

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN KUALITAS MINUMAN SINBIOTIK LABU KUNING
(*Cucurbita moschata*) DENGAN VARIASI WAKTU FERMENTASI**

**ANTIOXIDANT ACTIVITY AND QUALITY OF PUMPKIN (*Cucurbita moschata*) SYNBIOTIC
DRINKS WITH VARIATION OF FERMENTATION TIMES**

Agnes Sekar Arum Jati¹, L.M. Ekawati Purwijantiningih², F. Sinung Pranata³
Program Studi Biologi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta
Jl. Babarsari no 44 Yogyakarta
theresiaasaj@gmail.com

ABSTRAK

Labu kuning (*Cucurbita moschata*) diketahui kaya akan senyawa betakaroten yang dapat berperan sebagai sumber antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh waktu fermentasi (12 jam, 24 jam, 48 jam) terhadap aktivitas antioksidan dan kualitas minuman sinbiotik terbaik. Serangkaian uji yang dilakukan meliputi penentuan aktivitas antioksidan dengan persentase inhibisi DPPH, uji total fenol, uji kadar abu, uji kadar protein, uji kadar lemak, uji pH, uji total asam tertitrasi, uji warna, uji mikrobiologi dan uji organoleptik. Hasil perlakuan terbaik yaitu perlakuan waktu fermentasi 24 jam dengan aktivitas antioksidan sebesar 72,43%, total fenol 24,92 mg GAE/100g, kadar abu 0,53%, kadar protein 0,56%, kadar lemak 0,84%, pH 4,52, total asam titrasi 0,474%, warna jingga kekuningan, total BAL $1,17 \times 10^9$ CFU/ml, negatif *Salmonella* dan organoleptik pada peringkat pertama. Berdasarkan pengolahan data dengan ANOVA yang dilanjutkan dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT), minuman sinbiotik labu kuning memberikan pengaruh beda nyata terhadap aktivitas antioksidan, kadar protein, kadar lemak, pH, total asam tertitrasi, total BAL serta memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata pada total fenol dan kadar abu.

Kata Kunci : Labu Kuning, Minuman Sinbiotik, Antioksidan.

PENDAHULUAN

Perubahan gaya hidup berpengaruh terhadap pola makan sehari-hari. Pola makan yang salah memicu timbulnya berbagai penyakit, terutama gangguan saluran pencernaan seperti diare. Hal ini berkaitan dengan Laporan Riset Kesehatan Dasar 2007, yang menunjukkan bahwa sebagian besar penduduk Indonesia masih kurang mengonsumsi serat dari sayur dan buah, kurang olah raga hingga kebiasaan mengonsumsi makanan yang mengandung pengawet dan pewarna sintetis. Salah satu cara untuk mengatasi hal tersebut yaitu dengan mengonsumsi produk pangan yang baik untuk pencernaan seperti minuman sinbiotik, yang merupakan kombinasi dari probiotik dan prebiotik.

Labu kuning merupakan sumber karbohidrat dan kaya akan β -karoten yang berperan sebagai antioksidan (Raharjo, 2009). Salah satu upaya dalam pemanfaatan labu kuning yaitu dengan pembuatan minuman sinbiotik, Pada produk ini terdapat dua komponen sekaligus yaitu inulin dari labu kuning yang berperan sebagai prebiotik dan kultur starter *Lactobacillus casei* yang berperan sebagai probiotik. Dengan adanya proses fermentasi, maka antioksidan eksogenus dapat meningkat karena adanya interaksi dengan

bakteri asam laktat (Eleganty, 2016). Oleh karena itu, produk minuman sinbiotik labu kuning ini dapat memberikan efek kesehatan karena mengandung probiotik dan antioksidan.

METODE PENELITIAN

Bahan-bahan yang digunakan adalah buah labu kuning, *Lactobacillus casei*, cat Gram A, cat Gram B, cat Gram C, cat Gram D, cat nigrosin, larutan 3% H₂O₂, akuades, indikator phenolphthalein 1%, H₂SO₄ pekat, NH₃ pekat, HCl 0,1N, NaOH 0,1N, Na₂CO₃ 7%, methanol 96%, ethanol 9%, alkohol 70%, alkohol 95%, reagen DPPH, reagen Folin-Ciocalteu, asam galat, katalis N, indikator merah metil, dietil eter, petroleum eter, MRS agar, MRS broth, medium Lactose Broth, medium SCB, Sodium Biselenite, medium SSA, CaCO₃, kertas saring, plastik dan kapas.

Alat-alat yang digunakan adalah pisau, talenan, kompor gas, panci, termometer, kain saring, jarum ose, erlenmeyer, jarum enten, cawan petri, rak tabung reaksi, tabung reaksi, *magnetic stirrer*, botol jar, gelas benda, gelas penutup, pipet tetes, cup plastik, corong, penjepit kayu, buret, statif, propipet, pipet ukur, gelas beker, tabung falcon, corong pemisah, gelas ukur, eksikator, cawan porselin, mikrotip, mikropipet, bunsen, tanur, labu kjeldhal, lemari asam, timbangan analitik, vortex, spektrofotometer, mikroskop, oven, autoklaf, pH meter, *milipore membrane*, *juicer*, *hot plate*, *microwave*, *laminar air flow*, *freezer*, *waterbath*, *color reader*, *sentrifuge*, inkubator, kertas payung, aluminium foil, korek api dan karet.

