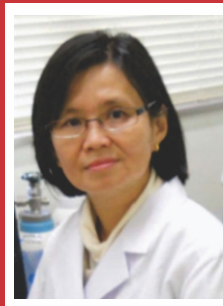


Ingrid S Surono, M.Sc., Ph.D.

# PROBIOTIK, MIKROBIOME DAN PANGAN FUNGSIONAL



Ir. Ingrid S. Surono, M.Sc., Ph.D., lahir di Tegal 7 Februari 1957. Menyelesaikan studi S1 di bidang Teknologi Hasil Pertanian IPB tahun 1980, M.Sc di bidang proses pengolahan Pangan di Asian Institute of Technology (AIT), Bangkok Thailand pada 1984, dan memperoleh PhD di bidang Dairy Microbiology and Functional Foods di United Graduate School Gifu University Jepang, tahun 1996. Tahun 2004-2006, mendapat kesempatan Post Doctoral di Functional Foods Forum, University of Turku, Finland. Di Bidang Riset, meraih penghargaan Science and Technology Award 2011, Toray Foundation, dan tahun 2012 Ten best RISTEK KALBE Science Award. Tahun 2010, mendapat penghargaan oral presenter ketiga terbaik, pada XXXII International Congress on Microbial Ecology in Health and Disease, di Athena, Yunani dan tahun 2011 penghargaan yang sama pada FASEB Summer Research Conference di Carefree, Arizona, USA. Penulis telah meneliti probiotik selama 24 tahun, dan telah mempublikasikan 6 buku mengenai Mengkudu, Probiotik, Nutrition in Food Industry, Riset dan Pengembangan Produk Baru, Bahaya dan Risiko pada produk Pangan, dan Pengantar Keamanan pangan untuk Industri Pangan, menulis 3 chapter di Encyclopedia of Dairy Science, 2011. Elsevier, dan menulis 2 chapter buku yang diterbitkan oleh CRC pada tahun 2015 dan Taylor Francis, 2016. Saat ini sebagai Ketua Departemen Teknologi Pangan di Fakultas Teknik, Universitas Bina Nusantara dan Ketua Indonesian Scientific Society for Probiotics and Prebiotics (ISSPP), sejak 2010 hingga saat ini.



Penerbit Deepublish (CV BUDI UTAMA)  
Jl. Rajawali, Gang Elang 6 No.3, Drono, Sardonoharjo, Ngaglik, Sleman  
Jl. Kaliurang Km 9,3 Yogyakarta 55581  
Telp/Fax : (0274) 453427  
Email : deepublish@gmail.com  
Anggota IKAPI (076/DIY/2012)  
Penerbit Deepublish www.deepublish.co.id @deepublish

Kategori : Biologi

ISBN 602401462-7



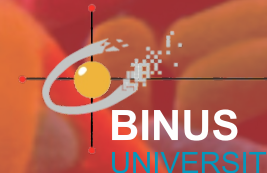
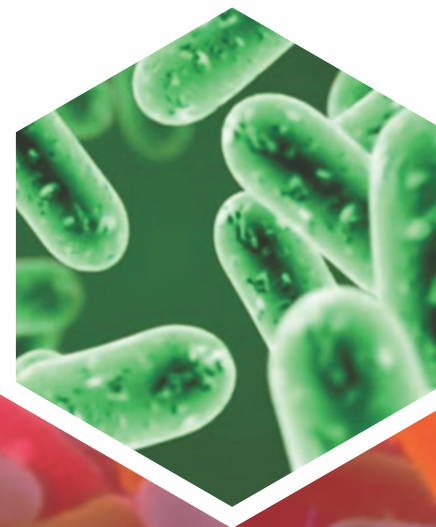
PROBIOTIK, MIKROBIOME DAN PANGAN FUNGSIONAL

Ingrid S Surono, M.Sc., Ph.D.



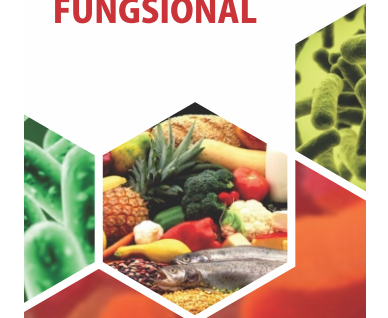
Ingrid S Surono, M.Sc., Ph.D.

# PROBIOTIK, MIKROBIOME DAN PANGAN FUNGSIONAL



Ingrid S Surono, M.Sc., Ph.D.

## PROBIOTIK, MIKROBIOME DAN PANGAN FUNGSIONAL



PROBIOTIK, MIKROBIOME  
DAN PANGAN FUNGSIONAL

## **UU No 19 Tahun 2002 Tentang Hak Cipta**

### Fungsi dan Sifat hak Cipta Pasal 2

1. Hak Cipta merupakan hak eksklusif bagi pencipta atau pemegang Hak Cipta untuk mengumumkan atau memperbanyak ciptaannya, yang timbul secara otomatis setelah suatu ciptaan dilahirkan tanpa mengurangi pembatasan menurut peraturan perundang-undangan yang berlaku.

### Hak Terkait Pasal 49

1. Pelaku memiliki hak eksklusif untuk memberikan izin atau melarang pihak lain yang tanpa persetujuannya membuat, memperbanyak, atau menyiarkan rekaman suara dan/atau gambar pertunjukannya.

### Sanksi Pelanggaran Pasal 72

1. Barangsiapa dengan sengaja dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam pasal 2 ayat (1) atau pasal 49 ayat (2) dipidana dengan pidana penjara masing-masing paling singkat 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp 1.000.000,00 (satu juta rupiah), atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp 5.000.000.000,00 (lima miliar rupiah).
2. Barangsiapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan, atau menjual kepada umum suatu ciptaan atau barang hasil pelanggaran Hak Cipta sebagaimana dimaksud dalam ayat (1), dipidana dengan pidana penjara paling lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp 500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah)

Ingrid S Surono, MSc., PhD.

# PROBIOTIK, MIKROBIOME DAN PANGAN FUNGSIONAL





deepublish | publisher

Jl.Rajawali, G. Elang 6, No 3, Drono, Sardonoharjo, Ngaglik, Sleman  
Jl.Kaliurang Km.9,3 – Yogyakarta 55581  
Telp/Faks: (0274) 4533427  
Website: www.deepublish.co.id  
www.penerbitdeepublish.com  
E-mail: deepublish@ymail.com

---

### Katalog Dalam Terbitan (KDT)

---

#### **SURONO, Ingrid S**

Probiotik, Mikrobiome dan Pangan Fungsional/oleh Ingrid S  
Suro. --Ed.1, Cet. 1--Yogyakarta: Deepublish, September 2016.

viii, 243 hlm.; Uk:17.5x25 cm

ISBN 978-602-401-482-7

1. Biologi

I. Judul  
570

Hak Cipta 2016, Pada Penulis

---

Desain cover : Herlambang Rahmadhani  
Penata letak : Ika Fatria Iriyanti

**PENERBIT DEEPUBLISH**  
**(Grup Penerbitan CV BUDI UTAMA)**

Anggota IKAPI (076/DIY/2012)

Copyright © 2016 by Deepublish Publisher  
All Right Reserved

---

Isi diluar tanggung jawab percetakan

---

Hak cipta dilindungi undang-undang  
Dilarang keras menerjemahkan, memfotokopi, atau  
memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini  
tanpa izin tertulis dari Penerbit.

## KATA PENGANTAR

Buku ini merupakan rangkuman pengalaman penulis baik dalam bentuk riset maupun studi literatur selama 24 tahun. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terimakasih yang tulus kepada Prof. Dr. Akiyoshi Hosono, dari Shinshu University-Jepang, yang telah mengantarkan dan membuat penulis jatuh hati pada bakteri asam laktat serta memotivasi penulis dalam meneliti sifat probiotik bakteri asam laktat.

Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada DIKTI, melalui program The Young Academic URGE Project (1998-1999), UNESCO melalui program pertukaran ilmuwan di bidang Mikrobiologi tahun 1999, dan Domestic Collaborative Research Grant (2000-2001), serta Kementerian Riset dan Teknologi melalui program RUTI selama 3 tahun (2002-2004), yang membiayai penulis dalam meneliti bakteri asam laktat dan sifat-sifat probiotiknya, mulai dari *in vitro* sampai uji klinis, serta hibah Kompetensi 2011-2013 bekerjasama dengan Prof Clara Kusharto dan Dr Sri Anna Mariana.

Kepada Prof. Dr. Subijanto Marto Sudarmo, SpA(K), penulis menyampaikan terimakasih atas kepercayaan yang diberikan dalam bersama-sama membimbing mahasiswa S3 di Progam Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Pada kesempatan ini juga ingin disampaikan terimakasih kepada Prof. Dr. Lee Yuan Kun dari Fakultas Kedokteran National University of Singapore dan Dr. Yoshimi Benno dari Japan Collections of Microorganisms – RIKEN, Jepang atas kolaborasi riset dan persahabatan yang tulus, serta kepada Prof. Dr. Seppo Salminen dari Functional Foods Forum, Turku University Finlandia yang memfasilitasi riset dengan dana Academy of Finland 2004-2006 melalui post Doctoral program.

Kepada PT Yakult Indonesia Persada yang beberapa kali mensponsori penulis dalam mengikuti berbagai kegiatan seminar internasional, penulis menyampaikan terimakasih.

Buku ini dipersembahkan untuk Reni, Yudit dan Baby, Samsi, serta

kedua cucu tercinta Amadis dan Avedis, semoga bisa memberi inspirasi dan semangat dalam belajar dan berkarya. Terimakasih kepada Tuhan Yang Maha Esa atas karunia ibunda Lely Sulastris yang tegar dan senantiasa menyebut namaku di dalam doa-doanya. Terimakasih kepada suami tercinta, Priyo Waspodo, yang senantiasa mendukung penulis dalam setiap kegiatan riset dan penulisan jurnal serta buku. Diatas segalanya, terimakasih kepada Tuhan Yang Maha Pengasih dan Penyayang, atas perkenannya buku ini dapat diterbitkan. Semoga bermanfaat bagi yang memerlukannya.

Bogor, 1 Juni 2016

Ingrid S. Surono

## DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	vii
<b>I. Pendahuluan .....</b>	<b>1</b>
<b>II. Karakteristik Bakteri Asam Laktat .....</b>	<b>4</b>
A. Habitat Bakteri Asam Laktat .....	10
B. Homo dan Hetero fermentatif .....	11
<b>III. Metabolisme Bakteri Asam Laktat .....</b>	<b>18</b>
A. Jalur EMP .....	18
B. Senyawa metabolit .....	22
<b>IV. Berbagai Teknik Identifikasi Bakteri Asam Laktat .....</b>	<b>46</b>
<b>V. Susu Fermentasi .....</b>	<b>52</b>
A. Pola konsumsi susu fermentasi .....	54
B. Jenis susu fermentasi .....	55
C. Fermentasi laktat pada susu .....	57
D. Fermentasi laktat dan khamir pada susu .....	62
E. Fermentasi laktat dan kapang pada susu .....	67
F. Standar Identitas .....	67
G. Kultur starter .....	68
H. Jenis kultur starter .....	70
I. Produk susu fermentasi di Asia .....	77
J. Susu Fermentasi di Negara-negara Skandinavia .....	86
K. Susu Fermentasi di Eropa Timur .....	87
<b>VI. Susu Fermentasi dan Pangan Fungsional .....</b>	<b>89</b>
A. Pangan Fungsional .....	89
<b>VII. Kondisi saluran pencernaan .....</b>	<b>135</b>
A. Sekresi berbagai cairan pencernaan .....	136
B. Bakteri dalam saluran pencernaan .....	140
C. Berbagai hambatan dalam saluran pencernaan .....	147
<b>VIII. Efek Probiotik, Prebiotik dan Synbiotik .....</b>	<b>148</b>
A. Bakteri probiotik .....	152
B. Prebiotik .....	173
C. Efek Synbiotik .....	175



<b>IX.</b>	<b>Infeksi <i>H. pylori</i>: Tukak Lambung Hingga Kanker</b>	
	<b>Lambung.....</b>	<b>178</b>
	A. Bersembunyi dalam lambung.....	178
	B. Infeksi <i>H. pylori</i> .....	179
	C. Menimbulkan tukak dan pemicu kanker lambung.....	179
<b>X.</b>	<b>Probiotik Asal Dadih .....</b>	<b>183</b>
<b>XI.</b>	<b>Potensi Probiotik dalam Industri Pangan Fungsional.....</b>	<b>200</b>
<b>XII.</b>	<b>Faktor Pendorong Pangsa Pasar Pangan Probiotik .....</b>	<b>203</b>
<b>XIII.</b>	<b>Prospek Riset Probiotik.....</b>	<b>207</b>
<b>XIV.</b>	<b>Inovasi Pangan Probiotik Dalam Industri .....</b>	<b>209</b>
	GLOSARIUM .....	240
	INDEKS .....	241
	TENTANG PENULIS .....	243

# I. Pendahuluan

---

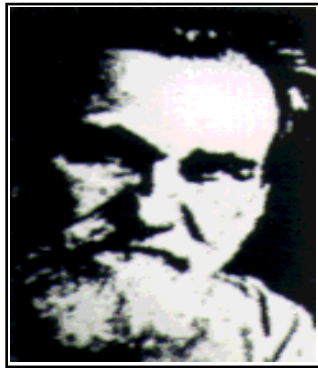
Bakteri asam laktat banyak terlibat dalam fermentasi makanan sebagai salah satu cara pengawetan makanan, karena bakteri asam laktat menghasilkan asam laktat dan berbagai senyawa metabolit bersifat antimikroba yang bisa dikategorikan menjadi dua kelompok senyawaan, yaitu berberat molekul rendah seperti hidrogen peroksida, karbon dioksida, diasetil, dan berberat molekul tinggi seperti bakteriosin.

Bakteri asam laktat menjadi penting dalam pengolahan makanan karena kemampuannya dalam memproduksi berbagai macam senyawa yang berperan terhadap flavour, warna, tekstur dan konsistensi dari makanan fermentasi.

Susu fermentasi sudah dikenal sejak awal dari peradaban; disebutkan dalam kitab kitab suci agama, dan manfaatnya dirasakan sebelum diketahui dan diteliti secara ilmiah. Satu abad yang lalu, awal abad ke-20 fungsi utama dari mikrobiota usus benar-benar tidak diketahui. Metchnikoff, pemenang hadiah Nobel Kedokteran pada tahun 1908, mengkaitkan kesehatan dan umur panjang dengan konsumsi bakteri yang ada dalam yoghurt. Pada tahun 1907, beliau menduga bahwa bakteri yang terlibat dalam fermentasi yoghurt, *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*, menekan proses pembusukan yang berlebihan dalam saluran cerna dan bahwa yoghurt berperan penting dalam menjaga kesehatan manusia. Penemuan Tissier untuk bifidobacteria pada bayi yang diberi ASI juga memainkan peran kunci dalam memantapkan konsep bahwa bakteri baik berperan aktif dalam menjaga kesehatan, sebagaimana dilaporkan manfaat klinis dari modulasi flora pada bayi yang menderita infeksi saluran cerna.

