

Produksi sari pepaya (*Carica papaya*) fermentasi sebagai minuman probiotik antihiperkolesterolemia

*Production of fermented papaya (*Carica papaya*) juice as a probiotic beverage for antihypercholesterolemic*

R. Haryo Bimo Setiarto^{1*}, Nunuk Widhyastuti¹, Nandani Dwi Octavia², dan Herson Cahaya Himawan²

¹ Laboratorium Mikrobiologi Pangan, Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi LIPI
Jalan Raya Jakarta-Bogor Km 46, Kawasan CSC Cibinong 16911, Jawa Barat, Indonesia

² Program Studi Farmasi Sekolah Tinggi Teknologi Industri dan Farmasi Bogor
Jalan Kumbang No. 23 Bogor 1615, Jawa Barat, Indonesia

* e-mail: haryobimo88@gmail.com



INFO ARTIKEL

Sejarah artikel:

Diterima:
27 April 2018
Direvisi:
20 Juni 2018
Diterbitkan:
28 Juni 2018

Kata kunci:

formulasi;
sari pepaya probiotik;
fermentasi;
antihiperkolesterolemia

ABSTRAK

Minuman probiotik dapat digunakan sebagai terapi antihiperkolesterolemia. Salah satu bahan potensial untuk minuman probiotik yaitu pepaya (*Carica papaya*) yang dapat difermentasi menggunakan bakteri asam laktat. Tujuan penelitian ini adalah memperoleh formula kultur campuran bakteri asam laktat yang tepat untuk memproduksi minuman sari pepaya probiotik yang mampu menurunkan kadar kolesterol total pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague Dawley. Sari pepaya difermentasi menggunakan formulasi kultur campuran bakteri asam laktat yang berbeda, terdiri dari A (*Lactobacillus bulgaricus*: *Lactobacillus acidophilus*: *Streptococcus thermophilus*); B (*Lactobacillus plantarum*: *Lactobacillus acidophilus*: *Streptococcus thermophilus*); C (*Lactobacillus casei*: *Lactobacillus acidophilus*: *Streptococcus thermophilus*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa formula terbaik minuman sari pepaya probiotik menggunakan kultur campuran A berdasarkan parameter pH, total asam laktat dan total bakteri asam laktat. Setelah dilakukan uji kolesterol total, maka didapatkan hasil bahwa minuman sari pepaya probiotik dapat menurunkan kadar kolesterol total dengan persentase penurunan sebesar 17,51%. Minuman sari pepaya probiotik dapat diaplikasikan untuk terapi antihiperkolesterolemia pada manusia dengan dosis sebesar 55,56 ml per hari.

ABSTRACT

Keywords:

formulation;
probiotic extract
papaya;
fermentation;
antihypercholesterolemic

Probiotic beverages can be used as antihypercholesterolemia therapy. One potential ingredient for probiotic drinks is papaya (*Carica papaya*) which can be fermented using lactic acid bacteria. The aim of this research is to get the right mixture of lactic acid bacteria culture formula to produce probiotic papaya juice which can decrease total cholesterol level in white rats (*Rattus norvegicus*) of Sprague Dawley strain. The papaya juice is fermented using a mixed culture formulation of different lactic acid bacteria, comprising A (*Lactobacillus bulgaricus*: *Lactobacillus acidophilus*: *Streptococcus thermophilus*); B (*Lactobacillus plantarum*: *Lactobacillus acidophilus*: *Streptococcus thermophilus*); C (*Lactobacillus casei*: *Lactobacillus acidophilus*: *Streptococcus thermophilus*). The results showed that the best formula of probiotic papaya juice mixed using A mixture culture based on pH parameter, total lactic acid and total lactic acid bacteria. After the total cholesterol test, the results obtained that probiotic papaya juice beverage can reduce total cholesterol levels with a decrease percentage of 17.51%. Probiotic papaya juice beverage can be applied to antihypercholesterolemia therapy in humans at doses of 55.56 ml each day.

1. Pendahuluan

Perubahan gaya hidup dan pola makan yang kurang sehat dapat berdampak pada masalah kesehatan berupa penyakit degeneratif yaitu hiperkolesterolemia (*The American College of Obstetricians and Gynecologists*, 2013). Hiperkolesterolemia merupakan kondisi ketika kadar kolesterol darah melebihi batas normal yaitu di atas 200 mg/dl. Kelebihan kolesterol dalam darah akan mengakibatkan penyakit arteri koroner (CAD) dan pembuluh darah perifer (PVD) (Stapleton *et al.*, 2010). Hiperkolesterolemia atau tingginya kadar kolesterol dalam darah dapat diatasi dengan mengonsumsi minuman probiotik. Minuman probiotik merupakan minuman yang mengandung bakteri probiotik yang mempunyai efek menguntungkan bagi kesehatan pencernaan karena dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen, mencegah diare dan sembelit (Suhartini, 2009). Gianti dan Evanuarini (2011) menyatakan bahwa proses fermentasi bahan pangan dapat meningkatkan cita rasa, aroma, tekstur dan kandungan utama dari bahan pangan tersebut. Selain itu, fermentasi dapat menurunkan kadar gula dan menghasilkan dampak pengasaman sehingga memberikan rasa segar (Tamminen *et al.*, 2013).

Saat ini telah banyak dikembangkan minuman probiotik yang berbahan dasar selain susu yaitu menggunakan sari buah. Minuman ini dapat menjadi alternatif bagi masyarakat yang tidak dapat mengonsumsi minuman berbahan dasar susu karena alergi terhadap protein hewani atau intoleransi terhadap laktosa. Salah satu bahan potensial yang dapat digunakan sebagai minuman probiotik yaitu buah pepaya.

