

PRODUKSI EKSPOLISAKARIDA OLEH *Lactobacillus plantarum* B2 PADA PRODUK PROBIOTIK BERBASIS BUAH MURBEI

Production of Exopolysaccharide from Lactobacillus plantarum B2 in Mulberry Based Probiotic Product

Elok Zubaidah*, Yusnita Liasari, dan Ella Saparianti

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian – Fak. Teknologi Pertanian – Universitas Brawijaya
Jl. Veteran – Malang

*Penulis korespondensi, Email:elzoeba@yahoo.com

ABSTRACT

Some microbes, including of lactic acid bacteria probiotic, has ability to produce exopolysaccharides (EPS). Recently, researches on the ability of lactic acid bacteria that produces exopolysaccharides have still been focused only on milk, and haven't been known how much EPS produced by lactic acid bacteria in fruit and vegetable. Fermentation in mulberry extract is diversification of such fruit. By adding Lactobacillus plantarum B2 as EPS producer in mulberry extract, expectedly it could be fermented drink that gives multifunctional healthy effect, probiotic, exopolysaccharide, and anthocyanin.

*The aims of this research were to determine the effect of kinds of sugar and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (diamonium hidrogen fospat) concentration to EPS production of *L. plantarum* B2 when grown in mulberry extract. This research was conducted in randomized block design with two factors. First factor was kind of sugar that consist of glucose, sucrose, and lactose. The second factor was $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (diamonium hidrogen fospat) concentration (0.10%; 0.20%; and 0.30%). Each treatment was done in three replications. The result was analyzed using analysis of variance (ANOVA) within 1% and 5% interval of confidence, and then continued by BNT or DMRT test. The best treatment searched by Multiple Attribute method. The result showed the effect of type of sugar on total sugar, total EPS, total acid, pH, and total LAB. Diamonium hidrogen fospat concentration treatment showed significant difference on total LAB, total N, total EPS, pH, total acid, total anthocyanin, and color intensity (L^* , a^* , b^*). Interaction of both treatments gave no significant difference on all parameters. The best treatment resulted from the combination of 0.20% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ concentration and lactose treatment with characteristics viability of *L. plantarum* B2 of 7.28×10^8 CFU/ ml, total EPS of 2105 mg/L, total acid of 0,54 %, total sugar of 6.61%, pH of 4.33, total N of 0.0209%, total anthosyanin of 190.73 mg/L, brightness level (L^*) of 23.73, redness level (a^*) of 8.40, dan yellowish level (b^*) of 8.90.*

Keywords: exopolysaccharides, probiotic product, mulberry

PENDAHULUAN

Eksopolisakarida (EPS) adalah polimer gula atau polisakarida yang disekresikan oleh mikrob keluar sel. Eksopolisakarida yang dihasilkan mikroorganisme banyak digunakan pada industri karena sifat fisiko-kimianya serupa dengan polisakarida dari tanaman (selulosa, pektin dan pati) dan rumput

laut (alginat dan karaginan). Eksopolisakarida juga berperan dalam rasa di mulut, tekstur, dan persepsi rasa dari produk fermentasi. Menurut Sutherland (1998), EPS juga banyak diaplikasikan pada industri makanan sebagai pengental sehingga meningkatkan tekstur, viskositas dan sifat rheologi produk. Selain itu EPS mempunyai efek kesehatan karena

terdapat aktivitas immunostimulator, antitumor dan aktivasi makrofage dan limfosit untuk meningkatkan ketahanan tubuh, serta bersifat prebiotik (Tallon *et al.*, 2006).

Beberapa mikrob, termasuk bakteri asam laktat (BAL) yang bersifat probiotik, memiliki kemampuan menghasilkan eksopolisakarida seperti *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium longum*. Berbagai jenis strain dari *L. plantarum* telah diteliti dapat menghasilkan eksopolisakarida (Tallon *et al.*, 2006).

Sementara ini penelitian tentang kemampuan BAL menghasilkan EPS masih difokuskan hanya sebatas pada produk fermentasi berbasis susu, dan belum banyak diketahui berapa jumlah eksopolisakarida yang dihasilkan BAL pada fermentasi berbasis buah-buahan atau sayuran

Fermentasi dengan substrat sari buah murbei merupakan diversifikasi dari buah murbei. Berdasarkan data dari Departemen Kehutanan (2001), saat ini terdapat 45.085,5 ha lahan murbei di Indonesia, namun pemanfaatannya masih terbatas dan belum banyak dikembangkan sebagai produk pangan. Padahal buah murbei merupakan buah yang cukup banyak tersedia di Indonesia dan memiliki rasa yang disukai. Penambahan bakteri *Lactobacillus plantarum* B2 penghasil EPS pada sari buah murbei, diharapkan diperoleh produk minuman fermentasi yang memberikan efek kesehatan yang bersifat multifungsional yaitu mengandung probiotik, eksopolisakarida, dan antosianin. Selain itu, pada penelitian ini dilakukan eksplorasi potensi *Lactobacillus plantarum* B2 sebagai isolat lokal yang menghasilkan eksopolisakarida

Diantara BAL mesofilik, *L. plantarum* sering digunakan secara luas dalam industri fermentasi makanan seperti sayur-sayuran dan sosis). *L. plantarum* adalah salah satu spesies BAL

yang banyak diteliti, karena pada umumnya beberapa strain tersebut bersifat probiotik.

