

F/TPG
2004
024

3/2

SKRIPSI

FORMULASI KULTUR BAKTERI ASAM LAKTAT
DALAM PENGEMBANGAN MINUMAN PROBIOTIK (III)

Oleh

DIECE ROOSFLANY SHINTA DEVI

FO2499125

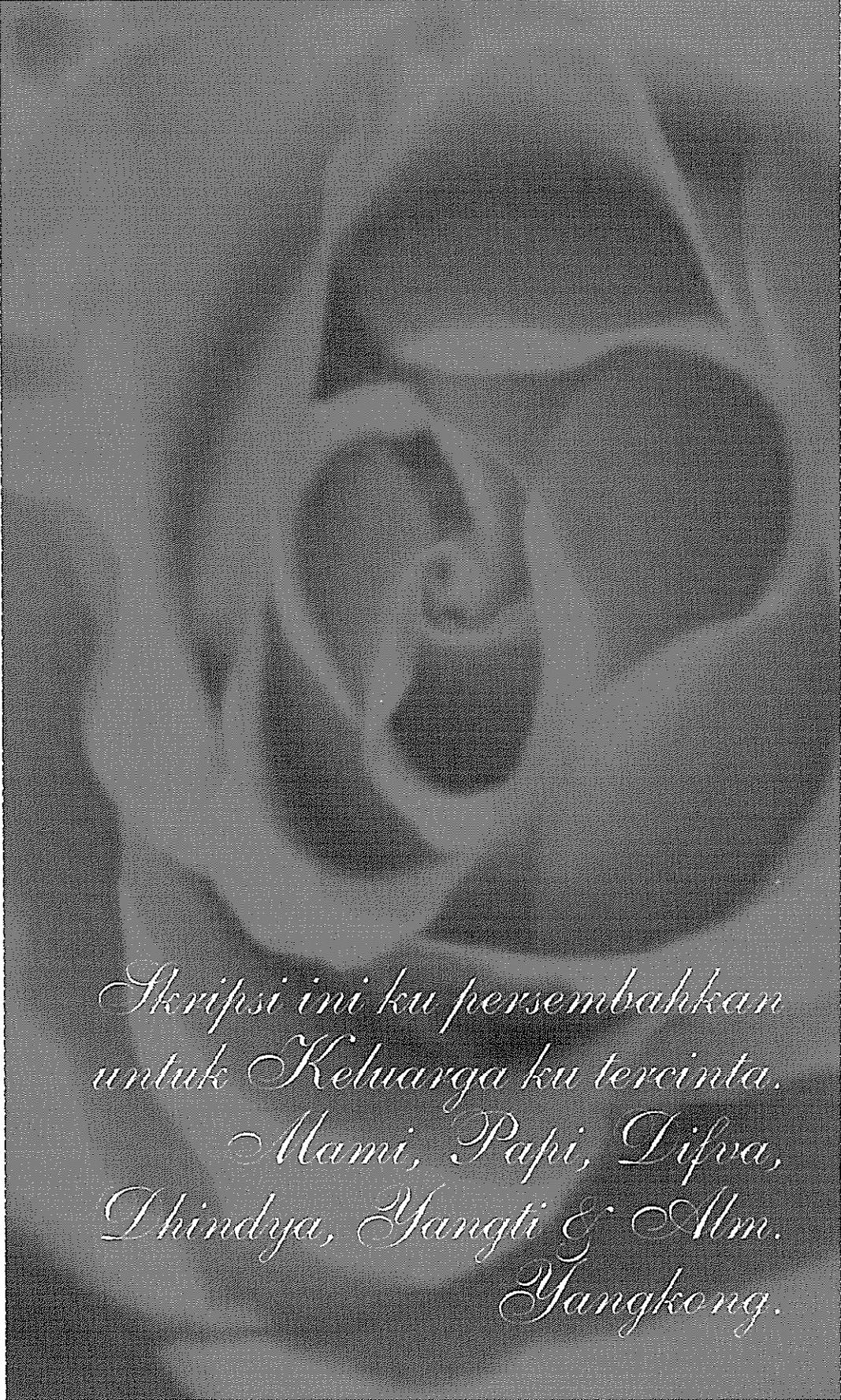


2004

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

INSTITUT PERTANIAN BOGOR

BOGOR



*Skripsi ini ku persembahkan
untuk Keluarga ku tercinta.
Mami, Papi, Difva,
Dhinda, Yangti & Alm.
Yangkong.*

Diece Roosflany Shinta Devi. F02499125. Formulasi Kultur Bakteri Asam Laktat dalam Pengembangan Minuman Probiotik (III). Di bawah bimbingan Betty Sri Laksmi Jenie* dan Nur Wulandari. 2004.

RINGKASAN

Banyak penelitian menunjukkan bahwa galur yang diisolasi dari makanan tradisional seperti pickel, tempoyak dan sauerkraut mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri patogen, tahan garam empedu, serta mampu mereduksi kolesterol sehingga berpotensi sebagai galur probiotik.

Tujuan dari penelitian ini adalah penganekaragaman minuman probiotik sebagai minuman fungsional dengan memanfaatkan BAL probiotik yang diperoleh dari makanan tradisional.

Penelitian ini meliputi (1) seleksi Bakteri Asam Laktat (BAL) asal makanan tradisional, (2) modifikasi konsentrasi susu skim, (3) formulasi kultur minuman probiotik, dan (4) uji penyimpanan minuman probiotik.

Tiga galur hasil penelitian sebelumnya yang berpotensi sebagai galur probiotik, diseleksi berdasarkan kemampuannya untuk tumbuh dalam media nabati dengan konsentrasi susu skim dan glukosa tertentu. BAL probiotik tersebut yaitu BAL A, BAL B, dan BAL C. Ketiganya mampu tumbuh dalam media pertumbuhan tersebut dengan pertumbuhan tertinggi dicapai BAL A sebesar 2.4×10^9 CFU/ml. Pada modifikasi konsentrasi susu skim (X_1 , X_2 , X_3 dan X_4 %), BAL A dapat tumbuh baik pada semua konsentrasi susu skim yang diteliti.

Minuman probiotik Formula 1, Formula 2 dan Formula 3 memperlihatkan penghambatan yang bagus terhadap *Salmonella typhimurium* dan *Aspergillus flavus*. Ketiganya dapat menurunkan jumlah *S. typhimurium* sebesar 3.2 unit log CFU/ml. Penghambatan tertinggi dicapai oleh Formula 1 dengan penurunan *A. flavus* sebesar 1.65 unit log CFU/ml

Uji skalar garis terhadap penampakan, aroma dan rasa ketiga formula tidak berbeda nyata. Akan tetapi uji skalar garis dan uji penjenjangan (*ranking*) terhadap penerimaan umum Formula 1 berbeda nyata dan lebih disukai dibandingkan dengan 2 formula lain. Pertumbuhan BAL ketiga formula berkisar antara 9.5×10^8 – 1.9×10^9 CFU/ml.

Uji penyimpanan untuk minuman probiotik Formula 1 dilakukan dalam lemari pendingin (3 - 5 °C). Selama penyimpanan 33 hari jumlah BAL mengalami penurunan hingga menjadi 4.0×10^3 CFU/ml, dari jumlah sekitar 2.0×10^9 CFU/ml. Jumlah BAL minimal untuk mempertahankan efek probiotik hanya dapat terpenuhi hingga penyimpanan selama 10 hari yaitu sebesar 1.4×10^8 CFU/ml.

Berdasarkan uji penerimaan aroma minuman probiotik selama penyimpanan, ternyata produk masih dapat diterima hingga 20 hari oleh semua panelis. Pada uji penerimaan rasa selama penyimpanan 20 hari, sebanyak 83 % (>80 %) panelis menyatakan masih dapat menerima rasa dari minuman probiotik tersebut. Sehingga bila dilihat dari segi aroma dan rasa, minuman probiotik tersebut dianggap masih dapat diterima hingga penyimpanan selama 20 hari.

*) Pemegang otorisasi penelitian

**FORMULASI KULTUR BAKTERI ASAM LAKTAT
DALAM PENGEMBANGAN MINUMAN PROBIOTIK (III)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN

Pada Departemen Teknologi Pangan dan Gizi

Fakultas Teknologi Pertanian

Institut Pertanian Bogor

Oleh

DIECE ROOSFLANY SHINTA DEVI

FO2499125

2004

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

INSTITUT PERTANIAN BOGOR

BOGOR

**INSTITUT PERTANIAN BOGOR
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN**

**FORMULASI KULTUR BAKTERI ASAM LAKTAT
DALAM PENGEMBANGAN MINUMAN PROBIOTIK (III)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN

Pada Departemen Teknologi Pangan dan Gizi

Fakultas Teknologi Pertanian

Institut Pertanian Bogor

Oleh

DIECE ROOSFLANY SHINTA DEVI

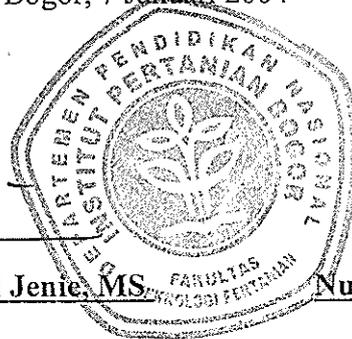
FO2499125

Menyetujui,

Bogor, 7 Januari 2004



Prof. Dr. Ir. Betty Sri Laksmi Jenie, MS
Dosen Pembimbing I



Nur Wulandari, STP, MSi
Dosen Pembimbing II

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Jakarta, pada tanggal 26 Juni 1981 dan merupakan anak kedua dari tiga bersaudara. Putri dari pasangan Bapak Deddy Sukaryadi Rusdwiyo dan Ibu Alfi Haryati ini memulai pendidikan dari TK Tarakanita IV Jakarta (1984-1985).

Selanjutnya penulis menempuh pendidikan pada SD Tarakanita IV Jakarta (1987-1989) dan SDI Al-Azhar Kemandoran Jakarta (1989-1993), SMPI Al-Azhar Kemandoran Jakarta (1993-1996), dan SMUN 78 Jakarta (1996-1999). Pada tahun 1999, penulis diterima di Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, melalui jalur Ujian Masuk Perguruan Tinggi (UMPTN).

Selama menempuh pendidikan di IPB, penulis aktif dalam berbagai kegiatan antara lain pengurus *Local Committee International Association of Students in Agricultural and Related Science* (IAAS) IPB (2002-2003), aktif dalam berbagai kegiatan IAAS (2000-sekarang), panitia dari *Earth Seminar* yang diselenggarakan oleh IPB (2001), panitia *World Congress IAAS* di Indonesia (2002) dan peserta *World Congress IAAS* di Belgia (2003).

Dalam rangka pemenuhan syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada Fakultas Teknologi Pertanian, penulis melaksanakan penelitian di laboratorium Departemen Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian, yang berjudul "Formulasi Kultur Bakteri Asam Laktat dalam Pengembangan Minuman Probiotik (III)" di bawah bimbingan Prof. Dr. Ir. Betty Sri Laksmi Jenie, MS dan Nur Wulandari, STP, MSi.

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan rahmat, hidayah, rizki dan kemudahan sehingga penulis berhasil menyelesaikan penelitian dan menyusun skripsi dengan judul FORMULASI KULTUR BAKTERI ASAM LAKTAT DALAM PENGEMBANGAN MINUMAN PROBIOTIK (III).

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada Departemen Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Dalam penulisan skripsi ini, terdapat beberapa data yang tidak dituliskan demi keperluan hak paten. Apabila pembaca menginginkan informasi yang lebih jelas mengenai hasil penelitian ini, mohon dapat menghubungi Prof. Dr. Ir. Betty Sri Laksmi Jenie, MS sebagai pemegang otorisasi penelitian.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Ibu Prof. Dr. Ir. Betty Sri Laksmi Jenie, MS, selaku pembimbing I penulis, yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan, nasehat serta perhatiannya selama penelitian dan penulisan skripsi.
2. Ibu Nur Wulandari STP, MSi, yang telah bersedia menjadi Pembimbing II penulis. Terima kasih untuk segala bimbingannya, selama penelitian dan penulisan skripsi.
3. Bapak Ir. Sutrisno Koeswara, MSi, yang telah bersedia menjadi dosen penguji dalam ujian kelulusan penulis.
4. Ibu Ir. C. C. Nurwitri, MS dan Ir. Budi Nurtama M. Agr, yang telah banyak memberikan arahan dan bimbingan selama penelitian.
5. Mami, Papi, Difva, Dhindya, Yangti dan seluruh keluarga besar Aryadi atas dukungan dan kasih sayangnya selama pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi.
6. Sub Proyek QUE Program Studi Teknologi Pangan, melalui *Project Grant* tahun anggaran 2003 yang telah mendanai penelitian ini.

7. Pak Koko, Pak Sidik, Pak Mulyono, Mbak Ari dan seluruh laboran di Jurusan TPG yang telah banyak membantu penulis selama bekerja di laboratorium.
8. Teman-teman *Micro-Babe* : Stella, Uun, Pipit, Echi, Intan, Ane, Ika, Dery dan Nani, atas kebersamaannya menjalani penelitian di laboratorium mikrobiologi.
9. The D-ers : Ate, Kodel, Destwiw, Epit, Ndari, Echa, Ajeng, Mimi, Bq, Wylma, QQ, Dwi “bonekaku”, Tita, Ridwan, Iponx, Roni, dan Poanx atas kegilaannya selama penulis menjadi mahasiswa jurusan TPG.
10. Merry, Tri, Ria dan Desi atas kebersamaannya dalam suka dan duka.
11. Widya, Viona dan Ratikh untuk persahabatan yang indah selama 14 tahun terakhir.
12. Jihan, Mulia, Anto, Andi, Mief, Mom beserta segenap anggota *International Association of Students in Agriculture and Related Science* (IAAS) LC-IPB yang telah menceritakan hari-hari penulis.
13. Inggit, Sasa, Deni dan seluruh teman-teman basket FATETA atas kebersamaannya dalam menjalankan hobi.
14. Tintus Hermawan atas kasih sayang, semangat dan pengorbanannya untuk penulis selama pembuatan skripsi ini.
15. Alumni SDI dan SMPI Al-Azhar KMD, SMUN 78 Jakarta, dan TPG’36 beserta semua pihak lain yang telah membantu dan tidak bisa disebutkan namanya satu persatu.

Akhirnya penulis berharap semoga karya kecil ini bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan. Amin.

Bogor, 7 Januari 2004

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
I. PENDAHULUAN.....	1
A. LATAR BELAKANG.....	1
B. TUJUAN.....	2
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
A. SIFAT BAKTERI ASAM LAKTAT	3
B. JENIS - JENIS ISOLAT BAKTERI ASAM LAKTAT DAN PERANANNYA SEBAGAI PROBIOTIK.....	4
C. AKTIVITAS ANTIMIKROBA BAKTERI ASAM LAKTAT..	6
D. SALMONELLA TYPHIMURIUM.....	7
E. ASPERGILLUS FLAVUS.....	7
III. BAHAN DAN ALAT.....	9
A. BAHAN DAN ALAT.....	9
B. METODOLOGI PENELITIAN.....	10
1. Persiapan Kultur.....	10
2. Formulasi Kultur Bakteri Asam Laktat dalam Pengembangan Minuman Probiotik.....	11
a. Seleksi BAL Probiotik.....	12
b. Modifikasi Konsentrasi Susu Skim.....	13
c. Formulasi Kultur Minuman Probiotik.....	13
d. Uji Penyimpanan Minuman probiotik.....	15
C. METODE ANALISIS.....	15
1. Uji Penghambatan Terhadap Pertumbuhan Bakteri Patogen dan Kapang.....	15
2. Total Bakteri Asam Laktat.....	16

3. Uji Organoleptik.....	17
4. Nilai pH.....	17
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	18
A. SELEKSI BAL PROBIOTIK.....	18
B. MODIFIKASI KONSENTRASI SUSU SKIM.....	21
C. FORMULASI KULTUR MINUMAN PROBIOTIK	23
1. Total Bakteri Asam Laktat dan Nilai pH.....	24
2. Uji Penghambatan Terhadap <i>Salmonella typhimurium</i>	25
3. Uji Penghambatan terhadap <i>Aspergillus flavus</i>	29
4. Uji Organoleptik.....	32
D. UJI PENYIMPANAN MINUMAN PROBIOTIK.....	35
1. Total Bakteri Asam Laktat dan Nilai pH.....	35
2. Uji Organoleptik.....	38
a. Aroma.....	38
b. Rasa.....	39
V. KESIMPULAN.....	41
DAFTAR PUSTAKA.....	43
LAMPIRAN.....	47

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Nilai pH pertumbuhan kultur BAL probiotik dalam media nabati.....	19
Tabel 2. Nilai pH minuman probiotik dengan modifikasi konsentrasi susu skim.....	22
Tabel 3. Pengaruh formulasi kultur BAL terhadap nilai pH minuman probiotik.....	25
Tabel 4. Pengaruh formulasi kultur BAL terhadap nilai pH media nabati yang diinokulasi dengan <i>Salmonella typhimurium</i>	28
Tabel 5. Pengaruh formulasi kultur BAL terhadap nilai pH media nabati yang diinokulasi dengan <i>Aspergillus flavus</i>	31
Tabel 6. Hasil uji penerimaan terhadap aroma.....	38
Tabel 7. Hasil uji penerimaan terhadap rasa.....	39

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Tahap-tahap persiapan kultur.....	10
Gambar 2. Tahap-tahap formulasi kultur BAL dalam pengembangan minuman probiotik.....	11
Gambar 3. Tahap-tahap persiapan kultur (starter).....	12
Gambar 4. Skema formulasi minuman probiotik.....	14
Gambar 5. Pertumbuhan kultur BAL probiotik dalam media nabati.....	18
Gambar 6. Stabilitas BAL A dalam MRSB pada penyimpanan di lemari pendingin.....	20
Gambar 7. Pertumbuhan BAL A dalam media nabati dengan modifikasi konsentrasi susu skim.....	21
Gambar 8. Pengaruh formulasi terhadap jumlah BAL dalam minuman probiotik.....	24
Gambar 9. Pengaruh formulasi terhadap penurunan <i>Salmonella typhimurium</i> pada penghambatan dengan bakteri asam laktat.....	26
Gambar 10. Pengaruh formulasi terhadap total bakteri asam laktat pada penghambatan <i>Salmonella typhimurium</i>	26
Gambar 11. Pengaruh formulasi terhadap penurunan <i>Aspergillus flavus</i> pada penghambatan dengan bakteri asam laktat.....	29
Gambar 12. Pengaruh formulasi terhadap total bakteri asam laktat pada penghambatan <i>Aspergillus flavus</i>	30
Gambar 13. Pengaruh jenis formula minuman probiotik terhadap jumlah panelis yang menyukai produk pada uji organoleptik.....	32
Gambar 14. Stabilitas BAL minuman probiotik formula 1 pada media nabati selama Penyimpanan pada suhu 3 - 5 °C	35
Gambar 15. Nilai pH minuman probiotik selama penyimpanan pada suhu 3 - 5 °C.....	37