Buah pepaya banyak mengandung zat-zat kimia yang bermanfaat bagi pembuluh darah. Buah pepaya mengandung betakaroten dan vitamin C yang berperan sebagai antioksidan yang dapat mencegah pembentukan radikal bebas dan peroksidasi lipid. Kandungan pektin pada buah pepaya menyebabkan terjadinya eliminasi kolesterol dari tubuh dalam bentuk asam empedu yang mengakibatkan tubuh menggunakan kolesterol dalam darah untuk menggantikan asam empedu yang hilang (Endrinaldi, 2012). Buah pepaya juga mengandung serat yang dapat menurunkan kadar kolesterol dengan menghambat enzim HMG-KoA reduktase sehingga sintesis kolesterol akan terhambat serta dapat mengikat asam empedu dan membentuk misel yang akan dikeluarkan melalui feses (Dewi dan Probosari, 2012). Selain itu, pepaya mengandung gula sebagai sumber karbon yang dapat diuraikan melalui proses fermentasi mikroba (Krishna *et al.*, 2008).

Proses fermentasi dilakukan oleh bakteri asam laktat yang merupakan agensia probiotik. Pada penelitian ini dilakukan formulasi beberapa variasi kultur campuran

bakteri asam laktat diantaranya *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* dan *Streptococcus thermophilus*. Selanjutnya dipilih formula kultur campuran bakteri asam laktat terbaik untuk memproduksi minuman sari pepaya probiotik berdasarkan parameter total bakteri asam laktat. Kultur campuran bakteri asam laktat lebih menguntungkan karena dapat meningkatkan laju pertumbuhan bakteri sehingga produksi asam laktat meningkat dan tidak mudah terkontaminasi (Cagno *et al.*, 2008).

Pemanfaatan *Lactobacillus bulgaricus* sangat berperan dalam pembentukan aroma minuman sari pepaya probiotik. *Lactobacillus plantarum* digunakan dalam proses fermentasi karena selain merupakan bakteri probiotik, bakteri ini juga biasa digunakan pada fermentasi sayur dan buah (Primurdia dan Kusnadi, 2014). *Lactobacillus casei* juga mampu memproduksi asam laktat serta bakteriosin yang dapat menekan pertumbuhan dan membunuh bakteri patogen dalam usus. *Lactobacillus acidophilus* merupakan bakteri probiotik yang dapat menurunkan keasaman dengan cepat, sedangkan *Streptococcus thermophilus* lebih berperan pada citarasa dari minuman probiotik (Jannah *et al.*, 2014).

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* merupakan kelompok jenis bakteri asam laktat yang bersifat homofermentatif. Bakteri asam laktat yang bersifat homofermentatif dapat memproduksi asam laktat sebagai produk mayoritas dari fermentasi karbohidrat dan sebagian kecil asetat melalui jalur heksosa difosfat (HDP) atau disebut juga *Embden – Meyerhoff Pathway*. Sementara itu bakteri asam laktat yang bersifat heterofermentatif dapat menghasilkan asam laktat dari fermentasi karbohidrat melalui jalur *heksosa monofosfat* (HMP) atau biasa juga disebut jalur fosfoketolase dan jalur pentosa fosfat. Asam laktat yang terbentuk pada proses fermentasi sebagian besar diubah menjadi asam asetat, asam propionat dan butirat melalui jalur asetil-KoA (Novia, 2012).

Minuman sari pepaya (*Carica papaya*) probiotik yang difermentasi menggunakan formula kultur campuran bakteri asam laktat terpilih selanjutnya diuji pada hewan uji berupa tikus jantan dan dianalisis kadar kolesterol totalnya untuk membuktikan aktivitas antihiperkolesterolemianya. Menurut Septianggi *et al.* (2013) asupan tinggi kolesterol adalah kuning telur burung puyuh. Telur burung puyuh mengandung kolesterol yang sangat tinggi yaitu sebanyak 3640 mg dalam 10 gramnya. Dengan demikian, pemberian asupan tinggi kolesterol dengan kuning telur burung puyuh selama 1 minggu berturut-turut pada tikus jantan dapat menaikkan kadar kolesterol tikus (Larasati, 2017).

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi salah satu alternatif terapi antihiperkolesterolemia bagi masyarakat. Tujuan penelitian ini adalah memperoleh formula kultur campuran bakteri asam laktat yang tepat

untuk memproduksi minuman sari pepaya probiotik dan mengetahui aktivitasnya dalam menurunkan kadar kolesterol total pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague Dawley.

2. Metode

Bahan penelitian adalah sebagai berikut: buah pepaya California yang berasal dari perkebunan pepaya California di Ciseeng Parung Bogor berumur 6 bulan, kultur murni *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* koleksi Laboratorium Mikrobiologi Pangan Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Media De Man Rogosa Sharpe Broth (MRSB) (Himedia), Bacto agar (Pronadisa), indikator fenoltalein, NaCMC, NaOH (Emsure), asam oksalat, vaselin, spiritus, aquades, alkohol 70%, susu pasteurisasi, tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague Dawley diperoleh dari Laboratorium Balai Penelitian Veteriner (Balitvet) Bogor, pakan tikus BR2, sekam, kuning telur puyuh dan simvastatin.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: autoklaf (Hiclave HFE-50 Japan), blender (Philips Netherland), pisau, neraca digital (AND 300 Japan), termometer, waterbath (Grant W14 UK), erlenmeyer (Iwaki Japan), beaker glass, pH meter (Laqua PH1100 Japan), botol semprot, tisu, laminar, sentrifugator (Kubota 5910 Japan), sentrifugator (Kubota 6500 Japan), botol corning, botol sentrifugasi, buret, klem, statif, corong, tabung reaksi, homogenizer (Stuart UK), mikropipet 5 mL (Gilson UK), mikropipet 1 mL (Gilson UK), mikropipet 200µL (Sibata Japan), white tip, blue tip, yellow tip, aluminium foil, tabung reaksi, plastik, kertas, karet, bunsen, cawan petri, spread, kawat ose, rak tabung, gelas plastik, inkubator (Isuzu Japan), microwave (Electrofast UK), gunting bedah, sonde, test strip kolesterol (Easy Touch USA), kolesterolmeter (Easy Touch USA) dan kandang tikus.

