

MINUMAN PROBIOTIK NIRA SIWALAN : KAJIAN LAMA PENYIMPANAN TERHADAP DAYA ANTI MIKROBA *Lactobacillus casei* PADA BEBERAPA BAKTERI PATOGEN

Thomas Indarto P. Suseno^{*)}; Sutarjo Surjoseputro^{*)}; dan Anita K.^{**)}

Abstrak

Nira siwalan dapat dibuat menjadi minuman probiotik karena memiliki kadar nutrisi yang relatif lengkap. Pada pembuatan minuman probiotik ini nira siwalan ditambah susu skim sebagai sumber laktosa dan menambah nutrisi untuk pertumbuhan bakteri *Lactobacillus casei*.

Kultur bakteri yang digunakan untuk membuat minuman probiotik adalah *Lactobacillus casei* FNCC 0090 NRRL B-1922, untuk menentukan daya anti mikroba minuman probiotik digunakan bakteri patogen dari kultur murni *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 IFO 13276, *Salmonella typhi* FNCC 0050 IFO 12529 dan *Enteropatogenik Escherichia coli* FNCC 0091 IFO 3301.

Dari penelitian dapat diketahui : penyimpanan minuman probiotik nira siwalan (0, 10, 20 dan 30 hari) pada suhu 5 - 12 °C, berpengaruh nyata pada pH dan total asam, total bakteri asam laktat dan daya hambat *L. casei* terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* dan *Escherichia coli*. Daya hambat *L. casei* terhadap *Salmonella typhi* lebih besar daripada *Escherichia coli*, dan kurang mampu menghambat *Staphylococcus aureus*.

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Nira siwalan (*legen*) dapat dibuat menjadi minuman probiotik, karena pada nira siwalan terdapat gula yang merupakan sumber karbon dan terdapat nutrisi yang cukup lengkap sebagai media pertumbuhan bagi bakteri asam laktat. Selain itu nira siwalan juga tersedia dalam jumlah yang relatif banyak dan murah harganya, tetapi belum diolah secara optimal. Dengan diolahnya nira siwalan menjadi minuman probiotik diharapkan dapat meningkatkan nilai ekonomis siwalan sekaligus sebagai usaha penganekaragaman produk pangan.

Minuman probiotik merupakan istilah lain untuk menyebut minuman fermentasi asam laktat. Probiotik (bahasa Yunani, *probiotic* = untuk hidup) adalah minuman kesehatan yang

mengandung bakteri asam laktat hidup yang mampu bertahan hidup dalam keasaman lambung sehingga dapat menempati usus dalam kuantitas yang cukup besar (Waspodo, 1997). Bakteri ini bersifat antagonis terhadap bakteri patogen, karena selama fermentasi bakteri asam laktat menghasilkan asam-asam organik dan senyawa bakteriocin yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba patogenik dan mikroba pembusuk (Kilara dan Shahani, 1978). Minuman probiotik terbukti dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen dan pembusuk sehingga dapat menjaga keseimbangan mikroflora alami di dalam usus. Dengan mengkonsumsi minuman probiotik dapat membantu mencegah gangguan saluran pencernaan (gastroenteritis) yang sering dialami oleh masyarakat pada umumnya.

Minuman probiotik dari hasil fermentasi susu yang sudah dikenal luas antara lain *yogurt*, susu asidofilus, *bulgarian milk*, *kefir*, *kumiss*, *piima*, *skyr*, *taeete*, *leben* (Mesir), *dahi* (India), *Hamao* (Asia Tengah), *yakult* dan masih banyak lagi (Vedamuthu, 1982). Pembuatan minuman

^{*)} Staf Pengajar Tetap Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya

^{**)} Alumni Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya

probiotik dari nira siwalan pada penelitian ini didasarkan pada pembuatan *yakult* yaitu dengan menggunakan bakteri asam laktat *Lactobacillus casei*., jenis bakteri ini merupakan salah satu bakteri asam laktat yang mampu hidup dalam usus manusia dan hanya kadang-kadang dijumpai di usus, sehingga perlu diberikan dalam diet manusia (Waspo, 1997).

Penambahkan susu skim sebagai sumber laktosa pada pembuatan minuman probiotik dari nira siwalan perlu, karena susu skim terdapat laktosa yang dalam proses fermentasi akan diubah menjadi asam laktat. Kandungan laktosa dalam susu skim adalah sebesar 74 persen (Pederson, 1971), sehingga dengan kandungan laktosa yang cukup tinggi ini sumber energi yang tersedia bagi *L. casei* untuk melakukan proses metabolisme juga tinggi. Selain itu fungsi penambahan susu skim adalah untuk memperbaiki citarasa dan konsistensi minuman probiotik.

Penyimpanan produk susu fermentasi biasanya dilakukan pada suhu rendah yaitu antara 5-12°C. Selama penyimpanan pada suhu refrigerasi tersebut akan terjadi penurunan aktivitas bakteri yang terkandung pada produk (Campbell dan Marshall, 1975). Penurunan aktivitas bakteri asam laktat selama penyimpanan pada suhu refrigerasi ini karena pada suhu tersebut enzim-enzim yang berperan dalam proses metabolisme terhambat kerjanya, dengan demikian umur simpan produk dapat lebih lama.

Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh lama penyimpanan minuman probiotik dari nira siwalan terhadap daya antimikroba *L. casei* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* dan *Escherichia coli*.

Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh lama penyimpanan minuman probiotik dari nira siwalan terhadap daya antimikroba *Lactobacillus casei* terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* dan *Escherichia coli*.

TINJAUAN PUSTAKA

Tinjauan Umum Nira Siwalan

Nira siwalan pada keadaan segar rasanya manis, berbau harum, jernih dan tak berwarna. Rasa manis nira disebabkan oleh tingginya kadar gula (kurang lebih 12%). Nira mengandung karbohidrat yang terdiri dari sukrosa, glukosa dan fruktosa. Komposisi kimia nira siwalan dapat dilihat pada Tabel 1.

