



UNIVERSITAS INDONESIA

**PEMBUATAN YOGURT NABATI MELALUI
FERMENTASI SUSU KACANG MERAH (*Phaseolus vulgaris*)
MENGUNAKAN KULTUR *BACKSLOP***

SKRIPSI

**DIANA NOVIA
0706263744**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JANUARI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PEMBUATAN YOGURT NABATI MELALUI
FERMENTASI SUSU KACANG MERAH (*Phaseolus vulgaris*)
MENGUNAKAN KULTUR *BACKSLOP***

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**DIANA NOVIA
0706263744**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JANUARI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Diana Novia

NPM : 0706263744

Tanda Tangan :



Tanggal : 06 Januari 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Diana Novia
NPM : 0706263744
Program Studi : Biologi
Judul Skripsi : Pembuatan Yogurt Nabati melalui Fermentasi Susu Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris*) menggunakan Kultur *Backslop*

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si.) pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. (.....)
Penguji I : Drs. Iman Santoso, M. Phil (.....)
Penguji II : Dra. Lestari Rahayu, M. Sc. (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 06 Januari 2012

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas rahmat dan karunia yang telah diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini. Tak lupa penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Bapak Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. selaku pembimbing yang telah dengan sabar memberikan kritik, saran, ilmu dan semangat dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi ini. Skripsi ini tidak akan selesai tanpa dorongan dan dukungan dari Bapak.
2. Bapak Drs. Iman Santoso, M. Phil dan Ibu Dra. Lestari Rahayu, M. Sc. selaku penguji yang telah memberikan banyak saran untuk pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi ini.
3. Bapak Dr. rer. nat. Mufti Petala Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen dan Penasehat Akademik yang telah membimbing penulis selama kuliah di Departemen Biologi dan Ibu Dra. Nining Betawati Prihantini, M. Sc. selaku Sekretaris Departemen Biologi FMIPA UI atas perhatian dan dukungannya.
4. Ibu Sitaresmi Ismangil, M. Sc. yang telah memberi banyak dukungan dan saran untuk penelitian ini, Ibu Ariyanti Oetari, Ph. D. dan Ibu Wellyzar Sjamsuridzal, Ph. D. yang juga telah membantu penelitian ini secara tidak langsung.
5. Mama dan Papa yang tiada hentinya memberikan semangat agar dapat menyelesaikan skripsi ini. Kakakku yang tercinta yang selalu memberikan dukungan moril dan materil dalam penulisan skripsi. Serta seluruh keluarga besar di Medan dan Jakarta yang tidak dapat disebutkan satu persatu.
6. Dachniar Hajar dan Fahreza Saputra yang selalu menemani dikala suka dan duka. Bama, Estri, Virgine, Doni, Kirana, Mora, Galuh, Bregas, Rendy, dan Kenardo yang dengan setia membantu selama proses penelitian. Terima kasih atas bantuan dan dukungan kalian semua teman.
7. Pak A. Supriadi, Mbak Asri Martini, Kak Selvia, Mbak Reno, dan Mbak Dahlia, yang selalu mensupport penulis untuk menyelesaikan penelitian dan skripsi. Adik asuhku Grand dan Michele.

8. Teman-teman BLOSSOM yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang telah mengajari arti sebuah persahabatan, yang selalu memberikan pelukan dikala duka, yang selalu membuat bahagia dikala berkumpul bersama, dan yang telah menjadi keluarga kedua. *“Friends Are Like Four Leaf Clover, Hard To Find But Lucky To Have”*.
9. Sahabat-sahabat SIGMA-B UI yang telah memberikan pengalaman-pengalaman petualang serta keceriaan-keceriaan yang tak dapat terlupakan selama di Departemen Biologi. Haikal, Lulu, Januar, Ratih Rimayanti, Niki, Muhammad Taufik Aulia, Kak Heri, Kak Dhamar, Kak Doni Sulistiono, Kak Archimedes, Kak Toni, Kak Chirsty, Kak Tina, Kak Pandu, Kak Pingkan, Kak Poertis, Kak Wanda, Anargha, Yuan, Widi, Idham, Septi, Aulia, Divo, Puteri Hapsari, dan lainnya yang tidak dapat disebutkan satu persatu.
10. Sahabat-sahabatku tercinta Nicholas Putrasia, Livinsia Yaputri, Evilina Sinaga, Tiomaida Sitorus, Mike, Jonathan Fritz, dan Handy Azwindy yang tak pernah berhenti memberikan semangat untuk penulis agar dapat menyelesaikan skripsi ini.

Akhir kata, semoga skripsi ini dapat berguna bagi pembaca dan ilmu pengetahuan.

Penulis
2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Diana Novia

NPM : 0706263744

Program Studi : S1

Departemen : Biologi

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Pembuatan Yogurt Nabati melalui Fermentasi

Susu Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris*) menggunakan Kultur *Backslop*

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 06 Januari 2012

Yang menyatakan



(Diana Novia)

ABSTRAK

Nama : Diana Novia
Program Studi : Biologi
Judul : Pembuatan Yogurt Nabati melalui Fermentasi Susu Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris*) menggunakan Kultur *Backslop*

Penelitian bertujuan untuk menghasilkan produk yogurt nabati hasil fermentasi susu kacang merah menggunakan kultur *backslop*. Kultur *backslop* yang digunakan sebanyak 15% (v/v) berasal dari produk BioYogurt, inkubasi dilakukan selama 48 jam pada suhu 38° C. Analisis produk fermentasi meliputi perhitungan jumlah bakteri asam laktat, kadar protein, total asam, pH dan uji organoleptik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada akhir fermentasi jumlah bakteri asam laktat adalah 7,64 log CFU/ml, kadar protein adalah 14,89 mg/ml, kadar total asam adalah 1,6%, pH adalah 4,00 dan tingkat kesukaan panelis terhadap produk adalah *moderate*.

Kata kunci : *backslop*, fermentasi, kacang merah, organoleptik, yogurt

xiii + 55 hal; 11 lampiran; 12 gambar; 5 tabel.

Bibliografi : 77 (1944--2011)

ABSTRACT

Name : Diana Novia
Study Program : Biology
Title : Production of Natural Yogurt from Red Bean
(*Phaseolus vulgaris*) Milk Fermentation by using
Backslop Culture

The research aims to produce natural yogurt products of the fermented red bean milk by backsloping. Backslop culture from BioYogurt used as much as 15% (v/v), incubation performed for 48 hours at temperature of 38° C. Analysis fermentation products included the calculation of the lactic acid bacteria amount, protein content, total acid, pH and levels of panelist's delight. The results showed that at the end of fermentation were, the number of lactic acid bacteria 7,64 log CFU/ml, protein content 14,89 mg/ml, total acid 1,6%, pH amount 4,00 and the degree of panelist's delight against the product moderate.

Keywords : backslop, fermentation, red beans, organoleptic, yoghurt

xiii + 55 pages ; 11 appendixes; 12 pictures; 5 tables.

Bibliography : 77 (1944--2011)

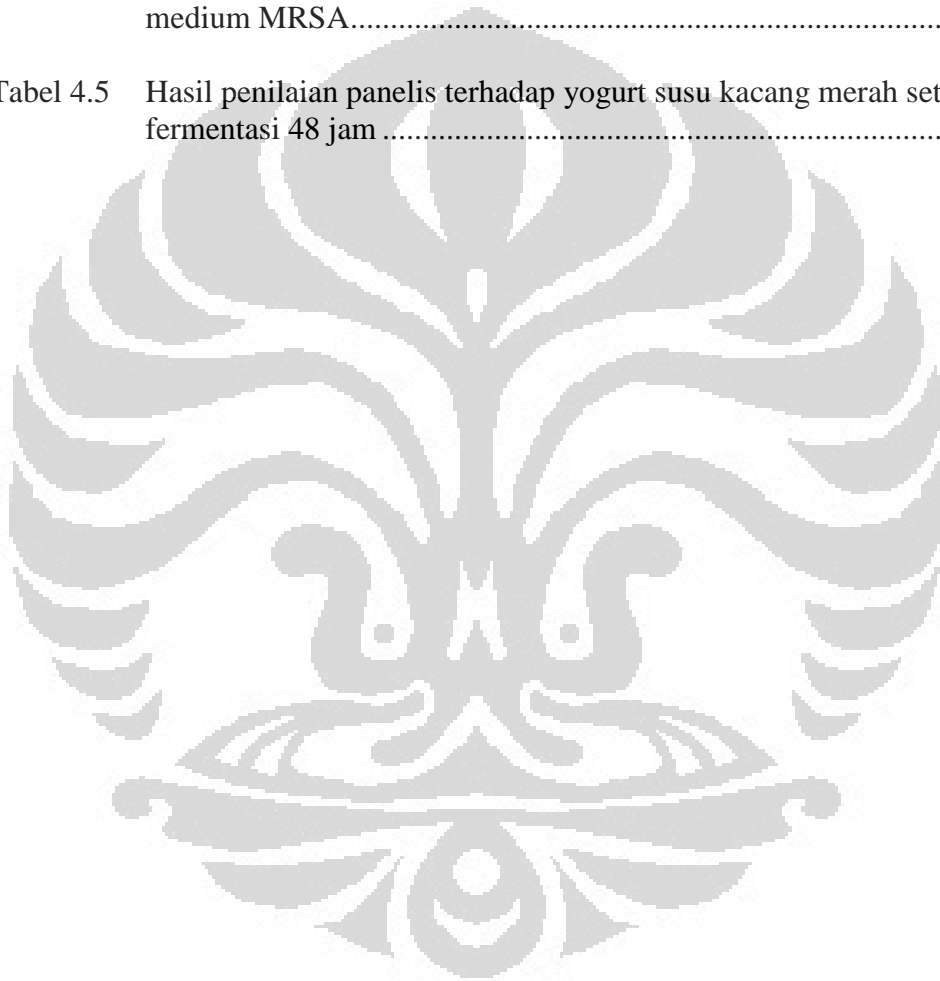
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
1. PENDAHULUAN	1
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Fermentasi	5
2.2 Bakteri Asam Laktat.....	6
2.3 Pertumbuhan bakteri.....	11
2.4 Pengaruh Faktor Lingkungan	12
2.5 Kedelai.....	14
2.6 Kacang Merah	15
2.7 Uji Organoleptik.....	17
3. METODE PENELITIAN.....	18
3.1 Lokasi dan Waktu	18
3.2 Alat Dan Bahan.....	18
3.2.1 Alat.....	18
3.2.2 Bahan	18
3.3 Cara Kerja	19
3.3.1 Pembuatan medium <i>de Man Rogosa Sharpe Broth (MRSB)</i>	19
3.3.2 Pembuatan medium <i>de Man Rogosa Sharpe Agar (MRSB)</i>	19
3.3.3 Metode isolasi	19
3.3.4 Karakterisasi bakteri	20
3.3.4.1 Pengamatan Makroskopis	20
3.3.4.2 Pengamatan Mikroskopis.....	20
3.3.5 Pembuatan kurva pertumbuhan normal bakteri	20
3.3.6 Uji Biokimia.....	21
3.3.6.1 Uji Katalase.....	21
3.3.6.2 Uji Oksidase.....	21
3.3.6.3 Uji Aerob dan Anaerob.....	21
3.3.7 Pembuatan susu kacang merah	21
3.3.8 Pembuatan <i>backslop</i>	22
3.3.9 Fermentasi susu kacang merah	22

3.3.10	Enumerasi sel bakteri.....	22
3.3.11	Pembuatan kurva standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA) ..	23
3.3.12	Pengukuran kadar protein	24
3.3.13	Standarisasi NaOH.....	24
3.3.14	Pembuatan 1% Fenolftalein	24
3.3.15	Pengukuran total asam.....	24
3.3.16	Pengukuran derajat keasaman (pH)	25
3.3.17	Uji Organoleptik	26
3.3.18	Pengolahan dan analisis data	26
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1	Isolasi Bakteri Asam Laktat	27
4.2	Kurva Pertumbuhan Bakteri	30
4.3	Kadar Protein.....	34
4.4	Total Asam Titrasi.....	35
4.5	Kadar pH	36
4.6	Uji Organoleptik.....	38
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	41
5.1	Kesimpulan	41
5.2	Saran	41
	DAFTAR REFERENSI	42
	LAMPIRAN.....	50

DAFTAR TABEL

Tabel 1	Komponen nilai gizi susu kedelai dan susu sapi	3
Tabel 2.2	Jenis mikroorganisme dan contoh produk yang dihasilkan.....	8
Tabel 2.6	Komponen nilai gizi kacang merah per 100 g.....	16
Tabel 4.1	Pengamatan isolat bakteri I ₁ dan I ₂ pada suhu 44° C selama 48 Jam dan isolat I ₃ pada suhu 38° C selama 48 jam pada medium MRSA.....	29
Tabel 4.5	Hasil penilaian panelis terhadap yogurt susu kacang merah setelah fermentasi 48 jam	40



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.2(1)	Pemecahan glukosa menjadi asam laktat oleh bakteri homofermentatif melalui jalur glikolisis.....	9
Gambar 2.2(2)	<i>Streptococcus thermophilus</i>	10
Gambar 2.2(3)	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	10
Gambar 2.6	Biji kacang merah (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	16
Gambar 3.3.15	Warna merah muda yang muncul saat titrasi asam.....	25
Gambar 4.1	Hasil pengamatan morfologi isolat bakteri secara mikroskopik dengan metode Gram stain.....	28
Gambar 4.2(1)	Grafik perbandingan pertumbuhan isolat I ₁ dan I ₃ pada medium MRSB selama 48 jam pengamatan.....	31
Gambar 4.2(2)	Grafik pertumbuhan bakteri asam laktat yang berasal dari hasil fermentasi susu kacang merah diinkubasi dengan suhu 38° C selama 48 jam pada medium MRSA.....	33
Gambar 4.3	Grafik kadar protein (mg/ml) hasil fermentasi susu kacang merah dengan suhu inkubasi 38° C selama 48 jam.....	34
Gambar 4.4	Grafik persentase total asam hasil fermentasi susu kacang merah dengan suhu inkubasi 38° C selama 48 jam.....	36
Gambar 4.5(1)	Kurva penurunan kadar pH yogurt susu kacang merah selama proses fermentasi	37
Gambar 4.5(2)	Pembentukan gumpalan pada dasar dan permukaan yogurt kacang merah	38

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Skema isolasi bakteri asam laktat.....	50
Lampiran 2.	Skema pengamatan makroskopik dan mikroskopik.....	50
Lampiran 3.	Skema pembuatan kurva pertumbuhan bakteri	51
Lampiran 4.	Skema pembuatan susu kacang	51
Lampiran 5.	Skema pembuatan <i>backslop</i>	52
Lampiran 6.	Skema fermentasi susu kacang merah.....	52
Lampiran 7.	Skema perhitungan jumlah koloni bakteri	53
Lampiran 8.	Skema pembuatan kurva standar protein	53
Lampiran 9.	Skema pengukuran kadar protein.....	54
Lampiran 10.	Skema analisis total asam tertitrasi.....	54
Lampiran 11.	Contoh hasil pengisian kuisisioner oleh panelis.....	55

BAB 1

PENDAHULUAN

Fermentasi merupakan salah satu proses pengolahan makanan yang paling umum dan populer di seluruh dunia (Battcock & Azam-Ali 1998: 1). Fermentasi menjadi populer karena proses tersebut tidak hanya dapat mengubah makanan untuk menjadi lebih awet, namun juga memberikan citarasa, aroma yang enak, dan meningkatkan kandungan nutrisi makanan (Suroño 2004: 118; Farnworth 2008: 2). Dua kunci utama dalam fermentasi adalah mikroorganisme dan substrat.

Mikroorganisme yang berperan dalam fermentasi sangat beraneka ragam, contohnya adalah bakteri asam laktat pada produk susu dan khamir pada produk minuman beralkohol dan roti (Bamforth 2005: 2). Fermentasi dari khamir *Saccharomyces cerevisiae* yang umum dikonsumsi adalah roti (Ray 2004: 22). Fermentasi dari *Saccharomyces cerevisiae* juga dipakai untuk menghasilkan *wine*, yaitu minuman beralkohol hasil fermentasi dari sari buah anggur (Bamforth 2005: 89--99).

Fermentasi telah digunakan selama berabad-abad sebagai proses untuk mengubah susu menjadi suatu produk untuk memperpanjang daya simpannya dan sejak lama telah dipercaya memiliki manfaat baik bagi kesehatan tubuh (Tamime & Robinson 2000: 1; Adams & Moss 2008: 320). Salah satu jenis produk fermentasi susu adalah yogurt. Yogurt merupakan produk hasil fermentasi susu oleh bakteri asam laktat dari genus *Lactobacillus* dan *Streptococcus* (Farnworth 2008: 7). Percampuran dari bakteri tersebut dapat menghasilkan citarasa dan karakteristik yang berbeda pada produk (Guerin-Danan *dkk.* 1998: 111).

Tahun 1993 Chandan & Shahani (*lihat* Yusmarini & Efendi 2004: 104) menyatakan bahwa yogurt merupakan salah satu produk makanan yang sangat populer. Yogurt dapat membantu dalam proses pencernaan, mencegah diare, mencegah peningkatan kadar kolesterol yang terlalu tinggi, bahkan dapat membantu melawan kanker. Yildiz (2010: 16) menyatakan bahwa yogurt aman untuk dikonsumsi oleh bayi berumur di atas 6 atau 9 bulan. Yogurt mengandung protein, kalsium dan vitamin yang sangat baik untuk pertumbuhan bayi.

Yogurt merupakan salah satu makanan bergizi pengganti susu. Diketahui bahwa banyak orang yang tidak dapat mengonsumsi susu segar karena

kurangnya enzim laktase pada saluran pencernaan untuk mendegradasi laktosa yang terdapat dalam susu. Ketidakmampuan tersebut disebut dengan *lactose intolerance*. Penderita *lactose intolerance* akan mengalami gangguan pencernaan apabila mengonsumsi susu segar (Scrimshaw & Murray 1988: 1079). Laktosa pada yogurt telah dipecah menjadi asam laktat sehingga tidak akan menyebabkan gangguan pencernaan pada manusia (Tamime 2006: 64--65).

