

Karakteristik fisikokimia dan aktivitas antioksidan susu kedelai fermentasi spontan tanpa *bleaching* sebagai pangan fungsional

Nurul Fahira¹, Wulan Rachmawati¹, Fatmawati Nur¹, Cut Muthiadin¹, Hafsan^{1*}

¹Prodi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar

*Corresponding author: Jl. HM. Yasin Limpo 36 Gowa, Sulawesi Selatan, Indonesia. 92113

E-mail addresses: hafsan.bio@uin-alauddin.ac.id

Kata kunci

Antioksidan
Bakteri Asam Laktat
Bleaching
Fermentasi spontan
Susu kedelai

Keywords

Antioxidant
lactic acid bacteria
Bleaching
Spontaneous fermentation
Soy milk

Diajukan: 5 Juli 2025

Ditinjau: 14 Agustus 2025

Diterima: 22 November 2025

Diterbitkan: 30 April 2026

Cara Sitasi:

N. Fahira, W. Rachmawati, F. Nur, C. Muthiadin, H. Hafsan, "Karakteristik fisikokimia dan aktivitas antioksidan susu kedelai fermentasi spontan tanpa *bleaching* sebagai pangan fungsional", *Filogeni: Jurnal Mahasiswa Biologi*, vol. 6, no. 1, pp. 90-100, 2026.

Abstrak

Permintaan masyarakat terhadap pangan fungsional terus meningkat, termasuk produk berbasis kedelai seperti susu kedelai. Salah satu proses teknologi yang lazim dilakukan adalah *bleaching*, namun metode ini berpotensi menghilangkan senyawa bioaktif penting. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi karakteristik fisikokimia, dinamika pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL), serta aktivitas antioksidan susu kedelai fermentasi spontan tanpa *bleaching* sebagai alternatif pangan fungsional alami. Penelitian bersifat eksperimental dengan fermentasi spontan susu kedelai pada suhu ruang selama 6, 12, 18, 24, dan 30 jam. Parameter yang diamati meliputi warna, rasa, kekentalan, pH, kadar asam laktat, populasi BAL, serta aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH. Hasil menunjukkan terjadinya perubahan signifikan pada karakteristik fisikokimia, meliputi warna kekuningan, rasa lebih asam, dan kekentalan menurun. Jumlah BAL meningkat dari $0,4 \times 10^6$ CFU/mL pada jam ke-6 menjadi $4,7 \times 10^6$ CFU/mL pada jam ke-30, disertai kenaikan kadar asam laktat hingga 0,077% dan penurunan pH dari 5 menjadi 2. Aktivitas antioksidan produk sangat tinggi dengan nilai IC₅₀ sebesar 47,06 ppm. Fermentasi spontan tanpa *bleaching* berpotensi menghasilkan susu kedelai sebagai pangan fungsional alami dengan kandungan bioaktif yang tetap terjaga.

Abstract

The demand for functional foods continues to increase, including soy-based products such as soy milk. One common technological process is *bleaching*, which may eliminate essential bioactive compounds. This study aimed to evaluate the physicochemical characteristics, lactic acid bacteria (LAB) growth dynamics, and antioxidant activity of spontaneously fermented soy milk without *bleaching* as a natural functional food alternative. The research was experimental, involving spontaneous fermentation of soy milk at room temperature for 6, 12, 18, 24, and 30 hours. Parameters observed included color, taste, viscosity, pH, lactic acid content, LAB population, and antioxidant activity measured by the DPPH method. Results revealed significant changes in physicochemical characteristics, with color shifting to yellowish tones, taste becoming more acidic, and viscosity decreasing. LAB counts increased from 0.4×10^6 CFU/mL at 6 hours to 4.7×10^6 CFU/mL at 30 hours, accompanied by an increase in lactic acid content up to 0.077% and a decrease in pH from 5 to 2. The antioxidant activity of the product was very high, with an IC₅₀ value of 47.06 ppm. Spontaneous fermentation without *bleaching* has the potential to produce soy milk as a natural functional food while preserving bioactive compounds.

1. Pendahuluan

Permintaan masyarakat terhadap pangan fungsional terus mengalami peningkatan, sejalan dengan meningkatnya kesadaran akan pentingnya kesehatan, pola makan seimbang, serta upaya pencegahan penyakit degeneratif seperti kanker, diabetes melitus, hipertensi, dan penyakit jantung koroner [1], [2]. Salah satu jenis pangan yang semakin mendapat perhatian adalah produk berbasis kedelai, seperti susu kedelai, yang dikenal memiliki kandungan protein nabati berkualitas tinggi, rendah lemak jenuh, bebas kolesterol, serta tidak mengandung laktosa, sehingga cocok dikonsumsi oleh individu dengan intoleransi laktosa maupun mereka yang menganut pola makan vegetarian [3]. Selain kandungan gizinya, susu kedelai juga kaya akan senyawa bioaktif, terutama isoflavon, flavonoid, serta antosianin, yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi [4], [5]. Senyawa-senyawa ini berperan penting dalam melindungi sel-sel tubuh dari kerusakan akibat radikal bebas, yang diketahui sebagai salah satu faktor pemicu stres oksidatif dan perkembangan penyakit degeneratif [6], [7].

Proses fermentasi diketahui dapat meningkatkan nilai fungsional susu kedelai, terutama melalui aktivitas mikroorganisme seperti bakteri asam laktat (BAL). Meski seluruh alat dan bahan telah melalui proses sterilisasi, fermentasi spontan tetap memungkinkan pertumbuhan BAL. Hal ini disebabkan oleh keberadaan mikroflora indigenous yang secara alami menempel pada permukaan biji kedelai, bahkan setelah proses perebusan singkat (pasteurisasi) yang tidak sepenuhnya membunuh semua mikroorganisme tahan panas [8], [9]. Selain itu, lingkungan proses termasuk udara, permukaan peralatan, dan tangan operator yang dapat menjadi sumber inokulum mikroba asam laktat, meski dalam jumlah kecil. BAL memiliki toleransi asam dan daya saing tinggi, sehingga mampu berkembang dominan dalam substrat susu kedelai yang kaya nutrisi. Oleh sebab itu, fermentasi spontan tetap terjadi meskipun tanpa penambahan starter inokulum secara sengaja.