Nira segar tidak tahan disimpan, hanya beberapa jam ($\pm 24 - 36$ jam) sejak disadap, nira siwalan akan mengalami perubahan, yaitu ditandai dengan timbulnya gelembung dan rasanya seperti tuak atau asam (Susanto, 1994). Nira siwalan mengalami fermentasi dengan adanya mikroorganisme yang merubah sukrosa menjadi alkohol, dan berlanjut menjadi asam.

Tabel 1. Komposisi Kimia Nira Siwalan (tiap 100 g bahan)

Komposisi	Nira Siwalan
Air (g)	86,1
Protein (g)	0,3
Lemak (g)	0,02
Karbohidrat (g)	13,54
Abu (g)	0,04

Sumber : Susanto, 1994

Minuman Probiotik

Probiotik (bahasa Yunani, *probiotik* = untuk hidup), adalah minuman kesehatan yang mengandung bakteri asam laktat hidup yang mampu bertahan hidup dalam keasaman lambung sehingga dapat menempati usus dalam kuantitas yang cukup besar yang bermanfaat untuk memperbaiki keseimbangan mikroba dalam saluran pencernaan manusia (Waspodo, 1997).

Bakteri probiotik dikenal sejak tahun 76 SM. Ahli sejarah Roma, Plinio, pernah memberi saran bahwa minum susu fermentasi dapat mengatasi keracunan dan infeksi saluran pencernaan. Pada tahun 1907, Metchnikoff memberikan penjelasan ilmiah tentang manfaat bakteri laktat dalam *yoghurt*. Menurut pendapatnya, mengonsumsi *yoghurt* yang mengandung bakteri *Lactobacillus sp* dalam jumlah besar akan mengusir bakteri pembentuk racun yang hadir dalam usus manusia sehingga dapat memperpanjang usia dan mencegah terjadinya penuaan dini. Aplikasi minuman probiotik dalam pengobatan antara lain untuk mencegah infeksi saluran kandung kemih, mencegah konstipasi atau sembelit, melindungi diare pada bayi dan orang yang sedang melakukan perjalanan. Selain itu juga dapat menanggulangi efek pengobatan dengan antibiotik dalam jangka panjang, mencegah hiperkolesterol, mencegah terjadinya kanker usus, pengeroposan tulang dan meningkatkan sistem kekebalan tubuh (Waspodo, 1997). Menurut Salminen (1993), syarat dari minuman probiotik adalah mengandung lebih dari 10^8 sel bakteri *L. casei* dalam satu mililiter dalam keadaan hidup.

Tinjauan Umum *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei yang digunakan sebagai starter pada produk minuman probiotik termasuk jenis bakteri asam laktat homofermentatif, yaitu bakteri yang memfermentasi glukosa menjadi asam laktat dalam jumlah yang besar (90 persen). Selain asam laktat juga dihasilkan asam sitrat, malat, suksinat, asetaldehid, diasetil dan asetoin dalam jumlah yang kecil, yang mempengaruhi cita rasa minuman probiotik (Speck, 1978).

Berdasarkan morfologinya, *L. casei* berbentuk batang pendek dalam koloni tunggal

maupun berantai, dengan ukuran panjang 1,5 - 5,0 mm dan lebar 0,6 - 0,7 mm. Bakteri ini bersifat Gram positif, katalase negatif, tidak membentuk endospora maupun kapsul, tidak mempunyai flagela dan tumbuh dengan baik pada kondisi anaerob fakultatif. Berdasarkan suhu pertumbuhannya, bakteri ini termasuk bakteri mesofil yang dapat hidup pada suhu 15 - 41°C dan pada pH 3,5 atau lebih, sedangkan kondisi optimum pertumbuhannya adalah pada suhu 37°C dan pH 6,8 (Mutai, 1981). *L. casei* biasanya diisolasi dari produk susu dan lumen usus manusia (Robinson, 1981).

Syarat-syarat Bakteri Probiotik

Di dalam saluran usus manusia, bakteri yang masuk dalam saluran pencernaan manusia harus menaklukkan berbagai penghalang fisiologis yang terdapat dalam saluran pencernaan manusia agar tetap hidup. Penghalang pertama adalah getah lambung dan yang kedua adalah cairan empedu. Penghalang-penghalang ini termasuk bakterisidal kuat sehingga kebanyakan mikroorganisme yang masuk usus manusia akan mati (Yakult Honsha, 1989).

Sifat terpenting dari strain bakteri asam laktat probiotik adalah mampu bertahan hidup saat melalui mulut, lambung, usus kecil dan usus besar. Selain itu, bakteri asam laktat juga harus mampu bertahan hidup pada tingkat keasaman lambung yang dapat mencapai pH sampai di bawah 3 dan asam empedu yang bersifat bakterisidal (Coste, 1997). Agar bakteri asam laktat yang dikonsumsi memiliki pengaruh dan bermanfaat terhadap kesehatan saluran usus manusia, strain probiotik harus mampu melekat dan tumbuh pada permukaan sel mukosa saluran usus (Salminen, 1993).

Sifat-sifat strain bakteri probiotik yang baik menurut Salminen (1993) adalah : stabil pada kondisi asam, khususnya asam lambung; stabil terhadap asam empedu; mampu bertahan hidup dalam saluran pencernaan manusia; mampu menyebar dan berkembang biak pada sel-sel usus manusia; mengkolonisasi pada saluran pencernaan manusia; memproduksi senyawa atau substansi antimikroba; bersifat antagonis terhadap bakteri patogen dan kariogenik ; tumbuh baik secara *in*

vitro ; aman untuk dikonsumsi manusia.

Dasar pemilihan stater bakteri asam laktat adalah kemampuan hidupnya di dalam usus manusia. Hanya bakteri asam laktat yang mampu mencapai dan tetap hidup di dalam usus manusia, yang dapat memainkan peranan dalam mengurangi bakteri patogen usus dan meningkatkan kesehatan manusia (Yakult Honsha, 1990). Bakteri-bakteri asam laktat yang termasuk dalam bakteri probiotik antara lain *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Bifidobacterium bifidum* dan *Enterococcus faecium*.