Metode *backslop* merupakan salah satu metode dalam proses fermentasi skala rumah tangga. Metode tersebut menggunakan kultur dari hasil fermentasi sebelumnya. Penggunaan kultur dari hasil fermentasi sebelumnya, bertujuan untuk mempercepat proses fermentasi, mempermudah proses aplikasi, dan meningkatkan peluang keberhasilan pembuatan produk. Melalui metode *backslop*, diharapkan diperoleh produk fermentasi yang sejenis dalam waktu yang singkat. Selain metode *backslop*, metode *controlled fermentation* juga dapat digunakan dalam pembuatan produk fermentasi. Metode *controlled fermentation* pada umumnya digunakan dalam skala industri dan membutuhkan jumlah mikroorganisme murni yang banyak (Ray & Bhunia 2008: 144--145).

Kacang-kacangan dapat menjadi alternatif sumber protein bagi negara-negara berkembang (Tamime & Robinson 2000: 421). Jenis kacang yang telah banyak diolah untuk dikonsumsi saat ini adalah kacang kedelai. Susu kedelai merupakan salah satu produk olahan kacang kedelai sebagai pengganti susu sapi (Babu *dkk.* 2009: 25). Susu kedelai mempunyai nilai gizi yang mirip dengan susu sapi sehingga baik digunakan sebagai pengganti susu sapi bagi penderita *lactose intolerance* (Gandhi 2009: 19). Perbandingan komponen nilai gizi susu kedelai dengan susu sapi berdasarkan data dari Direktorat Gizi DepKes RI dapat dilihat pada Tabel 1.

Diversifikasi pengolahan pangan berbahan dasar kacang-kacangan masih sangat terbatas. Salah satu usaha diversifikasi produk kacang-kacangan adalah dengan membuat susu dari kacang-kacangan yang difermentasi sehingga menyerupai yogurt dari susu hewan (Widowati & Misgiyarta 2004: 2). Soygurt merupakan susu kacang kedelai yang telah difermentasi oleh bakteri *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus* (Yusmarini & Efendi 2004: 107). Kedua bakteri tersebut melakukan interaksi yang terbukti dapat

mempercepat proses fermentasi dibandingkan dengan fermentasi menggunakan kultur tunggal (Bamforth 2005: 169; Tamime 2006: 33).

Tabel 1. Komponen Nilai Gizi Susu Kedelai Dan Susu Sapi

Komponen	Susu kedelai (per 100ml)	Susu sapi (per 100ml)
Kalori	41 kal	61 kal
Protein	3.5 g	3.2 g
Lemak	2.5 g	3.5 g
Karbohidrat	5 g	4.3 g
Kalsium	50 mg	143 mg
Fosfor	45 g	60 g
Besi	0.7 mg	1.7 g
Vitamin A	200 SI	130 SI
Vitamin B1	0.08 mg	0.03 mg
Vitamin C	2 mg	1 mg
Air	87 g	88.33 g

[Sumber: Direktorat Gizi DepKes RI 1989: 5 & 14.]

Lin dkk. (2005: 7357) melaporkan mengkonsumsi soygurt dapat menurunkan *Total Cholesterol* (TC) dan akumulasi *Triglyceride* (TG) di hati. Namun, pemanfaatan susu kedelai masih terbatas karena bau yang kurang disenangi (langu) (Yusmarini & Efendi 2004: 104). Langu merupakan bau khas dari kacang-kacangan. Bau tersebut disebabkan oleh kerja enzim lipoksigenase pada biji kedelai. Bau langu muncul saat pengolahan yaitu setelah tercampurnya lipoksigenase dengan lemak kedelai (Yusmarini & Efendi 2004: 109).

Susu kacang kedelai dapat digunakan sebagai alternatif untuk para penderita *lactose intolerance* agar dapat mengkonsumsi susu dengan protein tinggi. Namun rasa langu yang dihasilkan dari kacang kedelai menjadi penghalang utama tidak disukainya susu nabati tersebut. Fermentasi pada susu kacang kedelai diharapkan dapat menghilangkan aroma langu, ternyata tidak berhasil dan aroma tersebut tetap melekat pada susu kacang yang telah difermentasi (Yusmarini & Efendi 2004: 109). Perlu dilakukan diversifikasi dalam pembuatan yogurt nabati agar dapat diterima oleh masyarakat.

Kacang merah umum terdapat di Indonesia dan harganya relatif terjangkau. Widowati & Misgiyarta (2004: 13) menyatakan bahwa hasil olahan kacang merah menjadi susu kacang merah memiliki cita rasa yang lebih enak

untuk dikonsumsi dibandingkan dengan susu kacang kedelai, kacang tanah, kacang hijau dan kacang tunggak. Kacang merah dapat digunakan sebagai salah satu bahan pilihan dalam pembuatan yogurt nabati karena rasanya enak dan tidak menghasilkan aroma langu. Namun, penelitian tentang fermentasi susu kacang merah masih sangat sedikit.

Pembuatan susu kacang merah hampir sama dengan pembuatan susu kacang-kacangan lain seperti susu kedelai dan susu kacang hijau (Widowati & Misgiyarta 2004: 4). Fratiwi *dkk.* (2008: 49) menyatakan bahwa fermentasi susu kacang merah memiliki rasa yang hampir sama atau tidak berbeda nyata dengan hasil fermentasi susu skim, sampai sekarang kacang merah juga belum banyak diteliti untuk diolah menjadi produk fermentasi. Oleh karena itu, penelitian penggunaan kacang merah sebagai bahan dasar pembuatan yogurt nabati perlu dieksplorasi.

Penelitian bertujuan untuk menghasilkan produk yogurt nabati dari bahan susu kacang merah hasil fermentasi dengan menggunakan kultur *backslop*. Tingkat pertumbuhan bakteri asam laktat pada substrat susu kacang merah hasil fermentasi perlu diketahui. Analisis produk yogurt susu kacang merah untuk mengetahui kadar protein, total asam, dan pH perlu dilakukan. Selain itu, tingkat kesukaan panelis dengan menggunakan uji organoleptik perlu diketahui.

Hipotesis penelitian adalah produk yogurt nabati dapat dihasilkan dari kacang merah hasil fermentasi menggunakan kultur *backslop*. Proses fermentasi akan mempengaruhi jumlah bakteri asam laktat pada substrat susu kacang merah. Proses fermentasi akan mempengaruhi kadar protein, total asam dan pH. Yogurt kacang merah diduga memiliki rasa yang unik sehingga disukai oleh panelis.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Fermentasi

Fermentasi merupakan proses perubahan kimawi, dari senyawa kompleks menjadi lebih sederhana dengan bantuan enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme (Jay *dkk.* 2005: 150). Proses tersebut akan menyebabkan terjadinya penguraian senyawa-senyawa organik untuk menghasilkan energi (Madigan *dkk.* 2011: 373). Selain itu, akan terjadi proses pengubahan substrat menjadi produk baru oleh mikroorganisme (Bourgaize *dkk.* 1999: 357).

Dua kunci utama fermentasi adalah mikroorganisme dan substrat (Bamforth 2005: 2). Mikroorganisme dan substrat yang tepat dapat menghasilkan produk fermentasi yang diinginkan. Salah satu contohnya adalah pada pembuatan *vinegar*, bakteri dari genus *Acetobacter* dipilih untuk memfermentasi substrat dari sari buah. Mikroorganisme digunakan untuk fermentasi karena mikroorganisme terbukti mudah untuk dibudidayakan, memiliki pertumbuhan yang cepat, dapat menggunakan substrat yang murah (termasuk limbah), produk yang dihasilkan beragam dan mudah untuk dimanipulasi genetiknya sehingga memungkinkan untuk menghasilkan produk baru pada industri fermentasi (Waites *dkk.* 2001: 75).

Substrat adalah materi organik yang dapat digunakan oleh mikroorganisme sebagai sumber nutrisi bagi kelangsungan hidup mikroorganisme (Gandjar *dkk.* 2006: 44). Substrat dapat berbentuk cair maupun padat. Pemilihan substrat yang tepat untuk proses fermentasi penting untuk dilakukan. Substrat yang tepat adalah substrat yang dapat memenuhi semua kebutuhan nutrisi bagi mikroorganisme yang akan dipakai (Waites *dkk.* 2001: 86).

Fermentasi dilakukan terhadap suatu bahan makanan untuk mendapatkan produk makanan baru yang dapat memperpanjang daya simpan (Farnworth 2008: 2). Aktifitas mikroorganisme pada fermentasi akan menyebabkan perubahan kadar pH dan terbentuk senyawa penghambat seperti alkohol dan bakteriosin yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme pembusuk (Waites *dkk.* 2001: 179).

Metode fermentasi produk makanan dapat dibagi menjadi 3 metode berdasarkan sumber mikroorganisme yang digunakan yaitu *natural fermentation*, *back-slopping*, dan *controlled fermentation*. *Natural fermentation* merupakan proses fermentasi yang terjadi secara spontan, melibatkan mikroorganisme *indigenous*, dan memerlukan kondisi lingkungan yang tepat. Kelemahan metode tersebut adalah membutuhkan proses yang relatif lama, produk yang dihasilkan memiliki mutu tidak stabil, kemungkinan gagal cukup tinggi, serta rentan dicemari oleh bakteri patogen (Adams & Nout 2001: 6).

Back-slopping merupakan proses fermentasi menggunakan sebagian hasil fermentasi produk sebelumnya yang diinokulasikan ke bahan baku baru. Hasil produk fermentasi sebelumnya diharapkan mengandung mikroorganisme yang dapat melakukan fermentasi pada bahan baku baru sehingga menghasilkan produk yang sejenis (Hutkins 2006: 67). Metode tersebut memiliki kelebihan yaitu proses fermentasi lebih cepat dan keberhasilan fermentasi cukup tinggi dibandingkan dengan *natural fermentation*. Kelemahan metode *back-slop* adalah apabila digunakan dalam jangka waktu yang lama, kemungkinan akan terjadi penurunan mutu produk. Selain itu, tingkat kegagalan metode tersebut cukup tinggi dibandingkan dengan *controlled fermentation* (Ray & Bhunia 2008: 144--145).

Controlled fermentation merupakan proses fermentasi dengan skala industri menggunakan *pure culture*. Kultur yang digunakan dapat berasal dari kultur tunggal (*single culture*) atau kultur campuran (*mixed culture*). Kelebihan dari metode ini adalah dapat menghasilkan produk dalam jumlah besar, produk yang dihasilkan relatif stabil, dan tingkat kegagalan serta pencemaran oleh bakteri patogen relatif rendah (Ray & Bhunia 2008: 145).

2.2 Bakteri Asam Laktat

Proses pembuatan produk susu yang difermentasi melibatkan peranan mikroorganisme. Mikroorganisme tersebut dapat berupa bakteri, khamir, kapang atau berupa kombinasi mikroorganisme tersebut (Tamime 2006: 12). Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri yang pada umumnya digunakan dalam fermentasi susu (Yildiz 2010: 98). Bakteri tersebut termasuk ke dalam bakteri Gram-positif;

berbentuk batang, *coccus* atau *coccobacilli*; dapat bertahan pada suhu 4--45° C; dan hidup pada pH 4--4,5 namun ada pula yang toleran di atas pH 9 atau di bawah pH 3,2 (Bamforth 2005: 32).

Berdasarkan produk yang dihasilkan selama fermentasi, bakteri asam laktat dibedakan menjadi homofermentatif dan heterofermentatif. Bakteri homofermentatif menghasilkan produk fermentasi tunggal yaitu asam laktat, sedangkan bakteri heterofermentatif memproduksi asam laktat dan etanol (Bamforth 2005: 21; Jay *dkk.* 2005: 151--153). Percampuran beberapa jenis mikroorganisme dapat menghasilkan cita rasa yang unik dan sampai sekarang masih terus diteliti (Yildiz 2010: 98). Berdasarkan Tamime (2006: 13), jenis-jenis bakteri yang termasuk dalam kelompok homofermentatif dan heterofermentatif dapat dilihat pada Tabel 2.2.

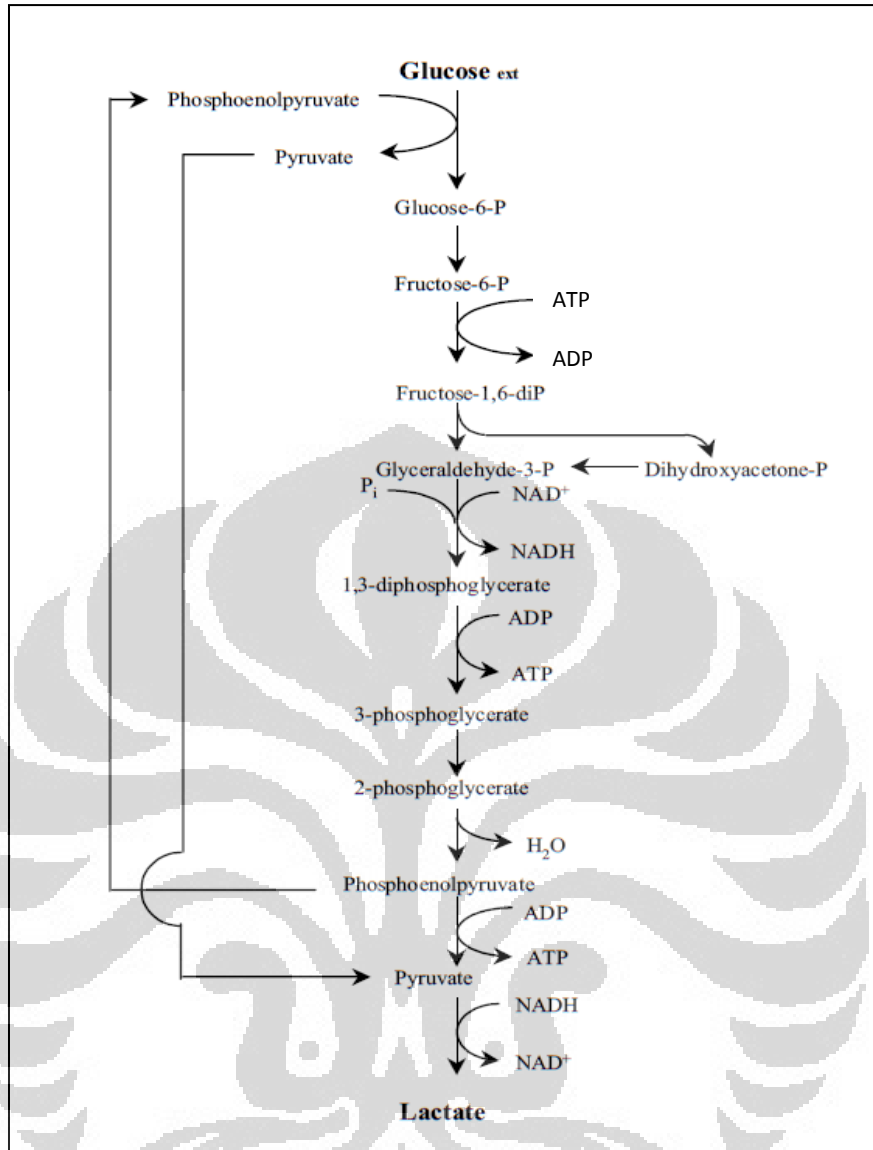
Bakteri homofermentatif akan menghasilkan asam laktat sebagai produk utama. Asam laktat tersebut merupakan hasil dari pemecahan glukosa menjadi piruvat yang kemudian diubah menjadi asam laktat melalui jalur glikolisis. Skema perubahan glukosa menjadi asam laktat melalui jalur glikolisis atau jalur Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) dapat dilihat pada Gambar 2.2(1). Bila pada suatu makanan mengandung gula disakarida seperti laktosa atau sukrosa, maka mikroorganisme akan melakukan hidrolisis gula tersebut. Laktosa akan dipecah menjadi galaktosa dan glukosa oleh enzim laktase, sedangkan sukrosa akan dipecah menjadi glukosa dan fruktosa oleh enzim sukrase (Ray & Bhunia 2008: 65).

Bakteri asam laktat yang umumnya digunakan dalam fermentasi susu antara lain berasal genus *Streptococcus* dan *Lactobacillus* (Tamime 2006: 12). Karakteristik bakteri dalam genus *Streptococcus* adalah berbentuk bulat, berukuran lebih kecil dari 2 µm, berstruktur rantai atau berpasangan, non-motil, tidak terdapat endospora, Gram positif, fakultatif anaerob, memfermentasi karbohidrat untuk menghasilkan asam laktat, katalase negatif dan tumbuh pada suhu optimum ±37° C (Gambar 2.2(2)) (Vos *dkk.* 2009: 708).

Tabel 2.2 Jenis Mikroorganisme dan Contoh Produk yang Dihasilkan

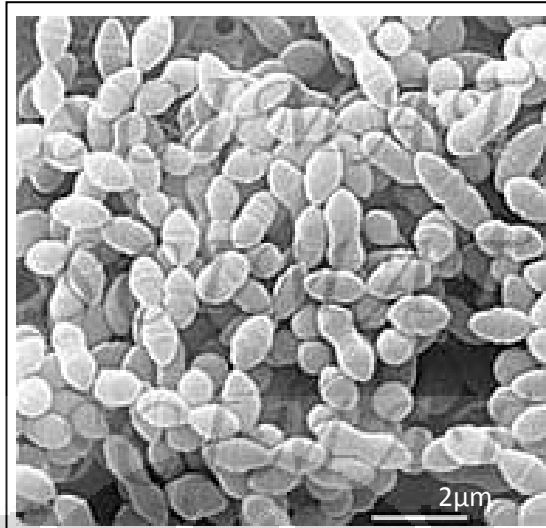
Organisme Starter	Produk Metabolisme	Fermentasi Laktosa	Contoh Produk Fermentasi Susu
I. Lactic acid bacteria			
Traditional			
<i>Lactococcus spp.</i>	L(+) laktat	Homofermentatif	<i>Buttermilk, sour cream, ymer, Nordic milks</i>
<i>Leuconostoc spp.</i>	D(-) laktat, diasetil	Heterofermentatif	<i>Buttermilk, sour cream, ymer, Nordic milks</i>
<i>Pediococcus acidilactici</i>	DL laktat	Homofermentatif	<i>Fermented milk, kefir</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	L(+) laktat, asetaldehid, diasetil	Homofermentatif	<i>Yogurt, skyr, labneh, sour cream</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii spp.</i>	D(-) laktat, asetaldehid, diasetil	Homofermentatif	<i>Yogurt, skyr, labneh</i>
Non-traditional			
<i>Lactobacillus spp.</i>	DL laktat	Homofermentatif	<i>Yogurt, kefir, buttermilk, sour cream</i>
<i>Lactobacillus spp.</i>	DL laktat	Heterofermentatif	<i>Yogurt, kefir</i>
<i>Bifi do bacterium spp.</i>	L(+) laktat, asetat	Heterofermentatif	<i>Yogurt, buttermilk, sour cream</i>
<i>Enterococcus spp.</i>	L(+) laktat	Homofermentatif	<i>Fermented milk</i>
<i>Acetobacter aceti</i> and <i>rasens</i>	Asetat, CO ₂		<i>Kefir</i>
II. Yeasts			
<i>Candida spp.</i> , <i>Saccharomyces spp.</i> , <i>Kluyveromyces spp.</i> and <i>Debaromyces spp.</i>	Ethanol, CO ₂ , aseton, amil-alkohol, propanal		<i>Skyr, kefir</i>
III. Moulds			
<i>Geotrichum candidum</i>			<i>Viili, kefir</i>

[Sumber: Tamime 2006: 13.]