Permasalahan dalam pembuatan minuman probiotik sari buah adalah rendahnya kandungan N dan P sehingga perlu ditambahkan sumber N dan P dari luar. Diamonium hidrogen fosfat ((NH₄)₂HPO₄) mengandung unsur N dan P yang sangat diperlukan mikrob guna menunjang pertumbuhan dan perkembangan sel. Selain itu menurut Harrah *et al.*, (2006), unsur N dan PO₄ berguna dalam pembentukan struktur eksopolisakarida.

Dalam pertumbuhan dan perkembangan sel bakteri, selain sumber N dan P, juga diperlukan sumber karbon yang merupakan sumber energi utama. Selain itu menurut penelitian Tallon *et al.*, (2006), jenis gula sangat berpengaruh terhadap produksi eksopolisakarida.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan dasar yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah murbei, kultur *Lactobacillus plantarum* B2, Media MRS broth merk Oxoid, MRS agar, berbagai jenis gula (glukosa, sukrosa, laktosa), diamonium hidrogen fosfat ((NH₄)₂HPO₄), akuades, dan alkohol 70%.

Bahan yang digunakan untuk analisis kimia adalah analisis pH: larutan buffer pH 4 & 7; indikator merah metilen, NaOH 0.1 N, asam oksalat, pereaksi anthrone, larutan glukosa standar, etanol 95%, MRS Agar merk Pronadisa, dan pepton

Alat

Alat-alat yang digunakan meliputi peralatan gelas, autoklaf (Model HL-36 AE, Hirayama Jepang), inkubator (Binder BD 53 Germany), *laminar air flow*, vortex-mixer model VM-2000, Bunsen, ose, spektrofotometer (UNICO UV-2100), timbangan digital (Denver Instrumen M-310), timbangan analitik, mikropipet (Finnipipett, Labsystem), pH

meter (Model pHS-3C), dan refraktometer.

Metode Penelitian

Pada penelitian ini digunakan Rancangan Percobaan, Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan dua faktor yang masing-masing faktor mempunyai 3 level. Faktor pertama adalah jenis gula dengan 3 level (glukosa, sukrosa, dan laktosa) dan faktor kedua adalah konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ dengan 3 level (0,10%; 0,20%; 0,30%) dan diulang 3 kali.

Pelaksanaan penelitian

Proses pembuatan minuman probiotik murbei dilakukan sebagai berikut: sari buah murbei dihancurkan kemudian disaring dan filtrat diencerkan dengan perbandingan sluri:air 1:5 (v/v). Sari buah murbei diambil 100 ml ditimbang dan ditambahkan nutrisi sesuai dengan level perlakuan yaitu diamonium hidrogen fosfat $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,1%, 0,2% dan 0,3%); 5% gula (glukosa, galaktosa, laktosa). Kemudian diaduk sampai homogen. Selanjutnya dilakukan sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 105°C selama 3 menit. Setelah didinginkan sampai suhu 37°C yaitu suhu pertumbuhan optimum *L. plantarum* B2, diinokulasi dengan *L. plantarum* B2 sebanyak 5% (v/v) lalu diinkubasi pada suhu 37°C

Analisis

Pengujian yang dilakukan pada produk probiotik meliputi total bakteri asam laktat dengan menggunakan metode *pour plate* (Lay, 1994), total eksopolisakarida (Tallon *et al.*, 2006), total asam, pH, total gula metode anthrone, total antosianin (Gusti dan Wrolstad, 2000), kadar protein metode Kjedahl, dan warna.

Data yang diperoleh dianalisis sidik ragam (dilanjutkan dengan uji beda nyata BNT (Beda Nyata Terkecil) menggunakan selang kepercayaan 1% dan 5 %. Bila ada interaksi dilakukan uji DMRT (Yitnosumarto,1991). Penentuan perlakuan terbaik menggunakan metode

“Multiple Attribute” (Zeleny, 1992 dalam Mahendra, 2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1 menunjukkan karakteristik filtrat murbei yang sudah diencerkan yang digunakan sebagai bahan baku pembuatan minuman probiotik.

Tabel 1. Hasil analisis kimiawi filtrat buah murbei

Parameter	Kadar
pH	3,6
Antosianin (mg/l)	275,24
Total Gula (%)	5,07
Total N (%)	0,04
Polisakarida (mg/l)	750
Warna	26,6
- L*	28
- a*	6,8
- b*	15

Total BAL (*Lactobacillus plantarum* B2)

Tabel 2 menunjukkan bahwa jumlah *Lactobacillus plantarum* B2 setelah akhir fermentasi mengalami peningkatan. Rerata total bakteri asam laktat (*L. plantarum* B2) pada jam ke-0 berkisar antara $4,53 \times 10^7$ - $4,77 \times 10^7$ cfu/ml. Setelah fermentasi (inkubasi jam ke-24), rata-rata jumlah *L. plantarum* B2 meningkat menjadi $6,41 \times 10^8$ - $9,36 \times 10^8$ cfu/ml.

