

4. PEMBAHASAN

Fermentasi merupakan proses produksi makanan yang paling mudah dan sederhana. Fermentasi merupakan proses yang menggunakan mikroorganisme seperti *yeast* dan bakteri, untuk mengubah karbohidrat menjadi alkohol atau asam organik dalam kondisi anaerobik (Crawford, 2018). Pada penelitian yang sudah dilakukan, jus buah duwet difermentasi menggunakan Kultur Campuran merk “Yogourmet” dan *Lactobacillus pentosus* LLA18. Kultur Campuran merk “Yogourmet” yang digunakan merupakan kombinasi dari bakteri *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, dan *Lactobacillus acidophilus*. Penggunaan ketiga jenis bakteri ini didasarkan pada teori Bull *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* merupakan bakteri probiotik yang sering digunakan dalam pembuatan minuman probiotik. Kedua jenis bakteri tersebut biasanya dikombinasikan dengan *Lactobacillus acidophilus*. Menurut Chockchaisawasdee & Stathopoulos (2011), pada awal fermentasi *Streptococcus thermophilus* akan mendominasi dan tumbuh lebih cepat dengan menghasilkan produk berupa asam laktat, asam asetat, asetaldehid, diasetil, dan asam format. Keberadaan asam format tersebut akan menstimulasi pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus*. *Lactobacillus bulgaricus* akan menghasilkan asam amino dan peptida yang akan digunakan oleh *Streptococcus thermophilus* untuk tumbuh. Sementara itu, penggunaan *Lactobacillus pentosus* LLA18 didasarkan pada penelitian Khuangga (2017), yang menyatakan bahwa *Lactobacillus pentosus* LLA18 merupakan bakteri probiotik dan menghasilkan aktivitas bakteriosin paling optimal pada media *whey* yang disuplementasikan dengan glukosa sebanyak 1%.

4.1. Karakteristik Fermentasi Jus Buah Duwet dengan Kultur Campuran merk “Yogourmet” dan *Lactobacillus pentosus* LLA18

Pengujian jumlah koloni bakteri asam laktat (BAL) pada penelitian ini ditentukan dengan *Total Plate Count* (TPC) dengan metode *spread plate*. Hasil dari *total plate count* yang dihitung sebagai bakteri probiotik, hanya koloni bakteri yang membentuk zona bening (Gambar 6). Zona bening pada media hanya akan terbentuk pada bakteri probiotik dan tidak akan terbentuk pada bakteri jenis lain. Hal ini karena bakteri

probiotik menghasilkan produk samping berupa asam laktat. Asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri probiotik akan bereaksi dengan CaCO_3 yang ada pada media dan membentuk kalsium laktat yang larut dalam media sehingga membentuk zona bening pada koloni bakteri probiotik yang tumbuh (Yusmarini *et al.*, 2010).

Berdasarkan Tabel 2., diketahui bahwa jus buah duwet yang difermentasi dengan Kultur Campuran merk “Yogourmet” dan *L. pentosus* LLA18 sudah memenuhi syarat minuman probiotik. Syarat sebuah produk disebut sebagai minuman probiotik adalah mikroorganisme yang ada dalam produk tersebut harus hidup dan tersedia dalam jumlah tinggi, umumnya lebih dari 10^8 - 10^9 CFU/ml sel saat dikonsumsi. Persyaratan lainnya adalah kemampuan untuk bertahan hidup di bawah kondisi ekstrim saluran pencernaan manusia (Prado *et al.*, 2008 dan Shah, 2001 dalam Kandyliis *et al.*, 2016). Pada jus buah duwet segar memiliki kandungan bakteri probiotik sebesar 1×10^3 - 4×10^3 CFU/ml. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Trias *et al.* (2008), yang menyatakan bahwa di dalam buah dan sayuran segar terdapat bakteri asam laktat. Pada jus buah duwet fermentasi dengan Kultur Campuran merk “Yogourmet”, jumlah koloni BAL tertinggi terdapat pada waktu inkubasi 24 jam, yaitu berkisar antara 3×10^7 - $4,3 \times 10^8$ CFU/ml dan jumlah koloni BAL terendah terdapat pada waktu inkubasi 48 jam, yaitu berkisar antara 1×10^7 - 2×10^7 CFU/ml. Sementara itu, pada jus buah duwet fermentasi dengan dengan *Lactobacillus pentosus* LLA18, jumlah koloni BAL tertinggi terdapat pada waktu inkubasi 24 jam, yaitu berkisar antara 2×10^8 - $1,7 \times 10^9$ CFU/ml dan jumlah koloni BAL terendah terdapat pada waktu inkubasi 48 jam, yaitu berkisar antara 1×10^7 - 4×10^7 CFU/ml.