Gambar 2.2(1) Pemecahan Glukosa Menjadi Asam Laktat Oleh Bakteri Homofermentatif Melalui Jalur Glikolisis

[Sumber: Tamime 2006: 17.]

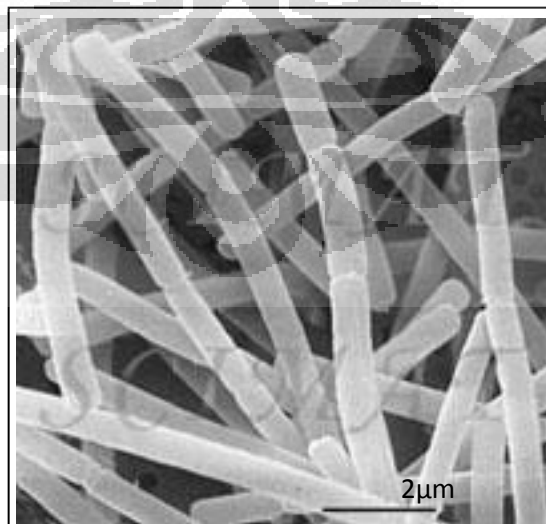


Gambar 2.2(2) *Streptococcus thermophilus*

[Sumber: SCIMAT 2007: 1.]

Taksonomi *Streptococcus* berdasarkan Vos *dkk.* (2009: 655) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Procariota
Filum : Firmicutes
Kelas : Bacilli
Ordo : Lactobacillales
Famili : Streptococcaceae
Genus : *Streptococcus*



Gambar 2.2(3) *Lactobacillus bulgaricus*

[Sumber: SCIMAT 2006: 1.]

Lactobacillus merupakan bakteri Gram positif, tidak menghasilkan spora, berbentuk batang atau dapat berupa *coccobacilli* (Gambar 2.2(3)), dan fakultatif anaerob. *Lactobacillus* tumbuh pada suhu optimum 30--40° C, dan tumbuh optimal pada pH 5,5--6,2 (Vos *dkk.* 2009: 465).

Taksonomi *Lactobacillus* berdasarkan Vos *dkk.* (2009: 464--465) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Procariota
Filum : Firmicutes
Kelas : Bacilli
Ordo : Lactobacillales
Famili : Lactobacillaceae
Genus : *Lactobacillus*

2.3 Pertumbuhan Bakteri

Bakteri yang diinokulasi ke dalam substrat baru mengalami beberapa tahap fase pertumbuhan. Penggabungan fase-fase pertumbuhan bakteri tersebut akan membentuk suatu kurva pertumbuhan. Fase-fase pertumbuhan tersebut terbagi menjadi 4 fase yaitu: fase lag, fase log, fase stasioner dan fase kematian (Perry *dkk.* 2007: 129).

Fase lag merupakan suatu fase di mana bakteri akan beradaptasi dengan mengeluarkan enzim-enzim untuk memecah substrat kompleks menjadi lebih sederhana agar dapat digunakan sebagai bahan makanan dan penghasil energi untuk membelah diri (Tamime & Robinson 2000: 622; Madigan *dkk.* 2010: 126). Fase lag dapat berlangsung dengan singkat, tetapi dapat pula membutuhkan waktu lama. Hal tersebut dapat dipengaruhi oleh medium pertumbuhan yang digunakan. Semakin kompleks suatu substrat maka semakin lama waktu yang dibutuhkan untuk menguraikannya (Jay 2005: 45; Madigan *dkk.* 2011: 1023). Ciri fase lag adalah tidak adanya penambahan jumlah bakteri (Perry *dkk.* 2002: 130).

Fase log merupakan fase ketika bakteri mulai membelah dan tumbuh (Tortora *dkk.* 2010: 173). Fase log merupakan suatu periode dimana sel berada pada kondisi optimal, sehingga pada fase tersebut terjadi pembelahan sel secara

cepat (Tamime & Robinson 2000: 622). Laju pertumbuhan pada fase log sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan (suhu dan komposisi medium) (Madigan *dkk.* 2011: 126).

Fase stasioner merupakan fase ketika jumlah sel yang dibentuk seimbang dengan jumlah sel yang mati (Tortora *dkk.* 2010: 173). Fase stasioner dapat terjadi karena keterbatasan sumber nutrisi pada substrat atau karena akumulasi produk sampingan yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Madigan *dkk.* 2011: 126). Bakteri yang telah mencapai fase stasioner akhir akan memasuki fase kematian. Ciri dari fase kematian adalah terjadinya penurunan jumlah populasi bakteri hingga mencapai tingkat yang stabil. Setelah sebagian besar bakteri mati, sebagian kecil bakteri yang bertahan hidup dapat bertahan sampai berbulan-bulan tergantung jenisnya (Brooks *dkk.* 2007: 55). Kematian bakteri pada fase kematian umumnya disertai dengan terjadinya lisis sel (Madigan *dkk.* 2011: 126).

2.4 Pengaruh Faktor Lingkungan

Faktor lingkungan berperan penting dalam keberhasilan suatu proses fermentasi. Faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme meliputi suhu, pH, A_w , dan oksigen (Madigan *dkk.* 2011: 132).

Suhu merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme saat fermentasi. Suhu dapat mempengaruhi komponen sel mikroorganisme, terutama pada enzim yang sangat mudah terdenaturasi pada suhu tinggi (Bamforth 2005: 10--15). Suhu minimum merupakan batas suhu terendah mikroorganisme masih dapat tumbuh. Suhu optimum merupakan suhu yang tepat untuk pertumbuhan optimal mikroorganisme. Suhu maksimum merupakan batas suhu tertinggi mikroorganisme masih dapat tumbuh (Brock & Madigan 1991: 321). Berdasarkan kemampuan toleransi mikroorganisme terhadap suhu, mikroorganisme dapat digolongkan menjadi 3 jenis, yaitu *thermophiles*, *psychrophiles*, dan *mesophiles*. *Thermophiles* merupakan mikroorganisme yang tumbuh pada suhu tinggi ($> 50^\circ \text{C}$), *psychrotrophiles* tumbuh pada suhu rendah ($0\text{--}7^\circ \text{C}$), dan *mesophiles* tumbuh pada suhu sedang ($30\text{--}35^\circ \text{C}$) (Spencer & Spencer 2001: 4; Bamforth 2005: 10).

Setiap mikroorganisme memiliki pH optimum untuk tumbuh (Bamforth 2005: 12). Berdasarkan toleransi terhadap pH, mikroorganisme dapat digolongkan menjadi beberapa jenis, yaitu *acidophilic* dan *alkalinophilic*. Mikroorganisme yang dapat hidup pada pH rendah disebut *acidophilic*. Beberapa mikroorganisme dikatakan *alkalinophilic* apabila dapat tumbuh pada pH tinggi (> 10) (Brock & Madigan 1991: 328).

Semua organisme memerlukan air untuk dapat hidup. Pertumbuhan mikroorganisme dipengaruhi oleh *Water activity* (A_w) di lingkungan. *Water activity* merupakan perbandingan antara tekanan uap air pada air murni dengan tekanan uap air pada larutan yang mengandung mikroorganisme (Bamforth 2005: 14). Kandungan terlarut mempengaruhi nilai A_w . Hal tersebut disebabkan oleh afinitas yang tinggi terhadap zat terlarut seperti kadar gula, garam atau substansi lain, sehingga air yang tersedia menjadi lebih sulit untuk dimanfaatkan oleh mikroorganisme (Madigan *dkk.* 2011: 141). *Halophiles* merupakan mikroorganisme yang dapat bertahan hidup pada lingkungan dengan kadar garam tinggi, *osmophiles* merupakan mikroorganisme yang dapat hidup pada lingkungan dengan kadar gula tinggi, mikroorganisme yang dapat bertahan hidup pada lingkungan kering disebut *xerophiles* (Brock & Madigan 1991: 329; Bamforth 2005: 14; Adams & Moss 2008: 40).

Mikroorganisme dapat digolongkan menjadi beberapa jenis berdasarkan perlu tidaknya oksigen. *Obligate aerobes* yaitu mikroorganisme yang mutlak memerlukan oksigen sebagai aseptor elektron terakhir. *Facultative anaerobes* yaitu mikroorganisme yang dapat menggunakan oksigen sebagai aseptor elektron terakhir namun dapat menggantinya apabila tidak terdapat oksigen. *Microaerophiles* merupakan mikroorganisme yang memerlukan oksigen namun dalam jumlah yang sedikit dan tidak melebihi 2--10% v/v. *Aerotolerant anaerobes* merupakan mikroorganisme yang tidak dapat menggunakan oksigen untuk metabolisme namun tetap dapat tumbuh pada lingkungan yang beroksigen. *Obligate anaerobes* merupakan mikroorganisme yang akan mati bila terpapar oksigen (Bamforth 2005: 14; Madigan *dkk.* 2011: 144).

2.5 Kacang Kedelai

Kacang kedelai (*Glycine max* L. Merr) merupakan salah satu jenis kacang yang paling umum dikonsumsi orang Asia (Tamang & Kailasapathy 2010: 192). Jepang merupakan salah satu negara pengimport kedelai terbesar di Asia dan lebih dari 80% digunakan untuk memproduksi makanan (Farnworth 2008: 269). *Kurosu, shoyu, miso* dan *natto* merupakan produk makanan hasil fermentasi kacang kedelai di Jepang, makanan tersebut diproduksi secara tradisional melalui fermentasi mikroorganisme (Murooka & Yamshita 2008: 791).

Farnworth (2008: 54) menyatakan bahwa produk berbahan kedelai dibutuhkan oleh konsumen yang alergi terhadap susu sapi dan yang merupakan seorang vegetarian. Kedelai juga merupakan substrat yang baik untuk pertumbuhan bakteri probiotik, namun tidak untuk *Lactobacillus bulgaricus*. Berdasarkan Bozanic *dkk.* (2011: 55), hal tersebut terjadi karena kurangnya aktivitas enzim α -galaktosidase pada *L. bulgaricus*, namun *L. bulgaricus* dapat tumbuh dengan baik pada substrat kacang kedelai apabila dicampur dengan *Streptococcus thermophilus*.

Komponen karbohidrat utama pada kacang-kacangan adalah rafinosa dan stakiosa (Tamang & Kailasapathy 2010: 341). Chang *dkk.* (2010: 110) melaporkan bahwa rafinosa dan stakiosa merupakan komponen prebiotik sehingga dapat mendukung pertumbuhan bakteri probiotik dalam yogurt kedelai. Kunaepah (2008: 2--3) menyatakan bahwa kandungan gula alami kacang yang dapat dimanfaatkan oleh mikroorganisme dalam pembuatan soygurt sangat terbatas sehingga diperlukan penambahan gula sebagai sumber karbon.

Gandhi (2009: 13) melaporkan bahwa kacang kedelai dengan ukuran yang lebih besar, lebih kaya akan protein dan mengandung minyak lebih sedikit, jenis kacang kedelai tersebut lebih banyak dijadikan tofu dan susu kedelai. Olsen *dkk.* (2004: 254) melaporkan bahwa susu kedelai yang mengandung isoflavon dapat mencegah terjadinya osteoporosis pada tulang belakang wanita yang telah menopause.

2.6 Kacang Merah

Kacang merah merupakan sumber protein yang murah untuk negara maju dan negara berkembang (Granito *dkk.* 2002: 230). Selain mengandung protein dengan kadar tinggi, kacang merah juga mengandung banyak mineral dan vitamin B (Tabel 2.6). Kacang merah merupakan sumber serat makanan (Huges 1991: 124) dan dapat mengurangi risiko penyakit jantung dan kanker usus besar (Broughton *dkk.* 2003: 61).

Kacang merah mengandung lebih dari 50% protein globulin, 30% albumin dan 30% glutein dari total protein. Komposisi asam amino dari ketiga protein tersebut adalah, albumin kaya sistin, glutein kaya metionin, dan asam glutamik terdapat pada glutein dan globulin (Baudoin & Maquet 1999: 221). Selain mengandung asam-asam amino tersebut kacang merah juga mengandung lisin yang kadarnya menurun sampai 46% pada kacang merah yang dimasak (Granito & Alvarez 2006: 1169).

Kacang merah mengandung jenis karbohidrat yang berbeda dengan susu sapi. Karbohidrat pada kacang merah terdiri dari golongan oligosakarida, sedangkan pada susu sapi merupakan laktosa (Yusmarini & Efendi 2004: 105). Reddy *dkk.* (1980 *lihat* Granito *dkk.* 2005: 128) menyatakan bahwa α -galaktosida (rafinosa, stakiosa, dan verbaskosa) dari oligosakarida diduga merupakan faktor antinutrisi yang menyebabkan perut kembung. Han & Baik (2006: 433) dan Barampama & Simard (1994: 833) melaporkan perendaman, pemasakan atau fermentasi dapat meningkatkan kadar nutrisi dari kacang merah dengan mengurai senyawa oligosakarida.

Oligosakarida merupakan salah satu jenis prebiotik. Prebiotik merupakan komponen makanan yang tidak dapat dicerna dan resistan terhadap enzim pada sistem pencernaan manusia serta dapat lolos ke usus, kemudian mengalami fermentasi sehingga menghasilkan nutrisi untuk bakteri pada usus. Penggabungan antara probiotik dengan prebiotik disebut dengan sinbiotik. Saat ini, sedang dilakukan perkembangan pembuatan produk sinbiotik berupa yogurt, yaitu dengan cara memasukkan oligosakarida ke dalam yogurt probiotik (Tamang & Kailasapathy 2010: 378--386).

Tabel 2.6 Komponen Nilai Gizi Kacang Merah Per 100 g

Komponen	Jumlah
Kalori	336 kal
Protein	23.1 g
Lemak	1.7 g
Karbohidrat	59.5 g
Kalsium	80 mg
Fosfor	400 mg
Besi	5.0 mg
Vitamin B1	0.6 mg
Air	12 g

[Sumber: Direktorat Gizi DepKes RI 1989: 5&14.]



Gambar 2.6 Biji Kacang Merah
(*Phaseolus vulgaris*)

Taksonomi kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) berdasarkan Backer & Brink (1963: 639) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Rosales
Famili : Papilionaceae
Genus : *Phaseolus*
Speseies : *Phaseolus vulgaris*

2.7 Uji Organoleptik

Penerimaan konsumen terhadap suatu produk makanan dapat dilihat dengan melakukan uji organoleptik (Rahayu 2003: 199). Uji organoleptik dapat meliputi rasa, aroma, tingkat kepedasan, dan tingkat kepahitan (Mailer & Beckingham 2006: 4). Uji organoleptik melibatkan penggunaan indera manusia (penglihatan, penciuman, sentuhan, dan pengecap) untuk mengevaluasi suatu produk makanan layak atau tidak untuk dikonsumsi (Nuka 2006: 111). Uji organoleptik bersifat subjektif dan berorientasi pada persepsi manusia (Marcuse 1944: 214). Keunggulan uji organoleptik adalah mudah untuk diaplikasikan dan biayanya relatif murah (Ubisimail 2010: 23).

Dua metode yang umumnya digunakan untuk mengevaluasi produk makanan pada uji organoleptik adalah: (1) uji kecenderungan kesukaan konsumen tidak terlatih, bertujuan untuk mengetahui tingkat kesukaan konsumen ketika diberikan suatu produk makanan; (2) Pembentukan panel dengan orang-orang yang telah terlatih, bertugas memberikan nilai terhadap sampel produk. Uji organoleptik sebaiknya dilakukan oleh orang-orang dengan kualifikasi dan terlatih dalam uji tersebut sehingga penilaian terhadap produk yang diuji bersifat objektif (Nuka 2006: 111).

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Penelitian mulai bulan Maret--Juli 2011 dan September--Desember 2011.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah lemari pendingin [Gassio], kompor listrik [Sanyo], autoklaf [Hirayama], oven [Heraeus], inkubator statis [Imperial II], blender [Philips], pemanas air [Sharp], timbangan digital [And EW-300 G], kamera digital [Canon], spektrofotometer [Optima SP-3000+], kuvet, *transfer box*, gelas Erlenmeyer, gelas *beaker*, gelas ukur, cawan petri, tabung reaksi, jarum tanam bulat (*ose*), mikropipet, *microtips* 0,2 ml, *microtips* 1 μ l, tabung ependorf, pipet, botol alkohol, spatel *Drygalski*, batang pengaduk, spatula, pembakar spiritus, labu takar, panci, kain saring (*cheesecloth*), dan botol selai.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian tersebut adalah kacang merah segar [AR], yogurt *plain* [Bio Yogurt], medium *de Man Rogosa Sharpe* (MRS) [Oxoid], agar [Britania], *Bovine Serum Albumin* (BSA) [Sigma], akuades, reagen Bradford [Sigma], fenolftalein [Merck], NaOH [Merck], kertas pH 0--14 Universalindikator [Merck], Oksidase strip test [Liofilchem], kertas tisu, alkohol, dan spiritus.

3.3 Cara Kerja

3.3.1 Pembuatan medium *de Man Rogosa Sharpe Broth* (MRSB)

Sebanyak 50 g MRS *broth* dilarutkan dalam akuades hingga volume mencapai 1.000 ml, kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga homogen. Medium disterilisasi pada autoklaf dengan suhu 121⁰ C, tekanan 2 atm, selama 15 menit (Barrow & Feltham 1993: 205).