Medium sari murbei dengan penambahan jenis gula glukosa menghasilkan jumlah *L. plantarum* B2 paling tinggi. Hal ini dimungkinkan karena glukosa merupakan sumber karbon yang paling sederhana yang digunakan sebagai sumber energi terlebih dahulu, sehingga pertumbuhan dan perkembangan sel meningkat lebih cepat. Sukrosa dan laktosa merupakan disakarida sehingga harus dipecah terlebih dahulu menjadi monosakarida untuk digunakan sebagai sumber energi bagi pertumbuhan dan perkembangan sel.

Tabel 2. Rerata total *L. plantarum* B2 dalam minuman probiotik sari buah murbei akibat pengaruh jenis gula

Jenis Gula (5%)	Total <i>L. plantarum</i> B2 (log cfu/ml)		Peningkatan
	Awal Fermentasi	Akhir Fermentasi	
	Glukosa	7,67 a	
Sukrosa	7,66 a	8,88 b	1,22 b
Laktosa	7,67 a	8,83 a	1,16 a

Keterangan: Angka pada kolom yang sama yang mempunyai notasi huruf yang berbeda berarti berbeda nyata pada uji BNT ($\alpha = 0,01$). BNT ($\alpha=0,01$) akhir fermentasi=0,028706

Total BAL terendah diperoleh pada medium sari murbei dengan gula laktosa. Hal ini dikarenakan laktosa akan dipecah menjadi glukosa dan galaktosa, ada kemungkinan aktivitas enzim β -D galaktosidase dalam menghidrolisis laktosa pada *L. plantarum* sangat rendah (Tallon *et al.*, 2006). Akibatnya hanya glukosa saja yang digunakan sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan dan perkembangan sel. Menurut Helferich and Westhoff, 1980 dalam Setyaningsih, 1992), pada metabolisme karbohidrat, laktosa dihidrolisis oleh bakteri asam laktat dengan enzim β galaktosidase menjadi glukosa dan galaktosa. Glukosa digunakan untuk memproduksi asam laktat sedangkan galaktosa terakumulasi.

Peningkatan jumlah *L. plantarum* B2 semakin tinggi seiring dengan meningkatnya konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, namun hanya sampai pada konsentrasi 0,2%, sedangkan pada konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,3% kenaikan jumlah *L. plantarum* B2 paling rendah tetapi kedua konsentrasi tersebut tidak menampakkan perbedaan yang nyata (Tabel 3).

Unsur nitrogen dan fosfat sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan bakteri sebagai pembentukan dinding sel. Adanya penambahan $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ menyebabkan peningkatan jumlah nutrisi yang diperlukan oleh *L. plantarum* untuk tumbuh dan berkembang biak. Menurut Fardiaz (2003), nutrisi bagi mikroba berfungsi sebagai sumber energi untuk pertumbuhan, membentuk sel, dan

biosintesis produk-produk metabolit. Nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroba meliputi air, sumber karbon, sumber nitrogen, vitamin dan mineral.

Tabel 3. Rerata total *L. plantarum* B2 dalam minuman probiotik sari buah murbei akibat pengaruh konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (%)	Total <i>L. plantarum</i> B2 (log cfu/ml)		Peningkatan
	Sebelum Fermentasi	Setelah Fermentasi	
	0,10	7,67 a	
0,20	7,67 a	8,92 c	1,25 b
0,30	7,66 a	8,85 a	1,19 a

Keterangan: Angka pada kolom yang sama yang mempunyai notasi huruf yang berbeda berarti berbeda nyata pada uji BNT ($\alpha = 0,01$). BNT ($\alpha=0,01$) akhir fermentasi=0,0287191

Menurut Stamer (1979), konsentrasi nutrisi yang semakin tinggi tidak selalu menyebabkan perombakan nutrisi tersebut, yang berkaitan dengan aktivitas bakteri untuk menggunakan nutrisi yang tersedia. Jika mikroorganisme mempunyai kemampuan perombakan yang rendah dan berada pada konsentrasi substrat yang tinggi maka laju perombakan akan lambat. Kemungkinan *L. plantarum* tidak menggunakan semua nitrogen sebagai nutrisi pada konsentrasi 0,30%.

Hal ini terbukti dari hasil analisis total N. Total N yang tersedia pada medium fermentasi sari buah murbei dengan konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,30% yaitu 0,1057%. namun yang dirombak oleh sel hanya berkisar 0,0514%-0,0639%, jadi masih terdapat sisa nitrogen di dalam medium fermentasi.