Hasil percobaan secara *ex vivo*, diketahui bahwa *L. casei* mampu hidup pada kisaran pH 3,0 sampai 7,0 bakteri ini memiliki sifat tahan terhadap asam lambung dan asam empedu (Coste, 1997). *L. casei* jarang dijumpai di usus, maka bakteri ini perlu diberikan dalam diet manusia (Waspodo, 1997). Selain itu, *L. casei* memiliki keunggulan dalam menggunakan gula sebagai sumber karbon dalam jangka waktu yang cukup lama dibandingkan dengan kelompok bakteri probiotik yang lain, sehingga produk memiliki umur simpan yang cukup lama (Salminen, 1993).

Daya Antimikroba Bakteri Probiotik

Awal abad keduapuluh, telah dinyatakan bahwa asam laktat dan produk lain yang terdapat dalam susu yang difermentasi oleh bakteri asam laktat dapat menghambat pertumbuhan dan pembentukan toksin bakteri-bakteri pembentuk spora yang anaerobik dalam usus besar. Keunggulan tersebut mengakibatkan produk susu hasil fermentasi menjadi bahan pangan yang dikenal dan disukai masyarakat serta dipercaya sebagai makanan kesehatan. Fermentasi susu menghasilkan produk-produk metabolit seperti asam laktat, asam asetat dan hidrogen peroksida serta senyawa bakteriocin, misalnya *asidofilin*, *asidolin*, *bulgarikan*, *nisin*, *diplococin* dan sebagainya, yang dapat mencegah atau menghambat pertumbuhan mikroba patogenik dan mikroba perusak (Kilara dan Shahani, 1978).

Menurut Oberman (1985), asam-asam lain yang diproduksi oleh bakteri asam laktat seperti asam asetat, propionat dan formiat, walaupun

diproduksi dalam jumlah sedikit, tetapi mempunyai daya antimikroba yang lebih kuat dibandingkan dengan asam laktat. Asam laktat dan sedikit asam asetat yang terbentuk mempunyai efek penghambat terhadap mikroba patogen, karena selain disebabkan oleh penurunan pH di bawah pH optimal pertumbuhan mikroba patogen, tetapi juga karena adanya molekul asam tidak berdisosiasi yang dapat menembus dinding sel dan mengganggu proses metabolisme dan mekanisme genetik sel bakteri patogen (Field, 1989).

Diketahui bahwa bakteri *vibrio* dan bakteri kolera dalam yakult yang mengandung *L. casei* akan mati kurang dari 5 menit. Sedangkan bakteri disentri, *tifus* dan *stafilokokus* akan mati dalam waktu yang lebih lama yaitu antara 35 - 40 menit. Sementara itu bakteri *koliiform* adalah bakteri yang paling tahan terhadap bakteri asam laktat, karena baru akan mati setelah dari 60 menit (Yakult Honsha, 1990). Hal ini karena bakteri *koliiform* merupakan bakteri alami yang juga terdapat dalam saluran pencernaan manusia.

Konsumsi yakult yang mengandung *L. casei* secara teratur setiap hari dapat meningkatkan jumlah kelompok bakteri *Lactobacillus*, dan sebaliknya dapat menekan bakteri *coli*. Jumlah bakteri *coli* akan menurun dari $8,0 \times 10^7$ koloni/ml hingga di bawah $1,0 \times 10^7$ koloni/ml jika mengkonsumsi yakult selama 9 hari. Akan tetapi ketika konsumsi yakult dihentikan, jumlah bakteri *L. casei* akan menurun. Sebaliknya bakteri *coli* jumlahnya akan meningkat hingga $6,0 \times 10^7$ koloni/ml dalam waktu 9 hari setelah konsumsi yakult dihentikan.

Penyimpanan produk susu fermentasi biasanya dilakukan pada suhu rendah, yaitu antara 5 - 12°C. Pada suhu tersebut aktivitas metabolisme dari stater bakteri akan terhambat, tetapi bakteri tersebut tidak mati. Jika suhu dinaikkan hingga suhu optimal pertumbuhannya, maka bakteri akan aktif kembali (Yakult Honsha, 1990). Selama waktu penyimpanan pada suhu refrigerasi terjadi penurunan aktivitas bakteri yang terkandung dalam produk (Campbell dan Marshall, 1975).

Peranan Bakteri Asam Laktat (*L. casei*) Terhadap Kesehatan

Menurut Yakult Honsha (1990), peranan bakteri *Lactobacillus casei* dalam usus manusia adalah : (1) mengatur keseimbangan mikroflora alami di dalam usus; (2) merangsang usus untuk memproduksi asam organik seperti asam laktat yang berguna untuk membantu proses pencernaan dan penyerapan zat-zat; (3) mengurangi jumlah bakteri patogen dan pembusuk, serta menekan produksi senyawa beracun di dalam tubuh seperti amonia, fenol dan hidrogen sulfida. Bakteri asam laktat yang masih hidup dan tertelan ke dalam tubuh akan mencapai saluran usus manusia dan sebagian akan menetap, memperbanyak diri dan memproduksi komponen-komponen metabolit seperti asam laktat yang dapat mengurangi bakteri patogen dan mengontrol ekskresi kotoran dengan cara menstimulir dinding usus (Yakult Honsha, 1989).

Fungsi lain bakteri probiotik adalah dapat menanggulangi *lactose-intolerance*, menurunkan kadar kolesterol, mencegah penyakit jantung, mencegah penyakit degeneratif lain dan penuaan dini, antikarsinogenik serta dapat merangsang sistem kekebalan tubuh (Waspodo, 1997).

L. casei juga dapat menurunkan kerja enzim yang berhubungan dengan penyakit kanker usus besar. Enzim b-glukuronidase, nitroreductase dan *glycochol acid hydrolase* dikenal dapat meningkatkan laju konversi dari prokarsinogen menjadi karsinogen proksimal dalam usus halus dan dalam konsentrasi yang tinggi dapat meningkatkan resiko penyakit kanker usus besar (Coste, 1997).

Bakteri Patogen Pada Saluran Pencernaan Manusia

Mikroba patogen yang terdapat di dalam makanan, biasanya masuk ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan. Infeksi oleh mikroba tersebut dapat dimulai dari membran mukosa pada dinding saluran pencernaan, terutama usus halus (Fardiaz, 1983).