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Pertumbuhan kultur bakteri asam laktat probiotik dalam media nabati.....	48
Lampiran 2. Pertumbuhan kultur murni BAL A dalam MRSB pada penyimpanan 3 - 5°C	49
Lampiran 3. Pertumbuhan BAL A media nabati dengan modifikasi konsentrasi susu skim.....	50
Lampiran 4. Penilaian organoleptik terhadap minuman probiotik dengan modifikasi susu skim.....	51
Lampiran 5. Total bakteri asam laktat pada produk formulasi minuman probiotik.....	52
Lampiran 6. Total <i>Salmonella typhimurium</i> pada penghambatan oleh bakteri asam laktat.....	53
Lampiran 7. Penurunan <i>Salmonella typhimurium</i> pada uji penghambatan oleh bakteri asam laktat.....	54
Lampiran 8. Total bakteri asam laktat pada uji penghambatan terhadap pertumbuhan <i>S. typhimurium</i>	55
Lampiran 9. Total <i>A. flavus</i> pada uji penghambatan oleh bakteri asam laktat.....	56
Lampiran 10. Penurunan <i>Aspergillus flavus</i> pada uji penghambatan oleh bakteri asam laktat.....	57
Lampiran 11. Total bakteri asam laktat pada uji penghambatan terhadap <i>A. flavus</i>	58
Lampiran 12. Data pengukuran garis skala uji skalar garis terhadap 3 formula minuman probiotik.....	59
Lampiran 13. Analisis sidik ragam skor kesukaan terhadap penerimaan umum 3 formula minuman probiotik.....	61
Lampiran 14. Uji penjenjangan (ranking) terhadap penerimaan umum 3 jenis produk dalam formulasi kultur minuman probiotik...	62

Lampiran 15. Analisis sidik ragam skor kesukaan terhadap penampakan dalam formulasi kultur minuman probiotik.....	63
Lampiran 16. Analisis sidik ragam skor kesukaan terhadap aroma dalam formulasi kultur minuman probiotik.....	64
Lampiran 17. Analisis sidik ragam skor kesukaan terhadap aroma dalam formulasi kultur minuman probiotik.....	65
Lampiran 18. Komentar panelis terhadap penerimaan umum 3 jenis produk dalam formulasi kultur minuman probiotik.....	66
Lampiran 19. Total Bakteri Asam Laktat pada uji penyimpanan minuman probiotik Formula 1.....	67
Lampiran 20. Uji organoleptik penyimpanan minuman probiotik Formula 1.....	68
Lampiran 21. Perhitungan jumlah spora kapang dengan metode Petroff-Hausser (Fardiaz, 1989).....	69
Lampiran 22. Contoh formulir uji skalar garis dan rangking dalam pemilihan formulasi terbaik.....	70
Lampiran 23. Contoh formulir uji penyimpanan aroma dan rasa selama penyimpanan minuman probiotik Formula 1.....	73

I. PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Peran probiotik makin diperbincangkan karena manfaatnya dalam membantu meningkatkan kesehatan pencernaan. Hal ini disebabkan perkembangan trend hidup sehat dalam masyarakat serta semakin meningkatnya kesadaran akan kesehatan, nutrisi dan diet.

Probiotik merupakan mikroorganisme hidup dalam suplemen makanan yang mempunyai pengaruh menguntungkan pada kesehatan inang (manusia), dengan memperbaiki keseimbangan mikroflora intestinal (Gibson dan Fuller, 2000). Persyaratan utama dari bakteri probiotik untuk dapat tumbuh pada usus manusia adalah harus dapat menempel terlebih dahulu pada sel epitel manusia dan mengkolonisasi pada sisi penempelan sehingga dapat mencegah kolonisasi bakteri patogen pada dinding mukosa usus.

Makanan tradisional Indonesia seperti pickel, tempoyak, dadih, sauerkraut (asinan kubis), acar ketimun, dan kecap ikan ternyata merupakan sumber bakteri asam laktat yang berpotensi untuk digunakan sebagai bakteri probiotik. Banyak penelitian yang menunjukkan bahwa galur-galur yang diisolasi dari makanan tradisional mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan patogen seperti *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes*, serta mempunyai ketahanan terhadap garam empedu yang baik dan mampu mereduksi kolesterol (Jenie *et al.*, 2003).

L. plantarum pi28a yang diisolasi dari pickel memiliki ketahanan terhadap garam empedu dan dapat tumbuh dengan baik pada pH rendah. Sedangkan *L. plantarum* sa28k yang diisolasi dari sauerkraut telah diuji secara *in vitro* mampu meningkatkan jumlah laktobasilli, diiringi dengan penurunan yang nyata terhadap jumlah bakteri koliform dan stafilkoki pada feses tikus, serta dapat menurunkan konsentrasi kolesterol serum darah tikus secara nyata ($p < 0.05$) (Kusumawati, 2002). *L. coryneformis* tempoyak memiliki toleransi terhadap asam lambung dan asam empedu, memiliki senyawa antimikroba terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Salmonella*

typhimurium, mampu berkoagregasi dan mampu menempel pada lempeng *stainless steel* (Wirawati, 2002).

Sebagai negara berkembang Indonesia dihadapkan pada masalah penyediaan pangan sebagai sumber kalori dan gizi. Bahan nabati sebagai salah satu sumber pangan yang melimpah dari hasil pertanian ternyata belum dimanfaatkan secara maksimum. Berbagai jenis produk probiotik yang berkembang sekarang ini umumnya berupa produk dalam bentuk beku atau kering beku, minuman susu dan susu fermentasi. Oleh karena itu perlu dilakukan usaha diversifikasi produk probiotik dengan pengembangan minuman probiotik berbahan dasar nabati.

B. TUJUAN

1. TUJUAN UMUM

Penganekaragaman minuman probiotik sebagai minuman fungsional dengan memanfaatkan BAL probiotik yang diperoleh dari makanan tradisional.

2. TUJUAN KHUSUS

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah untuk :

- a. Mengetahui kemampuan pertumbuhan BAL probiotik dalam media pertumbuhan nabati.
- b. Mengetahui aktivitas penghambatan minuman probiotik terhadap bakteri patogen dan kapang.
- c. Mengetahui pengaruh uji penyimpanan terhadap mutu minuman probiotik.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. SIFAT BAKTERI ASAM LAKTAT

Bakteri asam laktat (BAL) termasuk dalam golongan bakteri gram positif, tidak berspora, berbentuk bulat atau batang, tidak berespirasi, memproduksi asam laktat sebagai produk akhir terbesar selama proses fermentasi karbohidrat (Axelsson, 1993). BAL juga memiliki komposisi DNA kurang dari 50% mol G+C, bersifat katalase negatif tetapi kadang-kadang terdeteksi katalase semu pada kultur yang ditumbuhkan pada konsentrasi gula rendah (Pot *et al.*, 1994).

Bakteri yang tergolong bakteri asam laktat adalah *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, dan *Vagococcus* (Axelsson, 1993).

Klasifikasi bakteri asam laktat menjadi beberapa genus didasarkan pada perbedaan morfologi, jenis fermentasi glukosa, perbedaan suhu pertumbuhan, produksi asam laktat, kemampuan untuk tumbuh pada konsentrasi garam tinggi, dan toleransi terhadap asam serta garam. Pada pengklasifikasian beberapa genus baru, penambahan karakteristik seperti komposisi asam lemak dan sifat motil juga digunakan sebagai dasar (Axelsson, 1993).

Fermentasi gula oleh bakteri asam laktat dapat dibedakan menjadi dua jenis yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. Pada metabolisme homofermentatif, asam laktat dihasilkan sebagai produk akhir di bawah kondisi standar melalui glikolisis (jalur *Embden-Meyerhof*). Pada metabolisme heterofermentatif, dihasilkan produk akhir lain seperti asam asetat, etanol, dan karbondioksida melalui jalur 6-fosfoglukonat (fosfoketolase) (Axelsson, 1993).

B. JENIS-JENIS ISOLAT BAKTERI ASAM LAKTAT DAN PERANANNYA SEBAGAI PROBIOTIK

Mitsuoka (1990), mengelompokkan BAL berdasarkan kemampuannya untuk tumbuh dalam usus pencernaan manusia yaitu (1) Kelompok yang dapat mencapai usus dalam keadaan hidup dan paling sering ditemukan dalam kotoran manusia, contoh *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*); (2) Kelompok yang dapat mencapai usus dalam keadaan hidup dan cukup sering ditemukan dalam kotoran manusia, contoh *Lactobacillus* (*L. acidophilus* dan *L. reuteri*); (3) Kelompok yang dapat mencapai usus dalam keadaan hidup dan terkadang ditemukan dalam kotoran manusia, contoh *Lactobacillus* (*L. casei* dan *L. brevis*); (4) Kelompok yang biasa dipakai oleh industri susu dan tidak ditemukan dalam kotoran manusia, contoh *Lactobacillus* (*L. bulgaricus*) dan laktokoki (*S. thermophilus* dan *S. cremoris*).

Probiotik merupakan mikroorganisme hidup dalam suplemen makanan yang mempunyai pengaruh menguntungkan pada kesehatan inang (manusia), dengan memperbaiki keseimbangan mikroflora intestinal (Gibson dan Fuller, 2000). Gibson dan Fuller (2000) juga menyatakan, probiotik yang efektif harus memenuhi beberapa kriteria yaitu memberikan efek yang menguntungkan pada sel inang, tidak patogenik dan tidak toksik, mengandung sejumlah besar sel hidup, mampu bertahan dan melakukan kegiatan metabolisme dalam usus, tetap hidup selama dalam penyimpanan dan waktu digunakan, mempunyai sifat sensori yang baik dan diisolasi dari sel inang. Sehingga tidak semua BAL merupakan probiotik.

Tahapan mekanisme probiotik untuk meningkatkan kesehatan menurut Hoover (2000) adalah dengan cara : (1) produksi senyawa antimikroba seperti asam laktat, asam asetat, karbondioksida, H_2O_2 , bakteriosin, reuterin, dan senyawa penghambat lainnya yang dapat menekan pertumbuhan mikroorganisme patogen, (2) kompetisi dalam penyerapan nutrisi, dan sisi penempelan pada sel epitel usus, produksi mukus, (3) menstimulasi sistem imunitas dan mampu mengubah aktivitas metabolisme mikroba dalam saluran pencernaan.

Pada penelitian Elida (2002), terpilih 5 isolat unggul sebagai kandidat bakteri probiotik yaitu *Streptococcus raffinolactis* ct4, *Lactococcus piscium* dl4, *Leuconostoc paramesenteroides* bl2, *Ln. Mesenteroides* al2, dan *L. brevis* ae4. Kelima isolat memiliki aktivitas antimikroba yang tinggi terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Salmonella typhimurium*, dengan ketahanan relatif 80-95% baik terhadap pH 3.5 dan memproduksi asam laktat tinggi. Bahkan uji koagregasi menunjukkan bahwa koagregasi tertinggi terjadi antara pasangan *S. raffinolactis* ct4 dan *Ln. Mesenteroides* al2 yaitu 5.2 %, dimana persen hidrofobisitas *S. raffinolactis* adalah yang tertinggi yaitu sebesar 15.7 %.

Penelitian Kusumawati (2002), menunjukkan terjadinya penurunan *L. plantarum* pi28a sebanyak 0.41 unit log/ ml pada pengujian ketahanan terhadap pH 2.5 selama 90 menit, serta penurunan sebesar 1.59 unit log/ ml pada konsentrasi garam empedu 1 %. Sehingga *L. plantarum* pi28a dinyatakan berpotensi sebagai bakteri probiotik. Sedangkan penelitian Wirawati (2002) menunjukkan bahwa *L. coryneformis* dalam tempoyak berpotensi sebagai bakteri probiotik. Pemilihan didasarkan atas toleransi bakteri tersebut terhadap asam lambung dan asam empedu, memiliki senyawa antimikroba terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Salmonella typhimurium*, serta mampu berkoagregasi, dan mampu menempel pada lempeng *stainless steel*, walaupun sifat hidrofobisitas yang diekspresikan oleh isolat-isolat ini rendah.

Hasil penelitian Kusumawati (2002), menunjukkan *L. plantarum* sa28k yang diisolasi dari asinan kubis, *L. acidophilus* FNCC116 yang diisolasi dari moromi kecap, dan *L. casei* FNCC343 yang diisolasi dari bekasam memiliki ketahanan yang baik untuk tumbuh pada lingkungan asam dan mengandung garam empedu serta menunjukkan aktivitas penghambatan yang tinggi terhadap *Bacillus cereus*, *S. aureus*, dan *E. coli*. Tiga bakteri probiotik tersebut meningkatkan jumlah laktobasili yang diiringi dengan penurunan yang nyata terhadap jumlah bakteri koliform dan stafilokoki pada feses tikus.

C. AKTIVITAS ANTIMIKROBA BAKTERI ASAM LAKTAT

Bakteri asam laktat memproduksi asam organik (asam laktat, asam format, dan asam asetat), diasetil, hidrogen peroksida, karbondioksida dan bakteriosin yang berpotensi untuk menghambat beberapa mikroorganisme lain (Davidson dan Hoover, 1993).

Sebagian besar bakteri asam laktat telah dilaporkan dapat menonaktifkan bakteri patogen serta menghambat pertumbuhan kapang, dan beberapa substansi antibakteri telah berhasil diisolasi (Gourama dan Bullerman, 1995).

Mekanisme aktivitas penghambatan antimikroba menurut Branen dan Davidson (1993) dapat melalui beberapa faktor, antara lain (1) mengganggu komponen penyusun dinding sel, (2) bereaksi dengan membran sel sehingga mengakibatkan peningkatan permeabilitas dan menyebabkan kehilangan komponen penyusun sel, (3) menginaktifkan enzim esensial yang berakibat pada terhambatnya sintesis protein dan destruksi atau kerusakan fungsi material genetik.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Wirawati (2002), ditemukan isolat-isolat bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai bakteri probiotik dalam tempoyak yaitu *L. coryneformis* To 8, *L. plantarum* To 9, *L. plantarum* To 23, *L. casei* To 25, dan *L. casei* To 26. Pemilihan antara lain didasarkan sifat-sifat bakteri tersebut, yaitu memiliki senyawa antimikroba terhadap *E. coli*, *S. aureus*, dan *S. typhimurium*.

Pengujian secara *in vivo* juga telah dilakukan oleh Kusumawati (2002), dimana pemberian *L. plantarum* sa28k pada tikus dapat menurunkan jumlah koliform dan stafilokoki dalam feses tikus.

Beberapa jenis bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus* spp telah ditemukan menghambat pertumbuhan kapang serta produksi aflatoksin, hal ini berkaitan dengan pelepasan cairan intraselular sel berberat molekul rendah dari bakteri asam laktat selama proses lisis dari sel bakteri tersebut (Gourama dan Bullerman, 1995). Menurut Lavermicocca (2000), komponen antimikotik yang dihasilkan oleh *L. plantarum* adalah fenil laktat dan 4-hidroksi fenil laktat.

D. SALMONELLA TYPHIMURIUM

Salmonella typhimurium merupakan famili *Enterobacteriaceae*, gram negatif, fakultatif anaerob, tidak berspora, memproduksi asam dan terkadang gas dari glukosa, biasanya katalase positif dan oksidase negatif serta mereduksi nitrat menjadi nitrit, sensitif terhadap panas, dengan pH minimum pertumbuhan adalah 3.8 (Roberts *et al.*, 1996).

Penelitian menunjukkan bahwa *Salmonella spp.* dapat tumbuh dan bertahan hidup dalam media asam, hingga pH 4.1. *Salmonella* cukup toleran terhadap asam dan respon ini telah menunjukkan juga perlindungan melawan asam organik (Stratford *et al.*, 1999).

Bakteri ini menggunakan sitrat sebagai sumber karbon, memproduksi hidrogen sulfida, ornitin, arginin dan lisin dekarboksilat, memberi hasil positif pada uji dengan *methyl red*, serta hasil negatif pada uji *Voges-Proskauer* dan uji indol (Roberts *et al.*, 1996).

Media yang dapat digunakan sebagai media pertumbuhan selektif *Salmonella* adalah *Hectoen Enteric Agar* (HEA). Perbedaan terlihat dari perubahan warna oleh pH sebagai akibat dari adanya fermentasi laktosa, produksi hidrogen sulfida, atau dekarboksilasi lisin (Roberts *et al.*, 1996).

E. ASPERGILLUS FLAVUS

Aspergillus flavus diklasifikasikan ke dalam Subkingdom *Deuteromycotina*, dan klas *Hyphomycetales*, reproduksi dengan spora aseksual yang dikenal sebagai konidia, konidia kurang lebih berbentuk bola, berukuran sangat kecil dan berdiameter 5 mikron (Sarles *et al.*, 1956).

A. flavus tumbuh pada kisaran suhu yang luas (di atas kisaran mesofilik), bersifat xerofilik dan mampu hidup pada a_w 0.8 (Roberts *et al.*, 1996). Spesies ini dapat tumbuh pada kisaran suhu 12-48 °C dengan suhu optimum pertumbuhan adalah 25 - 42 °C (Robinson *et al.*, 2000). Sedangkan kisaran pH pertumbuhan *A. flavus* adalah 2.1 - 11.2, dengan pertumbuhan yang lebih lambat pada pH di bawah 3.5 (Roberts *et al.*, 1996).

Kapang jenis ini memproduksi konidia berwarna kuning-hijau, dengan tekstur lembut, biasanya hanya memproduksi aflatoksin B dan kurang dari 50% isolat bersifat toksik (Roberts *et al.*, 1996).

