas, sehingga mencegah timbulnya efek negatif dari radikal bebas (Sanmugapriya dan Venkataraman, 2006).

Peningkatan jumlah radikal bebas dalam tubuh yang tidak diimbangi dengan jumlah antioksidan endogenous akan mengakibatkan terjadinya tekanan oksidatif yang dapat menyebabkan penyakit degeneratif seperti Alzheimer, Parkinson, Aterosklerosis, Kanker, dan penuaan dini (Nurrahman *et al.*, 2012). Salah satu cara yang dilakukan untuk mengatasi tekanan oksidatif adalah dengan menggunakan antioksidan eksogenous yang diaplikasikan melalui bahan makanan. Menurut Saija *et al.*, (1995), salah satu bahan pangan yang menghasilkan antioksidan alami adalah kedelai. Kedelai memiliki komponen penting berupa senyawa bioaktif yang bertindak sebagai antioksidan yaitu isoflavon (Zubik dan Meydani, 2003) sedangkan menurut Borodin *et al.*, (2011), sumber antioksidan terbesar dalam kedelai adalah isoflavon dan tokoferol (Vitamin E).

Kedelai serta olahannya telah banyak dikonsumsi oleh masyarakat, salah satunya adalah susu kedelai. Selain memiliki kandungan protein yang tinggi, komposisi susu kedelai hampir sama dengan susu hewani dan harganya lebih terjangkau. Menurut USDA *Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Food* (2002), susu kedelai memiliki kandungan total isoflavon yang cukup besar yaitu 9,56 mg/100gr, sedangkan tokoferol yang merupakan antioksidan terbesar setelah isoflavon menurut Borodin *et al.*, (2011), memiliki kandungan sebesar 21 µg/g.

Pada penelitian sebelumnya oleh Wang *et al.*, (2006), menemukan bahwa pada susu kedelai yang difermentasi oleh BAL *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacteria longum* menghasilkan aktivitas antioksidan yang tinggi. Proses fermentasi oleh BAL diharapkan dapat meningkatkan kadar antioksidan eksogenous dalam susu kedelai. Menurut (Gyorgy *et al.*, 1964) proses fermentasi mengakibatkan senyawa isoflavon sebagai antioksidan akan terhidrolisis menjadi senyawa isoflavon bebas yang disebut aglikon sehingga lebih mudah dicerna dan lebih tinggi aktivitasnya.

Menurut Gilliland (1989), BAL diklasifikasikan sebagai GRAS (*Generally Recognized as Safe*) untuk digunakan sebagai bahan tambahan pada makanan oleh US FDA (*Food and Drug Administration*). BAL penting dalam industri makanan dan digunakan sebagai starter pada berbagai proses fermentasi makanan (Piekarczyk, 2013). *Lactobacillus casei* dan *Lactococcus lactis* adalah jenis BAL yang sering digunakan dalam proses fermentasi makanan. Menurut Sun *et al.*, (2014), *L. casei* dan *Lac. lactis* memiliki perbedaan dalam jalur fermentasinya, *L. casei* termasuk ke dalam BAL fakultatif heterofermentatif sedangkan *Lac. lactis* merupakan BAL homofermentatif. Klasifikasi ini berdasarkan pada produk yang dihasilkan selama fermentasi. BAL homofermentatif mengubah glukosa menjadi satu produk berupa asam laktat sedangkan BAL heterofermentatif mengubah glukosa menjadi asam laktat dan produk lain. Melalui penelitian ini, maka diharapkan susu kedelai yang difermentasi menggunakan Bakteri Asam Laktat (BAL) *L. casei* dan *Lac. lactis* dapat meningkatkan kandungan antioksidan eksogenous sebagai sumber antioksidan alami.

1.2 Rumusan Masalah

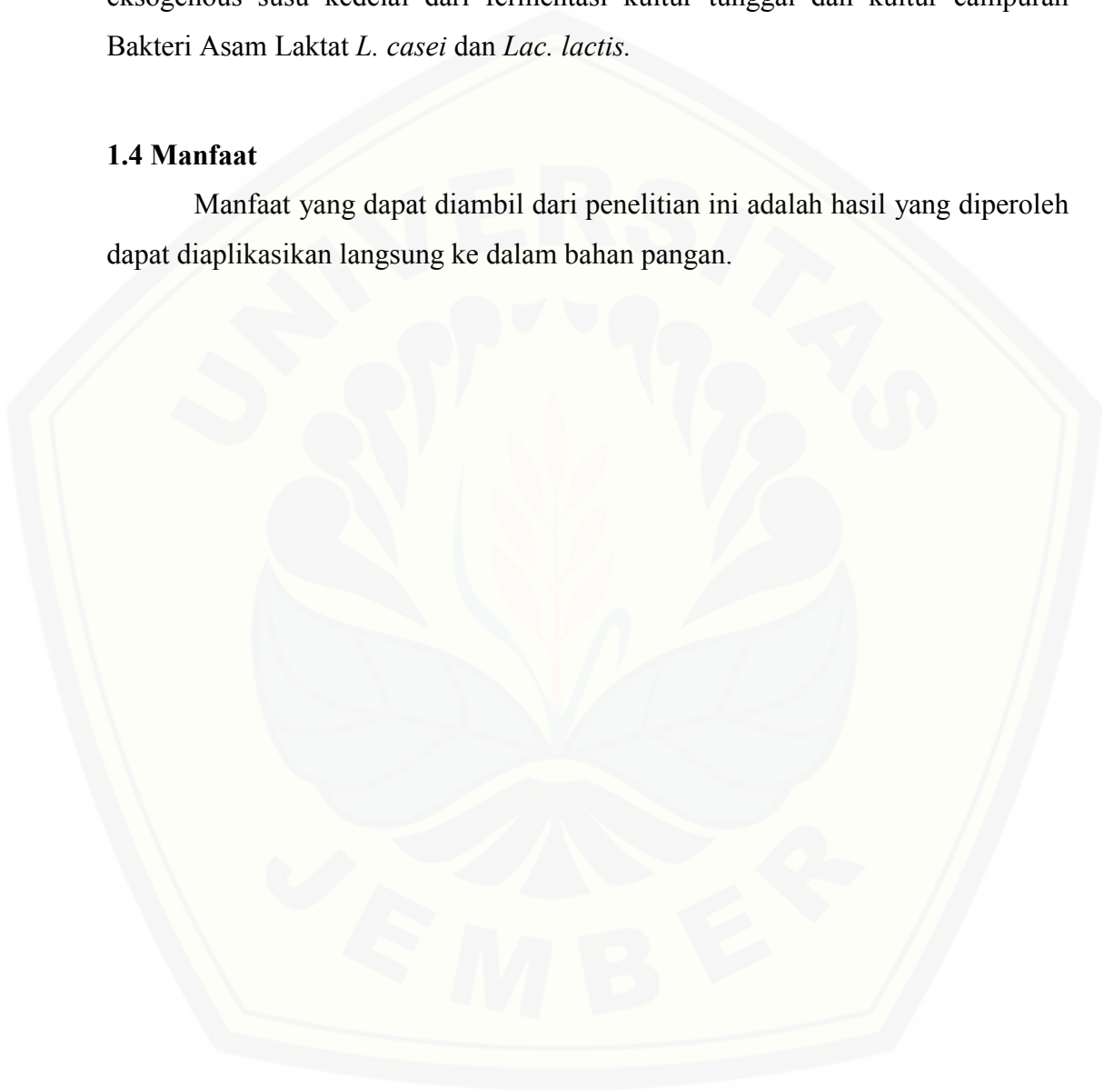
Berdasarkan latar belakang di atas maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah: Apakah fermentasi susu kedelai dari kultur tunggal dan kultur campuran Bakteri Asam Laktat *L. casei* dan *Lac. lactis* dapat meningkatkan kadar antioksidan eksogenous dalam susu kedelai?

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan eksogenous susu kedelai dari fermentasi kultur tunggal dan kultur campuran Bakteri Asam Laktat *L. casei* dan *Lac. lactis*.

1.4 Manfaat

Manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah hasil yang diperoleh dapat diaplikasikan langsung ke dalam bahan pangan.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Antioksidan dan Radikal Bebas

2.1.1 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang berfungsi untuk melindungi tubuh dari serangan radikal bebas. Antioksidan merupakan suatu sistem pertahanan tubuh untuk menangkal serangan radikal bebas atau oksidan sehingga dapat membatasi kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas. Sistem pertahanan antioksidan ini antara lain adalah enzim *Superoxide Dismutase* (SOD) yang terdapat di mitokondria dan sitosol, *Glutathione Peroxidase* (GPX), dan katalase (CAT). Selain itu terdapat juga sistem pertahanan antioksidan yang berupa mikronutrien yaitu β -karoten, vitamin C dan vitamin E (Hariyatmi, 2004).

Antioksidan bekerja dalam tubuh dengan beberapa cara antara lain berinteraksi langsung dengan radikal bebas, oksidan, dan oksigen tunggal, mencegah pembentukan senyawa oksigen reaktif, atau mengubah senyawa reaktif menjadi kurang reaktif. Antioksidan bisa didapatkan melalui dua cara yaitu dari luar tubuh (eksogen) dan dari dalam tubuh (endogen). Antioksidan eksogen adalah antioksidan yang berasal dari konsumsi makanan dan minuman yang mengandung vitamin C dan E, maupun antioksidan sintetik seperti *Butylatet Hydroxytoluen* (BHT), sedangkan contoh antioksidan endogen adalah enzim *Superoxide Dismutase* (SOD), *Glutathione Peroxidase* (GPX), dan katalase (CAT) (Winarsi, 2007).

Selain itu, menurut Kumalaningsih (2007), berdasarkan fungsinya terdapat lima jenis antioksidan yaitu:

a. Antioksidan primer

Antioksidan ini mampu mengurangi pembentukan radikal bebas baru dengan cara memutus reaksi berantai dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil. Contohnya adalah superoksida dismutase (SOD), glutathion

peroksidase, dan katalase yang dapat mengubah radikal superoksida menjadi molekul air.

b. Antioksidan sekunder

Antioksidan sekunder merupakan senyawa yang berfungsi menangkap radikal bebas serta mencegah terjadinya reaksi berantai sehingga tidak terjadi kerusakan. Beberapa contohnya adalah vitamin A (betakaroten), vitamin C, vitamin E, dan senyawa fitokimia.

c. Antioksidan tersier

Antioksidan tersier berperan dalam memperbaiki kerusakan sel-sel dan jaringan yang rusak karena serangan radikal bebas. Contoh antioksidan tersier adalah enzim metionin sulfoksidan reduktase yang dapat memperbaiki DNA dalam inti sel.