2.1. Pembuatan starter kultur campuran

Masing-masing bakteri dari media cair MRSB dipipet sebanyak 3 mL, kemudian dimasukkan ke dalam media MRSB sebanyak 150 mL dalam erlenmeyer. Media MRSB yang sudah dimasukkan bakteri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam (Jannah *et al.*, 2014). Selanjutnya, starter dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang telah disterilasi dengan perbandingan masing-masing 1:1:1 sebagai berikut: A (*Lactobacillus bulgaricus* : *Lactobacillus acidophilus* : *Streptococcus thermophilus*); B (*Lactobacillus casei* : *Lactobacillus acidophilus* : *Streptococcus thermophilus*); C (*Lactobacillus plantarum* : *Lactobacillus acidophilus* : *Streptococcus thermophilus*)

2.2. Pembuatan minuman sari pepaya probiotik

Pembuatan sari pepaya dilakukan dengan mencuci buah pepaya yang sudah dikumpulkan hingga bersih dan memotong buah pepaya tersebut berbentuk dadu berukuran kecil. Buah pepaya yang sudah bersih dan dipotong dadu selanjutnya dimasukkan ke dalam

blender, untuk dihaluskan. Setelah itu hasilnya disentrifugasi dengan kecepatan 8500 rpm selama 15 menit suhu 24 °C dan diambil supernatannya.

2.3. Formulasi kultur bakteri asam laktat untuk pembuatan minuman sari pepaya probiotik

Supernatan sari pepaya hasil sentrifugasi ditambahkan susu dengan perbandingan 2:1 kemudian dipasteurisasi pada suhu 61-63 °C selama 30 menit kemudian diberikan beberapa variasi kultur campuran starter bakteri asam laktat dengan variasi A, B dan C sebanyak 7,5% (v/v) ke dalam sari pepaya kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 6 jam. Parameter yang diamati selama formulasi kultur bakteri asam laktat untuk pembuatan minuman sari pepaya probiotik adalah nilai pH, total asam laktat, total koloni bakteri asam laktat (Association of Official Analytica Chemists, 1999) untuk mengetahui kualitas minuman sari pepaya probiotik yang dihasilkan.

2.4. Uji organoleptik

Uji organoleptik dilakukan dengan menggunakan metode uji hedonik (Suryono *et al.*, 2005) yang meliputi respon panelis terhadap warna, aroma, tekstur dan rasa. Kriteria penilaian yang digunakan yaitu: amat sangat suka, sangat suka, suka, biasa, tidak suka, sangat tidak suka amat sangat tidak suka dengan skala numerik dari 1 sampai 7. Uji organoleptik dilakukan di daerah Bogor terhadap 30 orang panelis tidak terlatih. Evaluasi sensorik dilakukan untuk memvalidasi kualitas produk minuman sari pepaya probiotik yang kualitas sensoriknya layak diterima oleh konsumen.

2.5. Pengujian efek antihiperkolesterolemia

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang digunakan dalam penelitian diadaptasi selama 1 minggu. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar kolesterol total awal tikus sebelum diberi perlakuan. Sebelum tikus percobaan diberi perlakuan, terlebih dahulu tikus diberi asupan tinggi kolesterol (Larasati, 2017). Tikus diinduksi kuning telur puyuh sebanyak 1 ml yang mengandung kolesterol 29 mg selama tujuh hari untuk menaikkan kadar kolesterol. Hewan uji yang telah diberikan asupan tinggi kolesterol kemudian diberikan perlakuan dengan pemberian minuman sari pepaya probiotik, kontrol positif (simvastatin) dan kontrol negatif (aquades) masing-masing sebanyak 1 ml (Fahri *et al.*, 2005).

Sebanyak 30 tikus yang telah dibagi menjadi 3 kelompok diadaptasi dengan pakan standar BR-2 selama 7 hari. Kelompok I (kontrol negatif/ aquades), kelompok II (kontrol positif/ simvastatin) dan kelompok III (minuman sari pepaya sinbiotik). Kemudian kadar kolesterolnya dianalisis, sebelum pengukuran kadar kolesterol tikus dipuasakan selama 12 jam. Adapun prosedur pengukuran kolesterolnya yaitu tikus dipegang dan ekor tikus dicelupkan ke dalam air hangat. Sampel darah pada tikus kemudian diambil melalui ekor tikus dengan cara memotong ujung ekor tikus (National Advisory Committee for Laboratory Animal Research,

2004). Sampel darah ditetaskan di strip kolesterol pada kolesterolmeter dan ditunggu beberapa detik kemudian dibaca kadar kolesterolnya (National Institute of Health, 2001). Setelah dilakukan proses adaptasi, semua kelompok perlakuan diberi pakan tinggi kolesterol, yaitu larutan kuning telur puyuh sebanyak 1 mL yang mengandung kuning telur puyuh sebanyak 0,0296 gram selama 7 hari. Setelah tujuh hari diukur kadar kolesterolnya, kemudian dilanjutkan dengan pemberian akuades sebanyak 1 mL pada kelompok I (kontrol negatif), simvastatin 0,9 mg/kg BB pada kelompok II (kontrol positif) dan minuman sari pepaya probiotik secara oral sebanyak 1 ml pada kelompok III. Pemberian dilakukan dengan cara disonde setiap hari sekali selama 7 hari berturut-turut, kemudian kadar kolesterol total diukur dan dicatat.

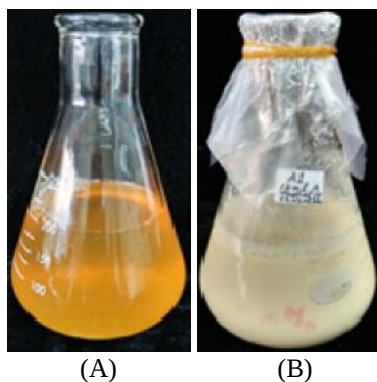
2.6. Analisa data

Data hasil analisis viabilitas bakteri asam laktat, pH, total asam tertitrisasi, uji organoleptik dan kadar kolesterol untuk setiap perlakuan yang diuji selanjutnya dianalisis menggunakan aplikasi SPSS versi 16 dengan one way anova dan dilanjutkan dengan uji lanjut Tukey HSD.

