

IV. HASIL PENGAMATAN DAN PEMBAHASAN

A. Identifikasi *Lactobacillus plantarum*

Mikroorganisme yang ada di alam memiliki karakteristik morfologi, struktur dan sifat-sifat yang khas. Identifikasi *L. plantarum* dilakukan untuk memastikan tidak terjadi kontaminasi pada isolat yang digunakan sebagai agensia pada tahap formulasi dan fermentasi. Isolat *L. plantarum* yang digunakan berasal dari kultur koleksi LIPI Cibinong. Identifikasi *L. plantarum* didasarkan pada sifat morfologi, dan biokimia bakteri *L. plantarum*. Sifat-sifat isolat yang didapatkan disajikan dalam tabel 6

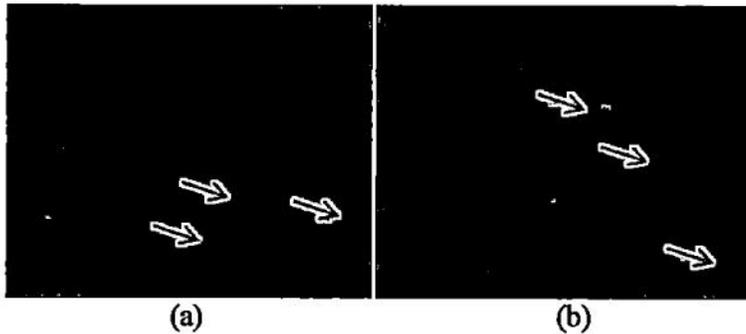
Tabel 6. Karakteristik *Lactobacillus plantarum* hasil uji

Karakteristik	Keterangan
Morfologi sel:	
Bentuk	Batang
Gram	+
Morfologi koloni:	
Warna	Putih susu (kekuningan)
Diameter	± 2 mm
Motilitas	Non motil
Uji biokimiawi:	
Katalase	-
Glukosa	+
Sukrosa	+
Aerobisitas	Fakultatif anaerob

1. Sel bakteri.

Pengamatan terhadap sel bakteri dilakukan setelah pengecatan gram pada isolat, lalu dilihat menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Menurut Arief (2013) *Lactobacillus plantarum* berbentuk batang dan bersifat gram positif. Bakteri Gram positif akan memberikan warna ungu ketika di beri cat Gram.

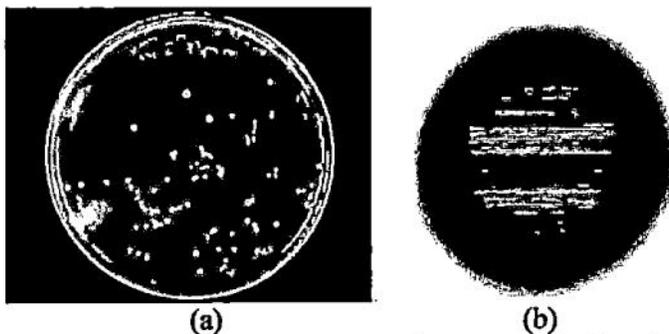
Berdasarkan pengamatan (gambar 3), diketahui bahwa sel berbentuk batang dan dinding sel berwarna biru, terdapat warna merah jingga yang tipis di dalam sel, sehingga dapat disimpulkan bahwa isolat bersifat gram positif.



Gambar 3. Sel *Lactobacillus plantarum* LIPI (a) dan hasil dari identifikasi (b) berbentuk batang dan dinding sel berwarna violet

2. Koloni

Hasil pengamatan menunjukkan bentuk koloni *circular*, elevasi *convex*, bentuk tepi *entire*, struktur dalam *Opaque*, diameter ± 2 mm dan berwarna putih susu/kekuningan (gambar 4). Menurut Yoni dkk. (2010) *L. plantarum* memiliki sifat katalase negatif, Gram positif, bentuk sel basil, heterofermentatif dan homofermentatif, non motil, warna koloni putih susu, tepi koloni *entire*, struktur dalam *opaque*, warna pigmen jernih dan sifat sel fakultatif anaerob.



Gambar 4. Koloni isolat *Lactobacillus plantarum* (a) dan bentuk koloni tunggal *Lactobacillus plantarum* (b)

3. Uji aerobisitas.

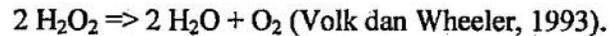
Pengujian aerobisitas dilakukan untuk mengetahui respon pertumbuhan isolat terhadap keberadaan oksigen. Pengujian aerobisitas dilakukan dengan menumbuhkan isolat dalam media MRS *Broth* pada tabung reaksi steril lalu diamati pertumbuhan massa sel bakterinya. Berdasarkan pengamatan (gambar 5), koloni yang tumbuh di sepanjang kedalaman medium tetapi massa sel paling banyak terdapat pada dasar media sehingga isolat bersifat fakultatif anaerob.



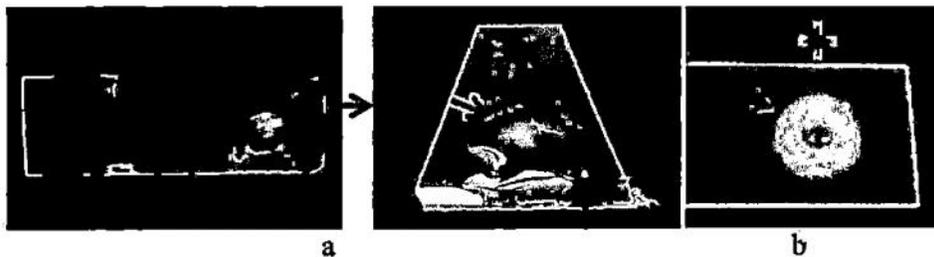
Gambar 5. Hasil uji aerobisitas isolat *Lactobacillus plantarum*

4. Uji katalase

Uji katalase merupakan suatu pengujian terhadap bakteri tertentu untuk mengetahui bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri aerob, anaerob fakultatif, atau anaerob obligat. Bakteri yang memerlukan oksigen menghasilkan hidrogen peroksida yang sebenarnya beracun bagi bakteri sendiri. Namun mereka dapat tetap hidup dengan adanya antimetabolit tersebut karena mereka menghasilkan enzim katalase yang dapat mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen dengan reaksi sebagai berikut :



Reaksi positif uji katalase ditunjukkan dengan membentuk gelembung-gelembung yang berarti ada pembentukan gas Oksigen (O_2) sebagai hasil pemecahan H_2O_2 oleh enzim katalase yang diproduksi oleh bakteri tersebut (gambar 6b). Bakteri asam laktat termasuk bakteri katalase negatif (Yoni, 2010), sehingga hasil reaksi uji katalase tidak terbentuk gelembung udara yang berarti tidak terbentuk gas. Berdasarkan hasil pengamatan (gambar 6a) menunjukkan tidak ada gelembung yang dihasilkan setelah meneteskan kurang lebih 2 tetes H_2O_2 3 % pada kultur yang digoreskan pada kaca preparat sehingga diperoleh hasil katalase isolat *L. plantarum* adalah negatif.

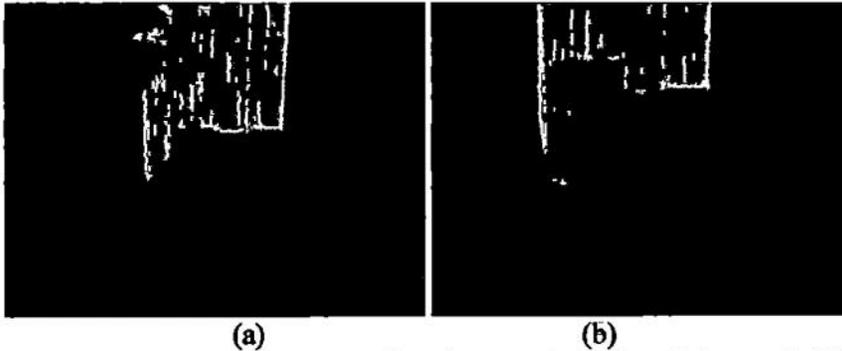


Gambar 6. Hasil uji katalase: (a) isolat *L. plantarum* tidak menunjukkan tidak ada gelembung pada goresan isolat setelah ditetesi H_2O_2 3 %
(b) contoh sampel uji katalase positif

Menurut Yoni (2010), berdasar Bergey's *Manual of Systematic Bacteriology*, kelompok bakteri asam laktat berbentuk batang yang mempunyai katalase negatif dan hasil pengecatan Gram bersifat positif merupakan bakteri asam laktat genus *Lactobacillus*.

5. Uji fermentasi

Pengujian tipe fermentasi dilakukan dengan uji produksi gas. Pada bakteri asam laktat terdapat dua tipe fermentasi, yaitu homofermentasi dan heterofermentasi. Hasil uji fermentasi disajikan pada gambar 7.



Gambar 7. Uji fermentasi pada media sukrosa cair (a) dan glukosa cair (b)

Berdasarkan hasil uji yang diperoleh (gambar 7) isolat *L. plantarum* yang digunakan bersifat homofermentatif, ditandai dengan terjadinya perubahan warna pada larutan sukrosa dan glukosa dari warna *orange* menjadi warna kuning muda serta tidak menghasilkan gas pada tabung Durham. Anonim (2014d) menyatakan fermentasi dari *L. plantarum* bersifat homofermentatif sehingga tidak menghasilkan gas.

Bakteri asam laktat homofermentasi hanya menghasilkan asam laktat sebagai produk utama fermentasinya; sedangkan bakteri asam laktat heterofermentasi selain asam laktat juga menghasilkan etanol, asam lain seperti asam asetat serta gas CO₂. Sehingga apabila bakteri asam laktat yang diuji menghasilkan gas yang tertampung dalam tabung Durham, bakteri asam laktat tersebut dinyatakan sebagai heterofermentatif; sedangkan isolat yang tidak menghasilkan atau memproduksi gas disebut homofermentatif.

6. Perbanyak bakteri *L. plantarum*

Perbanyak bakteri *L. plantarum* bertujuan untuk membuat starter yang kemudian digunakan pada tahap perbanyak dalam berbagai media modifikasi MRS cair dan fermentasi pada penelitian tahap 2. Pertumbuhan massa sel pada media perbanyak diperlihatkan dengan perubahan warna media menjadi kuning keruh (lampiran 4.1 i). Starter harus diuji viabilitasnya untuk mengetahui populasi *L. plantarum* sebelum dinokulasikan pada media perbanyak modifikasi. Uji viabilitas dilakukan dengan metode TPC (lampiran 4.1j). Populasi *L. plantarum* pada starter mencapai $1,7 \times 10^8$ CFU/ml.

B. Tahap 1. Pengembangan *Lactobacillus plantarum* pada berbagai media modifikasi MRS Broth

Evaluasi efektivitas perlakuan media modifikasi terhadap perbanyak *L. plantarum* dinyatakan dalam viabilitas dan perubahan tingkat keasaman (pH) media sampai akhir masa inkubasi, yaitu selama 48 jam disajikan pada tabel 7. Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan secara signifikan jumlah *L. plantarum* pada akhir masa inkubasi tetapi tidak diikuti oleh tingkat keasaman (pH). Kecepatan dan jumlah bakteri *L. plantarum* ditentukan oleh kesesuaian dan kandungan nutrisi yang terdapat pada media perbanyak. Sedangkan perubahan pH media ditentukan oleh aktivitas metabolisme yang dilakukan oleh koloni bakteri *L. plantarum* selama inkubasi pada proses perbanyak.