3.3.2 Pembuatan medium *de Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA)

Sebanyak 50 g MRS ditambahkan dengan 2% agar, kemudian dilarutkan dalam akuades hingga volume mencapai 1.000 ml, kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga homogen. Medium disterilisasi pada autoklaf dengan suhu 121⁰ C, tekanan 2 atm, selama 15 menit. MRS agar kemudian dituangkan sebanyak 15--20 ml ke dalam cawan petri dan dibiarkan mengeras (Barrow & Feltham 1993: 205).

3.3.3 Metode isolasi

Bakteri diisolasi dari *yogurt plain* yang diencerkan terlebih dahulu. Sebanyak 1 g sampel diencerkan sampai 10⁵, 10⁶, dan 10⁷. Tiap pengenceran diambil sebanyak 0,1 ml untuk ditumbuhkan pada medium MRS agar. Koloni bakteri yang tumbuh pada medium MRS agar diambil dengan menggunakan ose dan diinokulasikan secara *streak* kuadran pada cawan petri yang mengandung medium MRS agar. Koloni bakteri yang terpisah diambil kembali menggunakan ose dan digoreskan secara *streak* pada medium MRS miring (Benson 2001: 85). Bakteri yang berhasil diisolasi diinkubasi pada suhu 38 dan 44° C.

3.3.4 Karakterisasi bakteri

3.3.4.1 Pengamatan Makroskopik

Koloni bakteri diinokulasi secara *streak* pada medium MRS dalam cawan petri dan diinkubasi pada suhu 38 dan 44° C. Pengamatan secara makroskopik meliputi ukuran koloni, warna koloni, bentuk koloni, tepi koloni dan permukaan koloni.

3.3.4.2 Pengamatan Mikroskopik

Pengamatan mikroskopik dilakukan dengan membuat pengecatan Gram, bentuk sel dan ukuran sel. Sebanyak 2--3 tetesan larutan Gram A (*Hucker's Crystal Violet*) ditetaskan pada olesan bakteri, kemudian dibiarkan selama 1 menit. Setelah itu olesan bakteri dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan kertas isap. Preparat kemudian ditetesi larutan Gram B (*Lugol's Iodine*) dan dibiarkan selama 1 menit. Setelah dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan, preparat ditetesi larutan larutan Gram C (alkohol aseton) selama 30 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat kemudian ditetesi larutan Gram D (safranin) selama 30 detik, dicuci dan dikeringkan. Preparat kemudian diamati di bawah mikroskop. Bakteri Gram positif akan berwarna ungu, sedangkan bakteri Gram negatif akan berwarna merah (Gandjar *dkk.* 1992: 32).

3.3.5 Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri

Isolat bakteri ditumbuhkan pada medium MRS *broth* (MRSB) dengan pH 6 dan 5, kemudian diinkubasi pada suhu 38° dan 44° C. Medium MRSB dengan pH 6 dan diinkubasi pada suhu 38° C digunakan untuk menumbuhkan bakteri diduga *Streptococcus* sedangkan medium MRSB dengan pH 5 dan diinkubasi pada suhu 44° C digunakan untuk menumbuhkan bakteri diduga *Lactobacillus*. Medium MRSB kemudian diinkubasi pada inkubator *shaker* selama 48 jam

dengan suhu berkisar antara 38--42° C. Bakteri diamati pertumbuhan koloni pada jam ke-0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, dan 48 dengan metode *Total Plate Count* (TPC).

3.3.6 Uji Biokimia

3.3.6.1 Uji katalase

Satu ose isolat bakteri yang berumur 24 jam diletakkan di atas gelas objek yang telah terdapat tetesan H₂O₂ 3%. Reaksi positif terjadi apabila terbentuk gelembung-gelembung udara.

3.3.6.2 Uji oksidase

Sebanyak satu ose bakteri diinokulasikan pada permukaan strip dan diratakan. Timbulnya warna ungu kebiruan selama kurang dari 30 detik menandakan enzim sitokrom oksidase bakteri tersebut aktif.

3.3.6.3 Uji aerob & anaerob

Isolat bakteri yang telah diamati morfologinya secara mikroskopis ditumbuhkan pada medium MRS agar (MRSa) miring. Tabung yang berisi isolat bakteri diinkubasi di dalam *anaerobic jar* pada inkubator dengan suhu 44°C untuk menguji pertumbuhan anaerob, untuk menguji pertumbuhan aerob isolat bakteri ditumbuhkan pada medium MRSa dan diinkubasi dengan suhu 44° C.

3.3.7 Pembuatan susu kacang merah

Kacang merah yang dibeli dari pasar swalayan sebanyak 1000 g direndam dalam akuades selama 8 jam dengan perbandingan kacang : akuades 1:4 (b/v). Kacang merah yang sudah direndam dibersihkan sampai bersih dan direbus dengan suhu tidak lebih dari 80° C selama 45 menit sampai kacang menjadi

setengah lunak. Kulit kacang dikupas kemudian kacang diblender sampai halus dan diberi penambahan akuades dengan perbandingan kacang : akuades 1 : 8 (b/v). Susu kacang merah disaring dengan kain saring (*cheesecloth*), ditambahkan 5% sukrosa dan dimasukkan ke dalam botol steril dengan volume 300 ml sebanyak 150 ml per botol (Kunaepah 2008: 36).

3.3.8 Pembuatan *backslop*

Backslop diambil dari yogurt *plain*. Sebanyak 15% (v/v) yogurt *plain* dimasukkan ke dalam 150 ml susu kacang merah dalam botol steril yang memiliki volume 300 ml, diinkubasi selama 24 jam pada inkubator dengan suhu 38° C sehingga dihasilkan *backslop* 1. Sebanyak 15% (v/v) *backslop* 1 dimasukkan ke dalam 150 ml susu kacang merah kemudian diinkubasi pada inkubator selama 24 jam dengan suhu 38° C untuk menghasilkan *backslop* 2, yang akan dijadikan *backslop* untuk fermentasi susu kacang merah selanjutnya (Samsumaharto & Puspawati 2008: 265).

3.3.9 Fermentasi susu kacang merah

Susu kacang merah dipanaskan pada suhu 80° C selama 15 menit, kemudian setelah dingin, sebanyak 150 ml susu kacang merah dimasukkan ke dalam botol steril yang memiliki volume 300 ml. *Backslop* 2 sebanyak 15% (v/v) diinokulasikan ke dalam susu kacang merah. Fermentasi susu kacang merah dilakukan selama 48 jam pada inkubator dengan suhu 38° C. Selama proses fermentasi dilakukan analisis meliputi enumerasi sel bakteri, kadar protein, total asam tertitrasi, dan derajat keasaman (pH). Sampel diambil pada fermentasi jam ke-0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, dan 48 (Widowati & Misgiyarta 2004: 4).

3.3.10 Enumerasi sel bakteri

Selama proses fermentasi dilakukan perhitungan jumlah bakteri asam laktat yang terdapat di dalam susu kacang merah. Metode *Total Plate Count*

(TPC) dan medium *de Man Rogosa Sharpe* (MRS) dipakai untuk menghitung jumlah bakteri yang hidup. Tortora *dkk.* (2010: 174) menyatakan bahwa metode TPC merupakan metode untuk menghitung sel bakteri hidup dengan cara menghitung koloni-koloni yang terbentuk.

Sampel diambil sebanyak 1 ml kemudian diencerkan dalam 99 ml akuades steril (10^{-2}). Kemudian diencerkan sampai 10^{-7} . Faktor pengenceran yang digunakan adalah 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7} . Setiap faktor pengenceran diambil 0,1 ml menggunakan pipet steril kemudian diinokulasikan ke dalam cawan petri berisi medium MRS agar dan diratakan dengan spatel Drygalski. Setiap seri pengenceran dibuat tiga pengulangan. Biakan diinkubasi pada inkubator dengan suhu 38°C selama 48 jam, kemudian dilakukan perhitungan jumlah koloni bakteri yang tumbuh dipermukaan medium.

Berdasarkan Gandjar *dkk.* (1992: 39--40), perhitungan jumlah koloni per ml dilakukan dengan rumus:

$$\text{Jumlah koloni per ml (CFU/ml)} = \frac{\text{jumlah koloni}}{\text{faktor pengenceran} \times \text{vol. yang diinokulasi}}$$

3.3.11 Pembuatan kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA)

Kurva standar protein dibuat dengan mengukur kadar absorbansi larutan standar BSA dengan konsentrasi 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; dan 2 $\mu\text{g/ml}$. Sebanyak 0.2 ml larutan standar ditambahkan 1 ml reagen Bradford, dihomogenkan dan diinkubasi selama 10 menit kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Selanjutnya dibuat grafik larutan standar protein (Kruger 2002: 16). Akuades digunakan sebagai blanko.

3.3.12 Pengukuran kadar protein

Sebanyak 0,2 ml sampel ditambahkan 1 ml reagen Bradford, dihomogenkan dan diinkubasi selama 10 menit kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm (Kruger 2002: 16). Akuades digunakan sebagai blanko.

3.3.13 Standarisasi NaOH

Sebanyak 0,5 g kalium ftalat ($C_6H_5KO_4$) dipanaskan pada suhu $110\text{ }^\circ\text{C}$ selama 4 jam. Kalium ftalat tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 100 l dan dilarutkan dengan akuades sampai mencapai volume 25 ml. Larutan dipanaskan hingga larut dan dibuat tiga kali ulangan. Indikator phenolphthalein ditambahkan sebanyak 2 tetes ke dalam larutan tersebut. Larutan dititiasi dengan larutan NaOH sampai timbul warna merah muda Perhitungan Molaritas NaOH menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Molaritas larutan NaOH} = \frac{\text{g kalium flalat}}{0,2042 \times \text{ml NaOH}}$$

3.3.14 Pembuatan 1% Fenolftalein

Fenolftalein ditimbang sebanyak 0,1 g, kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 150 ml. Fenolftalein dilarutkan dalam 10 ml etanol dan mulut ditutup dengan *aluminium foil*.

3.3.15 Pengukuran total asam

Sampel 10 ml dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml dan diencerkan sampai tanda tera dengan akuades. Sampel yang sudah diencerkan diambil sebanyak 5 ml dipindahkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml dan ditambahkan 2 tetes fenolftalein 1% (v/v). Titrasi dilakukan dengan menggunakan larutan NaOH 0,1 N

sampai timbul warna merah muda (Gambar 3.3.15). Total asam tertitrasi dihitung dengan rumus:

$$\text{Total asam tertitrasi} = \frac{\text{ml } 0,1 \text{ N NaOH} \times 0,009 \times 100 \times \text{Faktor Pengenceran}}{\text{ml sampel}}$$

(Misgiyarta & Widowati 2003: 5)



Gambar 3.3.15 Warna merah muda yang muncul saat titrasi asam

3.3.16 Pengukuran derajat keasaman (pH)

Pengukuran derajat keasaman menggunakan kertas pH 0--14 Universalindikator [Merck]. Kertas pH dicelupkan ke dalam sampel selama 10 detik. Setelah kertas dikeringkan selama 2 detik, dicocokkan warna dengan warna standar sehingga nilai pH dapat ditentukan.

3.3.17 Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan oleh 19 orang panelis yang tidak terlatih. Panelis dipilih secara acak dari Mahasiswa Departemen Biologi FMIPA, UI. Panelis diminta untuk menilai rasa, aroma dan tingkat kesukaan masing-masing sampel pada lembaran kuesioner yang telah disajikan, dengan kisaran nilai terendah adalah 1 (sangat tidak disukai) dan nilai tertinggi adalah 5 (sangat disukai) (Chang *dkk.* 2010: 109).

3.3.18 Pengolahan dan analisis data

Data yang dianalisis secara deskriptif dengan membuat tabulasi dan grafik. Data yang diperoleh merupakan data kuantitatif yang meliputi data hasil perhitungan koloni bakteri, data hasil pengukuran protein, data hasil perhitungan total asam, data hasil pengamatan terhadap pH, dan data hasil uji organoleptik.

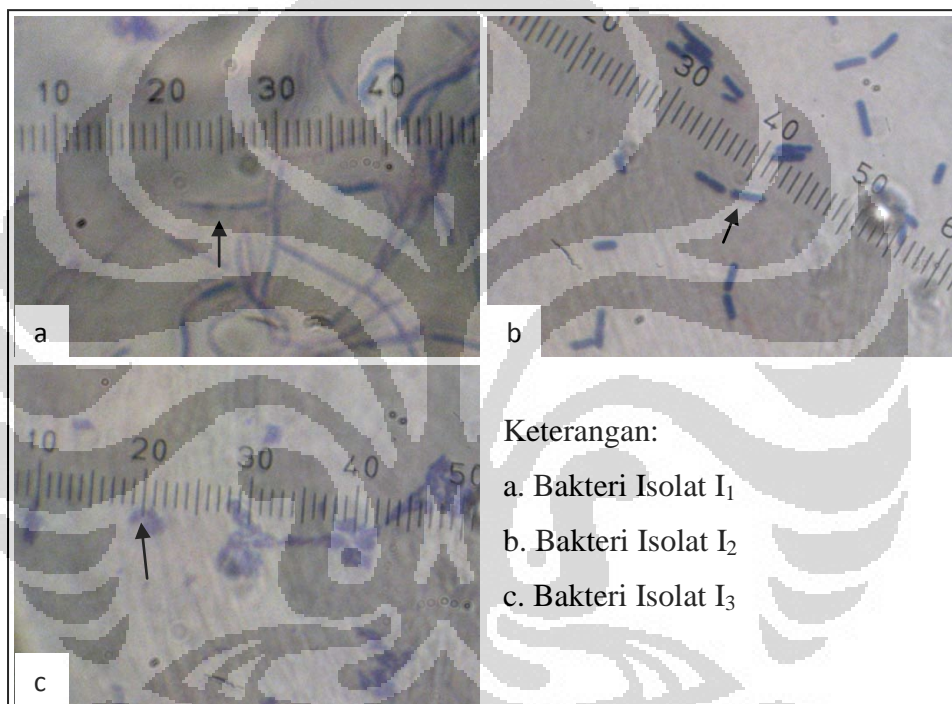
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi Bakteri Asam Laktat

Sebanyak 3 isolat bakteri asam laktat berhasil diisolasi dari *yogurt plain* (I₁, I₂, dan I₃). Isolasi bakteri asam laktat bertujuan untuk mengetahui dan memastikan genus bakteri yang terdapat pada *backslop*. Medium yang digunakan saat isolasi adalah *de Man Rogosa Sharpe* (MRS). Pemilihan medium tersebut dilakukan karena medium diduga sesuai untuk pertumbuhan bakteri asam laktat yang berasal dari *backslop*. Zahoor *dkk.* (2003: 47) menyatakan bahwa MRS merupakan medium yang paling umum digunakan untuk menumbuhkan bakteri asam laktat, meliputi genus: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, dan *Leuconoctoc*. Atlas (2010: 1231) menyatakan bahwa MRS mengandung berbagai nutrisi, meliputi karbon, nitrogen, vitamin, dan mineral yang menunjang pertumbuhan bakteri asam laktat. Berdasarkan Becton, Dickison & Company (2003: 1), medium MRS mengandung sodium asetat dan amonium sitrat yang berfungsi sebagai inhibitor untuk bakteri selain *Lactobacillus*. Selain itu, sodium asetat berfungsi sebagai *buffer* sehingga pH yang rendah dapat dipertahankan. Kadar pH yang rendah tersebut tidak dapat ditoleransi oleh mikroorganisme selain *Lactobacillus*.

Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang pada umumnya menyukai suasana asam untuk dapat tumbuh. Oleh sebab itu, pembuatan medium dengan pH yang sesuai perlu dilakukan. Medium *de Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA) yang diasamkan sampai pH 5 diduga dapat digunakan untuk menumbuhkan genus *Lactobacillus*. Medium MRSA tanpa pengasaman diduga dapat digunakan untuk menumbuhkan genus *Streptococcus*. Berdasarkan Hutkins & Nannen (1993: 2354--2355), *Lactobacillus* memiliki pH maksimum untuk tumbuh 5,8 sedangkan *Streptococcus* memiliki pH maksimum 7,5 untuk dapat tumbuh. Saccaro *dkk.* (2011: 3903) melaporkan bahwa tidak terdapat pertumbuhan *Lactobacillus* pada medium MRSA dengan pH 6,2 tetapi pertumbuhan terlihat pada medium dengan pH 5,2.

Suhu juga merupakan faktor penting dalam pertumbuhan bakteri. Suhu inkubasi bakteri yang tidak sesuai diduga dapat menyebabkan pertumbuhan bakteri menjadi terhambat. Medium yang berisi bakteri *Streptococcus* diinkubasi pada suhu 38° C sedangkan medium yang mengandung bakteri *Lactobacillus* diinkubasi pada suhu 44° C. Pemilihan kedua suhu tersebut didasarkan pada Heller (2001: 376S). Heller (2001: 376S) menyatakan bahwa suhu optimum untuk pertumbuhan *S. thermophilus* adalah 40° C, sedangkan suhu optimum untuk pertumbuhan *L. bulgaricus* adalah 45° C.



Gambar 4.1 Hasil Pengamatan Morfologi Isolat Bakteri Secara Mikroskopik dengan Metode Gram Stain

Pengamatan morfologi isolat dilakukan untuk mendeskripsikan karakter bakteri tersebut. Hasil pengamatan isolat I₁ dan I₂ dapat dilihat pada Tabel 4.1. Isolat I₁ dan I₂ diinkubasi pada suhu 44° C selama 48 jam. Hasil pengamatan isolat I₁ dan I₂ secara mikroskopik menunjukkan bahwa isolat bakteri berbentuk batang, Gram positif, struktur membentuk rantai, bersifat non-motil, dan hanya tumbuh pada medium MRS pada suasana asam (pH 5). Isolat I₁ berukuran 5--9 µm (Gambar 4.1a), sedangkan isolat I₂ berukuran 3--4 µm (Gambar 4.1b).