BAL tidak hanya berperan dalam menghasilkan asam organik yang memengaruhi rasa, tekstur, dan stabilitas produk, tetapi juga berpotensi meningkatkan kandungan senyawa bioaktif, serta memproduksi metabolit sekunder yang memiliki efek fungsional, seperti bakteriosin, enzim proteolitik, dan senyawa antimikroba [8], [9]. Beberapa studi menunjukkan bahwa BAL juga dapat terlibat dalam transformasi komponen flavonoid dan antosianin ke bentuk aglikon yang lebih bioaktif, sehingga fermentasi mampu meningkatkan aktivitas antioksidan produk akhir [10].

Namun, salah satu proses teknologi yang kerap dilakukan dalam pengolahan susu kedelai adalah *bleaching*. Proses *bleaching* bertujuan menghilangkan warna kuning alami kedelai agar produk lebih putih dan menarik secara visual [11]. Meskipun demikian, *bleaching* dilaporkan dapat mereduksi kadar senyawa bioaktif, terutama antosianin dan flavonoid, yang berperan penting dalam aktivitas antioksidan produk berbasis kedelai [12], [5]. Oleh karena itu, pengolahan susu kedelai tanpa *bleaching* menjadi alternatif penting karena berpotensi mempertahankan senyawa bioaktif alami sekaligus meningkatkan nilai fungsionalnya melalui fermentasi, terutama jika fermentasi dilakukan secara spontan.

Sejumlah penelitian sebelumnya telah mengeksplorasi karakteristik susu kedelai fermentasi, baik dari sisi parameter mikrobiologis, fisikokimia, maupun aktivitas antioksidan [8], [13]. Namun, penelitian-penelitian tersebut umumnya mengkaji parameter-parameter tersebut secara terpisah. Sebagian studi hanya memfokuskan pada pertumbuhan BAL, sementara yang lain berfokus pada perubahan kimia atau peningkatan aktivitas antioksidan tanpa mempertimbangkan dinamika ketiganya secara terpadu. Selain itu, penelitian yang secara eksplisit mengintegrasikan efek *bleaching* atau ketiadaannya dalam fermentasi spontan susu kedelai masih sangat terbatas. Sampai saat ini belum ada penelitian yang secara komprehensif menelaah hubungan antara perubahan karakteristik fisikokimia

susu kedelai tanpa bleaching, dinamika populasi BAL selama fermentasi spontan, dan implikasinya terhadap aktivitas antioksidan dalam satu rangkaian desain penelitian.

Padahal, integrasi ketiga aspek tersebut sangat krusial karena parameter fisikokimia, dinamika BAL, dan aktivitas bioaktif saling mempengaruhi. Perubahan pH akibat fermentasi tidak hanya memodifikasi rasa dan tekstur, tetapi juga dapat meningkatkan stabilitas senyawa antosianin dalam bentuk flavilium serta memengaruhi transformasi biokimia senyawa fenolik yang berperan sebagai antioksidan. Dengan demikian, kajian terpadu diperlukan untuk memahami bagaimana fermentasi spontan tanpa bleaching dapat menghasilkan produk susu kedelai dengan kualitas sensori yang baik, karakteristik fisikokimia yang stabil, serta aktivitas antioksidan yang meningkat sehingga layak dikembangkan sebagai pangan fungsional.

Berdasarkan celah penelitian tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengkaji secara simultan perubahan karakteristik fisikokimia, dinamika BAL, dan aktivitas antioksidan susu kedelai fermentasi spontan tanpa bleaching. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemahaman yang lebih holistik serta menjadi dasar ilmiah dalam pengembangan susu kedelai fermentasi sebagai pangan fungsional tanpa perlakuan *bleaching* yang berpotensi menurunkan nilai bioaktifnya.

2. Metode Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi serta Laboratorium Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.

Instrumentasi. Bahan utama dalam penelitian ini menggunakan kedelai varietas kuning konsumsi dari satu sumber dan kelompok panen yang sama untuk meminimalkan variasi komposisi bioaktif antarsampel. Pengendalian ini penting agar perubahan aktivitas antioksidan, dinamika BAL, dan parameter fisikokimia yang diamati benar-benar mencerminkan efek fermentasi spontan, bukan perbedaan karakter dasar bahan baku. Bahan lainnya berupa gula pasir, aquadest, media de Man Rogosa Sharpe (MRS) agar, larutan NaOH 0,1 N, indikator fenoltalein, serbuk 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), serta methanol pro analysis (PA), dipersiapkan sesuai standar penelitian pangan fungsional [3], [9].

Prosedur kerja. Biji kedelai (300 g) direndam 12 jam, direbus pada suhu 80°C selama 20 menit, kemudian digiling dengan 1,5 L air. Bubur kedelai disaring menggunakan kain saring steril untuk menghasilkan sari kedelai, yang kemudian ditambah gula pasir 1,5% (b/v), dipanaskan 80–85°C selama 5 menit, lalu dimasukkan ke botol kaca steril dan dipasteurisasi ulang [11], [5]. Fermentasi dilakukan spontan tanpa penambahan starter. Proses inkubasi dilakukan pada suhu ruang ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) selama 6, 12, 18, 24, dan 30 jam [8]. Penggunaan suhu ruang ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) dipilih karena penelitian ini meniru kondisi fermentasi spontan yang lazim terjadi pada proses tradisional susu kedelai, di mana fermentasi berlangsung tanpa kontrol suhu. Rentang fluktuasi $\pm 2^\circ\text{C}$ masih berada dalam kisaran pertumbuhan BAL mesofilik sehingga tidak menghambat fermentasi dan tetap mencerminkan kondisi nyata. Jika digunakan inkubator bersuhu stabil, fermentasi akan berlangsung terlalu cepat dan tidak lagi merepresentasikan dinamika alami BAL campuran dalam fermentasi spontan. Oleh karena itu, suhu ruang dianggap lebih relevan dan aplikatif untuk tujuan penelitian ini.