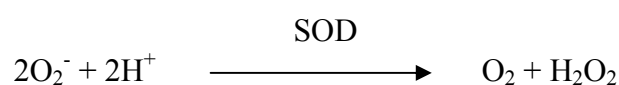
d. Oxygen Scavenger

Antioksidan yang termasuk oxygen scavenger berperan dalam mengikat oksigen sehingga tidak mendukung reaksi oksidasi, contohnya vitamin C.

e. Chelators atau Sequestrants

Senyawa ini dapat mengikat logam sehingga logam tersebut tidak dapat mengkatalis reaksi oksidasi. Contohnya adalah asam sitrat dan asam amino.

Menurut Astuti (2008), sistem pertahanan alami tubuh terhadap radikal bebas yaitu antioksidan endogen yang terdiri atas enzim-enzim seperti enzim superoksida dismutase (SOD), glutation peroksidase dan katalase yang berperan dalam menghambat reaksi oksidasi. Enzim superoksida dismutase (SOD) mengkatalis perubahan radikal superoksida menjadi molekul hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen (O_2) dan molekul oksigen yang kemudian hidrogen peroksida akan diubah menjadi air oleh enzim katalase (CAT) dan glutation peroksidase dengan reaksi sebagai berikut:



Enzim SOD berada di mitokondria dalam bentuk Mn-SOD dan Cu-Zn SOD. Enzim SOD bekerja dengan menghambat simultan dari O_2 dan H_2O_2 yang berasal dari pembentukan radikal hidroksi ($*OH$) (Astuti, 2008).

Sementara itu, mekanisme kerja enzim katalase yang terdapat pada peroksisom dan glutathion peroksidase yaitu dengan mengubah hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air (H_2O) sebagai berikut:



Enzim glutathion peroksidase merupakan enzim yang mempunyai selenium (Se) pada sisi aktifnya. Enzim ini mengkatalis reduksi hidrogen peroksida dan lemak peroksida dengan menggunakan glutathion tereduksi sebagai kofaktor (Astuti, 2008).

2.1.2 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah molekul yang mengandung satu elektron tidak berpasangan pada orbit terluarnya. Adanya elektron tidak berpasangan ini menyebabkan radikal bebas secara kimiawi menjadi sangat aktif. Radikal bebas dapat bermuatan positif (kation), negatif (anion), atau tidak bermuatan (Haliwell and Gutteridge, 1990). Radikal bebas memerlukan elektron yang berasal dari pasangan elektron di sekitarnya agar menjadi stabil, sehingga terjadi perpindahan elektron dari molekul donor ke molekul radikal. Akibat reaksi tersebut, molekul donor menjadi radikal baru yang tidak stabil dan menimbulkan reaksi berantai yang akan menimbulkan kerusakan dan menjadi penyebab berbagai penyakit (Simanjuntak, 2004).

Radikal bebas dapat berasal dari luar tubuh (eksogen) atau terbentuk di dalam tubuh (endogen) yaitu hasil metabolisme. Sumber radikal bebas dari luar tubuh berasal dari polutan, makanan dan minuman, radiasi serta pestisida. Sementara itu, senyawa radikal dari dalam dapat timbul melalui beberapa macam mekanisme seperti autooksidasi, aktivitas oksidasi dan sistem transpor elektron.

Menurut Madhavi *et al.*, (1996), radikal bebas diproduksi terus menerus dalam sel di sistem transpor elektron mitokondria, membran plasma, sitosol, retikulum endoplasma, dan peroksisom. Senyawa radikal yang terbentuk selanjutnya menjadi inisiator pada proses peroksidasi lipid yang menimbulkan kerusakan jaringan tubuh.

Radikal bebas dapat berasal dari proses metabolisme dalam tubuh (internal) dan dari luar tubuh (eksternal). Sumber radikal bebas dari dalam tubuh mencakup superoksida, hidroksil, peroksil, hidrogen peroksida (H_2O_2), singlet oksigen, oksida nitrit dan peroksinitrit. Sumber radikal dari luar tubuh berasal dari asap rokok, polusi, radiasi, sinar UV, obat, pestisida, limbah industri dan ozon (Punchard dan Kelly, 1996).

Salah satu senyawa yang erat kaitannya dengan radikal bebas adalah oksigen. Oksigen sangat berperan dalam tubuh, namun juga merupakan awal dari terbentuknya radikal bebas yang dikenal dengan nama *Reactive Oxygen Species* (ROS). Beberapa ROS yang dapat merugikan tubuh adalah anion superoksida, radikal hidroksil, hidrogen peroksida, oksigen tunggal, dan lain-lain (Prakash *et al.*, 2001)

Keberadaan ROS yang berlebihan akan menyebabkan tekanan oksidatif. Pada kondisi tekanan oksidatif, kemampuan antioksidan untuk mengeliminasi radikal bebas mengalami gangguan sehingga menggoyahkan rantai reduksi-oksidasi normal. Selain itu, tekanan oksidatif akan menimbulkan reaksi dalam tubuh yaitu merusak sel, jaringan dan organ yang dapat memicu kanker, inflamasi, arterosklerosis, rematik, jantung koroner, katarak dan penyakit degeneratif lainnya (Nurrahman *et al.*, 2012). ROS menyebabkan kerusakan terhadap berbagai unsur penting dalam tubuh. ROS menyerang dan merusak rantai asam lemak tak jenuh yang merupakan komponen penting dari membran fosfolipid mitokondria, dan lisosom. Selain itu ROS mengakibatkan kerusakan serta inaktivasi reseptor, enzim dan sebagainya (Windono, 2001).

2.2 Kandungan Susu Kedelai

Kedelai merupakan sumber protein nabati utama yang baik untuk tubuh. Pada umumnya hasil olahan kedelai memiliki kandungan gizi tinggi, mengandung protein yang mudah dicerna dan mempunyai nilai Protein Efisiensi Rasio (PER) yang hampir sama dengan protein hewani.

Kandungan antioksidan pada kedelai yang sering dijumpai adalah isoflavon, vitamin E (tokoferol), vitamin C (asam askorbat) dan beberapa komponen lain (Borodin *et al.*, 2001). Kedelai yang mengalami proses pengolahan menjadi bahan makanan lain, kandungan antioksidan dalam kedelai dapat berubah bergantung pada proses pengolahannya (Xu *et al.*, 2010), cara penyimpanan (Rau De Almeida Callou, 2010) dan perbedaan kandungan antioksidan awal yang dimiliki masing-masing jenis kedelai (Anderson dan Wolf, 1995). Perbedaan kandungan antioksidan pada kedelai dan hasil olahannya dapat dilihat pada Tabel 1.1.

Tabel 1.1. Kandungan Antioksidan Kedelai dan Hasil Olahannya

Kedelai dan Hasil Olahannya	Isoflavon	Tokoferol	B-Karoten µg/g, µg/ml	Asam Askorbat µg/g, µg/ml
	µg/g, µg/ml	µg/g, µg/ml		
Kedelai	580-3800	380	19	70
Tepung Kedelai (Full fat)	580-3800	370	13	97
Tepung Kedelai (Lipoxygenase)	580-3800	310	15	101
Tepung Kedelai (Semi fat)	370-2500	265	10	110
Susu Kedelai	30-175	21	-	15
Tofu	-	124	-	51,7

Sumber: Borodin *et al.*, 2011

Susu kedelai merupakan salah satu produk olahan kedelai yang dapat digunakan sebagai alternatif pengganti susu sapi karena mengandung gizi yang hampir sama dengan harga yang lebih murah. Menurut Chen *et al.*, (2010), kandungan protein susu kedelai mencapai 1,5 kali protein susu sapi. Selain itu,

susu kedelai juga mengandung lemak karbohidrat, kalsium, fosfor, zat besi, vitamin A, vitamin B1, vitamin B2, dan isoflavon. Kandungan asam lemak tak jenuh pada susu kedelai lebih besar serta tidak mengandung kolesterol sehingga akan mengurangi resiko penyakit jantung. Kelebihan susu kedelai yang lain adalah tidak mengandung laktosa sehingga susu ini cocok dikonsumsi oleh penderita intoleransi laktosa. Perbandingan antara susu kedelai, susu sapi, dan air susu ibu (ASI) dapat dilihat pada Tabel 1.2.

Tabel 1.2 Komposisi Susu Kedelai, Susu Sapi, dan Air Susu Ibu per 100 gram

Komposisi	Susu Kedelai	Susu Sapi	ASI
Air (%)	88,6	88,6	88,6
Kalori (kkal)	52,99	58	62
Protein (%)	4,4	2,9	1,4
Karbohidrat (%)	3,8	4,5	7,2
Lemak (%)	2,5	0,3	3,1
Vit. B1 (%)	0,04	0,04	0,02
Vit. B2 (%)	0,02	0,15	0,03
Vit. A (%)	0,02	0,2	0,2
Kalsium (mg)	15	100	35
Fosfor (mg)	49	90	25
Natrium (mg)	2	16	15
Besi (mg)	1,2	0,1	0,2
Asam lemak jenuh (%)	40 -48	60 - 70	55,3
Asam lemak tidak jenuh (%)	52 – 60	30 - 40	44,7
Kolesterol (mg)	0	9,24 - 9,9	9,3 - 18,6