Tabel 4.1. Hasil Pengamatan Isolat Bakteri I₁ dan I₂ pada Suhu 44° C Selama 48 Jam dan Isolat I₃ pada Suhu 38° C Selama 48 Jam pada Medium MRSA

	Isolat		
	I ₁	I ₂	I ₃
a. Pengamatan secara Mikroskopik			
Bentuk	Batang	Batang	Bulat
Pengecatan Gram	+	+	+
Ukuran sel (µm)	5--9x0,5	3--4x1	1
Motilitas	√	√	√
b. Pengamatan secara Makroskopik			
Ukuran koloni (mm)	1,5--2,0	1,5--2,0	0,5
Bentuk koloni	<i>irregular</i>	<i>irregular</i>	<i>irregular</i>
Tepi koloni	<i>entire</i>	<i>entire</i>	<i>entire</i>
Permukaan koloni	<i>convex</i>	<i>convex</i>	<i>convex</i>
Warna koloni	putih	putih	Putih
c. Uji Biokimia			
Katalase	-	-	-
Oksidase	-	-	-
Tumbuh aerob	√	√	√
Tumbuh anaerob	√	√	√

Keterangan: √ = ada

- = tidak ada

+ = Gram positif

Pengamatan secara makroskopik menunjukkan bahwa isolat I₁ dan I₂ memiliki ukuran diameter koloni 1,5--2,0 mm, katalase negatif, oksidase negatif, warna koloni putih, *irregular*, *entire*, dan *convex*. Berdasarkan hasil pengamatan morfologi tersebut, diduga bakteri I₁ dan I₂ berasal dari genus *Lactobacillus*. Hasil pengamatan morfologi yang dilakukan sesuai dengan deskripsi *Lactobacillus* yang dilakukan Vos *dkk.* (2009: 465) dan Sameen *dkk.* (2010: 233). Vos *dkk.* (2009: 465) menyatakan bahwa *Lactobacillus* memiliki sel berbentuk batang, dengan ukuran bervariasi, pada umumnya membentuk rantai, bersifat non-motil, merupakan Gram positif, uji katalase negatif, uji oksidase negatif dan dapat hidup

pada kondisi aerob maupun anaerob. Berdasarkan Sameen *dkk.* (2010: 233), *Lactobacillus* yang diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37° C di medium MRS dapat hidup pada kondisi aerob maupun anaerob, memiliki ukuran koloni 1,5--2,0 mm, *convex*, dan *entire*.

Hasil pengamatan isolat I₃ dapat dilihat pada Tabel 4.1. Isolat bakteri I₃ ditumbuhkan pada medium MRSA dengan suhu inkubasi 38 °C selama 48 jam. Hasil pengamatan morfologi isolat I₃ menunjukkan bahwa ukuran diameter koloni 0,5 mm, uji katalase negatif, uji oksidase negatif, dapat hidup pada kondisi aerob maupun anaerob, berwarna putih, *irregular*, *entire*, dan *convex*. Hasil pengamatan morfologi secara mikroskopis isolat I₃ dapat dilihat pada Gambar 4.1c. Hasil pengamatan morfologi menunjukkan bahwa bakteri berbentuk bulat, Gram positif, membentuk struktur rantai, dan non-motil. Berdasarkan hasil pengamatan morfologi tersebut, diduga bakteri I₃ berasal dari genus *Streptococcus*.

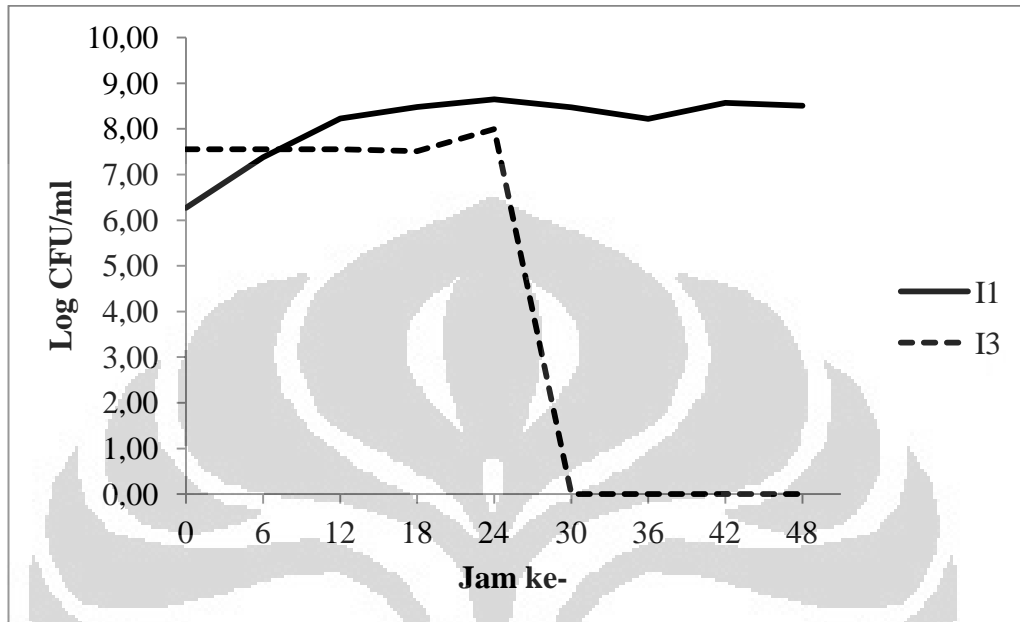
Hasil pengamatan morfologi yang dilakukan sesuai dengan deskripsi bakteri *Streptococcus* berdasarkan Barrow & Feltham (1993: 59), Vos *dkk.* (2009: 656), dan Sameen *dkk.* (2010: 233). Barrow & Feltham (1993: 59) menyatakan bahwa *Streptococcus* memiliki ciri Gram positif, berbentuk bulat (*coccus*), dan non-motil. Vos *dkk.* (2009: 656) menyatakan bahwa koloni *Streptococcus* berukuran 0,5-1,0 mm setelah 24 jam inkubasi pada suhu 37 °C dan dapat hidup pada kondisi anaerob maupun aerob.

Berdasarkan Tomi (komunikasi pribadi, 30 November 2011), diketahui bahwa BioYoghurt yang digunakan sebagai *backstop* mengandung 3 jenis bakteri asam laktat, yaitu *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* dan *Lactobacillus acidophilus*.

4.2 Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pembuatan kurva pertumbuhan bertujuan untuk mengukur perubahan jumlah isolat bakteri I₁ dan I₃ yang ditumbuhkan pada medium MRSB selama 48 jam. Perbandingan pertumbuhan isolat bakteri I₁ dan I₃ dapat dilihat pada Gambar 4.2(1). Setelah inkubasi 24 jam, isolat bakteri I₃ tidak dapat hidup, hal tersebut diduga karena bakteri tersebut membentuk asam. Asam yang terbentuk

menyebabkan terjadinya penurunan kadar pH medium dari 6 menjadi 4,5 setelah 48 jam fermentasi. Pembentukan asam sehingga menyebabkan kadar pH menjadi rendah diduga merupakan penghambat pertumbuhan isolat I₃ pada medium MRS.



Gambar 4.2(1) Grafik Perbandingan Pertumbuhan Isolat I₁ dan I₃ pada Medium MRSB Selama 48 Jam Pengamatan

Berdasarkan Guss & Delwiche (1954: 715), pada akhir inkubasi (48 jam) pertumbuhan *Streptococcus* pada medium hanya meningkat sedikit dan terjadi penurunan kadar pH menjadi 4,4. Proses fermentasi menjadi penghambat pertumbuhan *Streptococcus*, pemanfaatan medium menyebabkan pembentukan asam yang merupakan faktor penyebab berhentinya pertumbuhan.

CondaLab(a) (2010: 1) melaporkan bahwa medium MRS mengandung amonium sitrat yang pada kadar pH rendah dapat menjadi penghambat pertumbuhan bakteri lain selain bakteri dari genus *Lactobacillus*. Medium MRS juga mengandung sodium asetat yang akan mempertahankan suasana asam pada medium. Gabungan dari kedua komponen tersebut menjadikan medium MRS dapat digolongkan menjadi medium selektif.

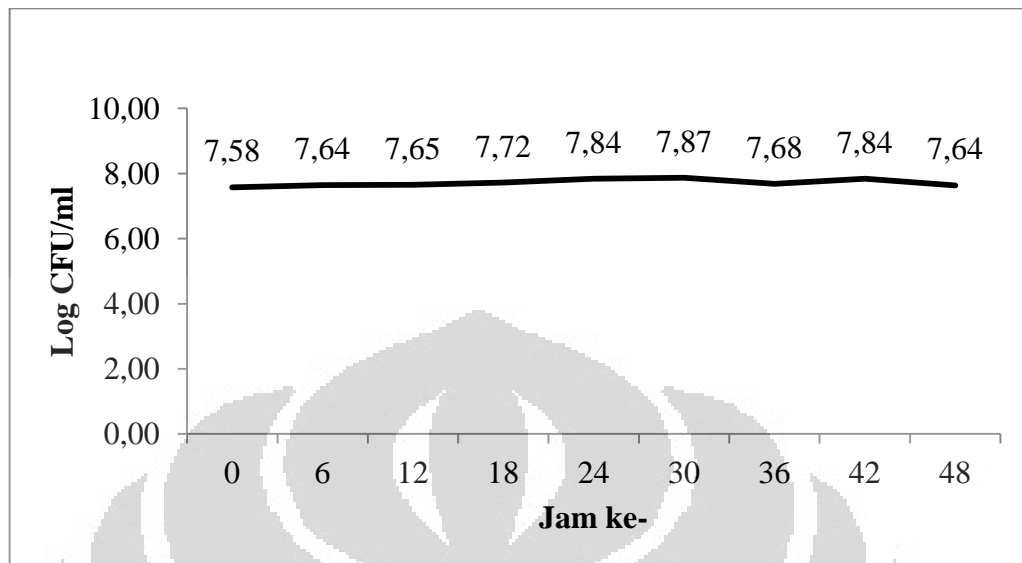
Berdasarkan CondaLab(b) (2010: 1), medium M17 merupakan medium yang tepat bagi pertumbuhan *Streptococcus* hal tersebut disebabkan karena medium M17 mengandung sodium gliserofotfat. Sodium gliserofotfat merupakan suatu *buffer* yang dapat mempertahankan pH medium di atas 5,7 sehingga tidak

menyebabkan kerusakan sel *Streptococcus*. Bakteri dari genus *Streptococcus* memerlukan medium yang mengandung komponen *buffer*. Komponen *buffer* tersebut harus dapat mempertahankan kadar pH medium tetap berada di atas 5,7. Hal tersebut disebabkan karena bakteri dari genus *Streptococcus* merupakan bakteri yang dapat menghasilkan asam dengan cepat, namun kadar asam yang terlalu tinggi dapat menyebabkan kerusakan sel *Streptococcus* dan dapat menghambat pembentukan sel baru.

Isolat I₁ menunjukkan terjadinya pertumbuhan yang cukup signifikan dari jam ke-6 sampai ke-24, diduga pada jam tersebut merupakan fase log dari isolat tersebut. Penurunan jumlah bakteri terjadi pada jam ke-30 sampai jam ke-36. Kemudian kembali meningkat pada jam ke-42. Pertumbuhan mengindikasikan bahwa isolat I₁ dapat memanfaatkan nutrisi pada substrat kacang merah. Penurunan yang terjadi diduga dapat disebabkan oleh berkurangnya nutrisi sehingga mengakibatkan terjadinya lisis sel dan kematian pada isolat I₁. Brooks *dkk.* (2007: 55) menyatakan bahwa saat nutrisi pada substrat sudah hampir habis, sebagian besar sel bakteri akan mati dan mengalami lisis sel. Nutrisi yang dikeluarkan dari sel akan dimanfaatkan oleh sebagian kecil bakteri untuk bertahan hidup.

Pembuatan kurva pertumbuhan bertujuan untuk mengukur perubahan jumlah bakteri asam laktat yang terdapat di dalam yogurt susu kacang merah selama 48 jam. Grafik pertumbuhan (Gambar 4.2(2)) menunjukkan bahwa bakteri asam laktat (BAL) tidak mengalami peningkatan jumlah secara logaritmik. Hal tersebut mengindikasikan bakteri asam laktat tidak dapat memanfaatkan substrat yang ada secara optimal. Diduga bakteri asam laktat tidak dapat memanfaatkan karbohidrat yang terdapat pada susu kacang merah berupa rafinosa dan stakiosa sebagai sumber energi. Selain itu diduga pula penambahan sukrosa 5% juga mempengaruhi pertumbuhan bakteri asam laktat pada susu kacang merah karena sukrosa diduga merupakan satu-satunya karbohidrat yang dapat digunakan sebagai sumber energi. *Streptococcus* diduga merupakan satu-satunya bakteri asam laktat di susu kacang merah yang dapat menggunakan sukrosa untuk menghasilkan energi. Sukrosa diduga akan dipecah menjadi glukosa dan fruktosa,

kemudian *Lactobacillus* diduga akan menggunakan glukosa yang terbentuk untuk menghasilkan energi.



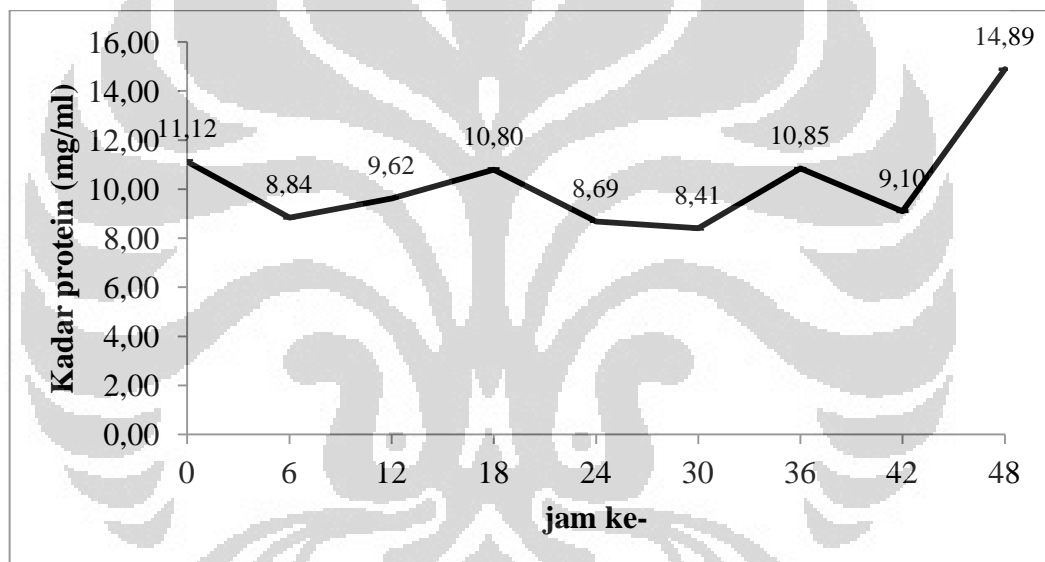
Gambar 4.2(2) Grafik Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat yang Berasal dari Hasil Fermentasi Susu Kacang Merah Diinkubasi dengan Suhu 38° C Selama 48 Jam pada Medium MRSA

Berdasarkan Tortora *dkk.* (2010: 172), kurva pertumbuhan dapat mewakili aktivitas pertumbuhan mikroorganisme. Kurva tersebut merupakan gabungan dari beberapa fase pertumbuhan, meliputi fase lag, fase log, fase stasioner, dan fase kematian. Pertumbuhan identik dengan aktivitas metabolisme dan pemanfaatan nutrisi. Berdasarkan Madigan *dkk.* (2011: 123) pertumbuhan logaritmik adalah suatu fase pertumbuhan dimana terjadinya penambahan bakteri secara eksponensial disertai dengan pembelahan sel secara konstan pada jangka waktu tertentu. Berdasarkan Granito & A´lvarez (2006: 1168) penambahan sukrosa pada proses fermentasi perlu dilakukan sebagai sumber energi bagi bakteri asam laktat. Trindade *dkk.* (2001: 101) melaporkan bahwa pertumbuhan bakteri asam laktat pada susu kacang kedelai sepenuhnya bergantung pada kemampuan untuk melakukan fermentasi karbohidrat yang terdapat pada substrat. Selain itu, *Streptococcus thermophilus* merupakan bakteri asam laktat yang dapat memanfaatkan sukrosa sebagai sumber energi sedangkan *Lactobacillus bulgaricus* tidak dapat menggunakannya. Vos *dkk.* (2009: 486) menyatakan bahwa *Lactobacillus bulgaricus* hanya dapat melakukan fermentasi terhadap laktosa dan glukosa. Ray & Bhunia (2008: 65) menyatakan bahwa sukrosa pada

suatu substrat akan dipecah oleh enzim sukrase menjadi glukosa dan fruktosa sehingga dapat digunakan sebagai sumber energi oleh mikroorganisme.

4.3 Kadar Protein

Hasil perhitungan kadar protein menggunakan metode Bradford dapat dilihat pada Gambar 4.2. Metode Bradford diduga dapat mengikat protein lisin pada kacang merah. Kruger (2002: 15) menyatakan bahwa reagen *Coomassie Brilliant Blue* merupakan pewarna yang dapat mengikat asam-asam amino terutama arginin, lisin, dan histidin pada protein.



Gambar 4.3 Grafik Kadar Protein (mg/ml) Hasil Fermentasi Susu Kacang Merah dengan Suhu Inkubasi 38° C Selama 48 Jam

Protein pada kacang merah diduga masih berupa protein kompleks sehingga perlu dilakukan suatu proses yang dapat mengubah protein tersebut menjadi lebih sederhana. Pemanasan susu kacang merah diduga dapat menyebabkan pemecahan struktur protein menjadi lebih sederhana. Struktur protein yang lebih sederhana diduga lebih mudah untuk dihidrolisis oleh *Lactobacillus*. Berdasarkan Zakaria & Suciono (1996: 8), pemanasan pada suhu 80 °C akan menyebabkan terjadinya denaturasi protein, terutama protein albumin dan globulin sehingga dapat merusak struktur kompleks protein. Struktur protein

kompleks yang telah diubah menjadi lebih sederhana akan lebih mudah untuk dihidrolisis oleh *Lactobacillus*.

