

IDENTIFIKASI FLAVONOID HASIL FERMENTASI SARI KACANG HIJAU DAN EKSTRAK KACANG HIJAU (*VIGNA RADIATA*) MENGGUNAKAN *LACTOBACILLUS CASEI*

Indah Khoirul Nisa*, M. Arifuddin, Adam M Ramadhan

Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Kefarmasian “Farmaka Tropis”,
Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman, Samarinda, Indonesia

*Email: indahkhoirulnisa5@gmail.com

ABSTRAK

Bertujuan untuk mengetahui profil pertumbuhan *Lactobacillus casei* dan perubahan pH pada starter sari kacang hijau (*Vigna radiata*) yang diinkubasi (12, 24, 36, dan 48 jam), dan karakteristik hasil fermentasi, serta mengidentifikasi secara kualitatif senyawa flavonoid ekstrak dan hasil fermentasi kacang hijau. Hasil penelitian dari profil pertumbuhan *Lactobacillus casei* starter sari kacang hijau pada 12, 24, 36, dan 48 jam mengalami peningkatan pertumbuhan dan semakin lama waktu fermentasi pH semakin meningkat serta karakteristik hasil fermentasi yaitu warna coklat dan gumpalan serbuk dibagian bawah pada masing-masing perlakuan. Identifikasi senyawa flavonoid secara kualitatif menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) pada masing-masing ekstrak dengan menyempatkan $AlCl_3$, noda menjadi kuning. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa waktu optimum pertumbuhan *Lactobacillus casei* pada fermentasi kacang hijau yaitu pada 36 jam, dan hasil fermentasi kacang hijau mengandung flavonoid.

Kata Kunci: Fermentasi, *Vigna radiata*, *Lactobacillus casei*

DOI: <https://doi.org/10.25026/mpc.v6i1.271>

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-kacangan karena adanya efek peningkatan zat gizi dan pengaruh yang baik bagi kesehatan^[1]. Salah satu jenis produk fermentasi susu

adalah yogurt yang merupakan produk hasil fermentasi susu oleh bakteri asam laktat dari genus *Lactobacillus* dan *Streptococcus*^[2].

Kacang hijau (*Vigna radiata*) berdasarkan penelitian sebelumnya, diketahui mengandung senyawa metabolit sekunder diantaranya, flavonoid, tanin, steroid/triterpenoid, saponin^[3]. Sehingga dilakukan pengembangan dengan memfermentasi kacang hijau menggunakan *Lactobacillus casei*. *Lactobacillus casei* merupakan bakteri asam laktat merupakan bakteri asam laktat yang dapat mencapai saluran pencernaan

manusia dalam keadaan hidup dan menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap bakteri patogen^[4]. *Lactobacillus casei* mampu hidup secara baik dalam medium alami yang menggunakan sayuran, rumput laut, biji-bijian dan umbi kentang^[5]. Oleh sebab itu, dilakukan perbandingan senyawa flavonoid dari hasil fermentasi sari kacang hijau dan ekstrak kacang hijau (*Vigna radiata*), dan mengetahui kemampuan tumbuh bakteri *Lactobacillus casei* jika nutrisi tersebut hanya diperoleh dari sari kacang hijau.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan untuk pembuatan medium bakteri adalah kacang hijau yang diperoleh dari Bengalon, Kalimantan Timur, starter *Lactobacillus casei* dan media NA dan NB. Bahan yang digunakan untuk analisis adalah aquades, media NA (*Nutrient Agar*), NB (*Nutrient Broth*), Etil asetat.

Alat

Alat yang digunakan dalam pembuatan medium bakteri adalah Gelas kimia, Gelas ukur, termometer, Gelas kaca, Kain saring, *blender*, timbangan digital, *Hot plate*, autoklaf, kulkas, inkubator, *Laminar Air Flow*, pH Meter dan *Spoid*.

Alat yang digunakan untuk analisis adalah Gelas kimia, *Magnetic Stirrer*, kulkas, inkubator, *Laminar Air Flow*, bunsen, jarum ose, cawan petri, pH meter, Corong pisah dan *Spoid*.