Menurut Fardiaz (1983), berdasarkan cara penyebaran dan daya penetrasi bakteri patogen di dalam tubuh yang dapat menyebabkan infeksi saluran pencernaan, maka dapat dibedakan atas tiga golongan, yaitu : (1) bakteri yang berkembang biak pada permukaan dinding saluran pencernaan dan tidak menembus ke dalam sel-sel mukosa, misalnya bakteri penyebab kolera ; (2) bakteri yang menebus sel-sel mukosa dan berkembang biak di dalam sel-sel tersebut tetapi tidak menyebar ke jaringan-jaringan yang lebih dalam, misalnya bakteri penyebab disentri ; (3) bakteri yang menyebar ke jaringan-jaringan yang lebih dalam, baik dalam cara menembus sel mukosa atau di antara sel-sel mukosa, misalnya bakteri penyebab salmonellosis dan disentri amuba.

METODE PENELITIAN

Bahan

Nira siwalan diperoleh dari perkebunan milik rakyat di Desa Jurang Kuping, Kecamatan Benowo, Kabupaten Gresik, Jawa Timur.

Kultur bakteri yang digunakan adalah *Lactobacillus casei* FNCC 0090 NRRL B-1922 dan kultur murni bakteri patogen yaitu *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 IFO 13276, *Salmonella typhi* FNCC 0050 IFO 12529 dan *Enteropatogenik Escherichia coli* FNCC 0091 IFO 3301 diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi PAU Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Media yang digunakan antara lain : NB (*Nutrient Broth*), NA (*Nutrient Agar*), SS Agar (*Salmonella-Shigella Agar*), MSA (*Manitol Salt Agar*), EMB (*Eosin Methylene Blue*), GYPA (*Glukosa Yeast Pepton Agar*), GYPB (*Glukosa Yeast Pepton Broth*) dan larutan pepton 0,1 %.

Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak kelompok (RAK) non faktorial yang terdiri dari 4 (empat) perlakuan yaitu waktu penyimpanan minuman probiotik dan diulang sebanyak 6 (enam) kali. Perlakuan waktu penyimpanan : $S_1 = 0$ hari (tanpa penyimpanan); $S_2 = 10$ hari ; $S_3 = 20$ hari ; $S_4 = 30$ hari. Data hasil penelitian yang diperoleh dianalisa sidik ragam. Apabila ada perbedaan dilanjutkan dengan uji BJND (Beda Jarak Nyata Duncan).

Persiapan Starter

Starter untuk pembuatan minuman probiotik dipersiapkan dengan menginokulasikan kultur *L. casei* dari Glukosa Yeast Pepton Agar (GYPA) sebanyak kurang lebih 2 ose ke dalam susu skim 10% steril. Setelah difermentasi selama 2 hari pada suhu 37°C, dilakukan pengukuran jumlah *L. casei* ($> 10^8$ mikroba/ml) untuk mengontrol bahwa ada pertumbuhan dari *L. casei*. Kultur ini disebut kultur induk.

Pembuatan kultur antara dilakukan dengan menginokulasi *L. casei* sebanyak 0,1% (v/v) dari kultur induk. Setelah inokulasi, kemudian diinkubasi selama 2 hari pada suhu 37°C. Setelah diukur jumlah *L. casei* ($> 10^8$ mikroba/ml), 0,5% (v/v) kultur ini ditumbuhkan kembali didalam campuran 10% susu skim dan 3% glukosa yang telah disterilisasi. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 37°C. Kalau jumlah *L. casei* memenuhi syarat lebih dari 10^8 mikroba/ml, maka kultur kerja ini siap diinokulasikan ke dalam nira siwalan yang telah dipersiapkan untuk minuman probiotik, sebanyak 0,5% (v/v). Tahap Proses Pembuatan Minuman Probiotik pada Gambar 1.

Pengamatan

Pengamatan yang dilakukan terhadap bahan baku (nira siwalan) adalah kadar gula reduksi ; pengamatan terhadap minuman probiotik meliputi pH, total asam, jumlah bakteri asam laktat (ALT BAL) dan daya antimikroba.

HASIL DAN PEMBAHASAN

pH

pH rata-rata minuman probiotik setelah diinkubasi 4 hari dan disimpan dalam refrigerator selama 30 hari adalah berkisar antara 3,79 - 4,12. Dari analisa varian dapat diketahui bahwa perlakuan waktu penyimpanan memberikan pengaruh nyata ($\alpha = 0,05$) terhadap pH minuman probiotik dan hasil uji BJND 5% pada Tabel 2. Menurut Salminen (1993) pada penyimpanan suhu rendah, laju metabolisme menjadi rendah tetapi asam laktat terus dapat diproduksi selama sumber karbon masih tersedia pada media. Dihasilkannya asam laktat sebagai hasil dari metabolisme gula menyebabkan penurunan pH produk. Proses metabolisme dari *L.*

casei yang masih berjalan dengan baik, selain disebabkan masih tersedianya sumber karbon juga dapat disebabkan suhu produk (minuman probiotik) setelah inkubasi dan dimasukkan dalam refrigerator, perlahan-lahan mengadakan keseimbangan dengan suhu refrigerator sehingga suhu dalam minuman probiotik turun. Kondisi suhu lingkungan akan berpengaruh terhadap pertumbuhan *L. casei* dan proses metabolismenya.