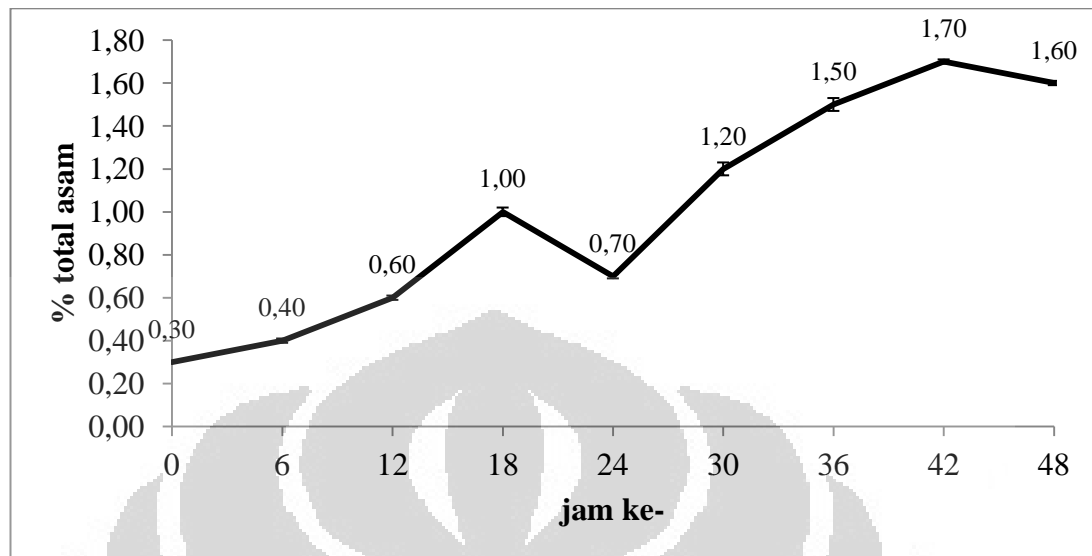
Hasil fermentasi selama 48 jam menunjukkan peningkatan kadar protein pada yogurt susu kacang merah (Gambar 4.3). Penyebab peningkatan kadar protein diduga berasal dari degradasi protein oleh enzim-enzim protease yang dihasilkan bakteri. Selain itu, lisis sel juga dapat menyebabkan peningkatan kadar protein. Protein-protein yang terdapat di dalam sel bakteri diduga akan keluar dan bercampur dengan substrat sehingga mengakibatkan terjadinya peningkatan kadar protein pada substrat. Berdasarkan Granito & Alvarez (2006: 6), protein yang didegradasi oleh proteinase dan peptidase akan menyebabkan pelepasan asam-asam amino dan rantai pendek peptida. Menurut Yusmarini & Efendi (2004: 107--108), komponen utama penyusun sel mikroorganisme adalah protein sehingga semakin banyak sel yang lisis maka semakin tinggi kadar protein pada soygurt.

4.4 Total Asam Tertirasi

Hasil pengamatan total asam dapat dilihat pada Gambar 4.4(1). Gambar 4.4(1) menunjukkan bahwa terjadinya peningkatan total asam pada fermentasi yogurt susu kacang merah. Pembentukan asam diduga berasal dari hasil pemecahan karbohidrat oleh bakteri asam laktat pada susu kacang merah. Jay (2005: 165) melaporkan bahwa kombinasi dari bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* berperan penting dalam peningkatan kadar asam pada yogurt susu sapi. *Streptococcus* akan tumbuh lebih cepat di awal fermentasi dari pada *Lactobacillus* dan berperan dalam peningkatan kadar asam (sekitar 0,5%) sedangkan *Lactobacillus* berperan penting dalam pembentukan asetaldehid. Berdasarkan Ray & Bhunia (2008: 69), pembentukan asetaldehid merupakan hasil dari pemecahan threonin oleh genus *Lactobacillus* untuk memberikan rasa asam pada yogurt.

Kacang merah diduga mengandung sumber karbon yang sangat terbatas untuk mendukung pertumbuhan bakteri asam laktat. Oleh sebab itu, perlu dilakukan penambahan sumber karbon pada substrat susu kacang merah berupa sukrosa. Sukrosa diduga memiliki struktur yang mudah untuk dipecah oleh bakteri

asam laktat. Selain itu, sukrosa juga mudah diperoleh dan harganya relatif terjangkau.



Gambar 4.4 Grafik Persentase Total Asam Hasil Fermentasi Susu Kacang Merah dengan Suhu Inkubasi 38° C Selama 48 Jam Pengamatan

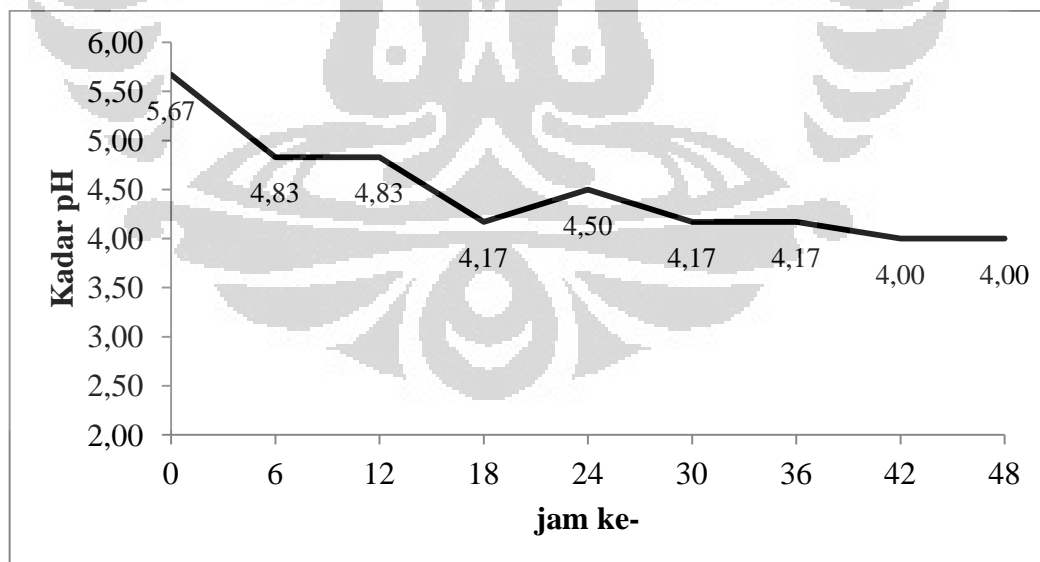
Yusmarini & Efendi (2004: 2) melaporkan bahwa sukrosa merupakan jenis gula yang umum ditambahkan dalam pembuatan yogurt. Sukrosa dibutuhkan oleh *Streptococcus* sebagai sumber karbon untuk melakukan aktivitas metabolisme sehingga suasana asam dapat terbentuk pada substrat. Kondisi asam yang sesuai akan memungkinkan pertumbuhan *Lactobacillus*. Berdasarkan Trindade *dkk.* (2001: 102) pembentukan asam tertinggi *Streptococcus* terjadi pada soygurt dengan penambahan sukrosa sebanyak 2,5% dibandingkan dengan tanpa sukrosa. Kadar asam yang tinggi akan mengakibatkan penurunan kadar pH sehingga memungkinkan *Lactobacillus* untuk tumbuh. Vos *dkk.* (2009: 484 & 708) menyebutkan bahwa *S. thermophilus* dapat menghasilkan asam dari hasil fermentasi sukrosa, sedangkan *L. bulgaricus* tidak dapat menfermentasi sukrosa. Namun *L. bulgaricus* dapat memanfaatkan glukosa dari hasil pemecahan sukrosa oleh enzim sukrase yang dihasilkan oleh *S. thermophilus*.

4.5 Kadar pH

Hasil pengamatan terhadap perubahan kadar pH yogurt kacang merah dapat dilihat pada Gambar 4.5(1). Hasil pengamatan menunjukkan terjadinya

penurunan kadar pH selama proses fermentasi. Penurunan kadar pH diduga terkait dengan peningkatan kadar total asam. Penurunan pH mengindikasikan terjadinya peningkatan kadar total asam pada substrat. Berdasarkan Ray & Bhunia (2008: 57) kenaikan atau penurunan kadar total asam berbanding terbalik dengan dengan pH. Yusmarini & Efendi (2004: 3) melaporkan bahwa pembentukan asam dari hasil penambahan berbagai jenis gula terbukti memberikan dampak yang berbeda terhadap penurunan pH. Penambahan sukrosa ke dalam substrat memberikan kontribusi yang paling banyak terhadap penurunan pH.

Kadar pH diduga dapat mempengaruhi aktivitas metabolisme bakteri dan viabilitas bakteri. Aktivitas metabolisme bakteri asam laktat diduga memiliki kaitan erat terhadap peningkatan asam dan penurunan pH. Berdasarkan Madigan *dkk.* (2011: 140), kadar pH memiliki peran penting pada pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel-sel mikroorganisme. Berdasarkan Ray & Bhunia (2008: 58), setiap organisme memiliki kadar pH tertentu untuk tumbuh dengan optimal. Ketika pH mengalami penurunan melebihi batas minimum suatu mikroorganisme, maka mikroorganisme tersebut tidak hanya akan berhenti untuk tumbuh namun akan kehilangan viabilitasnya.



Gambar 4.5(1) Kurva Penurunan Kadar pH pada Yogurt Susu Kacang Merah Selama Proses Fermentasi

Pengamatan terhadap pembentukan gumpalan pada substrat dilakukan secara visual. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Gambar 4.5(2). Hasil

pengamatan terhadap substrat menunjukkan adanya gumpalan-gumpalan berwarna putih di bagian dasar dan di permukaan botol. Gumpalan pada bagian dasar diduga merupakan hasil penggumpalan protein. Penggumpalan pada dasar diduga terjadi karena penurunan pH substrat yang mengakibatkan denaturasi protein. Gumpalan pada bagian permukaan diduga merupakan komponen pada kacang merah yang berat jenisnya lebih kecil dibandingkan dengan air. Ketika komponen tersebut beragregasi dengan sel bakteri, sel bakteri yang beragregasi akan memperbanyak diri sehingga berat jenis komponen tersebut meningkat. Hal tersebut menyebabkan hasil agregasi turun ke dasar botol.



Keterangan:
(←) : Gumpalan yang terbentuk

Gambar 4.5(2) Pembentukan Gumpalan pada Dasar Yogurt Kacang Merah Setelah Inkubasi 18 Jam

Menurut Bozanic *dkk.* (2011: 2), pH 4,6 merupakan titik isoelektrikal protein pada kacang kacang kedelai. Phadungath (2005: 6) melaporkan bahwa, pengasaman susu sapi hingga mencapai pH < 5 dapat mengakibatkan protein mencapai titik isoelektrik sehingga akan terjadi perubahan bentuk struktur pada kasein yang menyebabkan susu sapi menjadi kental. Yildiz (2010: 101) melaporkan bahwa pada awal fermentasi, *Streptococcus* berperan untuk

menurunkan pH hingga 5. Pertumbuhan *Lactobacillus* kemudian mengakibatkan penurunan pH menjadi 4. Seiring dengan penurunan pH maka yogurt akan menjadi kental. Saputra & Darmansyah (2010: 3) melaporkan bahwa, bakteri dapat menyatu dengan komponen yang terdapat pada suatu substrat yang berada di atas permukaan substrat. Bakteri yang menyatu dengan komponen tersebut kemudian akan mengalami penambahan jumlah koloni.

4.6 Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan oleh 19 orang panelis yang tidak terlatih. Panelis berasal dari kalangan dosen dan mahasiswa di Departemen Biologi FMIPA UI. Panelis diminta untuk mencicipi yogurt susu kacang merah kemudian mengisi kuisioner yang telah disediakan (Lampiran 9).

Rasa, aroma dan tekstur adalah kunci utama kesuksesan pembuatan produk yogurt. Pencampuran beberapa jenis bakteri akan mempengaruhi rasa atau aroma yogurt sehingga menghasilkan rasa atau aroma khas. Penambahan gula diduga dapat mempengaruhi cita rasa pada produk yogurt. Berdasarkan Yildiz (2010: 254), produk gugus karbonil yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat seperti asetaldehid, aseton, aseton, dan diasetil membentuk suatu karakteristik rasa/aroma khas pada yogurt.

Hasil pengisian kuisioner dapat dilihat pada Tabel 4.6. Uji organoleptik menunjukkan bahwa tingkat kesukaan panelis terhadap rasa yogurt adalah 2,89; terhadap aroma adalah 2,95; terhadap rasa asam adalah 3,16 dan terhadap yogurt kacang merah mencapai angka 3,11. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tingkat kesukaan panelis terhadap produk yogurt kacang merah yang dihasilkan adalah *moderate*.

Tabel 4.6 Hasil Penilaian Panelis Terhadap Yogurt Susu Kacang Merah Setelah Fermentasi 48 Jam

Panelis	Rasa	Aroma	Asam	Tingkat kesukaan
1	3	2	3	3
2	3	4	4	4
3	2	2	4	3
4	2	3	2	2
5	2	2	3	3
6	3	2	3	2
7	3	3	2	3
8	3	3	4	3
9	4	3	4	3
10	2	3	3	3
11	2	3	3	2
12	4	4	5	4
13	3	3	2	3
14	2	4	3	3
15	3	3	4	4
16	3	3	2	3
17	3	2	2	3
18	3	4	4	4
19	4	3	3	4
Rata-rata	2,84	2,95	3,16	3,11
SD	0,69	0,71	0,90	0,66

Berdasarkan Kokali (1996: 39), soygurt yang paling disukai oleh panelis adalah soygurt dengan penambahan sukrosa sebanyak 12%. Yusmarini & Efendi (2004: 6) melaporkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata dari panelis terhadap tingkat kesukaan soygurt yang telah diberi penambahan beberapa jenis gula. Soygurt yang diberi penambahan sukrosa sebanyak 7% memiliki rasa yang tidak terlalu asam dan masih berasa manis sehingga kurang disukai oleh panelis. Soygurt tersebut lebih disukai oleh panelis dibandingkan dengan soygurt yang diberi penambahan glukosa atau laktosa.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

1. Yogurt nabati dapat dihasilkan dari fermentasi susu kacang merah menggunakan kultur *backslop*.
2. Jumlah bakteri asam laktat pada akhir fermentasi adalah 7,64 log CFU/ml.
3. Kadar protein pada akhir fermentasi adalah 14,89 mg/ml, kadar total asam akhir adalah 1,6%, dan pH akhir adalah 4,00.
4. Tingkat kesukaan panelis terhadap produk adalah *moderate*.

5.2 SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai optimasi penambahan gula pada yogurt susu kacang merah sehingga menghasilkan produk yang lebih disukai oleh panelis.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kombinasi bakteri asam laktat yang tepat sehingga dapat menghasilkan produk dengan cita rasa yang lebih enak sehingga disukai oleh panelis.

DAFTAR REFERENSI

- Adams, M. R. & M. J. R. Nout. 2001. *Fermentation and food safety*. Aspen Publication, Gaithersburg: xi + 307 hlm.
- Adams, M. R. & M. O. Moss. 2008. *Food microbiology*. 3rd ed. RSC Publishing, Cambridge: xiv + 463 hlm.
- Atlas, R. M. 2010. *Hanbook of microbiological media*. 4th ed. CRC Press, New York: 2043 hlm.
- Babu, P. D., R. Bhakayaraj, & R. Vidhyalakshmi. 2009. A low cost nutritious food “Tempeh”- A Review. *World Journal of Dairy & Food Sciences*. **4**(1): 22--227.
- Backer, C. A. & R. C. B. van den Brink. 1963. *Flora of Java (Spermatophytes only)* vol. 1. NV. P.Noordhooft –Groninge, Groningen: xxiii + 648 hlm.
- Bamforth, C. W. 2005. *Food, fermentation and micro-organisms*. Blackwell Publishing, Oxford: xiv + 216 hlm.
- Barampama, Z. & R. E. Simard. 1994. Oligosaccharides, antinutritional factors, and protein digestibility of dry beans as affected by processing. *Food technology*. **59**(4): 833--838.
- Barrow, G. I. & R. K. A Feltham. 1993. *Cowan and steel's manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge University Press, Cambridge: xvii + 331 hlm.
- Battcock, M. & S. Azam-Ali. 1998. *Fermented fruits and vegetables. A global perspective*. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, Rome: iv + 60 hlm.
- Baudoin, J. -P. & A. Maquet. 1999. Improvement of protein and amino acid contents in seed of food legumes. a case study in *Phaseolus*. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. **3**(4): 220--224.

- Beckton, Dickinson & Company. 2003. BD LBS agar (Lactobacillus selection agar). 2003: 4 hlm.
http://www.google.co.id/url?sa=t&rct=j&q=becton+dickinson+LBS&source=web&cd=2&ved=0CCIQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.bd.com%2Fleaving%2F%3F%2Feurope%2Fregulatory%2FAssets%2FIFU%2FHB%2FCE%2FPA%2FPA-255011.pdf&ei=PvLkTv_EOcKHrAeI15CCCA&usg=AFQjCNF_pHsF--Z20UCfpj4GbYCJBmcW-g, 6 Desember 2011, pk. 19.45.
- Benson, H. J. 2001. *Benson's Microbiological applications: laboratory manual in general microbiology*. 8th ed. McGraw-Hill, New York: xi + 478 hlm.
- Bourgaize, D., T. T. Jewell, & R. G. Buiser. 1999. *Biotechnology demystifying the concepts*. Benjamin Cummings, San Francisco: xvi + 416 hlm.
- Božanić, I., S. Lovković, & I. Jeličić. 2011. Optimising fermentation of soymilk with probiotic bacteria. *Czech Journal of Food Science*. **29**(1): 51--56.
- Brock, T. D. & M. T. Madigan. 1991. *Biology of microorganisms*. 6th ed. Prentice-Hall International, New Jersey: xix + 425 hlm.
- Brooks, G. F., K. C. Carroll, J. S. Butel, & S. A. Morse. 2007. *Medical microbiology*. 24th ed. Mc Graw Hill, New York: x + 819 hlm.
- Broughton, W. J., G. Hernandez, M. Blair, S. Beebe, P. Gepts, & J. Vanderleyden. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil*. **252**: 55--128.
- Chandan, R.C. & K.M. Shahani. 1993. Yoghurt. *Dalam*: Yusmarini dan R. Efendi. 2004. Evaluasi mutu soygurt yang dibuat dengan penambahan beberapa jenis gula. *Jurnal Natural Indonesia*. **6**(2): 104--110.
- Chang, S. Y., D. H. Kim, & M. J. Han. 2010. Physicochemical and sensory characteristics of soy yogurt fermented with *Bifidobacterium breve* K-110, *Streptococcus thermophilus* 3781, or *Lactobacillus acidophilus* Q509011. *Food Science and Biotechnology*. **19**(1): 107--113.
- CondaLab(a). 2010. MRS Agar. 2010: 1 hlm,
<http://www.condalab.com/pdf/1043.pdf>, 16 Desember 2010, pk. 20.33.
- CondaLab(b). 2010. M17 Agar. 2010: 1 hlm.
<http://www.condalab.com/pdf/1318.pdf>, 16 Desember 2010, pk. 18.22.