METODE PENELITIAN

Ekstraksi Serbuk Kacang Hijau

Serbuk kacang hijau 100 g dimaserasi dengan 1 Liter metanol dan didiamkan 1 hari. Kemudian disaring dan filtrat. Diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga dihasilkan ekstrak kental. Lalu disimpan di dalam desikator untuk meminimalkan kadar air.

Ekstrak yang dihasilkan disimpan pada suhu ruang untuk digunakan pada analisis berikutnya^[3].

Pembuatan Sari Kacang Hijau

Sampel kacang hijau segar sebanyak 200 g. Kacang hijau direndam selama 8 jam, kemudian direbus selama 15 menit. Sebanyak 125 g kacang hijau diblender dengan 1000 mL air panas (perbandingan 1:8), setelah itu disaring. Filtrat diambil dan ampas dibuang^[6].

Pembuatan Starter Bakteri

Sari kacang hijau sebanyak 50 mL ditambah glukosa 2%, dicek pH. Kemudian dipasteurisasi selama 30 menit suhu ≤ 85 °C. Setelah itu sari kacang hijau diinokulasikan dengan *Lactobacillus casei* kemudian difermentasi selama 12, 24, 36, dan 48 jam pada suhu 37°C dan kemudian dicek pH starter^[6].

Analisis Total BAL

Starter bakteri (12, 24, 36, dan 48 jam) diambil 1 ml, dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril (pengenceran 10^{-1}) Diambil 1 ml larutan dari pengenceran 10^{-1} , dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril (pengenceran 10^{-2}), begitu seterusnya sampai pengenceran 10^{-8} . Diambil 1 ml dari masing-masing pengenceran terakhir yaitu pengenceran 10^{-6} , 10^{-7} dan 10^{-8} dituang dalam cawan petri steril, lalu dituangi media NA sampai dasar cawan tertutup media. Setelah media memadat, diinkubasi suhu 37°C selama 48 jam. Catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan yang mengandung koloni. Hitung angka TPC dalam 1 ml dengan mengalikan jumlah koloni rata-rata dengan faktor pengenceran yang digunakan dengan satuan *colony forming unit/ml*^[7].

Fermentasi Sari Kacang Hijau

Starter bakteri diinokulasi ke dalam 450 mL ke dalam kacang hijau secara aseptik kemudian difermentasi

selama 12, 24, 36, dan 48 jam pada suhu 37°C, kemudian diamati karakteristik keberhasilan fermentasi dan dicek pH^[6].

Ekstraksi Hasil Fermentasi Sari Kacang Hijau

Kacang hijau hasil fermentasi sebanyak 500 mL dimasukkan ke dalam gelas kimia, ditambah etil asetat, dimaserasi selama 1 jam dengan bantuan *stirer*, kemudian diambil bagian etil asetatnya. Diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40 °C hingga dihasilkan ekstrak kental. Lalu disimpan di dalam desikator untuk meminimalkan kadar air. Ekstrak yang dihasilkan disimpan pada suhu ruang untuk digunakan pada analisis berikutnya^[6].

Identifikasi Flavonoid

Ekstrak kacang hijau dan ekstrak hasil fermentasi kacang hijau ditotolkan pada plat silika gel GF60. Dielusi dengan butanol: asam asetat: air (4:1:5). Kemudian dikeringkan dan diamati pada UV 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya plat disemprot dengan $AlCl_3$, dikeringkan dan diamati kembali pada cahaya tampak, UV 254 nm dan 366 nm^[8].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, kacang hijau menggunakan dua perlakuan yaitu dibandingkan antara ekstrak metanol dan ekstrak hasil fermentasi secara kualitatif dengan mengidentifikasi senyawa flavonoid. Pada ekstrak metanol kacang hijau didapatkan hasil rendeman dapat dilihat pada Tabel 1.