Perhatian terhadap peranan bakteri asam laktat bagi kesehatan manusia dimulai sejak tahun 1908, ketika itu Eli Metchnikoff (Gambar 1), seorang ahli mikrobiologi dari Institut Pasteur di Perancis menyarankan untuk mengkonsumsi susu fermentasi agar panjang umur. Namun, keterkaitan antara mikroflora usus dengan kesehatan, baru di pahami hampir satu abad kemudian. Bahwa bayi yang minum ASI tubuhnya lebih tahan terhadap penyakit dibanding bayi yang minum susu formula, orang percaya karena dalam ASI terkandung kolostrum. Ternyata, kolostrum ini juga

bertanggung jawab terhadap populasi mikroflora dalam usus bayi. Jika semula bakteri asam laktat hanya dikenal sebagai bakteri yang bermanfaat bagi industri makanan dan minuman, maka riset mengenai bakteri asam laktat dewasa ini mulai menggali lebih dalam manfaat bakteri asam laktat bagi kesehatan manusia, sehingga merupakan prospek yang baik dalam pengembangan berbagai jenis pangan fungsional (*functional food*) dengan melibatkan bakteri asam laktat yang bersifat probiotik.



Gambar 1. E. Metchnikoff (1845-1919)

Keseimbangan mikroflora dalam saluran pencernaan yang optimum tergantung pada konsumsi nutrisi berimbang dan kondisi kesehatan seseorang. Bakteri yang berperan dalam menjaga harmonisasi ekosistem dalam usus disebut bakteri probiotik, umumnya termasuk dalam kelompok bakteri asam laktat dan bifidobakteria.

Probiotik didefinisikan sebagai "mikroba hidup yang bila diberikan dalam jumlah yang memadai memberikan manfaat kesehatan pada inangnya", dan bersifat spesifik terhadap strain. Kata-kata dalam definisi ini dipilih secara hati-hati untuk mewakili cara pemberian probiotik. Penggunaan kata konsumsi dan menelan menjadi terlalu ketat sehingga digunakan kata *administered*, yang artinya diberikan.

Banyak faktor yang mempengaruhi kolonisasi bakteri di usus besar manusia, di antaranya usia, terapi obat, diet, kondisi fisiologis, gerak peristaltik usus, imunitas lokal dan interaksi antar mikroba dalam usus. Kondisi stress, dan diet makanan yang tinggi lemak, protein dan rendah serat, berpengaruh negatif terhadap mikroflora usus. Tidak heran bila dalam kondisi stress terjadi sembelit, penurunan kekebalan tubuh dan

berdatanganlah berbagai penyakit.

Saluran pencernaan dimulai dari mulut, tenggorokan, kemudian lambung, usus halus dan usus besar dilalui oleh makanan yang dikonsumsi, termasuk bakteri, baik yang bermanfaat, untuk mudahnya disebut bakteri “baik”, maupun yang berpotensi mengganggu kesehatan manusia atau disebut bakteri “jahat”. Usus ibarat sebuah tabung reaksi yang berisi beragam bakteri dan berbagai nutrisi yang disuplai melalui makanan yang kita konsumsi. Dengan demikian, populasi bakteri “baik” bisa ditingkatkan, dan bakteri “jahat” bisa ditekan melalui konsumsi makanan yang baik dan benar.

## II. Karakteristik Bakteri Asam Laktat

---

Bakteri asam laktat ditemukan pertama kali oleh Pasteur, seorang professor Kimia di University of Lille, di tahun 1878. Lister melaporkan isolasi bakteri asam laktat asal susu yang tengik. Beberapa bakteri laktat dapat ditemukan juga pada saluran pencernaan manusia maupun hewan.

Pada tahun 1889, Tissier, peneliti Perancis pada laboratorium Prof. Pasteur, menemukan bakteri yang mendominasi saluran usus bayi yang minum ASI, yaitu *Bifidobacterium*. Semula bakteri ini diberi nama *Bacillus bifidus*, bentuknya seperti huruf Y, dalam bahasa Latin disebut *bifurcated*, sehingga selanjutnya disebut sebagai Bifidobacterium. Satu tahun kemudian, Moro, peneliti pada Universitas Graz di Austria, di tahun 1900 menemukan berbagai jenis bakteri pada bayi yang diberi minum susu botol, dan diberi nama *Bacillus acidophilus* (acido : asam; philus suka), selanjutnya dikenal sebagai bakteri *Lactobacillus acidophilus*.

Bakteri asam laktat dan Bifidobakteria termasuk dalam kelompok bakteri “baik” bagi manusia, dan umumnya memenuhi status GRAS (Generally Recognized As Safe), yaitu aman bagi manusia. Kelompok bakteri ini tidak membusukkan protein, dan dapat memetabolisme berbagai jenis karbohidrat secara fermentatif menjadi asam laktat sehingga disebut bakteri asam laktat. Jadi, makanan yang tercemar oleh bakteri asam laktat menjadi rusak karena asam, dan akan menjadi busuk kalau kemudian juga dicemari oleh bakteri pembusuk.

Bakteri asam laktat merupakan bakteri gram positif, katalase negatif, tidak membentuk spora, tidak mempunyai *cytochrome*, aerotoleran, anaerobik hingga mikroaerofilik, membutuhkan nutrisi yang kompleks seperti asam-asam amino, vitamin (B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> dan biotin), purine, pyrimidin. Secara umum niasin dan asam pantothenat esensial bagi pertumbuhan bakteri asam laktat. *Lactococcus cremoris* membutuhkan riboflavin dan biotin untuk pengikatan CO<sub>2</sub> dalam mensintesis asam aspartat dan asam lemak. Kemampuan biosintesisnya sangat terbatas, sehingga non motil, dan perolehan energinya semata-mata hanya bergantung pada metabolisme secara fermentatif.

Bakteri *Lactococcus* mesofil dan *Lactobacilli* membutuhkan Fe, Mg, Mo, Se dan Mn. Secara umum, bakteri asam laktat memerlukan niasin dan asam panthotenat. *Lactococcus cremoris* membutuhkan riboflavin dan biotin yang berperan dalam reaksi pengikatan CO<sub>2</sub> dalam mensintesis asam aspartat dan asam lemak. *Streptococcus thermophilus* memerlukan asam panthotenat, thiamin, niasin, biotin dan vitamin B<sub>6</sub>, sedangkan *Lactobacillus* memerlukan asam pantothenat, niasin dan vitamin lainnya (Tabel 1). Bisa jadi jumlah vitamin dalam susu sebagai media pertumbuhan tidak memadai, dan perlu penambahan dengan ekstrak khamir (*yeast extract*) dan lain-lain.

Bakteri asam laktat memerlukan nutrisi yang sangat kompleks, oleh karena itu umumnya habitatnya kaya akan nutrisi seperti berbagai jenis makanan (susu, daging, minuman dan sayuran), namun beberapa juga merupakan warga dari bakteri dalam mulut, saluran usus, vagina dari mamalia. Variasi karakteristik bakteri asam laktat normal terjadi, namun yang mutlak tidak bisa ditawar adalah sifatnya sebagai bakteri gram positif.

Tabel 1. Kebutuhan berbagai jenis vitamin pada genus *Lactobacillus sp.*

Jenis vitamin	<i>L. lactis</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. brevis</i>
kalsium pantothenat	++	++	++	++	++	++	++
Niasin	++	++	++	++	++	++	++
Riboflavin	++	++	++	++	++	+/-	-
Vitamin B <sub>12</sub> (Cyanocobaltamin)	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-
Thiamin	-	-	-	-	-	-	++
Pyridoxal (pyridoxamin)	-	-	++	-	+	-	-
Asam folat	-	-	-	++	++	-	++
Thymidin	-	-	-	-	-	-	t.d

Keterangan

++ : dibutuhkan

+ : meningkatkan pertumbuhan

+/- : hanya dibutuhkan strain tertentu

- : tidak dibutuhkan

t.d : tidak diketahui

Sumber : Ono dkk., 1992.

Kebutuhan asam amino sangat beragam, dan Tabel 2 memberikan informasi kebutuhan asam amino Genus *Streptooccus sp.* dan *Lactococcus sp.*, serta kandungan asam amino bebas dalam susu (□g/ml). Pada Tabel 2

juga terlihat bahwa kebutuhan asam amino untuk pertumbuhan maksimum bakteri *Streptococcus thermophilus* khususnya glutamine, cystine dan histidine, melebihi asam amino bebas yang terkandung dalam susu, sehingga perlu ditambahkan pada medium susu. Bagi *Streptococcus thermophilus*, ketersediaan ion  $\text{Ca}^{2+}$  diperlukan untuk pemanfaatan asam amino.

Tabel 2. Kebutuhan asam amino *Streptococcus sp.* dan *Lactococcus sp.*

Asam amino	Konsentrasi yang dibutuhkan tersedia dalam medium untuk maksimum pertumbuhan ( $\mu\text{g/ml}$ )				Konsentrasi asam amino bebas dalam susu ( $\mu\text{g/ml}$ )
	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis subsp. diacetylactis</i>	<i>Lc. cremoris</i>	<i>St. thermophilus</i>	
Glu	77	87	70	150	35.9
Leu	41	37	32	tidak diketahui	1.2
Ile	33	30	32	tidak diketahui	0.8
Val	27	30	41	tidak diketahui	2.6
Arg	37	36	39	tidak diketahui	1.6
Cys	stimulan	stimulan	27	80	tidak terdeteksi
Pro	tidak diketahui	tidak diketahui	38	tidak diketahui	8.8
His	23	24	14	60	2.8
Phe	31	tidak diketahui	6	tidak diketahui	tidak diketahui
Met	22	21	11	tidak diketahui	tidak terdeteksi

Sumber : Ono dkk., 1992

Pada mulanya, bakteri asam laktat terdiri dari 4 genus yaitu *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, dan *Streptococcus*. Namun demikian, beberapa genus baru, masuk ke dalam kelompok bakteri asam laktat menurut revisi taksonomik terakhir. Genus *Streptococcus* mencakup *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, dan *Vagococcus*. Ada yang berbentuk batang (*rod*), yaitu *Lactobacillus*, dan ada yang berbentuk kokus (*cocci*), yaitu *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* dan *Pediococcus*. Bakteri asam laktat dikelompokkan lebih lanjut menjadi homofermentatif bila produk akhirnya terutama adalah asam laktat, dan heterofermentatif, bila asam laktat dihasilkan bersama-sama dengan asam asetat, karbon dioksida, dan senyawa diasetil.

Beberapa peneliti menganggap *Bifidobacterium* masuk dalam kelompok bakteri asam laktat, meskipun secara filogenetik berbeda. Beberapa kesamaan diantara mereka adalah produksi asam laktat, ekologi tempat hidup dan fungsinya, serta pemanfaatannya sebagai kultur susu fermentasi.

Seiring dengan kemajuan biologi molekuler, tahun 1980-an genus

bakteri asam laktat berkembang menjadi 15 genus, namun hanya 5 genus, yaitu *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Pediococcus sp.* dan *Streptococcus sp.* yang berperan dalam proses fermentasi susu.

Di alam, bakteri laktat menempati dua sistem ekologi, yaitu saluran pencernaan manusia/hewan, dan produk makanan nabati maupun hewani, baik berupa kontaminan alami maupun ditambahkan untuk tujuan fermentasi. Bakteri asam laktat merupakan kontaminan alami pada susu karena ketersediaan substrat utamanya, yaitu laktosa, sehingga dikenal juga sebagai bakteri susu.

Produk-produk susu fermentasi, seperti yogurt, yakult, susu asam, calpis, keju, mentega, merupakan hasil kerja bakteri asam laktat. Perbedaan antara susu yang menjadi asam karena rusak dengan susu fermentasi ada pada pengaturan kondisi pada proses fermentasi susu, yang menyediakan kondisi optimum bagi bakteri asam laktat untuk tumbuh pada media susu, dan menghasilkan produk susu fermentasi yang tidak hanya enak dan bergizi, tetapi juga bebas dari bakteri kontaminan.

Sebaliknya susu rusak menjadi asam, sebagai aktivitas bakteri asam laktat yang mengasamkan susu, dan tumbuh juga berbagai jenis bakteri lain, dan bila jumlah awalnya cukup banyak mungkin berbahaya bagi kesehatan kita dan merusak susu.

Selain produk susu, bakteri laktat juga terlibat dalam fermentasi pickel buah dan sayuran, sereal serta berbagai produk salami daging dan ikan.

Beberapa jenis bakteri asam laktat ada yang menjadi “penduduk asli” saluran pencernaan, ***enteric lactic acid bacteria***, di antaranya *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* (pada bayi), *Bifidobacterium adolescentis* yang menempati usus besar manusia, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus vitulinus*, dan *Lactobacillus reuteri* yang hidup dalam usus halus. Kadang-kadang *Lactobacillus casei* dan *Lactobacillus brevis* juga dijumpai dalam usus manusia. Sedangkan *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus cremoris* digunakan sebagai kultur starter untuk produk fermentasi susu atau ***dairy lactic acid bacteria***.

Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan kelangsungan hidup bakteri asam laktat sangat beragam, namun komposisi kimia dan kandungan nutrisi pada media sangat berpengaruh.

Bakteri asam laktat memerlukan beberapa asam amino dan vitamin.



Karena susu mengandung sangat sedikit asam amino bebas, maka hanya bakteri asam laktat yang mampu memecah protein dan peptida yang dapat tumbuh. Demikian pula hanya dengan karbohidrat yang dapat difermentasi. Jenis karbohidrat yang tersedia biasanya sangat menentukan jenis bakteri asam laktat agar mampu tumbuh. Pada susu, bakteri yang tumbuh adalah yang mampu memfermentasi laktosa, sedangkan pada bahan sereal yang mampu tumbuh, harus mampu memfermentasi maltosa. Hal inilah yang membedakan dua kelompok besar bakteri asam laktat berdasarkan habitatnya, yaitu *dairy origin* dan *plant origin*.

Faktor pertumbuhan yang spesifik seperti ekstrak khamir dibutuhkan oleh spesies *Lactobacillus kefiranofaciens*.

Kondisi keasaman optimum adalah pH sekitar 4,0 – 5,0 sehingga bakteri asam laktat sangat kompetitif dibanding mikroba lain yang ada pada susu. Toleransi terhadap keasaman beragam pada tiap strain. *Lactobacillus sp.* dan *Pediococcus sp.* sangat toleran terhadap pH dibawah 4,6. Bakteri asam laktat juga mempunyai toleransi berbeda terhadap asam tidak terdisosiasi seperti asam asetat, dan *Lactobacillus sp.* lebih tahan terhadap asam dibandingkan dengan *Leuconostoc sp.*, *Streptococcus sp.* dan *Lactococcus sp.*

Bakteri asam laktat secara umum bersifat anaerobik, namun berbagai jenis strain reaksinya berbeda terhadap molekul oksigen. Beberapa strain obligat homofermentatif seperti *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* pertumbuhannya terhambat oleh oksigen yang terdifusi, tetapi beberapa strain bahkan menggunakan molekul oksigen untuk menghasilkan NAD<sup>+</sup> dan mendapatkan ATP dari konversi asetil fosfat ke asetat. Secara umum, keberadaan oksigen sangat menekan perkembangan bakteri asam laktat selaku bakteri anaerobik yang aerotoleran.

Senyawa penghambat alami maupun buatan bisa menghambat pertumbuhan bakteri asam laktat. Senyawa polifenol menghambat pertumbuhan *Lactobacillus plantarum*. Bakteri asam laktat relatif lebih tahan dibanding bakteri lain terhadap asam sorbat dan nitrit.

Suhu optimum bagi pertumbuhan bakteri asam laktat juga beragam pada setiap strain. Ada yang bersifat psikotropik (mampu tumbuh pada suhu 5°C atau di bawahnya) seperti genus *Leuconostoc* dan beberapa spesies *Lactobacillus* fakultatif heterofermentatif, khususnya *Lactobacillus sake*. Pada umumnya, kultur starter yogurt *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* dan juga kebanyakan spesies *Lactobacillus* obligat homofermentatif tumbuh pada suhu 45 °C tetapi tidak tumbuh

pada suhu 15 °C.