Total Eksopolisakarida Kasar (Crude EPS)

Jumlah total eksopolisakarida kasar sesudah fermentasi mengalami peningkatan. Rerata total eksopolisakarida kasar pada jam ke-0 berkisar antara 157,33-166,67 mg/l. Setelah fermentasi (inkubasi jam ke-24), rata-rata jumlah eksopolisakarida kasar menjadi 579,00-2469,67 mg/l.

Jumlah eksopolisakarida kasar paling tinggi diperoleh pada jenis gula laktosa (Tabel 4), sedangkan jumlah eksopolisakarida kasar paling rendah diperoleh pada konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,1%. Medium dengan sumber karbon berupa sukrosa memiliki nilai total *crude* EPS paling rendah, sedangkan medium dengan sumber karbon laktosa memiliki nilai total *crude* EPS paling tinggi. Pada saat fermentasi laktosa akan terpecah menjadi glukosa dan galaktosa yang merupakan sumber karbon utama dalam meningkatkan aktivitas enzim UDP-glukosa pirofosforilase dan UDP galaktosa 4-epimerase. Menurut Grobber *et al.*, (2006), UDP galaktosa 4-epimerase merupakan enzim kunci dalam pembentukan EPS, dan enzim tersebut akan aktif jika terdapat unit gula berupa galaktosa sebagai prekursor dalam pembentukan eksopolisakarida.

Medium dengan sumber gula sukrosa mempunyai total EPS kasar yang paling rendah. Selama fermentasi sukrosa akan dipecah menjadi glukosa dan fruktosa, namun dengan adanya fruktosa akan menghambat aktivitas enzim pembentuk EPS.

Tabel 4. Rerata total EPS kasar dalam minuman probiotik sari buah murbei akibat pengaruh jenis gula

Jenis Gula (5%)	Total <i>crude</i> EPS (mg/ml)		Peningkatan
	Awal	Akhir	
	Fermentasi	Fermentasi	
Glukosa	162,00 a	1489,00 b	1327,00 b
Sukrosa	159,33 a	869,22 a	709,89 a
Laktosa	163,33 a	2119,11 c	1955,78 c

Keterangan: Angka pada kolom yang sama yang mempunyai notasi huruf yang berbeda berarti berbeda nyata pada uji BNT ($\alpha = 0,01$). BNT ($\alpha=0,01$) akhir fermentasi=145,9

Tabel 5 menunjukkan jumlah eksopolisakarida kasar paling tinggi diperoleh pada konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,3%, sedangkan jumlah eksopolisakarida kasar paling rendah diperoleh pada konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,1%. Semakin tinggi kadar $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ menyebabkan peningkatan nilai total EPS kasar.

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ merupakan sumber nitrogen dan fosfat pada pembentukan senyawa metabolit *L.plantarum*. Eksopolisakarida tersusun dari gugus asetil, fosfat, sn-gliserol-fosfat dan N-asetil-amino-sakarida (Tallon *et al.*, 2006). Menurut Harrah *et al* (2006), unit penyusun heteropolisakarida kadang-kadang mengandung N-asetilglukosamin, N-asetilgalaktosamin, fukosa, asam glukuronat, dan gugus non-karbohidrat seperti fosfat, asetil, dan gliserol.

Tabel 5. Rerata total EPS kasar dalam minuman probiotik sari buah murbei akibat pengaruh konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (%)	Total <i>crude</i> EPS (mg/L)		Peningkatan
	Sebelum Fermentasi	Setelah Fermentasi	
	0,10	160,44 a	
0,20	161,44 a	1497,56	1336,11
0,30	162,78 a	1781,44	1618,67

Keterangan : Angka pada kolom yang sama yang mempunyai notasi huruf yang berbeda berarti berbeda nyata pada uji BNT ($\alpha = 0,01$). BNT ($\alpha=0,01$) akhir fermentasi=145,97831

Total Asam

Tabel 6 menunjukkan total asam paling tinggi diperoleh pada jenis gula glukosa, sedangkan total asam paling rendah diperoleh pada jenis gula laktosa. Hal ini berkaitan dengan jumlah total *L. plantarum* B2 yang meningkat akan mempengaruhi peningkatan nilai total asam. Medium dengan jenis gula glukosa menghasilkan jumlah sel yang paling tinggi, sehingga menghasilkan asam laktat paling besar dibandingkan jenis gula lain (sukrosa dan laktosa).

Selama proses fermentasi terjadi peningkatan nilai total asam akibat aktivitas bakteri asam laktat. Surono (2004) menyatakan, berbagai monosakarida dimetabolisme oleh bakteri asam laktat menjadi glukosa-6-fosfat atau fruktosa-6-fosfat dan kemudian dimetabolisme melalui jalur Embden Meyerhoff Parnas (EMP) yang akhirnya dihasilkan asam laktat. Terakumulasinya asam laktat selama proses fermentasi ini

menyebabkan tingkat keasaman minuman probiotik sari buah murbei meningkat. Ramadayantie (2001) menyatakan bahwa tingginya total asam tidak hanya berasal dari perombakan gula selama fermentasi, tetapi kemungkinan juga disebabkan oleh perombakan protein dan asam-asam lain. Dipertegas juga oleh Muchtadi dan Sugiono (1992), bahwa jumlah padatan (glukosa dan protein) sangat menentukan sekali proses fermentasi dan jumlah asam yang dihasilkan.

