

**Lampiran 1. Data Analisa Gula Reduksi Bahan Baku Nira Siwalan**

Ulangan	Kadar Gula Reduksi (%)
I	6,908
II	7,527
III	8,057
IV	8,373
V	7,960

## Lampiran 2. Data dan Hasil Analisa Sidik Ragam pH Minuman Probiotik

### A. Data Pengamatan pH Minuman Probiotik

Lama penyimpanan (hari)	Kelompok (Ulangan)						Jumlah	Rerata
	1	2	3	4	5	6		
0	4,40	3,98	4,23	4,03	3,95	4,10	24,69	4,12
10	3,86	3,87	4,02	3,93	3,90	3,93	23,51	3,91
20	3,71	3,73	3,93	3,80	3,83	3,91	22,91	3,92
30	3,76	3,66	3,90	3,69	3,83	3,92	22,76	3,79
Total	15,73	15,24	16,08	15,45	15,51	15,86	93,87	3,91

### B. Analisa Sidik Ragam terhadap pH Minuman Probiotik

Sumber Keragaman	db	JK	RJK	F <sub>hit</sub>	F <sub>tabel</sub> (5%)
Kelompok	5	0,1158	0,0232	2,367 <sup>ns</sup>	2,90
Perlakuan	3	0,3847	0,1282	13,0824 <sup>**</sup>	3,24
Galat	15	0,1274	0,0098		
Jumlah	23	0,6279			

\*) Berbeda nyata pada taraf probabilitas 5%

ns) Tidak berbeda nyata pada taraf probabilitas 5%

$$\text{Koefisien Keragaman (KK)} = \sqrt{\frac{\text{RJK galat}}{\text{rerata}}} \times 100\% = \sqrt{\frac{0,0098}{3,91}} \times 100\% = 2,53\%$$

$$S_y = \sqrt{\text{RJK galat}/r} = \sqrt{0,0098/6} = 0,0404$$

### C. Uji Perbedaan pH dengan Metode Duncan

Lama Penyimpanan (hari)	Rerata	P =			Notasi
		2	3	4	
0	12,37				a
10	13,40	1,03*			b
20	14,78	1,38*	2,41*		c
30	14,84	0,06	1,44*	2,47	c
rp		3,01	3,16	3,25	
Rp		0,7040	0,7391	0,7602	

\*) Berbeda nyata pada BJND 0,05

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata pada beda jarak nyata Duncan (BJND) 0,05.

**Lampiran 3. Data dan Hasil Analisa Sidik Ragam Total Asam (%) Minuman Probiotik**

**A. Data Pengamatan Total Asam (%) Minuman Probiotik**

Lama penyimpanan (hari)	Kelompok (Ulangan)						Jumlah	Rerata
	1	2	3	4	5	6		
0	0,60	0,85	0,71	0,68	0,78	0,73	4,35	0,73
10	0,91	0,92	0,79	0,95	0,95	0,81	5,33	0,89
20	0,98	1,02	0,81	0,99	1,01	0,92	5,73	0,96
30	0,99	1,12	0,83	1,04	1,92	0,40	5,90	0,98
Total	3,48	3,91	3,14	3,66	3,71	3,36	21,31	0,89

**B. Analisa Sidik Ragam terhadap total Asam (%) Minuman Probiotik**

Sumber Keragaman	db	JK	RJK	F <sub>hit</sub>	F <sub>tabel</sub> (5%)
Kelompok	5	0,0054	0,0011	0,1170 <sup>ns</sup>	2,90
Perlakuan	3	0,2509	0,0803	8,5426*	3,24
Galat	15	0,1411	0,0094		
Jumlah	23	0,3874			

\*) = Berbeda nyata pada  $\alpha = 0,05$

ns) = Tidak berbeda nyata (non-significant) pada  $\alpha = 0,05$

$$KK = \frac{\sqrt{RJK \text{ galat}}}{\text{rerata}} \times 100\% = \frac{\sqrt{0,0094}}{0,89} \times 100\% = 10,89\%$$

$$Sy = \sqrt{RJK \text{ galat}/r} = \sqrt{1,5667 \cdot 10^{-3}} = 0,0396$$

**C. Uji Perbedaan antar Total Asam (%) dengan Metode Duncan**

Lama Penyimpanan (hari)	Rerata	P =			Notasi
		2	3	4	
0	0,73				a
10	0,89	0,16*			b
20	0,96	0,07	0,23*		b
30	0,98	0,02	0,09	0,25*	b
rp		3,01	3,16	3,25	
Rp		0,1192	0,1251	0,1287	

\*) Berbeda nyata pada BJND 0,05

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata pada beda jarak nyata Duncan (BJND) 0,05.