Media yang dapat digunakan untuk mendeteksi *A. flavus*, antara lain adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan *Acidified PDA* (Robinson *et al.*, 2000)

III. BAHAN DAN METODE

A. BAHAN DAN ALAT

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini merupakan bahan nabati. Bahan-bahan tambahan yang digunakan adalah gula pasir (sukrosa), glukosa, susu skim, asam tartarat, NaCl, buffer pH 7 serta pH 4 dan air. Juga digunakan pewarna bakteri seperti *lugol*, *methyl red* dan *safranin*.

Kultur bakteri asam laktat yang digunakan adalah beberapa jenis isolat BAL hasil isolasi dari makanan tradisional yaitu BAL A, BAL B dan BAL C, serta kultur BAL yang biasa digunakan untuk minuman fermentasi yaitu BAL D dan BAL E. Kultur bakteri patogen yang digunakan untuk pengujian adalah *Salmonella typhimurium* sedangkan kapang yang digunakan adalah *Aspergillus flavus*.

Medium yang digunakan adalah *de Mann Rogosa Sharpe Broth* (MRSB), *Potato Dextrose Broth* (PDB), *Bacto Agar*, *Nutrient Broth* (NB), *Plate Count Agar* (PCA) dan *Hectoen Enteric Agar* (HEA).

Alat-alat yang digunakan yaitu pisau, kain saring, kapas, panci, botol gelas, tutup botol gelas, kantung plastik, aluminium foil, sudip, gelas pengaduk, pipet steril, cawan petri steril, mikropipet, tips, tabung reaksi steril, erlenmeyer, bunsen, waring blender, kompor, *hot plate*, neraca, inkubator, lemari pendingin, homogenisator, pH-meter, refraktometer, *haemocytometer* dan mikroskop.

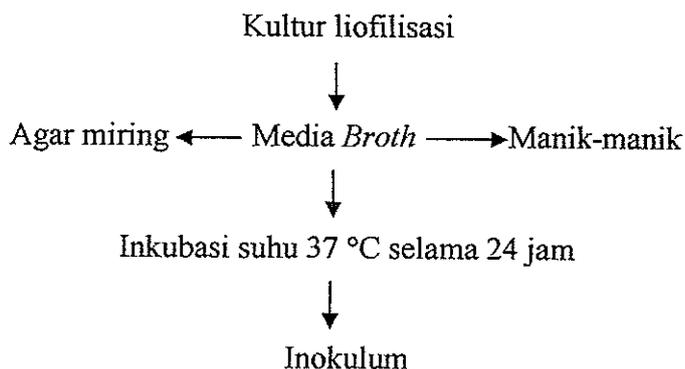
B. METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dibagi dalam 2 tahap yaitu : (1) Persiapan kultur dan (2) Formulasi kultur BAL dalam pengembangan minuman probiotik.

1. Persiapan Kultur

Kultur liofilisasi (3 kultur BAL probiotik dari makanan tradisional, 2 kultur BAL yang biasa digunakan pada minuman fermentasi, *S. typhimurium*, *A. flavus*) masing-masing dipindahkan ke dalam tabung reaksi berisi media *MRS Broth* untuk BAL, *Nutrient Broth* untuk *S. typhimurium* dan *Potato Dextrose Broth* untuk *A. flavus* kira-kira 5-7 ml, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Selanjutnya untuk *A. flavus* dilakukan penggoresan pada agar miring *Potato Dextrose Agar* dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 7 hari. Seluruh inokulum disimpan dalam lemari pendingin.

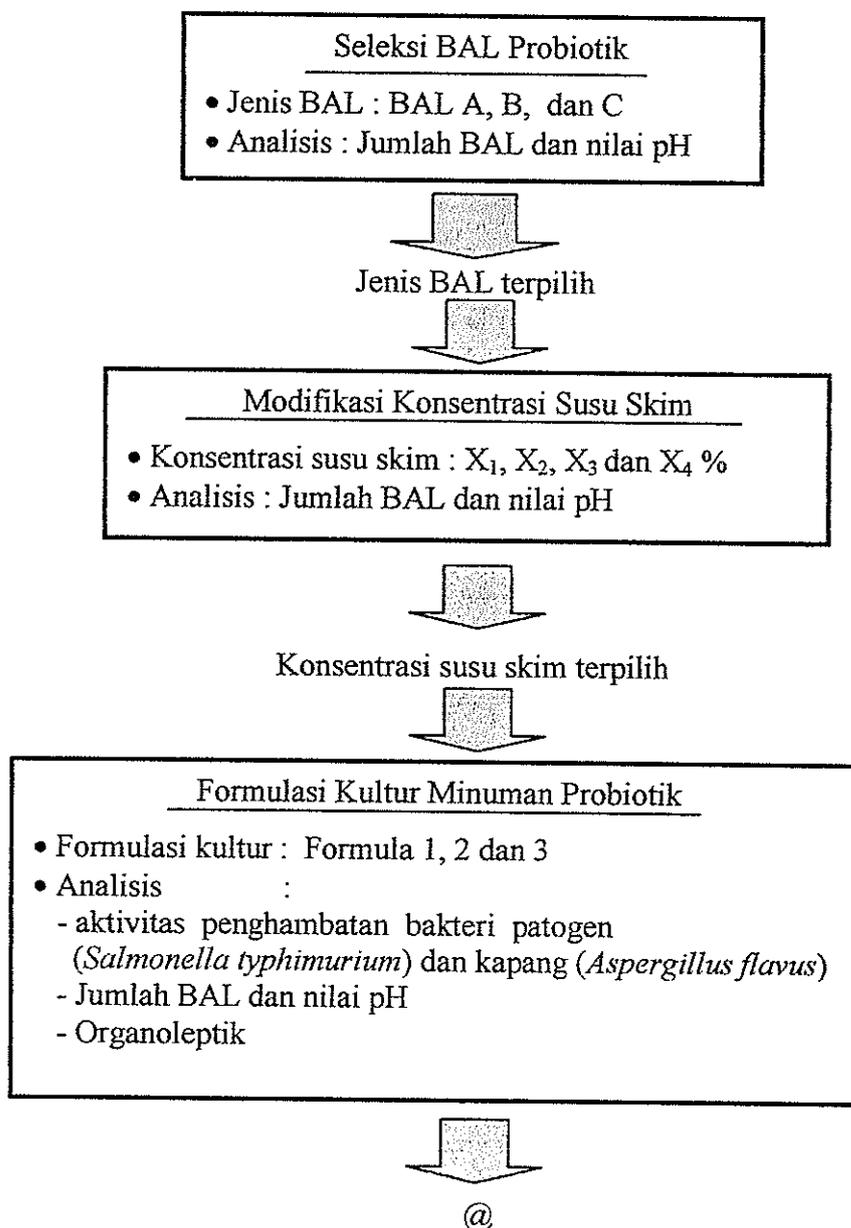
Penyimpanan kultur stok dilakukan dengan liofilisasi dalam manik-manik. Media *broth* yang sebelumnya telah ditumbuhkan kultur (BAL, *S. typhimurium*, *A. flavus*) dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi manik-manik yang telah disterilisasi, dan ditambah gliserol sebanyak 20 %. Setelah didiamkan selama 2 - 3 menit, media *broth* dikeluarkan, dan manik-manik selanjutnya disimpan dalam *freezer*. Sebaiknya kultur stok disegarkan kembali minimal 2 bulan sekali.

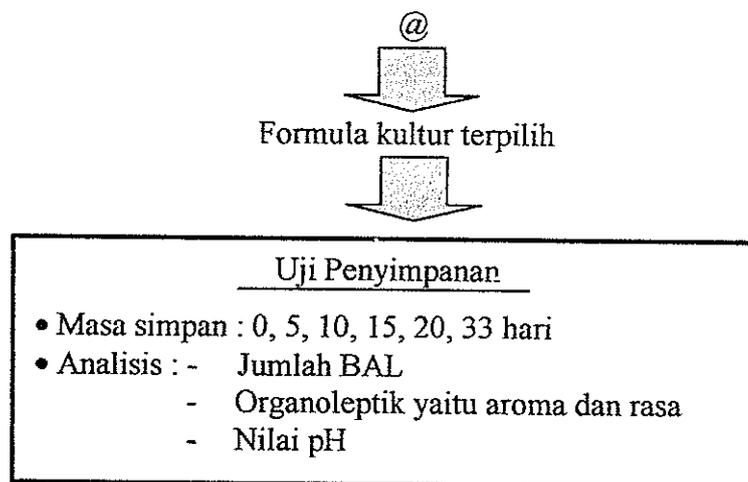


Gambar 1. Tahap-tahap persiapan kultur

2. Formulasi Kultur Bakteri Asam Laktat dalam Pengembangan Minuman Probiotik

Tahap-tahap formulasi kultur BAL dalam pengembangan minuman probiotik yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 2 meliputi : (a) Seleksi BAL probiotik, (b) Modifikasi konsentrasi susu skim, (c) Formulasi kultur minuman probiotik, (d) Uji penyimpanan minuman probiotik.

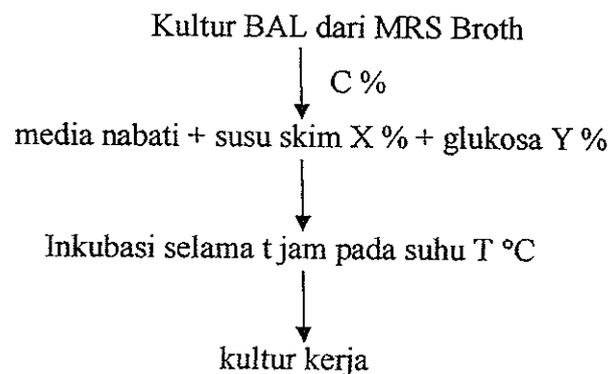




Gambar 2. Tahap-tahap formulasi kultur BAL dalam pengembangan minuman probiotik

a. Seleksi BAL Probiotik

Starter yang akan diinokulasikan ke dalam media nabati dibuat dalam bentuk kultur kerja. Kultur dari MRS broth (inokulum) ditumbuhkan sebanyak C % dalam media nabati yang telah ditambah susu skim (X %) dan glukosa (Y %), kemudian diinkubasi selama t jam pada suhu T °C, sehingga dihasilkan kultur kerja (starter). Tahap-tahap persiapan kultur bakteri dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Tahap-tahap persiapan kultur (Starter)

Seleksi BAL probiotik dilakukan dengan menumbuhkan kultur BAL dalam media nabati yang telah ditambah skim (X %) dan glukosa (Y %) selama t jam. Penghitungan jumlah BAL dilakukan dengan metode *Standard Plate Count*. BAL terpilih adalah yang menunjukkan jumlah pertumbuhan tertinggi pada media pertumbuhan nabati.

b. Modifikasi Konsentrasi Susu Skim

Modifikasi konsentrasi susu skim dilakukan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi susu skim terhadap pertumbuhan bakteri asam laktat. Pada tahap ini BAL probiotik yang terpilih di tahap 1, ditumbuhkan dalam media nabati dengan konsentrasi susu skim yang berbeda yaitu X_1 , X_2 , X_3 , dan X_4 . Konsentrasi susu skim tersebut mulai dibedakan pada saat pembuatan kultur kerja.

Media nabati yang telah ditambahkan susu skim dengan konsentrasi berbeda dan glukosa (Y %) dipasteurisasi pada suhu dan waktu tertentu. Kemudian media pertumbuhan tersebut didinginkan, diinokulasi dengan C % starter BAL terpilih dan diinkubasi pada suhu T °C selama t jam.

Penghitungan jumlah BAL dilakukan dengan metode *Standard Plate Count*. Konsentrasi susu skim terpilih adalah konsentrasi minimal yang dapat menghasilkan jumlah optimum dari BAL terpilih pada media pertumbuhan nabati dengan nilai organoleptik yang dapat diterima meliputi rasa, aroma dan tekstur minuman probiotik.

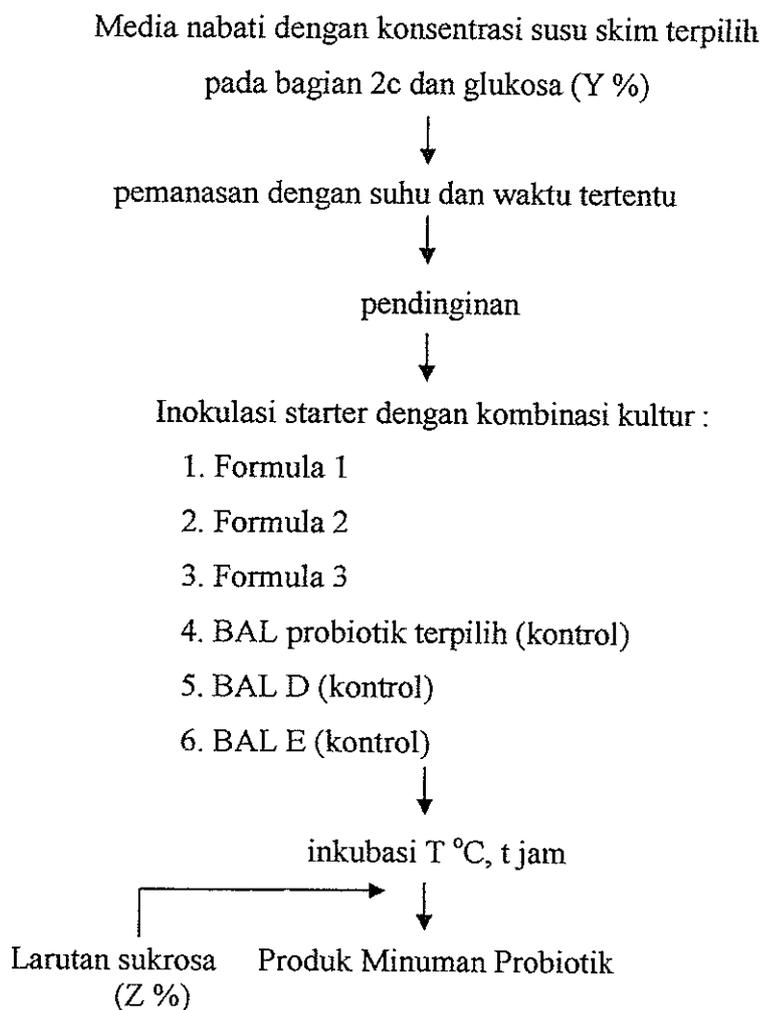
c. Formulasi Kultur Minuman Probiotik

Pada tahap ini dilakukan formulasi kultur minuman probiotik untuk mengetahui pengaruh jenis formula kultur terhadap pertumbuhan BAL, nilai pH, kemampuan penghambatan terhadap *S. typhimurium* dan *A. flavus* serta sifat organoleptik produk minuman probiotik.

Media nabati dengan konsentrasi susu skim yang telah terpilih pada tahap 2 dan glukosa (Y %), dipanaskan pada suhu serta waktu

tertentu dan didinginkan. Setelah itu diinokulasi starter dengan 3 jenis formula yaitu : (1) Formula 1, (2) Formula 2, dan (3) Formula 3. Sebagai kontrol digunakan : (1) BAL probiotik terpilih, (2) BAL D, dan (3) BAL E..

Media nabati yang telah diinokulasi lalu diinkubasi pada suhu T °C selama t jam sehingga dihasilkan minuman probiotik, selanjutnya ditambah larutan sukrosa dengan konsentrasi tertentu (Z %). Sukrosa terlebih dahulu dilarutkan sambil dipanaskan dalam air dan disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Tahap-tahap formulasi kultur minuman probiotik dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Skema formulasi minuman probiotik

d. Uji Penyimpanan

Pada tahap ini dilakukan uji penyimpanan pada produk yang terpilih berdasarkan tahap 3 yaitu produk dengan nilai sensori paling disukai, jumlah BAL terbanyak, dan kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan *Salmonella typhimurium* dan *Aspergillus flavus*. Produk disimpan pada suhu 3 - 5°C selama 33 hari. Parameter uji penyimpanan meliputi uji organoleptik, nilai pH, dan jumlah BAL produk.

C. METODE ANALISIS

1. Uji Penghambatan Terhadap Pertumbuhan Bakteri Patogen dan Kapang Perusak (Jenie dan Fardiaz, 1989)

Penentuan sifat penghambatan BAL probiotik terhadap bakteri patogen dan kapang perusak dilakukan dengan menginokulasikan secara terpisah 1 ml inokulum bakteri patogen dan kapang perusak ke dalam 100 ml media nabati. Kemudian bakteri dan kapang tersebut ditumbuhkan bersama-sama dengan BAL probiotik. Jumlah koloni awal yang terkandung berkisar antara 10^5 - 10^6 koloni/ml media nabati.

Bakteri patogen ditumbuhkan dalam media *Nutrient Broth* yang diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Jumlah bakteri dan kapang yang diinokulasi ke dalam 100 ml media nabati berjumlah 10^5 - 10^6 koloni/ml media nabati. Bakteri patogen yang digunakan adalah *Salmonella typhimurium*.

Kapang ditumbuhkan dalam agar miring *Potato Dextrose Agar* (PDA) selama 7-10 hari diinkubasi pada suhu 30 °C. Untuk kultur kerja, spora kapang diambil dalam larutan 0.85 % NaCl dan dihitung dengan menggunakan metode *Petroff-Hauser* (Lampiran 21). Kapang yang digunakan adalah *Aspergillus flavus*.

Pengamatan jumlah *S. typhimurium* dan *A. flavus* selama fermentasi dilakukan setelah inkubasi selama t jam. Pemupukan dilakukan

dengan metode tuang, menggunakan *Hectoen Enteric Agar* (HEA) untuk *S. typhimurium* dan *Potato Dextrose Agar* (PDA) untuk *A. flavus*. Setelah dilakukan pengenceran contoh dan pemupukan pada cawan petri steril, media dituangkan ke masing-masing cawan. Cawan digoyang mendatar dan agar dibiarkan membeku. Inkubasi dilakukan selama 2 hari pada suhu 37 °C dengan posisi cawan terbalik. Jumlah koloni pada setiap cawan dihitung untuk menentukan jumlah sel/ml atau g/contoh.

$$\begin{array}{l} \text{Jumlah sel/ml} = \text{Jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}} \\ \text{atau sel/gram} \end{array}$$

2. Total Bakteri Asam Laktat pada MRS Agar (Fardiaz, 1989)

Metode yang digunakan untuk menghitung total BAL adalah hitungan cawan. Pada metode ini, minuman probiotik yang diperkirakan mengandung lebih dari 300 sel BAL per ml memerlukan perlakuan pengenceran sebelum ditumbuhkan pada medium agar di dalam cawan petri. Setelah inkubasi akan terbentuk koloni pada cawan tersebut dalam jumlah yang dapat dihitung. Perhitungan koloni yang tumbuh dilakukan berdasarkan *Standard Plate Count*, dimana jumlah yang terbaik adalah diantara 30 sampai 300 koloni. Pengenceran biasanya dilakukan secara desimal yaitu 1:10, 1:100, dan seterusnya. Larutan yang digunakan untuk pengenceran berupa 0.85 % NaCl.

