Fermentasi nira tebu untuk pembuatan minuman probiotik dengan variasi jenis dan konsentrasi inokulum

Sugarcane juice fermentation for making probiotic beverages with variations of type and inoculum concentration

DWI KRISTANTI, RATNA SETYANINGSIH, ARI SUSILOWATI

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 13 Desember 2006. Revisi disetujui: 15 Februari 2007.

Abstract. Kristanti D, Setyaningsih R, Susilowati A. 2006. Sugarcane juice fermentation for making probiotic beverages with variations of type and inoculum concentration. *Biofarmasi* 5: 1-7. The exact type and concentration of inoculum in the manufacture of probiotic beverages are expected to produce a probiotic beverage that can meet the standard. This research aimed to determine the type of inoculum, the concentration of inoculum, and the combination of type and concentration of inoculum that meet the standard reviewed from the number of viable bacterial cells, reduction sugar content, acid total, the value of pH, and organoleptic test. The research was conducted using a factorial completely randomized design consisting of two factors: (i) the type of inoculum consisted of three levels, namely *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, and *L. plantarum*; (ii) the concentration of inoculum consisted of three levels, i.e., 1%, 2%, and 3%. The experiment was conducted with three replications. The fermentation media includes sugarcane juice, skim milk 10%, and gelatin 0.3% fermented with each inoculum for 96 hours. The parameters measured included the number of viable bacterial cells, acid total, pH value, reduction sugar content, and organoleptic test. Data obtained were analyzed by Analysis of Variance (ANOVA) and continued with the DMRT test at the significance level of 5%. The organoleptic test was analyzed by using a hedonic method. The research results showed that all types and the concentration of inoculum tested could be used in the fermentation of sugarcane juice for making probiotic beverages. The number of viable bacterial cells and the pH value met the standards of probiotic drinks in all treatments. The total of acid met the standards of probiotic beverage, except in the treatment of *L. casei* dan *L. plantarum* 1%. The result of the organoleptic test showed the preference of panelists on the scale of dislike instead of likes.

Keywords: Concentration of inoculum, fermentation, *Lactobacillus*, probiotic beverage, sugarcane juice

PENDAHULUAN

Peningkatan standar kesehatan masyarakat saat ini turut meningkatkan standar kualitas makanan yang dikonsumsi. Hasil studi pasar menunjukkan adanya kenaikan permintaan terhadap makanan fungsional yang mengandung kultur probiotik (Gardiner et al. 1999). Makanan fungsional adalah makanan yang mempunyai karakteristik sensori, bergizi, dan bermanfaat bagi kesehatan. Untuk memenuhi permintaan yang meningkat, produksi makanan probiotik saat ini sedang dikembangkan (Stanton et al. 1998).

Menurut Havenaar and Jos (1992), probiotik didefinisikan sebagai mikrobia hidup dalam jumlah tertentu dalam pencernaan serta mempunyai manfaat kesehatan bagi inangnya dengan cara menjaga keseimbangan mikroflora usus. Saluran pencernaan manusia termasuk ekosistem mikrobia yang kompleks yang mengandung lebih dari 400 spesies bakteri yang berbeda (Bruno et al. 2002).

Syarat utama dikategorikan sebagai bakteri probiotik diantaranya dapat bertahan hidup sejak dikonsumsi hingga mencapai saluran pencernaan. Beberapa bakteri asam laktat yang termasuk dalam bakteri probiotik antara lain

Lactobacillus acidophilus, *L. casei*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, dan spesies dari *Bifidobacterium* (Ray 1996; Shortt and Salminen 2001), sedangkan *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *Streptococcus cremoris*, *S. thermophilus*, dan *S. diacetylactis* merupakan bakteri asam laktat yang tidak dapat mencapai usus manusia dalam kondisi hidup (Purwandhani 1998). *Lactobacillus casei* merupakan bakteri asam laktat yang umum dipergunakan dalam minuman probiotik (Kuswardani dan Nugrahani 1998). Menurut Gilliland (1985), *L. casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum* merupakan bakteri asam laktat homofermentatif yang dapat menghasilkan asam lebih dari 85%.

Bakteri asam laktat yang digunakan dalam produk minuman fermentasi mempunyai beberapa fungsi yang menguntungkan, terutama terhadap kesehatan saluran pencernaan. Bakteri asam laktat yang masih hidup dalam saluran pencernaan akan menetap, memperbanyak diri, dan memproduksi komponen metabolit, seperti asam laktat yang dapat membunuh bakteri patogen (Gardiner et al. 1999). Dengan demikian, peranan bakteri probiotik menjadi penting bagi kesehatan manusia.

Bahan-bahan makanan yang mengalami fermentasi biasanya mempunyai nilai gizi yang lebih tinggi daripada

asalnya. Hal ini disebabkan karena mikrobia bersifat katabolik atau mampu memecah komponen-komponen kompleks menjadi zat-zat yang lebih sederhana sehingga lebih mudah dicerna, selain itu mikrobia juga dapat mensintesis beberapa vitamin (Winarno et al. 1980).