**Lampiran 4. Data dan Hasil Analisa Sidik Ragam Total Bakteri Asam Laktat (koloni/ml) pada Mimunan Probiotik**

**A. Data Pengamatan Bakteri Asam Laktat (koloni/ml) Minuman Probiotik**

Lama penyimpanan (hari)	Kelompok (Ulangan)						Jumlah	Rerata
	1	2	3	4	5	6		
0	1,7.10 <sup>9</sup>	5,4.10 <sup>9</sup>	2,1.10 <sup>9</sup>	2,2.10 <sup>9</sup>	4,4.10 <sup>9</sup>	8,4.10 <sup>9</sup>	1,18.10 <sup>10</sup>	1,96.10 <sup>9</sup>
10	2,3.10 <sup>9</sup>	1,3.10 <sup>9</sup>	6,9.10 <sup>9</sup>	6,9.10 <sup>9</sup>	9,2.10 <sup>9</sup>	1,4.10 <sup>9</sup>	2,50.10 <sup>10</sup>	4,17.10 <sup>9</sup>
20	2,1.10 <sup>9</sup>	6,2.10 <sup>9</sup>	1,3.10 <sup>9</sup>	1,3.10 <sup>10</sup>	1,3.10 <sup>10</sup>	2,1.10 <sup>9</sup>	4,06.10 <sup>10</sup>	6,77.10 <sup>9</sup>
30	8,5.10 <sup>9</sup>	9,3.10 <sup>9</sup>	3,8.10 <sup>9</sup>	1,1.10 <sup>10</sup>	1,2.10 <sup>10</sup>	9,8.10 <sup>9</sup>	3,72.10 <sup>10</sup>	6,20.10 <sup>9</sup>
Total	1,46.10 <sup>10</sup>	0,98.10 <sup>10</sup>	1,4.10 <sup>9</sup>	3,31.10 <sup>10</sup>	3,86.10 <sup>10</sup>	0,53.10 <sup>10</sup>	11,46.10 <sup>10</sup>	4,78.10 <sup>9</sup>

**B. Analisa Sidik Ragam terhadap Bakteri Asam Laktat (koloni/ml)**

Sumber Keragaman	db	JK	RJK	F <sub>hit</sub>	F <sub>tabel</sub> (5%)
Kelompok	5	2,2875. 10 <sup>19</sup>	4,5750.10 <sup>18</sup>	0,9915	2,90
Perlakuan	3	9,9365.10 <sup>18</sup>	3,3122.10 <sup>18</sup>	7,1781*	3,29
Galat	15	6,9215.10 <sup>18</sup>	4,6143.10 <sup>18</sup>		
Jumlah	23				

\*) = Berbeda nyata pada  $\alpha = 0,05$

$$KK = \sqrt{\frac{RJK}{\bar{y}}} \times 100\% = \sqrt{\frac{4,6143.10^{18}}{4,78.10^9}} \times 100\% = 44,9\%$$

$$Sy = \sqrt{4,6143.10^{18}/6} = 8,7695.10^8$$

**C. Uji Perbedaan antar Total Bakteri Asam Laktat (koloni/ml) dengan Metode Duncan**

Lama Penyimpanan (hari)	Rerata	P =			Notasi
		2	3	4	
0	1,96.10 <sup>9</sup>				a
10	4,17.10 <sup>9</sup>	2,21.10 <sup>9</sup>			a
30	6,20.10 <sup>9</sup>	2,03.10 <sup>9</sup>	4,24.10 <sup>9**</sup>		ab
20	6,77.10 <sup>9</sup>	0,57.10 <sup>9</sup>	2,60.10 <sup>9</sup>	4,81.10 <sup>9**</sup>	b
rp		3,01	3,16	3,25	
Rp		2,64.10 <sup>9</sup>	2,77.10 <sup>9</sup>	2,85.10 <sup>9</sup>	