Secara keseluruhan, jumlah koloni BAL yang difermentasikan dengan *Lactobacillus pentosus* LLA18 lebih tinggi daripada jumlah koloni BAL yang difermentasikan dengan Kultur Campuran merk “Yogourmet”. Hal ini karena, Kultur Campuran merk “Yogourmet” dan *L. pentosus* LLA18 memiliki perbedaan pH dan suhu optimum untuk pertumbuhannya. Bakteri *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, dan *Lactobacillus acidophilus* memiliki suhu 35-38°C dan pH 5-5,6 untuk pertumbuhan optimumnya (Yerlikaya, 2014). Sementara itu, *Lactobacillus pentosus* memiliki suhu 30°C dan pH 5-7,5 untuk pertumbuhan optimumnya. Akan tetapi, dalam kondisi

ekstrem hingga pH <3, bakteri *Lactobacillus pentosus* masih dapat bertahan (Daten & Ardyati, 2018).

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan diketahui bahwa pertumbuhan optimal Kultur Campuran merk “Yogourmet” dan *Lactobacillus pentosus* LLA18 pada media jus buah duwet adalah pada waktu inkubasi 24 jam. Penurunan pada waktu inkubasi 48 jam dapat terjadi karena nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri telah habis terpakai untuk pertumbuhan BAL. Selain itu, selama proses fermentasi dihasilkan produk berupa asam laktat yang akan menyebabkan terjadinya penurunan pH. pH yang terlalu asam dapat menghambat pertumbuhan BAL (Lestaringtyas *et al.*, 2017). Menurut Guevarra & Barraquio (2015), penurunan bakteri asam laktat di dalam jus dapat terjadi karena beberapa faktor, diantaranya adalah jenis *strain* yang digunakan, interaksi antara bakteri yang ada di dalam jus tersebut, produksi hidrogen peroksida, kondisi lingkungan, serta kandungan asam laktat dan asam asetat.

4.2. Karakteristik Kimiawi

Berdasarkan Tabel 4 dan Gambar 11, diketahui bahwa jus buah duwet segar yang belum mengalami fermentasi memiliki pH sebesar 3,67 yang lebih tinggi dibandingkan dengan jus buah duwet yang telah difermentasi dengan *L. pentosus* LLA18 atau Kultur Campuran merk “Yogourmet”. Menurut Sayin & Alkan (2015), proses produksi asam laktat yang dihasilkan dalam fermentasi bakteri asam laktat akan menyebabkan produk makanan yang difermentasi mengalami penurunan pH. Nilai pH akan mengalami penurunan dengan semakin lamanya waktu fermentasi. Hal ini karena selama proses fermentasi terjadi berbagai perombakan senyawa karbohidrat menjadi asam laktat (Hutkins, 2006; Salminen *et al.*, 2004). Selain asam laktat, bakteri probiotik juga dapat mengubah glukosa menjadi asam asetat, etanol, dan CO₂ sebagai produk akhirnya (Hutkins, 2006).

Kandungan gula yang ada pada jus buah duwet sesuai untuk pertumbuhan *Lactobacillus pentosus* LLA18. Hal ini didasarkan pada teori Ayyanar & Subash-Babu (2012); Jadhav *et al.* (2009); Singh *et al.* (2013), yang menyatakan bahwa kandungan gula yang

terdapat pada buah duwet adalah rafinosa, glukosa, fruktosa, manosal, sorbosa, galaktofuranosa, dan galaktosa. Sementara itu, bakteri *Lactobacillus pentosus* LLA18 menggunakan substrat berupa glukosa dan xilosa untuk menghasilkan asam laktat (Daten & Ardyati, 2018). Kesesuaian kandungan gula yang ada pada jus buah duwet sebagai media nutrisi untuk pertumbuhan *Lactobacillus pentosus* LLA18 dapat dilihat pada Tabel 4 dan Gambar 12. Berdasarkan Tabel 4 dan Gambar 12., diketahui bahwa pada jus buah duwet segar yang belum mengalami fermentasi memiliki kandungan gula sebesar 9,17% yang lebih tinggi dibandingkan dengan jus buah duwet yang telah difermentasi dengan *L. pentosus* LLA18 atau Kultur Campuran merk “Yogourmet”. Total gula (fenol-sulfat) mengalami penurunan semakin lama waktu fermentasi disebabkan oleh bakteri probiotik menggunakan gula yang ada pada jus buah duwet sebagai media pertumbuhannya dan untuk menghasilkan produk sampingnya (Kumar *et al.*, 2013).