Tanaman tebu terdiri dari 12,5% serat dan 7,5% cairan yang disebut nira (Supriyadi 1992). Nira tebu mempunyai potensi yang baik untuk dibuat minuman fermentasi karena kandungan nutrisinya yang cukup lengkap. Nira mengandung sekitar 15% sukrosa, 0,5% gula reduksi, sejumlah nitrogen, dan garam-garam mineral yang cukup untuk pertumbuhan mikrobia (Tilbury 1975).

Pengolahan nira tebu menjadi minuman probiotik memerlukan penambahan sumber nitrogen, karena kandungan nitrogen dalam nira tebu rendah. Penambahan susu skim sebagai sumber nitrogen diharapkan dapat meningkatkan kandungan nitrogen dan memberi aroma pada minuman probiotik. Selain itu, kandungan laktosa dalam susu skim dapat memacu pertumbuhan bakteri asam laktat. Penambahan gelatin dapat membantu meningkatkan homogenitas dari minuman probiotik (Kuswardani dan Nugerahani 1998).

Selama ini, pemanfaatan nira tebu terutama diolah menjadi gula. Sebagai upaya diversifikasi produk olahan tebu, salah satunya dapat dilakukan dengan membuat nira tebu menjadi minuman probiotik. Dari penelitian sebelumnya, nira siwalan telah digunakan sebagai bahan pembuatan minuman probiotik. Hasil penelitian menunjukkan penerimaan yang baik oleh panelis (Kuswardani dan Nugerahani 1998). Nira tebu mempunyai kandungan nutrisi yang hampir sama dengan nira siwalan. Untuk itu perlu dilakukan penelitian tentang pembuatan minuman probiotik dari nira tebu.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis inokulum, konsentrasi inokulum, serta kombinasi antara jenis dan konsentrasi inokulum yang dapat menghasilkan minuman probiotik dari nira tebu yang memenuhi standar ditinjau dari jumlah sel bakteri viabel, kadar gula reduksi, total asam, nilai pH, dan uji organoleptik.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan di Sub Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta pada bulan Agustus-Desember 2004.

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan untuk pembuatan *starter* meliputi bakteri *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi PAU Pangan dan Gizi UGM, sedangkan medium yang digunakan meliputi MRS *broth*, susu skim, akuades, dan glukosa. Bahan yang digunakan untuk pembuatan minuman probiotik meliputi nira tebu, *starter*, susu skim, dan gelatin. Sementara itu, alat penelitian yang digunakan meliputi inkubator, *magnetic stirrer*, *autoclave*, timbangan analitik, pH-meter, vorteks, penangas, refrigerator, *colony*

counter, spektrofotometer, *aluminium foil*, kapas, jarum inokulasi, dan peralatan gelas.

Rancangan penelitian

Percobaan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial dengan 2 faktor sebagai berikut. Faktor pertama adalah jenis bakteri, terdiri dari 3 taraf perlakuan yaitu: B₁ = *L. casei*, B₂ = *L. acidophilus*, dan B₃ = *L. plantarum*. Faktor kedua adalah konsentrasi inokulum, terdiri dari 3 taraf perlakuan yaitu: K₁ = konsentrasi 1%, K₂ = konsentrasi 2%, dan K₃ = konsentrasi 3%. Masing-masing perlakuan dilakukan dengan 3 ulangan. Dari kedua faktor tersebut diperoleh kombinasi perlakuan sebagai berikut:

B ₁ K ₁	B ₁ K ₂	B ₁ K ₃
B ₂ K ₁	B ₂ K ₂	B ₂ K ₃
B ₃ K ₁	B ₃ K ₂	B ₃ K ₃

Keterangan:

B₁K₁ = *L. casei* dengan konsentrasi inokulum 1%

B₁K₂ = *L. casei* dengan konsentrasi inokulum 2%

B₁K₃ = *L. casei* dengan konsentrasi inokulum 3%

B₂K₁ = *L. acidophilus* dengan konsentrasi inokulum 1%

B₂K₂ = *L. acidophilus* dengan konsentrasi inokulum 2%

B₂K₃ = *L. acidophilus* dengan konsentrasi inokulum 3%

B₃K₁ = *L. plantarum* dengan konsentrasi inokulum 1%

B₃K₂ = *L. plantarum* dengan konsentrasi inokulum 2%

B₃K₃ = *L. plantarum* dengan konsentrasi inokulum 3%

Cara kerja

Pembuatan kultur kerja

Masing-masing kultur murni bakteri *L. casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum* diperbanyak dengan cara satu ose kultur murni diinokulasikan ke medium MRS *broth* agar miring, diinkubasikan pada suhu 37°C untuk *L. casei* dan *L. acidophilus*, dan 30°C untuk *L. plantarum* selama 48 jam, dan siap digunakan untuk pembuatan *starter*. Kultur ini selanjutnya disebut kultur kerja.