Tabel 7. Jumlah *L. plantarum* dan nilai pH pada media perbanyakan yang berbeda pada inkubasi jam ke-48.

Pelakuan	Jumlah <i>L. plantarum</i> $10^8 \times \text{CFU/ml}$	pH formulasi rata-rata (%)
MRS <i>Broth</i> 100 %	8,10 b	4,00 a
MRS <i>Broth</i> 50 % + air kelapa 25 % + limbah cair tempe 25 %	8,96 a	4,00 a
Sukrosa 20g + air kelapa 50 % + limbah cair tempe 50 %	8,81 a	4,50 a

Keterangan : - huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata pada uji F $\alpha = 5\%$

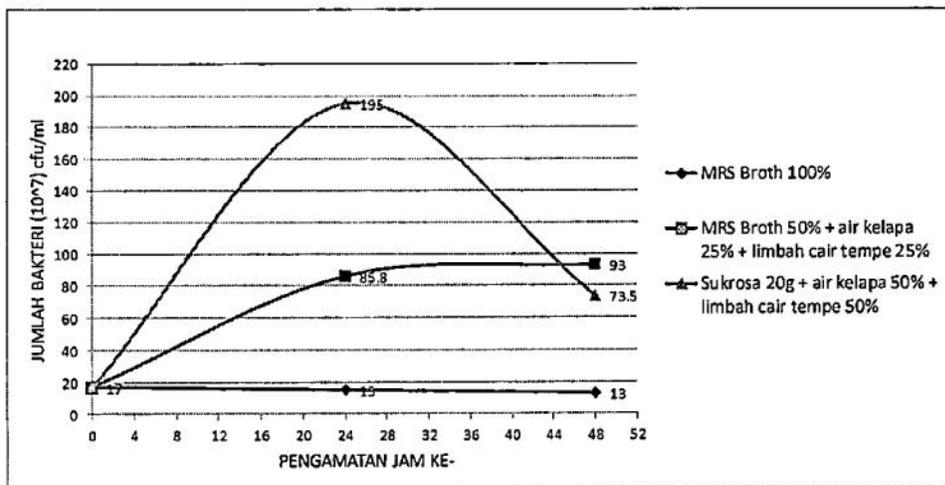
- huruf yang tidak sama menunjukkan ada beda nyata pada uji lanjut DMRT dengan $\alpha = 5\%$.

1. Jumlah *L. plantarum* pada media perbanyakan MRS *Broth* modifikasi

Pengujian viabilitas dilakukan untuk mengetahui efektivitas formulasi media MRS *Broth* modifikasi terhadap pertumbuhan *L. plantarum* yang dinyatakan dengan jumlah dan pola pertumbuhan *L. plantarum* selama inkubasi. Tabel 6 menunjukkan bahwa media modifikasi MRS *Broth* berpengaruh nyata (Lampiran 5a) terhadap jumlah *L. plantarum* selama inkubasi. Hasil sidik ragam jumlah *L. plantarum* menunjukkan perlakuan MRS *Broth* 100 % ($8,10 \times 10^8$ CFU/ml) berbeda nyata dengan perlakuan MRS *Broth* 50 % + air kelapa 25 % + limbah cair tempe 25 % ($8,97 \times 10^8$ CFU/ml) dan Sukrosa 20g + air kelapa 50 % + limbah cair tempe 50 % ($8,81 \times 10^8$ CFU/ml). Tetapi tidak berpengaruh nyata pada perlakuan MRS *Broth* 50 % + air kelapa 25 % + limbah cair tempe 25 % dan Sukrosa 20g + air kelapa 50 % + limbah cair tempe 50 %.

Perbedaan jumlah *L. plantarum* diduga karena kesesuaian dan perbedaan komposisi yang terkandung pada masing-masing perlakuan media. Beberapa penelitian menunjukkan kompleksitas senyawa yang terkandung pada media

akan mempengaruhi proses adaptasi dan metabolisme yang dilakukan oleh mikroorganisme sehingga akan berpengaruh pada kinetika pertumbuhannya. Salah satunya Nahariah *dkk.* (2015) mengungkapkan kemampuan bakteri *L. plantarum* pada telur menunjukkan aktivitas rendah dibandingkan pada produk pangan lainnya, hal ini disebabkan oleh kemampuan *L. plantarum* mengurai senyawa yang ada pada telur lebih kompleks dan membutuhkan waktu adaptasi yang lebih lama. Hal tersebut juga sesuai dengan penelitian Askari (2012) mengenai fermentasi asam laktat pada silase, proses fermentasi bakteri asam laktat akan berlangsung dari beberapa hari hingga beberapa minggu tergantung dari komposisi substrat dan kondisi silase.



Gambar 8. Kurva pertumbuhan *L. plantarum* selama inkubasi pada masing-masing jenis media formulasi.

Perlakuan MRS *Broth* 100 % menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap jumlah *L. plantarum* pada akhir inkubasi. Hal ini diduga karena *L. plantarum* sudah memasuki fase kematian. Hal tersebut terlihat pada kurva pertumbuhan selama masa inkubasi (gambar 8). Kurva pertumbuhan

mendeskripsikan tahapan pertumbuhan mikroorganisme yang secara garis besar terbagi menjadi *lag phase*, *exponential phase*, *stationary phase* dan *death phase*.

Kurva pertumbuhan (gambar 8) menunjukkan bahwa isolat *L. plantarum* pada masing-masing perlakuan mempunyai fase adaptasi (*lag phase*) relatif singkat sehingga tidak tampak pada kurva tersebut. Fase *lag* segera terjadi setelah inokulasi, yaitu fase penyesuaian diri dengan lingkungan baru. Sel akan beradaptasi pada kondisi pH dan nutrisi di lingkungan baru untuk menyesuaikan sistem metabolisme yang akan dilakukan. Terkait dengan hal tersebut diduga karena kondisi pH media perlakuan sama dengan media perbanyakannya sebelumnya dan sumber karbon, nitrogen dan vitamin pada masing-masing perlakuan memenuhi kebutuhan untuk pertumbuhan *L. plantarum*. Tidak adanya fase *lag* yang teramati pada pola pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* dikarenakan bakteri ini sangat mudah beradaptasi pada media yang baru selama media tersebut masih mengandung unsur gula di dalamnya (Agus dkk., (2012). Rintis (2010) mengungkapkan bahwa mikroorganisme mereorganisasi komponen molekularnya pada saat menyerap nutrisi baru. Komposisi dan jenis nutrisi akan mempengaruhi jenis enzim yang disintesa, enzim yang dibutuhkan akan dibentuk, enzim yang tidak diperlukan akan ditekan. "Mesin" proses di dalam sel menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan baru. Perubahan ini akan terefleksikan dalam mekanisme sel melalui pengaturan proses metabolisme.

Lag phase selanjutnya diikuti peningkatan laju pertumbuhan sel sampai mencapai percepatan pertumbuhan maksimal dalam *logarithmic* atau *exponential phase*. Viabilitas *L. plantarum* pada perlakuan MRS Broth 100 % menunjukkan

tren pertumbuhan yang menurun setiap waktu pengamatan, yaitu 15×10^7 CFU/ml (24 jam) dan 13×10^7 CFU/ml (48 jam). Hal ini diduga *L. plantarum* telah mengalami fase *log* dan stasioner, lalu masuk fase kematian pada rentang waktu 0-24 jam. Komposisi nutrisi media yang lengkap dan berimbang pada media MRS memungkinkan laju pertumbuhan sel *L. plantarum* mencapai percepatan maksimal pada rentang waktu tersebut. Selanjutnya karena percepatan pertumbuhan yang tinggi diduga kandungan nutrisi berkurang secara sinergis dan terjadi penumpukan beberapa produk metabolit sekunder yang bertindak sebagai inhibitor mengakibatkan kematian pada isolat *L. plantarum* yang ditandai dengan penurunan populasi.

Media MRS merupakan media selektif yang sangat tepat untuk menumbuhkan bakteri *L. plantarum*. Sodium asetat dan ammonium sitrat pada pH rendah bertindak sebagai selektif agen dan sumber energi dapat menghambat sebagian mikroorganisme, tetapi memungkinkan pertumbuhan *Lactobacillus* sp. (Condalab, 2014). Pepton, ekstrak daging, dan ekstrak ragi adalah sumber karbon, nitrogen, dan vitamin untuk memenuhi kebutuhan pertumbuhan *Lactobacillus* sp. Dextrosa adalah gula hasil fermentasi karbohidrat. Kalium Fosfat adalah agen *buffering*. Magnesium Sulfat dan Mangan Sulfat menyediakan kation yang digunakan dalam metabolisme. Polisorbat 80 adalah surfaktan, memfasilitasi penyerapan nutrisi oleh *Lactobacillus* sp (Fluka, 2014). Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Yuliana (2008), pada fase *logaritmik* mikroba membelah dengan cepat dan konstan, pada fase ini kecepatan pertumbuhan sangat

dipengaruhi oleh media tempat tumbuhnya seperti pH dan kandungan nutrisi, juga kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembaban udara.

Perlakuan MRS *Broth* 50 % + air kelapa 25 % + limbah cair tempe 25 % dan Sukrosa 20g + air kelapa 50 % + limbah cair tempe 50 % mengalami fase *log* pada rentang waktu 0 sampai 24 jam tetapi menunjukkan laju pertumbuhan yang berbeda (gambar 8). Selain laju pertumbuhan yang berbeda, jumlah populasi yang dicapai pada titik pertumbuhan maksimumnya juga berbeda yaitu $85,8 \times 10^7$ CFU/ml dan 195×10^7 CFU/ml. Hal tersebut diduga karena komposisi nutrisi yang berbeda pada kedua perlakuan khususnya senyawa gula yang berfungsi sebagai sumber energi untuk metabolisme dan pertumbuhan *L. plantarum*. *L. plantarum* adalah mikroorganisme kemotrof. Mikroorganisme kemotrof mendapatkan sumber energi berasal dari oksidasi senyawa organik seperti glukosa atau senyawa anorganik seperti H_2S atau $NaNO_2$ (Yanti, 2014).

Pada perlakuan MRS *Broth* 50 % + air kelapa 25 % + limbah cair tempe 25 % mengandung gula sebanyak 1,55 % (v/v) sedangkan pada perlakuan Sukrosa 20g + air kelapa 50 % + limbah cair tempe 50 % mengandung gula sebanyak 2,35 % (v/v) sehingga diduga perbedaan laju pertumbuhan dan jumlah populasi *L. plantarum* (gambar 8) karena perbedaan kandungan gula yang digunakan sebagai sumber energi untuk pertumbuhan *L. plantarum* pada kedua media tersebut. Selain itu pada air kelapa juga kaya akan hormon, asam amino bebas dan vitamin yang dapat memacu pertumbuhan *L. plantarum*. Sedangkan pada limbah cair tempe kaya akan protein (1,72 %) yang memenuhi kebutuhan N untuk pertumbuhan *L. plantarum*. Diduga dengan perbedaan volume air kelapa dan

limbah cair tempe pada kedua perlakuan menyebabkan perbedaan laju pertumbuhan dan jumlah populasi *L. plantarum*.