Tabel 6. Rerata total asam dalam minuman probiotik sari buah murbei akibat pengaruh jenis gula

Jenis Gula (%)	Total Asam (%)		Peningkatan
	Sebelum Fermentasi	Setelah Fermentasi	
Glukosa	0,16 a	0,55 c	0,39 b
Sukrosa	0,16 a	0,54 b	0,38 b
Laktosa	0,16 a	0,52 a	0,36 a

Keterangan: Angka pada kolom yang sama yang mempunyai notasi huruf yang berbeda berarti berbeda nyata pada uji BNT ($\alpha = 0,01$). BNT ($\alpha=0,01$) akhir fermentasi=0,0082746

Tabel 7 menunjukkan total asam paling tinggi diperoleh pada konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,10%, sedangkan total asam paling rendah diperoleh pada konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,30%. Peningkatan konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ menyebabkan penurunan total asam. $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ mempunyai ion NH_4^+ yang bersifat basa sehingga meningkatkan pH menjadi bersifat basa. Hal ini menyebabkan volume NaOH yang dibutuhkan dalam menetralisasi asam yang ada dalam medium menjadi lebih sedikit, sehingga total asam yang tertera rendah.

Diduga bahwa pada konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,30% jumlah sel *L. plantarum* B2 paling rendah. Mikroorganisme yang merombak gula, nitrogen, fosfat, dan nutrisi lain menjadi asam laktat dan asam-asam organik yang lain juga rendah. Akibatnya asam-asam yang terakumulasi juga rendah menyebabkan total asam menjadi lebih rendah.

Tabel 7. Rerata total asam dalam minuman probiotik sari buah murbei akibat pengaruh konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (%)	Total Asam (%)		Peningkatan
	Sebelum Fermentasi	Setelah Fermentasi	
0,10	0,20 c	0,57 c	0,37 a
0,20	0,15 b	0,55 b	0,39 b
0,30	0,13 a	0,49 a	0,36 a

Keterangan: Angka pada kolom yang sama yang mempunyai notasi huruf yang berbeda berarti berbeda nyata pada uji BNT ($\alpha = 0,01$). BNT($\alpha=0,01$) akhir fermentasi=0,0082746

Derajat Keasaman (pH)

Nilai pH akhir fermentasi mengalami penurunan. Rerata pH pada jam ke-0 berkisar antara 4,83-6,10. Setelah fermentasi (inkubasi jam ke-24), rata-rata pH menjadi 4,00-4,57. Tabel 8 menunjukkan nilai pH setelah fermentasi paling tinggi dengan jenis gula laktosa dan paling rendah adalah glukosa. Hal ini berhubungan dengan total BAL dalam medium. Total BAL pada medium glukosa paling tinggi, sehingga asam laktat yang dihasilkan tinggi menyebabkan penurunan pH juga paling tinggi. Sebaliknya pada medium dengan sumber gula laktosa.

Tabel 8. Rerata pH dalam minuman probiotik sari buah murbei akibat pengaruh jenis gula

Jenis Gula (%)	pH		Penurunan
	Sebelum Fermentasi	Setelah Fermentasi	
Glukosa	5,46 a	4,21 a	1,24 a
Sukrosa	5,50 a	4,28 ab	1,22 a
Laktosa	5,48 a	4,33 b	1,14 a

Keterangan: Angka pada kolom yang sama yang mempunyai notasi huruf yang berbeda berarti berbeda nyata pada uji BNT ($\alpha = 0,01$). BNT ($\alpha=0,01$) akhir fermentasi=0,0960048

Tabel 9 menunjukkan nilai pH setelah fermentasi paling tinggi diperoleh pada konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,30% dan paling rendah diperoleh pada konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,10%. Medium fermentasi dengan konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,3% memiliki jumlah total BAL paling rendah, sehingga asam laktat yang dihasilkan juga rendah, akibatnya penurunan pH juga rendah. Hal lain yang

mempengaruhi adalah pH awal medium sebelum fermentasi. Medium dengan konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,30% mempunyai pH yang paling tinggi, sehingga penurunan pH akhir fermentasi lebih rendah.

Tabel 9. Rerata pH dalam minuman probiotik sari buah murbei akibat pengaruh konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (%)	pH		Penurunan
	Sebelum Fermentasi	Setelah Fermentasi	
0,10	4,87 a	4,07 a	0,80 a
0,20	5,48 b	4,26 b	1,22 b
0,30	6,09 c	4,50 c	1,59 c

Keterangan : Angka pada kolom yang sama yang mempunyai notasi huruf yang berbeda berarti berbeda nyata pada uji BNT ($\alpha=0,01$). BNT ($\alpha=0,01$) akhir fermentasi=0,0960048

Total Antosianin

Jumlah total antosianin sesudah fermentasi mengalami penurunan. Tabel 10 menunjukkan total antosianin paling tinggi pada konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,10%, dan paling rendah pada konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,30%.