Pembuatan starter

Sebanyak 5 mL MRS *broth* steril diinokulasi dengan satu ose kultur kerja lalu diinkubasi pada suhu 37°C untuk *L. casei* dan *L. acidophilus*, dan 30°C untuk *L. plantarum* selama 48 jam sehingga diperoleh kultur cair dari masing-masing bakteri. Masing-masing kultur cair tersebut diinokulasikan sebanyak 1% ke dalam larutan susu skim 10% (v/v) steril kemudian diinkubasi pada suhu 37°C untuk *L. casei* dan *L. acidophilus*, dan 30°C untuk *L. plantarum* selama 48 jam sehingga diperoleh *starter* induk. *Starter* siap pakai dibuat dengan cara 1% *starter* induk diinokulasikan pada larutan susu skim 10% (v/v) dan glukosa 3% (b/v) selama 24 jam pada suhu 37°C untuk *L. casei* dan *L. acidophilus*, dan 30°C untuk *L. plantarum*, serta dihitung dengan metode *standart plate count* dengan standar 10⁸ bakteri/mL (Hadiwiyoto 1994).

Pembuatan minuman probiotik

Nira tebu diencerkan dengan akuades hingga kadar gula 4%, kemudian diambil 100 mL, ditambah dengan 10% susu skim dan 0,3% gelatin, dimasukkan ke dalam botol, dipanaskan pada suhu 85°C selama 30 menit, dan diinokulasi *starter* siap pakai dengan konsentrasi 1%, 2%, dan 3%, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C untuk *L. casei* dan *L. acidophilus*, dan 30°C untuk *L. plantarum* selama 96 jam.

Analisis jumlah sel bakteri viabel

Penghitungan jumlah sel bakteri viabel dilakukan dengan menggunakan metode *standart plate count*. Jumlah bakteri harus mencapai standar 10^8 bakteri/mL. Cara penghitungan jumlah sel bakteri viabel dilakukan menurut Hadiwiyoto (1994).

Analisis total asam dengan metode titrasi

Sebanyak 10 mL sampel dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditetesi dengan 3-4 tetes indikator PP 1%. Setelah itu, sampel dititrasi dengan NaOH 0,1 N hingga berwarna kemerahan (Hadiwiyoto 1994). Penghitungan total asam dapat dilakukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Total asam laktat} = \frac{\text{volume NaOH} \times N \times 0,09}{\text{volume contoh}} \times 100\%$$

Rumus ini berdasarkan pada 1 mL NaOH 0,1 N dapat menetralkan 0,09/1 mL asam laktat.

Analisis konsentrasi gula reduksi

Analisis konsentrasi gula reduksi dilakukan dengan menggunakan metode Nelson-Somagyi. Konsentrasi gula reduksi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Gula reduksi diukur sebelum dan sesudah inokulasi *starter*. Cara penentuan konsentrasi gula reduksi dilakukan menurut metode Sudarmadji et al. (1984).

Pengukuran nilai pH

Sensor pada pH-meter dibilas dengan akuades kemudian dikeringkan dengan kertas tisu. pH-meter dikalibrasi dengan menggunakan larutan penyangga (buffer) I (pH=4), kemudian larutan *buffer* II (pH=6,99). Setelah itu, sensor pada pH-meter dibilas kembali dengan akuades dan dikeringkan dengan kertas tisu. Sampel diukur pH-nya, kemudian sensor pH-meter dibersihkan kembali dengan akuades dan dibiarkan terendam dalam akuades. Pengukuran nilai pH dilakukan pada saat sebelum dan sesudah dilakukan inokulasi *starter* (Hadiwiyoto 1994).

Uji organoleptik menurut metode hedonik

Uji organoleptik dilakukan dengan berdasarkan tiga penilaian yaitu keasaman, rasa, dan bau. Pengujian dilakukan terhadap 25 panelis. Skala penilaian yang digunakan dalam uji organoleptik ini antara 1-7, yaitu: 1 = sangat tidak suka, 2 = tidak suka, 3 = agak tidak suka, 4 = biasa, 5 = agak suka, 6 = suka, 7 = sangat suka (Kartika et al. 1998).

Analisis data

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan yaitu jenis dan konsentrasi inokulum, data yang diperoleh dianalisis dengan Analisis Varians (ANOVA). Untuk mengetahui beda nyata antar perlakuan akibat pengaruh perlakuan dilakukan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf signifikansi 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian tentang pembuatan minuman probiotik dengan bahan baku nira tebu dilakukan sebagai upaya penganeekaragaman produk olahan tebu. Produk yang dihasilkan diharapkan mampu memenuhi kriteria minuman probiotik yang baik. Dalam penelitian ini, parameter yang diukur meliputi jumlah sel bakteri viabel, total asam, kadar gula reduksi, nilai pH, dan uji organoleptik.