Kandungan air bebas,  $a_w$  (water activity) optimum bagi pertumbuhan bakteri asam laktat adalah lebih dari 0,91. Kandungan garam dalam media akan menurunkan nilai  $a_w$ . Water activity ( $a_w$ ) minimum untuk berbagai genus bakteri asam laktat bervariasi, dan *Lactobacillus*, *Pediococcus*, dan *Enterococcus* bisa tumbuh pada kadar  $a_w$  yang lebih rendah, yaitu pada kadar garam sekitar 6,5 % dan 18 %, sedangkan spesies *Lactococcus*, *Leuconostoc* dan *Streptococcus* membutuhkan  $a_w$  yang lebih tinggi.

Interaksi diantara strain bakteri asam laktat sendiri sangat mungkin terjadi. Suatu strain mungkin saja menghambat strain yang lain karena pembentukan senyawa metabolit seperti asam organik atau senyawa antimikroba dan terjadinya kompetisi dalam memfermentasi karbohidrat atau nutrisi lainnya.

Beberapa strain bakteri asam laktat yang sifatnya *thermoduric* (tahan pada suhu tinggi) seperti *Enterococcus sp.* dan *Streptococcus thermophilus* dapat tumbuh pada suhu hingga 50°C. *Enterococcus faecalis* digunakan sebagai indikator kesempurnaan proses pasteurisasi. Waktu reduksi desimal dari strain ini sudah diketahui sekitar 3 menit pada suhu 70°C.

Informasi di atas menegaskan bahwa bakteri asam laktat mempunyai kemampuan untuk tumbuh pada kondisi bahan pangan dengan pH yang rendah dan konsentrasi tinggi dari asam yang tidak terdisosiasi seperti asam asetat, propionat, sorbat dan asam benzoat.

Disamping peran utama bakteri asam laktat dalam fermentasi makanan, ada fungsi lain yang tidak kalah penting bagi kesehatan manusia. Bukti-bukti riset para peneliti dunia menunjukkan bahwa bakteri laktat yang dikonsumsi hidup dan tetap hidup di saluran pencernaan memberikan kontribusi positif bagi kesehatan, melalui aktivitas metabolismenya dan dikenal sebagai memberikan efek probiotik.

Ini membuktikan pernyataan Metchnikoff di tahun 1908 yang menyarankan konsumsi susu fermentasi agar panjang umur dan sesuai dengan saran Hippocrates ilmuwan Yunani ahli kedokteran di zamannya yang memperhitungkan susu fermentasi tidak hanya sebagai produk makanan tetapi juga sebagai obat : "let food be your medicine and medicine be your food".

Sebelum kita menelaah lebih lanjut peranan bakteri asam laktat bagi manusia, ada baiknya mengetahui dua kelompok besar bakteri asam laktat, yaitu yang berasal dari tanaman (*plant origin*) dan berasal dari produk susu (*dairy origin*), dan perbedaan metabolisme homofermentatif dan

heterofermentatif.

### A. Habitat Bakteri Asam Laktat

Apabila kita kembali menengok ke era abad ke 15, penduduk di Asia Timur dan Asia Tenggara lebih banyak mengkonsumsi makanan dan minuman hasil fermentasi nabati, sedangkan di negara Barat, banyak mengkonsumsi makanan hasil fermentasi susu (*dairy product*). Dengan demikian, bakteri asam laktat yang terlibat dalam fermentasi juga terdiri dari dua kelompok besar yang berbeda yaitu bakteri asam laktat yang habitatnya pada tanaman, dan bakteri asam laktat dengan habitat susu.

Produk fermentasi nabati yang melibatkan bakteri asam laktat diantaranya adalah pickel buah dan sayuran, sauerkraut, kimchi, minuman beralkohol, produk fermentasi kedelai seperti tauco, miso, tempe, roti seperti idly sejenis roti di India. Sedangkan produk fermentasi susu yang sudah dikenal diantaranya yogurt, keju, yakult, kefir, dadih, dahi, kourmis dan lain-lain.

Media pertumbuhan kedua kelompok bakteri asam laktat tersebut berbeda. Secara umum bakteri asam laktat yang berasal dari kelompok produk susu menggunakan MRS, susu skim maupun whey sebagai media pertumbuhannya, sedangkan bakteri asam laktat dari kelompok nabati membutuhkan GYP (Glucose Yeast Phosphate) sebagai media pertumbuhannya.

Bakteri asam laktat asal susu tidak dapat digunakan untuk memfermentasi sari buah, yang cocok adalah bakteri asam laktat asal tanaman.

Tabel 3. Karakteristik bakteri asam laktat asal tanaman dan susu

	<b>BAL asal tanaman</b>	<b>BAL asal susu</b>
Habitat	tanaman	susu
sumber gula	Glucose, Fructose, Sucrose maltose, cellobiose	laktosa
Konsentrasi gula	tinggi atau rendah	stabil
Asam amino/vitamin	sedikit	banyak, seimbang
Senyawa penghambat	asam tanat, alkaloid, tiosianat	tidak ada
Ko-eksistensi	khamir, bakteri anaerobik	tidak ada

Sumber : Sanae Okada, 2003

Karakteristik berbagai jenis bakteri asam laktat yang diisolasi dari buah dan sayuran, dan dari susu seperti *L. casei*, *St. thermophilus*, *L.*

*delbrueckii ssp. bulgaricus*, dan *Lc. lactis* dalam memfermentasi karbohidrat dapat dilihat pada Tabel 4. berikut ini.

Tabel 4. Karakteristik kemampuan berbagai jenis bakteri asam laktat asal tanaman dan susu dalam memfermentasi berbagai jenis karbohidrat

Jenis BAL	Karbohidrat	BAL asal tanaman	BAL asal susu
<i>S. thermophilus</i>	fruktosa	80%	-
	celobiosa	80%	-
	maltosa	80%	-
	trehalosa	80%	-
	mannosa	80%	-
<i>L.delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	maltosa	+	-
	laktosa	-	+
<i>Lc. lactis</i>	D-xylosa	-	-
	sukrosa	75%	-

Sumber : Sanae Okada, 2003

Tabel 4. memperlihatkan bahwa *Lactobacillus. delbrueckii ssp bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* yang berasal dari susu tidak dapat memfermentasi maltosa. Sedangkan *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*. asal tanaman tidak dapat memfermentasi laktosa.

Pada Table 4. juga terlihat bahwa *Lactobacillus delbrueckii. ssp bulgaricus* asal susu tidak dapat ditumbuhkan dalam sari buah, karena tidak dapat memanfaatkan maltosa, demikian juga halnya dengan *Lactobacillus delbrueckii ssp.bulgaricus* asal sari buah tidak dapat ditumbuhkan dalam susu karena tidak dapat memfermentasi laktosa, kecuali diperkaya dengan karbohidrat yang dapat menunjang pertumbuhannya.

## B. Homo dan Hetero fermentatif

Secara fisiologis dan berdasarkan aktivitas metabolismenya, bakteri asam laktat dikelompokkan ke dalam dua sub grup, yaitu Homofermentatif dan Heterofermentatif.

Bakteri asam laktat homofermentative melibatkan jalur Embden Meyerhof), yaitu glikolisis, menghasilkan asam laktat, 2 mol ATP dari 1 molekul glukosa/heksosa dalam kondisi normal, tidak menghasilkan CO<sub>2</sub>

dan menghasilkan biomassa sel dua kali lebih banyak daripada bakteri asam laktat heterofermentatif.

Secara umum, bakteri asam laktat homofermentatif digunakan dalam fermentasi susu menjadi yogurt, dan juga untuk menghasilkan asam laktat sebagai asidulan dalam industri makanan dan industri polilaktat suatu industri polimer atau plastik ramah lingkungan.

Sedangkan bakteri asam laktat heterofermentatif, melalui jalur 6-fosfoglukonat/fosfoketolase selain menghasilkan asam laktat juga menghasilkan etanol, CO<sub>2</sub>, asam asetat, senyawa citarasa, dan mannitol serta 1 mol ATP dari heksosa dan tidak mempunyai enzim aldolase.

Bakteri asam laktat heterofermentatif banyak dimanfaatkan dalam industri susu untuk menghasilkan keju dan senyawa flavour, senyawa citarasa maupun pengental, yaitu eksopolisakarida.

Kondisi pertumbuhan yang berbeda bisa menghasilkan produk akhir fermentasi yang berbeda, sebagai akibat dari berubahnya metabolisme piruvat dan penggunaan electron akseptor eksternal seperti oksigen atau senyawa organik.

Tabel 5. Perbedaan antara genus dalam bakteri asam laktat

Genus	Bentuk sel	Fermentasi
<i>Streptococcus</i>	coccus berantai	homofermentatif
<i>Leuconostoc</i>	coccus berantai	heterofermentatif
<i>Pediococcus</i>	coccus dalam empat	homofermentatif
<i>Lactobacillus</i>	batang berantai	homofermentatif
	batang berantai	heterofermentatif
<i>Enterococcus</i>	coccus berantai	homofermentatif
<i>Lactococcus</i>	coccus berantai	homofermentatif

Sumber : Madigan dkk. (1997)

Genus *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* dan *Lactococcus* sifatnya homogen, tidak banyak perbedaan dalam satu genus, sedangkan *Lactobacillus* merupakan grup bakteri asam laktat yang sangat heterogen dalam satu genusnya, karena sangat berbeda komposisi DNA nya.

Genus *Streptococcus* banyak dijumpai di saluran pernapasan, mulut, dan usus halus. Kebanyakan genus *Lactococcus* berasal dari susu dan produk-produk susu dan tidak dapat memfermentasi sukrosa, *Enterococcus* berasal dari feses (tinja) ataupun saluran pencernaan manusia maupun hewan, sedangkan *Leuconostoc* umumnya berasal dari tanaman,

menyerupai *Streptococcus*, namun bersifat heterofermentatif, menghasilkan senyawaan flavour seperti diasetil dan asetoin, dan apabila ditumbuhkan pada media yang mengandung sukrosa akan menghasilkan polisakarida dekstran, atau yang dikenal dengan EPS (eksopolisakarida), yang membentuk konsistensi atau kekentalan susu fermentasi.

Genus *Lactobacillus* terdiri dari lebih dari 70 spesies dan dikelompokkan menjadi 3 sub group (Tabel 6), kebanyakan homofermentatif, namun ada juga yang heterofermentatif. *Lactobacillus* secara umum lebih tahan terhadap asam dibandingkan dengan genus bakteri asam laktat lainnya.

Tabel 6. Karakteristik 3 subgrup genus *Lactobacillus* sp.

Karakteristik	Spesies
<p><b>Homofermentatif :</b>            produksi utama asam laktat (&gt; 85% dari glukosa) tidak menghasilkan gas dari glukosa, mempunyai enzim aldolase, tidak mempunyai fosfoketolase            (1) tumbuh pada 45°C tetapi tidak pada 15°C, sel berbentuk batang panjang            (2) tumbuh pada 15°C, beberapa tumbuh pada 45°C, batang pendek, mempunyai aldolase dan fosfoketolase, fakultatif heterofermentatif</p>	<p><i>L. acidophilus</i>  <i>L. salivarius</i>  <i>L. helveticus</i>  <i>L. delbrueckii</i>  <i>L. casei</i>, <i>L. plantarum</i></p>
<p><b>Heterofermentatif</b>            menghasilkan kira-kira 50% asam laktat dari glukosa; menghasilkan CO<sub>2</sub> dan etanol, tidak mempunyai enzim aldolase, mempunyai fosfoketolase; berbentuk batang panjang dan pendek</p>	<p><i>L. curvatus</i>    <i>L. fermentum</i>, <i>L. reuteri</i>,  <i>L. brevis</i>, <i>L. buchneri</i>, <i>L. kefir</i></p>

Sumber : Sharpe (1981); Kandler dan Weiss (1986)

Tabel 6. memperlihatkan bahwa fermentasi homolaktat pada *Lactobacillus* menghasilkan ekuimolar konsentrasi asam laktat dari glukosa, sedangkan heterolaktat menghasilkan lebih dari 50 % asam laktat dan juga etanol dan CO<sub>2</sub>, sehingga mudah untuk membedakan antara homofermentatif dan heterofermentatif berdasarkan pembentukan gas selama pertumbuhan genus *Lactobacillus* sp. dalam media yang mengandung glukosa. Demikian juga dengan mengukur nilai keasaman (pH) kultur medium, yang tentunya lebih rendah bagi homofermentatif dibandingkan dengan heterofermentatif. Tabel 6 dan 8 juga memperlihatkan bahwa suhu pertumbuhan juga bisa digunakan untuk membedakan

spesies *Lactobacillus* secara taksonomik.

Menurut Woolford (1984), tidak ada media untuk membedakan secara cepat antara bakteri asam laktat homofermentatif dan heterofermentatif. Media telah dimodifikasi untuk mendukung pertumbuhan kedua kelompok bakteri ini, tetapi tidak bisa membedakan keduanya (Davidson dan Cronin, 1973; de Man, dkk., 1960; Rogosa, dkk., 1951).

McDonald dkk. (1987), berhasil mengembangkan media untuk membedakan dan menghitung bakteri asam laktat homofermentatif dan heterofermentatif, yang disebut sebagai HHD, singkatan dari Homofermentatif-Heterofermentatif Differential Medium, yang bisa digunakan untuk menghitung jumlah bakteri homofermentatif dan heterofermentatif secara bersamaan. Hal ini dapat dilakukan karena bakteri asam laktat heterofermentatif mengubah sebagian fruktosa menjadi manitol untuk menghasilkan CO<sub>2</sub>, asam laktat, dan asam asetat apabila hanya menggunakan fruktosa digunakan sebagai sumber karbon. Sebaliknya, bakteri asam laktat homofermentatif menghasilkan 2 molekul asam laktat dari heksosa apapun yang dapat difermentasi, termasuk juga fruktosa. Mengingat bakteri asam laktat homofermentatif menghasilkan asam lebih banyak dari sejumlah tertentu fruktosa ketimbang yang heterofermentatif, perbedaan pH akan terjadi. Dengan menambahkan 0,25% (14 mM) fruktosa dan 0,25% (18 mM) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dengan sumber asam amino, perbedaan 1 atau lebih unit pH akan terjadi antara bakteri asam laktat homofermentatif dan heterofermentatif yang ditumbuhkan dalam media cair HHD dan dengan bantuan indikator hijau bromocresol (pK 4,6) akan memudahkan membedakan bakteri asam laktat yang tumbuh. Bakteri asam laktat homofermentatif akan menjadikan media cair HHD berwarna hijau, sedangkan heterofermentatif akan memberikan warna biru.

Sebagaimana kita ketahui, homofermentatif menghasilkan lebih dari 85% asam laktat sebagai produk metabolitnya, sehingga asam laktat yang dihasilkan mampu memberikan suasana asam, dengan adanya *bromocresol green*, media agar untuk pertumbuhannya yang semula pH nya 7,0, berubah menjadi asam dan menyebabkan media cair HDD yang mengandung koloni bakteri homofermentatif menjadi berwarna hijau.

Campuran kultur bakteri asam laktat homofermentatif dan heterofermentatif dapat dipisahkan atau diketahui jumlahnya masing-masing apabila ditumbuhkan dalam media padat HHD yang mengandung indikator bromokresol hijau, dengan mengamati warna koloni bakteri yang

tumbuh, dimana koloni homofermentatif dan warna media disekitar pertumbuhannya berwarna biru hingga hijau, sementara koloni heterofermentatif tetap berwarna putih.