Cara kerja

1. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei diperoleh dari medium agar tegak. *Lactobacillus casei* diisolasi ke medium MRS broth dan dilanjutkan dengan metode *streak plate agar* pada medium MRS agar untuk memperoleh koloni tunggal. Karakterisasi *Lactobacillus casei* meliputi pengecatan Gram, identifikasi bakteri berdasarkan karakter morfologikal, uji katalase dan uji motilitas.

2. Pembuatan Sari Labu Kuning (Argarini, 1997 dengan modifikasi)

Labu kuning dicuci bersih, dikupas kulitnya dan dipisahkan dari jonjotnya. Kemudian labu dipotong kecil-kecil dan *diblanching* pada suhu 85°C selama 2 menit. Selanjutnya potongan labu kuning

dihancurkan dengan menggunakan *juicer* dan diperoleh sari labu kuning. Setelah itu, sari labu kuning disaring dengan kain saring dan kertas saring.

3. Pembuatan Starter *Lactobacillus casei*

Lima ml *MRS Broth* yang telah steril diinokulasi dengan satu ose kultur kerja lalu diinkubasi pada suhu 37°C untuk *Lactobacillus casei* selama 48 jam sehingga diperoleh kultur cair bakteri. Selanjutnya, kultur cair tersebut diinokulasikan sebanyak 5% ke dalam 100 ml sari labu kuning yang telah pasteurisasi dengan penambahan 8% sukrosa dan diinkubasi pada suhu 24 jam sehingga diperoleh starter siap pakai.

4. Pembuatan Minuman Sinbiotik (Mulyani dkk., 2013 dengan modifikasi)

Sari labu kuning sebanyak 200 ml ditambah dengan 8% glukosa. Selanjutnya, campuran sampel dipasteurisasi dengan suhu 60°C selama 15 menit dan didinginkan pada suhu *freezer*. Campuran sampel dimasukkan ke dalam botol jar. Starter siap pakai *Lactobacillus casei* dengan konsentrasi 5% diinokulasikan ke dalam campuran sampel. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C dengan lama inkubasi 12 jam, 24 jam dan 48 jam.

5. Uji Kimia Minuman Sinbiotik

a. Kadar Abu (AOAC, 1995)

Cawan porselen dikeringkan dengan oven 105°C selama 1 jam. Cawan porselen (a) dan minuman probiotik (w) ditimbang dalam cawan porselen yang telah diketahui bobot kosongnya, Kemudian dimasukkan ke dalam tanur bersuhu 550°C selama 8 jam, lalu didinginkan dengan eksikator dan ditimbang (x).

$$\text{Kadar Abu} = \frac{x-a}{w} \times 100\%$$

b. Kadar Protein (Sudarmadji dkk., 1984)

Labu kuning dipotong menjadi bagian yang kecil dan tipis kemudian diambil sebanyak 1 gram dan dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl kemudian ditambahkan dengan 2gram katalisator dan 15 ml H₂SO₄ pekat untuk mendigesti sampel danmendekomposisi Nitrogen. Semua bahan dalam labu Kjeldahl dipanaskan dalam almari asam sampai berhenti berasap, pemanasan diteruskan dengan api

besar hingga mendidih dan cairan jernih. Pemanasan tambahan diteruskan selama 1 jam. Api lalu dimatikan dan bahan dibiarkan hingga dingin.

Aquades 100 ml, beberapa lempeng keramik, dan empat tetes indikator PP ditambahkan ke dalam labu Kjeldahl yang didinginkan dalam air es. Setelah itu ditambahkan dengan larutan NaOH 40% sebanyak 40 – 50 ml perlahan-lahan sambil diaduk hingga larutan dalam labu berwarna pink. Labu Kjeldahl kemudian dipasangkan pada alat destilasi dan dipanaskan perlahan-lahan sampai dua lapisan cairan tercampur, lalu dipanaskan dengan cepat sampai mendidih.

Hasil destilasi ditampung dalam erlenmeyer yang telah diisi dengan 50 ml larutan standar HCl (0,1 N) dan 5 tetes indikator metil merah. Destilasi dilakukan hingga destilat tertampung sebanyak 75 ml. Destilat dititrasi dengan NaOH 0,1 N hingga berwarna kuning. Setelah itu larutan blanko dibuat dengan mengganti bahan dengan aquades sebanyak 10 ml lalu dilanjutkan tahap destruksi, destilasi, dan titrasi seperti pada bahan contoh. Persentase N dihitung dengan rumus:

$$\%N = \frac{ml\ NaOH(blanko-contoh) \times 14,008 \times 100 \times N\ NaOH}{berat\ contoh\ (g) \times 1000} \quad \text{Kadar protein} = \%N \times 6,38$$

c. Kadar Lemak (AOAC, 1995)