Sumber: Koswara, 2006

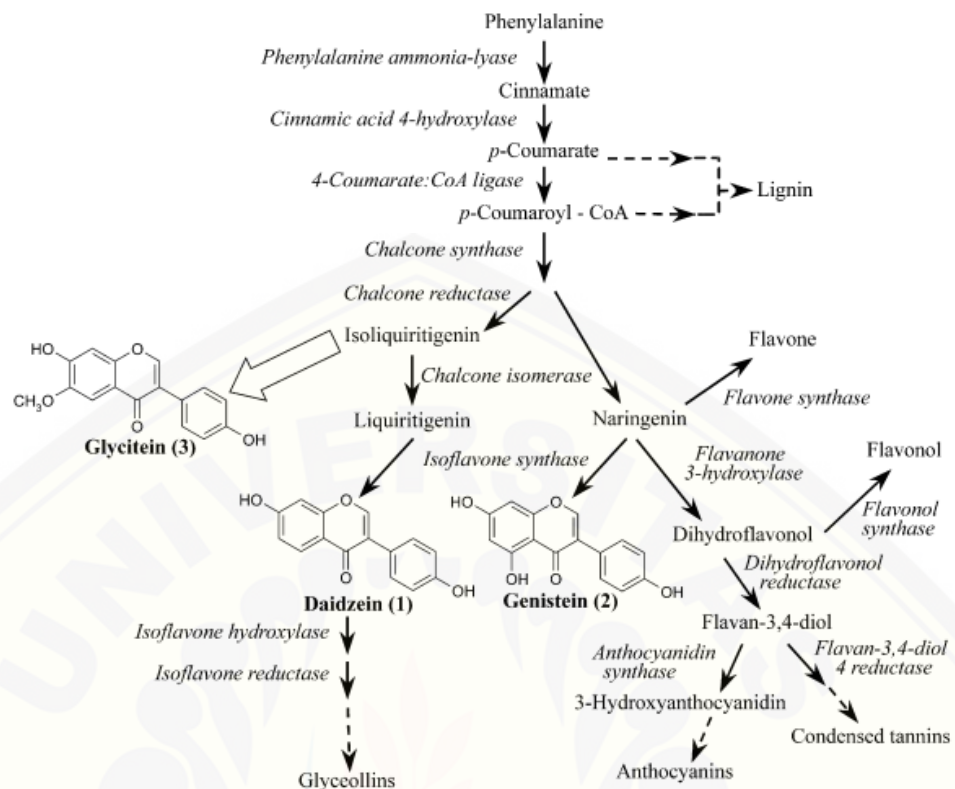
Susu kedelai merupakan salah satu pangan fungsional yang sangat digemari oleh masyarakat Indonesia. Susu kedelai dan produk berbasis kedelai lainnya merupakan sumber protein nabati yang baik, serat pangan, kandungan oligosakarida yang tinggi, memiliki kandungan vitamin dan mineral serta mampu menurunkan resiko penyakit jantung koroner, diabetes mellitus tipe 2, menurunkan resiko karsinogenesis, mengurangi gejala-gejala negatif akibat menopause dan meningkatkan kesehatan tulang (Chen *et al.*, 2010).

Sumber antioksidan terbesar dalam kedelai adalah isoflavon dan tokoferol (Vitamin E). Total kandungan isoflavon pada kedelai adalah sebesar 580-3800 µg/g dan 1,5-10 kali lipat lebih tinggi dari kandungan tokoferol. Sementara itu β-karoten (Vitamin A) dan asam askorbat (vitamin C) lebih rendah dibandingkan kandungan tokoferol sehingga hasil olahan kedelai bukan merupakan sumber Vitamin A dan Vitamin C untuk manusia (Borodin *et al.*, 2011).

Kandungan antioksidan terbesar dalam susu kedelai adalah isoflavon. Menurut USDA *Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Food* (2002), susu kedelai memiliki kandungan total isoflavon yang cukup besar yaitu 9,56 mg/100 gr sedangkan menurut Borodin *et al.*, (2011), susu kedelai memiliki kandungan total isoflavon sebesar 30-175 µg/g.

Isoflavon merupakan senyawa antioksidan yang sering dijumpai pada tanaman kacang-kacangan atau leguminosa. Wang *et al.*, (1998), menyatakan bahwa isoflavon mampu menstimulasi ekspresi katalase mRNA, Cu-n SOD serta GPX mRNA sehingga dapat melindungi sel dari serangan stress oksidatif. Secara alami, isoflavon pada kedelai hampir seluruhnya dalam bentuk B_glikosida (glikon) seperti genistin, daidzin dan glisitin. Pada kedelai yang mengalami proses fermentasi, bentuk glikosida isoflavon didegradasi menjadi senyawa aglikon (isoflavon dalam bentuk bebas). Proses degradasi glikon menjadi aglikon dikatalis oleh enzim glukosidase yang menyebabkan pelepasan glukosa dari glikosida. Isoflavon dalam bentuk aglikon tersebut lebih mudah dicerna dalam tubuh (Astuti, 2008).

Isoflavon tergolong kelompok flavonoid yaitu senyawa polifenolik yang banyak ditemukan dalam buah, sayur dan biji-bijian. Isoflavon adalah flavonoid utama dalam kedelai yang memiliki potensi besar dalam mencegah kanker, osteoporosis, sindrom menopause dan hiperkolesterol (Zubik dan Meydani, 2003). Biosintesis isoflavon berlangsung melalui beberapa tahap yaitu asam sinamat, asam kumarat, kalkon, dan isoflavon yang dapat dilihat dari gambar berikut:



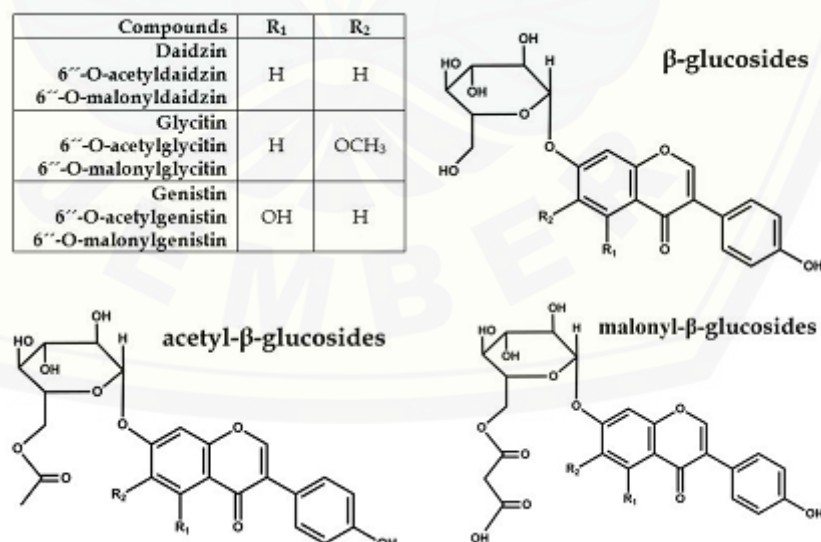
Gambar 2.1 Biosintesis Isoflavon (Sumber: Yu *et al.*, 2003)

Isoflavon disintesis dari salah satu cabang jalur fenilpropanoid. Jalur fenilpropanoid adalah jalur yang banyak ditemukan pada tumbuhan dan memproduksi komponen fenolik seperti lignin, flavon, flavonol, dan antosianin. Biosintesis isoflavon diawali dengan asam amino fenilalanin yang kemudian oleh enzim PAL (*Phenylalanine Ammonia Lyase*) gugus amin dihilangkan dari asam amino dan menghasilkan asam sinamat (*cinnamic acid*). Sitokrom P450 monooksigenase yaitu C4H (*Cinnamic acid 4-Hidroksylase*) akan menambahkan gugus hidroksil sehingga membentuk asam p-koumarat. Enzim 4-coumarate: koenzim A ligase (4CL) mengaktivasi asam p-koumarat dengan mengikat Asetil CoA sehingga menghasilkan p-koumaroil-CoA (Yu dan Brian, 2005).

Kemudian CHS (*Chalcone Synthase*) mensintesis pembentukan *chalcone* dengan membawa p-coumaroyl-CoA dengan 3 molekul malonyl -CoA untuk membentuk C15 yang merupakan skeleton flavonoid. Tanaman kacang-kacangan memproduksi 2 jenis *chalcone* yaitu *tetrahydroxy chalcone* (*naringenin chalcone*)

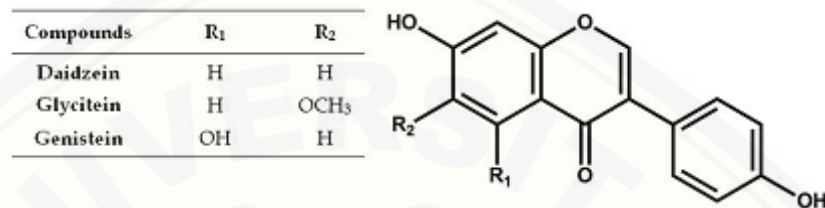
dan *trihydroxy chalcone* (*isoliquiritigenin chalcone*). Produksi dari *isoliquiritigenin* adalah hasil dari penambahan reaksi enzimatik yang dikatalis oleh enzim CHR (*Chalcone Reductase*). *Naringenin* dan *isoliquiritigenin chalcone* kemudian dikonversi menjadi *flavanon naringenin* dan *flavon liquiritigenin* oleh CHI (*Chalcone Isomerase*). Isoflavon disintesis oleh enzim IFS (*Isoflavon Synthase*) yang merupakan sitokrom P450 monooksigenase sehingga merubah *naringenin*, *isoliquiritigenin*, dan *liquiritigenin* menjadi isoflavon. Enzim IFS berperan penting dalam 2 hal yaitu merubah *naringenin* menjadi *genistein* dan bersama dengan CHR membentuk *daidzein* (Yu dan Brian, 2005).

Pada tanaman kedelai, kandungan isoflavon lebih tinggi pada biji kedelai khususnya pada bagian hipokotil (germ) yang akan tumbuh menjadi tanaman. Senyawa isoflavon ini merupakan senyawa kompleks atau konjugasi dengan senyawa gula melalui ikatan glukosida. Isoflavon yang dominan pada kedelai terdapat dalam bentuk glikosida sedangkan yang dominan pada produk kedelai fermentasi adalah aglikon. Senyawa aglikon dihasilkan dari pelepasan glukosa dan glikosida. Jenis senyawa isoflavon yang terdapat dalam kedelai terutama adalah *genistin*, *daidzin* dan *glisitin* (Araujo *et al.*, 2003).