Cara pemupukan yang digunakan adalah metode tuang (*pour plate*). Dalam metode ini, sejumlah contoh (1 ml atau 0.1 ml) dari pengenceran yang dikehendaki dimasukkan ke dalam cawan petri, kemudian ditambah MRSA steril yang telah didinginkan (47 – 50 °C) sebanyak 15 – 20 ml dan digoyangkan supaya contoh menyebar rata. Pemupukan dilakukan duplo pada setiap pengenceran. Cawan petri selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C dengan posisi terbalik selama 48 jam.

$$\text{Jumlah sel/ml} = \text{rata-rata koloni} \times 1/\text{faktor pengenceran}$$

3. Uji Organoleptik (Rahayu, 2001)

Pada tahap formulasi kultur minuman probiotik, uji organoleptik yang digunakan meliputi uji skalar garis terhadap penerimaan umum, penampakan, aroma dan rasa serta uji penjenjangan (*ranking*) terhadap penerimaan umum minuman probiotik tersebut. Pada uji skalar garis ditetapkan skala nilai yang berkisar antara 1 – 10, dengan nilai kurang dari 5 menyatakan tidak suka dan nilai lebih dari sama dengan 5 menyatakan suka. Data angka diperoleh dari pengukuran garis skala. Panelis yang digunakan adalah panelis semi terlatih sebanyak 30 orang. Panelis semi terlatih merupakan panelis yang memiliki cukup pengetahuan tetapi belum memiliki pengalaman dalam hal pengujian organoleptik. Pengujian dilakukan terhadap 3 jenis formula yaitu formula 1, formula 2 dan formula 3. Contoh formulir dapat dilihat pada Lampiran 22.

Sedangkan pada uji penyimpanan, uji organoleptik yang digunakan adalah uji penerimaan rasa dan aroma minuman probiotik selama penyimpanan 20 hari. Panelis yang digunakan adalah panelis semi terlatih sebanyak 12 orang. Contoh formulir dapat dilihat pada Lampiran 23.

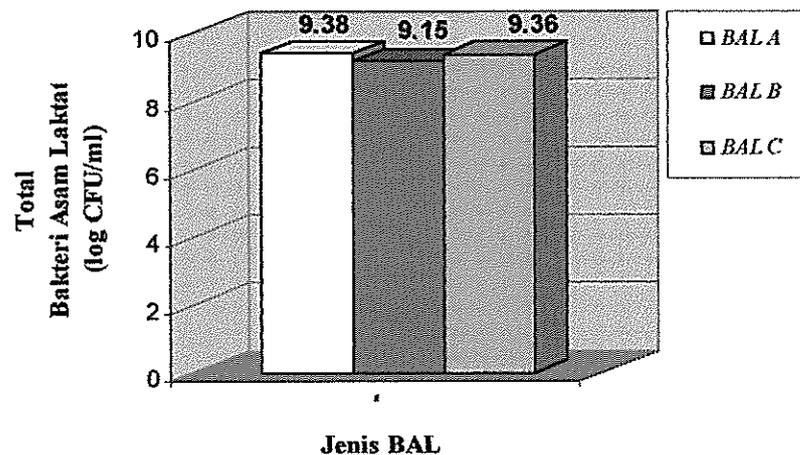
4. Nilai pH (Apriyantono *et al.*, 1989)

Tahap-tahap penetapan pH secara umum adalah suhu sampel diukur dan pengatur suhu pH sampel pada suhu diset, pH meter dinyalakan sampai stabil (15 - 30 menit), probe elektrode dibilas dengan akuades atau aliquot sampel dan dikeringkan dengan kertas tissue, elektrode dicelupkan pada larutan sampel, diset pengukuran pH dan elektrode dibiarkan tercelup beberapa saat sampai diperoleh pembacaan yang stabil. Pengukuran diulang hingga tiga kali untuk setiap sampel.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. SELEKSI BAL PROBIOTIK

Tiap galur bakteri asam laktat yang diuji memiliki kemampuan yang berbeda-beda untuk tumbuh dalam media nabati. Seleksi bakteri asam laktat probiotik dilakukan terhadap 3 galur yang telah diteliti sebelumnya sebagai galur yang berpotensi sebagai probiotik yaitu BAL A, BAL B dan BAL C. Ketiga galur tersebut ditumbuhkan dalam media pertumbuhan nabati selama t jam pada suhu T °C. Pertumbuhan kultur BAL probiotik dalam media nabati dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Pertumbuhan kultur BAL probiotik dalam media nabati

Hasil yang disajikan pada Gambar 5 menunjukkan bahwa ketiga galur probiotik tersebut memiliki kemampuan untuk tumbuh baik pada media nabati dengan penambahan susu skim (X %) dan glukosa (Y %). Pertumbuhan ketiga BAL berkisar $1.4 - 2.4 \times 10^9$ CFU/ ml (Lampiran 1).

Jumlah koloni ketiga galur yang mencapai 10^9 CFU/ml memperlihatkan kemampuan yang sama dari ketiga galur untuk tumbuh dalam media nabati, kemungkinan besar disebabkan karena ketiganya masih termasuk dalam genus yang sama sehingga memiliki metabolisme yang

kurang lebih sama. Hal ini diduga pula berkaitan dengan gula dan nutrisi yang tersedia dalam media tersebut. Fruktosa, glukosa dan sukrosa merupakan jenis gula yang umumnya terkandung dalam bahan nabati (Stratford *et al.*, 1999). Selama proses fermentasi gula-gula tersebut dimetabolisme oleh bakteri asam laktat menjadi asam laktat, asam asetat, etanol dan karbondioksida (Harris, 1998).

Metabolit-metabolit yang dihasilkan selama proses fermentasi seperti asam laktat, asam asetat, etanol dan CO₂, menyebabkan penurunan pH (Harris, 1998). Hasil pengukuran pH dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai pH pertumbuhan kultur BAL probiotik dalam media nabati

Jenis BAL	pH awal media nabati	pH minuman probiotik
BAL A	5.82	3.88
BAL B	5.82	3.78
BAL C	5.85	3.89

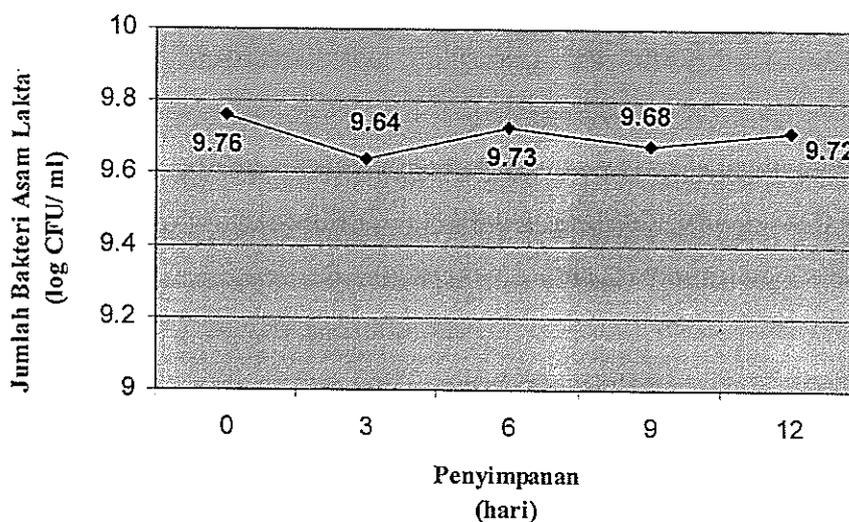
Pada pengukuran pH nilai yang terukur adalah konsentrasi ion H⁺ bebas dari sejumlah asam terdisosiasi (Stratford *et al.*, 1999). Hasil yang didapat pada Tabel 1 menunjukkan nilai pH rata-rata produk minuman probiotik yang berada dibawah 4, berkisar antara 3.78 - 3.89. Hal ini menandakan adanya proses fermentasi yang menghasilkan asam laktat, asam asetat dan asam format sehingga akumulasinya menyebabkan penurunan pH.

Pot *et al.*, (1994) mengelompokkan bakteri asam laktat menjadi 3 kelompok. Kelompok I adalah laktobasili obligat homofermentatif yang selalu memfermentasi gula menjadi asam laktat serta tidak dapat menggunakan pentosa dan glukonat. BAL yang termasuk dalam kelompok ini antara lain *L. delbrueckii*, *L. salivarius*, dan *L. acidophilus*. Kelompok II adalah laktobasili fakultatif heterofermentatif yang memfermentasi gula menjadi asam laktat, asam asetat, etanol dan asam format dalam jumlah glukosa yang terbatas. BAL yang termasuk dalam kelompok ini antara lain *L. casei*, *L. coryneformis*, dan *L. plantarum*. Kelompok III adalah laktobasili obligat heterofermentatif yang selalu memfermentasi gula menjadi asam laktat, asam asetat, etanol dan karondioksida serta memfermentasi pentosa

menjadi asam laktat dan asam asetat. BAL yang termasuk dalam kelompok ini adalah *L. brevis*, dan *L. fermentum*.

Karena pertumbuhan BAL A dalam media nabati mencapai 2.4×10^9 CFU/ ml (Lampiran 1), tertinggi di antara yang lain, maka BAL A ditetapkan sebagai galur terunggul dan digunakan pada tahap-tahap selanjutnya.

BAL probiotik terpilih yaitu BAL A diuji stabilitasnya di dalam media MRSB pada penyimpanan di suhu 3 - 5 °C selama 12 hari. Hal ini dilakukan untuk melihat viabilitas BAL selama penyimpanan sebagai kultur stok. Viabilitas BAL A dalam MRSB selama penyimpanan di lemari pendingin dapat dilihat pada Gambar 6.

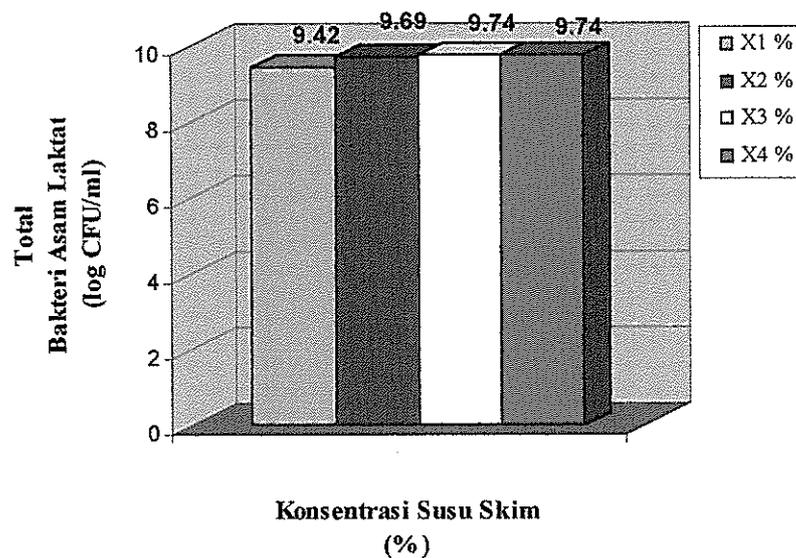


Gambar 6. Stabilitas BAL A dalam MRSB pada penyimpanan di lemari pendingin

Pada Gambar 6 terlihat jumlah bakteri asam laktat yang stabil jumlahnya selama penyimpanan dalam lemari pendingin selama 12 hari. Total bakteri asam laktat selalu berada di atas 10^9 CFU/ ml, bahkan hingga hari terakhir yaitu sebesar 5.2×10^9 CFU/ ml (Lampiran 2). Dengan demikian BAL A dalam media MRSB dapat terus disimpan dan digunakan selama 12 hari. Akan tetapi untuk mempertahankan viabilitas BAL, penyegaran kultur dilakukan setiap 12 hari.

B. MODIFIKASI SUSU SKIM

Susu skim digunakan BAL sebagai sumber energi. Konsentrasi susu skim yang diuji berturut-turut dari terendah ke tertinggi adalah X_1 , X_2 , X_3 dan X_4 %. Data pertumbuhan kultur BAL probiotik terpilih yaitu BAL A dalam media nabati dengan modifikasi konsentrasi susu skim dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Pertumbuhan BAL A dalam media nabati dengan modifikasi konsentrasi susu skim

Pada Gambar 7 terlihat jumlah koloni bakteri asam laktat pada seluruh konsentrasi susu skim berada di atas 9.00 log CFU/ ml. Hasil yang diperoleh berkisar antara 2.6×10^9 CFU/ ml hingga 5.5×10^9 CFU/ ml (Lampiran 3). Svensson (1999) menyatakan, efek probiotik dapat dipertahankan jika makanan atau minuman mengandung jumlah organisme probiotik minimal 10^6 - 10^8 CFU/ ml. Dengan demikian keempat produk yang dibuat dengan konsentrasi susu skim yang berbeda tersebut dapat dikatakan sebagai minuman probiotik.

Pertumbuhan BAL A yang mencapai 10^9 CFU/ ml pada semua konsentrasi memperlihatkan bahwa jumlah susu skim dalam media nabati tidak mempengaruhi kemampuan BAL tersebut untuk tumbuh. Menurut Johnson dan Steele (1997), laktosa dalam susu skim merupakan disakarida



yang tersusun dari glukosa dan galaktosa, oleh bakteri homofermentatif dan heterofermentatif laktosa dimetabolisme menjadi monosakarida-monosakarida penyusunnya untuk selanjutnya diubah menjadi asam laktat dan asam organik lain. Sehingga pada dasarnya dengan jumlah laktosa yang tidak terlalu banyak pun BAL tetap dapat tumbuh dengan baik, disebabkan kandungan gula alami seperti glukosa dan fruktosa dalam media nabati serta penambahan glukosa (Y %) selama pembuatan minuman probiotik dalam penelitian ini.

Bila dilihat dari segi biaya pembuatan keempat produk dengan berbagai konsentrasi susu skim dalam media nabati tersebut, media dengan konsentrasi X_1 % merupakan produk dengan biaya terendah. Oleh karena itu konsentrasi X_1 % digunakan pada tahap berikutnya.

Faktor lain yang mendukung pemilihan media nabati dengan konsentrasi X_1 % adalah hasil uji organoleptik pada produk yang meliputi rasa, penampakan (tekstur) dan aroma. Uji organoleptik ini hanya menggunakan 3 orang panelis karena hasil dari uji ini hanya dijadikan sebagai data pendukung. Seluruh panelis paling menyukai konsentrasi X_1 % karena menghasilkan aroma, penampakan dan rasa hampir serupa bahan nabati asal (Lampiran 4).

Pengukuran pH produk minuman probiotik dengan modifikasi konsentrasi susu skim dilakukan sebelum inokulasi (pH awal), pada media nabati tanpa inokulasi BAL yang telah diinkubasi 1 hari (kontrol), serta pada media nabati yang telah diinokulasi BAL dan diinkubasi 1 hari (produk minuman probiotik). Hasil pengukuran pH dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai pH minuman probiotik dengan modifikasi konsentrasi susu skim.

Konsentrasi susu skim (%)	pH awal media nabati	Inkubasi 24 jam	
		Tanpa BAL (kontrol)	Dengan BAL (minuman probiotik)
X_1	4.58	4.71	3.68
X_2	5.58	5.13	3.86
X_3	5.79	5.08	3.97
X_4	5.96	5.09	4.10

Pada Tabel 2 terlihat bahwa pada seluruh konsentrasi terjadi penurunan pH minuman probiotik jika dibandingkan dengan pH awal. Penurunan pH kemungkinan besar berkaitan dengan asam laktat yang dihasilkan dalam jumlah besar oleh BAL A, walaupun BAL tersebut juga menghasilkan asam asetat dan asam format. Menurut Thenawijaya (1990), asam laktat mempunyai pKa yang lebih rendah yaitu 3.68 bila dibandingkan dengan asam propionat dan asam asetat yaitu 4.87 dan 4.76. Asam organik yang mudah terionisasi adalah asam dengan nilai pKa yang lebih rendah, sehingga pH minuman yang lebih rendah ini disebabkan adanya ionisasi dari asam laktat dalam minuman probiotik.

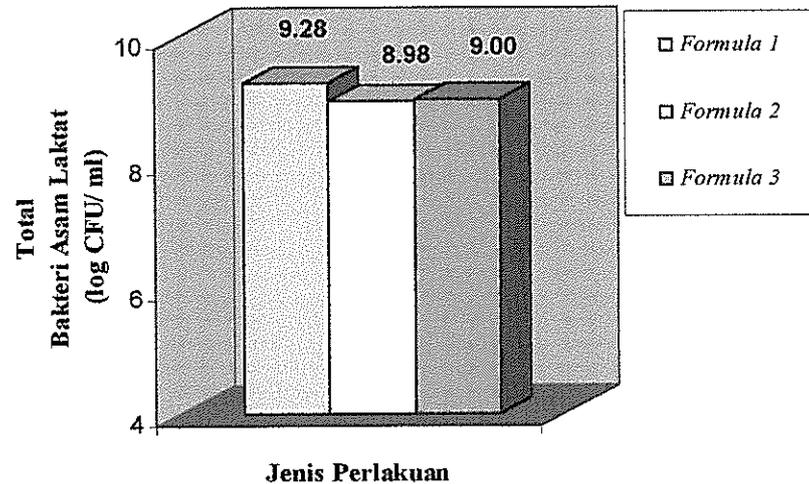
Nilai pH yang dihasilkan oleh empat jenis konsentrasi tersebut berkisar antara 3.68 - 4.1. Semakin tinggi konsentrasi susu skim yang digunakan maka semakin tinggi pula nilai pH minuman tersebut. Minuman probiotik dengan konsentrasi susu skim X_1 % memiliki pH terendah yaitu sebesar 3.68 yang berasal dari keasaman bahan nabati asal sehingga sejak awalpun (sebelum inkubasi) produk ini memiliki pH yang memang paling rendah.