Sampel sebanyak 10 gram ditambah dengan NH₃ pekat sebanyak 1,25 ml selanjutnya larutan ini dipanaskan dengan *waterbath* 70°C kurang lebih 15 menit. Larutan ditambah alkohol 95% sebanyak 10 ml dan dietil eter 25 ml. Seluruh larutan dimasukkan dalam labu sarisi kemudian dikocok 1 menit. Larutan ditambahkan petroleum eter 25 ml dan dikocok 1,5 menit. Larutan didiamkan sehingga akan membentuk dua lapisan. Lapisan atas diambil yang kemudian ditaruh dalam cawan porselen yang telah ditimbang untuk diuapkan di atas *waterbath*.

$$\text{Kadar Lemak} = \frac{berat\ cawan\ akhir - berat\ cawan\ kosong}{berat\ sampel} \times 100\%$$

d. Derajat Keasaman atau pH (AOAC, 1995)

Minuman sinbiotik labu kuning yang telah jadi dikocok secara merata, kemudian diukur pH nya dengan menggunakan pH meter.

e. Total Asam Titrasi (AOAC, 1995)

Pengukuran dengan prinsip titrasi asam basa. Sebanyak 10 ml sampel minuman sinbiotik labu kuning dimasukkan dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan dengan tiga tetes indikator PP 1% dan dititrasi dengan NaOH 0,1 N hingga berubah menjadi merah muda.

$$\text{Total Asam Laktat} : \frac{\text{ml NaOH } 0,1 \text{ N} \times 0,009}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

f. Penentuan Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH (Sasaki dkk., 2007 dengan modifikasi)

Larutan sari labu kuning sebanyak 0,5 ml dilarutkan ke dalam 5 ml metanol 96%. Selanjutnya larutan campuran diambil sebanyak 1 ml dan ditambahkan dengan larutan DPPH sebanyak 4 ml dikocok dengan vortex hingga homogen dan diinkubasi dalam ruang gelap selama 2 jam. Serapan diukur pada panjang gelombang 517 nm. Kemudian dihitung % aktivitas antioksidan sari labu kuning dengan rumus :

$$\% \text{ aktivitas antioksidan} : \frac{\text{Serapan kontrol} - \text{serapan larutan uji}}{\text{serapan kontrol}} \times 100\%$$

g. Pengukuran Kandungan Total Fenolik (Lee dkk., 2003 dengan modifikasi)

Sampel sari labu kuning sebanyak 0,4 ml dilarutkan dengan metanol 96% sebanyak 10 ml kemudian sebanyak 0,4 ml dimasukkan dalam labu ukur lalu ditambah 0,4 ml reagen *Folin Ciocalteu*. Larutan dihomogenkan menggunakan vortex selama 3 menit. Na_2CO_3 7% sebanyak 4 ml ditambahkan ke dalam larutan. Aquades ditambahkan hingga volumenya mencapai 10 ml. Larutan disimpan dalam ruangan gelap selama 60 menit pada suhu ruang. Absorbansinya dibaca pada λ 750 nm.

6. Uji Fisik Minuman Sinbiotik

a. Analisis Warna dengan Chromameter (deMan, 1997)

Sampel dimasukkan dalam plastik bening secukupnya. Pengukuran dilakukan hingga alat memberi cahaya terhadap sampel sebanyak 3 kali pada titik yang berbeda.

$$X = \frac{a+1,75 L}{5,645 L+a-3,012 b} \quad Y = \frac{1,786 L}{5,645 L+a-3,012 b}$$

7. Uji Mikrobiologis

a. Viabilitas BAL (Fardiaz, 1987 dengan modifikasi)

Sebanyak 1 ml minuman sinbiotik labu kuning diencerkan dalam 9 ml larutan akuades steril pada pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-10} , kemudian sampel pada pengenceran 10^{-6} hingga 10^{-10} dipipet sebanyak 1 ml ke dalam cawan petri steril. Ditambahkan dengan 20 ml MRSA cair steril, lalu cawan petri digoyangkan secara mendatar agar sampel menyebar rata. Setelah agar membeku, diinkubasi dengan posisi terbalik pada suhu 37°C selama 48 jam. Jumlah koloni yang tumbuh dihitung dan dinyatakan dalam satuan CFU/ml atau log CFU/ml.

b. Salmonella Hocking dkk., 1997)

Sampel sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam 9 ml medium LB (*Lactoe Broth*), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil inkubasi diambil sebanyak 1 ml dan diinokulasikan ke 9 ml medium SCB (*Selenite Cystine Broth*). Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Kemudian koloni yang muncul diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan pada medium SSA (*Salmonella Shingella Agar*) dengan metode *streak plate*. Kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C . Hasil positif berupa koloni transparan dengan warna hitam pada bagian tengah.

8. Uji Organoleptik (Soekarto, 1985 dengan modifikasi)

Pengujian dilakukan oleh 30 orang panelis yang memiliki latar belakang suka dengan minuman yang cenderung asam. Parameter uji meliputi warna, aroma, rasa dan homogenitas. Kriteria penilaian dilakukan yaitu dengan skala (1) tidak suka, (2) agak suka, (3) suka dan (4) sangat suka.