3. Hasil dan pembahasan

3.1. Formulasi kultur bakteri asam laktat untuk produksi minuman sari pepaya probiotik

Perlakuan fermentasi sari pepaya dibagi menjadi 3 kelompok sesuai dengan variasi kultur campuran yang dianalisis. Penambahan kultur campuran bakteri asam laktat dilakukan ke dalam sari pepaya sebanyak 7,5% dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 6 jam. Berdasarkan studi orientasi yang dilakukan penambahan kultur campuran sebanyak 7,5% dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 6 jam menghasilkan minuman sari pepaya probiotik dengan kualitas organoleptis yang baik. Hal ini sesuai dengan penelitian Khusaini (2014) yang menyatakan bahwa penambahan starter 7,5% dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 6 jam memberikan pengaruh yang nyata terhadap hasil uji organoleptik.



Gambar 1. (A) Sari Pepaya (B) Minuman Sari Pepaya Probiotik

Terjadi perubahan sifat organoleptis pada minuman sari pepaya probiotik baik pada rasa, aroma, tekstur dan warna. Susu yang dicampurkan pada sari pepaya membuat sari pepaya berwarna putih kekuningan

(Gambar 1). Beta karoten pada pepaya merupakan zat warna sehingga menjadikan pepaya berwarna kuning kemerahan. Adanya perubahan warna dari warna putih kekuningan pada sari pepaya sebelum fermentasi menjadi warna putih setelah proses fermentasi dikarenakan pemanasan dengan suhu tinggi pada saat proses pasteurisasi dan waktu yang digunakan selama proses fermentasi. Lama pemanasan pada suhu tinggi pada pepaya dapat menurunkan kecerahan dan meningkatkan kehilangan warna merah dan kuning pada pepaya.

Selain sifat organoleptis, hasil pengamatan pH pada minuman sari pepaya probiotik menurun antara 4,31 – 4,80 dari pH sari pepaya sebelum fermentasi adalah 6,57 (Tabel 1). Menurut Hesselstine *et al.* (1992) secara umum *Lactobacillus* dan *Pediococcus* menurunkan pH sekitar 3,5 – 4 dan beberapa *Leuconostoc* dan *Streptococcus* menurunkan pH hingga 4 - 4,5. Penurunan pH pada minuman sari pepaya probiotik diakibatkan oleh aktivitas bakteri asam laktat yang digunakan dalam proses fermentasi. Akibat dari aktivitas tersebut maka terjadilah proses glikolisis dimana glukosa dari sari pepaya maupun laktosa dari susu akan dipecah menjadi asam laktat yang pada akhirnya dapat menurunkan pH minuman sari pepaya probiotik. Bakteri asam laktat mengolah gula susu alami menjadi asam laktat, sehingga pH minuman probiotik berkisar antara 4-5. Pada pH ini dapat mencegah terjadinya perbanyakan sel (proliferasi) dari bakteri patogen (Santoso, 2014).

Tabel 1

Hasil uji pH, total asam laktat dan total bakteri asam laktat minuman sari pepaya probiotik.

Uji	Sampel		
	A	B	C
pH	4,31±0,014 ^a	4,32±0,05 ^a	4,80±0,06 ^b
Total Asam Laktat	1,91%±0,04 ^a	1,54%±0,07 ^b	1,54%±0,09 ^b
Total BAL (CFU/mL)	8,67 x 10 ¹⁰	3,29 x 10 ¹⁰	8,54 x 10 ¹⁰

Keterangan: A (*Lactobacillus bulgaricus* : *Lactobacillus acidophilus* : *Streptococcus thermophilus*); B (*Lactobacillus plantarum* : *Lactobacillus acidophilus* : *Streptococcus thermophilus*); C (*Lactobacillus casei* : *Lactobacillus acidophilus* : *Streptococcus thermophilus*). Notasi huruf yang berbeda pada baris menunjukkan nilai yang berbeda nyata dengan tingkat kepercayaan 95%, (taraf nyata, $\alpha=5\%$) oleh uji Tukey pada SPSS 17.0.

Pada pengujian total asam laktat, didapatkan total asam laktat pada minuman sari pepaya probiotik berkisar antara 1,54–1,91%. Keasaman minuman sari pepaya probiotik yang dihasilkan masih sesuai dengan ketentuan dari SNI Nomor 2981 tahun 2009 untuk produk minuman probiotik yogurt yaitu 0,5–2,0%. Menurut Jannah *et al.* (2014) penambahan ekstrak buah membuat keasaman yang dihasilkan semakin tinggi. Adanya peningkatan keasaman pada minuman sari pepaya probiotik berhubungan adanya peningkatan aktivitas bakteri asam laktat dalam memecah laktosa dan glukosa menjadi asam laktat.

Tahap terakhir dalam formulasi kultur campuran adalah perhitungan total bakteri asam laktat dengan

menggunakan metode *Total Plate Count* yang dilakukan untuk mengetahui viabilitas dari bakteri asam laktat yang berada dalam minuman sari pepaya probiotik. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan mengenai viabilitas bakteri asam laktat dengan variasi kultur campuran pada minuman sari pepaya probiotik diperoleh hasil pada kultur campuran A sebesar 10,93 (log CFU/mL), kultur campuran B sebesar 10,50 (log CFU/mL) dan pada kultur campuran C sebesar 10,92 (log CFU/mL) (Tabel 1).

Hasil perhitungan viabilitas bakteri asam laktat pada minuman sari pepaya probiotik menunjukkan bahwa jumlah viabilitas tertinggi diperoleh dari kultur campuran A dari kombinasi *Lactobacillus bulgaricus*; *Lactobacillus acidophilus*; *Streptococcus thermophilus* dengan jumlah bakteri sebesar 10,93 (log CFU/mL). Jumlah bakteri tersebut telah memenuhi standar untuk produk probiotik dengan jumlah minimal bakteri 10^6 - 10^7 CFU/mL. Jumlah tersebut adalah jumlah sel minimal yang memberikan efek kesehatan pada manusia (Manea et al, 2010).

Tabel 2

Hasil respon panelis terhadap warna, aroma, tekstur, dan rasa minuman sari pepaya probiotik.