Pengamatan organoleptik meliputi warna, rasa, dan kekekntalan. Pengamatan organoleptik pada penelitian ini dilakukan sebagai evaluasi deskriptif awal oleh peneliti, bukan sebagai uji hedonik atau uji organoleptik terstruktur. Pengamatan hanya mencakup

perubahan warna, aroma, dan rasa sebagai indikator kualitatif fermentasi, sehingga tidak melibatkan panelis terlatih maupun panelis konsumen. Evaluasi ini digunakan sebagai data pendukung untuk mengonfirmasi dinamika fisikokimia selama fermentasi, bukan sebagai dasar penilaian mutu sensori secara statistik.

Kekentalan diukur menggunakan viskometer Ostwald. Seluruh pengujian, termasuk pengukuran pH, kadar asam laktat, enumerasi BAL, dan uji aktivitas antioksidan DPPH dilakukan dalam tiga ulangan (triplo) untuk menjamin akurasi dan konsistensi hasil. Pengukuran pH dilakukan dengan pH meter digital. Kadar asam laktat ditentukan secara titrimetri, dengan penambahan indikator fenoltalein dan titrasi NaOH 0,1 N. Kadar dihitung dengan rumus :

$$\text{Asam laktat (\%)} = \frac{V \times N \times BE \times Fp}{\text{Massa sampel (g)}} \times 100$$

di mana V = volume titran (ml); N = normalitas NaOH; BE = 0,09 g/meq; Fp = faktor pengenceran [8].

Enumerasi BAL dilakukan metode *plate count*. Sebanyak 0,1 ml larutan pengenceran 10^{-4} hingga 10^{-6} diinokulasi ke MRS agar metode *pour plate*, kemudian diinkubasi selama tiga hari pada suhu ruang. Koloni dihitung, dilanjutkan uji pewarnaan Gram untuk konfirmasi morfologi BAL [9].

Uji aktivitas antioksidan dilakukan metode DPPH. Larutan DPPH 100 ppm dibuat dengan melarutkan 5 mg DPPH ke dalam 50 ml methanol PA. Sampel susu kedelai difermentasi diencerkan hingga konsentrasi 10, 30, 50, 70, dan 90 ppm. Sebanyak 2 ml sampel dicampur dengan 2 ml larutan DPPH, diinkubasi 30 menit dalam gelap, lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm [13]. Persentase inhibisi dihitung dengan rumus berikut:

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{\text{Ablanko} - \text{Asampel}}{\text{Ablanko}} \times 100$$

Nilai IC₅₀ ditentukan dari persamaan regresi linear antara konsentrasi dan % inhibisi, dengan interpretasi semakin rendah IC₅₀, semakin tinggi aktivitas antioksidan [12], [7].

Analisis data dilakukan secara deskriptif, mengingat penelitian ini bersifat eksploratif dan tidak membandingkan perlakuan. Waktu fermentasi diperlakukan sebagai rangkaian proses kontinu, sehingga tidak dianalisis menggunakan uji statistik inferensial. Nilai yang diperoleh disajikan sebagai rata-rata $\pm$ SD untuk menggambarkan konsistensi pengukuran.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Hasil Penelitian

Fermentasi spontan memengaruhi karakteristik fisik susu kedelai, meliputi warna, rasa, kekentalan, kadar asam laktat, dan pH. Selama proses fermentasi, warna susu kedelai mengalami perubahan dari putih pekat menjadi kekuningan intens pada akhir fermentasi 30 jam. Rasa susu kedelai berubah dari manis kedelai pada awal fermentasi menjadi asam tajam seiring bertambahnya waktu inkubasi. Kekentalan mengalami penurunan bertahap dari 5,25 cP menjadi 3,75 cP pada jam ke-30. Kadar asam laktat meningkat progresif dari 0,018% pada jam ke-6 menjadi 0,077% pada jam ke-30, sedangkan pH menurun dari 6,50 pada awal fermentasi menjadi 2,00 pada akhir fermentasi.

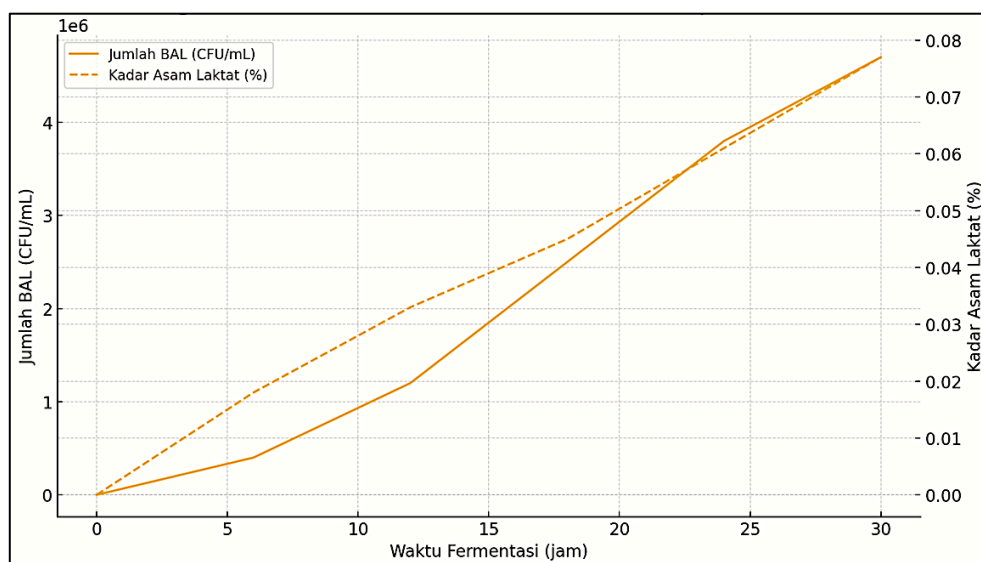
Data lengkap perubahan karakteristik fisik susu kedelai fermentasi spontan tanpa *bleaching* disajikan pada Tabel 1. Data ini menunjukkan perubahan parameter-parameter