9. Analisis Data (Gaspersz, 1991)

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan metode *Analysis of Variance* (ANOVA) dan untuk mengetahui letak beda nyata antar perlakuan digunakan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) dengan tingkat kepercayaan 95%. Data diproses dengan SPSS versi 15.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Analisis Uji Kemurnian *Lactobacillus casei*

Uji kemurnian bakteri *Lactobacillus casei* memberikan hasil Gram positif, berbentuk batang, katalase negatif dan bersifat non-motil. Menurut Saxelin (1991), *Lactobacillus casei* merupakan bakteri Gram-positif, anaerobik fakultatif, katalase negatif, heterofermentatif fakultatif, tidak membentuk spora, berbentuk batang. *Lactobacillus casei* dapat diisolasi dari berbagai habitat seperti daging, susu, produk olahan susu, makanan atau minuman asam dan limbah.

2. Analisis Kimia Sari Labu Kuning

Hasil analisis kimia sari labu kuning dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Analisis Kimia Sari Labu Kuning

Parameter	Dima dkk. (2015)	Usmiati dkk. (2005)	Bath dan Bath (2013)	Analisis kimia
Kadar Abu	0,41%	-	-	0,44%
Kadar Protein	-	0,63%	-	0,35%
Kadar Lemak	-	-	1,43%	0,52%

Berdasarkan Tabel 2 diketahui bahwa hasil analisis kimiakadar abu pada labu kuning tidak jauh berbeda dengan teori menurut Dima dkk. (2015) yang menyatakan bahwa kadar abu pada labu kuning sebesar 0,41%. Hasil analisis kadar protein lebih rendah dari penelitian Usmiati dkk. (2005) dan hasil analisis kadar lemak lebih rendah dari penelitian Bath dan Bath (2013). Kandungan gizi pada bahan makanan dipengaruhi oleh genetik tanaman, kondisi tanah tempat tumbuh, iklim, kondisi fisiologis buah, proses pemanenan (cara pengepakan, kondisi penyimpanan dan cara pengolahannya), sehingga memungkinkan hasil pengujian dapat berbeda satu sama lain (Morris dkk., 2004). Sari labu kuning juga mengandung aktivitas antioksidan dan total fenolik yang dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Analisis kimia Kandungan Antioksidan dan Total Fenol pada Sari Labu Kuning

Parameter	Azizah dkk. (2009)	Ellong dkk. (2015)	Analisis kimia
DPPH	78,4%	-	54,13%
Total Fenol	-	27,03 mg GAE/100g	26,52 mg GAE/100g

Berdasarkan Tabel 3 diketahui bahwa penangkapan radikal bebas DPPH oleh antioksidan lebih rendah dari penelitian yang dilakukan oleh Azizah dkk. (2009). Perbedaan hasil ini dapat

disebabkan karena senyawa antioksidan merupakan senyawa yang memiliki sifat mudah rusak selama proses pengolahan sehingga mengalami penyusutan saat analisis kimia. Polifenol merupakan senyawa turunan fenol yang mempunyai aktivitas sebagai antioksidan. Hasil analisis total fenol tidak jauh berbeda dari penelitian yang dilakukan oleh Ellong dkk. (2015). Penelitian Valenzuela dkk. (2014) mengenai kandungan polifenol dalam labu kuning, menunjukkan bahwa kandungan fenolik dalam labu kuning yaitu flavonoid.

3. Analisis Kimia Minuman Sinbiotik Labu Kuning

a. Kadar Abu

Semakin tinggi kadar abu pada bahan pangan, maka kualitas bahan pangan tersebut semakin buruk (Sudarmadji, 2003). Uji DMRT menunjukkan bahwa minuman sinbiotik dengan perlakuan waktu fermentasi tidak memberikan pengaruh beda nyata terhadap kadar abu, cenderung mengalami peningkatan pada waktu fermentasi 24 jam dan cenderung menurun pada waktu fermentasi 48 jam. Peningkatan dan penurunan yang tidak signifikan dapat disebabkan karena semua perlakuan pada minuman sinbiotik labu kuning menggunakan jumlah bahan yang sama sehingga tidak memberikan pengaruh beda nyata. Hasil analisis kadar abu dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Analisis Kadar Abu (%) pada Minuman Sinbiotik Labu Kuning

Waktu Fermentasi	Kadar Abu (%)
A (12 jam)	0,50 ^a
B (24 jam)	0,53 ^a
C (48 jam)	0,50 ^a

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata pada uji DMRT, dengan tingkat kepercayaan 95%

b. Kadar Protein

Uji DMRT diketahui bahwa perlakuan 12 jam dan 24 jam tidak memberikan pengaruh beda nyata, sedangkan perlakuan 48 jam terdapat pengaruh beda nyata. Peningkatan kadar protein karena protein dari kultur *Lactobacillus casei* ikut terdeteksi dan semakin meningkat seiring dengan waktu fermentasi yang semakin lama. Herawati dan Wibawa (2009) menyatakan bahwa semakin lama waktu fermentasi maka terjadi peningkatan kadar protein yang berhubungan dengan penurunan

konsentrasi lemak karena dalam metabolisme sel mikrobia terdapat pembentukan protein (lipoprotein) dari material non protein. Hasil analisis kadar protein dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Analisis Kadar Protein (%) pada Minuman Sinbiotik Labu Kuning

Waktu Fermentasi	Kadar Protein (%)
A (12 jam)	0,54 ^a
B (24 jam)	0,56 ^a
C (48 jam)	0,70 ^b