Jumlah sel bakteri viabel

Berdasarkan kriteria, minuman probiotik harus mengandung paling sedikit 10^8 bakteri asam laktat per mL (Kuswardhani dan Nugerahani 1998). Dalam pembuatan minuman probiotik dilakukan penghitungan jumlah sel bakteri viabel pada *starter* siap pakai terlebih dahulu. Hasil penghitungan jumlah sel bakteri pada *starter* siap pakai untuk *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum* berturut-turut adalah $2,46 \times 10^9$ bakteri/mL, $2,24 \times 10^9$ bakteri/mL, dan $2,10 \times 10^9$ bakteri/mL, sehingga jumlah *L. casei* dalam media fermentasi pada awal fermentasi dengan konsentrasi 1%, 2%, dan 3% berturut-turut adalah $2,46 \times 10^7$ bakteri/mL, $4,92 \times 10^7$ bakteri/mL, dan $7,38 \times 10^7$ bakteri/mL. Jumlah *L. acidophilus* dengan konsentarsi 1%, 2%, dan 3% berturut-turut adalah $2,24 \times 10^7$ bakteri/mL, $4,48 \times 10^7$ bakteri/mL, dan $6,72 \times 10^7$ bakteri/mL, sedangkan jumlah *L. plantarum* dengan konsentrasi 1%, 2%, dan 3% berturut-turut adalah $2,10 \times 10^7$ bakteri/mL, $4,20 \times 10^7$ bakteri/mL, dan $6,30 \times 10^7$ bakteri/mL. Setelah fermentasi selama 96 jam, terjadi peningkatan jumlah sel bakteri viabel dari masing-masing jenis bakteri. Peningkatan tersebut dikarenakan media fermentasi yang digunakan mengandung nutrisi yang sesuai, sehingga bakteri mampu tumbuh secara optimum.

Hasil Analisis Varians menunjukkan bahwa jenis dan konsentrasi inokulum memberikan perbedaan yang nyata terhadap jumlah sel bakteri viabel. Demikian juga dengan kombinasi kedua jenis perlakuan, yaitu jenis dan konsentrasi inokulum, memberikan perbedaan yang nyata terhadap jumlah sel bakteri viabel, dengan tingkat signifikansi kurang dari 0,05.

Hasil uji DMRT pada taraf signifikansi 5% menunjukkan bahwa jumlah sel bakteri viabel rata-rata yang dihasilkan berbeda nyata antara *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum*, demikian juga dengan jumlah sel bakteri viable yang dihasilkan oleh perbedaan konsentrasi inokulum yaitu 1%, 2%, dan 3%. Jumlah bakteri terendah adalah $2,19 \times 10^9$ bakteri/mL dengan inokulum *L. plantarum* pada konsentrasi 1%, sedangkan jumlah bakteri tertinggi dicapai oleh *L. casei* dan *L. acidophilus* pada konsentrasi 2% yaitu berturut-turut

sebesar $3,76 \times 10^9$ bakteri/mL dan $3,69 \times 10^9$ bakteri/mL, seperti terlihat pada Tabel 1. Jumlah ini masih memenuhi standar jumlah sel bakteri viabel pada minuman probiotik yaitu minimal 10^8 bakteri/mL. Hal ini menunjukkan bahwa jenis inokulum yaitu *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum* dengan konsentrasi inokulum sebesar 1% sudah dapat dipakai dalam pembuatan minuman probiotik jika dilihat dari jumlah bakteri.

Jumlah sel bakteri viabel tertinggi untuk masing-masing inokulum diperoleh pada konsentrasi 2%. Jumlah sel bakteri viabel pada konsentrasi 2% mencapai maksimum, sehingga jumlah sel bakteri viabel pada konsentrasi 3% mengalami penurunan. Hal ini diduga disebabkan adanya persaingan antar bakteri dalam mendapatkan nutrisi untuk pertumbuhannya, serta dipengaruhi oleh banyaknya asam yang terbentuk selama fermentasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Pada akhir fermentasi, jumlah sel bakteri viabel mampu mencapai 10^9 , sesuai dengan standar minuman probiotik, yaitu minimal 10^8 bakteri/mL. Menurut Ray (1996), jumlah sel bakteri probiotik yang tinggi (10^6 - 10^7 bakteri/mL atau lebih) dalam saluran pencernaan manusia memungkinkan bakteri asam laktat mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen.

Total asam

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan total asam yang disebabkan oleh perbedaan jenis dan konsentrasi inokulum pada minuman probiotik setelah fermentasi selama 96 jam. Berdasarkan hasil Analisis Varians, variasi jenis inokulum, yaitu *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum*, memberikan perbedaan yang nyata terhadap total asam yang dihasilkan. Variasi konsentrasi inokulum, yaitu 1%, 2%, dan 3%, juga memberikan perbedaan yang nyata terhadap total asam minuman probiotik. Untuk kombinasi perlakuan, yaitu jenis dan konsentrasi inokulum, juga memberikan perbedaan yang nyata. Hal ini dapat dilihat dari tingkat signifikansi yang kurang dari 0,05.

Hasil uji DMRT pada taraf signifikansi 5% menunjukkan bahwa total asam rata-rata yang dihasilkan berbeda nyata antara *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum*, demikian juga dengan total asam rata-rata yang dihasilkan antara konsentrasi inokulum 1%, 2%, dan 3%, seperti yang terlihat pada Tabel 2. Menurut Fardiaz et al. (1996), hal ini disebabkan oleh kemampuan bakteri dalam memecah gula menjadi asam laktat untuk masing-masing jenis *Lactobacillus* berbeda-beda.