Pada tahun 1991, Collin dkk. menggunakan pendekatan molekuler dalam mengidentifikasi 55 spesies *Lactobacillus* dan 24 spesies yang berdekatan, yaitu dengan menggunakan urutan 16 S rRNA. Ternyata *Lactobacillus* diklasifikasikan menjadi 3 kluster. Kluster I terdiri dari *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* spesies *Lactobacillus*, dan 11 spesies homofermentatif lainnya. Kluster II (*L. casei*/grup *Pediococcus*) terdiri dari 32 spesies *Lactobacillus* (5 spesies homofermentatif dan 27 spesies heterofermentatif), dan 5 spesies *Pediococcus*. Kluster III (grup *Paramesenteroides*) terdiri dari spesies heterofermentatif atipikal. Dengan demikian, klasifikasi berdasarkan sifat fenotip tidak sama dengan kluster filogenetik (bandingkan dengan Tabel 8).

Tabel 7 menunjukkan perbedaan karakteristik antara *Streptococcus*, *Lactococcus* dan *Enterococcus* serta habitat tempat hidupnya.

Berdasarkan suhu optimum pertumbuhannya, bakteri asam laktat dikelompokkan menjadi dua grup, yaitu mesofilik, dengan suhu optimum bagi pertumbuhannya 25°C, sedangkan suhu maksimum adalah 37- 40°C, dan termofilik, suhu optimum pertumbuhannya adalah 37- 45°C, suhu maksimumnya adalah 45 – 52°C.

Tabel 7. Perbedaan karakteristik dan habitat *Streptococcus*, *Enterococcus* dan *Lactococcus*

Grup	Spesies	Tumbuh baik pada		Tahan pada	Tumbuh pada		Habitat
		10°C	45°C	60°C, 30 menit	susu+0.1% metilen blue	broth+40% as empedu	
Streptococci							saluran pemapasan
Pyogenes	<i>Streptococcus</i>	-	-	-	-	-	mulut, usus halus
subgrup	<i>pyogenes</i>						
Viridans	<i>Streptococcus</i>	-	+	-	-	-	usus halus, vagina, tanaman
subgrup	<i>mutans</i>						
Enterococci	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	+	+	tanaman, produk susu
Lactococci	<i>Lactococcus lactis</i>	+	-	+	+	+	

Pada umumnya *Lactococci* dan *Leuconostoc* merupakan bakteri asam laktat yang mesofilik, sedangkan *Streptococcus thermophilus* dan homofermentatif *Lactobacilli* bersifat termofilik. Syarat utama bagi bakteri asam laktat sebagai starter fermentasi produk olahan susu adalah aman, memproduksi asam dari laktosa, menghasilkan senyawa aroma, dan dapat menghidrolisis protein. Tabel 8 memperlihatkan berbagai spesies



bakteri asam laktat untuk produk olahan susu (*dairy lactics*).

*Lactobacillus casei* termasuk dalam subgenus *Streptobacterium* (Tabel 8), suatu homofermentatif yang fakultatif heterofermentatif, bisa tumbuh pada suhu 15°C, menghasilkan L-asam laktat, tidak menghasilkan diasetil, dan struktur dinding selnya diklasifikasikan sebagai tipe Lys-Asp. *Lactobacillus casei* tersebar di alam dan telah diisolasi dari produk-produk olahan susu dan saluran pencernaan berbagai hewan. *L. casei* Shirota strain diisolasi dari saluran pencernaan manusia.

Beberapa sifat seperti pembentukan gas dari glukosa, pertumbuhan pada suhu 10°C, 45°C, toleransi terhadap kadar garam 6,5% dan 18 % serta pertumbuhan pada pH 4.4 dan 9.6 serta konfigurasi asam laktat yang dihasilkan penting bagi klasifikasi di tingkat spesies. Sifat-sifat lainnya meliputi karakteristik biokimia seperti berbagai kemampuan fermentasi karbohidrat, hidrolisis arginin, pembentukan acetoin (Vogues Proskauer tes), ketahanan terhadap asam empedu, tipe hemolisis, produksi ekstraseluler polisakarida, kebutuhan faktor pertumbuhan, keberadaan enzim-enzim tertentu seperti  $\beta$ -galaktosidase dan  $\beta$ -glukuronidase, sifat pertumbuhan pada susu juga membantu identifikasi di tingkat strain.

Karakteristik yang lebih jauh termasuk pendekatan molekuler atau khemotaksonomik, termasuk tipe asam amino (*diamino acid*) pada peptidoglikan, adanya asam teikhoat, rasio guanin +cytosin (G + C) dari DNA, komposisi asam lemak dan mobilitas elektroforetik dari laktat dehidrogenase (LDH).

Pendekatan molekuler dengan hibridisasi DNA-DNA sekuen rRNA dengan PCR, menjelaskan bahwa *L. casei* sebenarnya terbagi menjadi 3 spesies dan diajukan dua nama spesies baru, yaitu *L. paracasei* dan *L. rhamnosus*, disamping *L. casei*.

Tabel 8 Starter produk olahan susu (*dairy lactics*).

			<b>Homofermentatif Streptococci</b>	
			Lactococci mesofil	Streptococci thermofil
Tumbuh pada suhu			+	-
10°C				
Tumbuh pada suhu			-	+
45°C				
			<i>S. lactis</i> ( <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> )	<i>S. thermophilus</i>
			<i>S. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> )	
			<i>L. lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> )	
			<i>S. cremoris</i> ( <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> )	
			<b>Homofermentatif Lactobacilli</b>	
			<b>Grup I (Thermobacterium)</b>	<b>Grup II (Streptobacterium)</b>
Tumbuh pada suhu			-	+
15°C				
Tumbuh pada suhu			+	+
45°C				
Fermentasi ribosa			-	+
Gas dari asam glukonat			-	+
			<i>L. bulgaricus</i> ( <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> )	<i>L. casei</i> ( <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> )
			<i>L. lactis</i> ( <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> )	
			<i>L. helveticus</i>	
			<i>L. acidophilus</i>	
			<b>Heterofermentatif bakteri asam laktat</b>	
			<b>Betabacterium</b>	
			<i>Leuconostoc cremoris</i>	
			( <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> )	

Sumber : Ono dkk., 1992

# III. Metabolisme Bakteri Asam Laktat

---

Berbagai monosakarida dimetabolisme oleh bakteri asam laktat menjadi glucose-6-phosphate atau fructose-6-phosphate dan kemudian terjadi metabolisme melalui jalur EMP. Pola fermentasi ini menjadi basis taksonomi bakteri dan identifikasi bakteri asam laktat.

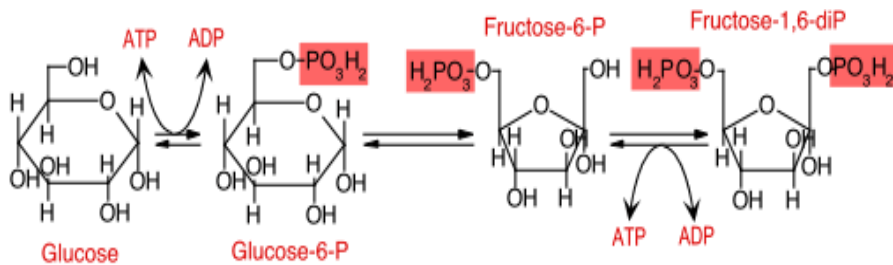
## A. Jalur EMP

Jalur Embden Meyerhoff Parnas (EMP) merupakan urutan reaksi oksidasi glukosa menjadi piruvat yang paling umum terjadi pada kebanyakan bakteri, tanaman, hewan dan bahkan manusia pada reaksi katabolismenya. Meskipun bukan satu-satunya cara untuk fermentasi glukosa, tetapi baik digunakan sebagai contoh katabolisme dalam fermentasi. Bakteri asam laktat homofermentatif menggunakan jalur EMP untuk menghasilkan piruvat untuk kemudian direduksi menjadi asam laktat melibatkan enzim *lactate dehidrogenase* menggunakan kelebihan NADH.

Jalur EMP terbagi menjadi tiga tahapan, yaitu aktivasi glukosa, penguraian glukosa dan ekstraksi energi. Berikut akan diuraikan masing-masing tahapan tersebut di atas.

### 1. Aktivasi glukosa

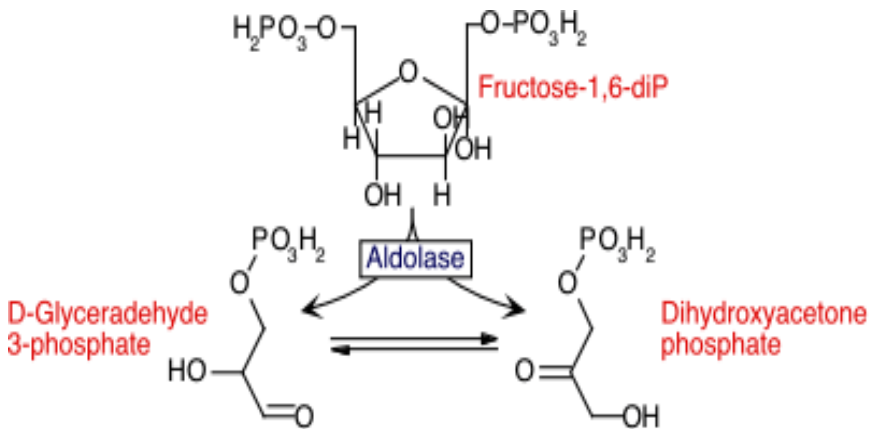
Sebagaimana diketahui, glukosa merupakan molekul yang relatif stabil, sehingga untuk mendegradasinya perlu ditambahkan fosfat energi tinggi agar tidak stabil. Pada tahap awal fosfat disumbangkan dari ATP atau fosfoenolpiruvat pada glukosa sehingga terbentuk glukosa-6-fosfat, untuk selanjutnya diisomerisasikan menjadi fruktosa-6-fosfat, dan fosfat kedua ditambahkan sehingga terbentuk fruktosa-1,6-bifosfat, yang lebih mudah diuraikan ketimbang glukosa (Gambar 2).



Gambar 2. Aktivasi glukosa dengan fosforilasi dari ATP

## 2. Penguraian Glukosa (heksosa)

Fruktosa-1,6-di fosfat selanjutnya diurai oleh enzim fruktosa bifosfat aldolase menjadi dua senyawa berkarbon 3, yaitu glyceraldehid 3 fosfat (GAP) dan dihidroxyacetonefosfat (DAP). Ini merupakan tahap yang penting dalam jalur EMP, yaitu mengubah glukosa yang berkarbon 6 menjadi dua molekul senyawa berkarbon 3 yang menjadi cikal bakal piruvat (Gambar 3).

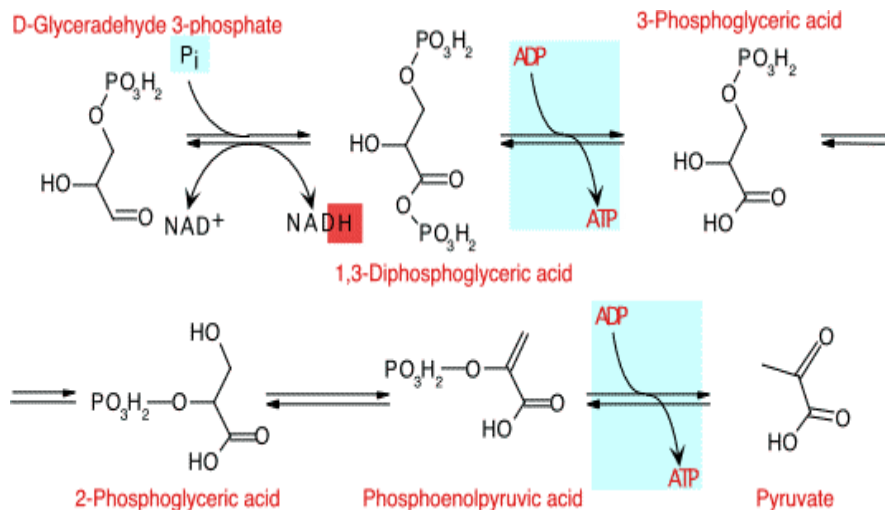


Gambar 3. Pemecahan fruktosa oleh aldolase

## 3. Ekstraksi energi

Pada reaksi tahap berikutnya DAP diubah menjadi GAP, yang akan berperan pada jalur EMP selanjutnya. Tahap berikutnya sangat penting. Fosfat anorganik ditambahkan pada GAP untuk membentuk *1,3-bisphosphoglycerate* (BPG). Setelah terjadi berbagai reaksi enzimatik, produk akhir dari jalur EMP adalah piruvat, seperti yang dapat dilihat pada

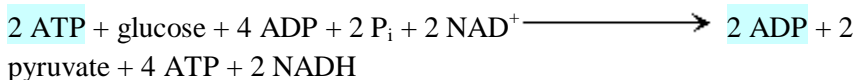
Gambar 4.



Gambar 4. Ekstraksi energi.

Perhatikan dua reaksi yang diberi warna biru yang menghasilkan energi. Tiap molekul glukosa yang masuk ke dalam glikolisis menghasilkan dua molekul GAP yang akan melanjutkan reaksi yang baru separuh terjadi.

Reaksi keseluruhan dapat diringkas sebagai berikut :

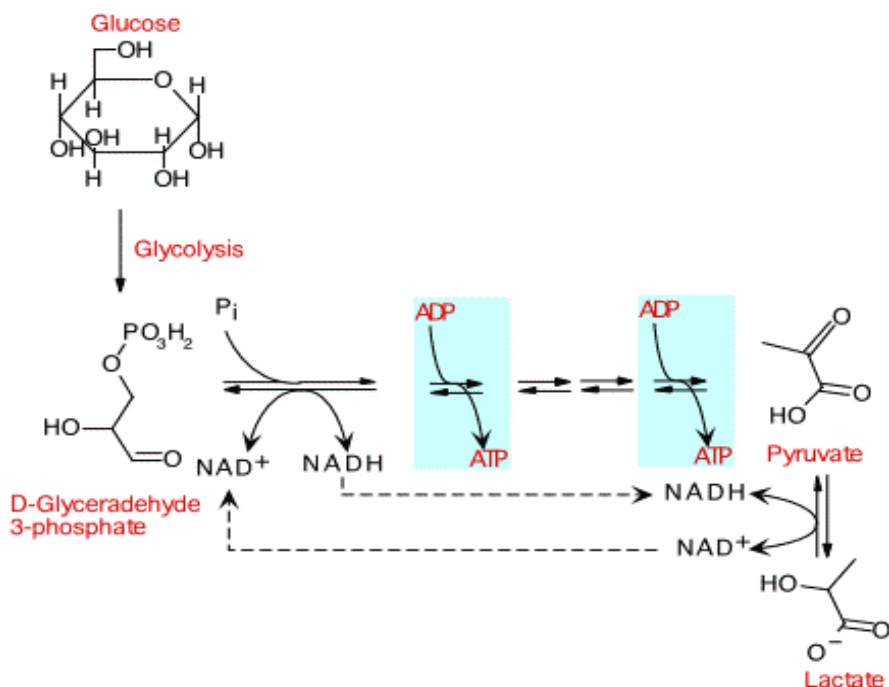


Reaksi di atas nampaknya sangat tidak efisien dibanding dengan metabolisme aerobik, yang menghasilkan 38 ATP dari satu molekul glukosa.