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata pada uji DMRT, dengan tingkat kepercayaan 95%

c. Kadar Lemak

Uji DMRT menunjukkan bahwa minuman sinbiotik labu kuning dengan perlakuan fermentasi 12 jam dan 24 jam tidak memberikan pengaruh beda nyata, tetapi perlakuan 12 jam dan 24 jam berbeda nyata dengan perlakuan 48 jam. Penurunan disebabkan karena *Lactobacillus casei* mampu menggunakan lemak pada sari labu kuning sebagai energi untuk pertumbuhannya. Menurut Khusnul dan Kusnaldi (2014), selama proses fermentasi bakteri asam laktat memiliki aktivitas lipolitik sekunder yang dikendalikan oleh enzim lipase sehingga dapat memecah lemak menjadi asam lemak dan gliserol. Hasil analisis kadar lemak dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Uji Lemak (%) pada Minuman Sinbiotik Labu Kuning

Waktu Fermentasi	Kadar Lemak (%)
A (12 jam)	0,96 ^b
B (24 jam)	0,84 ^b
C (48 jam)	0,55 ^a

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata pada uji DMRT, dengan tingkat kepercayaan 95%

d. Derajat Keasaman atau pH

Selama proses fermentasi *Lactobacillus casei* memecah zat gula menjadi komponen lebih sederhana yaitu glukosa dan fruktosa, serta menghasilkan asam laktat. Menurut Winarno dan Fernandez (2007), asam laktat yang merupakan hasil proses fermentasi dapat meningkatkan citarasa, meningkatkan keasaman, bahkan dapat menurunkan pH suatu produk. Menurut Rosa (2010), nilai pH untuk yogurt berkisar antara 3,5 – 4,5. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan lama fermentasi 24 jam dan 48 jam masih berada dalam standar pH yogurt. Hasil pengamatan derajat keasaman minuman sinbiotik labu kuning dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Pengamatan Derajat Keasaman pada Minuman Sinbiotik Labu Kuning

Waktu Fermentasi	pH
A (12 jam)	5,54 ^c
B (24 jam)	4,52 ^b
C (48 jam)	3,99 ^a

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata pada uji DMRT, dengan tingkat kepercayaan 95%

e. Total Asam Titrasi

Asam yang terbentuk selama proses fermentasi karbohidrat oleh *Lactobacillus casei* ini menjadi asam laktat yang akan memberikan cita rasa khas pada minuman sinbiotik labu kuning. Peningkatan kadar asam laktat sejalan dengan penurunan derajat keasaman yang terbentuk selama proses fermentasi. Sreeramulu dkk. (2000) menyatakan bahwa selama proses fermentasi terjadi perombakan glukosa dan fruktosa oleh bakteri yang kemudian menghasilkan asam-asam organik yang akan semakin meningkat seiring dengan semakin lama waktu fermentasi. Hasil pengamatan total asam titrasi minuman sinbiotik labu kuning dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil Analisis Total Asam Tertitrasi (%) pada Minuman Sinbiotik Labu Kuning

Waktu Fermentasi	Total Asam Laktat (%)
A (12 jam)	0,132 ^a
B (24 jam)	0,474 ^b
C (48 jam)	0,609 ^c

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata pada uji DMRT, dengan tingkat kepercayaan 95%

f. Aktivitas Antioksidan

Tabel 9 menunjukkan bahwa selama fermentasi terjadi peningkatan aktivitas antioksidan pada minuman sinbiotik yang semula sebesar 54,13% pada analisis kimia lalu meningkat menjadi 66,06% pada minuman sinbiotik dengan perlakuan waktu fermentasi 12 jam dan semakin meningkat pada perlakuan waktu fermentasi 24 jam menjadi 72,43%. Peningkatan aktivitas antioksidan ini disebabkan senyawa antioksidan lebih stabil pada kondisi asam yang terbentuk selama proses fermentasi. Menurut Yu dan Van (2005), asam laktat pada yoghurt mengandung α -hydroxy acids (AHA) yang memiliki sifat antioksidan, sehingga aktivitas antioksidan yang dipengaruhi oleh asam laktat dari probiotik berperan sebagai donor atom hidrogen bagi atom yang memiliki elektron tidak

berpasangan pada orbit terluarnya (radikal bebas). Ayu dkk. (2013), menambahkan bahwa aktivitas antioksidan yang mengalami penurunan karena suasana yang semakin asam menyebabkan senyawa fenolik menjadi semakin stabil dan sulit melepaskan proton yang dapat berikatan dengan DPPH sehingga aktivitas antioksidannya menurun.