- Direktorat Gizi DepKes RI. *Daftar Komposisi Bahan Makanan*. 1989. Bhatara, Jakarta: 25 hlm.
- Farnworth, E. R. 2008. *Handbook of fermented functional foods*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton: vii + 581 hlm.
- Fратиwi, Yulneriwarni & Noverita. 2008. Fermentasi kefir dari susu kacang-kacangan. *VIS VITALIS. Jurnal Ilmiah Biologi*. **1**(2): 45--54.
- Gandhi, A. P. 2009. Review article quality of soybean and its food products. *International Food Research Journal*. **16**: 11--19.
- Gandjar, I., I.R. Koentjoro, W. Mangunwardoyo & L. Soebagya. 1992. *Pedoman praktikum mikrobiologi dasar*. Jurusan Biologi FMIPA UI, Depok: vii + 88 hlm.
- Gandjar, I., W. Sjamsuzidzal & A. Oetari. 2006. *Mikologi: dasar dan terapan*. Yayasan Obor, Jakarta: xii + 238 hlm.
- Granito, M., J. Frias, R. Doblado, M. Guerra, M. Champ, & C. Vidal-Valverde. 2002. Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*) by natural fermentation. *European Food Research and Technology*. **214**: 226--231.
- Granito, M., C. Michel, J. Frias, M. Champ, & M. Guerra. 2005. Fermented *Phaseolus vulgaris*: acceptability and intestinal effects. *European Food Research and Technology*. **220**: 182--186.
- Granito, M. & G. A'lvarez. 2006. Lactic acid fermentation of black beans (*Phaseolus vulgaris*): microbiological and chemical characterization. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **86**: 1164--1171.
- Guerin-Danan, C., C. Chabanet, C. Pedone, F. Popot, P. Vissade, C. Bouley, O. Szyllit, & C. Andrieux. 1998. Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in healthy infants. *American Journal of Clinical Nutrition*. **67**: 111--117.
- Guss, M. L. & E. A. Delwiche. 1954. *Streptococcus thermophilus*. *Journal of bacteriology*. **67**(6): 714--717.
- Han, I. H. & B. K. Baik. 2006. Oligosaccharide content and composition of legumes and their reduction by soaking, cooking, ultrasound, and high hydrostatic pressure. *Cereal chemistry*. **83**(4): 428--433.

- Heller, K. J. 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Society for Clinical Nutrition*. **73**: 374--379.
- Huges, J. S. 1991. Potential contribution of dry bean dietary fiber to health. *Food technology*. **45**(9): 124--146.
- Hutkins, R. W. 2006. *Microbiology and technology of fermented food*. Blackwell Publishing, Iowa: xi + 473 hlm.
- Hutkins, R. W. & N. L. Nannen. 1993. pH homeostasis in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. **76**: 2354--2365.
- Jay, J. M., M. J. Loessner, & D. A. Golden. 2005. *Modern food microbiology*. 7th ed. Springer Science, New York: xx + 790 hlm.
- Kokali, Y, N, S. 1996. Pengaruh pemberian gula (sukrosa) dan natrium bikarbonat terhadap kualitas soygurt. Skripsi Sarjana S1 Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Diponegoro, Semarang: 56 hlm.
- Kruger, N. J. 2002. *Dalam: Walker, J. M. (ed.) The Protein Protocols Handbook*. 2nd ed. Humana Press, New Jersey: xviii + 809 hlm.
- Kunaepah, U. 2008. Pengaruh lama fermentasi dan konsentrasi glukosa terhadap aktivitas antibakteri, polifenol total dan mutu kimia kefir susu kacang merah. Tesis Pasca-Sarjana S2 Magister Gizi Masyarakat Universitas Diponegoro, Semarang: 118 hlm.
- Lin, C.Y., Z. Y. Tsai, I. C. Cheng, & S. H. Lin. 2005. Effects of fermented soy milk on the liver lipids under oxidative stress. *World Journal of Gastroenterology*. **11**(46): 7355--7358.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, & D. A. Stahl. 2011. *Biology of microorganisms*. 13th ed. Benjamin Cummings, San Francisco: xxviii + 1040 hlm.

- Mailer, R & C. Beckingham. 2006. Testing olive oil quality: chemical and sensory methods. Agustus 2006: 5 hlm.
http://www.google.co.id/url?sa=t&rct=j&q=Testing+olive+oil+quality%3A+chemical+and+sensory+methods&source=web&cd=1&ved=0CDcQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.dpi.nsw.gov.au%2F_data%2Fassets%2Fpdf_file%2F0005%2F87197%2Fpf231-Testing-olive-oil-quality.pdf&ei=aPzkToLfc8-GrAefnuGECA&usg=AFQjCNG_B7g1T50j_AGZJtD3ONzMpUVdZQ,
 12 Desember 2011, pk. 20.30.
- Marcuse, S. 1944. An application of the control chart method to the testing and marketing of foods. *American Statistical Association*. 214--222.
- Misgiyarta S. & Widowati. 2003. Seleksi dan karakterisasi bakteri asam laktat (BAL) indigenus. *Buletin Plasma Nutfah*. 7: 1--17.
- Murooka, Y. & M. Yamshita. 2008. Traditional healthful fermented products of Japan. *Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **35**(8): 791--798.
- Nuka. 2006. Fish, gear, and vessel sampling methods. *Sampling Tactics Manual*. 111--120.
- Olsen, E. L., J. E. B. Jensen, K. D. R. Setchell, & T. H. Jensen. 2004. Soy milk or progesterone for prevention of bone loss A 2 year randomized, placebo-controlled trial. *European Journal of Nutrition*. **43**: 246--257.
- Perry, J. J., J. T. Staley, & S. Lory. 2007. *Microbial life*. Sinauer Associates, Massachusetts: 800 hlm.
- Phadungath, C. 2005. The mechanism and properties of acid-coagulated milk gels. *The Songklanakarin Journal of Science and Technology*. **27**(2): 433--448.
- Rahayu, I. 2003. Karakteristik fisik, komposisi kimia dan uji organoleptik telur ayam merawang dengan pemberian pakan bersuplemen omega-3. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. **14**(3): 199--205.
- Ray, B. 2004. *Fundamental food microbiology*. 3rd ed. CRC Press, Florida: ix + 608 hlm.

- Ray, B. & A. Bhunia. 2008. *Fundamental food microbiology*. 4th ed. CRC Press, Boca Raton: xxxvii + 492 hlm.
- Reddy, N. R., D. K. Salunke, & R. P. Sharma. 1980. Flatulence in rats following ingestion of cooked and germinated black and a fermented product of black gram and rice blend. *Dalam: Granito, M., C. Michel, J. Frias, M. Champ, & M. Guerra. 2005. Fermented Phaseolus vulgaris: acceptability and intestinal effects. European Food Research and Technology. 220: 182--186.*
- Saccaro, D. M., C. Y. Hirota, A. Y. Tamime & M. N. De Oliveira. 2011. Evaluation of different selective media for enumeration of probiotic microorganisms in combination with yogurt starter cultures in fermented milk. *African Journal of Microbiology Research. 5(23): 3901--3906.*
- Sameen, A., F. M. Anjum, N. Huma & M. I. Khan. 2010. Comparison of locally isolated culture from yogurt (dahi) with commercial culture for the production of mozzarella cheese. *International Journal of Agriculture and Biology. 12(2): 231--236.*
- Samsumaharto, R. A. & N. Puspawati. 2008. Perbandingan fermentasi yoghurt susu biji asam (*Tamarindus indica*, L.) dengan yoghurt susu murni. *Jurnal Kimia dan Teknologi. 4(1): 263--274.*
- Saputra, A. H. & Darmansyah. 2010 (November). Evaluation of physical and mechanical properties composite of nata de coco fibers/resin filled SiO₂, and Al₂O₃. The 1st International Seminar on Fundamental and Application of Chemical Engineering.
- SCIMAT. 2006. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. 25 Agustus 2006: 1 hlm. http://www.magma.ca/~pavel/science/L_bulgaricus.htm, 14 Maret 2011, pk. 12.56.
- SCIMAT. 2007. *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*. 18 Mei 2007: 1 hlm. http://www.magma.ca/~pavel/science/Strepto_thermo.htm, 14 Maret 2011, pk. 13.20.
- Scrimshaw, N. S. & E. B. Murray. 1988. The acceptability of milk and milk products in populations with a high prevalence of lactose intolerance. *American Journal of Clinical Nutrition. 48: 1079--1159.*

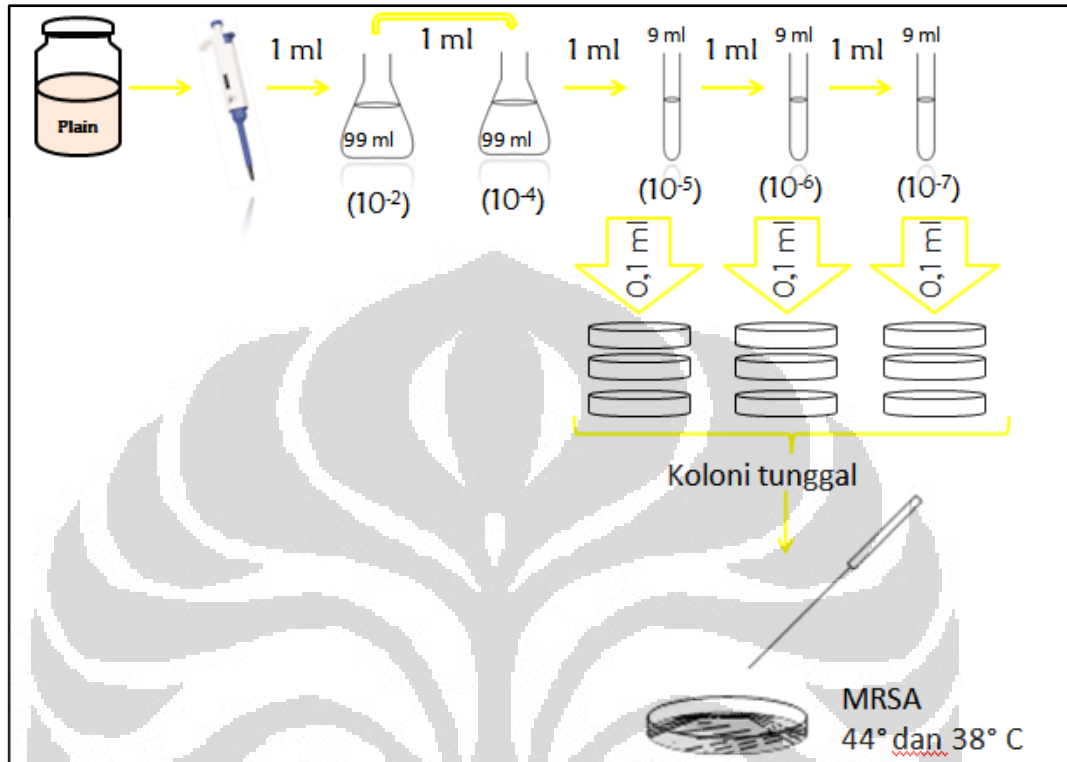
- Spencer, J. F. T., & A. L. R. de Spencer. 2001. *Food microbiology protocols*. Humana Press, New Jersey: xiv + 495 hlm.
- Surono, I. S. 2004. *Probiotik susu fermentasi dan kesehatan*. Tri Cipta Karya, Jakarta: xiii + 280 hlm.
- Tamang, J. P. & K. Kailasapathy. 2010. *Fermented foods and beverages*. CRC Press, Boca Raton: vi + 434 hlm.
- Tamime, A. Y. 2006. *Fermented milks*. Blackwell Publishing, Oxford: xvii + 266 hlm.
- Tamime, A.Y. & R. K. Robinson. 2000. *Yogurt Science and Technology*. 3rd ed. Woodhead Publishing, Cambridge: xvi + 791 hlm.
- Tomi. (30 November 2011). Wawancara pribadi.
- Tortora, G. J., B. R. Funke, & C. L. Case. 2010. *Microbiology: an introduction*. 10th ed. Benjamin Cummings, New York: xxxi + 793 hlm.
- Trindade, C. S., S. C. Terzi, L. C. Trugo, R. C. D. Modesta & S. Couri. 2001. Development and sensory evaluation of soy milk based yoghurt. *Sociedad Latinoamericana de Nutrición*. **51**(1): 100--104.
- Ubisimail. 2010. Testing for milk quality. Juni 2010: 3 hlm.
http://www.google.co.id/url?sa=t&rct=j&q=Testing+for+milk+quality+Ubisimail&source=web&cd=1&ved=0CB8QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.ubisimail.co.za%2Fpdf_files%2Fjune%252010%2FPDF%2Ftesting_milk_quality.pdf&ei=Mf3kTouNGNHHrQfntjwBw&usg=AFQjCNFT9P_goXiJXIgoZM9EjY3uRbLSRg, 12 Desember 2011, pk. 01.59.
- Vos, P. De, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. H. Schleifer, & W. B. Whitman. 2009. *Bergey's manual of systematic bacteriology volume three: The Firmicutes*. 2nd ed. Springer, Athens: xxvi + 1422 hlm.
- Waites, M. J., N. L. Morgan, J. S. Rockey, & G. Higon. 2001. *Industrial microbiology: an introduction*. Blackwell Science, London: xi + 288 hlm.
- Widowati & Misgiyarta S. 2004 (September). Efektifitas bakteri asam laktat (bal) dalam pembuatan produk fermentasi berbasis protein /susu nabati.

Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman,
Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian.

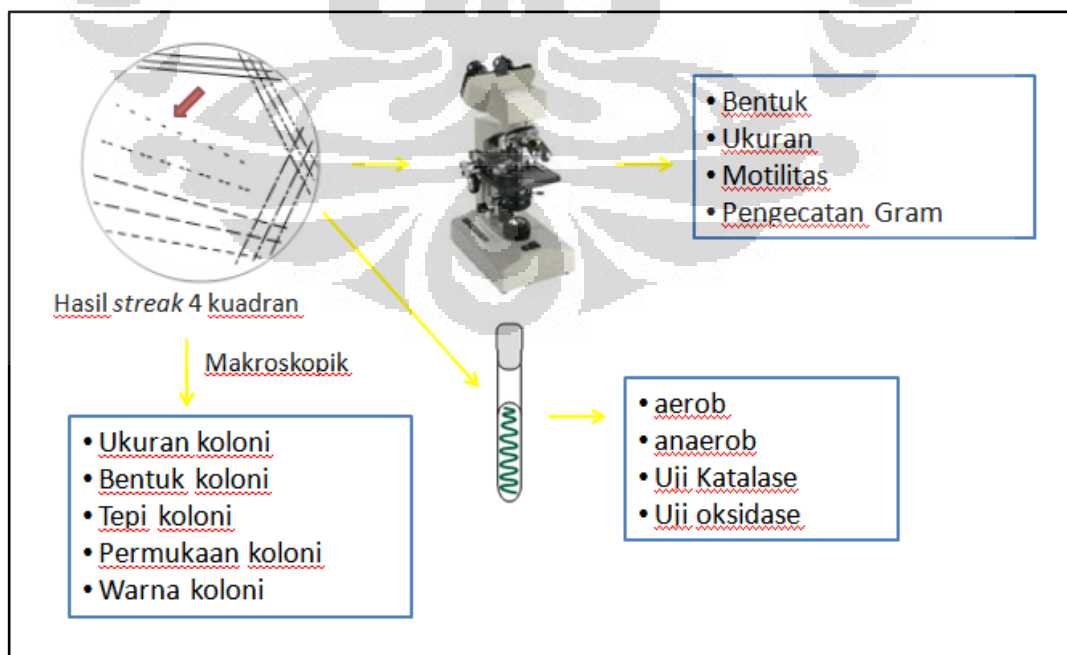
- Yildiz, F. 2010. *Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products*. CRC Press, New York: xi + 440 hlm.
- Yusmarini & R. Efendi. 2004. Evaluasi mutu soygurt yang dibuat dengan penambahan beberapa jenis gula. *Jurnal Natural Indonesia*. 6(2): 104--110.
- Zahoor, T., S. U. Rahman & U. Farooq. 2003. Viability of *Lactobacillus bulgaricus* as yoghurt culture under different preservation methods. *International Journal of Agriculture and Biology* 5(1): 46--48.
- Zakaria, F. R. & Suciono. 1996. Isolasi dan karakteristik protein kacang merah (*Phaseolus vulgaris*) dan kacang tolo (*Vigna unguiculata*) lokal serta pengujian sifat antigeniknya sebelum dan sesudah fermentasi asam laktat. *Buletin Teknik dan Industri Pangan*. 7(2): 1--9.