Total asam terbesar yang dihasilkan terdapat pada hasil fermentasi dengan inokulum *L. casei* pada konsentrasi 2% yaitu sebesar 1,035%, sedangkan total asam terkecil terdapat pada hasil fermentasi dengan inokulum *L. casei* dan *L. plantarum* pada konsentrasi 1% yaitu masing-masing sebesar 0,819% dan 0,801%. Nilai total asam yang dihasilkan oleh *L. casei* dan *L. plantarum* dengan konsentrasi 1% belum memenuhi standar total asam minuman probiotik yang baik, yaitu minimal 0,85%. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan *L. acidophilus* dalam memecah gula yang ada dalam media yang digunakan lebih baik dibandingkan dengan *L. casei* dan *L. plantarum*.

Total asam terbesar untuk masing-masing inokulum diperoleh pada konsentrasi 2%. Hal ini sesuai dengan jumlah sel bakteri viabel yang mencapai jumlah terbanyak pada konsentrasi 2%. Jumlah sel bakteri viabel yang tinggi mempunyai kemampuan yang tinggi juga dalam memetabolisme gula dari media fermentasi untuk mendapatkan energi dan menghasilkan asam. Hal ini disebabkan jumlah enzim yang dihasilkan oleh bakteri juga semakin meningkat.

Total asam dinyatakan sebagai persentase asam laktat karena ketiga inokulum merupakan golongan bakteri asam laktat homofermentatif yang menghasilkan asam laktat sebagai produk utama fermentasi. Menurut Meade and Spencer (1963), media fermentasi dari nira tebu mengandung gula berupa sukrosa, glukosa, dan fruktosa yang dapat digunakan oleh *Lactobacillus* sebagai sumber energi dan menghasilkan asam. Penambahan susu skim merupakan sumber laktosa dalam media fermentasi. Laktosa merupakan disakarida yang terdiri dari glukosa dan galaktosa yang dapat dijadikan sebagai sumber energi dan menghasilkan asam laktat oleh masing-masing jenis inokulum. Gilliland (1985) menyebutkan bahwa laktosa dapat dihidrolisis menjadi glukosa dan galaktosa oleh β -D galaktosidase. Pada proses selanjutnya, metabolisme melalui proses glikolisis, glukosa diubah menjadi asam piruvat yang selanjutnya menjadi asam laktat oleh aktivitas enzim laktat dehidrogenase, sedangkan galaktosa harus diubah terlebih dahulu menjadi glukosa sebelum memasuki jalur glikolisis, sehingga prosesnya menjadi lebih panjang.

Nilai pH

Hasil pengukuran pH menunjukkan terjadinya penurunan pH pada minuman probiotik setelah terjadi fermentasi selama 96 jam, dibandingkan dengan pH awal sebelum fermentasi yaitu sebesar 6,35. Berdasarkan hasil Analisis Varians, nilai pH masing-masing jenis dan konsentrasi inokulum menunjukkan perbedaan yang nyata, dengan tingkat signifikansi kurang dari 0,05. Demikian juga untuk kombinasi perlakuan menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap nilai pH minuman probiotik, dengan tingkat signifikansi kurang dari 0,05.

Hasil uji DMRT pada taraf signifikansi 5% menunjukkan bahwa nilai pH rata-rata yang dihasilkan berbeda nyata antara *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum*, demikian juga nilai pH rata-rata yang dihasilkan antara konsentrasi inokulum, yaitu 1%, 2%, dan 3%, seperti yang terlihat pada Tabel 3. Nilai pH masing-masing perlakuan seluruhnya memenuhi standar minuman probiotik yaitu maksimal 4,5. Nilai pH yang rendah dalam minuman probiotik sangat diharapkan agar mikroba patogen tidak dapat tumbuh.

Nilai pH terendah untuk masing-masing inokulum diperoleh pada konsentrasi 2%. Perbedaan nilai pH sebelum fermentasi dan sesudah fermentasi terjadi akibat aktivitas bakteri asam laktat sehingga menghasilkan asam. Hal ini menyebabkan penurunan nilai pH pada media fermentasi setelah fermentasi selama 96 jam. Purwandhani dan Suladra (2003) menyebutkan bahwa bakteri asam laktat menghasilkan metabolit berupa asam sebagai akibat metabolisme glukosa selama proses fermentasi. Asam yang

dihasilkan semakin meningkat yang ditandai dengan penurunan nilai pH atau peningkatan keasaman.

Menurut Lehniger (1997), besar kecilnya nilai pH dipengaruhi oleh konsentrasi ion H^+ . Asam laktat ($CH_3CHOHCOOH$) yang dihasilkan selama proses fermentasi merupakan asam yang mudah terdisosiasi menjadi ion H^+ dan ion $CH_3CHOHCOO^-$. Wibowo (1989) menyebutkan bahwa konsentrasi ion H^+ yang tinggi akan menurunkan nilai pH, sehingga minuman probiotik setelah fermentasi menjadi asam.