tersebut pada berbagai waktu inkubasi, yang menjadi indikator keberhasilan fermentasi dan potensi produk sebagai pangan fungsional.

Tabel 1. Karakteristik fisik susu kedelai fermentasi spontan tanpa *bleaching*

Waktu Fermentasi (jam)	Warna	Rasa	Kekentalan (cP)	pH
0	Putih pekat	Manis kedelai	5,25	6,50
6	Putih keruh	Manis agak asam	5,85	5,00
12	Putih kekuningan	Asam lembut	5,47	4,20
18	Kuning pucat	Asam sedang	4,82	3,50
24	Kuning cerah	Asam kuat	4,30	2,80
30	Kuning intens	Asam tajam	3,75	2,00

Pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL) merupakan salah satu parameter penting dalam fermentasi spontan, karena berperan dalam produksi asam laktat dan pembentukan senyawa bioaktif. Grafik pada Gambar 1 menunjukkan perkembangan jumlah BAL dan kadar asam laktat selama fermentasi spontan susu kedelai tanpa *bleaching*, yang masing-masing meningkat signifikan seiring bertambahnya waktu inkubasi. Kurva garis penuh menunjukkan peningkatan jumlah BAL (CFU/mL), sedangkan kurva garis putus-putus menggambarkan akumulasi asam laktat (%). Keduanya memperlihatkan tren peningkatan yang konsisten sepanjang fermentasi, mencerminkan aktivitas metabolik BAL yang semakin intensif. Peningkatan jumlah BAL berkorelasi dengan peningkatan kadar asam laktat, yang berkontribusi pada penurunan pH dan perubahan karakteristik fisikokimia produk selama fermentasi. Visualisasi ini menegaskan bahwa fermentasi spontan berlangsung aktif dan stabil tanpa perlakuan *bleaching*.



Gambar 1. Perkembangan populasi bakteri asam laktat (BAL) dan kadar asam laktat selama fermentasi spontan susu kedelai tanpa *bleaching* pada interval waktu 0–30 jam

Aktivitas antioksidan susu kedelai fermentasi spontan tanpa *bleaching* dievaluasi menggunakan metode DPPH pada berbagai konsentrasi larutan sampel. Data persentase inhibisi radikal DPPH yang dihasilkan pada masing-masing konsentrasi ditampilkan pada Tabel 2. Nilai-nilai ini menjadi dasar perhitungan IC₅₀, yang mencerminkan kekuatan aktivitas antioksidan produk.

Tabel 2. Persentase inhibisi radikal DPPH oleh susu kedelai fermentasi spontan tanpa *bleaching*

Konsentrasi Sampel (ppm)	% Inhibisi DPPH (rata-rata $\pm$ SD)
10	21,47 $\pm$ 1,12
30	39,85 $\pm$ 1,05
50	56,03 $\pm$ 0,97
70	73,21 $\pm$ 1,08
90	89,44 $\pm$ 1,15

3.2 Pembahasan

Fermentasi spontan susu kedelai tanpa *bleaching* menunjukkan perubahan fisik yang nyata dan signifikan selama proses inkubasi. Pada awal fermentasi, susu kedelai memiliki warna putih khas, namun mulai menunjukkan perubahan menjadi kekuningan setelah melewati waktu fermentasi sekitar 18 jam. Fenomena perubahan warna ini diyakini berkorelasi erat dengan aktivitas metabolik bakteri asam laktat (BAL), yang menghasilkan pigmen tertentu serta senyawa metabolit sekunder selama fermentasi [8], [9], [14]. Selain itu, warna kuning alami kedelai yang tidak dihilangkan akibat tidak melalui proses *bleaching* juga memberikan kontribusi visual terhadap perubahan warna produk akhir [11]. Perubahan rasa dari manis menjadi asam teramati secara konsisten seiring dengan bertambahnya waktu fermentasi. Hal ini selaras dengan laporan bahwa produksi asam laktat selama fermentasi mengakibatkan penurunan pH, yang secara langsung memengaruhi persepsi rasa menjadi lebih tajam dan asam [3], [2]. Kondisi ini juga tercermin pada penurunan pH produk dari nilai awal sekitar 5 menjadi sekitar 2 pada akhir fermentasi 30 jam. Lingkungan yang semakin asam menjadi indikator keberhasilan fermentasi sekaligus berperan penting dalam pengendalian mikroba kontaminan, meningkatkan keamanan produk [10].

Kekentalan susu kedelai fermentasi spontan tercatat mengalami penurunan bertahap seiring lama inkubasi. Pengukuran dengan viskometer Ostwald menunjukkan viskositas yang kian menurun. Fenomena ini mengindikasikan terjadinya degradasi atau perubahan ikatan molekul protein kedelai akibat kondisi lingkungan yang semakin asam. Ketika pH mendekati titik isoelektrik protein kedelai (sekitar pH 4,6), interaksi antarmolekul protein menjadi minimal, sehingga protein lebih mudah terlarut dalam larutan, menghasilkan konsistensi produk yang lebih encer [3], [5].