Selanjutnya pada rentang waktu 24-48 jam menunjukkan perbedaan pertumbuhan pada masing-masing perlakuan. Perlakuan MRS *Broth* 50 % + air kelapa 25 % + limbah cair tempe 25 % memasuki fase pertumbuhan lambat. Hal tersebut terlihat dari perubahan kurva pertumbuhan (gambar 8) dengan peningkatan jumlah populasi yang lebih sedikit, yaitu menjadi 93×10^7 CFU/ml. Fase pertumbuhan lambat yaitu fase dimana zat nutrisi di dalam medium sudah sangat berkurang dan adanya hasil-hasil metabolisme yang mungkin beracun atau dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Rintis (2010) mengungkapkan fase perlambatan pertumbuhan terjadi karena berkurangnya konsentrasi satu atau lebih nutrisi esensial dan terakumulasinya produk yang bersifat toksik terhadap pertumbuhan. Perubahan lingkungan yang cepat menyebabkan terjadinya *imbalance growth*. Pada fase eksponensial sistem pengendali proses metabolisme seluler ditunjukkan menghasilkan laju reproduksi yang maksimum namun pada fase perlambatan pertumbuhan tekanan yang diakibatkan oleh terbatasnya nutrisi dan lingkungan yang toksik akan merubah sistem pengendali proses metabolisme seluler agar bisa tetap bertahan pada kondisi yang tidak menguntungkan.

Perlakuan Sukrosa 20g + air kelapa 50 % + limbah cair tempe 50 % memasuki fase stasioner dan kematian pada rentang waktu 24-48 jam. Hal tersebut ditunjukkan oleh penurunan jumlah populasi *L. plantarum* menjadi $73,5 \times 10^7$ CFU/ml (gambar 8). Hal tersebut diduga karena kandungan nutrisi esensial pada media perlakuan yang berfungsi dalam pertumbuhan sudah tidak ada sehingga sel

mengalami kematian. Fase stasioner diduga terjadi dalam waktu yang relatif singkat pada rentang waktu 24-48 jam inkubasi. Lama fase stasioner yang terjadi tidak dapat diduga karena tidak dilakukan pengamatan jumlah bakteri selama rentang waktu tersebut. Rintis (2010) mengungkapkan setelah fase perlambatan pertumbuhan selesai dimulailah fase stasioner. Pada fase ini laju pertumbuhan adalah nol (tidak ada pembelahan sel) atau laju pertumbuhan sama dengan laju kematian. Konsentrasi massa sel tetap, namun jumlah sel yang hidup akan berkurang, terjadi lisis sel dan sebagian sel dapat tumbuh pada produk hasil lisis sel tersebut. Walaupun laju pertumbuhan adalah nol selama fase stasioner tetapi metabolisme sel masih aktif dan menghasilkan metabolit sekunder, sebagai hasil dari perubahan pengendalian selular karena terbatasnya konsentrasi nutrisi esensial. Produksi metabolit sekunder (antibiotik, hormon) justru meningkat pada fase stasioner. Selama fase stasioner, sel mengkatabolisme nutrisi yang tersimpan dalam sel (*endogenous metabolism*) sehingga diperoleh energi (*maintenance energy*) untuk pemeliharaan membran sel, transportasi nutrisi, gerak dan perbaikan struktur sel yang rusak. Pertumbuhan mikroba akan terhenti selain disebabkan oleh terbatasnya konsentrasi nutrisi esensial dan terakumulasinya produk yang bersifat toksik juga disebabkan oleh terbentuknya produk yang menghambat pertumbuhan.

Kandungan gula, protein, asam amino, vitamin, hormon, dan nutrisi lain yang terkandung pada perlakuan Sukrosa 20g + air kelapa 50 % + limbah cair tempe 50 % diduga telah dimanfaatkan untuk pertumbuhan maksimal *L. plantarum*. Sehingga terjadi penumpukan metabolisme sekunder yang

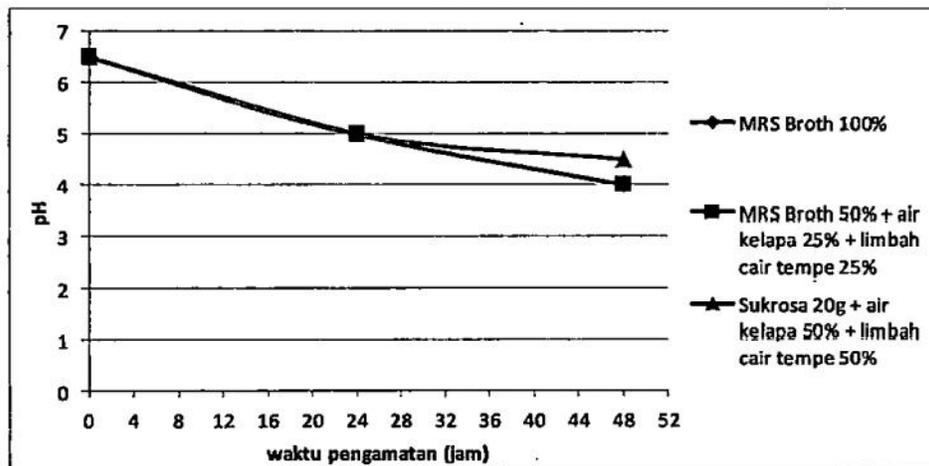
menghambat pertumbuhan *L. plantarum* dan mengakibatkan kematian. Perbedaan kandungan nutrisi pada masing-masing media perlakuan menyebabkan laju pertumbuhan yang berbeda. Semakin cepat laju pertumbuhan menunjukkan semakin tinggi jumlah *L. plantarum*, sehingga semakin banyak nutrisi yang digunakan dalam metabolisme sehingga fase kematian semakin cepat dicapai seiring terbatasnya nutrisi yang tersedia dan penumpukan inhibitor atau racun hasil dari metabolisme sekunder. Rintis (2010) mengungkapkan fase kematian kemudian akan terjadi setelah fase stasioner. Namun kematian sel sebenarnya telah terjadi selama fase stasioner sehingga batas yang jelas untuk kedua fase tersebut tidak ada

2. pH media modifikasi MRS Broth

Pengamatan pH berfungsi sebagai indikator pertumbuhan *L. plantarum* pada media modifikasi MRS Broth. Perubahan pH menunjukkan aktivitas metabolisme *L. plantarum* terkait dengan komposisi nutrisi yang dimiliki oleh masing-masing media. Anonim (2014e) menyatakan *Lactobacillus plantarum* bersifat toleran terhadap garam, memproduksi asam dengan cepat dan memiliki pH optimal 5,3 hingga 5,6. Oleh karena itu pH awal masing-masing media diatur pada $6,5 \pm 0,2$ sesuai dengan pH standar media MRS sehingga pada kisaran pH tersebut ketersediaan nutrisi bagi *L. plantarum* pada fase adaptasi optimal dan dapat tumbuh dengan baik pada kisaran pH optimalnya. Media de Man, Rogosa dan Sharpe (MRS) adalah media selektif untuk menumbuhkan bakteri *Lactobacillus*. Media MRS sangat tepat untuk pertumbuhan bakteri asam laktat,

termasuk *Lactobacillus* sp, *Pediococcus* sp, dan *Leuconostoc* sp. (Condalab, 2014).

Tabel 7 menunjukkan kadar pH pada akhir masa inkubasi yaitu 48 jam. Perlakuan media pada perbanyakan *L. plantarum* menunjukkan penurunan pH tidak berbeda nyata (lampiran 5b). Hal tersebut menandakan pertumbuhan dan aktivitas metabolisme *L. plantarum* pada masing-masing media perbanyakan tidak berpengaruh nyata terhadap penurunan pH pada akhir masa inkubasi. Penurunan pH selama tahap perbanyakan pada media modifikasi MRS *Broth* dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9. Grafik penurunan pH media selama tahap perbanyakan

Peningkatan tingkat keasaman menjadi 4 pada perlakuan 100 % media MRS *Broth*, pH 4 pada perlakuan 50 % MRS *Broth* + 25 % air kelapa + 25 % limbah cair tempe, dan kadar pH 4,5 pada perlakuan Sukrosa 20g + 50 % air kelapa + 50 % air kelapa, disebabkan oleh aktivitas metabolisme *L. plantarum* secara homofermentatif yang mengubah karbohidrat atau gula pada masing-masing media perbanyakan menjadi energi untuk pertumbuhan, asam laktat, air,

serta produk akhir lainnya. Nahariah dkk., (2013) menyatakan *L. plantarum* mampu merombak senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan hasil akhirnya yaitu asam laktat. Asam laktat dapat menghasilkan pH yang rendah pada substrat sehingga menimbulkan suasana asam.

Asam laktat sebagai produk utama fermentasi mudah terdisosiasi menghasilkan H^+ dan $CH_3CHOHCOO^-$. Adanya ion H^+ semakin mempengaruhi nilai pH, semakin banyak asam laktat yang dihasilkan maka konsentrasi ion H^+ semakin meningkat dan terukur dipengukuran pH. Akumulasi asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat dapat menurunkan pH media fermentasi. Nilai pH yang terhitung merupakan konsentrasi H^+ yang terbebaskan selama proses fermentasi (Azmi, 2015).

C. Tahap 2. Fermentasi tepung *MOCAF*

Identifikasi kemampuan *L. plantarum* hasil perbanyakan menggunakan media modifikasi *MRS Broth* dalam fermentasi singkong untuk pembuatan tepung *MOCAF* dinyatakan melalui perhitungan total bakteri selama fermentasi dan hasil metabolismenya antara lain pengukuran pH (Tabel 8), kadar protein, kadar karbohidrat, kadar HCN, Kadar Abu, Kadar Air, Kadar, dan Uji Organoleptik meliputi aroma, tekstur, derajat keputihan, dan besar butiran yang terbentuk selama proses fermentasi (Tabel 9). Hasil pengamatan jumlah bakteri dan pH yang dianalisis menggunakan analisis sidik ragam dan uji lanjut DMRT dengan taraf kesalahan 5 % menunjukkan adanya pengaruh nyata perlakuan terhadap viabilitas *L. plantarum* selama proses fermentasi tetapi tidak memberika pengaruh nyata pada tingkat keasaman (pH) (lampiran 5c, 5d).