Uji	Sampel		
Organoleptik	A	B	C
Rasa	4,33±0,02 ^a	3,27±0,41 ^b	2,87±0,28 ^b
Aroma	4,37±0,23 ^a	3,47±0,49 ^b	4,23±0,98 ^a
Tekstur	4,53±0,30 ^a	4,10±0,33 ^b	4,23±0,62 ^a
Warna	4,23±0,70 ^a	4,10±0,99 ^a	3,87±0,33 ^a

Keterangan : 1 (sangat tidak suka), 2 (tidak suka), 3 (agak tidak suka), 4 (agak suka), 5 (suka), 6 (sangat suka), 7 (amat sangat suka). Notasi huruf yang berbeda pada baris menunjukkan nilai yang berbeda nyata dengan tingkat kepercayaan 95%, (taraf nyata, $\alpha=5\%$) oleh uji Tukey pada SPSS 17.0.

Berdasarkan parameter pH, total asam laktat dan total bakteri asam laktat maka didapatkan formula minuman sari pepaya probiotik menggunakan kultur campuran A dari kombinasi *Lactobacillus bulgaricus* : *Lactobacillus acidophilus* : *Streptococcus thermophilus* dengan pH terendah 4,31, total asam laktat tertinggi sebesar 1,91% dan jumlah bakteri terbanyak yaitu 10,93 (log CFU/mL). Bakteri probiotik terutama *Lactobacillus acidophilus* apabila dikombinasikan dengan bakteri *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus* dapat menghasilkan minuman probiotik dengan pH yang lebih rendah karena mampu menfermentasi gula menjadi asam laktat dengan cepat. *Streptococcus thermophilus* hanya mampu bertahan hidup di dalam saluran pencernaan dalam waktu yang sangat singkat sehingga bakteri ini memiliki daya tahan hidup yang singkat dalam minuman sari pepaya probiotik sehingga perlu dikombinasikan dengan *Lactobacillus acidophilus* yang akan menggantikan *Streptococcus thermophilus*. *Lactobacillus bulgaricus* adalah salah satu BAL (bakteri asam laktat) yang digunakan sebagai starter kultur untuk susu fermentasi, berpotensi sebagai antikolesterol yang diduga karena adanya EPS (eksopolisakarida) yang

diproduksinya (Teguh, 2008). Minuman sari pepaya probiotik menggunakan kultur campuran A, untuk selanjutnya diaplikasikan guna menurunkan kadar kolesterol total pada tikus putih jantan galur Sprague Dawley.

Berdasarkan Tabel 2 diketahui bahwa aroma dan tekstur minuman sari pepaya probiotik mendapatkan nilai kesukaan yang lebih tinggi daripada yang lainnya, sedangkan tingkat kesukaan rasa minuman sari pepaya probiotik memiliki nilai kesukaan yang terendah. Nilai kesukaan rasa dan warna yang rendah ini sangat wajar. Hal ini disebabkan karena panelis pada umumnya lebih terbiasa dengan minuman probiotik yang telah diberi pemanis dan pewarna, sedangkan minuman probiotik yang disajikan merupakan minuman probiotik dari sari buah alami yang didominasi rasa asam. Berdasarkan kesukaan panelis pada rasa, aroma, tekstur dan warna pada Tabel 2, maka nilai tertinggi kesukaan panelis terdapat pada minuman sari pepaya probiotik menggunakan kultur campuran A dari kombinasi *Lactobacillus bulgaricus* : *Lactobacillus acidophilus* : *Streptococcus thermophilus*.

Selain perubahan warna yang terjadi pada sari pepaya, minuman sari pepaya probiotik juga mengalami perubahan aroma. Sari pepaya sebelum fermentasi memiliki aroma khas pepaya dan setelah dilakukan proses fermentasi aroma pepaya menjadi aroma khas asam. Bakteri asam laktat membutuhkan energi yang diperoleh dari fermentasi glukosa sari pepaya menjadi asam laktat yang melibatkan proses glikolisis dan aktivitas enzim laktat dehidrogenase. Perubahan aroma disebabkan aktivitas bakteri asam laktat dalam keadaan anaerob. Dalam keadaan anaerob glukosa dari sari pepaya akan diuraikan menjadi asam piruvat yang selanjutnya diuraikan kembali menjadi asam laktat, asam asetat, etanol, CO₂ dan sejumlah bahan organik yang mudah menguap seperti alkohol, asetaldehid, ester, dan lain-lain. Ester yang diperoleh dari hasil mekanisme glikolisis ini menyebabkan perubahan aroma pada sari pepaya.

Perubahan rasa yang terjadi pada minuman sari pepaya probiotik selain dikarenakan adanya penambahan susu dalam sari pepaya dapat juga disebabkan adanya aktivitas bakteri asam laktat selama proses fermentasi. Susu memiliki kandungan protein dan laktosa yang tinggi. Protein dalam susu akan diuraikan oleh bakteri asam laktat (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* dan *Streptococcus thermophilus*) selama proses fermentasi berlangsung, sehingga menghasilkan peptida dan asam amino yang berpengaruh terhadap flavour. Flavour atau rasa dari pepaya yang sebelum fermentasi adalah manis menjadi lebih masam dan segar setelah mengalami proses fermentasi. Hal ini sesuai dengan penelitian dari Kusmawati (2008) yang menyatakan bahwa dengan dilakukannya proses fermentasi dan penambahan susu skim ke dalam umbi bengkuang dapat meningkatkan kesukaan terhadap rasa oleh panelis. Selain memperbaiki rasa, tingginya kandungan protein dalam susu juga dapat memperbaiki tekstur sehingga meningkatkan kekentalan pada produk yang dihasilkan.

Tabel 3

Hasil pengukuran rerata kadar kolesterol hewan uji.

Kelompok	Pengukuran Kadar Kolesterol Total (mg/dL)			Penurunan kadar setelah perlakuan (mg/dL)	Persentase penurunan (%)
	Awal	Setelah Induksi	Setelah Perlakuan		
Kontrol Negatif (Aquades)	154,56	230,89	218,44	12,44	5,57±0,58 ^a
Kontrol Positif (Simvastatin)	151,44	227,89	176,56	51,33	22,56±0,96 ^c
Minuman Sari Pepaya Probiotik	152,22	225,22	185,56	39,67	17,51±0,72 ^b

Keterangan: Notasi huruf yang berbeda pada kolom menunjukkan nilai yang berbeda nyata dengan tingkat kepercayaan 95%, (taraf nyata, $\alpha=5\%$) oleh uji Tukey pada SPSS 17.0.