Penelitian ini memberikan hasil bahwa semakin lama fermentasi maka pH medium semakin rendah. Penurunan nilai pH disebabkan oleh peningkatan jumlah asam-asam organik yang merupakan hasil metabolisme dari bakteri asam laktat yang ada pada sari kacang hijau. Asam laktat yang dihasilkan sebagai produk utama akan terdisosiasi menghasilkan H^+ dan $CH_3CHOHCOO^-$, sehingga semakin

tingginya asam laktat memungkinkan tingginya ion H^+ yang terbebaskan dalam medium sehingga menurunkan nilai pH sari kacang hijau. Fermentasi yang melibatkan bakteri asam laktat ditandai dengan peningkatan jumlah asam-asam organik yang diiringi dengan penurunan pH^[9]. Bakteri asam laktat akan memanfaatkan nutrisi tersebut dan menghasilkan asam-asam organik selama fermentasi berlangsung, akibatnya asam-asam organik tersebut terakumulasi dan pH media mengalami penurunan. Dan semakin lama waktu fermentasi, semakin banyak asam-asam organik yang terakumulasi dalam media sehingga akan meningkatkan derajat keasaman.

Analisis jumlah bakteri pada starter untuk mengetahui fase pertumbuhan hidup bakteri asam laktat pada starter. Penambahan glukosa 2 % pada starter bakteri berguna untuk menambah sumber energi bagi bakteri asam laktat. Media yang biasa digunakan untuk pertumbuhan BAL antara lain Muller Hinton, NA, dan MRS^[10]. Media pertumbuhan untuk *L. casei* digunakan medium NA (*Nutrient Agar*). Dari Tabel 2 menyatakan bahwa pada waktu inkubasi 12 dan 24 jam masih dalam fase lag atau fase adaptasi. Pada waktu 36 jam pertumbuhan bakteri meningkat ini merupakan pertumbuhan logaritmik. Pertumbuhan logaritmik adalah suatu fase pertumbuhan dimana terjadinya pertumbuhan bakteri secara eksponensial disertai dengan pembelahan sel secara konstan pada jangka waktu tertentu^[11]. Pada 48 jam pertumbuhan bakteri mulai menurun ini menyatakan fase kematian dimana nutrisi di dalam starter mulai berkurang sehingga bakteri kekurangan nutrisi sehingga mati.

Keberhasilan fermentasi ditandai dengan pembentukan gumpalan pada sari kacang hijau yang diamati secara visual. Gumpalan di bagian dasar merupakan hasil penggumpalan protein, karena penurunan pH pada substrat mengakibatkan denaturasi protein. Ketika

komponen pada substrat beragregasi dengan sel bakteri, bakteri yang beragregasi akan memperbanyak diri sehingga berat jenis komponen meningkat menyebabkan hasil agregasi turun ke dasar^[12].

Dilakukan analisis kualitatif flavonoid untuk mengetahui pada ekstrak metanol dan hasil fermentasi terdapat senyawa flavonoid. Ekstraksi flavonoid pada sari kacang hijau menggunakan etil asetat. Penggunaan etil asetat selain karena cocok untuk menarik komponen kimia didalam sampel, juga didasarkan atas metode ekstraksi yang digunakan yakni ekstraksi cair-cair, dimana etil asetat tidak akan bercampur dengan kandungan air yang terdapat pada sampel, sehingga akan terpisah antara lapisan etil asetat yang mengandung flavonoid dan lapisan

airnya^[13]. Selain itu pemilihan etil asetat karena selama proses fermentasi terjadi perubahan komponen dan bioaktivitas senyawa aktif dimana komponen bioaktif yang umumnya bersifat polar telah terdegradasi menjadi kepolarannya menurun sehingga etil asetat yang bersifat semi polar dapat menarik senyawa tersebut^[14]. Untuk identifikasi kualitatif senyawa flavonoid digunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) digunakan eluen butanol:asam asetat:air (4:1:5)^[8] dimana eluen bersifat sangat polar, kepolaran fase diam dan fase gerak hampir sama tapi lebih polar fase gerak sehingga senyawa flavonoid yang dipisahkan terangkat mengikuti aliran eluen. Setelah disemprotkan $AlCl_3$ berfluoresensi kuning di UV 366 sehingga positif mengandung flavonoid^[8].