Tabel 8. Jumlah *L. plantarum* dan nilai pH fermentasi

Pelakuan	Jumlah <i>L. plantarum</i> ($10^7 \times$ CFU/ml)	pH formulasi rata-rata (%)
MRS <i>Broth</i> 100 %	6,99 b	3,00 a
MRS <i>Broth</i> 50 % + air kelapa 25 % + limbah cair tempe 25 %	7,45 a	3,00 a
Sukrosa 20g + air kelapa 50 % + limbah cair tempe 50 %	7,04 ab	3,00 a

Keterangan : - huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata pada uji F $\alpha = 5\%$

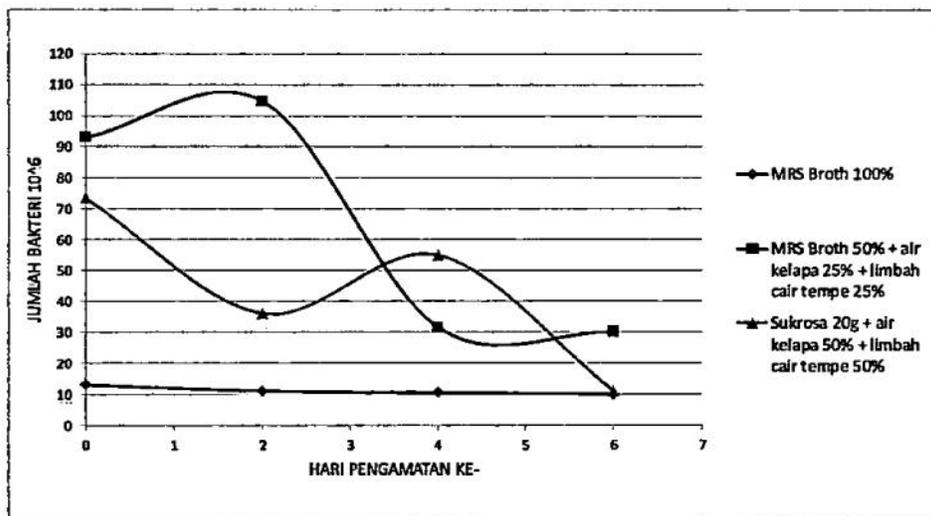
- huruf yang tidak sama menunjukkan ada beda nyata pada uji lanjut DMRT dengan $\alpha = 5\%$.

Perbedaan viabilitas pada masing-masing perlakuan diduga disebabkan oleh jumlah inokulum yang diberikan pada awal fermentasi dan kemampuan adaptasi *L. plantarum* pada media fermentasi. Sedangkan tidak adanya pengaruh yang signifikan perlakuan terhadap pH menunjukkan aktifitas fermentasi *L. plantarum* yang terjadi pada tingkat yang sama.

1. Jumlah bakteri *L. plantarum* pada fermentasi tepung *MOCAF*

Pengujian viabilitas dilakukan untuk mengetahui aktivitas fermentasi *L. plantarum* hasil dari perbanyakan media modifikasi MRS *Broth* terhadap mutu tepung *MOCAF* yang dihasilkan yang dinyatakan dengan jumlah dan pola pertumbuhan *L. plantarum* selama fermentasi. Tabel 7 menunjukkan bahwa perlakuan media modifikasi MRS *Broth* berpengaruh nyata terhadap jumlah *L. Plantarum* selama fermentasi (lampiran 5c). Hasil sidik ragam jumlah bakteri selama fermentasi menunjukkan jumlah *L. plantarum* pada perlakuan MRS *Broth* 100 % ($6,99 \times 10^7$ CFU/ml) berbeda nyata dengan perlakuan MRS *Broth* 50 % + air kelapa 25 % + limbah cair tempe 25 % ($7,45 \times 10^7$ CFU/ml) dan Sukrosa 20g + air kelapa 50 % + limbah cair tempe 50 % ($7,04 \times 10^7$ CFU/ml).

Perbedaan jumlah bakteri *L. plantarum* pada akhir masa fermentasi diduga disebabkan oleh jumlah inokulum yang diberikan berbeda pada awal fermentasi serta fase pertumbuhan yang dimiliki oleh inokulum pada fase yang berbeda. Hal tersebut akan mempengaruhi laju pertumbuhan dan jumlah sel *L. plantarum* yang aktif melakukan fermentasi hingga akhir pengamatan yang dinyatakan dalam kurva pertumbuhannya (gambar 10).



Gambar 10. Kurva pertumbuhan *L. plantarum* selama proses fermentasi.

Pada rentang waktu 0-2 hari fermentasi menunjukkan *L. plantarum* pada perlakuan MRS *Broth* 100 % dan Sukrosa 20g + air kelapa 50 % + limbah cair tempe 50 % mengalami fase *lag*. Berbeda dengan perlakuan MRS *Broth* 50 % + air kelapa 25 % + limbah cair tempe 25 % mengalami fase logaritmik. Hal ini diduga karena inokulum yang diberikan dari media perbanyakannya pada fase pertumbuhan yang berbeda sehingga mempengaruhi fase *lag* dan pertumbuhannya di media yang baru. Happy (2012) mengungkapkan sel akan beradaptasi pada kondisi pH dan nutrisi di lingkungan baru untuk menyesuaikan sistem metabolisme yang akan dilakukan. Lama fase *lag* bervariasi tergantung kepada

umur dan jumlah inokulum. Selanjutnya aktivitas metabolisme yang akan menambah jumlah sel terjadi pada akhir fase adaptasi.

L. plantarum pada perlakuan MRS *Broth* 100 % dan Sukrosa 20g + air kelapa 50 % + limbah cair tempe 50 % yang digunakan sebagai inokulum untuk fermentasi singkong mengalami fase kematian pada media perbanyakan (gambar 9) sehingga saat digunakan sebagai inokulum fermentasi singkong memerlukan waktu untuk adaptasi pada substrat yang baru dan melakukan metabolisme untuk pertumbuhan. Sedangkan pada perlakuan MRS *Broth* 50 % + air kelapa 25 % + limbah cair tempe 25 % berada pada fase pertumbuhan lambat, yaitu fase dimana pertumbuhan bakteri mulai terhambat oleh metabolit sekunder tetapi masih terdapat nutrisi pada media perbanyakan. Diduga *L. plantarum* dari perlakuan MRS *Broth* 50 % + air kelapa 25 % + limbah cair tempe 25 % masih aktif membelah diri dan tidak memerlukan waktu lama untuk beradaptasi dengan memanfaatkan nutrisi yang terkandung pada media perbanyakan lalu melakukan metabolisme pada substrat baru untuk pertumbuhannya. Menurut Purwoko (2007) bakteri dapat meneruskan perbanyakan sel di media baru karena bahan pembawa mampu menyediakan nutrisi yang sama dengan media lama.

Pada rentang waktu 2-6 hari fermentasi, perlakuan MRS *Broth* 50 % + air kelapa 25 % + limbah cair tempe 25 % telah memasuki pertumbuhan maksimal dan memasuki fase kematian dilanjutkan kematian diperlambat (gambar 9). Hal ini diduga karena nutrisi tersedia dari singkong yang bertindak sebagai substrat berkurang dan telah terjadi penumpukan metabolit sekunder yang bertindak sebagai inhibitor. Sedangkan pada perlakuan Sukrosa 20g + air kelapa 50 % +

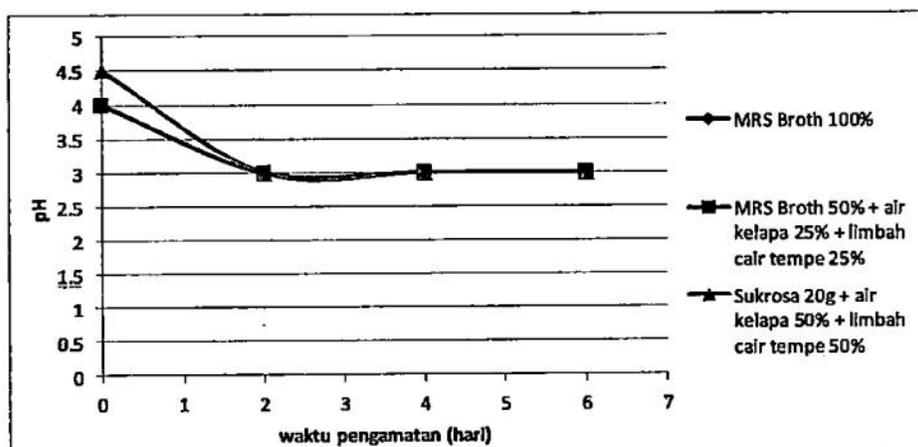
limbah cair tempe 50 % selama 2-6 hari *L. plantarum* mengalami fase *logaritmik* diikuti dengan fase kematian. Hal tersebut diduga *L. plantarum* telah menyesuaikan dengan substrat dan kondisi lingkungan disekitarnya, melakukan metabolisme dengan menghidrolisis pati pada singkong menjadi gula sederhana yang digunakan sebagai sumber energi, lalu sel mulai membelah dengan kecepatan yang lambat menuju fase *logaritmik* *L. plantarum* membelah dengan cepat dan konstan. Setelah melewati fase *logaritmik*nya *L. plantarum* mengalami penurunan jumlah populasi dan memasuki fase kematian sampai dengan hari keenam fermentasi.

Berdasarkan aktivitas *L. plantarum* pada perlakuan MRS Broth 50 % + air kelapa 25 % + limbah cair tempe 25 % dan perlakuan Sukrosa 20g + air kelapa 50 % + limbah cair tempe 50 % dalam fermentasi singkong menjadi tepung *MOCAF*, dapat diketahui bahwa *L. plantarum* mengalami proses pertumbuhan *eksponensial* dan fase kematian berlangsung selama 4 hari. Hal ini sidik ragam jumlah bakteri menunjukkan *L. plantarum* aktif melakukan fermentasi dalam rangka mengekstraksi senyawa kompleks pada singkong menjadi senyawa yang lebih sederhana dan meningkatkan nilai mutu tepung *MOCAF* selama rentang waktu tersebut.

2. Tingkat keasaman (pH) selama fermentasi

Pengukuran pH bertujuan untuk menduga aktifitas *L. plantarum* dalam memfermentasi singkong menjadi tepung *MOCAF*. Hasil sidik ragam tingkat keasaman selama fermentasi menunjukkan tidak ada pengaruh yang signifikan

antara *L. plantarum* yang berasal dari hasil perbanyakan menggunakan perlakuan MRS Broth 100 %, MRS Broth 50 % + air kelapa 25 % + limbah cair tempe 25 %, dan Sukrosa 20g + air kelapa 50 % + limbah cair tempe 50 % terhadap penurunan pH selama fermentasi (lampiran 5d). Penggunaan *L. plantarum* dalam fermentasi ubikayu dapat menurunkan pH dari 4,5 menjadi 3 (gambar 11).



Gambar 11. Grafik perubahan pH selama fermentasi tepung *MOCAP*

Hal ini menunjukkan bahwa *L. plantarum* termasuk mikroorganisme asidofilik, yaitu makhluk hidup yang mampu berkembang dalam kondisi yang sangat asam. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Ary dkk. (2013) bahwa ragi roti, ragi tempe, dan *L. plantarum* termasuk mikroorganisme sidofilik, pH 2-5. Penurunan pH tidak berpengaruh signifikan terhadap penelitian ini karena tidak diikuti dengan jumlah sel terbanyak, dan nilai proksimat produk.

Asam laktat dapat menghasilkan pH yang rendah pada substrat sehingga menimbulkan suasana asam. Hartono (2013) mengungkapkan bahwa asam yang terukur dari pH meter adalah konsentrasi ion-ion H^+ yang menunjukkan jumlah asam terdisosiasi, sehingga tidak mewakili asam yang terdapat pada produk

sesungguhnya, sedangkan asam yang terukur dengan titrasi adalah semua komponen asam. Ion H^+ diperoleh dari disosiasi ikatan kovalen asam laktat.