Gambar 2.2 Struktur Kimia Senyawa Genistin, Glisitin dan Daidzin (Sumber: Araujo *et al.*, 2013)

Isoflavon pada kedelai berbentuk senyawa konjugat dengan senyawa gula melalui ikatan -O- glikosidik. Selama proses fermentasi, ikatan -O- glikosidik terhidrolisis sehingga dibebaskan senyawa isoflavon aglikon dan gula (Araujo *et al.*, 2003). Struktur kimia senyawa isoflavon aglikon adalah sebagai berikut:

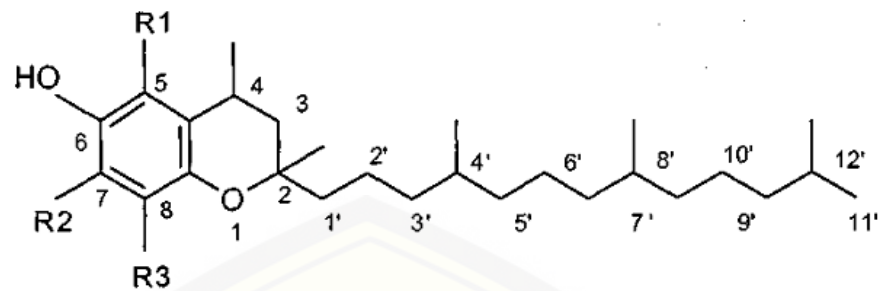


Gambar 2.3 Struktur kimia senyawa isoflavon aglikon (Sumber: Araujo *et al.*, 2003)

Proses fermentasi akan mengakibatkan kedelai mengalami berbagai perubahan baik secara fisik maupun enzimatik karena adanya aktivitas mikroorganisme. Proses fermentasi tersebut mengakibatkan senyawa isoflavon pada kedelai ada dalam bentuk bebas (aglikon). Isoflavon aglikon yang biasanya ditemukan pada kedelai adalah daidzein, genistein, dan glisitein (Araujo *et al.*, 2003).

Selain sebagai antioksidan, isoflavon pada kedelai fermentasi juga berpotensi sebagai anti-konstriksi pembuluh darah dan juga berpotensi menghambat pembentukan LDL (low density lipoprotein) sehingga dapat mengurangi terjadinya arteriosklerosis pada pembuluh darah. Isoflavon dapat mencegah terbentuknya sel kanker, memperbaiki metabolisme hormon steroid, menurunkan kolesterol serta melindungi sel hati dari paparan senyawa beracun (Koswara, 2006).

Kandungan antioksidan terbesar pada susu kedelai setelah isoflavon adalah tokoferol (Vitamin E). Tokoferol merupakan derivat dari tokol. Istilah vitamin E digunakan secara umum untuk semua derivat tokol dan tokotrienol (Pekiner, 2003). Struktur tokoferol ditunjukkan oleh gambar di bawah.



	$\underline{R_1}$	$\underline{R_2}$	$\underline{R_3}$
α -tocopherol	CH_3	CH_3	CH_3
β -tocopherol	CH_3	H	CH_3
γ -tocopherol	H	CH_3	CH_3
δ -tocopherol	H	H	CH_3

Gambar 2.4 Struktur tokoferol (Sumber: Pekiner, 2003)

Menurut data USDA (*United States Department of Agriculture*), 100 gram kedelai rebus mengandung 2 mg α -tokoferol atau sekitar 15% dari kebutuhan vitamin E yang dianjurkan per hari. Sementara itu, menurut Borodin *et al.*, (2011), kandungan tokoferol dalam susu kedelai sebesar 21 $\mu\text{g/g}$. Pekiner (2003), menyebutkan bahwa sebagian besar vitamin E dalam kedelai berbentuk γ -tokoferol yang merupakan antioksidan tokoferol yang paling efektif karena kemampuannya dalam menangkap radikal bebas lebih tinggi dibandingkan α -tokoferol.

Tokoferol berfungsi sebagai antioksidan yang berperan penting sebagai komponen membran sel dan berperan dalam menstabilkan membran. Pada membran sel, tokoferol mencegah oksidasi lemak khususnya PUFA (*Poly Unsaturated Fatty Acid*). Tokoferol sebagai antioksidan akan mencegah penyebaran peroksidasi lemak dengan cara memutus reaksi berantai (Takahashi *et al.*, 1989).

2.3 Bakteri Asam Laktat

Bakteri Asam Laktat (BAL) bukan merupakan suatu kelompok organisme yang berhubungan dalam filogenetik. BAL dikelompokkan berdasarkan kemampuan metabolismenya yaitu menghasilkan asam laktat dalam proses fermentasi. BAL diklasifikasikan dalam 2 filum yaitu Firmicutes dan Actinobacteria. Pada filum Firmicutes, terdapat genus BAL yang paling penting yaitu *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* dan *Weissella* sedangkan yang termasuk ke dalam filum Actinobacteria adalah genus *Bifidobacterium* (Sun *et al.*, 2014).

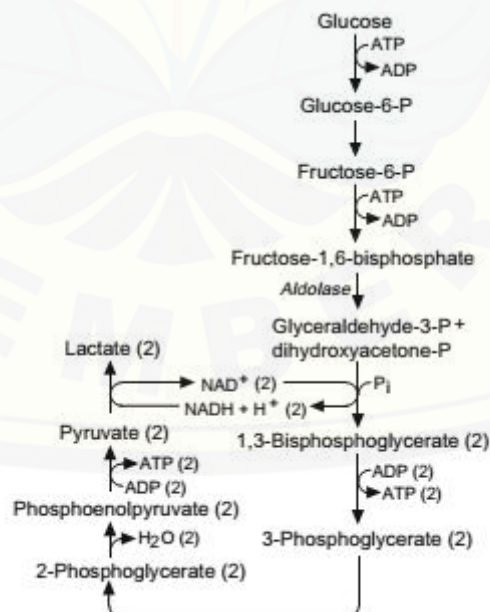
Bakteri asam laktat (BAL) merupakan salah satu kelompok organisme yang sering digunakan dalam fermentasi makanan. Bakteri asam laktat berkontribusi pada rasa dan tekstur produk fermentasi serta menghambat bakteri pembusukan makanan dengan cara memproduksi asam laktat. Pada proses fermentasi, bakteri asam laktat digunakan sebagai agen dalam pembuatan yoghurt, keju, mentega, acar mentimun dan lain-lain (Todar, 2011).

Bakteri asam laktat diklasifikasikan sebagai GRAS (*Generally Recognized as Safe*) untuk digunakan sebagai bahan tambahan pada makanan oleh US FDA (*Food and Drug Administration*). Oleh karena itu, BAL sering digunakan dan diaplikasikan pada industri makanan, kosmetik dan kesehatan. Pada industri makanan, BAL secara luas digunakan untuk memberikan rasa dan aroma, berperan pada pengaturan pH, melindungi dari bakteri patogen dan lain-lain (Young *et al.*, 2006).

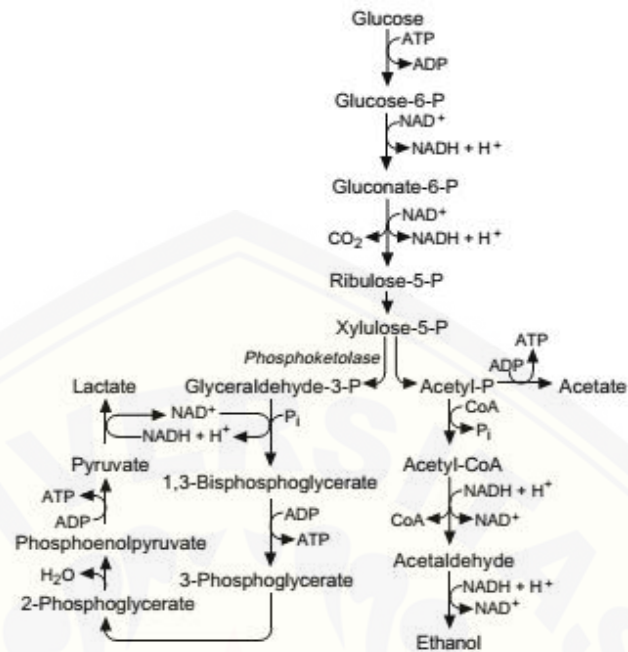
BAL dapat melindungi dari pencemaran bakteri patogen karena menghambat pertumbuhan bakteri lain dengan memproduksi protein yang disebut dengan bakteriosin. Salah satu contoh bakteriosin yang dikenal adalah nisin. Nisin diproduksi oleh *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis*. Senyawa bakteriosin dapat menghambat bakteri patogen yang dapat merusak makanan dan membahayakan kesehatan manusia, sehingga keamanan makanan lebih terjamin (Walstra dan Geurts, 2005).

Bakteri asam laktat menghasilkan asam-asam organik seperti asam laktat, asam asetat dan asam propionat yang bersifat sebagai antimikrob karena dapat menurunkan kadar pH sehingga berfungsi sebagai pengawet alami (*biopreservative*). Bakteri asam laktat juga menghasilkan berbagai komponen antibakteri lain seperti hidrogen peroksida (H_2O_2), karbondioksida (CO_2), diasetil dan bakteriosin. Keuntungan penggunaan BAL adalah mampu mencegah pembusukan dan kontaminasi oleh mikroba lain serta memproduksi bakteriosin, non patogenik, tidak membentuk toksin mikroaerofilik, dan aerotoleran sehingga membutuhkan proses fermentasi yang sederhana serta dapat tumbuh dengan cepat (Yang, 2000).

Bakteri asam laktat dapat diklasifikasikan dalam 2 grup yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. Klasifikasi ini berdasarkan pada produk yang dihasilkan selama fermentasi. BAL homofermentatif mengubah glukosa menjadi satu produk berupa asam laktat sedangkan BAL heterofermentatif mengubah glukosa menjadi asam laktat, etanol dan CO_2 (Salminen *et al.*, 2004). Jalur homofermentatif dan heterofermentatif adalah sebagai berikut:



Gambar 2.5 Jalur Homofermentatif menghasilkan asam laktat (Sumber:Fugelsang dan Edwards, 2007)



Gambar 2.6 Jalur Heterofermentatif menghasilkan asam laktat, etanol dan CO₂ (Sumber: Fugelsang dan Edwards, 2007)

Lactococcus dan *Lactobacillus* merupakan genus bakteri asam laktat yang sering digunakan dalam industri makanan dan aplikasi bioteknologi. Contoh jenis bakteri yang sering digunakan adalah *Lactobacillus casei* dan *Lactococcus lactis*. Berikut karakteristik dari bakteri asam laktat *L. casei* dan *Lac. lactis*.