Tabel 1 Hasil Rendeman Serbuk Kacang Hijau

Ekstrak	Berat Simplisia	Berat Ekstrak	% Rendemen	Warna Ekstrak
Serbuk Kacang Hijau	100 g	3,4 g	3,4 %	Hijau

Tabel 2 Analisis pH Strater dan Jumlah Bakteri Total L. Casei

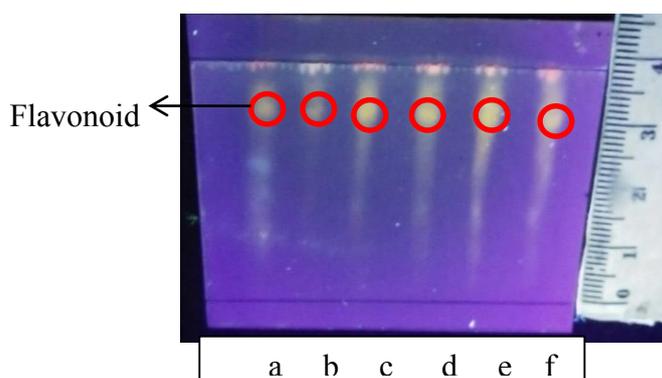
No	Sampel	Nilai pH	Pengenceran			Jumlah Sel Bakteri cfu/mL
			10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	
1.	Starter 12 jam	4,61	159	25	1	$1,59 \times 10^8$
2.	Starter 24 jam	3,98	191	55	2	$1,91 \times 10^8$
3.	Starter 36 jam	3,75	414	74	4	$7,4 \times 10^8$
4.	Starter 48 jam	3,56	114	19	2	$1,14 \times 10^8$

Tabel 3 Analisis Karakteristik Hasil Fermentasi

Sampel	Warna	Tekstur
Sari Kacang Hijau	Coklat	Tidak Ada Gumpalan
Fermentasi 12 jam	Coklat	Gumpalan serbuk
Fermentasi 24 jam	Coklat	Gumpalan serbuk
Fermentasi 36 jam	Coklat	Gumpalan serbuk
Fermentasi 48 jam	Coklat	Gumpalan serbuk

Tabel 4 Identifikasi Flavonoid secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada Ekstrak dan Hasil Fermentasi Kacang Hijau yang telah disemprot dengan $AlCl_3$

Sampel	Eluen	Warna			Nilai Rf	Keterangan
		UV 366	UV 254	UV/ $AlCl_3$		
Ekstrak Metanol	Butanol: Asam asetat: Air	Ungu gelap	Noda gelap	Fluoresensi kuning	0,75	(+)Flavonoid
Sari Kacang Hijau	(4:1:5)	Ungu gelap	Noda gelap	Fluoresensi kuning	0,75	(+)Flavonoid
Hasil Fermentasi 12 jam		Ungu gelap	Noda gelap	Fluoresensi kuning	0,75	(+)Flavonoid
Hasil Fermentasi 24 jam		Ungu gelap	Noda gelap	Fluoresensi kuning	0,75	(+)Flavonoid
Hasil Fermentasi 36 jam		Ungu gelap	Noda gelap	Fluoresensi kuning	0,75	(+)Flavonoid
Hasil Fermentasi 48 jam		Ungu gelap	Noda gelap	Fluoresensi kuning	0,75	(+)Flavonoid



Gambar 1 KLT ekstrak serbuk kacang hijau dan hasil fermentasi setelah disemprot $AlCl_3$.

Keterangan :

a: Ekstrak Metanol,
d: 24 jam,

b: Sari Kacang Hijau,
e: 36 jam,

c: 12 jam
f: 48 jam

Dilakukan analisis kualitatif flavonoid untuk mengetahui pada ekstrak metanol dan hasil fermentasi terdapat senyawa flavonoid. Ekstraksi flavonoid pada sari kacang hijau menggunakan etil asetat. Penggunaan etil asetat selain karena cocok untuk menarik komponen kimia didalam sampel, juga didasarkan atas metode ekstraksi yang digunakan yakni ekstraksi cair-cair, dimana etil asetat tidak akan bercampur dengan kandungan air yang terdapat pada sampel, sehingga akan terpisah antara lapisan etil asetat

yang mengandung flavonoid dan lapisan airnya [13]. Selain itu pemilihan etil asetat karena selama proses fermentasi terjadi perubahan komponen dan bioaktivitas senyawa aktif dimana komponen bioaktif yang umumnya bersifat polar telah terdegradasi menjadi kepolarannya menurun sehingga etil asetat yang bersifat semi polar dapat menarik senyawa tersebut [14]. Untuk identifikasi kualitatif senyawa flavonoid digunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) digunakan eluen butanol:asam asetat:air (4:1:5)[8]

dimana eluen bersifat sangat polar, kepolaran fase diam dan fase gerak hampir sama tapi lebih polar fase gerak sehingga senyawa flavonoid yang dipisahkan terangkat mengikuti aliran eluen. Setelah disemprotkan $AlCl_3$ berfluoresensi kuning di UV 366 sehingga positif mengandung flavonoid [8].