Kekentalan susu kedelai fermentasi spontan menunjukkan dinamika khas proses fermentasi, dengan pola awal peningkatan diikuti penurunan pada fase lanjut. Pada jam ke-6, viskositas meningkat dari 5,25 cP menjadi 5,85 cP. Peningkatan sementara ini umum terjadi pada fase awal fermentasi ketika bakteri asam laktat (BAL) mulai memasuki fase adaptasi dan pertumbuhan awal. Pada tahap ini, beberapa strain BAL menghasilkan eksopolisakarida (EPS) dalam jumlah kecil sebagai respons protektif terhadap lingkungan baru. EPS yang bersifat hidrofilik dapat meningkatkan ketahanan aliran cairan sehingga viskositas tampak meningkat. Selain itu, pada pH sekitar 5,0, yang berada dekat dengan titik isoelektrik protein kedelai (pH 4,6), sebagian protein mengalami *micro-coagulation*. Penggumpalan mikro ini menambah resistensi aliran cairan dan memberikan kontribusi pada peningkatan viskositas awal.

Namun, setelah fase fermentasi memasuki waktu ≥ 12 jam, penurunan pH berlangsung lebih cepat akibat produksi asam laktat yang makin intensif. Lingkungan yang makin asam menyebabkan denaturasi protein, terurainya struktur globular, serta runtuhnya matriks EPS yang tidak stabil pada kondisi pH rendah. Akibatnya, viskositas berbalik menurun secara bertahap hingga mencapai 3,75 cP pada akhir fermentasi 30 jam. Mekanisme ini konsisten dengan laporan yang menunjukkan bahwa protein kedelai mudah

mengalami perubahan struktur pada kondisi asam, sehingga menurunkan kemampuan larutan menahan aliran [11]. Selain denaturasi kimiawi, penurunan viskositas juga dipengaruhi oleh aktivitas proteolitik BAL, yang melepaskan enzim protease dan mempercepat pemecahan ikatan peptida protein kedelai [8].

Fenomena kombinasi peningkatan viskositas awal dan penurunan viskositas lanjutan ini merupakan cerminan interaksi kompleks antara metabolisme BAL, karakteristik kimia protein kedelai, serta dinamika pH selama fermentasi. Dalam konteks produk pangan fungsional, perubahan kekentalan tersebut dapat menjadi pedang bermata dua: menghadirkan tekstur dan sensasi asam segar yang khas, namun tetap perlu disesuaikan dengan preferensi konsumen agar produk memiliki daya terima yang optimal di pasar [3].

Enumerasi mikrobiologi menunjukkan adanya peningkatan signifikan jumlah BAL selama fermentasi. Populasi BAL bertambah dari $0,4 \times 10^6$ CFU/mL pada 6 jam inkubasi, hingga mencapai $4,7 \times 10^6$ CFU/mL pada 30 jam fermentasi. Lonjakan populasi ini mencerminkan fase pertumbuhan logaritmik bakteri, di mana bakteri beradaptasi dengan lingkungan nutrisi baru sebelum tumbuh eksponensial [9]. Peningkatan jumlah BAL berkorelasi dengan meningkatnya produksi asam laktat, sejalan dengan jalur glikolisis, di mana glukosa dipecah menjadi asam piruvat dan selanjutnya direduksi menjadi asam laktat. Proses ini tidak hanya memengaruhi rasa produk, tetapi juga menciptakan kondisi lingkungan yang semakin asam, ditunjukkan oleh penurunan pH [8], [10]. Korelasi negatif antara jumlah BAL dengan nilai pH menjadi temuan penting, mengonfirmasi bahwa aktivitas metabolik BAL secara signifikan menurunkan pH medium fermentasi.

Menariknya, BAL dikenal sebagai mikroorganisme yang tidak hanya berperan dalam proses fermentasi dasar, tetapi juga menghasilkan berbagai metabolit sekunder seperti bakteriosin, senyawa antimikroba, serta enzim proteolitik yang dapat meningkatkan nilai fungsional produk fermentasi [9]. Aktivitas metabolik BAL juga berkontribusi pada transformasi senyawa polifenol, termasuk flavonoid dan antosianin, menjadi bentuk aglikon yang lebih bioaktif sehingga secara potensial meningkatkan kapasitas antioksidan produk [10], [5]. Dengan demikian, keberlimpahan populasi BAL dalam fermentasi spontan susu kedelai tidak hanya berfungsi dalam aspek keamanan mikrobiologis, tetapi juga menjadi faktor penting dalam meningkatkan bioaktivitas dan nilai fungsional produk akhir.

Selain kapasitas biotransformasi tersebut, BAL juga memberikan pengaruh yang signifikan terhadap profil aroma produk melalui produksi berbagai senyawa volatil. Selama metabolisme karbohidrat dan asam amino, BAL menghasilkan komponen volatil seperti asetaldehida, diasetil, asetoin, dan alkohol rantai pendek [14], [18]. Asetaldehida berkontribusi pada aroma asam-segar khas produk fermentasi nabati, sedangkan diasetil dan asetoin memberikan karakter *butter-like* atau *creamy* yang umum dijumpai pada yogurt atau kefir kedelai [9]. Seiring meningkatnya populasi BAL selama fermentasi, akumulasi senyawa volatil ini bertambah, sehingga aroma susu kedelai berubah dari manis-kacang pada fase awal menjadi aroma asam tajam dan lebih fermentatif pada jam ke-24 hingga 30.