Antioksidan merupakan molekul yang dapat menetralkan radikal bebas dengan menerima atau menyumbangkan elektron untuk menghilangkan radikal bebas reaktif yang tidak berpasangan. Molekul antioksidan dapat langsung bereaksi dengan radikal reaktif dan menghancurkannya, sehingga dihasilkan radikal bebas baru yang kurang aktif dan kurang berbahaya dibandingkan dengan radikal yang telah dinetralkan (Lü *et al.*, 2010). Berdasarkan Tabel 4 dan Gambar 13., diketahui bahwa jus buah duwet segar memiliki aktivitas antioksidan sebesar 89,87%. Kandungan antioksidan pada jus buah duwet segar sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Akhila (2014). Buah duwet memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi, yaitu sekitar 82% (Akhila, 2014), yang terdiri atas vitamin C (asam askorbat), tanin, fenol, dan antosianin (paling dominan) (Suradkar *et al.*, 2017).

Berdasarkan Tabel 4 dan Gambar 13., diketahui bahwa aktivitas antioksidan (DPPH) mengalami peningkatan pada waktu inkubasi 24 jam dan mulai mengalami penurunan pada waktu inkubasi 48 jam. Adanya peningkatan aktivitas antioksidan ini sesuai dengan penelitian sebelumnya. Pada penelitian Li *et al.* (2019) menunjukkan bahwa proses fermentasi jus apel dengan bakteri probiotik *Lactobacillus plantarum* ATCC14917 dapat meningkatkan aktivitas antioksidan (DPPH). Hal ini didukung oleh

penelitian Ibrahim *et al.*, (2014), tentang efek fermentasi bakteri asam laktat pada aktivitas antioksidan dalam teh herbal menunjukkan bahwa teh herbal yang difermentasi memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi daripada produk teh segar, yaitu antioksidan meningkat dari 45% menjadi 85%. Penelitian oleh Hartajanie *et al.* (2018), juga menyatakan bahwa fermentasi jus pare dengan bakteri *L. fermentum* B3 dapat meningkatkan aktivitas antioksidan. Adanya peningkatan aktivitas antioksidan oleh proses fermentasi ini dapat disebabkan adanya enzim β -glukosidase yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat. Keberadaan enzim β -glukosidase menyebabkan senyawa-senyawa bioaktif seperti flavonoid, fenol, dan antosianin (glikosida) terhidrolisis menjadi bentuk aglikonnya. Bentuk aglikon ini lebih mudah dicerna dan lebih berpotensi sebagai antioksidan dibandingkan dengan bentuk glikosidanya (Hur *et al.*, 2014; Michlmayr & Kneifel, 2014).

4.3. Aktivitas Antimikroba

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa jus buah duwet segar memiliki aktivitas antimikroba dalam menghambat bakteri patogen *Escherichia coli* FNCC0091, *Staphylococcus aureus* FNCC0047, dan *Salmonella thypimurium* FNCC0056. Hal ini juga didukung oleh penelitian Haque *et al.* (2017), tentang aktivitas antimikroba pada ekstrak buah Jambul (*Syzygium cumini*) dalam menghambat bakteri patogen. Dalam penelitian Haque *et al.* (2017), menyatakan bahwa pertumbuhan bakteri patogen *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, dan ETEC secara signifikan dihambat oleh jus buah duwet sebanyak 1 hingga 6 log ($p < 0,001$).