Gula reduksi

Kadar gula reduksi dalam pembuatan minuman probiotik dari nira tebu diukur dengan menggunakan metode Nelson-Somagi. Dalam metode ini, gula reduksi ditandai dengan adanya gugus pereduksi $C=O$. Gugus ini mereduksi ion kupri (Cu^{2+}) di dalam larutan Fehling menjadi cuprooksida (Cu_2O) sehingga diidentifikasi sebagai gula pereduksi (Lehniger 1997). Gula reduksi dalam penelitian ini diukur sebelum dan sesudah fermentasi untuk mengetahui kandungan gula reduksi yang tersisa pada minuman probiotik.

Hasil Analisis Varians menunjukkan bahwa kadar gula reduksi masing-masing jenis dan konsentrasi inokulum menunjukkan perbedaan yang nyata dengan tingkat signifikansi kurang dari 0,05. Demikian juga dengan kombinasi kedua macam perlakuan, yaitu jenis dan konsentrasi inokulum, menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap kadar gula reduksi minuman probiotik dari nira tebu. Hal ini dapat dilihat pada tingkat signifikansi yang kurang dari 0,05.

Tabel 1. Jumlah sel bakteri viabel ($\times 10^9$ bakteri/mL) minuman probiotik dari nira tebu setelah fermentasi selama 96 jam dengan inokulum *L. casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum*.

Jenis bakteri	Konsentrasi inokulum (%)			Rata-rata
	1	2	3	
<i>L. casei</i>	2,77 ^c	3,76 ^g	3,08 ^e	3,20 Z
<i>L. acidophilus</i>	2,55 ^b	3,69 ^g	2,93 ^d	3,06 Y
<i>L. plantarum</i>	2,19 ^a	3,40 ^f	2,81 ^c	2,80 X
Rata-rata	2,51 A	3,62 C	2,94 B	

Keterangan: Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata antar perlakuan pada uji DMRT dengan taraf signifikansi 5%.

Tabel 2. Total asam (%) minuman probiotik dari nira tebu setelah fermentasi selama 96 jam dengan inokulum *L. casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum*.

Jenis bakteri	Konsentrasi inokulum (%)			Rata-rata
	1	2	3	
<i>L. casei</i>	0,819 ^a	1,035 ^e	0,954 ^c	0,936 Y
<i>L. acidophilus</i>	0,900 ^b	1,002 ^d	0,972 ^c	0,958 Z
<i>L. plantarum</i>	0,801 ^a	0,945 ^c	0,894 ^b	0,880 X
Rata-rata	0,840 A	0,994 C	0,940 B	

Keterangan: Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata antar perlakuan pada uji DMRT dengan taraf signifikansi 5%.

Tabel 3. Nilai pH minuman probiotik dari nira tebu setelah fermentasi selama 96 jam dengan inokulum *L. casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum*.

Jenis bakteri	Konsentrasi inokulum (%)			Rata-rata
	1	2	3	
<i>L. casei</i>	4,10 ^g	3,49 ^a	3,66 ^c	3,75 Y
<i>L. acidophilus</i>	3,78 ^e	3,63 ^b	3,70 ^d	3,71 X
<i>L. plantarum</i>	4,11 ^g	3,80 ^e	3,94 ^f	3,95 Z
Rata-rata	4,00 C	3,64 A	3,77 B	

Keterangan: Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata antar perlakuan pada uji DMRT dengan taraf signifikansi 5%.

Tabel 4. Kadar gula reduksi minuman probiotik dari nira tebu setelah fermentasi selama 96 jam dengan inokulum *L. casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum*.

Jenis bakteri	Konsentrasi inokulum (%)			Rata-rata
	1	2	3	
<i>L. casei</i>	0,4960 ^f	0,3065 ^a	0,4292 ^c	0,4106 X
<i>L. acidophilus</i>	0,5092 ^g	0,3712 ^b	0,3967 ^{cd}	0,4257 Y
<i>L. plantarum</i>	0,5322 ^h	0,3924 ^c	0,4040 ^d	0,4429 Z
Rata-rata	0,5125 C	0,3567 A	0,4101 B	

Keterangan: Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata antar perlakuan pada uji DMRT dengan taraf signifikansi 5%.

Tabel 5. Uji organoleptik warna, rasa, dan bau minuman probiotik dari nira tebu setelah fermentasi selama 96 jam dengan inokulum *L. casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum*.

Warna		Rasa		Bau	
Minuman probiotik	Nilai kesukaan	Minuman probiotik	Nilai kesukaan	Minuman probiotik	Nilai kesukaan
<i>L. plantarum</i> 2%	5,12	<i>L. plantarum</i> 2%	3,52	<i>L. plantarum</i> 2%	4,60
<i>L. plantarum</i> 3%	4,86	<i>L. casei</i> 1%	3,16	<i>L. plantarum</i> 1%	4,40
<i>L. plantarum</i> 1%	4,84	<i>L. plantarum</i> 3%	3,12	<i>L. plantarum</i> 3%	3,96
<i>L. acidophilus</i> 1%	3,60	<i>L. plantarum</i> 1%	3,12	<i>L. acidophilus</i> 1%	2,92
<i>L. acidophilus</i> 2%	3,56	<i>L. casei</i> 3%	3,12	<i>L. acidophilus</i> 3%	2,76
<i>L. acidophilus</i> 3%	3,20	<i>L. casei</i> 2%	3,04	<i>L. acidophilus</i> 2%	2,60
<i>L. casei</i> 3%	3,20	<i>L. acidophilus</i> 3%	2,52	<i>L. casei</i> 1%	2,44
<i>L. casei</i> 2%	3,12	<i>L. acidophilus</i> 2%	2,44	<i>L. casei</i> 2%	2,44
<i>L. casei</i> 1%	2,76	<i>L. acidophilus</i> 1%	2,40	<i>L. casei</i> 3%	1,88