**Lampiran 5. Data dan Hasil Analisa Sidik Ragam Luas Daerah Hambatan ( $\text{mm}^2$ ) *L. casei* terhadap *Escherichia coli***

**A. Data Pengamatan Luas Daerah Hambatan ( $\text{mm}^2$ ) *L. casei* terhadap *E. coli***

Lama penyimpanan (hari)	Kelompok (Ulangan)						Jumlah	Rerata
	1	2	3	4	5	6		
0	11,22	12,60	13,69	13,32	12,25	11,22	74,20	12,37
10	11,90	14,44	14,06	14,06	13,32	12,60	80,38	13,40
20	13,69	16,40	14,44	16,00	14,44	13,69	88,66	14,78
30	14,44	16,00	14,06	16,40	14,06	14,06	89,02	14,84
Total	51,25	59,44	56,25	59,78	54,07	51,57	332,26	13,85

**B. Analisa Sidik Ragam Luas Daerah Hambatan ( $\text{mm}^2$ ) *L. casei* terhadap *E. coli***

Sumber Keragaman	db	JK	RJK	$F_{\text{hit}}$	$F_{\text{tabel}} (5\%)$
Kelompok	5	20,2414	4,0483	12,3349*	2,90
Perlakuan	3	25,4273	8,4758	25,8251*	3,29
Galat	15	4,9233	0,3282		
Jumlah	23	50,5920			

\*) = Berbeda nyata pada  $\alpha = 0,05$

$$KK = \frac{\sqrt{\text{RJK galat}}}{\text{rerata}} \times 100\% = \frac{\sqrt{0,3282}}{13,85} \times 100\% = 4,1364\%$$

$$S_y = \sqrt{\text{RJK galat}/r} = 0,2339$$

**C. Uji Perbedaan antar Luas Daerah Hambatan ( $\text{mm}^2$ ) *L. casei* terhadap *E. coli***

Lama Penyimpanan (hari)	Rerata	P =			Notasi
		2	3	4	
0	12,37				a
10	13,40	1,03*			b
20	14,78	1,38*	2,41*		c
30	14,84	0,06	1,44*	2,47*	c
rp		3,01	3,16	3,25	
Rp		0,7040	0,7391	0,7602	

\*) Berbeda nyata pada BJND 0,05

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata pada beda jarak nyata Duncan (BJND) 0,05.

**Lampiran 6. Data dan Hasil Analisa Sidik Ragam Luas Daerah Hambatan ( $\text{mm}^2$ ) *L. casei* terhadap *Salmonella typhi***

**A. Data Pengamatan Luas Daerah Hambatan ( $\text{mm}^2$ ) *L. casei* terhadap *Salmonella typhi***

Lama penyimpanan (hari)	Kelompok (Ulangan)						Jumlah	Rerata
	1	2	3	4	5	6		
0	12,60	12,96	12,96	14,44	13,69	12,25	78,90	13,15
10	13,69	14,44	13,61	14,71	14,82	13,69	84,96	14,16
20	16,40	16,40	15,60	16,00	15,60	14,44	94,44	15,74
30	17,64	17,22	15,64	17,64	16,00	14,82	98,96	16,49
Total	60,33	61,02	57,81	62,79	60,11	55,20	357,26	14,89

**B. Analisa Sidik Ragam Luas Daerah Hambatan ( $\text{mm}^2$ ) *L. casei* terhadap *Salmonella typhi***

Sumber Keragaman	db	JK	RJK	$F_{hit}$	$F_{tabel} (5\%)$
Kelompok	5	8,8826	1,7765	4,92*	2,90
Perlakuan	3	41,1217	13,7072	37,96*	3,29
Galat	15	5,4159	0,3611		
Jumlah	23	55,4202			