3. Analisis Proksimat Tepung *MOCAF*

Analisis proksimat pada produk pangan untuk mengetahui kandungan gizi yang terkandung didalamnya, peranan dan fungsi tiap komponen nutrisi dalam pembentukan biomolekul dan dapat digunakan sebagai analisis biologis dan pencegahan penyakit. Analisis proksimat tepung *MOCAF* merupakan analisis bahan makanan yang bertujuan menentukan komponen bahan makanan dan kadarnya terkait dengan kualitas tepung *MOCAF* dibandingkan dengan standar mutu yang berlaku. Penentuan kualitas berkaitan dengan nilai gizi yang terkandung dalam tepung *MOCAF* hasil fermentasi menggunakan *L. plantarum* yang dikembangkan pada berbagai media perbanyak alternatif. Tepung *MOCAF* hasil fermentasi dikelompokkan menjadi tepung *MOCAF* A; hasil fermentasi perlakuan MRS *Broth* 100 %; tepung *MOCAF* B; hasil fermentasi perlakuan MRS *Broth* 50 % + air kelapa 25 % + limbah cair tempe 25 %; tepung *MOCAF* C; hasil fermentasi perlakuan Sukrosa 20g + air kelapa 50 % + limbah cair tempe 50 %.

Hasil penelitian menunjukkan perlakuan MRS *Broth* 50 % + air kelapa 25 % + limbah cair tempe 25 % menunjukkan nilai mutu tepung *MOCAF* paling mendekati standar mutu yang berlaku dengan kadar protein tertinggi 1,86 % b/b, kadar HCN terendah 2,39 ppm, kadar karbohidrat terendah 81,41 % b/b, kadar serat 4,17 % b/b, kadar air 2,47 % b/b, kadar abu tertinggi 0,26 % b/b, aroma

netral, tekstur halus, dan warna tepung putih. Hasil analisis proksimat tepung *MOCAF* dibandingkan dengan SNI dan Codex Stan 176 disajikan dalam tabel 9.

Tabel 9. Data perbandingan mutu tepung *MOCAF* hasil fermentasi

Kriteria Uji	Satuan	Perlakuan			SNI	Codex Stan 176
		A	B	C		
Kadar Karbohidrat (b/b)	%	85,77 b	81,41 c	87,18 a	Maks. 77,9	Maks. 15
Kadar Serat (b/b)	%	5,64 a	4,17 a	2,00 a	Maks. 2,0	1,9 - 3,4
Kadar Abu (b/b)	%	0,22 a	0,26 a	0,14 b	Maks. 1,5	Maks. 0,2
Kadar Air (b/b)	%	2,47 ab	2,74 a	2,26 b	Maks. 13	Maks. 13
Kadar Protein (b/b)	%	1,12 a	1,86 b	1,32 c		Min. 1,0
Kadar HCN	ppm	3,39 a	2,39 a	2,41 a	Maks. 10	Maks. 14
Tekstur		Halus	Halus	Halus	Halus	Halus
Aroma		Netral	Netral	Netral	Netral	Netral
Warna		Putih	Putih	Putih	Putih	Putih

Keterangan : - Huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata pada uji F $\alpha = 5\%$
 - Huruf yang sama menunjukkan ada beda nyata pada uji lanjut DMRT dengan $\alpha = 5\%$.
 - A = MRS *Broth* 100 %; B = MRS *Broth* 50 % + air kelapa 25 % + limbah cair tempe 25 %; C = Sukrosa 20g + air kelapa 50 % + limbah cair tempe 50 %.

a. Analisis Kadar Karbohidrat

Karbohidrat merupakan hasil sintesa CO_2 dan H_2O dan mengalami polimerisasi menjadi pati dan senyawa-senyawa bermolekul besar lain yang menjadi cadangan makanan pada tanaman. Nama karbohidrat dipergunakan pada senyawa-senyawa tersebut mengingat rumus empirisnya berupa $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_n$ yaitu karbon yang mengalami hidratisasi. Karbohidrat dapat digolongkan menjadi dua macam yaitu karbohidrat sederhana dan karbohidrat kompleks. Atau secara alami ada tiga bentuk karbohidrat terpenting yaitu monosakarida, oligosakarida, dan polisakarida (Sudarmadji, 2007).

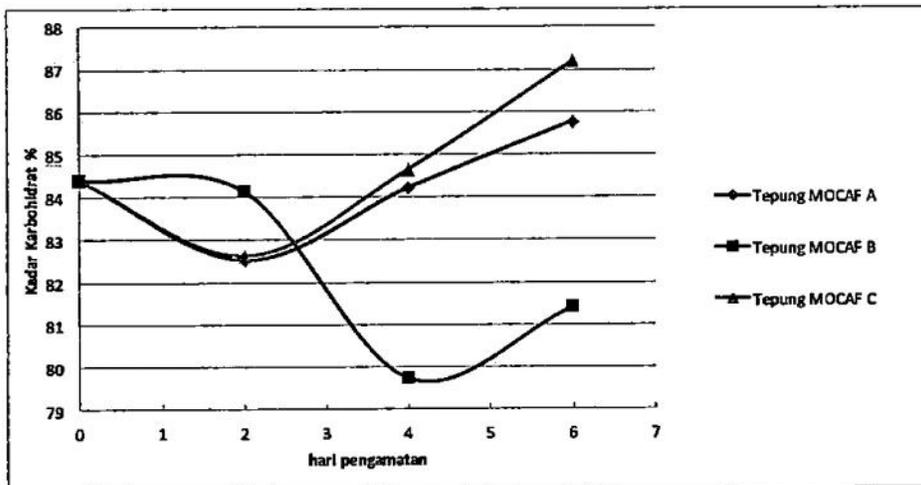
Polisakarida merupakan senyawa makromolekul yang terbentuk dari banyak sekali unit monosakarida. Sebagian polisakarida membentuk struktur

tanaman yang tidak dapat larut misalnya selulosa dan hemiselulosa. Sebagian lagi membentuk senyawa cadangan berbentuk pati pada tanaman. Pati disusun oleh polisakarida berupa amilosa dan amilopektin. Selain pati dalam karbohidrat juga terdapat serat kasar. Serat kasar adalah senyawa yang tidak dapat dicerna dan mengandung senyawa selulosa, lignin serta zat lain yang belum teridentifikasi dengan pati (Sudarmadji, 2007).

Hasil analisis dalam penelitian ini (tabel 9), karbohidrat mewakili nilai total gula yang tereduksi, pati, dan serat kasar yang terkandung pada tepung *MOCAF*. Menurut BPOM (2005) total karbohidrat meliputi gula, pati, serat pangan dan komponen karbohidrat lain. Dalam penelitian ini analisis karbohidrat dilakukan untuk menduga perubahan kimiawi yang dialami karbohidrat singkong selama proses fermentasi yang dilakukan *L. plantarum* yang telah dikembangkan pada berbagai macam media perlakuan. Fermentasi yang dilakukan oleh *L. plantarum* bertujuan untuk mendapatkan energi dengan hasil akhir asam laktat. Karbohidrat merupakan sumber energi paling besar. Karbohidrat atau amilum awalnya akan diurai oleh amilase menjadi maltosa atau disakrida. Oleh enzim maltase, maltosa akan diubah menjadi 2 molekul glukosa. Glukosa inilah yang kemudian masuk siklus Krebs menghasilkan energi (ATP).

Hasil analisis sidik ragam uji karbohidrat dan uji lanjut DMRT dengan taraf kesalahan 5 % (lampiran 5e) menunjukkan pengaruh yang sangat signifikan terhadap jumlah karbohidrat pada masing-masing perlakuan. Perlakuan Tepung *MOCAF C* menunjukkan nilai tertinggi dengan karbohidrat

terkandung sebanyak 87,18 % diikuti dengan perlakuan Tepung *MOCAF* A 85,77 % dan yang terendah perlakuan Tepung *MOCAF* B sebesar 81,41 % (tabel 8). Hal tersebut diduga karena aktivitas respirasi glukosa yang dilakukan oleh *L. plantarum* terkait perbedaan jumlah populasi pada masing-masing perlakuan berbeda (gambar 10). Jumlah populasi pada masing-masing perlakuan menyebabkan jumlah substrat yang dirombak diikuti dengan gula yang dihasilkan dan yang dimanfaatkan untuk pertumbuhan berbeda. Semakin tinggi jumlah populasi *L. plantarum* membutuhkan energi yang semakin tinggi untuk tumbuh, hal tersebut menyebabkan jumlah aktivitas metabolisme yang dilakukan semakin tinggi dan dapat menurunkan jumlah karbohidrat yang terkandung. Gula sederhana, seperti glukosa menyimpan energi yang akan digunakan oleh sel Nurlaeli (2011). Hal tersebut terlihat pada perubahan kadar karbohidrat yang teranalisis dan disajikan pada gambar 12.



Gambar 12. Grafik perubahan jumlah karbohidrat tepung *MOCAF* selama fermentasi

Bila dibandingkan, analisis kadar serat tidak berbeda nyata tetapi terdapat perbedaan yang signifikan pada uji karbohidrat. Hal ini diduga kadar karbohidrat yang teranalisis merupakan gula yang tereduksi, dan pati yang terkandung dalam tepung *MOCAF*. Pada saat fermentasi, substrat berupa senyawa gula sederhana dan gula kompleks yang terkandung dalam singkong terhidrolisis secara enzimatik oleh *L. plantarum*. Gula karbohidrat tersebut meliputi monosakarida dan oligosakarida, kecuali sukrosa (Yona, dkk., 2004). Monosakarida berupa glukosa dan fruktosa jumlahnya sangat sedikit di alam (Sudarmadji, 2007). Untuk memenuhi kebutuhan energi dari gula sederhana berupa glukosa dan fruktosa diperoleh dari hidrolisis oligosakarida dan polisakarida berupa pati.

Hidrolisis Sukrosa akan menghasilkan 2 mol gula reduksi berupa glukosa dan fruktosa. Proses hidrolisis yang dapat dituliskan dengan persamaan reaksi: $C_6H_{22}O_{11}$ (Sukrosa, BM = 342) + $H_2O \Rightarrow C_6H_{12}O_6$ (fruktosa, BM = 180) + $C_6H_{12}O_6$ (Glukosa, BM = 180). Selain dari sukrosa gula reduksi terutama diperoleh dari hidrolisis pati amilase yang dihasilkan oleh *L. plantarum*. Proses hidrolisis yang dapat dituliskan dengan persamaan reaksi: $C_6H_{10}O_5$ (pati, BM = 162) + $H_2O \Rightarrow C_6H_{12}O_6$ (glukosa, BM = 180).

Analisis karbohidrat pada tepung *MOCAF* hasil dari fermentasi menggunakan *L. plantarum* pada penelitian ini juga dapat digunakan untuk menentukan komposisi bahan makanan, penentuan sifat fisis dan kimiawi dalam kaitannya dengan pembentukan kekentalan, kekekatan, stabilitas larutan dan tekstur hasil olahannya. Selain itu berkaitan dengan Ilmu Gizi dapat

digunakan sebagai analisis biologis (*bioassay*) senyawa karbohidrat dalam peranannya membentuk kalori, pencegahan penyakit (diabetes, kegemukan, dll), serat kasar dalam pencernaan dan sebagainya (Sudarmadji, 2007).

Kadar tepung terigu komersial menurut SNI (2009) maksimal sebesar 77,9 %. Jika dibandingkan kadar karbohidrat terbaik tepung *MOCAF* hasil fermentasi menggunakan *L. plantarum* pada perlakuan Tepung *MOCAF* B yaitu sebesar 81,41 % sudah mendekati ambang maksimal dari standar tepung terigu. Jika dibandingkan dengan kandungan tepung *MOCAF* hasil penelitian Setyo, dkk. (2012) sebesar 80,31 % sedikit lebih tinggi. Hal ini menunjukkan pembuatan tepung *MOCAF* dengan fermentasi menggunakan *L. plantarum* yang diperbanyak menggunakan media modifikasi MRS *Broth* dapat menurunkan kandungan karbohidrat pada tepung *MOCAF*.