Keterangan: 1 = Sangat tidak suka, 2 = tidak suka, 3 = agak tidak suka, 4 = biasa, 5 = agak suka, 6 = suka, 7 = sangat suka

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan kadar gula reduksi yang disebabkan adanya perbedaan jenis dan konsentrasi inokulum setelah fermentasi selama 96 jam, seperti yang terlihat pada Tabel 4. Hasil uji DMRT pada taraf signifikansi 5% menunjukkan bahwa kadar gula reduksi rata-rata yang dihasilkan berbeda nyata antara *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum*, demikian juga dengan kadar gula reduksi rata-rata yang dihasilkan antar konsentrasi inokulum, yaitu 1%, 2%, dan 3%.

Kadar gula reduksi terendah untuk masing-masing jenis inokulum diperoleh pada konsentrasi 2%. Hasil yang diperoleh dari pengukuran gula reduksi dengan menggunakan standar glukosa murni memperlihatkan bahwa setelah fermentasi selama 96 jam terjadi penurunan. Kadar gula reduksi awal sebelum fermentasi sebesar 0,6825%. Semakin tinggi jumlah sel bakteri viabel dalam minuman probiotik maka gula reduksi yang dikonsumsi oleh bakteri juga semakin banyak, sehingga kadar gula reduksi semakin menurun dan asam yang dihasilkan semakin meningkat. Perbedaan kadar gula reduksi pada akhir fermentasi untuk masing-masing jenis inokulum disebabkan oleh perbedaan kemampuan dalam memecah gula menjadi asam laktat. Hal ini sesuai dengan jumlah total asam yang terbentuk bahwa semakin sedikit gula reduksi yang tersisa maka total asam yang dihasilkan semakin banyak. Kadar gula reduksi yang lebih rendah pada akhir fermentasi menunjukkan bahwa proses fermentasi lebih optimum dibandingkan dengan kadar gula reduksi yang lebih tinggi.

Gula yang terdapat dalam media fermentasi merupakan sumber nutrisi bagi pertumbuhan bakteri dan dipakai untuk diubah menjadi asam laktat. Nira tebu mengandung gula reduksi berupa glukosa dan fruktosa yang dapat digunakan sebagai sumber energi dan nutrisi. Penambahan susu skim ke dalam media fermentasi merupakan sumber laktosa yang dapat dihidrolisis menjadi glukosa dan galaktosa oleh β -D-galaktosidase.

Uji organoleptik

Uji organoleptik yang dipakai dalam penelitian ini merupakan uji kesukaan. Pada dasarnya, uji kesukaan merupakan pengujian pada panelis untuk mengemukakan respons berupa tingkat kesukaan terhadap sifat bahan yang diuji. Pada pengujian ini digunakan panelis yang belum terlatih tanpa membandingkan bahan uji dengan sampel standar (Kartika et al. 1998). Parameter yang diuji pada penelitian ini meliputi warna, rasa, dan bau dari minuman probiotik. Uji kesukaan dilakukan terhadap 25 orang panelis (Tabel 5).

Panelis disajikan sampel satu per satu kemudian panelis diminta menilai sampel tersebut berdasarkan tingkat kesukaan menurut skala nilai yang telah disediakan. Skala tingkat kesukaan yang disediakan berkisar dari nilai 1-7 yaitu: (1) sangat tidak suka, (2) tidak suka, (3) agak tidak suka, (4) biasa, (5) agak suka, (6) suka, dan (7) sangat suka.

Minuman probiotik berwarna putih kecokelatan. Warna minuman probiotik yang terlalu pucat tidak disukai oleh panelis. Aroma pada minuman probiotik disebabkan oleh