2.3.1 *Lactobacillus casei*

Genus *Lactobacillus* terdiri atas bakteri gram positif yang tidak memiliki enzim katalase ketika tumbuh di lingkungan yang bernutrisi kompleks seperti karbohidrat, asam amino, peptida, asam lemak, garam dan vitamin. Katalase adalah enzim yang pada umumnya dimiliki oleh semua organisme dan berfungsi mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. *Lactobacillus* secara umum dapat bersifat homofermentatif atau heterofermentatif. *Lactobacillus* bersifat anaerob tetapi dapat bersifat *aerotolerant* dan *acidophilic* (Sun *et al.*, 2014).

Lactobacillus casei terdiri dari 5 spesies dan subspecies yaitu *L. casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. paracasei* subsp. *tolerans*, *L. rhamnosus*, *L. zeae*. *Lactobacillus* dikelompokkan menjadi obligat homofermentatif, fakultatif homofermentatif dan obligat heterofermentatif berdasarkan tipe fermentasi glukosa dan proses fermentasi yang digunakan. *L. casei* termasuk ke dalam kelompok *Lactobacillus* fakultatif heterofermentatif (FHE) yaitu kelompok BAL yang memfermentasi heksosa menjadi asam laktat melalui jalur glikolisis. Pada lingkungan dengan glukosa yang terbatas, kelompok ini dapat mendegradasi pentosa dan glukonat melalui jalur *pentose phosphate* (PP) dengan induksi dari enzim *phospoketolase* sehingga menghasilkan asam asetat, etanol dan asam format (Sun *et al.*, 2014).

2.3.2 *Lactococcus lactis*

Genus *Lactococcus* terdiri atas bakteri gram positif berbentuk bulat, non-motil dan bersifat fakultatif anaerob. Saat ini terdapat 11 spesies dan subspecies *Lactococcus* yaitu *Lac. chungangensis*, *Lac. fujiensis*, *Lac. garvieae*, *Lac. lactis* subsp. *cremoris*, *Lac. lactis* subsp. *hordniae*, *Lac. lactis* subsp. *lactis*, *Lac. lactis* subsp. *tractae*, *Lac. piscium*, *Lac. plantarum*, *Lac. raffinolactis* dan *Lac. taiwanensis*.

Lac. lactis bersifat homofermentatif dan pertumbuhannya tidak terlalu dipengaruhi oleh aerasi. *Lac. lactis* tidak memiliki katalase namun memiliki NADH oksidase dan superoksida dismutase (SOD) yang meningkat secara teratur dalam kondisi aerob. *Lac. lactis* juga dapat meningkatkan kemampuan hidup dan bertahannya dengan cara menurunkan produksi asam laktat serta meningkatkan asam asetat dan diasetil dalam medium. Oleh karena itu, *Lac. lactis* dapat melakukan transisi dari fermentasi ke respirasi aerob (Sun *et al.*, 2014).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, dan Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Jember. Waktu pelaksanaan penelitian dimulai pada bulan September 2015 sampai dengan Maret 2016.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian terdiri dari neraca analitik, tabung reaksi, rak tabung reaksi, jarum ose, labu erlenmeyer, spatula, gelas ukur, gelas Beaker, autoklaf, *shaker*, *sentrifuge*, pipet mikro, tip, pipet tetes, *microtube*, vortek, penangas air, *laminar air flow*, *freeze dryer*, inkubator, *waterbath*, spektrofotometer, lampu bunsen, kapas, korek api, kertas saring, kertas tisu, kertas label, spidol penanda.

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah biji kedelai varietas Baluran, isolat bakteri asam laktat *Lactobacillus casei* (koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember) dan *Lactococcus lactis* (koleksi Pusat Studi Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada), media GYP (*Glucose Yeast Pepton*) broth, media GYP agar, akuades, larutan garam fisiologis, larutan etanol 80%, larutan etanol 100%, DPPH (*1,1 diphenyl-2-picrylhidrazil*).

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan BAL *Lactobacillus casei* dan *Lactococcus lactis*

Pembuatan kurva pertumbuhan *Lactobacillus casei* dan *Lactococcus lactis* dilakukan dengan cara mengkulturkan biakan *L. casei* dan *Lac.lactis* pada media GYP (*Glucose Yeast Pepton*) broth 100 ml di dalam erlenmeyer dan diinkubasi shaker dengan kecepatan 125 rpm pada suhu 37⁰C selama 48 jam. Sebanyak 1 ml diambil dan dimasukkan ke dalam 9 ml garam fisiologis sebagai pengenceran

10^{-1} . Setelah itu diambil $100 \mu\text{l}$ dari pengenceran 10^{-1} dan dimasukkan ke dalam *microtube* yang berisi $900 \mu\text{l}$ garam fisiologis sebagai pengenceran 10^{-2} . Hal tersebut dilakukan sampai pengenceran 10^{-8} dengan interval 4 jam. Kemudian sebanyak $5 \mu\text{l}$ diambil dari tiap-tiap pengenceran lalu ditumbuhkan secara *drop plate* ke media GYP agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya dihitung jumlah koloni yang tumbuh menggunakan metode TPC (*total plate count*) dengan persamaan:

$$\text{Jumlah sel/ml (CFU/ml)} = \text{Jumlah koloni percawan} \times \frac{1000 \mu\text{l}}{5 \mu\text{l}} \times \frac{1}{\text{pengenceran}}$$

(Skinner *et al.*, 1952)

3.3.2 Pembuatan starter *Lactobacillus casei* dan *Lactococcus lactis*

Starter dibuat dengan menggunakan media GYP broth dan kultur BAL *Lactobacillus casei* dan *Lactococcus lactis* yang telah disiapkan pada media GYP agar miring. Kultur BAL *L. casei* dan *Lac. lactis* diinokulasikan sebanyak 2 ose pada masing-masing media GYP broth 100 ml dalam Erlenmeyer. Selanjutnya diinkubasi shaker pada suhu 37°C dengan kecepatan 125 rpm selama 48 jam. Starter siap digunakan pada fase logaritmik (fase log) hasil dari kurva pertumbuhan.

3.3.3 Pembuatan Susu Kedelai

Proses pembuatan susu kedelai mengacu pada Yusmarini *et al.*, (2010), dengan modifikasi. Biji kedelai disortir dan direndam dalam air selama 8 jam, kemudian dicuci dan ditiriskan lalu direbus hingga matang. Setelah itu kulit kedelai dihilangkan dan dicuci bersih. Kedelai yang telah bersih dari kulitnya kemudian dihancurkan dengan cara diblender sambil ditambahkan air hangat matang dengan perbandingan kedelai : air (1 : 6). Kedelai yang telah diblender kemudian disaring dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditutup dengan aluminium foil. Susu kedelai disterilisasi pada suhu 115°C selama 10 menit.

3.3.4 Fermentasi Susu Kedelai dengan Isolat BAL

Proses fermentasi susu kedelai dilakukan berdasarkan metode Yusmarini *et al.*, (2010). Susu kedelai yang telah disterilisasi kemudian didinginkan. Setelah itu diinokulasikan dengan kultur tunggal isolat BAL *L. casei* dan *Lac. lactis* serta kultur campuran *L. casei* dan *Lac. lactis* pada fase log dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan variasi waktu yaitu 24 jam dan 48 jam.

3.3.5 Ekstraksi dan Preparasi Sampel

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode Ping *et al.*, (2012), yang dimodifikasi. Susu kedelai yang telah difermentasi kemudian dikeringkan menggunakan alat *freeze dryer*. *Freeze drying* dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi. Sebanyak 2 gram sampel direndam dalam 20 ml ethanol 80 % kemudian di *waterbath* pada suhu 60° C selama 1 jam. Ekstrak kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 5000 rpm sehingga akan terpisah antara endapan dan supernatan. Supernatan yang didapat kemudian dikumpulkan dan disimpan untuk uji selanjutnya.

3.3.6 Uji Scavenging Radikal Bebas dengan Metode DPPH.

Uji aktivitas antioksidan ini digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan terbesar. Aktivitas antioksidan diketahui berdasarkan kemampuannya mendonorkan atom hidrogen (kemampuan *scavenging*) kepada radikal bebas DPPH (*1,1 diphenyl-2-picrylhidrazyl*) (Mujic *et al.*, 2011). Nilai aktivitas antioksidan yang dinyatakan dalam % inhibisi DPPH, semakin besar reduksi atau penangkapan DPPH maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Ketiga ekstrak susu kedelai dengan perlakuan berbeda yaitu fermentasi menggunakan *L.casei*, *Lac. lactis* serta campuran *L.casei* dan *Lac. lactis* diuji aktivitas antioksidannya menggunakan larutan DPPH. Sebanyak 2,4 mg DPPH dilarutkan dalam 100 ml etanol sehingga menghasilkan larutan DPPH 0,06 mM. Ekstrak sampel hasil fermentasi sebanyak 1,5 ml ditambahkan 1,5 ml larutan DPPH 0,06 mM kemudian diinkubasi dalam gelap selama 30 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm dengan menggunakan spektrofotometer (Marinova

dan Batchvarov, 2011). Larutan DPPH digunakan sebagai kontrol. Analisis dilakukan sebanyak 3 kali pada masing-masing sampel. Aktivitas *scavenging* DPPH dihitung berdasarkan persamaan:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

(Prakash *et al.*, 2001)

3.4 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel, grafik dan foto. Analisis data pada aktivitas antioksidan dari masing-masing sampel dilakukan melalui uji penangkapan radikal secara kuantitatif dengan metode DPPH.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Susu kedelai yang difermentasi dengan BAL dapat meningkatkan kadar antioksidan eksogenous. Aktivitas antioksidan susu kedelai tanpa isolat bakteri sebagai kontrol yaitu sebesar 18,5%. Aktivitas antioksidan susu kedelai hasil fermentasi *L. casei* selama 24 jam sebesar 21% dan mengalami penurunan menjadi 11% pada lama fermentasi 48 jam. Sementara itu, aktivitas antioksidan susu kedelai yang difermentasi oleh *Lac. lactis* selama 24 jam sebesar 15% dan mengalami peningkatan menjadi 35% untuk fermentasi 48 jam. Aktivitas antioksidan tertinggi terdapat pada susu kedelai hasil fermentasi oleh campuran BAL *L. casei* dan *Lac. lactis* yaitu sebesar 42% untuk lama fermentasi 24 jam dan meningkat menjadi 58% dengan lama fermentasi 48 jam