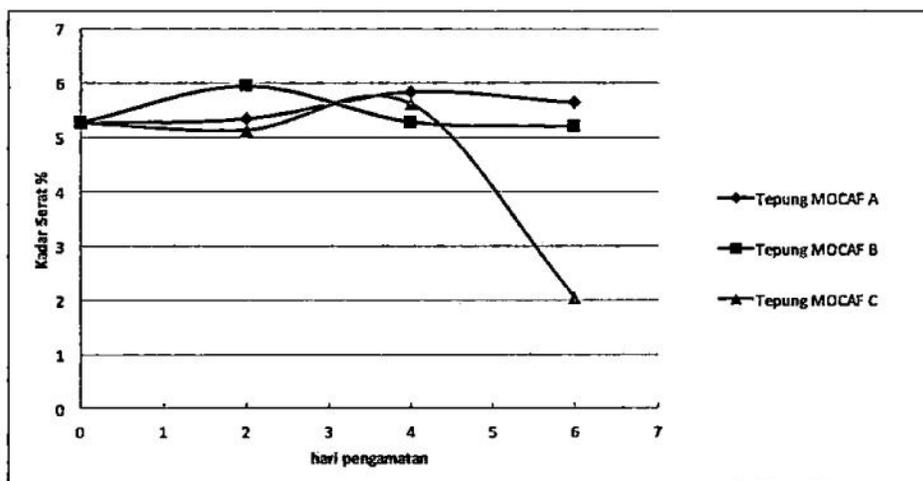
b. Analisis kadar serat

Serat kasar mengandung senyawa selulosa, lignin, dan zat lain yang belum diidentifikasi dengan pati. Yang disebut serat kasar disini adalah senyawa yang tidak dapat dicerna dalam organ pencernaan (Sudarmadji, 2007). Pengujian kadar serat bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap kadar serat tepung *MOCAF* yang dihasilkan selama fermentasi. Hasil penelitian menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada masing-masing perlakuan (tabel 9).

Hasil analisis sidik ragam uji kadar serat dan uji lanjut DMRT dengan taraf kesalahan 5 % (lampiran 5g) menunjukkan tidak terdapat pengaruh yang signifikan terhadap kadar serat pada masing-masing perlakuan. Kadar serat

yang dihasilkan pada penelitian ini berkisar antara 2 % b/b – 5,64 % b/b. Hal tersebut menunjukkan perlakuan fermentasi menggunakan *L. plantarum*, baik jumlah dan pola pertumbuhannya selama fermentasi, dalam pembuatan tepung *MOCAF* tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar serat yang terkandung. Bila dibandingkan dengan kadar karbohidrat yang teranalisis menunjukkan perbedaan dengan hasil analisis kadar serat. Kadar karbohidrat menunjukkan perbedaan yang signifikan tetapi tidak diikuti oleh kadar serat. Hal ini diduga *Lactobacillus plantarum* mampu merombak karbohidrat menjadi gula sederhana tetapi tidak memiliki enzim yang mampu menguraikan serat yang terkandung pada tepung *MOCAF*.

Kadar serat tepung *MOCAF* selama fermentasi menunjukkan perubahan yang sama pada setiap perlakuan, yaitu terdapat peningkatan kadar serat lalu terjadi penurunan pada akhir fermentasi. Hal ini diduga karena aktivitas metabolisme yang dilakukan oleh *L. plantarum* selama fermentasi meskipun kadar serat yang diperoleh tidak berbeda nyata.



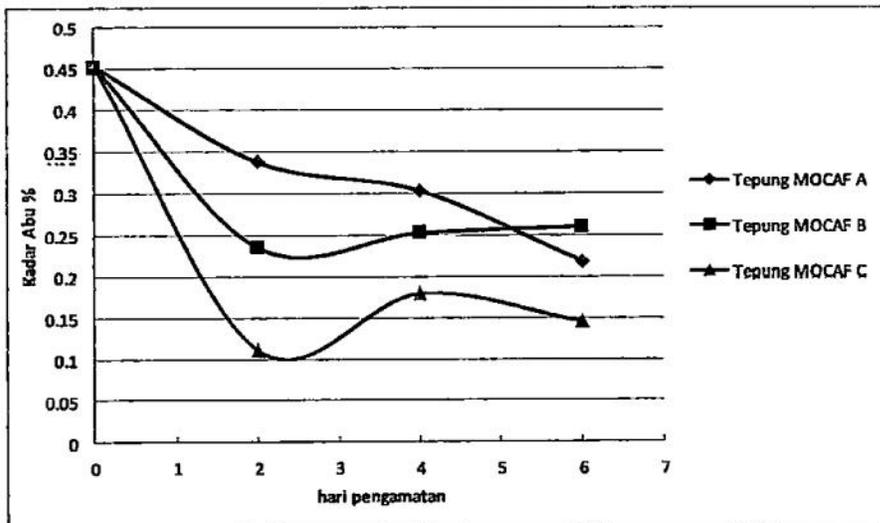
Gambar 13. Grafik kadar serat terkandung pada tepung *MOCAF* selama fermentasi.

Bila dibandingkan dengan kurva pertumbuhan *L. plantarum* masing-masing perlakuan selama fermentasi menunjukkan perubahan yang sama. Pada fermentasi tepung B pada hari kedua menunjukkan peningkatan kadar serat dan jumlah *L. plantarum* mengalami fase eksponensial lalu memasuki fase kematian sampai hari ke-6 dan terjadi penurunan kadar serat yang tertangkap pada saat analisis. Pada fermentasi Tepung *MOCAF* C pertumbuhan *L. plantarum* mengalami fase eksponensial pada hari keempat diikuti dengan peningkatan kadar serat yang terbaca lalu memasuki fase kematian sampai hari keenam fermentasi diikuti dengan penurunan kadar serat yang terbaca. Sedangkan pada fermentasi Tepung *MOCAF* C pertumbuhan *L. plantarum* menunjukkan pertumbuhan yang stabil pada kisaran jumlah yang sama sampai hari keenam diikuti dengan peningkatan kadar serat yang terbaca.

Serat kasar sangat penting dalam penilaian kualitas bahan makanan karena angka ini merupakan indeks dan menentukan nilai gizi bahan makanan (Sudarmadji, 2007). Menurut Winarno (1989), serat dalam bahan pangan tidak tercerna oleh tubuh tetapi mempunyai sifat positif bagi gizi dan metabolisme serta dapat mencegah berbagai penyakit seperti jantung koroner, sembelit, diare, wasir dan kanker usus besar. Bila dibandingkan dengan standar nilai mutu tepung *MOCAF* menurut SNI tepung *MOCAF* yang dihasilkan perlakuan Tepung *MOCAF* C (2,00 %) sudah sesuai dengan standar mutu, yaitu maksimal 2,00 % b/b.

c. Analisis kadar abu

Uji kadar abu dilakukan untuk mengetahui kadar abu yang terkandung dalam tepung *MOCAF*. Abu adalah zat anorganik sisa hasil pembakaran suatu bahan organik. Analisis kadar abu berkaitan dengan mineral yang terkandung dalam tepung *MOCAF*. Mineral yang terkandung dalam suatu bahan pangan dapat merupakan garam yang dibagi menjadi garam organik dan garam anorganik. Yang termasuk dalam garam organik meliputi asam malat, oksalat, asetat, dan pektat. Sedangkan garam anorganik antara lain dalam bentuk garam posfat, karbonat, klorida, sulfat, dan nitrat (Sudarmadji, 2007). Dengan mengetahui kadar abu yang terkandung dapat mengetahui pengaruh fermentasi pada setiap perlakuan terhadap mutu tepung *MOCAF* yang dihasilkan. Perubahan kadar abu disajikan pada gambar 14.



Gambar 14. Grafik perubahan kadar abu tepung *MOCAF*

Hasil analisis sidik ragam uji kadar abu dan uji lanjut DMRT dengan taraf kesalahan 5 % (lampiran 5h) menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap kadar abu pada masing-masing perlakuan. Hasil penelitian (tabel 9)

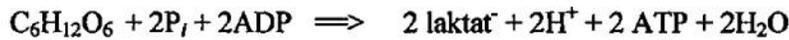
menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan pada perlakuan Tepung *MOCAF* C tetapi tidak pada perlakuan Tepung *MOCAF* B dan Tepung *MOCAF* A. Kadar abu tertinggi terdapat pada perlakuan Tepung *MOCAF* B sebesar 0,26 % b/b dan kadar abu terendah dihasilkan oleh perlakuan Tepung *MOCAF* C sebesar 0,14 % b/b. Hal tersebut diduga proses fermentasi tepung *MOCAF* yang dilakukan oleh *Lactobacillus plantarum* selain menghasilkan asam laktat juga menghidrolisis senyawa garam. Bila dibandingkan dengan standar nilai mutu tepung *MOCAF* menurut SNI tepung *MOCAF* yang dihasilkan perlakuan Tepung *MOCAF* C (0,14 %) sudah sesuai dengan standar mutu, yaitu maksimal 0,15 % b/b.

d. Analisis Kadar Air

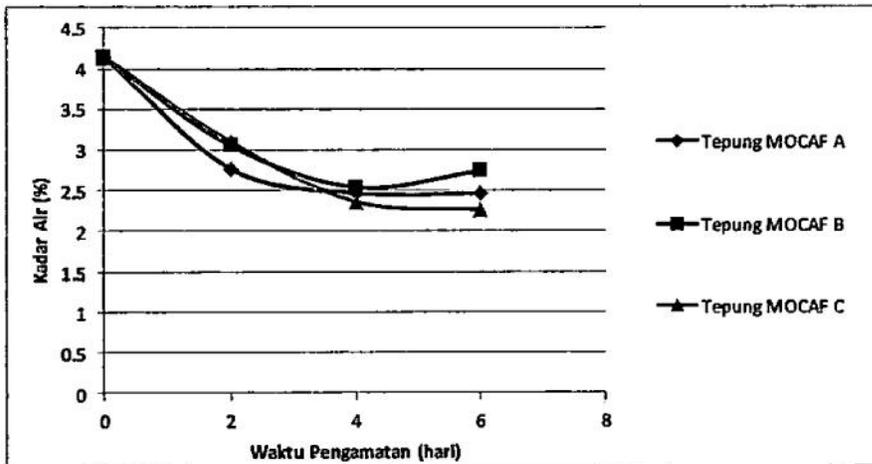
Pada penelitian ini analisis kadar air bertujuan untuk menduga aktivitas fermentasi *L. plantarum* terkait dengan perombakan karbohidrat dan kadar air yang terbebaskan dari ikatan hidrogennya dan dinyatakan dalam penurunan kadar air terkandung dalam tepung *MOCAF* selama fermentasi. Salma (2009) menyatakan kadar air sangat berpengaruh terhadap mutu bahan pangan, dan hal ini merupakan salah satu sebab mengapa dalam pengolahan pangan air tersebut sering dikeluarkan atau dikurangi dengan cara penguapan atau pengentalan dan pengeringan. Pengurangan air disamping bertujuan mengawetkan juga besar dan berat bahan pangan sehingga memudahkan dan menghemat pengepakan.