Berdasarkan Tabel 3., diketahui bahwa fermentasi pada jus buah duwet baik dengan Kultur Campuran merk “Yogourmet” dan *L. pentosus* LLA18 dalam menghambat bakteri patogen *Escherichia coli* FNCC0091, *Staphylococcus aureus* FNCC0047, dan *Salmonella thypimurium* FNCC0056 mengalami peningkatan aktivitas antimikroba seiring dengan penambahan waktu fermentasi. Hal ini karena, selama proses fermentasi dihasilkan produk berupa asam laktat, asam asetat, diasetil, asam lemak, bakteriosin, dan produk lainnya. Asam laktat, asam asetat, dan bakteriosin merupakan senyawa antimikroba yang sangat kuat (Abubakr, 2018). Asam laktat dan asam asetat yang

dihasilkan juga menyebabkan penurunan pH. Semakin lama waktu fermentasi, pH yang dihasilkan akan semakin asam. Asam yang dihasilkan oleh BAL akan berinteraksi dengan membran sel bakteri patogen sehingga menyebabkan denaturasi protein. Denaturasi protein menyebabkan kandungan sitoplasma dari bakteri mengalami kebocoran (Sharma *et al.*, 2017).

Pada jus buah duwet dengan fermentasi Kultur Campuran merk “Yogourmet” dan *Lactobacillus pentosus* LLA18 menghasilkan aktivitas antimikroba yang lebih tinggi dibandingkan dengan jus buah duwet segar. Hal ini karena selama proses fermentasi asam laktat, BAL menghasilkan berbagai senyawa antimikroba, seperti asam organik, diasetil, hidrogen peroksida, dan bakteriosin atau protein bakterisida (Lindgren & Dobrogosz, 1990 dalam O’Bryan *et al.*, 2015). Produk metabolisme BAL ini memiliki efek yang menguntungkan, yaitu memperpanjang umur simpan dan menghambat pertumbuhan organisme patogen. Asam organik yang dihasilkan diantaranya adalah asam laktat, asetat, dan asam propionat. Asam-asam organik tersebut menyebabkan lingkungan pertumbuhan menjadi sangat tidak menguntungkan bagi bakteri patogen dan bakteri pembusuk. Asam organik dianggap berfungsi sebagai antimikroba dengan mengganggu membran sel, menghambat transpor aktif, mengurangi pH intraseluler, dan menghambat berbagai fungsi metabolisme (Ricke, 2003; Ross *et al.*, 2002 dalam O’Bryan *et al.*, 2015). Asam organik memiliki cara kerja yang sangat luas dan menghambat bakteri gram positif dan gram negatif (Caplice & Fitzgerald, 1999 dalam O’Bryan *et al.*, 2015).

Berdasarkan hasil (Tabel 3), zona bening penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus* FNCC0047 lebih luas daripada *Salmonella typhimurium* FNCC0056 dan *Escherichia coli* FNCC0091. Hal ini dapat disebabkan karena *Staphylococcus aureus* FNCC0047 termasuk ke dalam golongan bakteri gram positif, sedangkan *Salmonella typhimurium* FNCC0056 dan *Escherichia coli* FNCC0091 termasuk ke dalam golongan bakteri gram negatif. Bakteri gram positif dan negatif memiliki struktur dan komposisi dinding sel yang berbeda. Bakteri gram positif memiliki dinding sel lapisan tunggal dengan kadar lipid rendah (1-4%), sedangkan bakteri gram negatif memiliki lebih banyak struktur kompleks yang terdiri dari lapisan luar tiga lapis dan kadar lipid tinggi

(11-12%). Oleh karena itu, bakteri gram negatif lebih tahan daripada bakteri gram positif (McKane & Kandel, 1996 dalam Hartayanie *et al.*, 2016). Aktivitas antimikroba yang ditunjukkan dari Kultur Campuran merk “Yogourmet” dan *L. pentosus* LLA18 berbeda terhadap berbagai jenis bakteri patogen. Ini disebabkan oleh target yang berbeda dari antimikroba, jenis, dan konsentrasi antimikroba yang diproduksi oleh masing-masing BAL.