Semakin tinggi konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ maka peningkatan pH juga semakin tinggi, sehingga kestabilan antosianin berkurang. Menurut Vargas *and* Lopez (2003), kestabilan antosianin dipengaruhi oleh kondisi pH dimana pada pH yang rendah akan menyebabkan antosianin lebih stabil dan kestabilannya akan terus menerus menurun dan mengalami kerusakan seiring dengan meningkatnya nilai pH.

Tabel 10. Rerata total antosianin dalam minuman probiotik sari buah murbei akibat pengaruh konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (%)	Total Antosianin (mg/l)		Penurunan
	Sebelum Fermentasi	Setelah Fermentasi	
0,10	216,18 c	213,75 c	2,43 a
0,20	194,56 b	190,82 b	3,73 ab
0,30	180,79 a	175,33 a	5,46 b

Keterangan: Angka pada kolom yang sama yang mempunyai notasi huruf yang berbeda berarti berbeda nyata pada uji BNT ($\alpha = 0,01$).

Pada pH 1 seluruh pigmen antosianin berada pada bentuk kation flavium yang

berwarna merah. Degradasi warna dari pigmen antosianin disebabkan oleh berubahnya kation flavium yang berwarna merah menjadi basa karbinol dan akhirnya menjadi kalkon yang tidak berwarna (Markakis, 1982).

Selama proses fermentasi terjadi penurunan total antosianin. Hal ini diduga karena terjadinya degradasi antosianin akibat adanya proses oksidasi. Oksidasi terjadi karena antosianin berada pada bentuk yang tidak stabil yaitu basa kuinoidal dan karbinol. Dalam medium cair, kemungkinan antosianin berada dalam empat bentuk struktur yang tergantung pH. Struktur tersebut adalah basa kuinoidal (biru), kation flavilium (merah) pH < 4, basa karbinol (tidak berwarna) pH 5,0 dan khalkone (tidak berwarna) (Von Elbe *and* Schwartz, 1996 dalam Arthey *and* Ashurst, 2001). Basa kuinoidal dan karbinol sangat tidak stabil dan oksidasi antosianin dalam makanan selama proses atau penyimpanan sangat dipengaruhi proporsi kedua basa ini (Vargas *and* Lopez, 2003). Adanya struktur yang tidak stabil tersebut memudahkan terjadi oksidasi antosianin akibat adanya oksigen dan cahaya selama proses fermentasi.

Total Gula

Total gula sesudah fermentasi mengalami penurunan. Tabel 11 menunjukkan total gula paling tinggi diperoleh pada jenis gula laktosa dan paling rendah diperoleh pada jenis gula glukosa.

Tabel 11. Rerata total gula dalam minuman probiotik sari buah murbei akibat pengaruh jenis gula

Jenis Gula (%)	Total Gula (%)		Penurunan
	Sebelum Fermentasi	Setelah Fermentasi	
Glukosa	11,01 a	4,24 a	6,77 b
Sukrosa	10,51 a	5,80 ab	4,72
Laktosa	10,64 a	6,96 b	ab
			3,68 a

Keterangan: Angka pada kolom yang sama yang mempunyai notasi huruf yang berbeda berarti berbeda nyata pada uji BNT ($\alpha = 0,01$). BNT ($\alpha=0,01$) akhir fermentasi=1,612633

Pada medium dengan jenis gula glukosa pertumbuhan *L. plantarum* paling tinggi karena glukosa merupakan gula monosakarida yang paling sederhana dan paling cepat dimetabolisme oleh *L. plantarum* menjadi asam laktat. Pada medium dengan jenis gula laktosa pertumbuhan *L. plantarum* paling rendah sehingga gula yang dirombak juga rendah dan sisa gula yang tidak digunakan ini terakumulasi menyebabkan total gula yang terukur pada akhir fermentasi lebih tinggi. Penurunan total gula yang disebabkan aktivitas mikroorganisme untuk berkembang biak dan merombak gula sebagai sumber C menjadi asam laktat. Akibatnya total gula menurun sementara total asam meningkat.

Total N

Total N sesudah fermentasi mengalami penurunan. Tabel 12 menunjukkan sisa total N paling tinggi diperoleh pada konsentrasi $(NH_4)_2HPO_4$ 0,3% dan paling rendah pada konsentrasi $(NH_4)_2HPO_4$ 0,1%.

Selama proses fermentasi bakteri asam laktat mempunyai batasan optimum untuk dapat merombak $(NH_4)_2HPO_4$ menjadi sumber energi berupa sumber N dan P dalam pertumbuhan dan perkembangan sel, sehingga tidak semua $(NH_4)_2HPO_4$ yang ditambahkan dirombak sebagai sumber energi dan terdapat $(NH_4)_2HPO_4$ sisa.