Lebih jauh, aktivitas proteolitik BAL dalam memecah protein kedelai menjadi peptida dan asam amino bebas turut menghasilkan prekursor bagi senyawa volatil lainnya melalui jalur dekarboksilasi dan transaminasi [3]. Senyawa-senyawa hasil degradasi ini menambah kompleksitas aroma dan berkontribusi pada persepsi sensori keseluruhan produk. Oleh karena itu, perubahan aroma pada susu kedelai fermentasi spontan merupakan hasil sinergis antara akumulasi asam organik, produksi senyawa volatil khas fermentasi, dan modifikasi komposisi kimia matriks kedelai selama fermentasi berlangsung.

Kadar asam laktat selama proses fermentasi spontan menunjukkan tren peningkatan progresif dari 0,018% pada jam ke-6 menjadi 0,077% pada jam ke-30. Pola ini

mencerminkan aktivitas metabolik bakteri asam laktat (BAL) yang efisien dalam mengonversi glukosa menjadi asam laktat sebagai produk utama fermentasi homofermentatif [7]. Produksi asam laktat berlangsung secara kontinu selama substrat karbohidrat tersedia, sebagaimana dilaporkan oleh Yusmarini et al. [8] yang menunjukkan bahwa BAL secara aktif menyumbang pada penurunan pH lingkungan fermentasi.

Akumulasi asam laktat berimplikasi langsung pada dua aspek penting dalam mutu produk: pertama, menciptakan rasa asam yang menjadi ciri khas minuman fermentasi berbasis susu kedelai; dan kedua, menciptakan lingkungan asam yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen, sehingga meningkatkan stabilitas dan keamanan mikrobiologi produk [3], [15]. Penurunan pH dari nilai awal sekitar 5 menjadi sekitar 2 pada akhir fermentasi tidak hanya berdampak pada karakter sensorik, tetapi juga berperan dalam memperpanjang umur simpan melalui efek antimikroba alami dari asam organik [7]. Lebih lanjut, kondisi pH rendah terbukti mendukung kestabilan senyawa bioaktif seperti antosianin dan flavonoid dalam bentuk struktur flavilium, yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi [5]. Oleh karena itu, keberadaan asam laktat tidak semata-mata penanda fermentasi, tetapi juga komponen kunci dalam mempertahankan kualitas fungsional susu kedelai fermentasi.

Meskipun nilai pH akhir mencapai sekitar 2 pada jam ke-30, kondisi ini tidak dimaksudkan sebagai pH konsumsi, melainkan sebagai gambaran dinamika fermentasi spontan dalam skala laboratorium. Nilai pH ekstrem tersebut merupakan konsekuensi dari fermentasi yang dibiarkan berlangsung tanpa penghentian proses (*free-run fermentation*), sehingga menggambarkan batas bawah acidification yang dapat dicapai oleh BAL pada medium susu kedelai dengan kapasitas buffer yang rendah [7], [15]. Dalam praktik produksi pangan, minuman berbasis susu kedelai jarang dikonsumsi pada pH serendah ini karena dapat menimbulkan sensasi asam yang terlalu kuat dan tidak nyaman bagi konsumen.

Untuk aplikasi konsumsi, proses fermentasi umumnya dihentikan lebih awal, misalnya pada pH 3,5 - 4,5 yang merupakan kisaran paling umum dan dapat diterima pada produk fermentasi nabati seperti yogurt kedelai, kefir kedelai, atau minuman probiotik serupa [3], [10]. Penghentian fermentasi dapat dilakukan melalui pendinginan cepat (*rapid cooling*) atau pasteurisasi ringan untuk menstabilkan populasi BAL dan mencegah acidification berlanjut. Dengan demikian, nilai pH 2 pada penelitian ini perlu dipahami sebagai bagian dari tujuan analitis untuk memetakan batasan dinamika fermentasi spontan, bukan sebagai rekomendasi pH konsumsi produk akhir.

Pendekatan ini sejalan dengan praktik fermentasi komersial, di mana proses dikontrol untuk memperoleh keseimbangan optimal antara kestabilan mikrobiologis, cita rasa yang dapat diterima, dan kandungan bioaktif yang tetap tinggi. Oleh karena itu, meskipun hasil penelitian memperlihatkan kemampuan BAL menurunkan pH secara drastis, produk fermentasi yang ditujukan untuk konsumsi tetap memerlukan standarisasi pH guna mencapai tingkat palatabilitas yang sesuai.

Hasil pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH menunjukkan bahwa susu kedelai fermentasi spontan tanpa *bleaching* memiliki kapasitas antioksidan sangat tinggi, dengan nilai IC₅₀ sebesar 47,06 ppm. Nilai ini termasuk dalam kategori aktivitas antioksidan sangat kuat, berdasarkan klasifikasi Molyneux, yang menyatakan bahwa nilai IC₅₀ < 50 ppm menunjukkan kemampuan antioksidan yang sangat tinggi dalam mereduksi radikal bebas [13], [16], [19]. Dengan demikian, susu kedelai fermentasi spontan tanpa bleaching menunjukkan kapasitas antioksidan yang signifikan dan kompetitif dibandingkan minuman fermentasi nabati lainnya.

Kapasitas antioksidan yang tinggi ini diduga bersumber dari senyawa bioaktif alami kedelai, seperti antosianin, flavonoid, dan isoflavon, yang tetap terjaga karena tidak melalui

proses bleaching. Selain itu, proses fermentasi spontan yang menurunkan pH hingga kisaran 2–3 menciptakan kondisi ideal bagi stabilisasi struktur flavilium antosianin, yakni bentuk paling aktif dalam menangkal radikal bebas [5], [10]. Senyawa flavilium memiliki banyak gugus hidroksil yang mampu bertindak sebagai donor proton, sehingga efektif memutus rantai reaksi radikal bebas dan melindungi sel dari kerusakan oksidatif [6].