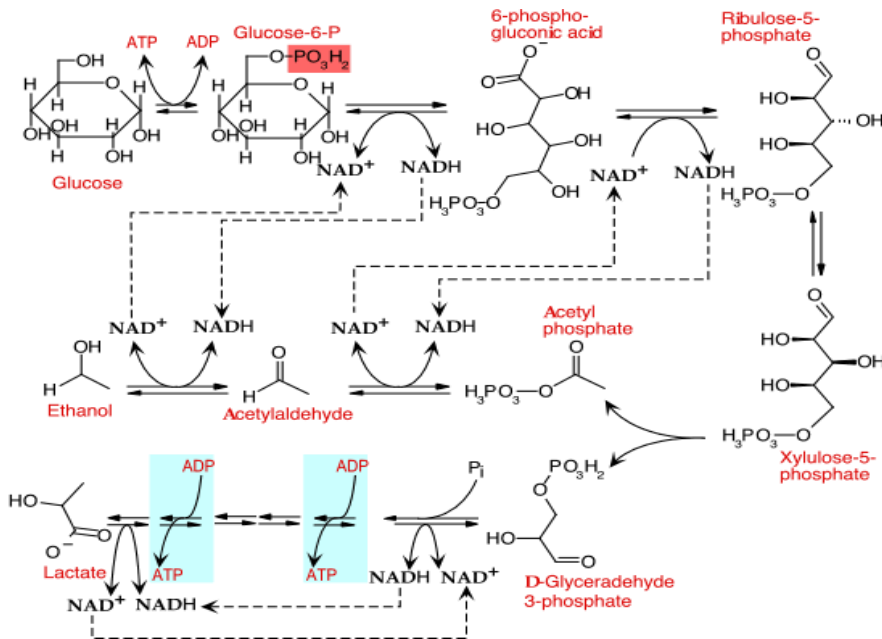
Warna biru menunjukkan energi yang masuk ke dalam reaksi. Dengan mengurangi dari energi yang terekstrak, akan menghasilkan energi akhir yaitu 2 molekul ATP per molekul glukosa. Usaha keras hanya demi 2 molekul ATP, yang digunakan sebagai sumber energi untuk mensintesis komponen-komponen sel seperti asam nukleat dan protein, yang penting bagi penggandaan sel. Fermentasi pada umumnya tidak menghasilkan banyak energi dan ini bisa memberikan pengertian mengapa mikroba yang terlibat dalam proses fermentasi bertemu dengan begitu banyak substrat namun tidak bertumbuh dengan pesat.

Fermentasi mikroba yang menghasilkan asam laktat ada yang homofermentatif dan heterofermentatif. Bakteri asam laktat homofermentatif, lebih dari 85% produk akhirnya adalah asam laktat (Gambar 5) Sedangkan bakteri asam laktat heterofermentatif, selain asam laktat juga menghasilkan senyawa metabolit lainnya seperti CO<sub>2</sub>, asam asetat, etanol, manitol dan senyawa flavor dari heksosa (Gambar 6).

Pada bakteri asam laktat heterofermentatif, sama sekali tidak digunakan jalur EMP selama proses metabolismenya, dan untuk setiap molekul glukosa hanya menghasilkan 1 molekul ATP (Gambar 6).



Gambar 5. Pembentukan asam laktat oleh BAL homofermentatif. Jalur yang digunakan identik dengan glikolisis.



Gambar 6. Fermentasi glukosa oleh BAL heterofermentatif Hanya satu ATP dihasilkan oleh 1 molekul glukosa

Tabel 9 memperlihatkan produksi asam laktat dan asetat serta ethonol oleh beberapa strain bakteri asam laktat.

Tabel 9. Metabolit primer yang dihasilkan strain bakteri asam laktat

Bakteri asam laktat	Setelah inkubasi 24 jam			Setelah inkubasi 72 jam		
	asam laktat (mg %)	asam asetat (mg %)	etanol (ppm)	asam laktat (mg %)	asam asetat (mg %)	etanol (ppm)
<i>L. bulgaricus</i> B-17	1.000	15	0.8	1.680	17	0.8
<i>L. jugurti</i> BS	2.200	29	0.9	2.940	38	1.0
<i>L. casei</i> strain <i>Shirota</i>	660	10	3.6	1.540	20	3.0
<i>S. thermophilus</i>	920	10	6.5	1.060	14	4.0
<i>S. cremoris</i> H-61	780	10	10.0	800	9	12.7
<i>S. lactis</i> 527	760	7	24.6	860	13	26.6
Media saja	40		0.8			

## B. Senyawa metabolit

Senyawa metabolit yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat, diantaranya adalah eksopolisakarharida (EPS) yang membentuk konsistensi yogurt dan digunakan sebagai biopolimer pengental, ada juga yang dikenal

sebagai bakteriosin, suatu peptida yang bersifat antimikroba, sehingga disebut sebagai biopreservasi, asam amino, berbagai jenis vitamin, asam folat, senyawa flavour seperti diasetil, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (hidrogen peroksida), berbagai jenis enzim, seperti  $\beta$ -galaktosidase, yang membantu penguraian laktosa, dan lain lainnya.

Berbagai jenis senyawa metabolit dihasilkan oleh bakteri asam laktat, baik berupa senyawa metabolit primer, seperti misalnya **asam** laktat, asam asetat, hidrogen peroksida, maupun metabolit sekunder semisal bakteriosin, senyawa *flavour*, maupun EPS.

Secara umum senyawa metabolit bakteri asam laktat **dikelompokkan** menjadi 5 kelompok senyawaan yang juga berfungsi sebagai antimikroba, sebagai berikut :

### **1. Asam organik**

Proses fermentasi yang melibatkan bakteri asam laktat mempunyai ciri khas yaitu terakumulasi asam organik yang disertai dengan penurunan nilai pH. Jenis dan jumlah asam organik yang dihasilkan selama proses fermentasi tergantung pada spesies bakteri asam laktat, komposisi kultur dan kondisi pertumbuhannya. Efek antimikroba dari asam organik merupakan akibat dari turunnya nilai pH dan juga bentuk tidak terdisosiasi dari molekul asam organik. Sebagaimana diketahui bahwa pH eksternal yang rendah mengakibatkan asidifikasi sel sitoplasma, sementara asam yang tidak terdisosiasi menjadi lipofilik, dapat berdifusi ke dalam membran. Asam yang tidak terdisosiasi akan melumpuhkan elektrokimia proton gradient, atau dengan mengubah permeabilitas sel membran yang akan mengganggu sistem transport substrat.

Bakteri asam laktat mempunyai enzim-enzim  *$\beta$ -galactosidase*, *glycolase* and *lactate dehydrogenase* (LDH) yang menghasilkan asam laktat dari laktosa. Asam laktat memberikan manfaat fisiologis sebagai berikut :

- Memperbaiki daya cerna protein susu dengan mengendapkannya sebagai gumpalan yang halus
- Memperbaiki pemanfaatan kalsium, fosfor dan zat besi
- Menstimulir sekresi asam lambung
- Meningkatkan pergerakan isi lambung
- Berfungsi sebagai sumber energi dalam proses respirasi

Asam laktat merupakan senyawa metabolit utama pada fermentasi bakteri asam laktat, yang dalam keseimbangan dengan bentuk terdisosiasi dan tidak terdisosiasi, dan kelankitan disosiasi tergantung pada pH. Pada



pH rendah sejumlah besar asam laktat dalam bentuk tidak terdisosiasi dan menjadi racun bagi banyak bakteri, kapang dan khamir. Namun demikian, mikroba sangat bervariasi sensitivitasnya terhadap bakteri asam laktat.

Asam laktat akan menurunkan pH sekitar saluran usus menjadi 4 – 5, sehingga menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk dan *E. coli* yang membutuhkan pH optimum 6 – 7. Sejumlah asam volatil yang dihasilkan selama fermentasi juga memberikan efek antimikroba dalam kondisi redoks potensial yang rendah.

Kultur starter yogurt, *S. thermophilus* hanya menghasilkan L-asam laktat, sedangkan *L. delbureckii* subsp. *bulgaricus* menghasilkan D-asam laktat. Selama fermentasi yogurt, *S. thermophilus* tumbuh lebih cepat dibanding *L. delbureckii* subsp. *bulgaricus*, itulah sebabnya pada awalnya dihasilkan L-asam laktat yang kemudian diikuti dengan produksi D-asam laktat.

Pada pH 5,0, asam laktat menghambat bakteri pembentuk spora, namun tidak efektif terhadap kapang dan khamir. Adalah mungkin bakteri *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 untuk tumbuh pada media yang mengandung 0.5 atau 0.75 % asam laktat dengan pH 3.5 – 4.5. Perlu diingat juga bahwa bentuk stereoisomer asam laktat juga berbeda daya antimikrobanya. L-asam laktat lebih lemah daya hambatnya dibandingkan dengan D-isomer.

Asam asetat dan asam propionat yang dihasilkan oleh strain bakteri asam laktat melalui fermentasi heterofermentatif, akan berinteraksi dengan sel membran, dan mengakibatkan asidifikasi intraseluler dan denaturasi protein. Asam asetat dan asam propionat lebih kuat daya antimikrobanya dibandingkan dengan asam laktat karena tingginya nilai pKa (asam laktat 3.08, asam asetat 4.75, dan asam propionat 4.87). Demikian juga halnya dengan proporsi asam tidak terdisosiasinya lebih tinggi dibanding asam laktat pada pH tertentu.

Asam asetat lebih kuat daya antibakterinya terhadap *Listeria monocytogenes* dibandingkan dengan asam laktat dan asam sitrat, demikian juga terhadap pertumbuhan dan germinasi spora *Bacillus cereus*. Asam asetat bersinergis dengan asam laktat, asam laktat menurunkan pH media, sehingga meningkatkan toksisitas asam asetat.

*Lactobacillus reuteri* memfermentasi glukosa menjadi asam laktat, etanol, dan CO<sub>2</sub>, namun dengan adanya gliserol akan dihasilkan lebih banyak asam asetat dan lebih sedikit etanol.

Asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat terdiri dari tiga tipe yaitu :

- L (+) asam laktat (Dextro rotatory)
- D (-) asam laktat (Levo rotatory)
- DL asam laktat (Racemic)

Selama fermentasi gula, bakteri asam laktat ada yang menghasilkan hanya L- asam laktat, ataupun hanya D-asam laktat, bahkan campuran kedua isomer asam laktat dalam jumlah yang proporsional. Hanya sedikit spesies bakteri asam laktat, yaitu *Lactobacillus curvatus* dan *Lactobacillus sake*, yang memiliki enzim *racemase*, yang mengubah L-asam laktat menjadi D-asam laktat. Dalam hal ini awalnya diproduksi L-asam laktat menginduksi *racemase*, yang akan mengubah L-asam laktat menjadi D-asam laktat.

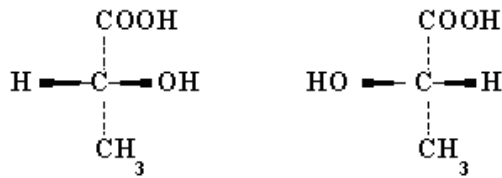
*Pediococcus pentosaceus* dan beberapa spesies *Lactobacillus sp.* proporsi isomer asam laktatnya berubah selama pertumbuhan secara tertutup. Secara umum, L-asam laktat dihasilkan pada awal fase pertumbuhan, sedangkan D-asam laktat dihasilkan pada akhir fase stasioner.

Pada bakteri *Lactobacillus casei* dan *Lactococcus sp.*, *allosteric group*  $\text{NAD}^+$  *dependent lactate dehydrogenase* (nLDH) yang diaktivasi oleh fructose-1,6-diphosphate menghasilkan L-asam laktat (Tabel 10)

D (-) asam laktat diketahui dapat menstimulir terjadinya asidosis, sedangkan DL asam laktat diubah menjadi L (+) atau D (-).isomer di dalam tubuh manusia. Dengan demikian L (+) asam laktat (Dextrorotatory) adalah satu-satunya asam laktat yang berguna bagi manusia secara klinis.

Konfigurasi struktural dari isomer L (+) dan D (-) asam laktat adalah seperti yang terlihat pada Gambar 7.

Pada manusia, kedua isomer tersebut di atas diserap, namun L(+) asam laktat cepat dan seluruhnya dimetabolit dalam pembentukan glikogen, sedangkan D(-) asam laktat lebih lambat dimetabolit, dan yang tidak termetabolit dikeluarkan melalui air seni, dan ini yang tidak dikendaki pada anak-anak. Beberapa strain bakteri asam laktat menghasilkan D(-) asam laktat, seperti misalnya *Lactobacillus. acidophilus*, sehingga meskipun bakteri ini bermanfaat bagi kesehatan sebagai bakteri probiotik, namun masih menjadi perdebatan apabila dikonsumsi oleh anak-anak.



**D(-) levorotatory asam laktat**

**L(+) dextrorotatory asam laktat**

Gambar 7. Konfigurasi struktural isomer asam laktat

L(+) asam laktat juga digunakan pada industri makanan, kosmetik dan sebagai bahan pembuat biopolimer, yaitu polimer yang biodegradable, dan memberikan daya penghambatan yang lebih kuat dibanding D(-) asam laktat, terhadap bakteri yang tidak diinginkan. Itulah sebabnya industri susu lebih suka menggunakan Bifidobakteri sebagai probiotik. *Lactobacillus sporogenes* hanya menghasilkan L (+) asam laktat sehingga bisa menjadi alternatif bagi industri susu. Tabel 10. memperlihatkan konfigurasi asam yang dihasilkan berbagai jenis bakteri asam laktat.

Tabel 10. Isomer asam laktat dari berbagai spesies bakteri asam laktat

Bakteri asam laktat	Isomer asam laktat
<i>Streptococcus thermophilus</i>	L (+) asam laktat
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	D(-) asam laktat
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	D(-) asam laktat
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	L (+) asam laktat
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	D(-) asam laktat
<i>lactobacillus sporogenes</i>	L (+) asam laktat
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	L (+) asam laktat
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	L (+) asam laktat
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	L (+) asam laktat
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	D(-) asam laktat
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	D(-) asam laktat

## 2. Hidrogen peroksida dan karbon dioksida

Enzim piruvat oksidase mengkonversi piruvat menjadi CO<sub>2</sub> dan asetil fosfat dengan diikuti pembentukan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Enzim ini juga terlibat dalam metabolisme aerobik dari bakteri *Lactobacillus plantarum*, membentuk asam asetat dalam jumlah cukup berarti secara aerob. Studi oleh Sedewitz

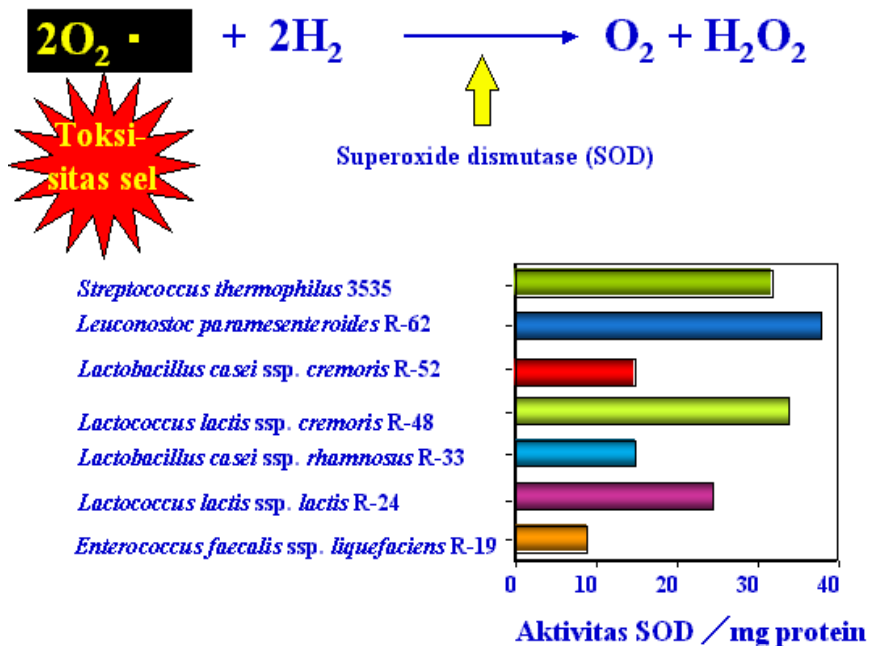
dkk., 1984 membuktikan bahwa enzim piruvat oksidase tertinggi aktivitasnya pada awal fase stasioner, dan pada media yang mengandung laktosa terbentuk enzim piruvat oksidase yang lebih banyak dibanding dengan media yang mengandung glukosa.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dihasilkan oleh enzim NADH oksidase dan superoksida dismutase, dimana oksigen berperan sebagai elektron akseptor eksternal, dan NADH oksidase dimiliki oleh hampir semua bakteri asam laktat. Apabila enzim bertindak sebagai mediator dua elektron transfer, maka produk yang dihasilkan adalah NAD<sup>+</sup> dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Beberapa peneliti berpendapat bahwa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tidak bisa terakumulasi dalam jumlah banyak secara *in vivo*, karena terdekomposisi oleh adanya peroksidase.