Berdasarkan Gambar 9 dan Gambar 10., diketahui bahwa jus buah duwet segar, dan fermentasi dengan Kultur Campuran merk “Yogourmet”, serta *L. pentosus* LLA18 yang telah dinetralisasi tidak menghasilkan zona bening pada sekeliling sumur. Proses netralisasi dilakukan dengan meningkatkan nilai pH sampel hingga mencapai pH 6. Tujuan dari netralisasi ini adalah untuk menghilangkan efek antimikroba dari asam organik. Hilangnya efek antimikroba menunjukkan bahwa zona bening yang terbentuk disekitar sumur merupakan efek bakteriosin (Thirumurugan *et al.*, 2015). Sampel netralisasi yang tidak membentuk zona bening tersebut menunjukkan bahwa sampel tersebut tidak memproduksi bakteriosin. Bakteriosin merupakan senyawa protein yang dikeluarkan oleh bakteri asam laktat yang memiliki sifat antimikroba (De Vuyst & Leroy, 2007). Ada beberapa faktor yang menyebabkan tidak tersedianya senyawa bakteriosin diantaranya pengaturan pH dan suhu yang tidak sesuai. Menurut De Vuyst & Leroy (2007) menyatakan bahwa bakteriosin dapat diproduksi pada pH 5-5,6 dengan suhu sedikit lebih rendah dari suhu pertumbuhan optimal.

4.4. Analisis Sensori

Berdasarkan Gambar 5., dapat dilihat bahwa semakin lamanya waktu fermentasi terjadi, maka perubahan warna yang terjadi akan semakin cerah, yaitu perubahan warna dari merah gelap menjadi merah lebih cerah. Perubahan warna yang terjadi dapat disebabkan karena penurunan pH selama proses fermentasi sehingga antosianin pada jus buah duwet mengalami perubahan warna (Tabel 4). Hal ini sesuai dengan teori Mahmudatussa'adah *et al.* (2015), yang menyatakan bahwa ekstrak antosianin ubi jalar ungu pada pH 1-3 berubah warna menjadi merah. Selain itu, antosianin juga dapat berfungsi sebagai indikator pH. Dari segi aroma, aroma asam yang dihasilkan semakin

kuat dengan semakin lamanya waktu fermentasi. Semakin kuatnya aroma asam ini dapat disebabkan karena selama proses fermentasi dihasilkan produk-produk samping berupa asam-asam organik, seperti asam laktat, asetat, dan asam propionat. Hal ini sesuai dengan teori Crawford (2018), yang menyatakan bahwa fermentasi asam laktat mengubah laktosa menjadi asam laktat. Hal ini juga diperkuat dengan teori Chanprasert & Gasaluck (2011), yang menyatakan bahwa fermentasi oleh bakteri asam laktat akan menghasilkan senyawa antibakterial, seperti asam organik, hidrogen peroksida, diasetil, karbondioksida, asetaldehid, dan bakteriosin.

Hasil penilaian panelis pada Tabel 5 dan Gambar 14., dapat diketahui bahwa rata-rata panelis menunjukkan tingkat kesukaan agak suka pada parameter rasa, aroma, dan *overall*. Pada parameter rasa, aroma, dan *overall* diketahui bahwa panelis paling menyukai produk fermentasi jus buah duwet dengan *L. pentosus* LLA18 pada fermentasi ke 24 jam. Panelis menunjukkan tingkat kesukaan agak suka dapat dikarenakan rasa produk yang cukup asam melihat dari pH produk yang kurang dari pH 4 (Tabel 4). Selain itu, rata-rata panelis lebih menyukai produk jus buah duwet hasil fermentasi dibandingkan jus buah duwet segar disebabkan karena rasa *astringent* dari jus buah duwet segar. Hal ini didukung oleh teori Ayyanar & Subash-Babu (2012) yang menyatakan bahwa buah duwet memiliki kombinasi rasa sangat manis, agak asam dengan sedikit rasa *astringent*. Rasa *astringent* pada buah duwet berasal dari kandungan tanin pada buah duwet. Kandungan tanin tersebut mengalami penurunan seiring dengan proses fermentasi. Hal ini karena selama proses fermentasi bakteri menghasilkan enzim yang dapat menguraikan sebagian besar tanin menjadi molekul-molekul sederhana, seperti katekin, asam galat, dan *galliccatechins* (Shang *et al.*, 2019). Perubahan senyawa tanin menjadi komponen yang lebih sederhana tersebut menyebabkan kandungan tanin pada buah duwet mengalami penurunan sehingga rasa *astringent* yang dihasilkan berkurang. Rasa *astringent* yang berkurang tersebut menyebabkan rasa jus buah duwet fermentasi menjadi lebih disukai daripada jus buah duwet yang belum difermentasi.