Tabel 9. Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan (%) pada Minuman Sinbiotik Labu Kuning

Waktu Fermentasi	DPPH (%)
A (12 jam)	66,06 ^b
B (24 jam)	72,43 ^c
C (48 jam)	58,38 ^a

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata pada uji DMRT, dengan tingkat kepercayaan 95%

Minuman sinbiotik labu kuning mengandung senyawa karotenoid dan vitamin C yang berfungsi sebagai antioksidan. Senyawa karotenoid pada labu kuning yaitu β -karoten, α -karoten, β -criptoxanthin, zeaxanthin dan lutein (Rodriguez-Amaya dkk., 2008). Penurunan aktivitas antioksidan dapat terjadi karena senyawa β -karoten dapat terdegradasi oleh cahaya maupun oksigen. Menurut Hounhouigan dkk. (2014), selain β -karoten, vitamin C mengalami penurunan besar akibat paparan cahaya dan oksigen, sehingga memungkinkan penurunan antioksidan.

g. Total Fenolik

Total fenol pada minuman sinbiotik labu kuning juga berada di bawah hasil penelitian yang dilakukan oleh Ellong dkk. (2015) dan hasil analisis kimia. Kehilangan total fenol selama pemasakan dapat terjadi melalui dua cara yaitu terlarut dalam cairan pengolah dan melalui proses oksidasi (Pratt, 1992). Semakin tinggi suhu dan semakin lama proses pengolahan dapat mengakibatkan kandungan fenol semakin menurun. Menurut Supriyono dkk. (2014), pembentukan senyawa fenol ada pada rentang pH 4 – 5 sehingga kandungan fenol dapat menurun karena kondisi asam semakin meningkat. Menurut McQue dan Shetty (2005), penurunan senyawa fenolik karena adanya proses degradasi struktur fenolik oleh mikrobia sebagai bentuk strategi detoksifikasi oleh antimikrobia, hasil analisis total fenol dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Hasil Analisis Total Fenol (mg GAE/100g) pada Minuman Sinbiotik Labu Kuning

Waktu Fermentasi	Total Fenol
------------------	-------------

A (12 jam)	21,61 ^a
B (24 jam)	24,92 ^a
C (48 jam)	18,53 ^a

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata pada uji DMRT, dengan tingkat kepercayaan 95%

Minuman sinbiotik ini mengandung senyawa fenolik yaitu flavonoid yang juga dapat berperan sebagai antioksidan. Menurut Hamid dkk. (2010), senyawa flavonoid memiliki potensi sebagai antioksidan karena memiliki gugus hidroksil yang terikat pada karbon cincin aromatik sehingga dapat menangkap radikal bebas yang dihasilkan dari reaksi peroksidasi lemak. Cuppett dkk. (1954) menambahkan bahwa flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam, berada dalam bentuk glukosida (mengandung rantai samping glukosa) atau dalam bentuk bebas yang disebut aglikon.

4. Analisis Fisik Minuman Sinbiotik Labu Kuning

a. Analisis Warna

Hasil analisis warna pada minuman sinbiotik labu kuning dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Hasil Analisis Warna pada Minuman Sinbiotik Labu Kuning

Waktu Fermentasi	Warna
A (12 jam)	Jingga kekuningan
B (24 jam)	Jingga kekuningan
C (48 jam)	Jingga kekuningan

Berdasarkan Tabel 11, dapat diketahui bahwa seluruh perlakuan pada minuman sinbiotik labu kuning menunjukkan warna jingga kekuningan. Kesamaan warna pada seluruh perlakuan karena minuman sinbiotik ini menggunakan 100% sari labu kuning tanpa kombinasi dengan air. Warna jingga kekuningan ini diperoleh dari β -karoten yang memberikan warna oranye-kuning pada labu kuning.

5. Analisis Mikrobiologi Minuman Sinbiotik Labu Kuning

a. Viabilitas Bakteri Asam Laktat

Lactobacillus casei memiliki peran penting dalam minuman sinbiotik labu kuning yaitu menghasilkan asam laktat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan bakteri pembusuk makanan. Berdasarkan Tabel 12, dapat diketahui bahwa total bakteri asam laktat semakin meningkat seiring dengan waktu fermentasi yang semakin lama. Jumlah total BAL semula $7,93 \times 10^8$

CFU/ml pada fermentasi selama 12 jam, lalu meningkat menjadi $1,17 \times 10^9$ CFU/ml pada fermentasi selama 24 jam dan jumlah paling besar ada pada waktu fermentasi selama 48 jam yaitu $1,67 \times 10^9$ CFU/ml. Hal ini menunjukkan bahwa semakin lama waktu fermentasi maka jumlah *Lactobacillus casei* akan semakin tinggi pula. Menurut Magala dkk. (2013), semakin lama waktu fermentasi maka asam piruvat, asam asetat dan asam laktat yang dihasilkan akan semakin banyak oleh bakteri asam laktat. Kimoto dkk. (1999) menambahkan bahwa bakteri probiotik akan mempunyai efek pada lingkungan usus apabila jumlah populasi bakteri tersebut mencapai minimal 10^6 - 10^8 CFU/ml, hal ini menunjukkan bahwa minuman sinbiotik labu kuning telah memenuhi syarat yang ada.

Tabel 12. Total BAL (CFU/ml) pada Minuman Sinbiotik Labu Kuning

Waktu Fermentasi	Total BAL
A (12 jam)	$7,93 \times 10^{8a}$
B (24 jam)	$1,17 \times 10^{9b}$
C (48 jam)	$1,67 \times 10^{9c}$

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata pada uji DMRT, dengan tingkat kepercayaan 95%

b. Salmonella

Pengujian *Salmonella* pada Tabel 13 menunjukkan hasil negatif pada seluruh minuman sinbiotik labu kuning, hal ini berarti pada perlakuan fermentasi selama 12 jam, 24 jam dan 48 jam tidak terdapat bakteri *Salmonella* yang dapat mengkontaminasi produk. Hasil ini sesuai dengan syarat yang ditentukan oleh SNI Minuman Susu Fermentasi Berperisa (SNI 7552 : 2009) yang menyatakan bahwa pertumbuhan patogen *Salmonella* harus negatif. Menurut Jay dkk. (2005), kondisi asam yang dihasilkan oleh asam laktat dapat menghambat pertumbuhan *Salmonella*, dimana patogen tersebut tumbuh baik pada pH 6,6 – 8,2.