\*) = Berbeda nyata pada  $\alpha = 0,05$

$$KK = \frac{\sqrt{0,3611}}{14,89} \times 100\% = 4,0357\%$$

$$Sy = \sqrt{0,3611/6} = 0,2453$$

**C. Uji Perbedaan antar Luas Daerah Hambatan ( $\text{mm}^2$ ) *L. casei* terhadap *Salmonella typhi***

Lama Penyimpanan (hari)	Rerata	P =			Notasi
		2	3	4	
0	13,15				a.
10	14,16	1,01*			b
20	15,74	1,58*	2,59*		c
30	16,49	0,75*	2,33*	3,34*	d
rp		3,01	3,16	3,25	
Rp		0,7384	0,7752	0,7972	

\*) Berbeda nyata pada BJND 0,05

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata pada beda jarak nyata Duncan (BJND) 0,05

**Lampiran 7. Data dan Hasil Analisa Sidik Ragam Luas Daerah Hambatan ( $\text{mm}^2$ ) *L. casei* terhadap *Staphylococcus aureus***

**A. Data Pengamatan Luas Daerah Hambatan ( $\text{mm}^2$ ) *L. casei* terhadap *Staphylococcus aureus***

Lama penyimpanan (hari)	Kelompok (Ulangan)						Jumlah	Rerata
	1	2	3	4	5	6		
0	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	37,50	6,25
10	6,25	6,55	6,25	6,25	6,50	6,25	38,05	6,34
20	7,02	6,76	6,50	6,76	6,50	6,68	40,22	6,70
30	6,76	7,29	6,50	7,02	6,76	6,76	41,09	6,85
Total	26,28	26,85	25,50	26,28	26,01	25,44	156,86	6,54

**B. Analisa Sidik Ragam Luas Daerah Hambatan ( $\text{mm}^2$ ) *L. casei* terhadap *Staphylococcus aureus***

Sumber Keragaman	db	JK	RJK	F <sub>hit</sub>	F <sub>tabel</sub> (5%)
Kelompok	5	0,2525	0,0505	1,85	2,90
Perlakuan	3	1,4707	0,4902	17,96*	3,29
Galat	15	0,4088	0,0273		
Jumlah	23	2,1320			

\*) = Berbeda nyata pada  $\alpha = 0,05$

$$KK = \frac{\sqrt{0,0273}}{6,54} \times 100\% = 2,5264\%$$

$$Sy = \sqrt{0,0273/6} = 0,0675$$

**C. Uji Perbedaan antar Luas Daerah Hambatan ( $\text{mm}^2$ ) *L. casei* terhadap *Staphylococcus aureus***

Lama Penyimpanan (hari)	Rerata	P =			Notasi
		2	3	4	
0	6,25				a
10	6,34	0,09			a
20	6,70	0,36*	0,45*		b
30	6,85	0,15	0,51*	0,60*	b
rp		3,01	3,16	0,25	
Rp		0,2032	0,2133	0,2194	

\*) Berbeda nyata pada BJND 0,05

## Lampiran 8. Analisa Kadar Gula Reduksi (Metode Nelson-Somogyi) (Sudarmadji, 1984)

### Penyiapan Kurva Standar

Dibuat larutan glukosa standar (10 mg glukosa anhidrat/100 ml). Dari larutan glukosa standar tersebut dilakukan 6 pengenceran sehingga diperoleh larutan glukosa dengan konsentrasi : 2, 4, 6, 8, 10 mg/100 ml. Disiapkan 7 tabung reaksi yang bersih, masing-masing diisi dengan 1 ml air suling sebagai blanko. Ke dalam masing-masing tabung di atas ditambahkan 1 ml reagensia Nelson (A+B), dan semua tabung dipanaskan pada penangas air mendidih selama 20 menit. Setelah itu semua tabung diambil dan didinginkan bersama-sama pada tempat yang berisi air dingin sehingga suhu tabung mencapai 25°C. Setelah dingin, larutan pada semua tabung ditambahkan 1 ml reagensia Arsenomolybdat, digojog sampai semua endapan  $\text{Cu}_2\text{O}$  yang ada larut kembali. Setelah semua endapan  $\text{Cu}_2\text{O}$  larut sempurna, ke dalam masing-masing tabung reaksi ditambahkan 7 ml air suling dan digojog sampai homogen. Kemudian OD (*optical density*) dari masing-masing larutan ditera dengan panjang gelombang 540 nm. Dari hasil pengamatan dibuat kurva standar yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi glukosa dan OD.