KESIMPULAN

1. Waktu optimum pertumbuhan *Lactobacillus casei* pada 36 jam
2. Nilai pH starter dari 12 jam hingga ke 48 jam mengalami penurunan dan karakteristik hasil fermentasi berwarna coklat dan terdapat gumpalan serbuk
3. Ekstrak Kacang Hijau dan hasil fermentasi Kacang Hijau mengandung flavonoid

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Khalil, A.A., 2006. Nutritional improvement of an Egyptian breed of mung bean by probiotic lactobacilli. *J. Biotechn. Egypt. pp.206-212.*
- [2] Farnworth, E. R. 2008. *Handbook of Fermented Functional Food. 2nd Ed.* CRC Pres. Boca Raton.
- [3] Djamil, Ratna., *et all.* 2009. Penapisan Fitokimia, Uji BSLT Dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Beberapa Spesies *Papilionaceae*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. Jakarta. Hal 65-71.
- [4] Jenie, B.S.L. 2003. Application of Lactic Acid Bacteria To Improve The Safety and Shelf Life of Minimally Processed Melon (*Cucumis melo* L.) *Proceeding of 8 th Asean Food Conference*. Hanoi, Vietnam.
- [5] Hye Young Kim, J. H. Min., J. Hwa Lee, G. E. Ji. 2002. Growth of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in Natural Media Using Vegetables, Seaweed, Grains, and Potatoes.

- [6] Fawwaz, Muammar, Elly Wahyudin, and M. Natsir Djide. 2013. Identifikasi Genistein Dan Efek Isoflavon Hasil Fermentasi Kedelai (*Glycine Max* (L) Merrill) Terhadap Proliferasi Sel Osteoblast Secara In Vitro. *JST Kesehatan, Vol.3 No.4 : 395-402*
- [7] Primurdia. 2014. Aktivitas Antioksidan Minuman Probiotik Sari Kurma. *Jurnal Pangan dan Agroindustri Vol 2 No 3*
- [8] Watanabe, Mitsuru; Ohshita, Yasuo; Tsushida , Tsushida. 1997. Antioxidant Compound from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Hulls. *J. Agric. Food Chem, Vol. 45, No. 4*
- [9] Yang, Z. 2000. Antimicrobial Compounds and Extracellular Polysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *Academia Dissertation Department of Food Technology University of Helsinki. Helsinki.*
- [10] Rosiana, Noor Erma, dan Isnaeni. 2008. Pengaruh Asam-asam Organik terhadap *Pertumbuhan Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus,* dan *Lactobacillus casei* (Bakteri Asam Laktat). *Majalah Farmasi Airlangga. Vol 6 No 2*
- [11] Madigan, M, T., J, M. Martinko, & D. A. Stahl. 2011. *Biology Of Microorganisms. 13 th ed.* Benjamin Cummings: San Francisco.
- [12] Novia, Diana. 2012. Pembuatan Yogurt Nabati melalui Fermentasi Susu Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris*) menggunakan Kultur *Backslop*. *Skripsi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Departemen Biologi*. Depok
- [13] Jung K.W., Choi W.I., Hong E.G., Pyun W.C., Park K.K., Park J.P., Seo K.S., Choi H.Y. & Lee H.C. 2010. Effects of Isoflavone

Aglycone-Rich Fermented Soybean Paste Extract on Osteoblastic Differentiation of MG-63 Cells. *Journal Korean Soc. Appl. Biol. Chem*, 53(6): 803-809.

[14] Rahmi, Nazarni, Eni Harmayani, Umar Santosa, dan Purnama Darmadji. 2016. Identifikasi Bakteri Asam Laktat dan Aktivitas Penghambatan Radikal pada Jaruk Tigarun (*Crataeva nurvala*, Buch Ham). *AGRITECH*, Vol 36, No 3.