Tabel 13. Hasil Pengujian *Salmonella* pada Minuman Sinbiotik Labu Kuning

Waktu Fermentasi	Hasil
A (12 jam)	Negatif
B (24 jam)	Negatif
C (48 jam)	Negatif

6. Analisis Uji Organoleptik Minuman Sinbiotik Labu Kuning

Menurut Susiwi (2009), penerimaan konsumen terhadap suatu produk diawali dengan penilaiannya terhadap penampakan, flavor dan tekstur. Berdasarkan data pada Tabel 14 dapat

diketahui bahwa dari parameter warna, aroma, rasa dan homogenitas, panelis lebih menyukai produk B yaitu minuman sinbiotik labu kuning dengan perlakuan fermentasi 24 jam. Selain itu apabila diurutkan berdasarkan peringkat, minuman sinbiotik A (fermentasi 12 jam) berada pada peringkat kedua, kemudian minuman sinbiotik B (fermentasi 24 jam) berada pada peringkat pertama dan minuman sinbiotik C (fermentasi 48 jam) berada pada peringkat ketiga. Hal ini menunjukkan bahwa pada uji organoleptik, perlakuan terbaik ada pada minuman sinbiotik B dengan waktu fermentasi 24 jam.

Tabel 14. Hasil Uji Organoleptik Minuman Sinbiotik Labu Kuning

Waktu Fermentasi	Parameter				Peringkat
	Warna	Aroma	Rasa	Homogenitas	
A (12 jam)	3,3	2,8	2,8	2,8	2
B (24 jam)	3,4	3	3,3	3,1	1
C (48 jam)	2,2	2,7	2,3	1,8	3

SIMPULAN

Waktu fermentasi pada minuman sinbiotik labu kuning dengan kualitas terbaik dari segi aktivitas antioksidan, analisis kimia, fisik dan mikrobiologis serta nilai evaluasi sensori dengan parameter warna, aroma, rasa dan homogenitas yang paling disukai panelis adalah 24 jam.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemist Inc., Virginia.
- Argarini, T. 1997. Stabilitas Vitamin A Sari Buah Wortel Selama Penyimpanan. *Skripsi*. Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Ayu, S., Yan, R. dan Eka, L. 2013. Penetapan Antioksidan pada Teh Hitam Kombucha Lokal di Bali dengan Waktu Fermentasi. *Skripsi*. Universitas Udayana, Bali.
- Azizah, A. H., Wee, K. C., Azizah, O. dan Azizah, M. 2009. Effect of Boiling and Stir Frying on Total Phenolics, Carotenoids and Radical Scavenging Activity on Pumpkin (*Cucurbita moschato*). *International Food Research Journal*. 16:45-51.
- Badan Standardisasi Nasional. 2009. *SNI 7552:2009 (SNI minuman susu fermentasi berperisa)*. <http://sisni.bsn.go.id>. 30 Agustus 2015.