Pada Tabel 2 juga terlihat perbedaan kisaran pH kontrol dengan pH minuman probiotik yang cukup besar. Pada semua konsentrasi terlihat nilai pH kontrol yang berada diantara pH awal dan pH minuman probiotik. Nilai pH kontrol yang lebih rendah dari pH awal memperlihatkan peningkatan keasaman media nabati akibat kerusakan selama penyimpanan. Nilai pH minuman probiotik yang lebih rendah dari pH kontrol menunjukkan adanya fermentasi oleh BAL sehingga dihasilkan asam yang berakibat pada penurunan pH minuman probiotik.

C. FORMULASI KULTUR MINUMAN PROBIOTIK

Pada tahap ini dilakukan pengujian terhadap 3 jenis formula kultur minuman probiotik yaitu Formula 1, Formula 2 dan Formula 3. Pengujian yang dilakukan terhadap ketiga formula tersebut adalah uji total BAL, pengukuran nilai pH, uji kemampuan penghambatan terhadap *S. typhimurium* dan *A. flavus*, serta uji organoleptik.

1. Total Bakteri Asam Laktat dan Nilai pH



Gambar 8. Pengaruh formulasi terhadap jumlah BAL dalam minuman probiotik

Gambar 8 menunjukkan total bakteri asam laktat yang terdapat dalam 3 formula minuman probiotik. Jumlah bakteri asam laktat ketiga formula berada pada kisaran 9.5×10^8 sampai dengan 1.9×10^9 CFU/ ml. Menurut Svensson (1999), efek probiotik dapat dipertahankan jika makanan atau minuman probiotik mengandung jumlah organisme probiotik minimal 10^6 - 10^8 CFU/ ml.

Jumlah bakteri asam laktat tertinggi adalah minuman probiotik Formula 1 dengan pertumbuhan mencapai 1.9×10^9 CFU/ ml, sedangkan pertumbuhan terendah dicapai oleh Formula 2 yaitu 9.8×10^8 CFU/ ml (Lampiran 5).

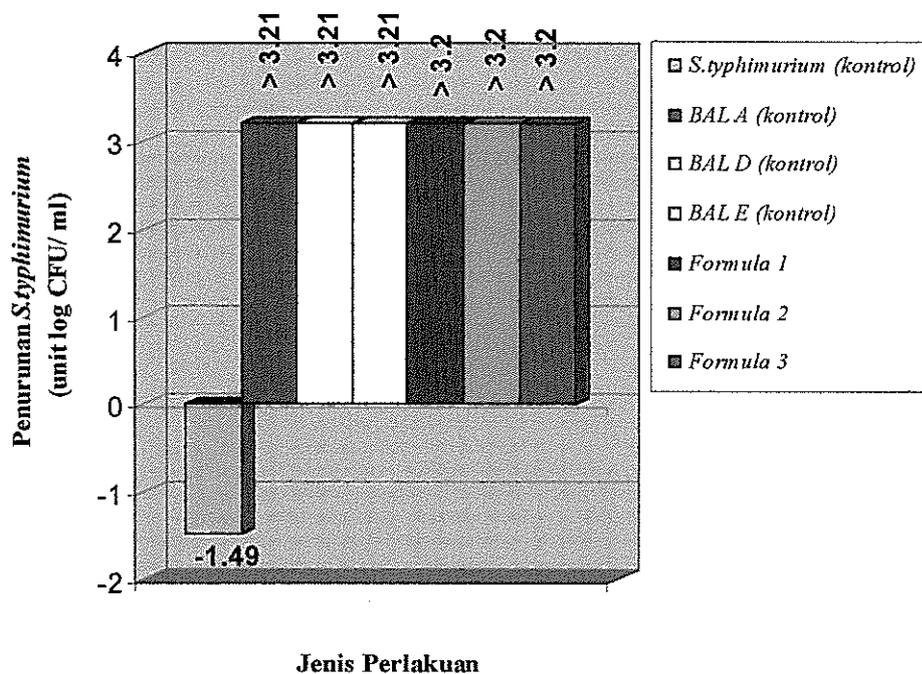
Tabel 3. Pengaruh formulasi kultur BAL terhadap nilai pH minuman probiotik

Jenis Formula	pH awal media nabati	pH minuman probiotik
Formula 1	4.76	3.75
Formula 2	4.73	3.78
Formula 3	4.74	3.76

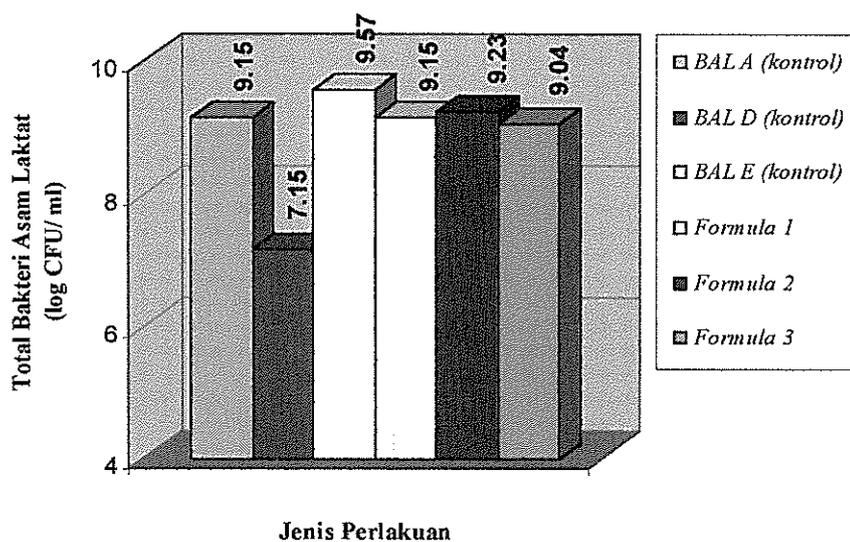
Tabel 3 memperlihatkan pengaruh formulasi terhadap nilai pH. Nilai pH ketiga formula tidak memperlihatkan perbedaan yang terlalu besar. Hal ini disebabkan kemampuan BAL pada ketiga formula untuk tumbuh dalam media nabati yang hampir sama. Minuman probiotik Formula 1 memiliki nilai pH 3.75, sedangkan nilai pH minuman probiotik Formula 2 dan 3 berturut-turut adalah 3.78 dan 3.76. Formula dengan jumlah BAL terbanyak memiliki pH terendah, dan sebaliknya formula dengan jumlah BAL terendah memiliki pH tertinggi.

2. Uji Penghambatan terhadap Pertumbuhan *Salmonella typhimurium*

Salah satu karakteristik yang harus dipenuhi oleh galur probiotik adalah bersifat antagonis terhadap bakteri patogen (Kullen dan Klaenhammer, 1999). Pengujian aktivitas penghambatan ketiga jenis formula terhadap pertumbuhan *S. typhimurium* dilakukan dengan menumbuhkan bersama-sama bakteri asam laktat dan patogen dalam media pertumbuhan nabati selama t jam. Dilakukan pula pengujian BAL A, BAL D dan BAL E secara terpisah terhadap pertumbuhan patogen dalam media yang sama sebagai kontrol formulasi minuman probiotik. Sebagai kontrol *S. typhimurium*, ditumbuhkan pula patogen tersebut tanpa kehadiran bakteri asam laktat dalam media nabati. Penurunan *S. typhimurium* dan BAL setelah inkubasi t jam dapat dilihat pada Gambar 9 dan 10.



Gambar 9. Pengaruh formulasi terhadap penurunan *Salmonella typhimurium* pada penghambatan dengan bakteri asam laktat



Gambar 10. Pengaruh formulasi terhadap total bakteri asam laktat pada penghambatan *S. typhimurium*

Gambar 9 memperlihatkan penurunan *S. typhimurium* yang cukup besar selama proses fermentasi pada seluruh jenis perlakuan. Pada pemupukan 10^{-1} tidak terlihat adanya pertumbuhan *S. typhimurium*

sehingga jumlahnya dalam media nabati tidak diketahui secara tepat dan dianggap lebih kecil dari 3.0×10^9 CFU/ ml (Lampiran 6).

Penurunan jumlah *S. typhimurium* hingga 3.2 unit log CFU/ ml pada ketiga formula dan 3.21 unit log CFU/ ml pada ketiga kontrol (BAL A, BAL D dan BAL E) serta peningkatan sebesar 1.49 unit log CFU/ ml pada kontrol *S. typhimurium* memperlihatkan kemampuan bakteri asam laktat dalam menghambat *S. typhimurium* (Lampiran 7). Penghambatan ini diduga berkaitan dengan hidrogen peroksida (H_2O_2) yang dihasilkan selama pertumbuhan BAL.

Menurut Davidson dan Hoover (1993), *Lactobacillus* memproduksi H_2O_2 melalui oksidasi piruvat, L-laktat dan NADH serta dehidrogenasi NAD-independent D-laktat. Metabolit-metabolit tersebut terakumulasi karena *Lactobacillus* tidak memproduksi katalase. Dahl *et al.* (1989) menyatakan efek bakterisidal dari hidrogen peroksida tidak hanya disebabkan oleh efek mengoksidasi yang kuat terhadap sel bakteri, tetapi juga karena destruksi struktur molekul dasar asam nukleat dan protein sel.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Ekarini (1995), H_2O_2 lebih mudah menyerang bakteri Gram negatif (koliform) daripada Gram positif (pembentuk spora), karena spesies laktobasili mampu menghambat bakteri Gram negatif seperti *E. Coli*, *P. Fluorescens* dan *S. typhimurium* daripada terhadap bakteri Gram positif seperti *L. monocytogenes*.

Pengaruh formulasi terhadap jumlah bakteri asam laktat dalam minuman probiotik, dapat dilihat pada Gambar 10. Jumlah bakteri asam laktat berkisar antara $1.1 - 3.7 \times 10^9$ CFU/ ml pada hampir semua perlakuan, kecuali media nabati dengan BAL D (kontrol) yaitu sebesar 1.4×10^7 CFU/ ml (Lampiran 8). Formulasi menyebabkan peningkatan jumlah bakteri asam laktat bila dibandingkan dengan kontrol.

Jumlah bakteri asam laktat ternyata tidak memberi pengaruh besar pada aktivitas penghambatan terhadap *S. typhimurium*, sehingga diduga penghambatan lebih berkaitan dengan terjadinya penurunan pH. Nilai pH masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Pengaruh formulasi kultur BAL terhadap nilai pH media nabati yang diinokulasi dengan *Salmonella typhimurium*

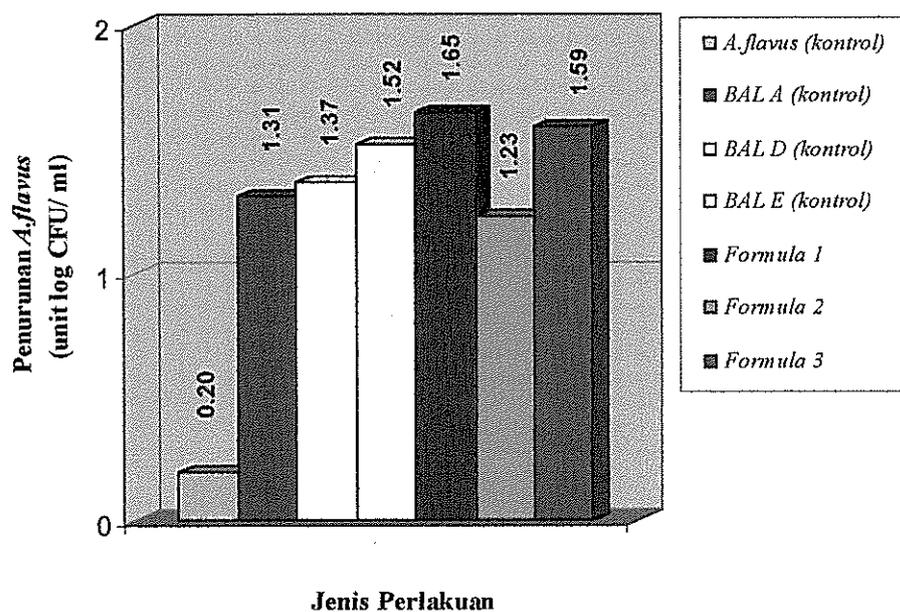
Jenis Perlakuan	pH minuman probiotik
<i>S. typhimurium</i> (kontrol)	4.61
BAL A (kontrol)	3.76
BAL D (kontrol)	4.10
BAL E (kontrol)	3.83
Formula 1	3.73
Formula 2	3.78
Formula 3	3.65

Pada Tabel 4 terlihat nilai pH keenam jenis perlakuan yang hampir seluruhnya rendah sehingga tidak memungkinkan *S. typhimurium* untuk tumbuh. Nilai pH keenam jenis perlakuan berkisar diantara 3.65 - 4.1 dengan pH kontrol *S. typhimurium* sebesar 4.61. Menurut Roberts *et al.*, (1996) pH minimum untuk pertumbuhan *Salmonella* adalah 3.8 tetapi kehadiran asam organik dapat mempengaruhi kemampuannya untuk tumbuh. Sehingga pada penelitian ini kehadiran asam laktat, asam asetat dan asam format sebagai metabolit dari BAL turut berperan dalam penghambatan *S. typhimurium*.

Asam laktat, asam asetat dan asam format menyebabkan penurunan pH di bawah kisaran pH pertumbuhan bakteri, dimana asam-asam ini dalam bentuk tidak terdisosiasi dapat berdifusi secara cepat ke dalam sel mikroba. Menurut Ostling dan Lindgren (1990), asam tidak terdisosiasi akan terurai menjadi anion dan proton, dimana proton (H^+) akan masuk ke dalam sel. Hal ini dapat mengganggu fungsi metabolisme seperti terjadinya pengasaman sitoplasma, penghambatan transfer substrat, dan sintesis makromolekul. Sehingga secara keseluruhan akan menghambat pertumbuhan bakteri.

3. Uji Penghambatan terhadap *Aspergillus flavus*

Pengujian aktivitas penghambatan bakteri asam laktat terhadap pertumbuhan *A. flavus* dilakukan dengan metode yang sama dengan penghambatan terhadap *S. typhimurium*. Formula dan kontrol dibuat seperti pada penghambatan *S. typhimurium*. *A. flavus* ditumbuhkan terpisah dalam media nabati tanpa inokulasi BAL sebagai kontrol. Jumlah awal *A. flavus* dalam tiap jenis produk kurang lebih sebesar 10^4 CFU/ ml. Penurunan jumlah *A. flavus* dapat dilihat pada Gambar 11.



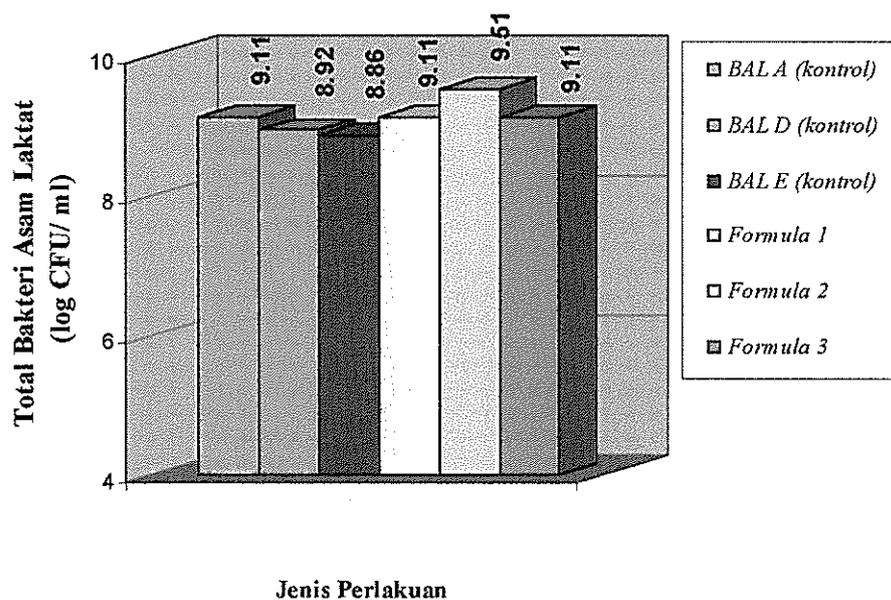
Gambar 11. Pengaruh formulasi terhadap penurunan *Aspergillus flavus* pada penghambatan dengan bakteri asam laktat

Pada Gambar 11 terlihat penurunan jumlah *A. flavus* yang berkisar antara 1.23 – 1.65 unit log CFU/ ml pada ketiga formula dan 1.31 – 1.52 unit log CFU/ ml pada ketiga kontrol kultur campuran (BAL A, BAL D dan BAL E). Penurunan juga dialami oleh kontrol *A. flavus* sebesar 0.20 unit log CFU/ ml dan hal ini menandakan bahwa media nabati bukan merupakan media pertumbuhan yang cocok bagi *A. flavus*. Tetapi dengan adanya BAL, pertumbuhan *A. flavus* menjadi makin terhambat. Gourama

dan Bullerman (1995), menyatakan bahwa *Lactobacillus spp.* dapat menghambat pertumbuhan *A. flavus*, penghambatannya disebabkan oleh metabolit BAL yang ber-BM 1000.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa metabolit BAL selain asam juga berperan dalam aktivitas antimikotik BAL. Penelitian yang dilakukan oleh Hidayat (2001) dan Rianto (2002) memperlihatkan bahwa setelah supernatan bebas sel BAL dinetralkan, ternyata kultur BAL tetap menunjukkan penghambatan terhadap kapang. Penghambatan ini diduga disebabkan oleh produksi metabolit selain asam oleh BAL.

Pada hampir seluruh formula, terjadi penurunan jumlah *A. flavus* yang lebih besar selama inkubasi bila dibandingkan dengan kontrol. Hal ini memperlihatkan peningkatan aktivitas penghambatan kapang akibat dari formulasi kultur, dan terlihat pula dari total bakteri asam laktat dari masing-masing formula yang lebih tinggi dari kontrolnya (Gambar 12).