Efek bakterisidal senyawa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adalah karena terjadinya oksidasi pada sel bakteri, yaitu gugus sulfhidril dari protein sel sehingga mendenaturasi sejumlah enzim dan terjadinya peroksidasi dan lipid membran meningkatkan permeabilitas membran. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juga bisa bertindak sebagai *precursor* bagi pembentukan radikal bebas yang bersifat bakterisidal seperti senyawa radikal superoksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) dan hidroksil (OH<sup>-</sup>) yang dapat merusak DNA. Disamping itu, reaksi pembentukan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> akan mengikat oksigen sehingga membentuk suasana anaerob yang tidak nyaman bagi bakteri aerob.

Enzim superoksida dismutase dimiliki oleh beberapa bakteri asam laktat seperti *Lactococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, dan tidak terdapat di dalam *Lactobacillus sp.* Meskipun demikian beberapa strain *Lactobacillus sp.* memiliki sistem unik pelindung terhadap enzim superoksida. Sistem ini berdasarkan akumulasi spesifik Mn<sup>2+</sup> yang mencapai intraselular konsentrasi yang tinggi yaitu 30 – 34 mM, yang dapat mengikat superoksida. Bakteri *Lactobacillus plantarum* banyak digunakan untuk studi ini, dan bakteri asam laktat asal tanaman yang kaya akan Mn<sup>2+</sup> seperti *Leuconostoc sp.* dan *Pediococcus sp.*, juga memiliki system perlindungan terhadap superoksida.

Gambar 8 memperlihatkan aktivitas enzim *super oxide dismutase* (SOD) yang dimiliki oleh berbagai jenis bakteri asam laktat.



Gambar 8. Aktivitas enzim SOD berbagai jenis bakteri asam laktat (Hosono dkk, 1992)

$\text{H}_2\text{O}_2$  dihasilkan oleh NADH oksidase pada bakteri asam laktat yang umumnya tidak memiliki katalase, dan bisa terakumulasi dan pada konsentrasi tertentu mencapai tingkat penghambatan terhadap bakteri asam laktat itu sendiri (*autoinhibitory level*), yang berbeda untuk setiap jenis strain.

Dilaporkan juga bahwa produksi  $\text{H}_2\text{O}_2$  oleh *Lactobacillus* dan *Lactococcus* menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* sp. dan berbagai mikroba psikotrofik yang mengkontaminasi makanan. Pada susu segar,  $\text{H}_2\text{O}_2$  mengaktifkan sistem laktoperoksidase yang mengkatalisis oksidasi thiosianat dan menghasilkan hipotiosianat ( $\text{OSCN}^-$ ), oxyacids ( $\text{O}_2\text{SCN}^-$ ) dan ( $\text{O}_3\text{SCN}^-$ ) dan produk-produk antara (*intermediate*) oksidasi yang bersifat menghambat dengan spektrum luas bakteri gram positif dan gram negatif. Laktoperoksidase glikoprotein dijumpai pada air liur, air mata dan susu.

Karbon dioksida ( $\text{CO}_2$ ) hanya diproduksi oleh bakteri asam laktat heterofermentatif. Mekanisme daya antimikrobanya masih belum diketahui dengan pasti. Namun demikian,  $\text{CO}_2$  berperan dalam menciptakan kondisi

anerob lingkungan yang menghambat dekarboksilasi secara enzimatik, dan akumulasi CO<sub>2</sub> dalam *lipid bilayer* membran akan berakibat terganggunya permeabilitas membran.

Gas CO<sub>2</sub> dapat secara efektif menghambat pertumbuhan berbagai mikroba perusak makanan, terutama bakteri gram negatif yang bersifat yang bersifat psikrotrofik, yaitu bakteri gram negatif yang hidup pada suhu rendah. Pada konsentrasi 10 % CO<sub>2</sub> dapat menurunkan populasi bakteri sebanyak 50 %, dan pada 20 – 50 % mempunyai aktifitas antifungi yang kuat.

Bakteri *Lactobacillus reuteri* memfermentasi glukosa dan menghasilkan asam laktat, etanol dan CO<sub>2</sub>.

### 3. Komponen aroma

Senyawa diasetil dihasilkan oleh semua genus bakteri asam laktat yang melakukan fermentasi sitrat, dan senyawa diasetil memberi aroma (*butter*/mentega). Pertama kali diidentifikasi oleh van Niel dkk pada tahun 1929, sebagai senyawa flavor pada mentega. Pada tahun 1927, seorang peneliti yang bernama Lemoigne menemukan efek antimikroba diasetil. Senyawa ini menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif seperti *Bacillus sp.* akibat reaksinya dengan protein yang mengikat arginin, sehingga mempengaruhi pemanfaatan arginin.

Spesies dan strain dari *Lactobacillus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Pediococcus sp.* dan *Streptococcus sp.* menghasilkan diasetil, suatu senyawa komponen citarasa, memberikan rasa manis dan citarasa mentega, dan juga mempunyai daya antimikroba.

Bakteri gram negatif lebih sensitif terhadap diasetil dibanding bakteri gram positif, dimana bakteri gram negatif dapat dihambat oleh 200 µg/ml diasetil, sedangkan bakteri gram positif memerlukan 300 µg/ml. Diasetil pada 344 µg/ml menghambat pertumbuhan *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Escherichia coli*, dan *Aeromonas*.

Mengingat produksi diasetil selama fermentasi asam laktat sangat sedikit, yaitu 4 µg/ml, yang dihasilkan oleh *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* dan jumlah yang dapat dideteksi secara sensoris bagi diasetil adalah 2-7 µg/ml, maka penggunaannya sebagai pengawet makanan sangat terbatas, dan lebih berperan dalam pembentukan aroma. Namun demikian, diasetil secara sinergis bersama-sama dengan senyawa antimikroba lainnya memberikan kontribusi yang berarti dalam sistem pengawetan makanan fermentasi.

Dalam kondisi piruvat yang tersedia secara berlebihan dalam sel, melebihi kebutuhan pembentukan NAD<sup>+</sup>, maka berlangsung metabolisme untuk pembentukan diasetil dan acetoin (2,3-butanediol).

Asetaldehida dihasilkan oleh *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* oleh enzim threonine aldolase, yang memecah threonine menjadi asetaldehida dan glisin. Mengingat *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* dan *S. thermophilus* dalam yogurt tidak dapat memetabolis asetaldehida, maka senyawa ini akan terakumulasi dalam produk akhir sebesar 25 ppm. Asetaldehida sejumlah 10-100 ppm dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* dan *E. coli* dalam produk-produk olahan susu.

#### **4. Asam lemak**

Bakteri asam laktat hanya memperlihatkan aktivitas hidrolisis lemak yang sangat tidak berarti. Pertumbuhan *Lactococci* yang mesofil, *Lactobacilli* dan *S. thermophilus* dihambat oleh asam oleat dan asam kaprilat; dan asam kaprilat menginterensi aktivitas proteolitik dari beberapa bakteri asam laktat

Dalam kondisi tertentu, beberapa genus *Lactobacilli* dan *Lactococci* mempunyai aktivitas lipolitik dan bisa menghasilkan asam lemak dalam jumlah yang signifikan, seperti misalnya pada fermentasi sosis dan fermentasi susu. Aktivitas antimikroba dari asam lemak juga telah diketahui. Asam lemak tak jenuh mempunyai daya antibakteri terhadap bakteri gram positif, dan daya anti fungi asam lemak tergantung pada panjang rantai, konsentrasi, dan pH medium.

Daya antimikroba asam lemak disebabkan oleh molekul yang tidak terdisosiasi, bukan anionnya, karena pH mempengaruhi aktifitasnya, semakin rendah pH semakin kuat dan cepat efek antibakterinya.

#### **5. Asam amino dan peptida**

Bakteri asam laktat yang terlibat dalam fermentasi keju memiliki aktivitas proteolitik yang kuat, sedangkan kultur starter yogurt dan susu fermentasi lainnya merupakan proteolitik lemah.

Hidrolisis protein susu terjadi secara bertahap, yaitu tahap pertama melibatkan enzim proteinase menghasilkan polipeptida dan tahap kedua dilanjutkan oleh aktivitas peptidase menghasilkan asam amino. *S. thermophilus* aktivitas peptidasenya lebih kuat ketimbang *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan aktivitas proteinasenya terbatas, sementara

kemampuan *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* menghidrolisis kasein menunjukkan aktivitas proteinase yang jauh lebih kuat, menghasilkan polipeptida yang selanjutnya diubah menjadi asam amino oleh aktivitas peptidase dari *S. thermophilus*.

Aktivitas enzim peptidase dari *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bisa menghasilkan peptida yang memberikan rasa pahit apabila fermentasi dilakukan pada suhu di bawah 44 °C.

## **6. Bakteriosin dan senyawa dengan massa molekul rendah lainnya**

Efek antimikroba bakteri asam laktat telah diperhitungkan kita sehingga dapat memperpanjang masa simpan beerbagai jenis bahan makanan melalui proses fermentasi. Efek pengawetan bakteri asam laktat utama adalah karena dihasilkan asam laktat yang menurunkan nilai keasaman atau pH bahan pangan. Disamping itu dihasilkan juga senyawa antimikrobal yaitu peptida yang disintesis dalam ribosoma, dikenal sebagai bakteriosin.

Diawali dengan ditemukannya senyawa antibakteri *colicins* yang dihasilkan oleh *E. coli* pada tahun 1920, senyawa penghambat serupa colicin yang juga dihasilkan oleh bakteri gram positif baik asal produk olahan susu maupun asal fermentasi bahan pangan lainnya.

Antimikroba strain tertentu dari grup N streptococci (sekarang disebut *Lactococcus*) yang menghambat pertumbuhan *Lactobacilli* pertama kali dilaporkan oleh Rogers pada tahun 1928. Kemudian oleh Whitehead pada tahun 1933, mengidentifikasi senyawa antibakteri ini adalah sejenis protein.

Sepuluh tahun kemudian, lambatnya pembentukan asam pada proses pengolahan keju Cheddar ternyata disebabkan oleh kultur starter yang digunakan, bukan karena adanya serangan phage maupun adanya antibiotik dalam susu. Senyawa tersebut diisolasi, dipekatkan dan ternyata mempunyai daya hambat terhadap beberapa mikroba patogen, dimana saat itu dikalsifikasikan sebagai suatu antibiotik yang diberi nama nisin, suatu singkatan dalam bahasa Inggris grup N streptococci (sekarang *Lactococcus*) Inhibitory Substance IN (akhiran yang biasa digunakan sebagai nama antibiotik). Istilah bakteriosin kemudian digunakan untuk senyawa antimikroba ini oleh Jacob dkk. tahun 1953.

Beberapa jenis bakteri asam laktat menghasilkan bakteriosin, suatu peptida yang bersifat antibakteri, toksin yang berupa protein yang dapat mencegah pertumbuhan bakteri sejenis. Tagg dkk (1976), mengemukakan kriteria bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri gram positif, yaitu suatu



jenis protein, bersifat bakterisidal tidak hanya bakteriostatik, mencegah pertumbuhan bakteri sejenis, dan mempunyai tempat pelekatan spesifik bagi patogen, yang membedakannya dengan senyawa antimikroba lainnya.

Secara umum, penamaan bakteriosin mirip dengan penamaan enzim, bila pada enzim diberi akhiran *ase*, maka pada bakteriosin diberi akhiran *cin* kecuali nisin dan beberapa jenis bakteriosin. Kebanyakan bakteriosin bersifat bakterisidal yaitu membunuh bakteri bukan hanya menghambat, sebagai akibat dari lemahnya *proton motive force* dan hilangnya kemampuan potensi membran. Nisin akan membentuk pori-pori pada membran sel bakteri yang dihambat, sehingga melemahkan fungsi membran. Tahun 1992, Klaenhammer dkk. mengelompokkan bakteriosin menjadi tiga kelas, dan setahun kemudian, dikembangkan menjadi empat kelas (Tabel 11).

Bakteriosin dikelompokkan menjadi 4 kelas, yaitu Kelas I lantibiotik yang merupakan peptida rantai pendek, suatu asam amino yang sangat khusus (misalnya nisin, suatu residu 34 peptida yang sangat aktif terhadap kebanyakan bakteri gram positif).

Sebaliknya, kelas II, bakteriosin yang mengandung senyawa non lantionin seperti lactococcins, pediocins, lactacins, dan leucocin A, merupakan peptida berberat atom rendah yang tahan panas, suatu 36 - 44 asam amino.

Kebanyakan bakteriosin kelas II mempunyai daya antibakteri terhadap *Listeria monocytogenes*. Bakteriosin kelas III, protein, peptida berberat atom tinggi yang tidak tahan panas, dan kelas IV merupakan kompleks bakteriosin yang tidak diketahui dengan baik identitasnya (Tabel 11).

*Lactococci*, *Lactobacilli*, *Pediococci*, *Leuconostoc*, *Streptococci* dan *Enterococci* diketahui menghasilkan bakteriosin. Tabel 12. memperlihatkan jenis-jenis bakteriosin yang diproduksi oleh berbagai spesies *Lactobacillus*.

Tabel 11. Klasifikasi Bakteriosin yang dihasilkan bakteri asam laktat

Kelas	Sub Kelas	Deskripsi
Kelas I		Lantibiotics
Kelas II		Berberat molekul kecil (<10kDa), tahan panas 100 - 121 °C, peptida aktif thd membran tidak mengandung lanthionine
	Iia	peptida yang aktif terhadap <i>Listeria</i>
	Iib	bakteriosin dipeptida
	Iic	peptida yang mengandung thiol aktif
Kelas III		berat molekul besar (> 30 kDa), protein yang labil
Kelas IV		Kompleks bakteriosin : mengandung protein dengan lipid dan atau karbohidrat

Sumber : Nes dkk. (1996)

Bakteriosin yang paling dikenal adalah nisin, suatu peptida yang dihasilkan oleh beberapa *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Nisin berinteraksi dengan fosfolipid dalam membran sitoplasma bakteri kontaminan seperti *Clostridium botulinum* dan *Listeria monocytogenes*, serta bakteri perusak makanan.