Selain efek stabilisasi kimia, bakteri asam laktat (BAL) yang berkembang selama fermentasi juga berperan penting. BAL diketahui memproduksi enzim β -glukosidase yang mampu memecah ikatan glikosida flavonoid, menghasilkan bentuk aglikon yang memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi [10], [18]. Dengan demikian, fermentasi spontan tidak hanya mempertahankan senyawa antioksidan yang ada, tetapi juga berpotensi meningkatkan bioaktivitas senyawa-senyawa tersebut melalui transformasi enzimatik.

Sebagai perbandingan, susu kedelai fermentasi spontan yang mengalami bleaching dilaporkan memiliki nilai IC_{50} lebih tinggi, yakni 48,98 ppm, yang menunjukkan penurunan kapasitas antioksidan akibat hilangnya sebagian senyawa bioaktif selama perlakuan bleaching [11], [12]. Proses bleaching memang diketahui menyebabkan degradasi signifikan terhadap senyawa fenolik dan pigmen alami kedelai, terutama kelompok flavonoid, isoflavon (genistein dan daidzein), serta antosianin, yang merupakan kontributor utama aktivitas antioksidan [11], [12], [20]. Senyawa-senyawa ini sangat sensitif terhadap suhu tinggi, oksidasi, dan kondisi alkali ringan yang kerap digunakan dalam proses bleaching, sehingga rentan mengalami kerusakan atau perubahan struktur kimia.

Beberapa studi melaporkan bahwa antosianin mudah mengalami degradasi cincin flavilium ketika terpapar panas atau lingkungan alkali, mengakibatkan penurunan kemampuannya dalam mendonorkan proton untuk menetralkan radikal bebas [20]. Demikian pula, isoflavon bentuk glikosida seperti genistin dan daidzin cenderung terhidrolisis atau teroksidasi selama *bleaching*, mengurangi ketersediaan bentuk aglikon yang lebih aktif secara antioksidan [21]. Degradasi kumulatif dari berbagai komponen bioaktif inilah yang menjelaskan mengapa nilai IC_{50} susu kedelai hasil fermentasi dengan bleaching lebih tinggi, mencerminkan kapasitas antioksidan yang lebih rendah.

Fakta ini memperkuat argumen bahwa fermentasi spontan tanpa *bleaching* merupakan strategi pengolahan yang sederhana namun efektif untuk mempertahankan kandungan senyawa fenolik dan pigmen alami kedelai, sekaligus menghasilkan produk dengan potensi bioaktivitas yang lebih tinggi. Lebih jauh, aktivitas antioksidan yang kuat pada produk fermentasi tanpa bleaching tidak hanya memberikan nilai nutrisi, tetapi juga berpotensi memberikan manfaat kesehatan fisiologis. Sejumlah penelitian telah mengaitkan konsumsi antioksidan alami dengan penurunan risiko penyakit degeneratif seperti arteriosklerosis, kanker, dan diabetes tipe 2 [6]. Dengan demikian, fermentasi spontan tanpa bleaching membuka peluang besar bagi pengembangan produk susu kedelai alami yang sehat dan memiliki daya saing tinggi di pasar pangan fungsional.

Hubungan antara pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL), produksi asam organik, dan perubahan pH selama fermentasi susu kedelai menunjukkan pola yang saling terkait erat dan tidak dapat dipisahkan. Peningkatan populasi BAL dari $0,4 \times 10^6$ menjadi $4,7 \times 10^6$ CFU/mL mencerminkan aktivitas metabolik yang intensif, khususnya konversi glukosa menjadi asam laktat sebagai produk utama fermentasi homofermentatif [7], [8]. Peningkatan kadar asam laktat yang terukur dari 0,018% menjadi 0,077% berbanding lurus dengan peningkatan jumlah BAL, menunjukkan adanya hubungan positif antara aktivitas metabolik BAL dan akumulasi total asam organik. Akan tetapi, kadar asam laktat tersebut tampak tidak sebanding dengan penurunan pH drastis hingga mencapai pH 2,00. Fenomena ini dapat dijelaskan melalui akumulasi asam organik minor seperti asetat, format, dan butirat yang

dihasilkan BAL selama fermentasi spontan, sebagaimana dilaporkan oleh beberapa studi fermentasi nabati [9], [14]. Selain itu, matriks susu kedelai memiliki kapasitas buffer yang lebih rendah dibandingkan susu hewani, sehingga sedikit perubahan konsentrasi ion hidrogen dapat menurunkan pH dengan cepat [5].

Korelasi negatif yang kuat antara pH dan pertumbuhan BAL mengindikasikan bahwa semakin tinggi aktivitas BAL, semakin cepat proses *acidification* berlangsung. Penurunan pH dari 6,50 menjadi 2,00 tidak hanya dipengaruhi oleh akumulasi asam laktat, tetapi juga oleh penurunan kapasitas *buffer* akibat degradasi protein dan pelepasan ion-ion bermuatan selama fermentasi [11]. Penurunan pH ini berkonsekuensi terhadap sifat fisikokimia produk, termasuk penurunan viskositas pada fase akhir fermentasi akibat denaturasi protein kedelai dan runtuhnya struktur eksopolisakarida (EPS) yang tidak stabil di bawah kondisi sangat asam [3], [8].