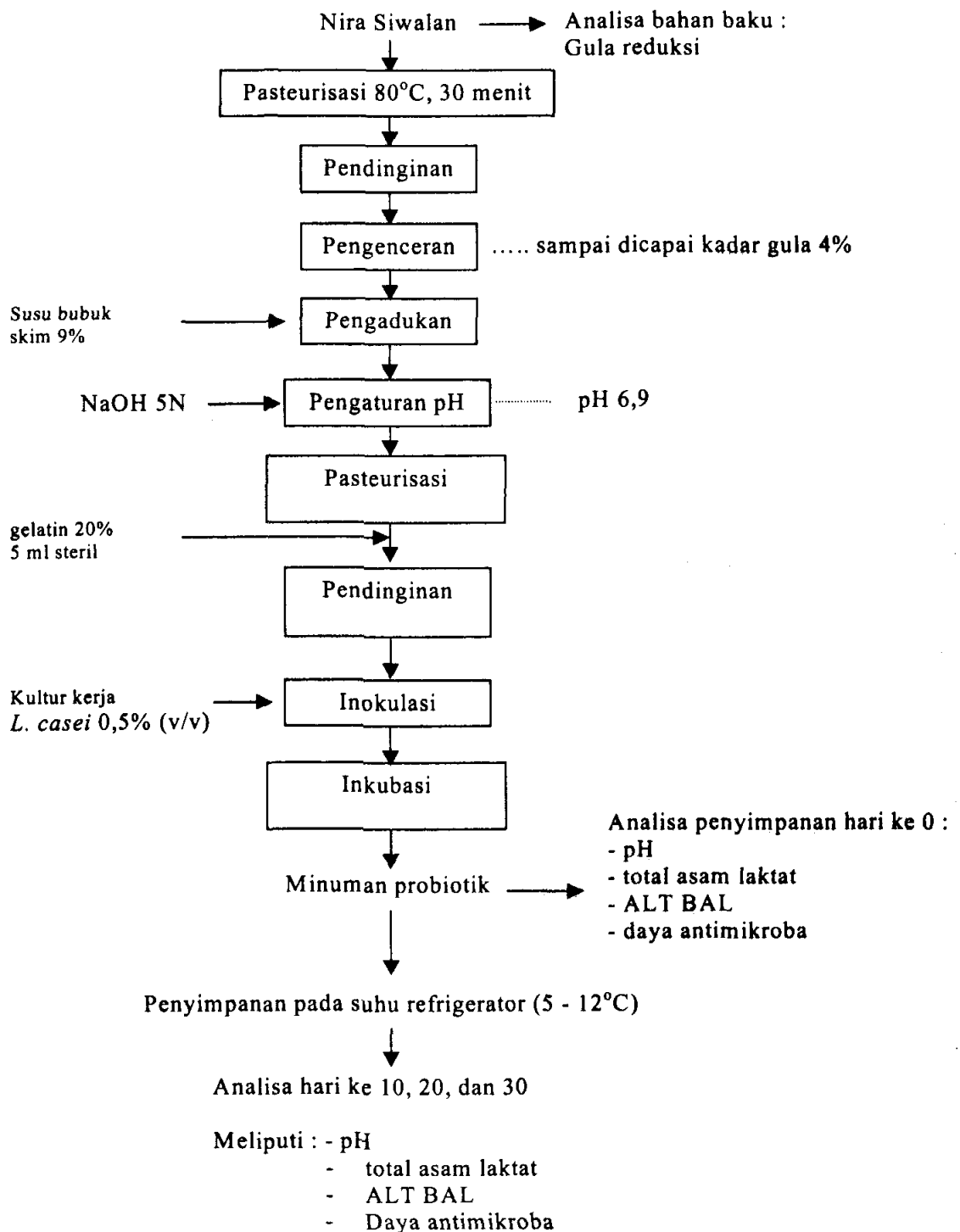
Pada penyimpanan suhu rendah (5-12°C), pertumbuhan *L. casei* menjadi terhambat dan proses metabolisme berjalan lambat, sehingga penurunan pH produk juga berjalan lambat (Gambar. 2). Dengan terhambatnya proses metabolisme dari *L. casei* ini, produk minuman probiotik dapat diperpanjang masa simpannya.

Menurut Salminen (1993), penyimpanan pada suhu rendah (5°C) pada produk yakult akan menghasilkan pH yang lebih tinggi (3,80) dengan masa simpan lebih dari 30 hari, dibandingkan dengan yakult yang disimpan pada suhu 25°C yang menghasilkan pH 3,50 dengan masa simpan 13 hari.

Total Asam

Total asam dinyatakan sebagai persen asam laktat, karena *L. casei* yang digunakan sebagai starter termasuk bakteri asam laktat homofermentatif yang menghasilkan asam laktat sebagai komponen utama. Persentase total asam laktat rata-rata dari minuman probiotik setelah disimpan selama 30 hari dalam suhu refrigerator (5-12°C), berkisar antara 0,73% - 0,98%. Hasil analisa sidik ragam, perlakuan lama penyimpanan memberikan pengaruh nyata pada total asam minuman probiotik dan hasil uji BJND 5% pada Tabel 3.

Produk yang disimpan pada suhu rendah (5-12°C) dapat menghambat laju metabolisme dan pertumbuhan *L. casei*. Dengan terhambatnya proses metabolisme *L. casei* menyebabkan asam-asam organik yang dihasilkan juga terhambat (Gambar 2). Menurut Kumalaningsih, dan Hidayat (1995), penurunan suhu penyimpanan sampai suhu minimum pertumbuhan mikroorganisme akan menghambat pertumbuhan, tapi aktivitas metabolisme masih dapat berlangsung secara lambat.

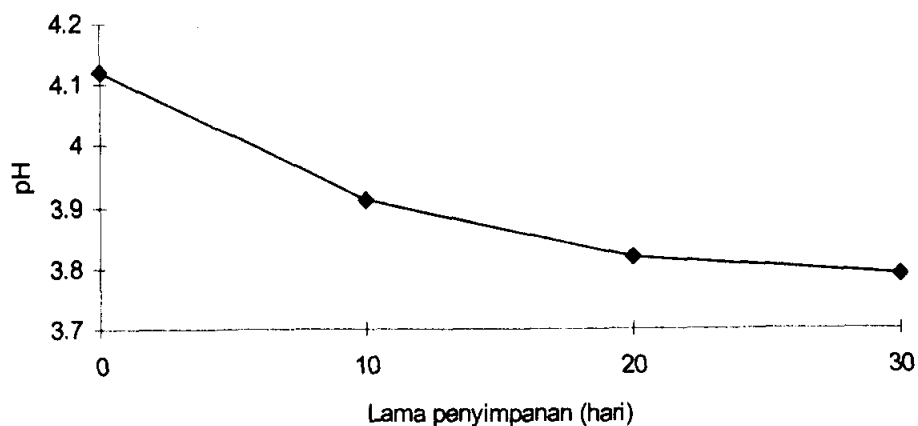


Gambar 1. Diagram Alir Pembuatan Minuman Probiotik dari Nira Siwalan

Tabel 2. Pengaruh Lama Penyimpanan (hari) Terhadap Nilai pH Minuman Probiotik

Lama Penyimpanan (hari)	Rata-rata Nilai pH	Notasi *)
0	4,12	b
10	3,91	a
20	3,82	a
30	3,79	a