Hingga saat ini, sekitar 70 jenis bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat dan *Bifidobacterium* telah diidentifikasi. Satu-satunya bakteriosin yang mendapat persetujuan dari FDA pada bulan April 1989, yaitu nisin untuk digunakan dalam keju oles pasteurisasi, untuk mencegah spora botulinum. Nisin tidak menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif, kapang atau khamir, tetapi menghambat pertumbuhan bakteri gram positif termasuk pembentuk spora seperti *Clostridium botulinum* dan bakteri perusak makanan yang tahan panas.

Nisin merupakan pengawet makanan yang memberikan “clean” label, yaitu aman bagi manusia, bagi pelaku industri pangan, karena sudah mendapat persetujuan dari FDA, dan dapat memperpanjang masa simpan dalam lemari es selama 14 sampai 30 hari tergantung jenis makanannya.

Tabel 12. Jenis –jenis bakteriosin yang dihasilkan *Lactobacillus*.

Jenis Bakteriosin	Bakteri asam laktat
Asidolin	<i>L. acidophilus</i>
Asidofilin	<i>L. acidophilus</i>
Lactacin B	<i>L. acidophilus</i>
Lactacin F	<i>L. acidophilus</i>
Bulgarin	<i>L. bulgaricus</i>
Plantaricin SIK-83	<i>L.plantarum</i>
Plantaricin A	<i>L.plantarum</i>
Lactolin	<i>L.plantarum</i>
Plantaricin B	<i>L.plantarum</i>
Lactolin 27	<i>L. helveticus</i>
Helveticin J	<i>L. helveticus</i>
Reuterin	<i>L. reuteri</i>
Lactobrevin	<i>L. brevis</i>
Lactobacillin	<i>L. brevis</i>
Gassericin A	<i>L. gasseri</i>

Sumber : Christensen dan Hutkins 1992); Siragusa (1992); Klaenhammer (1993); Jack dkk. (1994); Ryan dkk. (1996)

Bakteriosin yang dihasilkan bakteri asam laktat semakin mendapat perhatian sebagai bahan tambahan makanan (*food additives*) potensial terhadap bakteri patogen pengkontaminasi makanan. Reuterin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus reuteri* dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* pada daging cincang. Perlakuan penambahan campuran *Lactobacillus reuteri* dan gliserol secara nyata meningkatkan masa simpan ikan herring. *Lactobacillus reuteri* secara komersial telah digunakan bersama-sama dengan *Bifidobacterium infantis* dan *Lactobacillus acidophilus* pada susu fermentasi dengan merek dagang BRA-mjolk di Swedia.

Secara umum bakteriosin dihasilkan selama masa tumbuh cepat (*exponential growth phase*) pada siklus pertumbuhan mikroba, namun nisin dihasilkan dalam jumlah besar setelah sel mencapai fase stasioner.

Piscicolin 126 adalah bakteriosin yang terbukti tahan terhadap suhu tinggi dan pH asam. Kalau nisin berhasil untuk mengawetkan daging, piscicolin 126 ternyata lebih menjanjikan. Penambahan piscicolin 126 dalam suatu pasta ham komersial, dapat mencegah pertumbuhan *Listeria monocytogens* hingga 14 hari ketika disimpan pada suhu 10°C, dan uji ini membuktikan bahwa piscicolin 126 lebih kuat dibandingkan dengan nisin.

Coventry dkk, berhasil mengekstrak nisin, pediocin PO2, brevicin 286 dan piscicolin 126 dari media fermentasi. Ekstraksi bakteriosin penting untuk memperbaiki pengawetan makanan pada makanan olahan yang tidak

melibatkan proses fermentasi (non fermented food), demikian juga bagi makanan yang tidak cocok untuk diinokulasi dengan bakteri asam laktat.

Peptida dalam lantibiotik mengandung dehidro asam amino yang khas dan thioeter asam amino lanthionin dan 3-metillanthionin Tabel 13 memperlihatkan daftar bakteriosin yang mengandung lantibiotik dari bakteri asam laktat.

Bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacilli* dan *Bifidobacteria* mendapat perhatian yang lebih banyak mengingat peranan positif bakteri ini dalam usus manusia. Tabel 14. berikut memberi informasi berbagai jenis bakteriosin yang dihasilkan bakteri asam laktat dan aktivitasnya.

Tabel 13. Bakteriosin yang mengandung lanthionin (Kelas I)

Lantibiotik	Strain penghasil	Berat molekul	Antimikroba
Lacticin 481	<i>Lc. lactis</i> 481	2901 Da	BAL dan <i>Cl. tyrobutyricum</i>
Lactocin S	<i>Lb. sake</i> 145	3769 Da	<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Leuconostoc</i>
Lactococcin	<i>Lc. lactis</i> ADR185L030	2300 Da	<i>Cl. Tyrobutyricum</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>S. thermophilus</i>
Nisin A	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	3488 Da	<i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> ,  <i>Pediococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Clostridium</i> (+spora), <i>Bacillus</i> (+spora)
Nisin Z	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> NIZO 22186	3453 Da	<i>idem</i> dengan Nisin A
Salivaricin A	<i>Sc. salivarius</i> 20P3	2315 Da	<i>Micrococcus luteus</i>

Sumber : Modifikasi dari Klaenhammer (1993); Jack dkk.. (1994); Sahl dkk.(1995)

Deskripsi umum bagi bakteriosin kelas II adalah peptida tahan panas dan aktif menyerang membran dari sel target mikroba. Bakteriosin kelas II akan menghancurkan integritas membran dengan membentuk pori-pori.

*Lactobacillus reuteri* memetabolisme gliserol dan akan mengeluarkan senyawa intermediate 3-HPA (3-hydroxypropionaldehyde), suatu senyawa hasil dehidrasi gliserol. Senyawa 3-HPA ini merupakan senyawa non protein, bersifat antimikroba kuat, dan dikenal sebagai reuterin, dan karena sifat antimikrobanya, seringkali dikelompokkan ke dalam bakteriosin, meskipun reuterin bukan senyawa peptida. (Tabel 14)

Tabel 14. Berbagai jenis bakteriosin Kelas II dan aktivitasnya

Bakteriosin	Laktobasilus	aktivitas/sifat
Acidocin	<i>L. acidophilus</i>	Bakteriostatik thd <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i>
Lactocin 27	<i>L. helveticus</i> LP27	kompleks lipopolisakarida, bakteriostatik terhadap laktobasilus lain, tahan panas
Lactacin B	<i>L. acidophilus</i> N2	tahan panas
Lactacin F	<i>L. johnsonii</i> 11088	tahan panas
Curvacin C	<i>L. curvatus</i> LTH 1174	lisis laktobasili lain, kontaminan pangan seperti <i>Listeria</i> dan <i>Carnobacteria</i>
Sakacin A	<i>L. sake</i> LB706	tahan panas
Plantaricin SIK-83	<i>L. casei</i> B80	menghambat enterococci, Streptococci, <i>Pediococci</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Gassericin A	<i>L. gasseri</i>	peptida BM rendah, 3,8 kDa, bakterisidal tetapi tidak melisis <i>Listeria monocytogenes</i> dan enterik patogen lainnya
Reuterin	<i>L. reuteri</i>	non protein, menghambat gram negatif ( <i>Salmonellae</i> , <i>Shigellae</i> ) dan gram positif ( <i>Clostridia</i> , <i>Listeria</i> )

Sumber : Klaenhammer (1993); Jack dkk.. (1994); Sahl dkk. (1995)

*Lactobacillus reuteri* memetabolisme gliserol dan akan mengeluarkan senyawa intermediate 3-HPA (3-hydroxypropionaldehyde), suatu senyawa hasil dehidrasi gliserol. Senyawa 3-HPA ini merupakan senyawa non protein, bersifat antimikroba kuat, dan dikenal sebagai reuterin, dan karena sifat antimikrobanya, seringkali dikelompokkan ke dalam bakteriosin, meskipun reuterin bukan senyawa peptida. (Tabel 14).

Keunggulan reuterin sebagai komponen berberat molekul rendah non bersifat antimikroba yaitu aktif pada pH rendah hingga 2.0, tahan panas, aktivitas spektrum luas, larut dalam aseton. Bakteri asam laktat penghasil reuterin, *Lactobacillus reuteri* hidup dalam saluran pencernaan manusia dan hewan. Selama fase eksponensial, tidak dihasilkan reuterin, karena akan direduksi selama metabolisme glukosa. Ketika mencapai fase stasioner, reuterin mulai terakumulasi. Dalam keadaan terlarut, reuterin dijumpai dalam tiga bentuk, yaitu monomerik, monomerik hidrat, dan dimetrik siklik.

Aktivitas antimikrobanya pada spektrum yang luas, yaitu terhadap bakteri, fungi, protozoa dan virus. Mekanismenya adalah menghambat substrat yang mengikat subunit ribonukleotida reduktase, sehingga

mengganggu sintesis DNA, dan juga menginaktifkan enzim sulfhidril.

Bakteriosin kelas III dapat dijelaskan sebagai peptida berberat molekul tinggi dan tidak tahan panas, dan hingga saat ini hanya ditemukan dan diisolasi dari genus *Lactobacillus sp.* Beberapa jenis bakteriosin kelas III dapat dilihat pada Table 15 berikut ini.

Tabel 15. Bakteriosin Kelas III yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat

Bakteriosin	<i>Lactobacillus</i>	Massa molekul	Antimikroba
Acidophilucin A	<i>L. acidophilus</i>		<i>L. delbrueckii</i> , <i>L. helveticus</i>
Caseicin 80	<i>L. casei</i> B 80	40 kDa	<i>L. casei</i>
Helveticin J	<i>L. helveticus</i>	37 kDa	<i>L. helveticus</i> , <i>L. delbrueckii ssp bulgaricus</i> dan <i>lactis</i>
Helveticin V-1829	<i>L. helveticus</i>	> 10 kDa	<i>L. helveticus</i> , <i>L. delbrueckii ssp bulgaricus</i>
Lacticin A	<i>L. delbrueckii</i>		<i>L. delbrueckii ssp lactis</i>
Lacticin B	<i>L. delbrueckii</i>		<i>L. delbrueckii ssp bulgaricus</i>

Sumber : Klaenhammer (1993); Venema (1993)

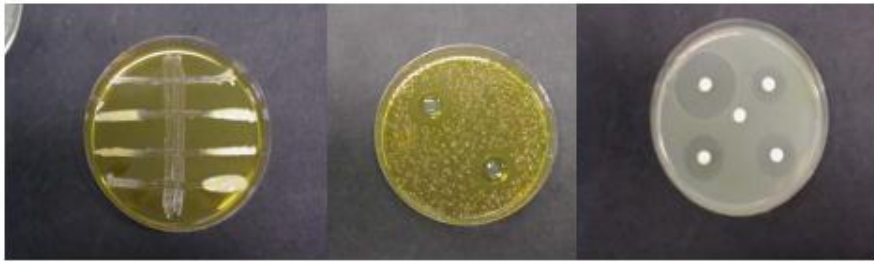
Bakteriosin Kelas IV merupakan senyawaan kompleks bakteriosin. lipid atau karbohidrat diperlukan keberadaannya untuk aktivitasnya sebagai antimikroba. Mekanisme kerjanya masih terus diteliti. Tabel 16 memperlihatkan bakteriosin kelas IV yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat.

Tabel 16. Bakteriosin kelas IV yang dihasilkan bakteri asam laktat

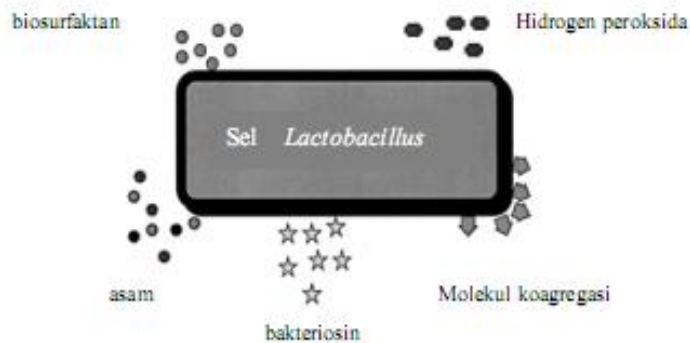
Bakteriosin	Strain BAL	Karakteristik	Antimikroba
Bacteriocin	<i>L. fermenti</i>	Kompleks protein-lipokarbohidrat	<i>L. fermenti</i>
Lactocin 27	<i>L. helveticus</i>	Kompleks protein-lipopolisakarida > 300 kDa, protein 12,400 Da	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. helveticus</i>
Leuconocin S	<i>Leu. paramesenteroides</i>	dua glikoprotein 20,000 Da dan 20, 000 Da	<i>Listeria sp.</i> , bakteri asam laktat
Pediocin SJ-1	<i>P. acidilactici</i>	glycoprotein 4000 Da	

Sumber : Klaenhammer (1993); Venema (1993); Jimenez-Diaz dkk ,1995)

Uji aktivitas bakteriosin dapat diawali dengan skrining sederhana dengan mengamati daya hambat yaitu menggores bakteri asam laktat probiotik yang diuji daya antibakterinya terhadap goresan bakteri patogen yang akan diuji, sehingga dapat terlihat penghambatan pertumbuhan sepanjang bakteri probiotik (Gambar 9a), untuk selanjutnya diuji dengan menggunakan *paper disc* (kertas cakram) steril (Gambar 9b dan 9c) dan setelah terdeteksi adanya aktivitas daya hambat terhadap bakteri patogen, dapat dilakukan uji yang lebih kompleks secara *in vitro*, *in vivo* dan klinis untuk membuktikan bahwa daya antibakteri itu merupakan aktivitas bakteriosin bukan senyawa penghambat lainnya.



Gambar 9. Uji sederhana daya antibakteri probiotik terhadap bakteri patogen (a) metode gores, (b) dan (c) *spot test* dengan menggunakan *paper disc* steril



Gambar 10. Senyawa metabolit yang disekresi oleh sel bakteri asam laktat (Reid, G., 2001)

Keterangan : biosurfaktan menghambat adhesi (pelekatan)  
 Asam organik, bakteriosin dan  $H_2O_2$  menghambat pertumbuhan  
 Molekul koagregasi menghambat penyebaran patogen

#### a. Aplikasi bakteriosin dalam biopreservasi makanan

Aktif molekul bakteriosin diekskresikan ke luar oleh sel bakteri asam laktat. Pada pH 5,0 atau lebih, banyak molekul bakteriosin yang tetap melekat pada permukaan sel bakteri asam laktat penghasil bakteriosin. Molekul bakteriosin ini bermuatan positif dan cenderung membentuk agregat, adsorb pada permukaan sel bakteri gram positif. Beberapa jenis bakteriosin seperti nisin mengandung asam amino termodifikasi lanthionin.

Aktivitas bakterisidal atau efek pembunuhan terhadap bakteri yang sensitif yaitu melalui destabilisasi fungsi permeabilitas membran sel dan pembentuk energi. Beberapa strain juga terlisis. Bakteri penghasil bakteriosin menjadi kebal terhadap bakteriosin yang dihasilkan akibat imunitas protein spesifik (Ray, 1992).

Bakteriosin umumnya efektif terhadap sel dari bakteri gram positif lainnya. Efek bakterisidalnya relatif stabil pada suhu tinggi. Sebagai contoh, pemanasan 100 °C selama 10 menit hanya menurunkan aktivitas nisin sebanyak 30 persen sedangkan pediosin AcH/PA-1 hanya berkurang sebanyak 10 %. Aktivitasnya stabil pada pH asam tetapi pada pH 9,0 atau lebih bisa rusak. Berbagai enzim proteolitik merusak aktivitas biologinya.