Gambar 12. Pengaruh formulasi terhadap total bakteri asam Laktat pada Penghambatan dengan *Aspergillus flavus*

Formula 1 ternyata memiliki penghambatan terbaik dengan penurunan *A. flavus* pada produk akhir sebesar 1.65 unit log CFU/ ml. Sedangkan Formula 2 ternyata memiliki kemampuan penghambatan

terendah dengan penurunan *A. flavus* sebesar 1.23 unit log CFU/ ml (Lampiran 10). Gourama dan Bullerman (1995), mempelajari pertumbuhan *A. flavus* dan produksi aflatoxin dengan menggunakan 3 spesies laktobasili (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, dan *L. plantarum*) dalam media cair semisintetik. *Lactobacillus* spp ternyata dapat menghambat pertumbuhan kapang, dan diperkirakan hal ini disebabkan oleh kompetisi pertumbuhan pada pH yang rendah. Nilai pH semua jenis perlakuan dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Pengaruh formulasi kultur BAL terhadap nilai pH media nabati yang diinokulasi dengan *Aspergillus flavus*

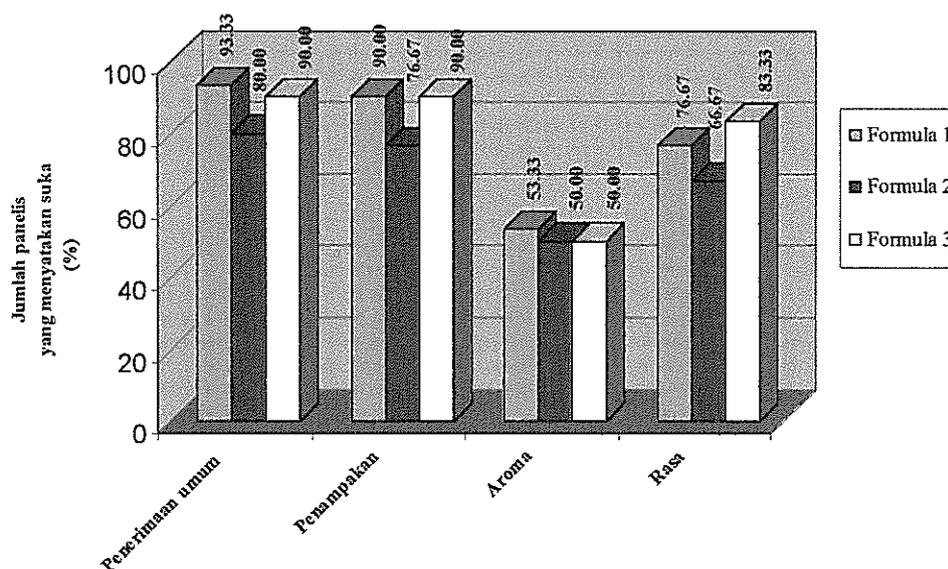
Jenis Perlakuan	pH minuman probiotik
<i>S. typhimurium</i> (kontrol)	4.90
BAL A (kontrol)	3.80
BAL D (kontrol)	3.91
BAL E (kontrol)	3.88
Formula 1	3.77
Formula 2	3.72
Formula 3	3.73

Pada Tabel 5 terlihat penurunan pH selama proses inkubasi akibat dari fermentasi oleh bakteri asam laktat. Nilai pH ketiga formula dan masing-masing kontrolnya berkisar antara 3.72-3.91, sedangkan pH kontrol *A. flavus* adalah 4.9. Roberts *et al.*, (1996) menyatakan pengaruh dari pH terhadap pertumbuhan *A. flavus* umumnya sangat kecil. Spesies ini tumbuh pada kisaran pH 2.1 - 11.2, walaupun pertumbuhannya lambat pada pH kurang dari 3.5 dan jauh lebih lambat pada pH di bawah 3.0.

Pengaruh pH pada pertumbuhan kapang tergantung pada substrat yang tersedia, suhu inkubasi, galur kapang, dan kehadiran mikroflora pesaing (Gourama dan Bullerman, 1995). Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa pH tidak terlalu berpengaruh terhadap penurunan jumlah *A. flavus* yang mencapai 1 log CFU/ ml pada saat ditumbuhkan bersama-sama dengan bakteri asam laktat pada semua jenis formula

4. Uji Organoleptik

Pada tahap formulasi kultur minuman probiotik, uji organoleptik yang digunakan meliputi uji skalar garis terhadap penerimaan umum, penampakan, aroma dan rasa; serta uji penjenjangan (*ranking*) terhadap penerimaan umum minuman probiotik tersebut. Pada uji skalar garis, jumlah panelis yang menyatakan suka, yaitu panelis yang memberi nilai lebih besar sama dengan 5, terhadap penerimaan umum, penampakan, aroma dan rasa produk dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Pengaruh jenis formula minuman probiotik terhadap jumlah panelis yang menyukai produk pada uji organoleptik

Berdasarkan uji skalar garis, ternyata jumlah panelis yang menyatakan suka terhadap penerimaan umum Formula 1, 2 dan 3 berturut-turut adalah 93.33, 80.00, dan 90.00 %. Setelah diolah lebih lanjut dengan metode *Duncan* (Lampiran 13), terdapat perbedaan yang nyata antara ketiga jenis produk ($p < 0.05$), sehingga dilakukan uji lanjutan untuk mengetahui sampel yang berbeda nyata dengan sampel lain. Sampel yang tidak berbeda nyata berada dalam satu grup homogen yaitu minuman probiotik Formula 2 (sampel 859) dan Formula 3 (sampel 145), sedangkan sampel yang berbeda nyata dengan 2 sampel lainnya dan lebih disukai oleh semua panelis adalah minuman probiotik Formula 1 (sampel 562).

Hasil uji pada Lampiran 13 menunjukkan penerimaan umum terbaik dicapai oleh Formula 1.

Kemudian dilakukan uji penjenjangan (*ranking*) terhadap penerimaan umum ketiga formula tersebut yang diolah dengan metode *Friedman*, dan didapat perbedaan yang nyata antara minuman probiotik Formula 1 dengan 2 formula lain ($p < 0.05$). Rata-rata peringkat untuk minuman probiotik Formula 1 adalah 1.53, Formula 2 adalah 2.27 dan Formula 3 adalah 2.20 (Lampiran 14). Minuman probiotik Formula 1 merupakan produk yang paling disukai karena memiliki rata – rata peringkat terkecil.

Dua jenis uji statistik yang dilakukan terhadap penerimaan umum menunjukkan hasil yang sama. Produk dengan penerimaan umum terbaik adalah minuman probiotik Formula 1, sehingga produk ini akan digunakan pada tahap selanjutnya. Hal ini menunjukkan bahwa formulasi kultur yang digunakan pada Formula 1 mampu menghasilkan metabolit asam dan komponen volatil yang berpengaruh baik pada organoleptik produk bila dibandingkan dengan dua formula lain. Menurut Helferich dan Westhoff (1980), selama fermentasi BAL, selain pembentukan asam yang menyebabkan rasa dan aroma yang khas, juga dihasilkan komponen – komponen citarasa seperti karbonil, asetaldehida, aseton, asetoin, dan diasetil.

Pada uji skalar garis terhadap penampakan, jumlah panelis yang menyatakan suka terhadap Formula 1 dan 3 adalah 90.00 % sedangkan terhadap Formula 2 sebesar 76.67 % (Gambar 13). Tetapi tidak terdapat perbedaan yang nyata antar ketiga formula tersebut berdasarkan pengolahan dengan metode *Duncan* ($p > 0.05$) (Lampiran 15). Berdasarkan hasil yang telah diperoleh pada uji skalar garis ternyata tidak ada pengaruh nyata formulasi kultur terhadap penampakan ketiga formula.

Penilaian terhadap aroma dilakukan dengan uji skalar garis seperti halnya penilaian terhadap penerimaan umum dan penampakan dari minuman probiotik. Akan tetapi hasil yang didapat agak berbeda yaitu jumlah panelis yang menyatakan suka terhadap aroma Formula 2 dan 3

sebesar 50.00 %, sedangkan Formula 1 sebesar 53.33 % (Gambar 13). Rendahnya jumlah panelis yang menyukai aroma produk, terlihat dari komentar yang tertulis pada formulir pengujian (Lampiran 18). Jumlah panelis yang menyatakan adanya aroma busuk pada ketiga formula berkisar dari 30 sampai dengan 33.33 %. Hasil pengolahan dengan metode *Duncan* memperlihatkan tidak adanya perbedaan yang nyata dalam hal aroma antara ketiga formula tersebut ($p > 0.05$) (Lampiran 16). Formulasi kultur pada minuman probiotik ternyata tidak menghasilkan aroma yang berbeda nyata.

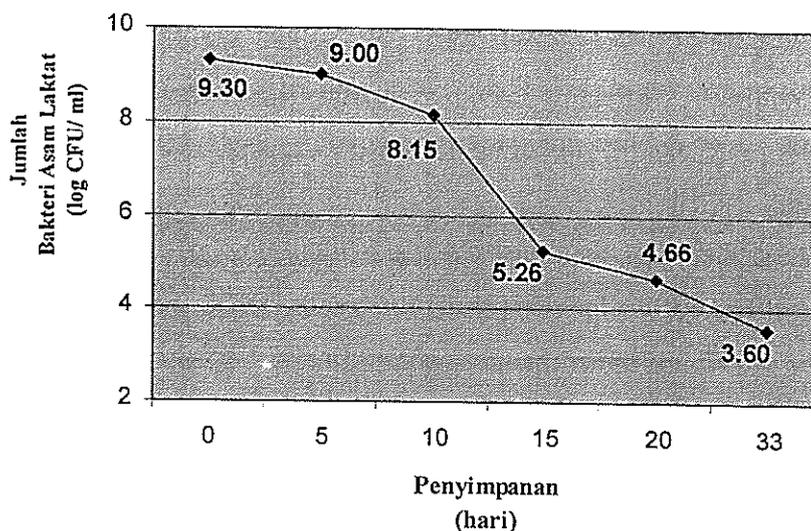
Nilai kesukaan panelis terhadap rasa dari ketiga formula produk tersebut berkisar dari 66.67 sampai dengan 83.33 %. Uji yang digunakan adalah uji skalar garis, dan setelah diolah dengan metode *Duncan* tidak terdapat adanya perbedaan yang nyata pada rasa dari ketiga jenis produk ($p > 0.05$) (Lampiran 17). Sama halnya dengan penampakan dan aroma, ketiga formulasi tidak memperlihatkan pengaruh nyata formulasi kultur terhadap penerimaan rasa.

Pada Lampiran 18 dapat dilihat komentar panelis terhadap *aftertaste* ketiga formula. Adanya *aftertaste* kemungkinan berpengaruh terhadap perbedaan hasil yang didapat pada uji skalar garis pada penerimaan umum dengan uji skalar garis pada penampakan, aroma dan rasa. Terdapat perbedaan nyata antara Formula 1 dengan 2 formula lainnya dalam hal penerimaan umum. Sebanyak 33.33 % panelis menyatakan adanya *aftertaste* pada Formula 2, dan 20.00 % pada Formula 3, bahkan beberapa menyatakan adanya rasa pahit setelah mengkonsumsi kedua formula minuman probiotik tersebut. Sedangkan 10.00 % panelis menyatakan adanya *aftertaste* seperti asam tersisa di lidah dan getir setelah mengkonsumsi formula 1.

D. UJI PENYIMPANAN MINUMAN PROBIOTIK

1. Total Bakteri Asam Laktat

Perhitungan total bakteri asam laktat dilakukan terhadap minuman probiotik dengan formulasi kultur terpilih yaitu Formula 1, pada suhu 3 - 5 °C selama 33 hari. Hal ini dilakukan untuk melihat kestabilan jumlah bakteri asam laktat selama penyimpanan. Penyimpanan dilakukan dalam botol jar yang terbuat dari kaca. Beal (1998) menyatakan bahwa kaca memberikan perlindungan terbaik dari oksidasi karena permeabilitasnya terhadap oksigen rendah. Sedangkan penyimpanan pada suhu di antara 3 - 5 °C merupakan kondisi ideal untuk kestabilan minuman probiotik. Stabilitas BAL minuman probiotik Formula 1 dalam media pertumbuhan nabati dapat dilihat pada Gambar 14.



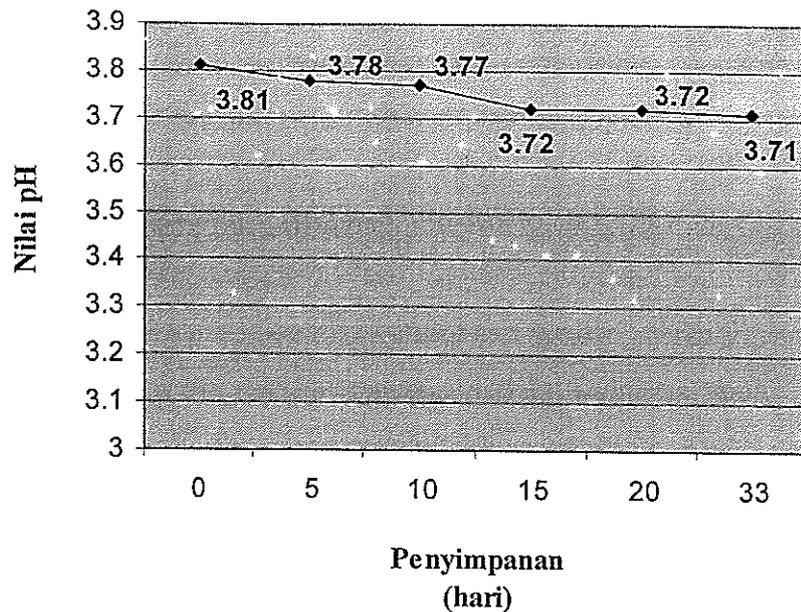
Gambar 14. Stabilitas BAL minuman probiotik Formula 1 dalam media nabati selama penyimpanan pada suhu 3 - 5 °C

Berdasarkan Gambar 14 terlihat penurunan jumlah BAL selama masa penyimpanan, dari jumlah awal 9.30 log CFU/ ml menjadi 3.60 log CFU/ml pada penyimpanan 33 hari. Pada awal masa simpan jumlah BAL adalah 2.0×10^9 CFU/ml. Penurunan yang tajam terjadi pada hari penyimpanan ke-15 dengan jumlah total bakteri asam laktat pada

minuman probiotik sebesar 1.8×10^5 CFU/ ml, dan terus menurun hingga penyimpanan selama 33 hari menjadi 4.0×10^3 CFU/ ml (Lampiran 19). Umur simpan yang singkat mungkin disebabkan karena sedikitnya nutrisi yang terdapat dalam media nabati bila dibandingkan dengan susu fermentasi dan penurunan nilai pH selama penyimpanan. Menurut Fardiaz (1998), kematian bakteri disebabkan karena nutrisi di dalam medium dan energi cadangan sel telah habis. Sedangkan menurut Rahayu dan Christanti (1992), kecepatan perubahan pH medium akan mempengaruhi total BAL dalam soyghurt. Penurunan pH yang cepat akan menghambat bahkan dapat menghentikan pertumbuhan BAL itu sendiri.

Lee dan Wong (1993) menyatakan bahwa nilai pH produk akhir sangat berperan penting dalam menentukan kestabilan bakteri asam laktat pada minuman fermentasi. Susu fermentasi BAL dengan pH akhir 3.4 memiliki umur simpan 4 hari sedangkan susu fermentasi BAL dengan pH akhir 6.5 memiliki umur simpan lebih dari 30 hari, bila keduanya disimpan pada suhu 25 °C. Nilai pH produk akhir dari minuman probiotik berbahan nabati ini memang rendah pada awal masa penyimpanan yaitu sebesar 3.81.

Pada minuman fermentasi, nilai pH merupakan salah satu indikator terbentuknya metabolit-metabolit yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat terutama selama masa penyimpanan. Nilai pH minuman probiotik Formula 1 selama uji penyimpanan dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Nilai pH minuman probiotik selama penyimpanan pada suhu 3-5 °C.

Gambar 15 memperlihatkan bahwa selama 33 hari penyimpanan, nilai pH produk terus menurun dengan penurunan yang tidak terlalu besar. Pada awal penyimpanan, nilai pH minuman probiotik adalah 3.81 dan terus menurun hingga hari ke-33 menjadi sebesar 3.71. Penurunan nilai pH kemungkinan besar berkaitan dengan akumulasi asam laktat, asam asetat dan asam organik lain yang dihasilkan oleh BAL selama penyimpanan. Menurut Thenawijaya (1990), asam laktat mempunyai pKa yang lebih rendah yaitu 3.68 bila dibandingkan dengan asam propionat dan asam asetat yaitu 4.87 dan 4.76. Asam organik yang mudah terionisasi adalah asam dengan nilai pKa yang lebih rendah, sehingga penurunan pH selama penyimpanan disebabkan adanya ionisasi dari asam laktat dalam minuman probiotik.

Pada penelitian Indriawati (2001), nilai pH yang dihasilkan dari keempat kombinasi kultur BAL pada yoghurt tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap lama penyimpanan dan kombinasi starter. Namun nilainya semakin menurun dengan bertambahnya lama penyimpanan. Penelitian Astuti (2003) juga memperlihatkan penurunan pH selama penyimpanan. Soygurt probiotik yang memiliki pH awal 4.36, setelah

penyimpanan selama 4 hari pada suhu ruang, pH nya menurun menjadi 3.48 dan setelah penyimpanan selama 20 hari di dalam lemari pendingin, pH nya menurun menjadi 3.90.