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan penurunan kadar air yang signifikan antara perlakuan Tepung *MOCAF* B dengan perlakuan

Tepung *MOCAF* C yaitu 2,74 % dan 2,26 %. Tetapi tidak dengan perlakuan Tepung *MOCAF* A memiliki kadar air sebesar 2,47 % (tabel 9). Hal ini diduga karena terkait aktivitas *L. plantarum* dalam fermentasi merombak karbohidrat menjadi asam laktat, energi, dan membebaskan ikatan air dengan koloid makromolekuler pada singkong yang dinyatakan dalam reaksi sebagai berikut:



Hasil analisis sidik ragam dan uji lanjut DMRT uji kadar air (lampiran 5i) dan uji karbohidrat (lampiran 5e) dengan taraf kesalahan 5 % menunjukkan korelasi antara kadar air dan kadar karbohidrat tepung *MOCAF* yang dihasilkan. Kandungan karbohidrat akan semakin rendah seiring dengan semakin tingginya kadar air, protein, abu, dan kadar lemak, juga sebaliknya (SNI 01-2891-1992). Perubahan kadar air selama fermentasi disajikan pada gambar 15.



Gambar 15. Grafik penurunan kadar air selama fermentasi tepung *MOCAF*

Kadar karbohidrat pada perlakuan Tepung *MOCAF* C menunjukkan kadar karbohidrat tertinggi (87,19 %) dan kadar air terendah (2,26 %) dan perlakuan Tepung *MOCAF* B menunjukkan kadar karbohidrat terendah (81,41

%) dengan kandungan kadar air tertinggi (2,74 %). Diduga kadar air terkandung dalam tepung *MOCAF* termasuk dalam air yang terikat secara lemah pada koloid, pati, protein dan selulosa.

Dalam bahan makanan terdapat dalam berbagai bentuk, yaitu air bebas dan air yang terikat. air bebas terdapat dalam ruang-ruang antar sel dan intergranular dan pori-pori yang terdapat pada bahan. Sedangkan air terikat dibedakan menjadi air yang terikat secara lemah dan air terikat secara kuat. Air terikat secara lemah karena terserap pada permukaan koloid makromolekuler seperti protein, pektin pati, dan selulosa. Selain itu juga terdispersi diantara koloid tersebut dan merupakan pelarut zat-zat yang ada dalam sel. Air dalam bentuk ini masih tetap mempunyai sifat air bebas dan dapat dikristalkan pada proses pembekuan. Sedangkan air dalam bentuk terikat kuat membentuk hidrat. Ikatannya bersifat ionik sehingga relatif sukar diuapkan. Air ini tidak membeku meskipun pada 0 °F (Sudarmadji, 2007).

Syarat mutu tepung *MOCAF* menurut SNI 7622-2011 memiliki kadar air maks 13 % (b/b). Berdasarkan hal tersebut tepung *MOCAF* hasil fermentasi menggunakan *L. plantarum* pada penelitian ini sudah memenuhi standar mutu yaitu dengan kadar air tertinggi 2,74 % (b/b). Kadar air dalam menentukan mutu tepung *MOCAF* berperan dalam mempertahankan umur simpan dan kualitas fisik meliputi aroma, penampakan dan teksturnya. Winarno (2008) menyatakan Kandungan air dalam makanan ikut menentukan *acceptability*, kesegaran, dan daya tahan bahan tersebut terhadap serangan mikroba. Kadar air yang tinggi akan mempengaruhi keawetan bahan pangan

dan mempercepat umur simpan serta memudahkan pertumbuhan mikroba. Hal tersebut senada dengan Sudarmadji (2007), air yang terdapat alam bentuk bebas dapat membantu terjadinya proses mikrobiologis, kimiawi, enzimatik, bahkan oleh aktivitas serangga perusak.

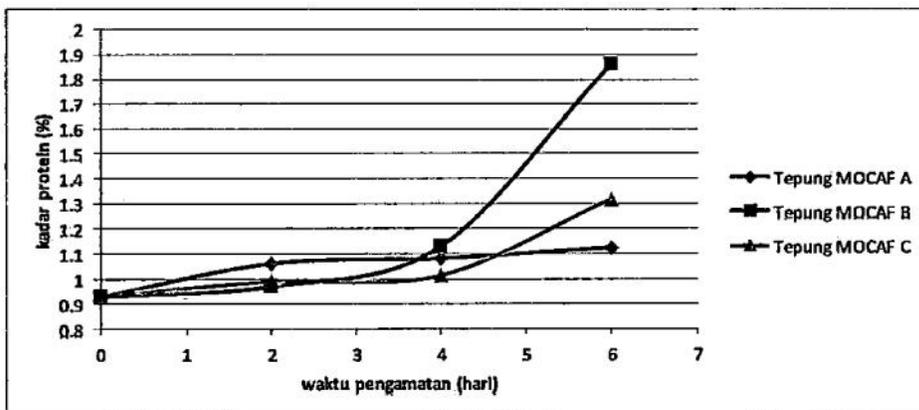
e. Analisis Protein

Protein merupakan suatu bahan makanan makronutrien. Molekul protein selain mengandung unsur C, H, O (seperti karbohidrat dan lemak) juga mengandung unsur N. Hal tersebut yang menyebabkan protein lebih berperan dalam pembentukan biomolekul daripada sumber energi seperti halnya karbohidrat dan lemak. Namun demikian bila organisme kekurangan energi protein dapat digunakan sebagai sumber energi setara karbohidrat mengandung 4 kilokalori/gram (Sudarmadji dkk., 2007). Hasil analisis kadar protein tepung *MOCAF* setelah fermentasi dapat dilihat pada tabel 9.

Analisis kadar protein dalam penelitian ini berfungsi untuk mengetahui aktivitas fermentasi *L. plantarum* hasil perbanyakan di berbagai media *MRS Broth* modifikasi dalam pengaruhnya meningkatkan kadar protein tepung *MOCAF* selama fermentasi. Protein terbesar yang terkandung dalam singkong diduga merupakan kelompok protein kompleks glikoprotein dan lipoprotein, yaitu protein yang terkandung dalam polisakarida dan lipida. Sudarmadji (2007) mengungkapkan protein sangat penting peranannya bagi sel makhluk hidup, karena berfungsi sebagai pembangun dan pengatur. Protein dalam bahan biologis biasanya terdapat dalam bentuk ikatan fisis yang

renggang maupun ikatan kimiawi yang lebih erat dengan karbohidrat atau lemak.

Hasil penelitian menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan pada masing-masing perlakuan (lampiran 5f). Kadar protein tertinggi dihasilkan oleh fermentasi *L. plantarum* pada perlakuan Tepung *MOCAF* B sebesar 1,86 %, diikuti perlakuan Tepung *MOCAF* C sebesar 1,31 % dan terendah pada perlakuan Tepung *MOCAF* A 1,12 % (tabel 12). Hal ini diduga karena aktivitas metabolisme *L. plantarum* selama proses fermentasi berbeda terkait dengan jumlah *L. plantarum* pada masing-masing perlakuan (gambar 10) dan sinergis dengan jumlah substrat yang dirombak selama 6 hari fermentasi. Garfik perubahan jumlah protein dapat dilihat pada gambar 15.



Gambar 16. Grafik peningkatan kadar protein tepung *MOCAF* selama fermentasi.

Peningkatan kadar protein pada tepung *MOCAF* ditentukan oleh aktivitas *L. plantarum* dalam proses fermentasi, merombak gula menjadi asam organik dan membebaskan senyawa protein. Dini, dkk. (2014) mengungkapkan peningkatan kadar protein akibat adanya kerja dari mikrobia dan adanya penambahan protein yang terdapat dalam sel mikroba itu sendiri.

Hasil penelitian menunjukkan semakin banyak jumlah inokulum yang digunakan dalam fermentasi singkong menghasilkan kadar protein yang semakin tinggi. Hal tersebut diduga dalam mencukupi kebutuhan energi untuk pertumbuhannya, *L. plantarum* memanfaatkan senyawa gula tanpa merombak protein yang ada tetapi merubahnya menjadi senyawa protein yang sederhana. Setyo, dkk. (2012) mengungkapkan Selama fermentasi bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* menghasilkan enzim proteinase. Proteinase akan menghidrolisis protein menjadi peptida yang sederhana. Adanya kenaikan kadar protein diperoleh dari aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh mikrobial yang ada dalam proses fermentasi.

f. Analisis HCN

Analisis asam sianida (HCN) bertujuan untuk mengetahui pengaruh aktivitas fermentasi *L. plantarum* pada masing-masing perlakuan terhadap penurunan kadar HCN selama 6 hari fermentasi. HCN dihasilkan dari hidrolisis glikosida sianogenetik secara alami. Pada ubi, glikosida sianogenetik diberi nama linamarin (Winarno, 2004). Zat glikosida ini diberi nama linamarin yang berasal dari aseton sianidrin yang bila dihidrolisis akan terurai menjadi glukosa, aseton dan HCN. Rumus molekul linamarin $C_{10}H_{17}O_6N$ dan mempunyai sifat yang mudah larut dalam air (Arum, 2011).

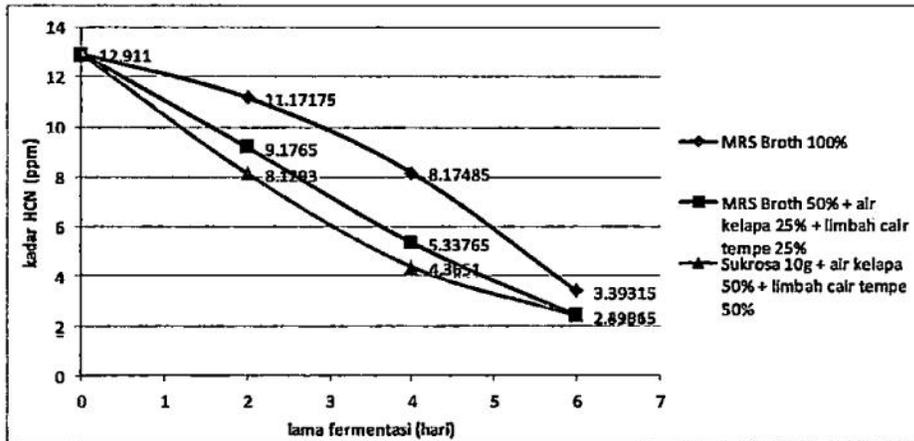
Hasil analisis sidik ragam dan uji lanjut DMRT dengan taraf kesalahan 5 % (lampiran 5g) menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan pada masing-masing perlakuan terhadap penurunan kadar HCN pada singkong. Hal ini menunjukkan bahwa *L. plantarum* yang ditumbuhkan di

berbagai media perbanyakan mampu menurunkan HCN pada kisaran konsentrasi yang tidak berbeda nyata (Tabel 9).

Kandungan HCN tertinggi terdapat pada perlakuan Tepung *MOCAF* A sebesar 3,39 ppm, diikuti perlakuan Tepung *MOCAF* B sebesar 2,41 ppm dan terendah pada perlakuan Tepung *MOCAF* C 2,39 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa tepung *MOCAF* hasil fermentasi *L. plantarum* aman untuk dikonsumsi. Menurut syarat mutu Tepung *MOCAF* SNI 7622-2011, Tepung *MOCAF* aman dikonsumsi dengan syarat kadar HCN maksimum sebesar 10 ppm.