LAMPIRAN

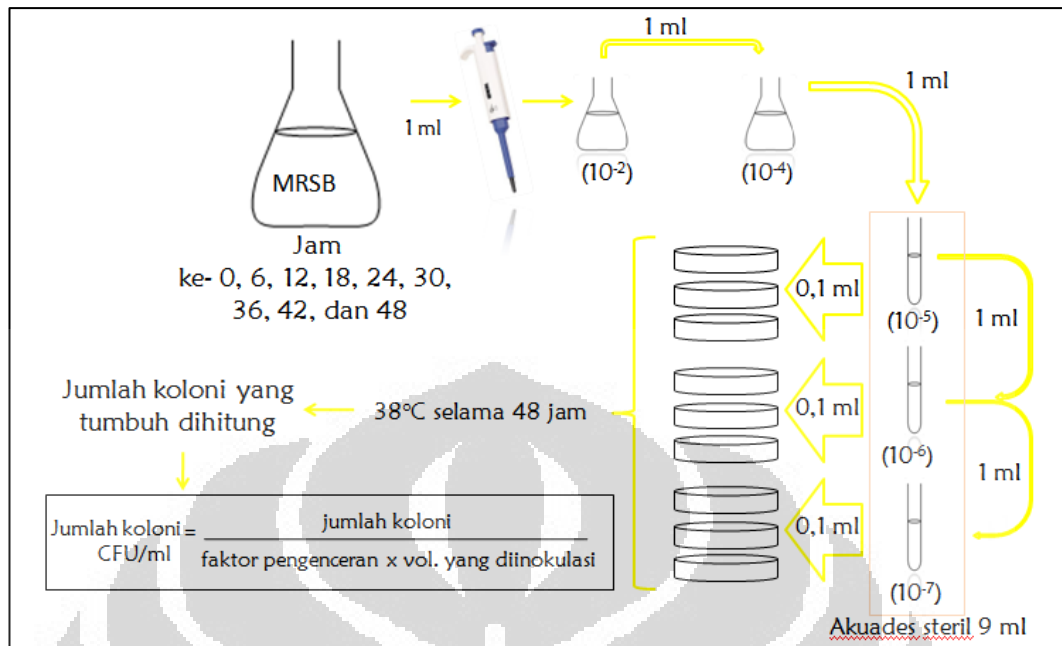
Lampiran 1. Skema isolasi bakteri asam laktat



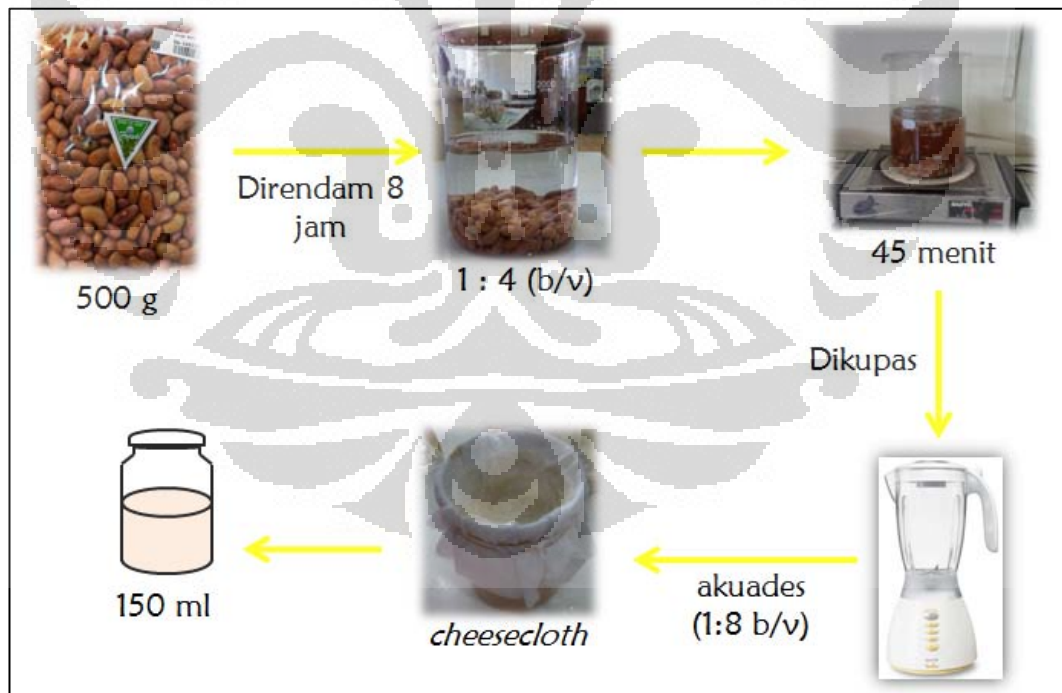
Lampiran 2. Skema pengamatan makroskopik dan mikroskopik



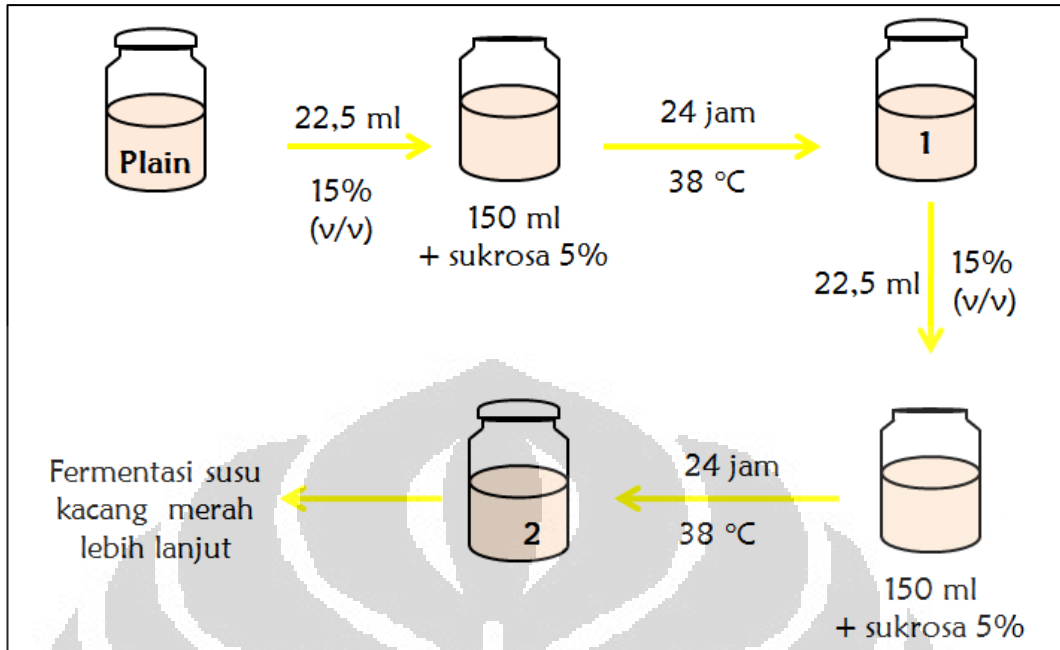
Lampiran 3. Skema pembuatan kurva pertumbuhan bakteri



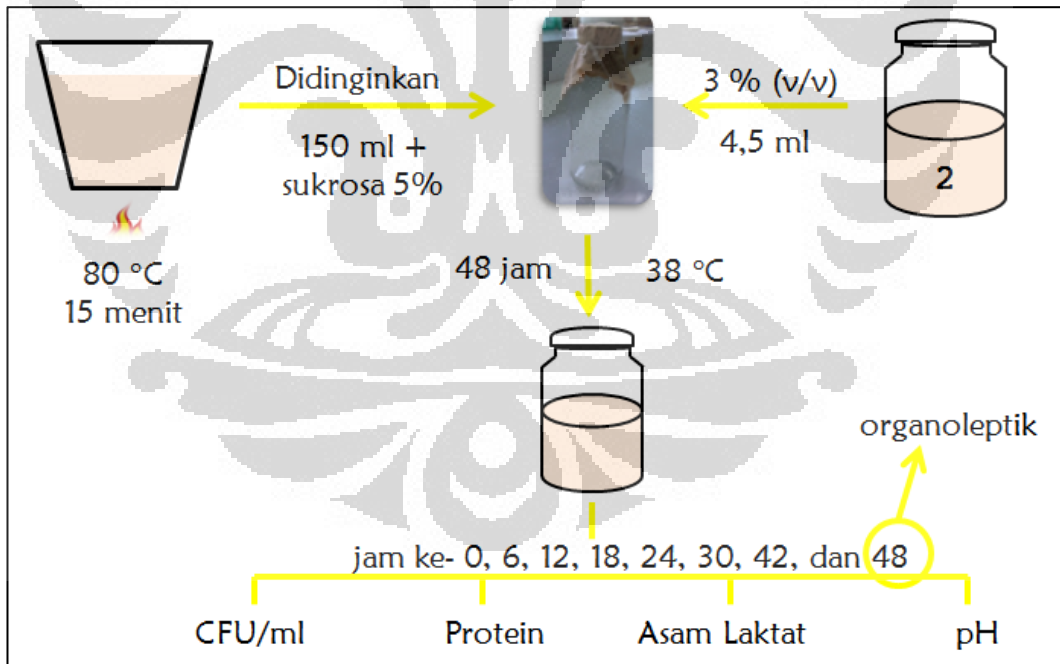
Lampiran 4. Skema pembuatan susu kacang



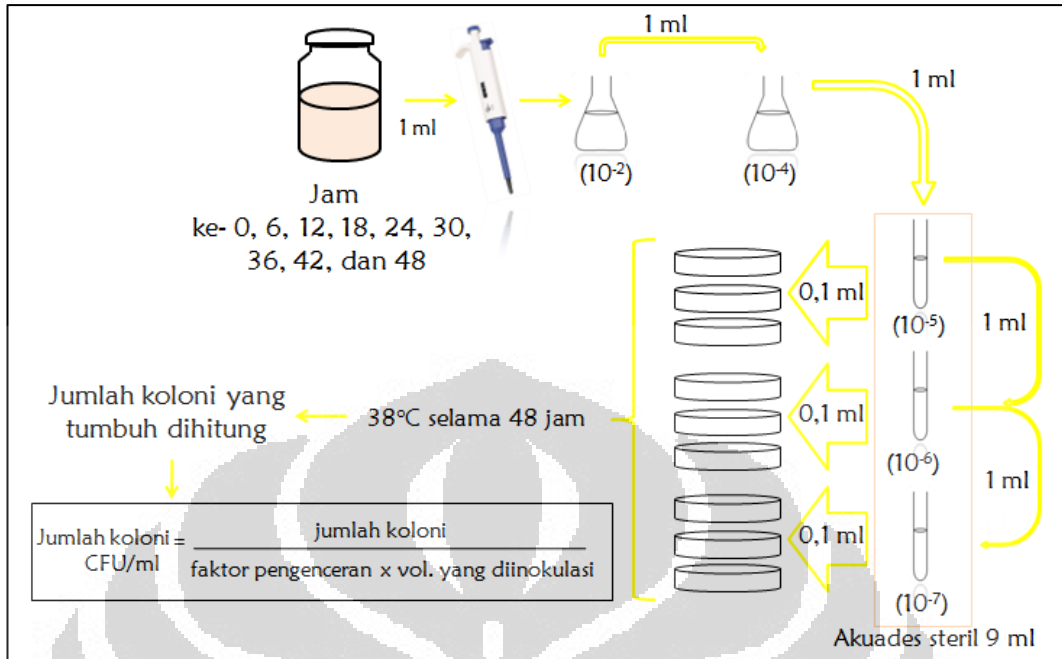
Lampiran 5. Skema pembuatan *backslop*



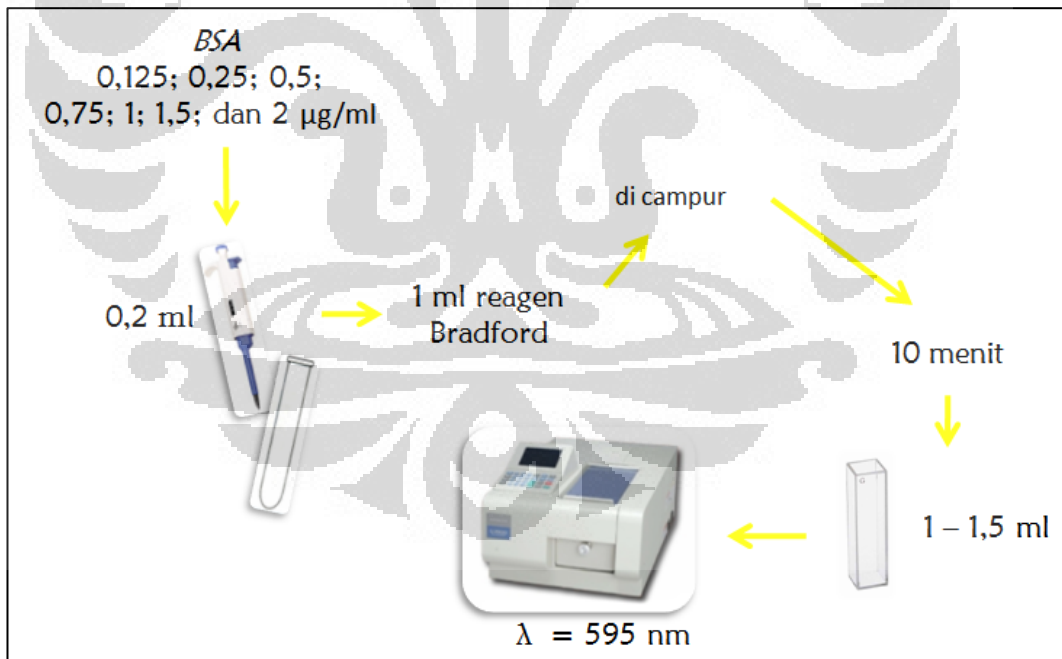
Lampiran 6. Skema fermentasi susu kacang merah



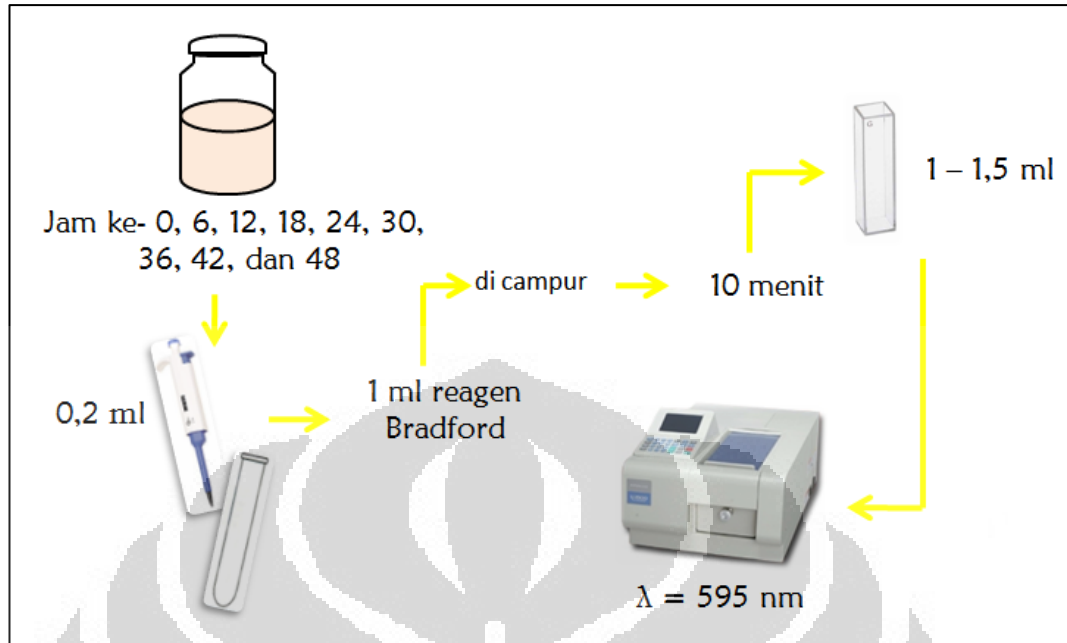
Lampiran 7. Skema perhitungan jumlah koloni bakteri



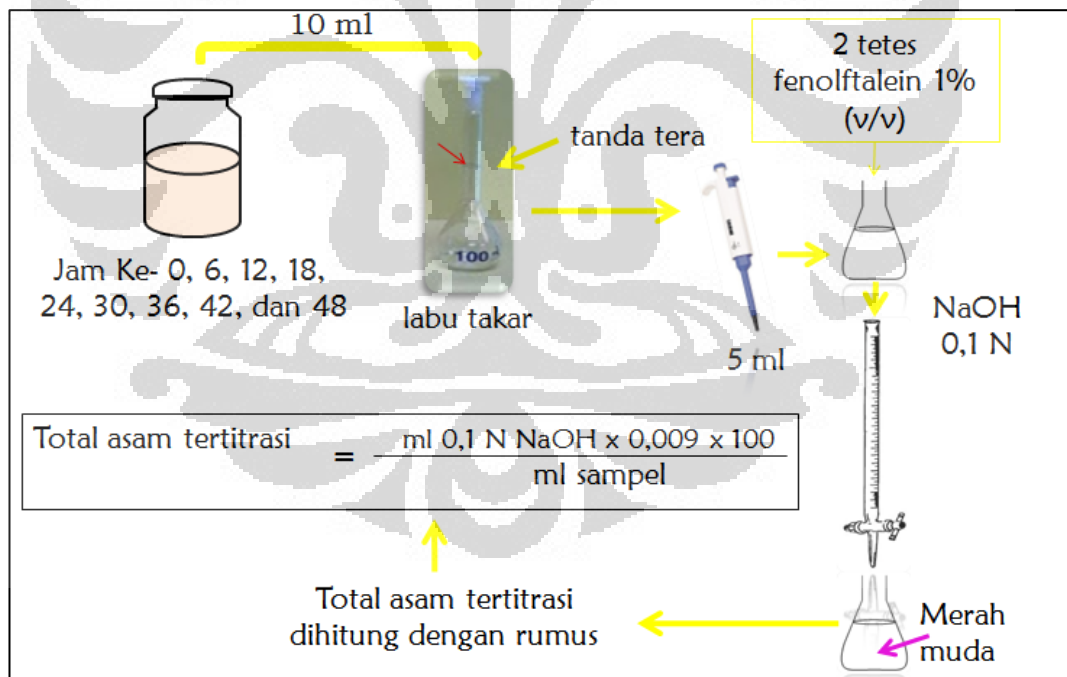
Lampiran 8. Skema pembuatan kurva standar protein



Lampiran 9. Skema pengukuran kadar protein



Lampiran 10. Skema analisis total asam tertitiasi



Lampiran 11. Contoh hasil pengisian kuisioner oleh panelis

(12)

Form Kuisioner Penelitian

Nama : Rizky Priambodo
Usia : 21 tahun

Penelitian ini dilakukan oleh Diana Novia (Bio'07) untuk mengetahui tingkat kesukaan panelis terhadap produ yogurt kacang merah yang telah dihasilkan. Anda diminta untuk menjawab pertanyaan-pertanyaan di bawah ini saat anda mencicipi yogurt dari susu kacang merah yang telah difermentasi selama 48 jam, kemudian disimpan pada suhu dingin selama 24 jam.

Beri nilai dengan kisaran nilai 1--5 (1 = sangat tidak suka, 2 = tidak suka, 3 = sedang, 4 = suka, dan 5 = sangat suka)

1. Bagaimana tingkat kesukaan anda terhadap rasa yang dihasilkan oleh yogurt tersebut:
4
2. Bagaimana tingkat kesukaan anda terhadap aroma yogurt tersebut:
4
3. Bagaimana tingkat kesukaan anda terhadap rasa asam yang dihasilkan oleh yogurt tersebut:
5
4. Bagaimana tingkat kesukaan anda terhadap produk tersebut:
4
5. Apakah anda pernah mengkonsumsi yogurt susu sapi sebelumnya? (Ya/Tidak) Ya Tidak
6. Apakah anda pernah mengkonsumsi yogurt susu kacang kedelai sebelumnya? (Ya/Tidak) Ya Tidak

Terima kasih atas partisipasi dari anda. Kami sangat menghargainya.