adanya komponen pemberi aroma (*flavor*), seperti asetaldehid dan aseton, yang diproduksi oleh bakteri asam laktat dengan memfermentasikan komponen-komponen karbohidrat di dalam medium. Aroma yang terlalu asam tidak disukai oleh panelis. Hasil pemerincian secara keseluruhan menunjukkan bahwa minuman probiotik dari nira tebu dengan inokulum *L. plantarum* paling disukai oleh panelis, sedangkan yang paling tidak disukai oleh panelis adalah minuman probiotik dengan inokulum *L. casei* untuk parameter warna dan bau. Namun untuk tingkat kesukaan terhadap rasa (keasaman), sampel yang paling tidak disukai adalah minuman probiotik dengan inokulum *L. acidophilus*. Minuman probiotik dari nira tebu yang paling disukai adalah minuman probiotik dengan inokulum *L. plantarum* pada konsentrasi 2% dengan penilaian terhadap warna, rasa, dan bau masing-masing sebesar 5,12; 3,52; dan 4,6. Minuman probiotik ini mempunyai jumlah sel bakteri viabel sebesar $3,40 \times 10^9$ bakteri/mL, total asam sebesar 0,945%, nilai pH sebesar 3,8, dan kadar gula reduksi sebesar 0,3924% dengan warna kecokelatan, serta rasa dan bau yang tidak terlalu asam. Kurangnya tingkat kesukaan panelis terhadap produk minuman probiotik dari nira tebu disebabkan tidak terbiasanya panelis mengkonsumsi susu asam. Produk-produk susu asam memang kurang disukai oleh konsumen karena rasanya yang kurang enak. Selain itu, hal ini juga disebabkan oleh rasa yang kurang manis akibat pengenceran nira tebu pada awal pembuatan minuman probiotik.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum* dapat digunakan sebagai inokulum dalam fermentasi nira tebu untuk pembuatan minuman probiotik yang memenuhi standar minuman probiotik. Konsentrasi inokulum antara 1-3% dapat digunakan dalam fermentasi nira tebu untuk pembuatan minuman probiotik yang memenuhi standar minuman probiotik, kecuali total asam pada konsentrasi 1% dengan inokulum *L. casei* dan *L. plantarum*. Kombinasi antara jenis dan konsentrasi inokulum pada semua perlakuan dapat digunakan dalam fermentasi nira tebu untuk pembuatan minuman probiotik yang memenuhi standar minuman probiotik, kecuali pada *L. casei* 1% dan *L. plantarum* 1%.

DAFTAR PUSTAKA

- Bruno FA, Lankaputhra WEV, Shah NP. 2002. Growth, viability, and activity of *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing prebiotics. *J Food Sci* 67: 2740-2744.
- Fardiaz S, Nuraini ED, Kusumaningrum H. 1996. Pemanfaatan air kelapa untuk produksi minuman sehat antidiare melalui proses fermentasi laktat. *Buletin Teknologi dan Industri Pangan* 7 (2): 47-53.
- Gardiner G, Stanton C, PB Lynch, Collins JK, Fitzgerald G, Ross RP. 1999. Evaluation of cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. *J Dairy Sci* 82: 1379-1387.
- Gilliland SE. 1985. *Bacterial Starter Culture of Foods*. CRC Press Inc. USA.

- Hadiwiyoto S. 1994. Teori dan Prosedur: Pengujian Mutu Susu dan Hasil Olahannya. Edisi Kedua. Penerbit Liberty, Yogyakarta.
- Havenaar R, Veld JHJH. 1992. Probiotic: A general view. In: Wood BJB (ed). The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. Chapman and Hall, London.
- Kartika B, Hastuti P, Wahyu S. 1998. Pedoman Uji Inderawi Bahan Makanan. PAU Pangan dan Gizi, Yogyakarta.
- Kuswardani I, Nugerahani I. 1998. Minuman probiotik dari nira siwalan (*Borassus sundaicus*): Kajian penambahan susu skim. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Pangan dan Gizi.
- Lehninger A. 1997. Dasar-dasar Biokimia Jilid I. Diterjemahkan oleh: M. Thenawidjaja. Erlangga, Jakarta.
- Meade GP, Spencer EF. 1963. Cane Sugar Handbook. New York: John Willey and Sons, Inc.
- Purwandhani SN, Suladra M. 2003. Optimasi produksi biomassa bakteri asam laktat *Lactobacillus acidophilus* SNP 2 pada media air kelapa dengan berbagai konsentrasi ekstrak tauge. Prosiding Seminar Nasional PATPI.
- Purwandhani. 1998. Isolasi dan Seleksi *Lactobacillus* yang Berpotensi sebagai Agensia Probiotik. [Tesis]. Pasca Sarjana UGM, Yogyakarta.
- Ray B. 1996. Fundamental Food Microbiology. CRC Press, Inc. Florida.
- Shortt C, Salminen S. 2001. Probiotic bacteria in human health: An overview. In: Ransley JK, Donnelly JK, Read NW (eds.). Food and Nutritional Supplements: Their Role in Health and Disease. Springer-Verlag, Berlin.
- Stanton C, Gardiner G, Lynch PB, Collins JK, Fitzgerald G, Ross RP. 1998. Probiotic cheese. Int Dairy J 8: 491-496.
- Sudarmadji S, Haryono B, Suhardi. 1984. Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Penerbit Liberty, Yogyakarta.
- Supriyadi A. 1992. Rendemen Tebu: Liku-liku Permasalahannya. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Tilbury RH. 1975. Occurrence and effects of lactic acid bacteria in the sugar industry. In: Carr JG (ed). Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food. Academic Press, Inc., London.
- Wibowo D. 1989. Mikrobiologi Industri. PAU UGM, Yogyakarta.
- Winarno FG, Fardiaz S, Fardiaz D. 1980. Pengantar Teknologi Pangan. Penerbit Gramedia, Jakarta.