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui konsentrasi dan lama fermentasi optimum dari susu kedelai hasil fermentasi BAL dalam menghasilkan antioksidan eksogenous serta menggunakan metode uji aktivitas antioksidan yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Akerlund, T., Nordstrom, K., & Bernander, R. 1995. Analysis of Cell Size and DNA Content in Exponentially Growing and Stationary Phase Batch Culture of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*, 177: 6791-6797.
- Al-Qadiri, H. M., Nivin, I. A., Mengshi, L., Murad, A., Anna, G. C., & Barbara A. R. 2008. Studying of The Bacterial Growth Phases Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 16: 73-89.
- Anderson R. L & Wolf W. J. 1995. Compositional Changes in Trypsin Inhibitors, Phytic Acid, Saponins and Isoflavones Related to Soybean Processing. *J. Nutr.* Vol. 125 (3): 581S-588S.
- Araujo, M. M., Gustavo, B. F., & Anna, L. C. H. V. 2013. *Soybean and Isoflavones – From Farm to Fork*, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/soybean-a-review/isoflavones-from-farm-to-fork>.
- Astuti, Sussi. 2008. Isoflavon Kedelai dan Potensinya sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi dan Hasil Pertanian*. Vol. 13, No.2.
- Borodin E. A., Dorovskikh V. A., Aksyonova T. V., & Shtarberg M.A. 2001. Lipid Composition and the Antioxidant Properties of Soy Milk in vitro and in vivo. *Far Eastern Medical Journal*. No.4, pp.26-30.
- Borodin E. A., Iraida G., Menshikova, Vladimir A., Dorovskikh, Natalya A., Feoktistova, Mikhail A., Shtarberg, Tatyana V. Aksenova, Takashi Yamamoto, Kiyoharu Takamatsu, Hiroyuki Mori, & Shigeru Yamamoto. 2011. *Antioxidant and Hypocholesterolemic Effects of Soy Foods and Cardiovascular Disease, Soybean and Health*, Prof. Hany El-Shemy (Ed.), ISBN: 978-953-307-535-8, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/soybean-and-health/antioxidant-and-hypocholesterolemic-effects-of-soyfoods-and-cardiovascular-disease>.
- Chen, H., Liu, L. J., Zhu, J. J., Xu, B., & Li, R. 2010. Effect of Soybean Oligosaccharides on Blood Lipid, Glucose Levels and Antioxidant Enzymes Activity in High Fat Rats. *Food Chemistry*, 119: 1633-1636.
- Chun, J., Kim, G. M., Lee, K., Choi, I. D., Kwon, G. H. Park, J. Y., Jeong, S. J., Kim, J. S., & Kim, J. H. 2007. Conversion of Isoflavone Glycosides to Aglycones in Soymilk by Fermentation with Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Science*, 72(2): 39-44.

- Coward, L., Smith, M., Kirk, M., & Barnes, S. 1998. Chemical Modification of Isoflavones in Soyfoods During Cooking and Processing. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68: 1486S-1491S.
- Deutsch, J. C. 1998. Ascorbic Acid Oxidation by Hydrogen Peroxide. *Anal. Biochem*, 255: 1-7.
- Djaafar, T. F., Santoso, U., Cahyanto, M. N., Takuya, S., Endang, S. R., & Kosuke, N. 2013. Effect of Indigenous Lactic Acid Bacteria Fermentation on Enrichment of Isoflavon and Antioxidant Properties of Kerandang (*Canavalia virosa*) Extract. *International Food Research Journal*, 20(5): 2945-2950.
- Duwat, P., Cesselin, B., Sourice, S., & Gruss, A. 2000. *Lactococcus lactis*, A Bacteriomodel for Stress Responses and Survival. *Int. J. Food Microbiol*, 55: 83-86.
- Fugelsang, K. C & Edwards, C. G. 2007. Lactic Acid Bacteria. *Wine Microbiology Practical Applications and Procedures*, Vol. 2.
- Gianti, I dan Evanuraini, H. 2011. Pengaruh Penambahan Gula dan Lama Penyimpanan Terhadap Kualitas Susu Fermentasi. *J. Ilmu dan Teknologi Hasil Ternak*, 6 (1): 28-33.
- Gilliand, S.E. 1989. Acidophilus Milk Products: A Review of Potential Benefits to Consumers. *Journal of Dairy Science*.
- Gyorgy, P., Murata, K., & Ikehata, H. 1964. Antioxidants Isolated from Fermented Soybeans Tempeh. *Nature*, 203: 872-875.
- Halliwell, B & J.M.C. Gutteridge. 1990. Role of Free Radical and Catalytic Logam Ions in Human Disease: An Overview. *Meth. Enzymol*, 186: 1-83.
- Hariyatmi. 2004. Kemampuan Vitamin E Sebagai Antioksidan Terhadap Radikal Bebas Pada Lanjut Usia. *MIPA*, 14(1): 52-60.
- Kaizu, H., Sasaki, M., Nakajima, H., & Suzuki, Y. 1993. Effect of Antioxidative Lactic Acid Bacteria on Rats Fed a Diet Deficient in Vitamin E. *J. Dairy Sci*, 76: 2493-2499.
- Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. 2009. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*. Vol 2: 41-60.
- Korpela, R., Lähteenmäki, T., Sievi, E., Saxelin, M., & Vapaatalo, H. 1997. *Lactobacillus rhamnosus* GG Shows Antioxidative Properties in Vascular Endothelial Cell Cultures. *Milchwissenschaft*, 52: 503-505.
- Koswara, S. 2006. *Isoflavon Senyawa Multi-manfaat dalam Kedelai*. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian IPB.

- Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C., & Kilk, A. 2002. Two Antioxidative Lactobacilli Strains as Promising Probiotics. *Int. J. Food Microbiol*, 72: 215-224.
- Kumalaningsih. 2007. Antioksidan Alami Penangkal Radikal Bebas. *Trubus Agrisarana*.
- Madhavi, D. L., S. S. Deshpande, & D. K. Salunkhe. 1996. *Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives*. New York: Marcel Dekker Publisher.
- Marinova, G. & V. Batchvarov, 2011. Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulg. J. Agric. Sci.*, 17: 11-24.
- McCue, P. & Shetty, K. 2003. Role of Carbohydrate Cleaving Enzymes in Phenolic Antioxidant Mobilization from Whole Soybean Fermented with *Rhizopus oligosporus*. *Food Biotechnol*, 17: 27-37.
- Miller, R. A & Britigan, B. E. 1997. Role of Oxidants in Microbial Pathophysiology. *Clin. Microbiol. Rev*, 10: 1-18
- Molyneux, P. 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazil (DPPH) for Estimating Antioiidant Activity. *J. Sci. Technol*, 26 (2): 211-219.
- Monod, J. 1949. The Growth of Bacterial Cultures. *Annu. Rev. Microbiol*, 3: 371-394.
- Mujic, I., Edina S., Stela J., Z. Saric., Vildana A., Senka, V., & Jelena Z. 2011. Isoflavone Content and Antioxidant Properties of Soybean Seeds. *Croat. J. Food Sci. Technol.* Vol. 3 (1): 16-20.
- Nurrahman, Astuti, Suparno dan Soesatyo. 2012. Peran Tempe Kedelai Hitam dalam Meningkatkan Aktivitas Enzim Antioksidan dan Daya Tahan Limfosit Tikus Terhadap Hidrogen Peroksida *In Vivo*. *Seminar Hasil-Hasil Penelitian-LPPM UNMUS 2012*. ISBN: 978-602-18809-0-6.
- Pedersen, M. B., Gaudu, P., Lechardeur, D., Petit, M. A., & Gruss, A. 2012. Aerobic Respiration Metabolism in Lactic Acid Bacteria and Uses in Biotechnology. *Annu. Rev. Food. Sci. Technol*, 3: 37-58.
- Pekiner, Bilgehan D. 2003. Vitamin E as an Antioxidant. *J. Fac. Pharm*, 32 (4): 243-267.
- Piekarczyk, T. A. 2013. *Lactose and β -Glucosides Metabolism and Its Regulation in Lactococcus lactis: A Review*. InTech, DOI: 10.5772/50889. Available from: <http://www.intechopen.com/books/lactic-acid-bacteria-r-d-for-food->

health-and-livestock-purposes/lactose-and-glucosides-metabolism-and-its-regulation-in-lactococcus-lactis-a-review.

- Ping, S. P., Shih, S. C., Rong, C. T., & King, W. Q. 2012. Effect of Isoflavone Aglycone Content and Antioxidation Activity in Natto by Various Cultures of *Bacillus subtilis* during The Fermentation Period. *Journal of Nutrition Food Science* 2:153. doi:10.4172/2155-9600.1000153.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. 2001. *Antioxidant In Food: Practical Application*. New York: Cambridge University Press.
- Prakash, A., Rigelhof, F., & Miller, E. 2001. Antioxidant Activity. *Medallion Laboratories Analytical Progress*, 19 (2): 1-4.
- Punchard, N. A., & F. J. Kelly. 1996. *Free Radical: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press.
- Pyo, Y. H., Lee, T. C., & Lee, Y. C. 2005a. Effect of Lactic Acid Fermentation on Enrichment of Antioxidant Properties and Bioactive Isoflavones in Soybean. *J. Food Sci*, 70: S215-S220.
- Pyo, Y. H., Lee, T. C., & Lee, Y. C. 2005b. Enrichment of Bioactive Isoflavones in Soymilk Fermented with β -glucosidase-producing Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Research International*, 38(5): 551-559.
- Rau De Almeida Callou K., Sadigov S., Lajolo F. M., & Genovese M. I. 2010. Isoflavones and antioxidant capacity of commercial soy based beverages: effect of storage. *J. Agric. Food Chem.* Vol.58 (7): 4284-91.
- Rekha, C. R. & Vijayalakshmi, G. 2011. Isoflavone Phytoestrogens in Soymilk Fermented with β -glucosidase Producing Probiotic Lactic Acid Bacteria. *Int. J. Food Sci & Nutr*, 62(2): 111-120.
- Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., & Castelli, F. 1995. Flavonoids as Antioxidant Agents: Importance of Their Interaction with Biomembranes. *Free Radic. Biol. & Med*, 19 (4): 481-486.
- Salminen, S., Von Wright, A., & Ouwehand, A. 2004. *Lactid Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspect* Third Edition. New York: Marcel Dekker Publisher.
- Sanmugapriya, E & S.Venkataraman. 2006. Studies on Hepatoprotective and Antioxidant Action of *Strychnos Potatorium* Linn. Seeds on CCl_4 Induce Acute Hepatic Injury in Experimental Rats. *J. Ethnopharmacol*, 105 (1-2): 154-160.
- Serrazanetti, D. I., Guerzoni, M. E., Corsetti, A., & Vogel R. F. 2009. Metabolic Impact and Potential Exploitation of The Stress Reactions in *Lactobacilli*. *Food Microbiol*, 26: 700-711.

- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. 1992. Antioxidative Properties of Xanthan on The Autoxidation of Soybean Oil in Cyclodextrin Emulsion. *J. Agric. Food Chem*, 40: 945-948.
- Simanjuntak, Partomuan. 2004. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Antioksidan dari Ekstrak Benalu Teh, *Scurrula oortiana* (Korth) Danser (Loranthaceae). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* ISSN 1693-1831. Vol. 2. No.1.
- Skinner, F. A., P. C. T. Jones., & J. E. Mollison. 1952. A Comparison of Direct and Plate Counting Techniue for Quantitative Estimation of Soil Microorganisms. *J. Gen. Microbiol*, 6: 261-271.
- Sun, Z., J. Yu., T. Dan., W. Zhang., & H. Zhang. *Lactic Acid Bacteria: Fundamental and Practice: Phylogenesis and Evolution of Lactic Acid Bacteria*. New York: Springer Publisher.
- Takahashi, M., Tsuchiya, J., & Niki, E. 1989. Mode of action of vitamin E as antioxidant in the membranes as studied by spin labeling. *Ann.N.Y.Acad.Sci*, 57: 521 -523.
- Tsangalis, D., Ashton, J. F., Stojanovska, L., Wilcox, G., & Shah, N. P. 2002. Development of an Isoflavone Aglycone-enriched Soymilk Using Soy Germ, Soy Protein Isolate and Bifidobacteria. *Journal of Food Research International*, 37(4): 301-312.
- Tsangalis, D., Ashton, J. F., Stojanovska, L., Wilcox, G., & Shah, N. P. 2003. Biotransformation of Isoflavones by Bifidobacteria in Fermented Soymilk Supplemented ith D-glucose and L-cysteine. *J. Food. Sci*, 68: 623-631.
- Todar, K. 2011. Lactic Acid Bacteria. Todar's Online Textbook of Bacteriology. http://textbookofbacteriology.net/lactics_3.html. Diakses pada 31 Mei 2015.
- U.S Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2002. *USDA-Iowa State University Database on Isoflavone Content of Foods, Release 1.3*. Available from: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/data/ isoflav/ isoflav.html>.
- Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. 2002. Stress Responses in Lactic Acid Bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*, 82: 187-216.
- Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., & Korhonen, H. 2007. Development of Antioxidant Activity in Milk Fermentation with Lactic Acid Bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 106-115.
- Walstra & Geurts. 2005. *Dairy Science and Technology*. Boca Rotan: Taylor and Francis Group.

- Wang, W., L. Q. Liu., C. M. Higuchi., & H. Chen. 1998. Induction of NADPH: Quinone Reduktase by Dietary Phytoestrogens in Colonic Colo205 Cells. *Biochem. Pharmacol*, 56: 189-195.
- Wang, H. J & Murphy, P. A 1996. Mass Balance Study of Isoflavone During Soybean Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 2377-2383.
- Wang, Y. C., Yu, R. C., & Chou, C. C. 2006. Antioxidative Activities of Soymilk Fermented With Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Food Microbiol*, 23: 128-135.
- Weng, T.M., & Chen, M.T. 2011. Effect of Two-Step Fermentation by *Rhizopus oligosporus* and *Bacillus subtilis* on Protein of Fermented Soybean. *Food Sci. Technol. Res*, 17 (5): 393 – 400.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Windono, T. 2001. Uji Peredam Radikal Bebas Terhadap 1, 1-Diphenyl-2-picrylhidrozil (DPPH) dari Ekstrak Kulit Buah dan Biji Anggur Probolinggo dan Bali. Artikel Hasil Penelitian, *Artocarpus*. Vol. 1. No.1. Surabaya: Fakultas Farmasi UNAIR.
- Xu B., Chang S.K., Liu Z., Yuan S., Zou Y., & Tan Y. 2010. Comparative studies on the chemical and cell-based antioxidant activities and antitumor cell proliferation properties of soy milk manufactured by conventional and commercial UHT methods. *J. Agric. Food Chem*. Vol.58 (6): 3558-66.
- Yang, Z. 2000. *Antimicrobial Compounds and Extracellular Polysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria: Structure and Properties*. Helsinki: Department of Food Technology.
- Yang, J. H., Mau, J. L., Ko, P. T., & Huang, L. C. 2000. Antioxidant Properties of Fermented Soybean Broth. *Food Chem*, 71: 249-254.
- Young, J. W., Kim, N. J., & Ryu, W. H. 2006. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. *Food Technol*, 44 (2): 163-172.
- Yu, Oliver & Brian, Mc.Gonigle. 2005. Metabolic Engineering of Isoflavone Biosynthesis. *Advances in Agronomy*. Vol 86.
- Yu, Oliver., June Shi., Aideen O. H., Carl A. M., Brian McGonigle., & Joan T. O. 2003. Metabolic Engineering to Increase Isoflavone Biosynthesis in Soybean Seed. *Phytochemistry*, 63: 753-763.
- Yulvianti, M., Widya, E., Tarsono dan M. Alfian, R. 2015. Pemanfaatan Ampas Kelapa sebagai Bahan Baku Tepung Kelapa Tinggi Serat dengan Metode *Freeze Drying*. *Jurnal Integrasi Proses*, 5 (2): 101-107.

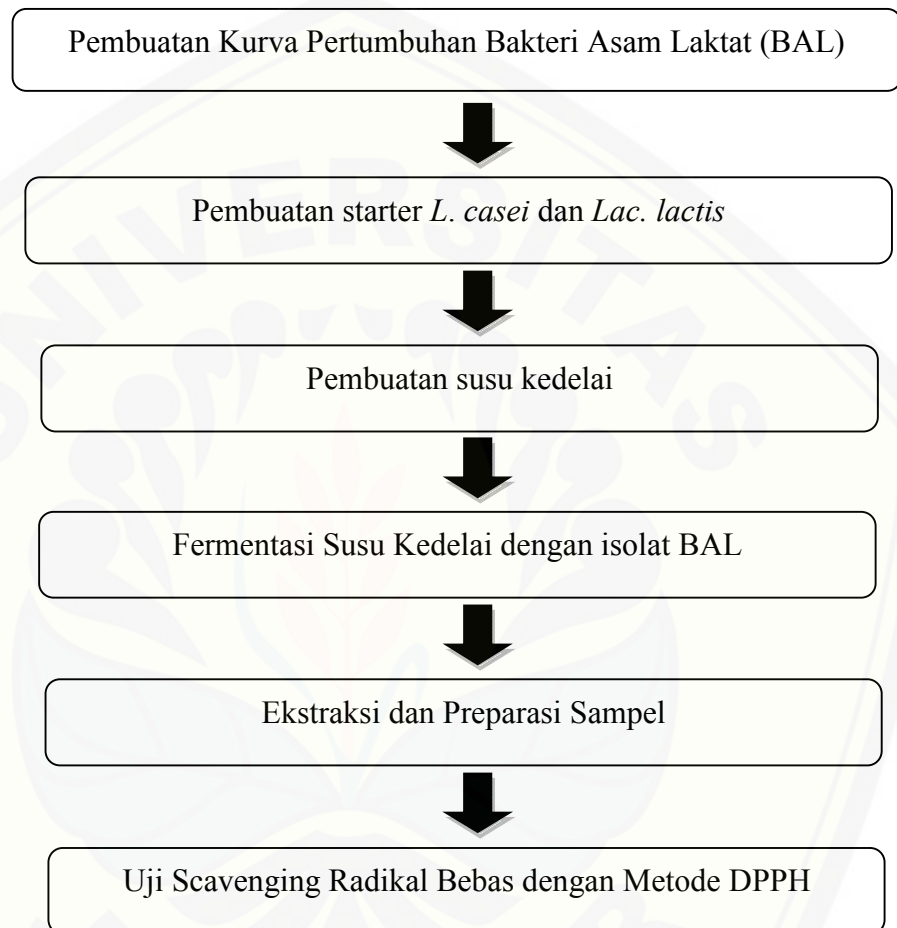
Yusmarini, R., Indriati, T., Utami dan Y. Marsono. 2010. Aktivitas Proteolitik Bakteri Asam Laktat dalam Fermentasi Susu Kedelai. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Vol. 21. No.2.

Zubik, L & M. Meydani. 2003. Bioavability of Soybean Isoflavon from Aglycone and Glucoside Form in American Women. *J. Clin. Nutr*, 77: 1459-1465.