3.2. Pengujian efek antihiperkolesterolemia

Berdasarkan Tabel 3 diketahui bahwa persentase rata-rata penurunan kadar kolesterol berbeda setiap kelompok perlakuan. Penurunan kadar kolesterol kelompok I (kontrol negatif) sebesar 5,57%; kelompok II (kontrol positif) sebesar 22,56% dan pada kelompok III (Minuman Sari Pepaya Probiotik) sebesar 17,51%. Perbedaan persentase penurunan kadar kolesterol yang signifikan antara kelompok perlakuan dapat dibuktikan melalui uji statistik one way anova yang diperoleh hasil signifikan penurunan kadar kolesterol $p < 0,05$ dan diteruskan uji *Post Hoc Test Tukey HSD*. Pada uji *Post Hoc Test Tukey HSD* dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antara persentase penurunan kadar kolesterol setiap kelompok perlakuan.

Pada kelompok I (kontrol negatif) terdapat penurunan kolesterol meskipun nilainya sangat kecil dibandingkan kelompok lainnya dengan persentase penurunan kolesterol sebesar 5,57%. Hal ini disebabkan tubuh memiliki pengendalian jumlah kolesterol yang terdapat pada organ hati. Menurut Pranasista (2012) hati merupakan pusat biosintesis dan degradasi kolesterol tubuh. Apabila asupan kolesterol dan lemak dari makanan berlebih, maka hati sedemikian rupa menjaga agar konsentrasi kolesterol tubuh tetap normal dengan cara mengurangi laju biosintesis kolesterol dan meningkatkan sekresi kolesterol melalui cairan empedu sehingga jumlah kolesterol berkurang. Dengan regulasi dari hati, maka konsentrasi kolesterol tubuh dapat dipertahankan pada kondisi normal.

Penurunan kadar kolesterol yang terjadi pada kelompok II (kontrol positif) lebih besar dibandingkan kelompok lainnya, yaitu sebesar 22,56%. Hal ini disebabkan karena pemberian simvastatin yang merupakan obat antihiperkolesterolemia. Menurut Harini (2009) mekanisme simvastatin sebagai antihiperkolesterolemia yaitu dengan menghambat 3-Hydroxy-3-Methyl Glutaryl Co-enzym A Reduktase (HMG Co-A Reduktase), yang merupakan enzim yang mengkatalisis HMG Co-A menjadi asam mevalonik. Cara kerjanya adalah menghambat pembentukan kolesterol di hati dan meningkatkan pembuangan LDL dari aliran darah. Penghambatan terhadap HMG-CoA reduktase menyebabkan penurunan sintesis kolesterol dan peningkatan jumlah reseptor LDL yang terdapat dalam membran sel hati dan jaringan ekstrahepatik, sehingga kadar kolesterol total dan LDL dalam plasma turun. Namun kelemahan pemberian obat simvastatin adalah memiliki efek samping miopati dan rhabdomyolisis.

Penurunan kadar kolesterol pada kelompok III (minuman sari pepaya probiotik) lebih kecil dibandingkan dengan kontrol positif yang diberikan obat simvastatin, namun pemberian minuman sari pepaya probiotik terbukti dapat menurunkan kadar kolesterol tinggi menjadi normal dengan persentase penurunan sebesar 17,51%. Penurunan kadar kolesterol pada hewan uji diduga disebabkan adanya bakteri probiotik yang terkandung dalam minuman sari pepaya probiotik. Jumlah sel hidup minimal yang dapat memberikan manfaat sebagai probiotik adalah 10^6 CFU/ml (Nasution, 2012).

Menurut Naim (2011) mekanisme penurunan kolesterol oleh bakteri bakteri asam laktat yaitu mampu meningkatkan sekresi enzim *Bile Salt Hydrolase* (BSH) sehingga dapat meningkatkan ekskresi asam empedu. Hal ini akan mengakibatkan terjadinya dekonjugasi asam empedu, sehingga zat tersebut menjadi sulit diabsorpsi kembali melalui siklus enterohepatik dan akan lebih banyak asam empedu yang diekskresikan melalui feses. Kondisi ini akan berakibat kebutuhan kolesterol dalam tubuh meningkat dan akibatnya kadar kolesterol dalam darah akan berkurang (Puryana, 2011).

Penurunan kadar kolesterol darah juga disebabkan oleh adanya kemampuan BAL dalam mengasimilasi kolesterol (Ooi dan Liong, 2010). Pada mekanisme asimilasi kolesterol, bakteri asam laktat akan mengambil atau mengabsorpsi kolesterol dan selanjutnya kolesterol akan bergabung menjadi satu pada membran seluler bakteri, sehingga bakteri tahan terhadap lisis. Akibat penurunan absorpsi kolesterol diet dari sistem pencernaan, maka kadar kolesterol di dalam darah juga mengalami penurunan. Pengaruh *Lactobacillus* terhadap penurunan kolesterol diduga karena kemampuan dalam mengasimilasi kolesterol dalam usus halus dan mendeconjugasi garam empedu. Asam lemak rantai pendek yang diproduksi oleh *Lactobacillus* dapat menghambat sintesis kolesterol hepatic dan distribusi kolesterol di dalam plasma dan hati (Collado *et al.*, 2009).

Penelitian lain menunjukkan penurunan kolesterol terjadi karena bakteri probiotik dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah dengan cara menyerap sejumlah kolesterol ke dalam selnya. Sel bakteri probiotik mengandung fosfolipid bilayer yang mampu menarik kolesterol ke dalam selnya.