*) Nilai rata-rata yang didampingi huruf yang sama tidak menunjukkan beda nyata ($\alpha = 0,05$)

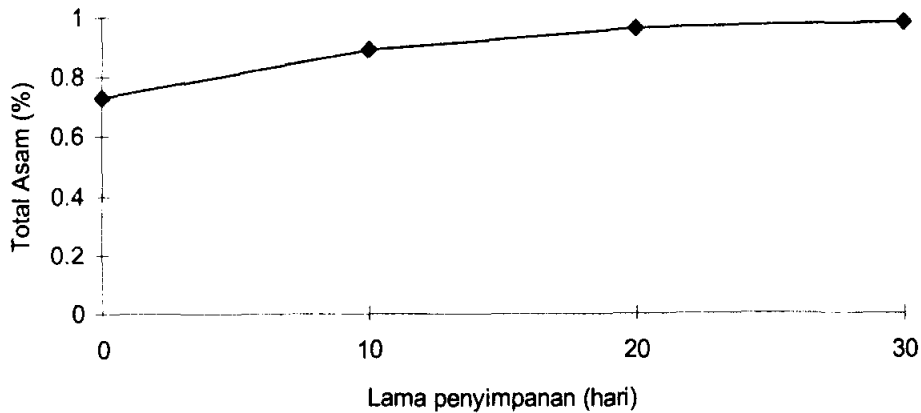


Gambar 2. Grafik Analisa pH Minuman Probiotik

Tabel 3. Pengaruh Lama Penyimpanan (hari) Terhadap Nilai Total Asam (%) Minuman Probiotik

Lama Penyimpanan (hari)	Rata-rata Nilai Total Asam	Notasi *)
0	0,73	a
10	0,89	b
20	0,96	b
30	0,98	b

*) Nilai rata-rata yang didampingi huruf yang sama tidak menunjukkan beda nyata ($\alpha = 0,05$)



Gambar 3. Grafik Analisa Total Asam (%) Minuman Probiotik

Total Bakteri Asam Laktat

Pada umumnya produk yakult dalam satu milimeter mengandung lebih dari 10^8 sel bakteri *L. casei* (Salminen, 1993). Jumlah rata-rata bakteri asam laktat yang terdapat pada minuman probiotik selama penyimpanan hari ke 0 sampai hari ke 30, adalah berkisar antara $1,96 \cdot 10^9$ - $6,77 \cdot 10^9$ mo/ml.

Dari hasil anava perlakuan waktu penyimpanan memberikan pengaruh nyata ($\alpha = 0,05$) terhadap jumlah bakteri asam laktat pada minuman probiotik. Selama penyimpanan sampai hari ke 20, jumlah *L. casei* terus mengalami peningkatan, tetapi pada penyimpanan hari ke 30 jumlah *L. casei* menurun (Tabel 4).

L. casei termasuk bakteri mesofil yang dapat hidup pada suhu $15-41^\circ\text{C}$, sedangkan kondisi optimum pertumbuhannya adalah pada suhu 37°C . Penyimpanan pada suhu rendah ($5-12^\circ\text{C}$) akan menurunkan atau menghambat aktivitas *L. casei*, sehingga pertumbuhan *L. casei* menjadi terhambat. Selain menghasilkan asam-asam organik sebagai komponen utama dalam proses metabolisme, *L. casei* juga menghasilkan metabolit lain seperti hidrogen peroksida dan senyawa antibiotik yang selain dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen, dalam akumulasi yang besar dimungkinkan juga dapat menghambat pertumbuhan *L. casei* juga. Sehingga pada pengamatan hari ke 30 jumlah *L. casei* mengalami

penurunan, tetapi jumlah ini masih memenuhi kriteria syarat minuman probiotik yaitu dalam satu mililiter mengandung lebih dari 10^8 sel bakteri *L. casei*. Hasil uji BJND 5 % tertera pada Tabel 4.

Daya Antimikroba *L. casei* terhadap Bakteri Patogen *Escherichia coli*

Hasil penelitian (Tabel 7.) dapat diketahui bahwa luas daerah penghambatan *L. casei* terhadap *E. coli* rata-rata berkisar antara $12,37-14,84 \text{ mm}^2$. Makin luas daerah penghambatan yang terbentuk menunjukkan makin besar kemampuan *L. casei* menghambat bakteri patogen.

Hasil anava diketahui bahwa perlakuan lama penyimpanan minuman probiotik (hari) memberikan pengaruh nyata ($\alpha = 0,05$) terhadap daya antimikroba *L. casei* terhadap *E. coli*. Hasil uji BJND 5% tertera pada tabel 5.

Menurut Fardiaz (1983) *E. coli* lebih tahan terhadap pH rendah, karena *E. coli* merupakan bakteri yang secara normal hidup dalam saluran pencernaan yang pH-nya relatif rendah. Penghambatan *E. coli* oleh *L. casei* tidak semata-mata disebabkan oleh rendahnya pH produk, tetapi oleh bakteri asam laktat yang hidup dan bertahan dengan baik pada tingkat keasaman rendah dan zat bacteriocin yang dihasilkan (Chandan, 1982).

Salmonella typhii

Menurut Salminen (1993), komponen penghambat yang dihasilkan oleh *Lactobacillus casei* mampu menghambat *E. coli*, *Pseudomonas sp*, *Salmonella sp*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clastridium* dan *Bifidobacterium*. Penghambatan terjadi pada pH 3-5.