LAMPIRAN

A. Alur Penelitian



B. Komposisi Bahan

Media	Bahan	Komposisi
<i>Glucose Yeast Pepton (GYP) Agar</i>	pepton	10 gr
	yeast extract	5 gr
	dextrose	20 gr
	bacto agar	15 gr
	akuades	1000 ml
<i>Glucose Yeast Pepton (GYP) Broth</i>	pepton	10 gr
	yeast extract	5 gr
	dextrose	20 gr
	akuades	1000 ml

C. Hasil Perhitungan Pembuatan Kurva Pertumbuhan**C.1 Hasil Perhitungan Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus casei***

Waktu Inkubasi (Jam)	Jumlah Sel (CFU/ml)	Log (CFU/ml)
0	$3,4 \times 10^6$	6,5
4	$4,8 \times 10^6$	6,7
8	$4,2 \times 10^6$	6,6
12	3×10^7	7,5
16	$1,12 \times 10^8$	8
20	$3,2 \times 10^8$	8,5
24	$8,6 \times 10^8$	8,9
28	$5,6 \times 10^8$	8,7
32	$1,55 \times 10^9$	9,2
36	$6,2 \times 10^8$	8,8
40	$3,8 \times 10^8$	8,6
44	$9,6 \times 10^7$	8
48	$4,4 \times 10^7$	7,6

C.2 Hasil Perhitungan Kurva Pertumbuhan *Lactococcus lactis*

Waktu Inkubasi (Jam)	Jumlah Sel (CFU/ml)	Log (CFU/ml)
0	3×10^6	6,5
4	$4,8 \times 10^6$	6,7
8	3×10^8	8,5
12	1×10^8	8
16	1×10^8	8
20	$3,4 \times 10^8$	8,5
24	$4,2 \times 10^8$	8,6
28	2×10^8	8,3
32	$8,8 \times 10^7$	7,9
36	$1,6 \times 10^8$	8,2
40	$4,8 \times 10^8$	8,7
44	$8,8 \times 10^7$	7,9
48	$1,2 \times 10^8$	8,08

D. Perhitungan % inhibisi Radikal DPPH

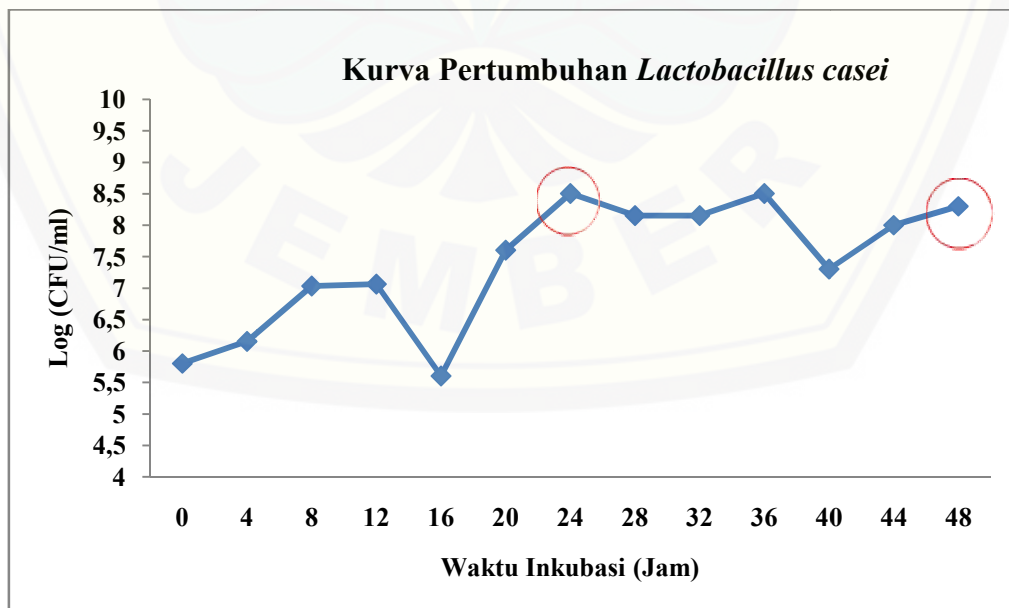
Sampel Susu Kedelai	Absorbansi (517 nm)			Rata-rata	% inhibisi
	U 1	U 2	U 3		
Tanpa Isolat	0,31	0,308	0,294	0,304	18,5%
<i>L. casei</i> 24 jam	0,321	0,27	0,294	0,295	21%
<i>L. casei</i> . 48 jam	0,326	0,331	0,339	0,332	11%
<i>Lac. lactis</i> 24 jam	0,315	0,316	0,318	0,316	15%
<i>Lac. lactis</i> 48 jam	0,028	0,365	0,33	0,241	35%
Kultur Campuran 24 jam	0,226	0,209	0,26	0,217	42%
Kultur Campuran 48 jam	0,15	0,157	0,164	0,157	58%

E. Susu Kedelai Hasil Fermentasi oleh *Lactobacillus casei* dan *Lactococcus lactis*



F. Kurva Pertumbuhan BAL dalam Media Susu Kedelai

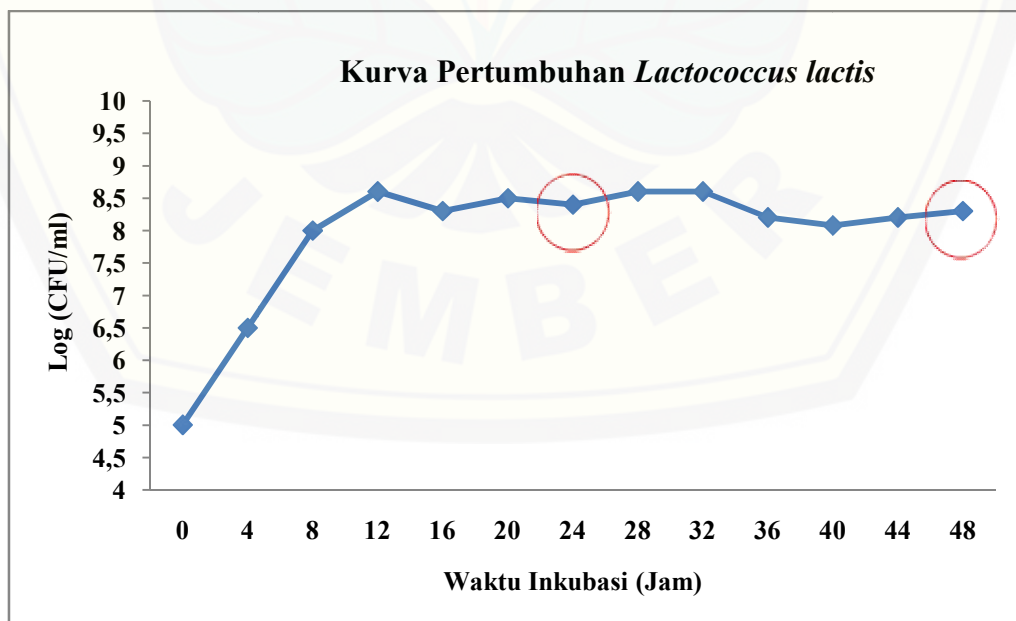
E.1 Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus casei* dalam Media Susu Kedelai



E. 2 Hasil Perhitungan Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus casei* dalam Media Susu Kedelai

Waktu Inkubasi (Jam)	Jumlah Sel (CFU/ml)	Log (CFU/ml)
0	$6,6 \times 10^5$	5,8
4	$1,4 \times 10^6$	6,15
8	$1,08 \times 10^7$	7,03
12	$1,16 \times 10^7$	7,06
16	$4,4 \times 10^5$	5,6
20	$3,8 \times 10^7$	7,6
24	3×10^8	8,5
28	$1,4 \times 10^8$	8,15
32	$1,4 \times 10^8$	8,15
36	$2,8 \times 10^8$	8,5
40	$2,2 \times 10^7$	7,3
44	9×10^7	8
48	$1,8 \times 10^8$	8,3

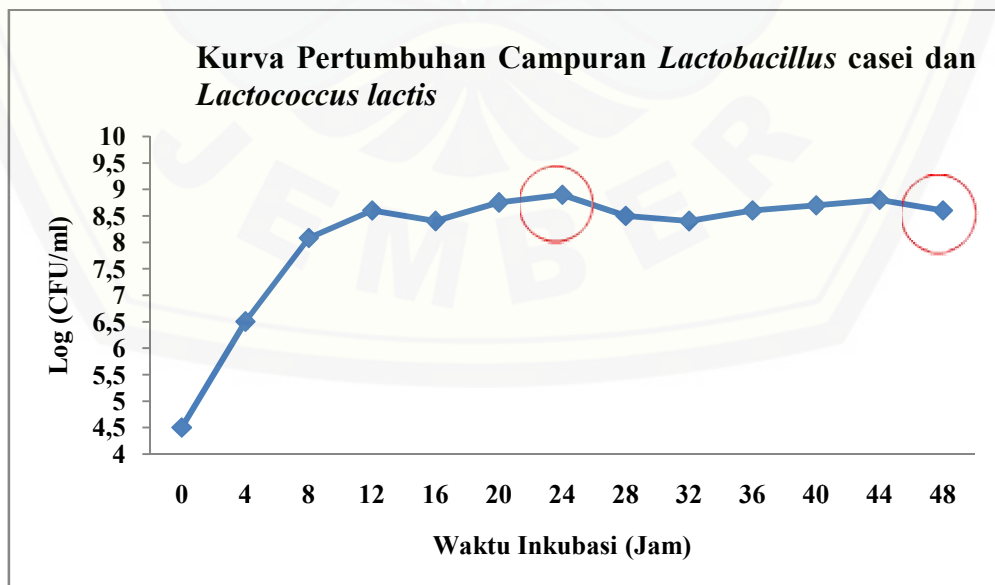
E. 3 Kurva Pertumbuhan *Lactococcus lactis* dalam Media Susu Kedelai



E. 4 Hasil Perhitungan Kurva Pertumbuhan *Lactococcus lactis* dalam Media Susu Kedelai

Waktu Inkubasi (Jam)	Jumlah Sel (CFU/ml)	Log (CFU/ml)
0	$9,5 \times 10^4$	5
4	3×10^6	6,5
8	9×10^7	8
12	$3,8 \times 10^8$	8,6
16	2×10^8	8,3
20	$3,6 \times 10^8$	8,5
24	$2,6 \times 10^8$	8,4
28	$3,8 \times 10^8$	8,6
32	$4,4 \times 10^8$	8,6
36	$1,6 \times 10^8$	8,2
40	$1,2 \times 10^8$	8,08
44	$1,6 \times 10^8$	8,2
48	$2,2 \times 10^8$	8,3

E.5 Kurva Pertumbuhan Campuran *Lactobacillus casei* dan *Lactococcus lactis* dalam Media Susu Kedelai



E. 6 Hasil Perhitungan Kurva Pertumbuhan Campuran *Lactobacillus casei* dan *Lactococcus lactis* dalam Media Susu Kedelai

Waktu Inkubasi (Jam)	Jumlah Sel (CFU/ml)	Log (CFU/ml)
0	$2,8 \times 10^4$	4,5
4	$2,8 \times 10^6$	6,5
8	$1,2 \times 10^8$	8,08
12	$3,8 \times 10^8$	8,6
16	$2,6 \times 10^8$	8,4
20	$5,6 \times 10^8$	8,75
24	$7,8 \times 10^8$	8,9
28	$3,2 \times 10^8$	8,5
32	$2,6 \times 10^8$	8,4
36	$3,8 \times 10^8$	8,6
40	$5,2 \times 10^8$	8,7
44	$5,8 \times 10^8$	8,8
48	4×10^8	8,6