Tabel 12. Rerata total N dalam minuman probiotik sari buah murbei akibat pengaruh konsentrasi $(NH_4)_2HPO_4$

Konsentrasi $(NH_4)_2HPO_4$ (%)	Total N (%)		Penu-runan
	Sebelum Fermentasi	Setelah Fermentasi	
0,10	0,0642 a	0,0128 a	0,0514a
0,20	0,0858 b	0,0219 b	0,0639b
0,30	0,1057 c	0,0434 c	0,0623c

Keterangan: Angka pada kolom yang sama yang mempunyai notasi huruf yang berbeda berarti berbeda nyata pada uji BNT ($\alpha = 0,05$). BNT ($\alpha=0,01$) akhir fermentasi=0,007631

Pada konsentrasi $(NH_4)_2HPO_4$ 0,3%, pertumbuhan *L. plantarum* paling rendah sehingga N yang dirombak sebagai

sumber energi juga rendah. Sisa N yang tidak digunakan ini terakumulasi menyebabkan total N yang terukur pada akhir fermentasi lebih tinggi. Menurut Jay (1996) karbon dan nitrogen merupakan sumber energi utama bagi mikroorganisme untuk pertumbuhan dan perkembangan sel.

Analisis Fisik Minuman Probiotik Sari Buah Murbei

Warna L* (kecerahan)

Hasil analisis warna L* (kecerahan) medium sari murbei sebelum fermentasi berkisar antara 22,80 sampai 24,03). Setelah fermentasi hasil pembacaan warna L* minuman probiotik sari buah murbei berkisar antara 23,13 sampai 24,20.

Tabel 13. Rerata total padatan terlarut dalam minuman probiotik sari buah murbei akibat pengaruh konsentrasi $(NH_4)_2HPO_4$

Konsentrasi $(NH_4)_2HPO_4$ (%)	Warna L*		Penu-runan
	Sebelum Fermentasi	Setelah Fermentasi	
0,10	24,00 c	24,17 c	0,17 a
0,20	23,49 b	23,73 b	0,24 a
0,30	22,90 a	23,19 a	0,29 a

Keterangan: Angka pada kolom yang sama yang mempunyai notasi huruf yang berbeda berarti berbeda nyata pada uji BNT ($\alpha=0,01$) akhir fermentasi=0,124648

Antosianin adalah senyawa yang bersifat amfoter, yaitu memiliki kemampuan untuk bereaksi baik dengan asam maupun basa. Dalam media asam, antosianin berwarna merah seperti halnya dalam vakuola sel dan berubah menjadi ungu dan biru jika media bertambah basa. Perubahan warna karena perubahan kondisi lingkungan ini tergantung dari gugus yang terikat pada struktur dasar dan posisi ikatannya.

Warna a*

Rerata warna a* (merah) medium sari buah murbei sebelum fermentasi adalah 6,93 sampai 8,97. Setelah fermentasi warna a* (merah) minuman

probiotik sari buah murbei menjadi 7,10 sampai 9,13.

Warna buah murbei sangat dipengaruhi oleh kandungan pigmen anthosianin yang ada di dalam daging. Secara fisik antosianin adalah kelompok pigmen yang menyebabkan warna kemerah-merahan dan larut dalam air, letaknya didalam cairan sel (Fennema, 1996). Dengan semakin meningkatnya konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ warna merah akan semakin memudar. Hal ini disebabkan karena pH awal medium fermentasi meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Dengan meningkatnya pH medium maka stabilitas antosianin menurun, sehingga terjadi perubahan warna.

Tabel 14. Rerata warna a* dalam minuman probiotik sari buah murbei akibat pengaruh jenis gula

Konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (%)	Warna a*		Peningkatan
	Sebelum Fermentasi	Setelah Fermentasi	
0,10	8,87 c	9,04 c	0,18 a
0,20	8,07 b	8,13 b	0,16 a
0,30	6,94 a	7,11 a	0,15 a

Keterangan: Angka pada kolom yang sama yang mempunyai notasi huruf yang berbeda berarti berbeda nyata pada uji BNT ($\alpha=0,01$). BNT ($\alpha=0,01$) akhir fermentasi=0,278248

Menurut Vargas and Lopez (2003) pigmen antosianin sangat dipengaruhi oleh pH dimana dalam suatu larutan kestabilan strukturnya bisa berwarna sampai tidak berwarna. Bentuk kation (ion flavilium) yang berwarna merah, stabil pada pH rendah dan kestabilannya berubah menjadi tidak berwarna jika pH meningkat menuju pH netral. Beberapa antosianin berwarna merah dalam larutan asam, ungu jika berada dalam larutan netral dan biru dalam larutan alkali. Kebanyakan antosianin sangat berwarna pada $\text{pH} < 4$.

Warna b*

Tingkat warna b* mempunyai kisaran sekitar -100 sampai +100, nilai (+) menunjukkan intensitas warna

kuning, sedangkan (-) menunjukkan intensitas warna biru.