Bakteri probiotik juga menghasilkan kofaktor kolesterol dehidrogenase yang berfungsi mengaktifkan enzim kolesterol reduktase untuk mengkonversi kolesterol menjadi kosprostanol. Kosprostanol merupakan sterol yang tidak dapat diserap oleh usus sehingga dikeluarkan melalui feses dan kolesterol dapat turun

(Ooi dan Liong, 2010). Penggunaan enzim kolesterol reduktase yang dihasilkan dari kultur isolat BAL (bakteri asam laktat) untuk mengurangi jumlah kolesterol yang diserap pada usus hewan tidak akan menurunkan kualitas produk yang dihasilkan, dan tidak menimbulkan efek samping yang berat karena enzim merupakan turunan dari protein di mana pada suhu yang tinggi akan terdenaturasi. Enzim kolesterol reduktase bercampur dengan sitosol dari BAL, mudah untuk diekstraksi karena larut dalam air (Nuraida et al., 2011). *L. acidophilus* memiliki kemampuan lebih tinggi untuk menurunkan kadar kolesterol dibandingkan dengan *L. fermentum*. Hal ini dikarenakan bakteri *L. acidophilus* memiliki kemampuan untuk mengkonversi kolesterol intra dan ekstra seluler menjadi koprostanol dengan lebih efektif (Nuraida et al., 2011).

Berdasarkan aktivitas metabolismenya, baik bakteri asam laktat homofermentatif maupun heterofermentatif, keduanya mampu menurunkan kadar kolesterol karena BAL memiliki kemampuan merombak karbohidrat sederhana menjadi asam laktat. Seiring dengan meningkatnya asam laktat, pH lingkungan menjadi rendah dan menyebabkan mikroba lain tidak tumbuh. Pada kondisi yang sama terjadi peningkatan ion H^+ dalam usus yang menyebabkan peningkatan ikatan air dengan lipid melalui lipoprotein (HDL). Dengan demikian, terjadi peningkatan HDL yang berfungsi untuk mengangkut kolesterol perifer menuju ke hati, menyingkirkan kelebihan kolesterol, dan mencegah terjadinya plak, sehingga peningkatan HDL dalam darah dapat mencegah terjadinya aterosklerosis. Kemampuan bakteri probiotik yang mampu hidup di usus halus dengan pH lebih rendah dikarenakan BAL memiliki membran seluler yang terdiri atas struktur lemak dua lapis dan juga kemampuannya mempertahankan pH sitoplasma lebih alkali daripada sitoplasma ekstraseluler (Ooi dan Liong, 2010).

Selain itu, buah pepaya mengandung betakaroten dan vitamin C yang berperan sebagai antioksidan yang dapat mencegah pembentukan radikal bebas dan peroksidasi lipid (Boshra dan Tajul, 2013). Kandungan pektin pada buah pepaya menyebabkan terjadinya eliminasi kolesterol dari tubuh dalam bentuk asam empedu yang mengakibatkan tubuh menggunakan kolesterol dalam darah untuk menggantikan asam empedu yang hilang (Endrinaldi, 2012). Serat dapat menurunkan kadar kolesterol dengan menunda pengosongan lambung yang mengakibatkan kalori yang masuk akan berkurang. Serat akan mengikat lemak sehingga penyerapan lemak akan terganggu. Serat akan menghambat enzim HMG-KoA reduktase sehingga sintesis kolesterol akan terhambat. Serat juga akan mengikat asam empedu dan membentuk misel yang akan dikeluarkan melalui feses (Dewi dan Probosari, 2012).

Hasil dari penelitian ini yaitu minuman sari pepaya probiotik mempunyai aktivitas antihiperkolesterolemia yang dapat berpengaruh dalam menurunkan kadar kolesterol total tikus putih jantan yang diinduksi kuning telur puyuh. Sari pepaya probiotik dapat diaplikasikan untuk terapi antihiperkolesterolemia pada manusia dengan dosis sebesar 55,56 ml per hari setelah melalui uji preklinis.

4. Kesimpulan

Berdasarkan parameter pH, total asam laktat dan total bakteri asam laktat maka didapatkan formula minuman sari pepaya probiotik menggunakan kultur campuran *Lactobacillus bulgaricus* : *Lactobacillus acidophilus* : *Streptococcus thermophilus* dengan pH terendah 4,31, total asam laktat tertinggi sebesar 1,91% dan jumlah bakteri terbanyak sebesar 10,93 (log CFU/mL). Minuman sari pepaya probiotik mempunyai aktivitas antihiperkolesterolemia yang dapat berpengaruh dalam menurunkan kadar kolesterol total tikus putih jantan yang diinduksi kuning telur puyuh. Pemberian minuman sari pepaya probiotik terbukti dapat menurunkan kadar kolesterol dengan persentase penurunan sebesar 17,51%. Minuman sari pepaya probiotik dapat diaplikasikan untuk terapi antihiperkolesterolemia pada manusia dengan dosis sebesar 55,56 ml per hari setelah melalui uji preklinis.

Ucapan terima kasih

Penelitian ini didanai oleh Kegiatan Inkubasi Teknologi Pusat Inovasi LIPI. Terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada ibu Kasirah dan seluruh peneliti serta teknisi di laboratorium Mikrobiologi Pangan Pusat Penelitian Biologi LIPI dan laboratorium hewan percobaan STTIF Bogor yang telah membantu sehingga penelitian ini berjalan lancar.

Daftar pustaka

- Association of Official Analytical Chemists., 1999. Official methods of analysis of the association analytical chemist. AOAC, Virginia.
- Boshra, V., Tajul, A., 2013. Papaya - an innovative raw material for food and pharmaceutical processing industry. Health and the Environment Journal 4, 68-75.
- Cagno, R.D., Surico, R.F., Siragusa, S., Angelis, M.D., Paradiso, A., Minervini, F., Gara, L.D., Gobetti, M., 2008. Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, french beans or marrows. International Journal of Food Microbiology 127, 220-228.
- Collado, M. C., E. Isolauri, S. Salmien, and Y. Sanz. 2009. The impact of probiotic on gut health. Curr Drug Metab. 10(1):68-78.
- Dewi, C.K., Probosari, E., 2012. Pengaruh pemberian buah pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap kadar kolesterol LDL dan kolesterol HDL pada tikus sprague dawley dengan hiperkolesterolemia. Journal of Nutrition College 1, 1-29.
- Endrinaldi, A., 2012. Pengaruh pemberian ekstrak pepaya terhadap kadar kolesterol total, LDL dan HDL darah tikus putih jantan. Majalah Kedokteran Andalas.
- Fahri, C., Sutarno, Listyawati, S., 2005. Kadar glukosa dan kolesterol total darah tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) hiperglikemik setelah pemberian ekstrak metanol akar meniran (*Phyllanthus niruri* L.). Jurnal Biofarmasi 3, 1-6.