### Penentuan Gula Reduksi pada Contoh

Diambil 50 ml larutan sampel dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambah dengan 25 ml aquades dan 10 ml HCl 30%. Larutan dipanaskan di atas penangas air pada suhu 67 - 70°C selama 10 menit. Kemudian contoh didinginkan cepat-cepat sampai suhu 20°C dan dinetralkan dengan NaOH



45%, kemudian diencerkan sampai volume 100 ml. Larutan contoh dipipet 1 ml ke dalam tabung reaksi yang bersih, kemudian ditambah 1 ml reagensia Nelson dan selanjutnya dilakukan seperti pada penyiapan kurva standar.

**Lampiran 9. Pengamatan pH (Fardiaz, 1986)**

Nilai pH ditentukan dengan menggunakan pH meter. Sebelum dilakukan pengukuran, pH meter perlu distandarisasi terlebih dahulu dengan mencelupkan elektroda pH meter ke dalam buffer 4,0 atau 7,0. Selanjutnya nilai pH yang ditunjukkan pada pH meter disamakan dengan nilai pH buffer. Setelah itu dilakukan pengukuran terhadap larutan contoh dengan mencelupkan elektrodanya ke dalam larutan contoh dan dibiarkan beberapa saat sampai diperoleh pembacaan yang stabil.

**Lampiran 10. Pengamatan Total Asam (Ranggana, 1977)**

Sampai diambil 10 ml dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 3 tetes indikator phenolphthalein, kemudian dititrasikan dengan larutan NaOH 0,1 N sampai warnanya berubah menjadi merah muda.

Perhitungan :

BM asam laktat = 90

fp = faktor pengenceran

$$\text{Total asam (\%)} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH} \times 90 \times \text{fp}}{\text{ml sampel} \times 1000} \times 100\%$$

**Lampiran 11. Pengamatan Jumlah Bakteri Asam Laktat (Harrigan, 1976)**

Persiapan pengenceran sampel dilakukan dengan memipet 1 ml sampel ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml larutan pepton 0,1%. Suatu deret pengenceran desimal dipersiapkan sampai tahap pengenceran  $10^{-10}$ . Selanjutnya sebanyak 1 ml sampel dari setiap pengenceran tersebut dipipet lalu dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Ke dalam masing-masing cawan ditambahkan kira-kira 10 ml GYP Agar steril. Setelah itu cawan petri disimpan dalam inkubator bersuhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24-28 jam dengan posisi terbalik. Koloni yang tumbuh dihitung.

## Lampiran 12. Pengamatan Daya Antimikroba (Metode Sumuran) (Ray, 1992)

### Persiapan Kultur Bakteri Patogen

Bakteri patogen dari media padat diinokulasikan kurang lebih 1 - 2 ose ke dalam tabung yang berisi 5 ml media Nutrient Broth dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, kultur bakteri disetarakan kekeruhannya sama dengan larutan ½ Mc. Farland I ( $\sim 1,5 \cdot 10^8$  mo/ml), kemudian diencerkan sampai konsentrasi kultur mengandung  $1,5 \cdot 10^5$  mo/ml.

### Pengujian Daya Antimikroba

NA 10 ml dan 5 ml dicairkan pada suhu 100°C, lalu didinginkan pada suhu 50°C selama 5 menit. NA 10 ml dituang dalam cawan petri steril dan dibiarkan sampai padat. Kemudian bakteri patogen yang sudah mengandung  $1,5 \cdot 10^5$  mo/ml dipipet 1 ml, lalu dimasukkan ke tabung yang berisi NA 5 ml, dihomogenkan lalu dituang ke dalam cawan petri yang telah berisi 10 ml NA yang telah padat.

Setelah padat, media tersebut dilubangi dengan alat pelubang gabus (diameter 5 mm) dan diisi dengan minuman probiotik yang akan diuji daya antimikrobanya dengan menggunakan mikropipet 20 µm. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati diameter daerah penghambatan dengan jangka sorong dan dihitung luasnya. Daerah penghambatan yang diamati adalah daerah transparan yang tidak ditumbuhi oleh bakteri patogen.