- Bath, M. A. dan Bhat, A. 2013. Study on Physico-Chemical Characteristics of Pumpkin Blended Cake. *Journal Food Processing and Technology*. 4(9):1-4.
- Cuppett, S., Schrepf, M. dan Hall, C. 1954. *Natural Antioxidant – Are They Reality. Dalam Foreidoon Shahidi: Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effect and Applications*. AOCS Press, Champaign, Illinois.
- deMan, J. M. 1997. *Kimia Makanan*. ITB, Bandung.
- Dima, F., Istrati, D., Garnai, M., Serea, V dan Vizireau, C. 2015. Study on Obtaining Vegetables Juices with High Antioxidant Potential, Preserved by Ohmic Pasteurization. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*. 21(1):67-74.
- Ellong, E. N., Billard, C., Adenet, S. dan Rochefort, K. 2015. Polyphenols, Carotenoids, Vitamin C Content in Tropical Fruits and Vegetables and Impact of Processing Methods. *Food and Nutrition Sciences*. 6:299-313.
- Fardiaz, S. 1987. *Penuntun Praktek Mikrobiologi Pangan. Lembaga Sumberdaya Informasi*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Gaspersz, V. 1991. *Metode Perancangan Percobaan*. Armico, Bandung.
- Hamid, A. A., Aiyelaagbe, O. O., Usman, L. A, Ameen, O. M. dan Lawal, A. 2010. Antioxidant : Its Medidal and Pharmacological Applications. *African Journal Of Pure and Applied Chemistry*. 4(8):142-151.
- Herawati, D. A. dan Wibawa, D. A. A. 2009. Pengaruh Konsentrasi Susu Skim Dan Waktu Fermentasi Terhadap Hasil Pembuatan Soyghurt. *Jurnal Ilmiah Teknik Lingkungan*. 1(2):48-58.
- Hocking, A. D., Arnold, G., Jenson, I., Newton, K. I. dan Sutherland, P. 1997. *Foodborne Microorganisms of Public Health Significance 5th Edition*. Australian Institute of Food Science and Technology Inc, NSW Branch, Food Microbiology Group, North Sidney. Australia.
- Hounhouigan, M. H., Linnemann, A. R., Soumanou, M. M. dan Van Boekel, M. A. J. S. 2014. Effect of Processing on The Quality of Pineapple Juice. *Food Reviews International*. 30(2):112–133.
- Khusnul, K. dan Kusnaldi, J. 2014. Aktifitas Antibakteri Minuman Probiotik Sari Kurma (*Phoenix dactilyfera* L.) Menggunakan *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus casei*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2(3):110-120.
- Kimoto, H., Kurisaki, J.,Tsuji, Mn, Ohmomo, S. dan Okatomo, T. 1999. Lactococci as Probiotic Strain: Adhesion to Human Enterocytelike caco-2 Cells and Tolerans to Low pH and Bile. *Lett in Appl Microbiol*. 29:313-316.
- Lee, K.W. Kim, Y. J. Lee, H.J. and Lee, C.Y. 2003. Cocoa Has More Phenolic Phytochemical and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Redwine. *J. Agric. Food Chem*. 51(25):7292-7295.
- Magala, M., Kohajdová, Z. dan Karovicová, J. 2013. Preparation of Lactic Acid Bacteria Fermented Wheat-Yoghurt Mixtures. *Acta. Sci. Pol., Technol. Aliment*. 12(3):295-302.
- Morris, A., Barnett, A. dan Jean-Burrows, O. 2004. Effect of Processing on Nutrient Content of Food. *Research Council*. 37(3):160-164.
- Mulyani, T., Sudaryati dan Susanto. 2013. Kajian Peran Susu Skim dan Bakteri Asam Laktat pada Minuman Sinbiotik Umbi Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*). *Jurnal Penelitian IFT*. UPN Veteran, Surabaya.

- Pratt, D.E. 1992. *Natural Antioxidant from Plant Material*. Am. Chem. Society, Washinton DC.
- Rodriguez-Amaya, D. B., Kimura, M., Godoy, H. T. dan Amaya-farfar, J. 2008. Updated Brazilian Database on Food Carotenoids: Factors Affecting Carotenoids Composition. *Journal of Food Composition and Analysis*. 21:445-463.
- Rosa, N. 2010. Pengaruh Penambahan Umbi Garut (*Maranta arundinaceae* L) dalam Bentuk Tepung dan Pati sebagai Prebiotik pada Yoghurt sebagai Produk Sinbiotik terhadap Daya Hambat Bakteri *Escherichia coli*. *Skripsi*. Program Studi Ilmu Gizi Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Sasaki , Y., Ito, L.A., Canteli, V, C., Ushirobira, T.M., Ueda, M, T., Dias, F.B.P., Nakamura, C.V., dan Mello, J.C. 2007. Antioxidant Capacity and In Vitro Prevetion of Dental Plaque Formation by Extract and Condensed Tannins of Paullinia cupana. *Molecules*. 12:1950-63
- Saxelin M., Elo, S., Salminen, S. dan Vapaatalo, H. 1991. Dose Response Colonization of Feces after Oral Administration of *Lactobacillus casei* Strain GS. *Microbiol Ecol Health Dis*. 4:14-209.
- Soekarto, S. T. 1985. *Penilaian Organoleptik*. Pusat Pengembangan Teknologi Pangan IPB, Bogor.
- Sreeramulu, G., Zhu, Y. dan Knol, W. 2000. Kombucha Fermentaion and It's Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 48(6):2589-2594.
- Sudarmadji, S., Haryono, B. dan Suhandi. 1984. *Analisis untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Edisi II. Penerbit Alumni, Bandung.
- Sudarmadji. 2003. *Analisis Bahan Makanan dan Pertanian*. Penerbit Liberti, Yogyakarta.
- Susiwi, S. 2009. *Penilaian Organoleptik*. Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung.
- Usmiati, S., Setyaningih, D., Purwani E.Y., Yuliani S. dan Maria, O.G. 2005. Karakteristik Serbuk Labu Kuning (*Cucurbita moschata*). *Jurnal Tekonologi dan Hasil Pangan*. 16(2):157-167.
- Valenzuela, G. M., Soro, A. S., Tauguinias, A. L., Gruszycki, M. R., Cravzov, A. L., Gimenez, M. C. dan Wirth, A. 2014. Evaluation Polyphenol Content and Antioxidant Activity of *Cucurbita* spp. *Open Access Library Journal*. 1:1-6.
- Winarno, F.G. dan Fernandez, I. E. 2007. *Susu dan Produk Fermentasinya*. M-Brio Press, Bogor.
- Yu, R.J. and Van-Scott, E.J. 2005. *α -hydroxyacids, Polyhydroxy Acids, Aldobionic Acids and Their Topical Actions*. In : Baran, R., Maibach, H.I., Taylor and Francis, editors. Textbook of Cosmetic Dermatology. Third Ed. Boca Raton Taylor and Francis, USA.