Temuan ini sejalan dengan laporan-laporan sebelumnya yang menyatakan bahwa dinamika pH selama fermentasi merupakan refleksi dari sinergi antara pertumbuhan BAL, produksi total asam organik, dan karakteristik kimia medium [10], [15]. Oleh karena itu, interpretasi hasil penelitian ini perlu melihat ketiga parameter tersebut sebagai satu rangkaian proses biokimia yang saling memengaruhi, bukan sebagai variabel yang berdiri sendiri. Integrasi ini memberikan gambaran yang lebih komprehensif mengenai mekanisme fermentasi spontan susu kedelai tanpa *bleaching*, sekaligus memperkuat validitas temuan melalui pola korelasi biologis dan kimiawi yang konsisten sepanjang waktu fermentasi

4. Kesimpulan

Fermentasi spontan susu kedelai tanpa *bleaching* menyebabkan perubahan signifikan pada karakteristik fisikokimia, termasuk perubahan warna menjadi kekuningan, penurunan kekentalan, serta rasa semakin asam. Jumlah BAL meningkat drastis seiring waktu fermentasi, diikuti peningkatan kadar asam laktat dan penurunan pH. Aktivitas antioksidan susu kedelai fermentasi spontan tanpa *bleaching* tergolong sangat kuat dengan nilai IC50 sebesar 47,06 ppm. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa fermentasi spontan tanpa *bleaching* berpotensi menghasilkan produk susu kedelai sebagai pangan fungsional alami dengan manfaat kesehatan yang tinggi, sekaligus memiliki karakteristik organoleptik yang khas. Penelitian lanjutan diperlukan untuk mengeksplorasi preferensi konsumen terhadap produk ini dan potensi skalabilitasnya secara komersial.

Daftar Pustaka

- [1] N. Granato, G. A. Branco, F. Nazzaro, M. Cruz, J. F. F. de Souza, and F. Shahidi, "Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products," *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 19, no. 6, pp. 2026–2049, 2020, doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00110.x.
- [2] L. J. Messina and M. J. Messina, "Insights gained from 20 years of soy research," *The Journal of Nutrition*, vol. 140, no. 12, pp. 2289S–2295S, 2010, doi: 10.3945/jn.110.124107.
- [3] J. Chien, Y. Hsieh, and C. Kao, "Soy milk and related products," in *Soybeans: Chemistry, Production, Processing, and Utilization*, L. A. Johnson, P. J. White, and R. Galloway, Eds., Urbana, IL: AOCS Press, pp. 731–760, 2008.
- [4] P. Rizzo, "Soy, soy phytoestrogens and health: An update," *Maturitas*, vol. 95, pp. 103–111, 2017.
- [5] J. Wang, X. Sun, and X. Zhang, "Effect of fermentation on the antioxidant activity in soybean and soy products: a review," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 61, no. 7, pp. 1112–1127, 2021.
- [6] S. Rimbach, K. Boesch-Saadatmandi, C. Frank, and P. Wagner, "Bioactivity and metabolism of soy isoflavones and their impact on human health," *Molecular Nutrition & Food Research*, vol. 52, no. 1, pp. 30–42, 2008.
- [7] H. Xu and J. Chang, "Characterization of phenolic substances and antioxidant activity of soybeans grown in North Dakota, USA," *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 63, no. 1, pp. 1–8, 2008, doi: 10.1021/jf801451k.

- [8] J. L. Liu, "Fermented soy foods and their potential health benefits: A review," *Journal of Functional Foods*, vol. 14, pp. 486–497, 2015.
- [9] K. D. Kavitha, M. S. Kandasamy, T. Devi, and M. Shetty, "Probiotic bacteria isolated from traditional fermented foods: A review," *Food Bioscience*, vol. 13, pp. 1–10, 2016.
- [10] R. Hur, S. Lee, and C. Chae, "Effect of lactic acid fermentation on phenolic profiles and antioxidant capacity of soybean," *Journal of Food Science and Technology*, vol. 51, no. 10, pp. 2901–2908, 2014.
- [11] R. S. Akhtar, N. Ahmad, and A. Ahmad, "Soybean processing and utilization," in *Soybean - Biomass, Yield, and Productivity*, IntechOpen, 2018.
- [12] S. Li, X. Chen, and Z. Zhang, "Antioxidant and antimicrobial activities of plant extracts used in traditional Chinese medicine," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 14, p. 211, 2014.
- [13] K. Prior, X. Wu, and L. Schaich, "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 10, pp. 4290–4302, 2005, doi: 10.1021/jf0502698.
- [14] C. Blandino, M. Al-Aseeri, and C. Pandiella, "Cereal-based fermented foods and beverages," *Food Research International*, vol. 41, no. 9, pp. 850–868, 2008, doi: 10.1016/S0963-9969(03)00009-7.
- [15] H. Patras, N. Brunton, and C. Tiwari, "Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods: mechanisms and kinetics of degradation," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 21, no. 1, pp. 3–11, 2010, doi: 10.1016/j.tifs.2009.07.004.
- [16] K. Okoth, R. Baraza, and L. A. Kunyanga, "Antioxidant activity of soy-based fermented products," *Food Science and Nutrition*, vol. 6, no. 3, pp. 820–827, 2018.
- [17] J. Li, W. Yu, and S. Luo, "Effect of fermentation time on antioxidant activity and sensory quality of fermented soy milk," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 113, p. 108293, 2019, doi: 10.1016/j.lwt.2019.108293.
- [18] B. S. Swain, S. Singh, and P. Mohanty, "Bio-transformation of phenolic compounds by lactic acid bacteria: A review," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 61, no. 9, pp. 1521–1533, 2021, doi: 10.1080/10408398.2020.1769538.
- [19] P. Molyneux, "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity," *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, vol. 26, no. 2, pp. 211–219, 2004, doi: 10.1287/sjst26.2.211-219.2004.
- [20] M. Shimizu, H. Koyama, and T. Suzuki, "Thermal and pH stability of anthocyanins in plant-based matrices: mechanisms of degradation and structural transformation," *Journal of Food Biochemistry*, vol. 44, no. 6, pp. e13212, 2020.
- [21] R. Xu and S. K. Chang, "Isoflavone stability in soymilk during thermal processing and storage," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, no. 6, pp. 1799–1807, 2008.