Tabel 15 menunjukkan bahwa derajat merah (b+) tertinggi diperoleh dari konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,30%. Hal tersebut diduga karena semakin tinggi konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,30%, semakin meningkat pH, sehingga semakin banyak antosianin yang hilang dan rusak, sehingga nilai derajat merahnya semakin turun dan derajat nilai kuningnya semakin meningkat.

Tabel 15. Rerata warna b* dalam minuman probiotik sari buah murbei akibat pengaruh konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (%)	Warna b*		Penu-runan
	Sebelum Fermentasi	Setelah Fermentasi	
0,10	8,83	8,66 a	0,18 a
0,20	9,06	8,87 b	0,17 a
0,30	9,24	9,09 c	0,16 a

Keterangan: Angka pada kolom yang sama yang mempunyai notasi huruf berbeda berarti berbeda nyata pada uji BNT ($\alpha=0,01$). BNT ($\alpha=0,01$) akhir fermentasi=0,142398172

Perlakuan Terbaik

Perlakuan terbaik diperoleh dari jenis gula laktosa dan konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,20% dengan karakteristik mikrobiologis, kimia, dan fisik sebagai berikut: dengan nilai total bakteri asam laktat (*Lactobacillus plantarum* B2) $7,28 \times 10^8$ cfu/ml, total eksopolisakarida kasar 2105 mg/l, total asam 0,54%, total gula 6,61%, pH 4,33, total N 0,0209%, total antosianin 190,73 mg/l, tingkat kecerahan (L^*) 23,73, tingkat kemerahan (a^*) 8,40, dan tingkat kekuningan (b^*) 8,90.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan perlakuan perbedaan jenis gula berpengaruh sangat nyata ($\alpha=0,01$) terhadap parameter jumlah sel *L. plantarum* B2, eksopolisakarida kasar, total asam, pH, dan total. Konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ berpengaruh sangat nyata ($\alpha=0,01$) terhadap jumlah sel *L. plantarum* B2, eksopolisakarida kasar, total

antosianin, total asam, pH, total N, dan warna (L^* , a^* , b^*). Minuman probiotik sari buah murbei dengan jenis gula laktosa dan konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,20% merupakan perlakuan terbaik secara fisik, kimia, dan mikrobiologis.

DAFTAR PUSTAKA

- Arthey, D and P.R., Ashurst. 2001. Fruit Processing, Nutrition, Product, and Quality Management. 2nd Edition. An Aspen Publication, Maryland
- Departemen Kehutanan. 2001. Keadaan Persuteraan Alam di Indonesia. <http://www.bi.go.id/sipuk/Im/ind/ulat/Sutera/pendahuluan.htm>. Tanggal akses 20 September 2006
- Fardiaz, S. 2003. Mikrobiologi Pangan. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta
- Fennema. O. R. 1996. Food Chemistry. Marcel Dekker, Inc. New York
- Giusti, M. M. and R. E. Wrolstad. 2000. Characterizations and Measurement of Anthocianins by UV-Visible Spectroscopy. John Willey and Sons, inc. <http://www.Org/masterly/fac/sample.Htm>.
- Harrah, T., B. Panilaitis, and D. Kaplan. 2006. Microbial Exopolysaccharides. <http://www.jds.fass.org/cgi/content/full.html>. Tanggal akses 23 Agustus 2006
- Helferich, W. and Westhoff. 1980. All About Yoghurt. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey
- Jay, J. M. 1992. Modern Food Microbiology. Chapman and Hall. New York
- Markakis, P. 1982. Anthocyanins as Food Colours. Academic Press. America
- Muchtadi, T., dan Sugiono. 1992. Petunjuk Laboratorium Teknologi Pengolahan Pangan Nabati. PAU Pangan dan Gizi IPB, Bogor
- Oberman and Libudzisz. 1998. Fermented Milks. Elsevier Applied Science Publishing, New York
- Ramadayantie, E. 2001. Pembuatan Yogurt Susu Tempe; Kajian Penambahan Susu Skim dan Air Pengekstrak Tempe Terhadap Sifat Kimia, Fisika, dan Organoleptik. Skripsi Jurusan THP - Fakultas Teknologi Pertanian-Unibraw, Malang
- Stamer, J. R. 1979. The lactic acid bacteria: microbes of diversity. Food Technology 1: 60-65
- Surono, S. 2004. Probiotik, Susu Fermentasi dan Kesehatan. YAPMMI, Jakarta.
- Sutherland I. W. 1998. Bacterial Exopolysaccharides. <http://www.blackwell-synergy.com/doi/full/10.html>. Tanggal akses 23 Agustus 2006
- Tallon, R., P. Bressollier, and M. C. Urdaci. 2006. Isolation and Characterization of Two Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. <http://pasteur.fontismedia.com/infiles.doc>. Tanggal akses 23 Agustus 2006
- Vargas, F. D. and O.P. Lopez. 2003. Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses. CRC Press, USA