Dibandingkan dengan *E. coli*, ternyata daerah penghambatan *Salmonella typhii* lebih luas. Hal ini berarti *Salmonella typhii* lebih rentan terhadap lingkungan pertumbuhannya yang ber-pH rendah, dan didukung oleh zat antagonistik lain yang diproduksi oleh *L. casei*, dibandingkan dengan *E. coli*. Hal ini karena *E. coli* memiliki kemampuan menfermentasi glukosa, sukrosa, dekstrosa, laktosa, maltosa, dan arabinosa. Berbeda dengan

Salmonella sp yang tidak dapat menfermentasi sukrosa dan laktosa (Burrows, 1974). Pada minuman probiotik terdapat karbohidrat berupa laktosa, sukrosa dan glukosa yang berasal dari nira siwala dan susu skim.

Hasil anava, perlakuan waktu penyimpanan memberikan pengaruh nyata ($\alpha = 0,05$) terhadap luas daerah hambatan (mm^2) *L. casei* terhadap *Salmonella typhii*. Dari hasil uji BJND 5% (Tabel 6), menunjukkan bahwa perlakuan lama penyimpanan (hari) minuman probiotik memberikan perbedaan daerah hambatan yang nyata antar masing-masing perlakuan. Hal ini karena *Salmonella typhii* lebih rentan terhadap pH lingkungan yang rendah dan metabolit yang dihasilkan *L. casei*.

Tabel 4. Pengaruh Lama Penyimpanan (hari) Terhadap Nilai Total Bakteri Asam Laktat (Koloni/ml) Minuman Probiotik

Lama Penyimpanan (hari)	Rata-rata Nilai Total BAL (Koloni/ml)	Notasi *)
0	1,96 . 10 ⁹	a
10	4,17 . 10 ⁹	a
20	6,77 . 10 ⁹	b
30	6,20 . 10 ⁹	ab

*) Nilai rata-rata yang didampingi huruf yang sama tidak menunjukkan beda nyata ($\alpha = 0,05$)

Tabel 5. Pengaruh Lama Penyimpanan (hari) Terhadap Anti Mikroba *L. casei* Terhadap *E. coli* pada Minuman Probiotik

Lama Penyimpanan (hari)	Rata-rata Luas Daerah Hambatan (mm ²)	Notasi *)
0	12,37	A
10	13,40	B
20	14,78	C
30	14,84	C

*) Nilai rata-rata yang didampingi huruf yang sama tidak menunjukkan beda nyata ($\alpha = 0,05$)

Selain asam-asam organik, dalam proses fermentasi juga dihasilkan hidrogen peroksida, diacetyl, bakteriocin; yang mana komponen-komponen ini berpotensi untuk menghambat pertumbuhan mikroba lain. (Doeschel, 1989 dalam Salminen, 1993). Secara umum mekanisme antimikroba suatu bahan pengawet dalam bentuk asam-asam lemah seperti asam laktat, disebabkan karena adanya molekul asam tidak berdisosiasi yang dapat menembus dinding sel dan mengganggu proses metabolisme dan mekanisme genetik sel bakteri patogen (Field, 1989).

Staphylococcus aureus

Dari hasil penelitian dapat diketahui bahwa daya hambat *L. casei* terhadap *Staphylococcus aureus* sangat kecil. Berdasarkan hasil Analisa Sidik Ragam, perlakuan lama penyimpanan memberikan pengaruh nyata ($\alpha = 0,05$) terhadap luas daerah hambatan (mm^2) *L. casei* terhadap *Staph. Aureus* (Tabel 7)

Tabel 6. Pengaruh Lama Penyimpanan (hari) Terhadap Anti Mikroba *L. casei* Terhadap *Salmonella typhii* pada Minuman Probiotik

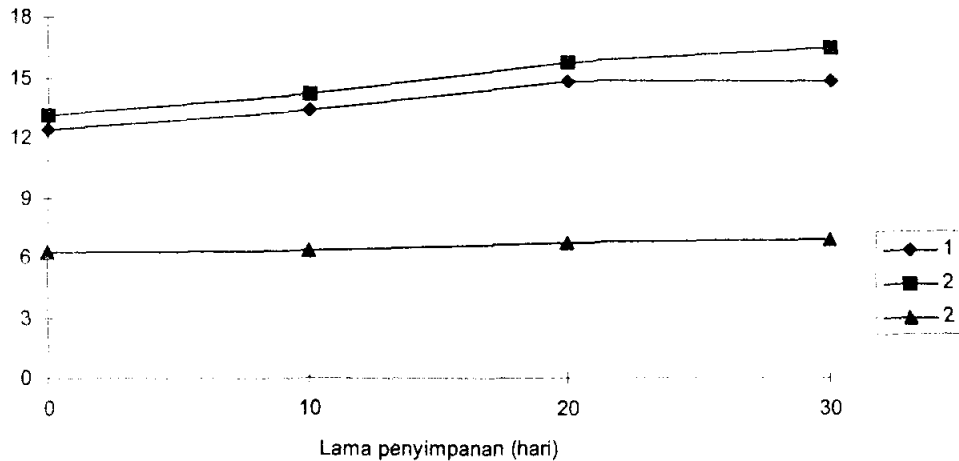
Lama Penyimpanan (hari)	Rata-rata Luas Daerah Hambatan (mm^2)	Notasi *)
0	13,15	A
10	14,16	B
20	15,74	C
30	16,49	D

*) Nilai rata-rata yang didampingi huruf yang sama tidak menunjukkan beda nyata ($\alpha = 0,05$)

Tabel 7. Pengaruh Lama Penyimpanan (hari) Terhadap Anti Mikroba *L. casei* Terhadap *Staphylococcus* pada Minuman Probiotik

Lama Penyimpanan (hari)	Rata-rata Luas Daerah Hambatan (mm^2)	Notasi *)
0	6,25	a
10	6,34	a
20	6,70	b
30	6,85	b

*) Nilai rata-rata yang didampingi huruf yang sama tidak menunjukkan beda nyata ($\alpha = 0,05$)



- Keterangan :
1. *E. Coli*
 2. *Salmonella typhii*
 3. *Staphylococcus aureus*

Gambar 4. Grafik Analisa Total Asam (%) Minuman Probiotik

Kecilnya kemampuan daya hambat dari *L. casei* terhadap *Staph. aureus* disebabkan karena *Staph. aureus* memiliki daya tahan terhadap asam dan bakteriosin yang dihasilkan oleh *L. casei* selama proses fermentasi. *Staph aureus* termasuk golongan bakteri Gram positif yang memiliki dinding sel yang kuat (terikat secara kovalen) sehingga bakteri ini lebih tahan terhadap asam dan zat antagonik lain yang dihasilkan *L. casei* dibandingkan dengan *Salmonella typhii* dan *E. coli* yang termasuk gram negatif.