2. Uji Organoleptik

a. Aroma

Uji penerimaan panelis terhadap aroma dilakukan pada 2 ulangan minuman probiotik untuk melihat konsistensi dari panelis (Lampiran 20). Ternyata panelis dapat dianggap konsisten karena tidak terdapat perbedaan penilaian antara 2 ulangan, sehingga data 2 ulangan dapat digabungkan seperti dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Uji Penerimaan terhadap Aroma

Panelis	H-0	H-5	H-10	H-15	H-20
1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1
Produk diterima	12	12	12	12	12
Jumlah panelis	12	12	12	12	12
Persen panelis (%)	100	100	100	100	100

Tabel 6 memperlihatkan hasil uji penerimaan aroma terhadap minuman probiotik selama penyimpanan. Pada penyimpanan minuman

probiotik selama 20 hari, ternyata seluruh panelis menyatakan masih dapat menerima aroma dari minuman probiotik tersebut. Sehingga dari segi aroma, minuman probiotik ini memiliki umur simpan lebih dari 20 hari.

b. Rasa

Uji penerimaan panelis terhadap rasa dilakukan pada 2 ulangan minuman probiotik untuk melihat konsistensi dari panelis (Lampiran 20) seperti halnya pada uji penerimaan aroma dan dapat dilihat di Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Uji Penerimaan terhadap Rasa

Panelis	H-0	H-5	H-10	H-15	H-20
1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	0	0
3	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1
8	1	0	0	0	0
9	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1
Produk diterima	12	11	11	10	10
Jumlah panelis	12	12	12	12	12
Persen panelis (%)	100	91.7	91.7	83.3	83.3

Seluruh panelis dianggap konsisten karena tidak terdapat perbedaan penilaian antara 2 ulangan, sehingga data 2 ulangan dapat digabungkan seperti dapat dilihat pada Tabel 7. Terjadi penurunan

penerimaan terhadap rasa minuman probiotik selama penyimpanan. Panelis yang dapat menerima minuman probiotik ini berkurang pada penyimpanan hari ke-5 yaitu sebanyak 91.7 % dan hal ini berlangsung hingga hari penyimpanan ke-10. Pada penyimpanan hari ke-15 hingga hari ke-20, panelis yang menyatakan masih dapat menerima sebanyak 83.33 %. Produk dinyatakan masih dapat diterima, bila panelis yang dapat menerima lebih besar dari 80 %. Sehingga bila dilihat dari segi rasa, minuman probiotik ini memiliki umur simpan lebih dari 20 hari.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Ketiga galur yang berpotensi sebagai probiotik yaitu BAL A, BAL B dan BAL C ternyata dapat tumbuh dalam jumlah yang tinggi pada media nabati dengan penambahan susu skim dan glukosa dengan jumlah tertentu. Pertumbuhan ketiganya beturut-turut adalah sebesar 2.3×10^9 , 1.4×10^9 , dan 2.4×10^9 CFU/ ml.

Pada modifikasi konsentrasi susu skim, semua konsentrasi yang diteliti tidak mempengaruhi pertumbuhan BAL A. Jumlah BAL A pada seluruh konsentrasi mencapai 10^9 CFU/ml dengan kisaran pertumbuhan $2.6 - 5.5 \times 10^9$ CFU/ ml.

Ketiga jenis formula memperlihatkan kemampuan penghambatan terhadap *S. typhimurium* yang hampir sama. Untuk penghambatan *A. flavus*, Formula 1 ternyata memiliki penghambatan terbaik dengan penurunan jumlah *A. flavus* pada akhir masa inkubasi selama t jam sebesar 1.65 unit log CFU/ ml.

Uji skalar garis terhadap ketiga formula menghasilkan perbedaan yang tidak nyata terhadap nilai penampakan, aroma dan rasa minuman probiotik ($p > 0.05$). Sebaliknya, uji skalar dan penjenjangan (*ranking*) terhadap penerimaan umum minuman probiotik memperlihatkan adanya perbedaan yang nyata antara Formula 1 dengan 2 formula lainnya dan Formula 1 lebih disukai oleh panelis. Total bakteri asam laktat pada ketiga formula berkisar antara $9.5 \times 10^8 - 1.9 \times 10^9$ CFU/ ml.

Selama penyimpanan 33 hari dalam lemari pendingin ($3 - 5$ °C) ternyata minuman probiotik Formula 1 mengalami penurunan jumlah bakteri asam laktat yang cukup besar. Dari jumlah awal sekitar 2.0×10^9 CFU/ ml menjadi 4.0×10^3 CFU/ ml pada hari penyimpanan ke-33.

Pada penyimpanan minuman probiotik Formula 1 selama 20 hari dalam lemari pendingin ($3 - 5$ °C), seluruh panelis menyatakan dapat menerima aroma minuman probiotik tersebut. Jumlah panelis yang dapat

menerima rasa dari minuman probiotik tersebut selama penyimpanan 20 hari adalah sebanyak 83.33 % (>80 %). Sehingga bila dilihat dari segi aroma dan rasa, minuman probiotik tersebut dianggap masih dapat diterima. Akan tetapi bila dikaitkan antara total BAL dan penerimaan organoleptik minuman probiotik selama penyimpanan, jumlah BAL minimal untuk mempertahankan efek probiotik hanya dapat terpenuhi hingga penyimpanan selama 10 hari walaupun minuman tersebut masih dapat diterima dari segi organoleptik.

B. SARAN

Adapun saran yang diberikan adalah perlunya diteliti mengenai penambahan nutrien seperti glukosa dan susu skim, baik sebelum atau sesudah inkubasi, sehingga viabilitas BAL tidak menurun pada saat penyimpanan selama 15 hari. Serta perlu adanya penelitian lanjutan mengenai penerapan suhu kamar sebagai suhu inkubasi minuman probiotik ini, agar mempermudah pembuatan minuman fermentasi dalam skala industri.

DAFTAR PUSTAKA

- Apriyantono, A., D. Fardiaz, N. L. Puspitasari, Y. Sedarnawati dan S. Budianto. 1989. Petunjuk Laboratorium Analisis Pangan. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Astuti, V. B. W. 2003. Pembuatan soygurt simbiotik dengan menggunakan Kultur campuran *S. thermophilus*, *L. casei* galur shirota dan *Bifidobacterium brevis*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Axelsson, L. T. 1993. Lactic acid bacteria : Classification and physiology. Di dalam Salminen, S. dan A. V. Wright (eds). Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker Inc, New York.
- Beal, C. 1998. Shelf life and sensory evaluation of non-alcoholic beverages. Di dalam Ashurst, P. R. (ed). Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices. Sheffield Academic Press, Inggris.
- Branen A. L. dan Davidson P. M. 1993. Antimicrobial in Food. New York : Marcel Dekker.
- Dahl, T. A., W. R. Midden dan P. E. Hartman. 1989. Comparison of killing of Gram negative and Gram positive bacteria by pure singlet oxygen. J. Bacteriol. 171 : 2188-2194.
- Davidson, P. M. dan D. G. Hoover. 1993. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. Di dalam Salminen, S. dan A. V. Wright (eds). Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker Inc, New York.
- Ekarini, S. 1995. Aktivitas antimikroba dari *Lactobacillus* terhadap bakteri patogen dan perusak ikan rucah. Skripsi Fakultas teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Elida, M. 2002. Profil bakteri asam laktat yang difermentasi dalam berbagai jenis bambu dan potensinya sebagai probiotik. Thesis Ilmu Pangan. Program Pasca Sarjana. Insitut Pertanian Bogor, Bogor.
- Fardiaz, S. 1989. Analisis Mikrobiologi Pangan. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- 1989. Penuntun Praktikum Mikrobiologi Pangan I. Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

- Gibson, G. R dan R. Fuller. 2000. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J. Nutr* 130 : 391S-395S.
- Gourama, H. dan L. B. Bullerman. 1995. Antimycotic and antiaflatoxigenic Effect of lactic acid bacteria : A review. *J. Food Protection* Vol 57 (11) : 1275-1280.
- Harris, L. J. 1998. The microbiology of vegetable fermentation. Di dalam Wood, B. J. B. (ed). *Microbiology of Fermented Food* Volume 1. Blackie Academic and Professional, London.
- Hidayat, A. 2001. Mempelajari potensi antimikotik *Lactobacillus plantarum* sa28k terhadap pertumbuhan *Aspergillus flavus*. Skripsi. Fakultas teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Helferich, W. dan D. Westhoff. 1980. All About Yoghurt. Prentice – Hall. Inc., Engle Wood Cliffs, New Jersey.
- Hoover, D. G. 2000. Microorganism and their products in the preservation of foods. Di dalam : Lund B. M., T. C. Baird Parker dan G. W. Gould (eds). *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Maryland : Aspen Publisher.
- Indriawati, D. A. 2001. Pemanfaatan beberapa inokulum bakteri asam laktat terhadap karakteristik dan daya simpan yoghurt. Skripsi. Fakultas teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Jenie, B. S. L. dan S. Fardiaz. 1989. Sanitasi dalam Industri Pangan. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Jenie, B. S. L *et al.*, 2003. Pangan Fungsional Penyusun Flora Usus yang Menguntungkan. Makalah pada Seminar Sehari Keseimbangan Flora Usus bagi Kesehata dan Kebugaran, Bogor.
- Johnson, M. E dan J. L. Steele. 1997. Fermented dairy product. Di dalam Doyle, M. P (ed). *Food Microbiology : Fundamental and Frontiers*. ASM Press, Washington D. C.
- Kullen, M. J. dan T. Klaenhammer. 1999. Genetic modification of *Lactobacillus* and *Bifidobacteria*. Di dalam Tannock, G. W. (ed). *Probiotics : A Critical Review*. Horizon Scientific Press, Inggris.
- Kusumawati, N. 2002. Seleksi bakteri asam laktat indigenous sebagai galur probiotik pangan dengan kemampuan mempertahankan keseimbangan mikroflora feses dan mereduksi kolesterol serum darah tikus. Thesis Ilmu Pangan. Program Pasca Sarjana. Insitut Pertanian Bogor, Bogor.

- Lavermicocca, P. , F. Valerio, A. Evidente, S. Lazzaroni, A. Corsetti dan M. Gobbetti. 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl. and Environ. Microbial.* p. 4084-4090.
- Lee, Y. K. dan S. F. Wong. 1993. Stability of lactic acid bacteria in fermented milk. Di dalam Salminen, S. dan A. V. Wright (eds). *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker Inc, New York.
- Mitsuoka, T. 1990. A Profile of Intestinal Bacteria. Yakult Honsha Co., Ltd., Tokyo.
- Ostling, C. E. dan S. E. Lindgren . 1990. Inhibition of *enterobacteria* and *lysteria* growth by lactic : acetic and formic acid. *J. Appl Bacteriol* 73 : 18-24
- Pot *et al.* 1994. Taxonomy of lactic acid bacteria. Di dalam Vuyst, L. D. dan E. J. Vandamme. (eds). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Blackie Academic and Professional, London.
- Rahayu, W. P. 2001. Penuntun Praktikum Penilaian Organoleptik. Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Rahayu, W. P. dan W. Christanti. 1992. Pembuatan soyghurt berflavor buah dan mutunya selama penyimpanan. *Bull. Pen. Ilmu. Tek. Pangan* III (1) : 59 – 73.
- Rianto, Y. 2002. Pengaruh kultur sel dan metabolit terhadap aktivitas antimikotik BAL. Skripsi. Fakultas teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Roberts, T. A, A. C. B. Parker, R. B. Tompkin. 1996. *Microorganisms in Foods 5: Microbiological Spesification of Food Pathogens*. Blackie Academic and Professional, London.
- Robinson, R. K., C. A. Batt dan P. D. Patel. 2000. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, California.
- Sarles *et al.* 1956. *Microbiology*. Harper and Brothers, New York.
- Stratford, M., P. D. Hofman dan M. B. Cole. 1999. Fruit juices, fruit drinks and soft drinks. Di dalam : Lund B. M., T. C. Baird Parker dan G. W. Gould (eds). *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Maryland : Aspen Publisher.
- Svensson, U. 1999. Industrial perspectives. Di dalam Tannock, G. W. *Probiotics : A Critical Review* (ed). Horizon Scientific Press, Inggris.



Thenawijaya, M. 1990. Dasar – Dasar Biokimia Jilid 1. PT. Erlangga. Jakarta.

Wirawati, C. U. 2002. Potensi bakteri asam laktat yang diisolasi dari tempoyak sebagai probiotik. Thesis. Ilmu Pangan. Program Pasca Sarjana. Institut pertanian Bogor, Bogor.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Pertumbuhan kultur bakteri asam laktat probiotik dalam media nabati

Jenis BAL	UJ	Pemupukan			CFU/ml	Rata-rata CFU/ml	Log CFU/ml
		10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸			
BAL A	1	TBUD	196	19	2.0 x 10 ⁹	2.4 x 10 ⁹	9.38
		TBUD	226	18			
	2	TBUD	274	27	2.8 x 10 ⁹		
		TBUD	285	29			
BAL B	1	TBUD	116	9	1.3 x 10 ⁹	1.4 x 10 ⁹	9.15
		TBUD	136	18			
	2	TBUD	1161	15	1.6 x 10 ⁹		
		TBUD	160	16			
BAL C	1	TBUD	249	20	2.4 x 10 ⁹	2.3 x 10 ⁹	9.36
		TBUD	205	29			
	2	TBUD	225	20	2.2 x 10 ⁹		
		TBUD	215	25			

Lampiran 2. Pertumbuhan kultur murni BAL A dalam MRSB pada penyimpanan 5 °C

Umur Simpan	UI	Pemupukan			CFU/ml	Rata-rata	Log CFU/ ml
		10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸			
MRSB inokulum	1	TBUD TBUD	79 109	7 9	9.4 x 10 ⁸	3.8 x 10 ⁹	9.58
	2	TBUD TBUD	373 347	47 44	4.6 x 10 ⁹		
	3	TBUD TBUD	TBUD TBUD	55 64	6.0 x 10 ⁹		
0 hari	1	TBUD TBUD	TBUD TBUD	51 50	5.1 x 10 ⁹	5.8 x 10 ⁹	9.76
	2	TBUD TBUD	TBUD TBUD	88 89	8.9 x 10 ⁹		
	3	TBUD TBUD	353 325	31 34	3.3 x 10 ⁹		
3 hari	1	TBUD TBUD	TBUD TBUD	51 47	4.9 x 10 ⁹	4.4 x 10 ⁹	9.64
	2	TBUD TBUD	TBUD TBUD	55 56	5.5 x 10 ⁹		
	3	TBUD TBUD	278 291	24 27	2.8 x 10 ⁹		
6 hari	1	TBUD TBUD	373 347	47 44	4.5 x 10 ⁹	5.4 x 10 ⁹	9.73
	2	TBUD TBUD	TBUD TBUD	55 64	5.9 x 10 ⁹		
	3	TBUD TBUD	TBUD TBUD	70 45	5.7 x 10 ⁹		
9 hari	1	TBUD TBUD	TBUD TBUD	84 58	7.1 x 10 ⁹	4.8 x 10 ⁹	9.68
	2	TBUD TBUD	TBUD TBUD	36 41	3.9 x 10 ⁹		
	3	TBUD TBUD	310 296	39 30	3.5 x 10 ⁹		
12 hari	1	TBUD TBUD	275 291	28 29	2.8 x 10 ⁹	5.2 x 10 ⁹	9.72
	2	TBUD TBUD	TBUD TBUD	58 96	7.7 x 10 ⁹		
	3	TBUD TBUD	379 400	58 43	5.1 x 10 ⁹		

Lampiran 3. Pertumbuhan BAL A dalam media nabati dengan modifikasi konsentrasi susu skim

Konsentrasi susu skim (%)	UI	Pemupukan			CFU/ ml	Rata-rata CFU/ ml	Log CFU/ml
		10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸			
X ₁	1	TBUD	197	25	2.1 x 10 ⁹	2.6 x 10 ⁹	9.42
		TBUD	218	24			
	2	TBUD	219	38	3.1 x 10 ⁹		
		TBUD	218	44			
X ₂	1	TBUD	TBUD	66	6.5 x 10 ⁹	4.9 x 10 ⁹	9.69
		TBUD	TBUD	65			
	2	TBUD	TBUD	31	3.3 x 10 ⁹		
		TBUD	TBUD	36			
X ₃	1	TBUD	TBUD	61	6.6 x 10 ⁹	5.5 x 10 ⁹	9.74
		TBUD	TBUD	72			
	2	TBUD	TBUD	43	4.5 x 10 ⁹		
		TBUD	TBUD	48			
X ₄	1	TBUD	TBUD	54	4.6 x 10 ⁹	5.5 x 10 ⁹	9.74
		TBUD	TBUD	38			
	2	TBUD	TBUD	92	6.4 x 10 ⁹		
		TBUD	TBUD	36			

Lampiran 4. Penilaian organoleptik terhadap minuman probiotik dengan modifikasi susu skim

Konsentrasi susu skim (%)	Penampakan	Aroma	Rasa
X₁	seperti media nabati asal	Khas media nabati asal	asam media nabati
X₂	agak lebih kental dibanding media nabati asal	aroma bahan nabati masih tercium	asam
X₃	agak lebih kental dibanding konsentrasi X ₃ %	aroma bahan nabati tidak terlalu tercium	asam
X₄	paling kental	aroma serupa yoghurt	asam yoghurt

Lampiran 5. Total bakteri asam laktat pada produk formulasi minuman probiotik

Jenis BAL	UI	Pemupukan			CFU/ ml	Rata-rata CFU/ ml	Log CFU/ml
		10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸			
Formula 1	1	TBUD	119	31	2.6 x 10 ⁹	1.9 x 10 ⁹	9.28
		TBUD	133	48			
	2	TBUD	134	7	1.2 x 10 ⁹		
		TBUD	105	14			
Formula 2	1	TBUD	104	10	9.7 x 10 ⁸	9.5 x 10 ⁸	8.98
		TBUD	90	6			
	2	TBUD	96	9	9.4 x 10 ⁸		
		TBUD	92	8			
Formula 3	1	TBUD	91	8	9.4 x 10 ⁸	1.0 x 10 ⁹	9.00
		TBUD	97	10			
	2	TBUD	109	10	1.1 x 10 ⁹		
		TBUD	117	6			

Lampiran 6. Total *S.typhimurium* pada uji penghambatan oleh bakteri asam laktat

Jenis Produk	Ulangan	Pemupukan							CFU/ml
		10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶		
<i>S. typhimurium</i> (kontrol)	1				TBUD	148	9	2.0 x 10 ⁷	
	2				TBUD	270	13	1.2 x 10 ⁷	
BAL A	1	-	-	-				< 3.0 x 10 ²	
	2	-	-	-				< 3.0 x 10 ²	
BAL D	1	-	-	-				< 3.0 x 10 ²	
	2	-	-	-				< 3.0 x 10 ²	
BAL E	1	-	-	-				< 3.0 x 10 ²	
	2	-	-	-				< 3.0 x 10 ²	
Formula 1	1	-	-	-				< 3.0 x 10 ²	
	2	-	-	-				< 3.0 x 10 ²	
Formula 2	1	-	-	-				< 3.0 x 10 ²	
	2	-	-	-				< 3.0 x 10 ²	
Formula 3	1	-	-	-				< 3.0 x 10 ²	
		-	-	-				< 3.0 x 10 ²	