Bila dibandingkan dengan aktivitas pertumbuhan *L. plantarum* selama fermentasi, penurunan kadar HCN berkorelasi positif dengan jumlah populasi *L. plantarum*. Semakin tinggi jumlah populasi *L. plantarum* semakin rendah kadar HCN yang dihasilkan, juga sebaliknya. Hal ini menunjukkan dengan perlakuan fermentasi menggunakan *L. plantarum* dapat mempercepat proses hidrolisis glikosida sianogenetik dan membebaskan HCN. Sesuai dengan penelitian Sri dan Haslina (2011) mengenai kajian degradasi asam sianida, kadar HCN tepung *MOCAF* tertinggi diperoleh pada tepung yang dibuat tanpa proses fermentasi yaitu sebesar 14,82 ppm dan terendah pada perlakuan fermentasi basah selama 3 hari dan airnya diganti yaitu 4,94 ppm. Pada saat fermentasi *L. plantarum* akan menyebabkan suasana asam dan hal tersebut menyebabkan aktivitas enzim linamarase meningkat tajam sehingga pemecahan linamarin semakin banyak. Dengan proses fermentasi perendaman air menyebabkan jumlah HCN yang dibebaskan juga semakin banyak. Hasil penelitian Setyo dkk (2012) mendapatkan kadar HCN terendah pada tepung

MOCAF hasil fermentasi menggunakan *Lactobacillus plantarum* diperoleh pada fermentasi 5 hari, yaitu sebesar 1,80 mg/kg.



Gambar 17. Grafik penurunan kadar HCN selama fermentasi

Arum (2011) menyebutkan tinggi rendahnya kandungan HCN pada singkong setelah fermentasi dan tepung dipenaruhi oleh cara pembuatan tepung *MOCAF* itu sendiri. Pada penelitian ini tepung *MOCAF* dibuat dengan tahapan pengupasan, pencucian dengan suhu 60°C, pemotongan ukuran kecil dengan *disawut* (lampiran 4.2c), pengeringan, dan penepungan. Pada gambar 14 dapat diketahui kadar HCN sebelum difermentasi sudah dalam konsentrasi rendah, yaitu sebesar 12,91 ppm. Bila dibandingkan, seharusnya varietas UJ-5 yang digunakan dalam penelitian ini termasuk jenis singkong pahit yang memiliki kandungan HCN 40-100 ppm (Agro Inovasi, 2011). Diduga kehilangan HCN sebelum fermentasi disebabkan oleh pra-perlakuan berupa pengupasan, pemotongan ukuran kecil dengan *disawut* dan direndam air pada suhu 60°C. Tujuan perendaman pada suhu 60 °C adalah agar tidak terjadi *browning* yang mengakibatkan tepung *MOCAF* berwarna kekuningan. Setyo dkk (2012) menyatakan proses perendaman dan pencucian dengan air panas

dapat menghilangkan HCN, sebab HCN mudah larut dalam air dan mempunyai titik didih 29°C. Sri dan Haslina (2011) mengatakan perendaman singkong dalam air menyebabkan HCN akan keluar kepermukaan irisan dan larut dalam air perendam karena HCN mudah larut dalam air perendam. Aliran air akan meningkatkan pelarutan, arena air air disekitar permukaan irisan singkong sebagai pelarut tidak mengalami tingkat kejenuhan oleh alkaloid yang terlarut.

Syarat mutu tepung *MOCAF* komersial menurut SNI 7622-2011 mengandung HCN maks. 10 ppm. Tepung *MOCAF* hasil penelitian menunjukkan kandungan HCN sudah memenuhi standar yang ada dan aman untuk dikonsumsi, yaitu dengan kadar HCN tertinggi sebesar 3,3932 ppm.

g. Aroma Tepung *MOCAF*

Penilaian aroma berdasarkan aroma khas singkong yang terdapat pada tepung *MOCAF* yang dihasilkan, dengan skala tidak beraroma khas singkong sampai sangat beraroma khas singkong. Lalu hasil penilaian dimasukkan dalam rumus dan dinyatakan dalam persen (%). Semakin rendah nilai persen aroma yang diperoleh menyatakan tepung *MOCAF* tidak beraroma khas singkong.

Hasil penelitian menunjukkan semakin lama proses fermentasi menghasilkan tepung *MOCAF* pada masing-masing perlakuan yang berbau netral, aroma khas singkong dan bau apek dan asam menjadi hilang. Hasil terbaik diperoleh pada fermentasi selama 6 hari dengan aroma tidak beraroma khas singkong. Murdani (2015) menyatakan aktifitas fermentasi menghasilkan

asam laktat, asam organik lain, enzim-enzim, senyawa volatil yang terdispersi kedalam air dan akan mempengaruhi struktur kasava, serta sifat fisik kimi serta aroma kasava setelah fermentasi. Asam laktat mempunyai aroma khas yang dapat menutupi aroma khas yang dapat menutupi aroma khas singkong dan asam sianida. Hasil uji kualitatif aroma disajikan dalam tabel 10.

Tabel 10. Hasil uji kualitatif aroma tepung *MOCAF*

Perlakuan	Pengamatan (hari)	Nilai Aroma (%)
Tepung <i>MOCAF</i> A	0	75
	2	75
	4	50
	6	25
Tepung <i>MOCAF</i> B	0	75
	2	50
	4	50
	6	25
Tepung <i>MOCAF</i> C	0	75
	2	50
	4	50
	6	25

Selama pengamatan aroma yang muncul adalah aroma khas asam laktat, yaitu aroma manis yang sedikit tajam dan cenderung memberikan kesan segar. Syarat mutu tepung *MOCAF* menurut SNI 7622-2011 mengenai aroma adalah tidak berbau. Hasil penelitian menunjukkan tepung *MOCAF* hasil fermentasi menggunakan *L. plantarum* menghasilkan tepung *MOCAF* sudah memenuhi standar mutu yang ada yang berbau netral, tidak beraroma khas singkong.

h. Tekstur Tepung *MOCAF*

Penilaian tekstur dilakukan dengan skala tekstur sangat halus sampai dengan sangat kasar. Lalu hasil penilaian dimasukkan dalam rumus dan

dinyatakan dalam persen (%). Setelah dilakukan penilaian data hasil perhitungan tekstur tepung *MOCAF* disajikan pada tabel 11.

Tabel 11. Hasil uji kualitatif tekstur tepung *MOCAF*

Perlakuan	Pengamatan (hari)	Nilai Tekstur (%)
Tepung <i>MOCAF</i> A	0	75
	2	25
	4	25
	6	25
Tepung <i>MOCAF</i> B	0	75
	2	25
	4	25
	6	25
Tepung <i>MOCAF</i> C	0	75
	2	25
	4	25
	6	25

Hasil pengamatan menunjukkan tepung *MOCAF* hasil fermentasi memiliki tekstur halus pada semua perlakuan. Semakin rendah nilai persen tekstur yang diperoleh menyatakan tepung *MOCAF* semakin halus. Bila dibandingkan dengan perlakuan kontrol (H_0) tepung *MOCAF* sedikit lebih kasar, ditandai dengan ketika dilakukan perabaan dan pemilinan terdapat butiran yang tidak ikut terpilin, sekalipun perbedaannya sedikit dengan tepung *MOCAF* hasil fermentasi yang menunjukkan kehalusan yang sedikit lebih halus. Hal tersebut diduga dengan dilakukan fermentasi terjadi perombakan substrat hidrat pada tepung *MOCAF* yang menyebabkan teksturnya menjadi lebih halus. Dini (2014) menyatakan bahwa fermentasi menyebabkan perubahan sifat bahan pakan termasuk tekstur sebagai akibat dari pemecahan kandungan bahan pangan oleh mikroorganisme yang berada di dalamnya. Proses fermentasi cenderung menyebabkan tekstur bahan menjadi lunak. Adanya aktivitas enzim akan memecah ikatan yang ada pada protein, lipid,

maupun amilase. Terurainya komponen-komponen tersebut membuat tekstur menjadi lunak. Syarat mutu tepung *MOCAF* menurut SNI 7622-2011 bertekstur serbuk halus. Sehingga tepung *MOCAF* hasil fermentasi menggunakan *L. plantarum* pada penelitian ini sudah memenuhi standar mutu yang ditentukan.

i. Warna Tepung *MOCAF*

Penilaian warna dilakukan dengan skala warna sangat putih sampai kuning. Lalu hasil penilaian dimasukkan dalam rumus dan dinyatakan dalam persen (%). Data hasil pengamatan disajikan dalam tabel 16.

Tabel 12. Hasil uji kualitatif warna tepung *MOCAF*

Perlakuan	Pengamatan (hari)	Nilai Warna (%)
Tepung <i>MOCAF</i> A	0	50
	2	50
	4	50
	6	50
Tepung <i>MOCAF</i> B	0	50
	2	50
	4	50
	6	50
Tepung <i>MOCAF</i> C	0	50
	2	50
	4	50
	6	50

Hasil penelitian menunjukkan tidak ada perubahan warna pada tepung *MOCAF* selama fermentasi. Semakin rendah nilai persen warna yang diperoleh menyatakan tepung *MOCAF* semakin putih. Hal tersebut diduga perlakuan perendaman setelah singkong dengan air bersuhu 60°C dikupas dapat mencegah terjadinya browning secara enzimatik pada singkong yang menyebabkan warna kekuningan pada tepung *MOCAF*. Kumalaningsih dkk. (2015) menyatakan getah umbi banyak mengandung senyawa-senyawa o-

difenol yang berupa senyawa asam klorogenat, asam isoklorogenasis, asam kafeat dan turunannya. Oksidasi senyawa-senyawa fenol tersebut menghasilkan senyawa melanodin yang berwarna coklat. Peristiwa pencoklatan ini melibatkan aktivitas golongan enzim katekol oksidase atau *o*-diphenol oxygen oxidoreductase dan kofaktor Cu^{2+} .

Syarat mutu tepung *MOCAF* menurut SNI 7622-2011 mengenai warna yaitu putih. Dengan demikian tepung *MOCAF* hasil fermentasi menggunakan *L. plantarum* sudah memenuhi standar mutu. Diduga dengan perlakuan perendaman dapat mencegah terjadinya oksidasi senyawa fenol yang keluar akibat pengirisan dan penyawutan karena ubikayu tidak terpapar oksigen dan suhu 60°C memberikan efek *stress* suhu yang mengakibatkan koagulasi senyawa fenol dan enzim yang keluar dari jaringan singkong yang rusak. Selanjutnya fermentasi dengan perendaman diduga menyebabkan terurainya senyawa yang bertanggung jawab terhadap pencoklatan dan larut dalam air rendaman. Dengan perlakuan tersebut diperoleh tepung *MOCAF* hasil fermentasi basah derajat keputihannya pada skala putih. Murdani (2015) menyatakan selama proses fermentasi terjadi kehilangan komponen penimbul warna, dan prtein yang dapat menyebabkan warna coklat ketika pengeringan. Dampaknya adalah warna tepung *MOCAF* yang dihasilkan lebih putih jika dibandingkan dengan warna tepung singkong biasa.