Daya antimikroba *L. casei* terhadap bakteri patogen *E. coli* ; *Salmonella typhii* dan *Staphylococcus aureus* berbeda-beda seperti pada Gambar 4. Daya hambat terhadap *Staphylococcus aureus* paling kecil dibandingkan yang lain. Menurut Fardiaz (1989) produk yogurt dengan tingkat keasaman 1% (sebagai asam laktat) masih ditemukan beberapa spesies dari *Staphylococcus sp* yang dapat bertahan dalam yogurt, tetapi hingga kini belum ada laporan yang menyatakan bahwa terdapat orang-orang yang keracunan dalam mengkonsumsi yogurt.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Lama penyimpanan minuman probiotik dari nira siwalan berpengaruh terhadap pH dan total asam, total bakteri asam laktat dan terhadap daya hambat *L. casei* terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhii* dan *Escherichia coli*.
2. Kemampuan daya hambat *L. casei* terhadap *Salmonella typhii* lebih besar daripada *Escherichia coli*, dan kurang mampu menghambat *Staphylococcus aureus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anomimous, 1989. **Microbes in The Intestinal : Our Life Long Partners**. Tokyo, Japan : Yakult Honsha Co. Ltd
- , 1990. **Yakult Fermented Milk Drink to Promote Health**. Tokyo Japan : Yakult Honsha Co. Ltd
- , 1990. **Ensiklopedia Nasional Indonesia (Jilid 14)**. Jakarta : PT. Cipta Adi Pustaka

- , 1992. **Daftar Komposisi Bahan Makanan**. Jakarta : Direktorat Gizi Departemen Kesehatan
- Buckle, K.A., Edwards, R.A., Sleet, G.H., dan Wootton, M., 1987. **Ilmu Pangan**. Jakarta : Universitas Indonesia Press
- Champbell, J.R. dan Marshall, R.T., 1975. **The Science of Providing Milk for Man**. New York : Mc Graw Hill Book
- Coste, J.S., 1997. **Lactobacillus casei**. Internet: <http://www.danonenewsletter.fr/nw7.html>
- Fardiaz, S., 1983. **Keamanan Pangan**, Jilid I. Bogor : Fakultas Teknologi Pertanian, Jurusan Pangan dan Gizi, IPB
- Field, L.M., 1989. **Fundamental of Food Microbiology**. Connecticut : AVI Publishing Co. Inc, Westport
- Frazier, W.C., dan Westhoff, D.C., 1988. **Food Microbiology**. New York : Mc. Graw Hill Book
- Gosal, J.C., 1998. **Pengaruh Konsentrasi Susu Bubuk Skim Terhadap Sifat Fisika Kimia, Sensoris dan Mikrobiologis Minuman Probiotik dari Nira Siwalan (*Borassus Sundaicus*)**. Skripsi. Surabaya : Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Widya Mandala.
- Hariggan, W.F., 1976. **Laboratory Methode in Food and Dairy Microbiology**. London, New York : Academic Press
- Helferich dan Westhoff, 1980. **All about Yogurt**. New Jersey : Prestice Hall Inc Angle Wood Cliff
- Heyne, K., 1987. **Tumbuhan Berguna Indonesia (Jilid I)**. Jakarta : Yayasan Sorana Wanajaya
- Hidayat, N., dan Kumalaningsih, S., 1995. **Mikrobiologi Hasil Pertanian**. Malang : IKIP
- Jenie, B.S.L., dan Fardiaz, S., 1989. **Uji Sanitasi dalam Industri Pangan Petunjuk Laboratorium**. Bogor : PAU Pangan dan Gizi, IPB
- Kilara dan Shanani, 1978 Dalam Rose, A.H., 1982. **Fermented Foods**. London : Academic Press, Inc
- Lutony, 1993. **Budidaya Siwalan**. Jakarta : Swadaya
- Mitsuoka, T., 1990. **A Profile of Intestinal Bacteria**. Tokyo : Yakult Honsha Co Ltd
- Mutai, M., 1981. **The Properties of Lactobacillus Product "Yakult 80"** (Japanese). New Food Industries
- Oberman, H., 1985. **Fermented Milks**. London : Elsevier Applied Science Publisher Ltd
- Pederson, C.F., 1971. **Microbiology of Food Fermentation**. Connecticut : AVI Publishing, Westport
- Rahman, A., 1992. **Tehnologi Fermentasi Susu**. Bogor : Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor
- Ray, B., dan Daeschel, M., 1990. **Food Biopreservatives of Microbial Origin**. CRC Press
- Robinson, R.K., 1981. **Dairy Microbiology: The Microbiology of Milk Products**. Volume II. London : Applied Science Publishing
- Salminen, S., dan Wright, A.V., 1993. **Lactic Acid Bacteria**. New York : Marcell Dekker, Inc
- Shurtleff, W., dan Aoyogi, A., 1979. **Tofu and Soymilk Production**. The Book of Tofu. Volume II. California : Soyfoods Center, Lafayette
- Speck, M.L., 1978. **Development in Industrial Microbiology dalam Rose, A.H., 1982. Economic Microbiology Fermented Foods**. Volume VII. London : Academic Press
- Sudarmadji, S., 1984. **Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian**. Yogyakarta : Liberty
- Vedamuthu, 1982. **Fermented Foods**. London : Academic Press, Inc
- Waspodo, 1997. **Probiotik Bakteri Pencegah Kanker**. Intisari