- Gianti, I., Evanuarini, H., 2011. Pengaruh penambahan gula dan lama penyimpanan terhadap kualitas fisik susu fermentasi. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Hasil Ternak* 6, 28-33.
- Harini, M., 2009. Kadar kolesterol darah dan ekspresi VCAM -1 pada endotel aorta tikus putih (*Rattus norvegicus* L) hiperkolesterolemik setelah perlakuan VCO [Skripsi]. Universitas Sebelas Maret Surakarta, Surakarta.
- Hesseltine, C.W., Elmer, L., Gaden, J., Bokanga, M., Harlander, S., 1992. *Biotechnology to traditional fermented food*. National Academy Press, Washington D.C.
- Jannah, A.M., Legowo, A.M., Pramono, Y.B., Al-Baarri, A.N., Abduh, S.B.M., 2014. Total bakteri asam laktat, pH, keasaman, citarasa dan kesukaan yogurt drink dengan penambahan ekstrak buah belimbing. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan* 3, 7-11.
- Khusaini, M., 2014. Pemanfaatan buah pepaya (*Carica pepaya* L.) dalam pembuatan yoghurt fruit dengan perbedaan jumlah konsentrasi starter dan lama fermentasi. *Jurnal Agrina* 1, 23-30.
- Krishna, K.L., Paridhavi, M., Patel, J.A., 2008. Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of papaya (*Carica papaya* Linn.). *Natural Product Radiance* 7, 364-373.
- Kusmawati, E., 2008. Kajian formulasi sari mentimun (*Cucumis sativus* L.) sebagai minuman probiotik menggunakan campuran kultur *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* subsp. *salivarius*, dan *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* [Tesis]. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Larasati, D.A., 2017. Aktivitas ekstrak etanol daun ubi jalar putih (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) terhadap penurunan kadar kolesterol total pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) Jantan [Skripsi]. Sekolah Tinggi Teknologi dan Industri Farmasi, Bogor.
- Manea, I., Buruleanu, L., 2010. Study of the effects shown by the action of various microorganisms on the lactic fermentation of juices. *Analisis Food Science and Technology* 11, 1-14.
- Naim, H.Y., 2011. Pengaruh pemberian yoghurt kedelai hitam (black soyghurt) terhadap profil lipid serum [Skripsi]. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Nasution, F.S., 2012. Identifikasi dan karakterisasi bakteri asam laktat pada kotoran ayam broiler sebagai agensi probiotik [Skripsi]. Universitas Negeri Medan, Medan.
- National Advisory Committee for Laboratory Animal Research., 2004. Guidelines on the care and use of animals for scientific purposes. United States of America, National Advisory Committee for Laboratory Animal Research.
- National Institute of Health., 2001. NCEP cholesterol guidelines. National Cholesterol Education Program ATP III 329, 925-929.
- Novia, D., 2012. Pembuatan yogurt nabati melalui fermentasi susu kacang merah (*Phaseolus vulgaris*) menggunakan kultur backslop [Skripsi]. Universitas Indonesia, Depok.
- Nuraida, L., Winarti, S., Hana, Prangdimutri, E. 2011. Evaluasi in vitro terhadap kemampuan isolat bakteri asam laktat asal air susu ibu untuk mengasimilasi kolesterol dan mendekongugasi garam empedu. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*. 22 (1): 46-52.
- Ooi, L., Liong, M., 2010. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics : a review of in vivo and in vitro findings. *International Journal of Molecular Sciences* 11, 2499-2522.
- Pranasista, L., 2012. Ekstrak daun salam (*Eugenia poliantha*) lebih efektif menurunkan kadar kolesterol total dan LDL dibandingkan statin pada penderita dislipidemia [Tesis]. Universitas Udayana, Denpasar Bali.
- Primurdia, E.G., Kusnadi, J., 2014. Aktivitas antioksidan minuman probiotik sari kurma (*Phoenix dactylifera* L.) dengan isolat *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus casei*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 2, 98–109.
- Puryana, I.G.P.S., 2011. Populasi *Lactobacillus rhamnosus* SKG34 dalam saluran pencernaan dan pengaruhnya terhadap kadar kolesterol tikus putih (*Rattus norvegicus*) [Skripsi]. Universitas Udayana, Denpasar Bali.
- Santoso, A., 2014. Pembuatan yoghurt fruit dari buah pepaya (*Carica papaya* L.). *Jurnal Agrina* 1, 31-39.
- Septiaggi, F.N., Mulyati, T., Hapsari, S.K., 2013. Hubungan asupan lemak dan asupan kolesterol dengan kadar kolesterol total pada penderita jantung koroner rawat jalan di RSUD Tugurejo. *Jurnal Gizi Universitas Muhammadiyah Semarang* 2, 13-20.
- Standar Nasional Indonesia (SNI) 2981., 2009. Syarat mutu minuman susu fermentasi. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional (BSN).
- Stapleton, P., Goodwill, A.G., James, M.E., Brock, R.W., Frisbee, J.C., 2010. Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies. *Journal of inflammation* 7, 1-10.
- Suhartini., 2009. Prospek ubi jalar sebagai bahan baku minuman probiotik. *Jurnal Iptek Tanaman Pangan* 4, 169-180.
- Suryono, A.S., Sudarwanto, M., Apriyantono, A., 2005. Studi pengaruh penggunaan bifidobakteria terhadap flavor yoghurt. *Jurnal Teknologi dan Industri* 16, 62-70.
- Tamminen, M., Salminen, S., Ouwehand, A.C., 2013. Fermentation of carrot juice by probiotics : viability and preservation of adhesion. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries* 2, 10-15.
- Teguh, S., 2008. Kandungan beta karoten, polifenol total dan aktivitas "merantas" radikal bebas kefir susu kacang hijau (*Vigna radiata*) oleh pengaruh jumlah starter (*Lactobacillus bulgaricus* dan *Candida kefir*) dan konsentrasi glukosa [Tesis]. Universitas Diponegoro, Semarang.
- The American College of Obstetricians and Gynecologists., 2013. Cholesterol and your health. United States of America: The American College of Obstetricians and Gynecologists.