Lampiran 7. Penurunan *Salmonella typhimurium* pada uji penghambatan oleh bakteri asam laktat

Jenis Produk	UI	Jumlah <i>S. typhimurium</i> (log CFU/ ml)			Penurunan Rata-rata <i>S. typhimurium</i> (log CFU/ ml)
		Awal	Akhir	Selisih	
<i>S. typhimurium</i> (kontrol)	1	5.68	7.30	> 1.62	1.49 *
	2	5.72	7.08	> 1.36	
BAL A	1	5.67	< 2.48	> 3.19	> 3.21
	2	5.71	< 2.48	> 3.23	
BAL D	1	5.67	< 2.48	> 3.19	> 3.21
	2	5.71	< 2.48	> 3.23	
BAL E	1	5.67	< 2.48	> 3.19	> 3.21
	2	5.71	< 2.48	> 3.23	
Formula 1	1	5.66	< 2.48	> 3.19	> 3.20
	2	5.70	< 2.48	> 3.22	
Formula 2	1	5.66	< 2.48	> 3.18	> 3.20
	2	5.70	< 2.48	> 3.22	
Formula 3	1	5.66	< 2.48	> 3.18	> 3.20
	2	5.70	< 2.48	> 3.22	

Keterangan

* : Peningkatan jumlah *S. typhimurium* dalam produk

Lampiran 8. Total bakteri asam laktat pada uji penghambatan terhadap pertumbuhan *S. typhimurium*

Jenis Produk	Ulangan	Pemupukan			CFU/ml	Rata-rata CFU/ ml	Log CFU/ ml
		10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸			
BAL A	1	TBUD	166	14	1.6 x 10 ⁹	1.4 x 10 ⁹	9.15
		TBUD	152	19			
	2	TBUD	133	12	1.2 x 10 ⁹		
		TBUD	100	10			
BAL D	1	95	16	-	8.2 x 10 ⁷	1.4 x 10 ⁷	7.15
		69	7	-			
	2	189	23	4	1.9 x 10 ⁸		
		190	32	6			
BAL E	1	TBUD	39	3	4.0 x 10 ⁸	3.7 x 10 ⁹	9.57
		TBUD	42	6			
	2	TBUD	34	2	3.4 x 10 ⁸		
		TBUD	35	3			
Formula 1	1	TBUD	185	20	1.7 x 10 ⁹	1.4 x 10 ⁹	9.15
		TBUD	158	23			
	2	TBUD	111	11	1.1 x 10 ⁸		
		TBUD	112	6			
Formula 2	1	TBUD	160	15	2.4 x 10 ⁹	1.7 x 10 ⁹	9.23
		TBUD	166	50			
	2	TBUD	119	7	1.1 x 10 ⁹		
		TBUD	106	14			
Formula 3	1	TBUD	112	14	1.0 x 10 ⁹	1.1 x 10 ⁹	9.04
		TBUD	98	11			
	2	TBUD	130	22	1.2 x 10 ⁹		
		TBUD	111	13			

Lampiran 9. Total *A.flavus* pada uji penghambatan oleh bakteri asam laktat

Jenis Produk	Ulangan	Pemupukan				CFU/ml
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
<i>A.flavus</i> (kontrol)	1		TBUD	42	2	2.8 x 10 ³
	2		TBUD	43	2	
BAL A	1	276	27	3		3.0 x 10 ³
	2	TBUD	65	5		
BAL D	1	314	18	4		5.5 x 10 ³
	2	TBUD	60	4		
BAL E	1	286	24	2		1.2 x 10 ³
	2	TBUD	43	5		
Formula 1	1	TBUD	46	3		4.2 x 10 ⁴
	2	TBUD	52	8		
Formula 2	1	TBUD	59	4		7.0 x 10 ⁴
	2	TBUD	128	9		
Formula 3	1	TBUD	123	16		1.5 x 10 ³
	2	158	18	2		
Formula 1	1	145	17	3		2.1 x 10 ³
	2	208	21	4		
Formula 2	1	209	24	3		5.0 x 10 ³
	2	TBUD	47	8		
Formula 3	1	TBUD	53	5		4.6 x 10 ³
	2	TBUD	41	6		
Formula 1	1	TBUD	52	6		1.7 x 10 ³
	2	178	23	1		
Formula 2	1	167	28	-		2.5 x 10 ³
	2	255	26	1		
Formula 3	1	250	26	4		2.5 x 10 ³
	2					

Lampiran 10. Penurunan *Aspergillus flavus* pada uji penghambatan oleh bakteri asam laktat

Jenis Produk	Ul	Jumlah <i>A. flavus</i> (log CFU/ ml)			Penurunan Rata-rata <i>A. flavus</i> (log CFU/ ml)
		Awal	Akhir	Selisih	
<i>A. flavus</i> (kontrol)	1	4.82	4.62	0.20	0.20
	2	5.04	4.85	0.19	
BAL A	1	4.81	3.45	1.36	1.31
	2	5.04	3.79	1.25	
BAL D	1	4.81	3.48	1.33	1.37
	2	5.04	3.64	1.40	
BAL E	1	4.81	3.74	1.07	1.52
	2	5.04	3.08	1.96	
Formula 1	1	4.80	3.18	1.62	1.65
	2	5.00	3.32	1.68	
Formula 2	1	4.80	3.70	1.12	1.23
	2	5.00	3.66	1.34	
Formula 3	1	4.80	3.23	1.57	1.59
	2	5.00	3.40	1.60	

Lampiran 11. Total bakteri asam laktat pada uji penghambatan terhadap pertumbuhan *A. flavus*

Jenis Produk	Ulangan	Pemupukan			CFU/ml	Rata-rata CFU/ml	Log CFU/ml
		10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸			
BAL A	1	TBUD	120	14	1.1 x 10 ⁹	1.3 x 10 ⁹	9.11
		TBUD	107	19			
	2	TBUD	179	12	1.6 x 10 ⁹		
		TBUD	133	10			
BAL D	1	TBUD	114	-	1.2 x 10 ⁷	8.3 x 10 ⁸	8.92
		TBUD	119	-			
	2	TBUD	37	4	4.7 x 10 ⁸		
		TBUD	57	6			
BAL E	1	TBUD	293	3	7.7 x 10 ⁸	7.2 x 10 ⁸	8.86
		TBUD	261	6			
	2	TBUD	57	2	6.7 x 10 ⁸		
		TBUD	78	3			
Formula 1	1	TBUD	125	20	1.2 x 10 ⁹	1.3 x 10 ⁹	9.11
		TBUD	114	23			
	2	TBUD	148	11	1.5 x 10 ⁸		
		TBUD	151	6			
Formula 2	1	TBUD	TBUD	15	5.4 x 10 ⁹	3.2 x 10 ⁹	9.51
		TBUD	TBUD	50			
	2	TBUD	105	7	1.0 x 10 ⁹		
		TBUD	104	14			
Formula 3	1	TBUD	144	14	1.3 x 10 ⁹	1.3 x 10 ⁹	9.11
		TBUD	119	11			
	2	TBUD	138	22	1.4 x 10 ⁹		
		TBUD	144	13			

Lampiran 12. Data pengukuran garis skala pada uji skalar garis terhadap 3 formula minuman probiotik

PENERIMAAN UMUM

Panelis	Formula 1 (cm)	Formula 2 (cm)	Formula 3 (cm)
1	5.75	8.75	7.35
2	6.95	6.90	7.00
3	7.90	7.00	6.80
4	8.00	7.90	7.60
5	5.40	4.65	6.00
6	6.80	5.60	6.60
7	8.10	9.30	8.90
8	5.80	5.30	5.30
9	7.50	3.20	4.45
10	6.80	2.60	4.30
11	5.25	7.40	6.25
12	8.00	9.00	9.30
13	6.30	5.50	4.80
14	7.20	6.30	5.20
15	7.35	6.20	6.50
16	4.60	4.50	4.55
17	7.80	4.80	6.10
18	8.80	9.00	8.10
19	7.20	5.50	6.40
20	7.10	6.50	8.05
21	7.70	8.80	6.20
22	7.60	7.50	7.15
23	9.40	9.00	9.20
24	6.50	5.10	6.20
25	4.90	6.30	5.65
26	6.60	5.90	6.30
27	9.60	7.70	8.80
28	9.30	8.90	9.10
29	7.60	6.40	7.10
30	6.75	4.30	5.00

PENAMPAKAN

Panelis	Formula 1 (cm)	Formula 2 (cm)	Formula 3 (cm)
1	7.10	8.50	5.20
2	6.50	6.40	6.50
3	7.40	6.30	6.30
4	7.65	7.30	6.95
5	3.30	4.80	5.30
6	6.30	6.50	6.60
7	9.00	10.00	9.80
8	7.70	7.90	7.30
9	7.94	3.20	4.75
10	7.00	8.80	5.30
11	4.40	7.80	5.90
12	4.00	4.80	5.80
13	6.50	3.90	5.40
14	5.90	5.70	5.80
15	6.90	4.80	6.80
16	5.75	5.80	5.75
17	5.90	6.60	3.50
18	9.35	9.30	9.40
19	5.50	5.00	5.20
20	5.50	3.80	4.20
21	7.80	9.30	6.00
22	7.55	7.05	7.00
23	9.20	8.30	8.70
24	8.10	7.80	8.00
25	5.00	5.90	5.40
26	7.10	6.30	6.85
27	9.70	8.70	9.00
28	8.70	9.50	9.10
29	6.60	6.10	5.85
30	7.00	3.10	5.30

Lampiran 12. Data pengukuran garis skala uji skalar garis terhadap 3 formula minuman probiotik (lanjutan)

AROMA

Panelis	Formula 1	Formula 2	Formula 3
1	4.00	1.80	5.25
2	7.00	5.50	7.00
3	9.00	9.00	8.10
4	6.20	6.90	7.70
5	3.40	3.40	3.70
6	6.20	6.10	6.60
7	9.40	5.70	7.90
8	2.30	2.30	2.30
9	4.60	7.20	2.40
10	4.10	4.30	3.20
11	5.50	4.80	6.60
12	4.70	5.30	4.50
13	3.60	4.00	3.10
14	4.40	4.50	4.50
15	4.80	2.80	4.50
16	3.40	3.30	3.40
17	5.20	2.50	3.80
18	9.10	9.40	9.30
19	6.10	4.60	3.80
20	6.00	7.50	6.40
21	4.00	5.60	3.10
22	6.25	6.30	6.20
23	9.10	7.70	8.40
24	4.70	3.60	2.50
25	3.60	2.60	3.00
26	2.40	2.30	2.40
27	7.80	7.10	5.60
28	8.40	8.10	8.90
29	5.50	5.10	5.30
30	7.00	3.70	5.40

RASA

Panelis	Formula 1	Formula 2	Formula 3
1	4.90	4.80	5.60
2	5.40	6.90	6.20
3	8.70	8.90	5.40
4	3.40	4.50	6.30
5	5.80	4.50	5.80
6	7.00	6.30	6.60
7	8.00	7.10	9.10
8	6.20	7.10	5.10
9	6.30	3.00	7.90
10	4.70	3.60	6.50
11	3.50	7.50	5.20
12	7.50	8.20	8.60
13	3.00	2.10	4.10
14	6.10	5.00	2.90
15	2.30	3.90	1.50
16	6.40	4.40	5.50
17	7.60	5.70	6.60
18	8.90	9.40	9.30
19	8.60	4.90	6.90
20	7.30	7.00	8.20
21	8.90	7.80	6.70
22	7.20	7.35	6.95
23	9.10	8.10	8.80
24	5.80	5.50	6.70
25	4.50	4.80	4.00
26	8.60	8.40	8.70
27	9.40	8.10	8.65
28	9.10	8.50	8.90
29	7.30	6.60	7.35
30	6.70	7.80	4.60

Lampiran 13. Analisis sidik ragam skor kesukaan terhadap penerimaan umum 3 formula minuman probiotik

Hasil analisis sidik ragam

Sumber Keragaman	DB	YK	KT	P*
Panelis	29	158.713	5.473	.000
Sampel	2	6.398	3.199	.024
Galat	58	46.712	.805	
Total	90	4354.405		

* : Berbeda nyata jika $P < 0.05$

Uji Duncan

SAMPEL	Rata-rata Kuadrat Terkecil	Grup Homogen	
		1	2
859	6.5267	X	
145	6.6750	X	
562	7.1517		X

Lampiran 14. Uji penjenjangan (*ranking*) terhadap penerimaan umum 3 jenis produk dalam formulasi kultur minuman probiotik

Uji Friedman

Uji Peringkat

	Rata-rata Peringkat
SMPL562	1.53
SMPL859	2.27
SMPL145	2.20

Uji Statistik

N	30
Q ²	9.867
DB	2
Signifikansi Asimtotik	.007

Lampiran 15. Analisis sidik ragam skor kesukaan terhadap penampakan 3 formula minuman probiotik

Hasil analisis sidik ragam

Sumber Keragaman	DB	YK	KT	P*
Panelis	29	190.516	6.570	.000
Sampel	2	2.992	1.496	.247
Galat	58	60.614	1.045	
Total	90	4234.679		

* : Berbeda nyata jika $P < 0.05$

Lampiran 18. Komentar negatif panelis terhadap penerimaan umum 3 jenis produk dalam formulasi kultur minuman probiotik

Jenis formula	After taste		Aroma	
	Komentar	Jumlah panelis (%)	Komentar	Jumlah panelis (%)
Formula 1	asam tersisa di lidah, getir	10.00	kurang segar, seperti daun sirih	30.00
Formula 2	pahit, asam tersisa di lidah, getir	33.33	busuk, seperti daun sirih	33.33
Formula 3	pahit, asam tersisa di lidah, getir	20.00	busuk, seperti daun sirih	33.33

Lampiran 20. Uji organoleptik penyimpanan minuman probiotik Formula 1

Penilaian organoleptik terhadap aroma

Panelis	Hari ke-0		Hari ke-5		Hari ke-10		Hari ke-15		Hari ke-20	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
4	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
5	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
6	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
7	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
8	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
9	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
10	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
11	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
12	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

Penilaian organoleptik terhadap rasa

Panelis	Hari ke-0		Hari ke-5		Hari ke-10		Hari ke-15		Hari ke-20	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	N	N
3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
4	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
5	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
6	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
7	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
8	Y	Y	N	N	N	N	N	N	N	N
9	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
10	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
11	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
12	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

Keterangan

I : Produk penyimpanan ulangan 1

Y : Produk dapat diterima

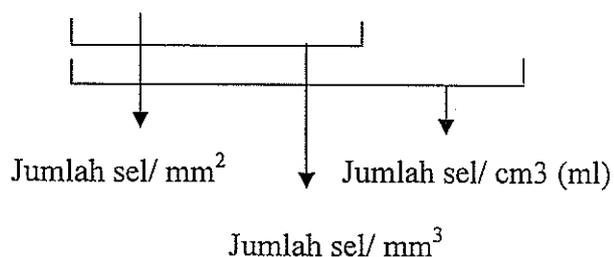
II : Produk penyimpanan ulangan 2

N:Produk tidak diterima

Lampiran 21. Perhitungan Jumlah Spora Kapang dengan Metode *Petroff-Hausser* (Fardiaz, 1989)

Dalam metode *Petroff-Hausser*, hitungan mikroskopik dilakukan dengan pertolongan kotak-kotak skala, dimana dalam setiap ukuran skala seluas 1 mm² terdapat 16 kotak besar. Tinggi contoh yang terletak di antara gelas obyek dengan gelas penutup adalah 0.1 mm. Jumlah sel dalam beberapa kotak besar dihitung, kemudian dihitung jumlah sel rata-rata dalam satu kotak besar. Jumlah sel per ml contoh dapat dihitung sebagai berikut :

$$\text{Jumlah sel per ml contoh} = \frac{\text{jumlah sel pada 16 kotak besar}}{16} \times \frac{1}{0.1} \times 10^3$$



$$\text{Jumlah sel per ml contoh} = \frac{\text{jumlah sel pada 16 kotak besar}}{16} \times 10 \times 10^3$$

Lampiran 22. Contoh formulir uji skalar garis dan penjenjangan (*ranking*) dalam pemilihan formulasi terbaik

UJI SKALAR GARIS DAN UJI PENJENJANGAN (*RANKING*)

Nama : _____ Tanggal: _____

Telp : _____

Sampel: Minuman probiotik (III)

Instruksi :

- Cicipilah sampel yang disajikan dan netralkan lidah dengan air sebelum mencicipi sampel berikutnya
- Nyatakan penilaian secara urut terhadap masing-masing parameter sampel
- Penilaian rangking dilakukan dengan menuliskan kode sampel pada kolom rangking yang tersedia, berikan rangking 1 untuk sampel yang paling disukai
- Penilaian hedonik dilakukan dengan memberi garis tegak (I) pada garis skala yang tersedia
- Nilai 0 untuk penilaian sangat tidak suka, dan 10 untuk penilaian sangat suka

PARAMETER:

A. AROMA

Hedonik :

562	_____	
	0	10
145	_____	
	0	10
859	_____	
	0	10

Lampiran 22. Contoh formulir uji skalar garis dan penjenjangan (*ranking*) dalam pemilihan formulasi terbaik (lanjutan)

C. RASA

Hedonik :

562	_____	
	0	10
145	_____	
	0	10
859	_____	
	0	10

D. PENAMPAKAN

Hedonik :

562	_____	
	0	10
145	_____	
	0	10
859	_____	
	0	10

Lampiran 22. Contoh formulir uji skalar garis dan penjenjangan (*ranking*) dalam pemilihan formulasi terbaik (lanjutan)

E. PENERIMAAN UMUM

Hedonik :

562	_____	
	0	10
145	_____	
	0	10
859	_____	
	0	10

Rangking :

Rangking		
1	2	3

Bagaimana menurut anda produk yang disajikan?

.....

Apakah terdapat aftertaste pada produk?

.....