Aplikasi bakteriosin pada makanan lebih tepat digunakan pada makanan yang dikemas vakum dan disimpan pada suhu lemari es.

#### **b. Aspek regulasi aplikasi bakteriosin**

Nisin telah mendapat ijin untuk digunakan sebagai bahan tambahan makanan pada lebih dari 45 negara (Delves-Broughton, 1990). Bakteriosin dari bakteri asam laktat dan bakteri yang layak digunakan dalam makanan mempunyai keunggulan karena masuk dalam status GRAS.

Berbagai aplikasi penggunaan nisin telah tercatat, termasuk preservasi buah dan sayuran dalam kaleng, perservasi susu non fermentasi, produk olahan susu, daging, ikan serta penghambatan pembentukan diasetil oleh bakteri asam laktat pada bir (Ogden dan Waites, 1988). Penghambatan pertumbuhan spora bakteri merupakan aplikasi biopreservasi nisin yang paling potensial.

Aspek regulasi pemanfaatan bakteriosin sebagai biopreservasi dibahas pada suatu simposium yang disponsori oleh International Life Sciences Institute (ILSI), dan sepanjang bakteri penghasil bakteriosin masuk dalam status GRAS, dapat disetujui untuk digunakan.

### **7. Biopolimer eksopolisakarida**

Awalnya para peneliti mengamati kekentalan (*ropiness*) dari susu fermentasi yang melibatkan bakteri asam laktat mesofil dan termofil, ternyata merupakan hasil sintesis dan sekresi eksopolimer. Pembentukan eksopolisakarida (EPS) dikenal sejak awal tahun 1950. Pada waktu itu, ekstraseluler polisakarida yang diketahui sebagai *bifidan*, dihasilkan oleh *Bifidobacterium bifidum*.



Ada dua pendapat mengenai komposisi kimia eksopolimer dari bakteri asam laktat strain termofil. Awalnya, eksopolisakarida ini diyakini berupa suatu glikoprotein yang 47 % merupakan protein. Namun, Schellhaas (1983) menemukan bahwa eksopolimer terdiri dari 85 % karbohidrat yang terdiri dari glukosa dan galaktosa. Ternyata pendapat terakhir ini yang sekarang disepakati, bahwa eksopolimer merupakan berbagai tipe polisakarida yang disekresikan.

Kultur starter yogurt termofil, baik *S. thermophilus* maupun *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, bisa menghasilkan sampai 0,2 % (b/b) mukopolisakarida setelah 10 hari fermentasi. Demikian juga *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* mampu menghasilkan polisakarida kapsuler dalam susu fermentasi Swedia yaitu "Langfil", yang mengandung ramnosa, glukosa, galaktosa dan gliserol.

*Leuconostoc* yang bersifat mesofil menghasilkan homopolisakarida (dekstran), sedangkan *Lactococci* dan *Lactobacillus* menghasilkan heteropolisakarida, yang bercabang dan berbeda dalam komposisi tergantung dari sumber karbohidrat dalam medium pertumbuhannya.

EPS membentuk jaringan filamen yang dapat dilihat dengan *scanning electron* mikroskop. Sel bakteri tertutup oleh bagian polisakarida, dan filamen mengikat sel bakteri dan protein susu. Tekstur yogurt merupakan hasil dari interaksi kompleks antara protein susu, asam, dan EPS yang memberikan kesan lembut, kental dan stabilitas gel serta terjadinya sineresis.

Berbagai strain bakteri asam laktat menghasilkan EPS, baik sebagai kapsul, melekat pada sel bakteri, atau diekskresikan sebagai lendir. EPS mempunyai struktur yang menyerupai serat biji-bijian dan sayuran, sehingga berperan positif bagi kesehatan manusia. Beberapa jenis bakteri asam laktat yang menghasilkan EPS, diantaranya *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Bifidobacterium longum*, dan *Bifidobacterium infantis*. Penelitian mutakhir membuktikan adanya peran EPS yang menyerupai serat dan antitumor.

Bakteri asam laktat menghasilkan polisakarida sebagai komponen dinding sel dan cadangan polimer, dan juga pada beberapa spesies sebagai kapsul atau lendir. Pada industri olahan susu, strain bakteri asam laktat *Lactococci* mesofil yang membentuk lendir secara tradisional telah digunakan dalam produksi berbagai susu fermentasi seperti yogurt, *Vili*, produk susu fermentasi Finlandia, dan *Langfil* dari Skandinavia. Eksopolisakarida yang disekresikan oleh bakteri asam laktat berperan

penting bagi sifat rheologi dalam membentuk konsistensi dan tekstur yogurt, kefir, viili dan susu fermentasi lainnya.

Sejak akhir tahun 1980 an, pemanfaatan EPS asal bakteri asam laktat telah berkembang dalam industri susu, sebagai pengembangan dari susu fermentasi *Viili* di Finlandia yang sangat kental. Produksi kultur starter yogurt yang termofilik dan kental banyak digunakan untuk menggantikan bahan penstabil sintetis, sehingga mutu rheologis yogurt menjadi lebih baik dan mencegah terjadinya sineresis, yaitu keluarnya air dari koagulum.

Ada dua kelompok eksopolisakarida, yaitu homopolisakarida, suatu grup polisakarida, terdiri dari satu jenis monosakarida, dan heteropolisakarida, mengandung lebih dari satu jenis monosakarida, terutama berupa galaktosa dan glukosa serta sejumlah kecil monosakarida lainnya.

#### **a. Homopolisakarida**

Beberapa spesies bakteri asam laktat dapat memanfaatkan sukrosa sebagai substrat spesifik untuk menghasilkan dekstran, mutan dan levan.

Dekstran, suatu glukkan yang terbentuk ekstraseluler, dihasilkan oleh genus *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, dan *Streptococcus*, dan *Leuconostoc mesenteroides* dan *Leuconostoc dextranicum* terkenal sebagai penghasil dekstran. Meskipun tiap strain bakteri menghasilkan glukkan yang unik dan khas, tetapi struktur yang biasa ditemui merupakan ikatan  $\alpha$ -1,6 bisa sampai 95 % dengan proporsi yang lebih sedikit merupakan ikatan  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3, atau  $\alpha$ -1,4 yang membentuk molekul yang banyak bercabang.

Dekstran disintesis diluar sel oleh *dextranucrase* yang mengkatalisis sukrosa untuk menghasilkan D-fruktosa dan D-glukosa, dan mentransfer D-glukosa pada akseptor untuk membentuk dekstran. Reaksinya adalah sebagai berikut :

Sukrosa + glukkan akseptor ---- $\rightarrow$  dekstran atau mutan + D-fruktosa

Mutan juga disintesis dengan cara yang sama oleh *Streptococcus mutans* yang banyak dijumpai dalam mulut kita, sehingga membentuk karang gigi. Namun demikian, mutan berbeda dari dekstran karena mengandung ikatan  $\alpha$ -1,3 yang cukup banyak, sehingga polimer ini tidak larut dalam air.

Jenis lainnya dari homopolisakarida adalah galaktan yang dihasilkan oleh *Lc. lactis* ssp. *cremoris* H414, yang mengandung rantai pentasakarida.

## b. Heteropolisakarida

Berbagai jenis bakteri asam laktat, seperti *Lactobacillus*, *Lactococcus*, dan *Streptococcus*, dapat menghasilkan heteropolisakarida EPS. Komponen utama monosakarida adalah galaktosa dan glukosa, dan juga sejumlah kecil rhamnosa, fruktosa, mannosa dan galaktosamin. Dibandingkan dengan homopolisakarida EPS, produksi heteropolisakarida jauh lebih rendah, yaitu hanya 60 – 400 mg/L. Umumnya, heteropolisakarida disintesis intraseluler pada membran sitoplasma dan nukleotida gula digunakan sebagai precursor untuk penyusunan rantai polisakarida. Tahun 1968, pertama kali diketahui heteropolisakarida larut air yang dihasilkan oleh *Lactobacillus brevis* yang diisolasi dari starter kefir.

*Lactobacillus helveticus* menghasilkan berbagai jenis EPS, yang kesemuanya mengandung galaktosa dan glukosa. *Lactobacillus sake* 0-1 yang diisolasi dari produk fermentasi daging, mengandung glukosa, rhamnosa dan glycerol fosfat. Sedangkan *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772 menghasilkan EPS yang terdiri dari galaktosa, dan sedikit mengandung glukosa dan rhamnosa.

Eksopolisakarida juga dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* LMG9433, *Lactobacillus kefiranofaciens* K1, dan *Lactobacillus paracasei* 34-2, serta *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. Ternyata strain *Lactobacillus rhamnosus* strain C83, *Lactobacillus casei* CG11 dan *Lactobacillus sake* 0-1 pada suhu yang lebih rendah akan menghasilkan EPS lebih banyak, sedangkan beberapa strain *Lactobacillus* lainnya menghasilkan EPS lebih banyak pada suhu yang lebih tinggi dibandingkan dengan suhu optimum pertumbuhannya.

Di antara genus *Lactococci*, hanya *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* menghasilkan EPS, dan berperan dalam membentuk konsistensi susu fermentasi. EPS yang dihasilkan terdiri dari galaktosa, glukosa, dan seringkali juga mengandung rhamnosa. Suatu heteropolisakarida yang mengandung fosfat, suatu fosfopolisakarida, yang dikenal sebagai *viilian*, dihasilkan oleh *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SBT 0495, yang diisolasi dari kultur starter *Vili*, suatu susu fermentasi di Finlandia. Gruter dkk. (1992) menemukan galaktan hasil fermentasi susu oleh *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

*Streptococcus thermophilus* mewakili genus *Streptococcus* dalam menghasilkan EPS. Setiap strain bakteri ini menghasilkan EPS yang berbeda, sehingga susu fermentasi yang dihasilkan berbeda kekentalannya, karena EPS bisa berperan dalam tekstur yang berlendir, dan bisa juga bersifat sebagai pengental dalam yogurt. Doco dkk. (1990) menemukan polisakarida dalam susu yang difermentasi oleh *S. thermophilus* kandungan utamanya adalah galaktosa.

### **c. EPS dalam pengolahan pangan**

Polisakarida digunakan sebagai bahan pengental, penstabil, pengemulsi, pembentuk gel, atau bahan pengikat air, dan kebanyakan polisakarida yang digunakan dalam industri makanan berasal dari tanaman. Kebanyakan dari polisakarida ini secara kimia ataupun enzimatik dimodifikasi untuk meningkatkan sifat rheologisnya, seperti selulosa, pati, pektin, alginat dan karagenan, dan penggunaannya sangat terbatas. EPS yang berasal dari mikroba mempunyai sifat rheologis yang unik, karena mampu mengentalkan larutan hanya dengan konsentrasi rendah. EPS yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat untuk makanan telah mendapat perhatian besar sebagai generasi baru pengental dalam makanan.

Di bidang industri pangan EPS diproduksi untuk menggantikan bahan penstabil dan pengental kimia, dikenal sebagai biopolimer dan bertanggung jawab terhadap karakteristik rheologis susu fermentasi, seperti kekentalan larutan, viskoelastisitas, dan sifat pembentuk gel.

Dekstran adalah polisakarida pertama yang diproduksi bakteri asam laktat dalam skala industri. Ditemukan pada tahun 1880 pada gula tebu atau gula bit, dimana dekstran mengentalkan dan membentuk gel dalam larutan sirup. Dekstran ada yang larut dan ada yang tidak larut dalam air, karena berbeda strukturnya, banyak digunakan pada industri konfeksioneris untuk memperbaiki ketahanan terhadap kelembaban, kekentalan dan menghambat terjadinya kristalisasi gula. Pada permen gum dan jeli, dekstran berfungsi sebagai pembentuk gel. Pada proses pembuatan es krim, dekstran menghambat terjadinya kristalisasi, dan aplikasinya di pudding akan melembutkan dan kekenyalan yang diinginkan.

Pada tahun 1993, van den Berg dkk., memilah bakteri asam laktat penghasil EPS, dan dari 600 strain bakteri asam laktat yang diteliti, ditemukan 30 strain yang menghasilkan EPS, salah satu diantaranya

adalah *Lactobacillus sake* 0-1 yang menghasilkan EPS dengan rendemen tinggi yaitu 1,4 g/L, yang sama kentalnya dengan gum xanthan yang dihasilkan oleh *Xanthomonas campestris*, suatu bakteri penyebab penyakit pada tanaman. Van Geel-Schutten dkk (1998) menyatakan, bahwa sukrosa merupakan media yang sangat tepat untuk meningkatkan EPS.

Jumlah dan kualitas EPS yang dihasilkan tergantung dari beberapa aspek berikut : (a) strain mikroba; (b) komposisi media pertumbuhan atau senyawa faktor pertumbuhan; (c) kondisi proses termasuk susu dan waktu fermentasi.

**d. EPS yang mengganggu pengolahan makanan**

Pada industri gula, dekstran dan levan bisa mengakibatkan inefisiensi sukrosa, karena kadar sukrosa berkurang karena digunakan oleh bakteri asam laktat pembentuk EPS, dan masalah dalam proses filtrasi. Pembentukan biofilm pada pemanas *heat-exchanger* bisa mengkontaminasi produk-produk olahan susu. Adesi bakteri termofil pada pemanas *heat-exchanger* bisa mencemari susu yang telah dipasteurisasi. Disamping itu, *Pediococcus* juga bisa mengakibatkan kerusakan pada produk-produk bir, anggur, cider dan daging.

**e. EPS dan manfaat kesehatan**

Diantara kriteria penting bagi bakteri probiotik adalah kemampuan melekat dan berkolonisasi pada mukosa usus manusia. Riset terhadap kemampuan adesi bakteri menunjukkan bahwa polisakarida kapsuler bisa membantu pelekatan bakteri terhadap permukaan biologis, sehingga memungkinkan terjadinya kolonisasi. EPS terbukti mengawali adhesi, dan sebagai senyawa pelekat permanen. Susu fermentasi yang mengandung bakteri penghasil EPS, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SBT 0495, dapat menurunkan serum kholseterol, meskipun mekanismenya belum diketahui.

*Lactobacillus helveticus* ssp. *jugurti* dilaporkan menghasilkan EPS yang bersifat antitumor terhadap Sarcoma-180 secara *in vivo* pada mencit, yaitu dapat memperpanjang umur mencit yang disuntik dengan EPS secara interaperitoneal.

Lendir yang dihasilkan oleh *Bifidobacterium adolescentis* memberikan efek positif terhadap sistem imun secara *in vivo*. Demikian juga lendir yang dihasilkan oleh *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* KVS20 bersifat anti tumor.

Bakteri asam laktat penghasil EPS juga lebih tahan terhadap

*bacteriophages* dibanding yang tidak bakteri asam laktat yang tidak berkapsul. Namun demikian, hal ini tidak berlaku pada *Lactococci* mesofil, dimana strain ini merupakan host dari berbagai fag, dan fag tertentu bahkan dapat dilarutkan bahan kapsuler.

Beberapa dari senyawa EPS mengandung gluk- dan frukto-oligosakarida dan bisa menghasilkan asam lemak rantai pendek setelah terhidrolisis dalam saluran usus oleh mikroflora dalam usus besar serta bisa memberikan efek positif bagi kesehatan (misalnya anti tumor, penurunan kolesterol, dan stimulasi sistem imun), dan manfaat nutrisi seabgai prebiotik bagi flora usus.

### 8. Metabolisme vitamin

Kultur starter susu fermentasi khususnya kultur starter yogurt menggunakan vitamin yang terkandung dalam susu, sebagai faktor pertumbuhannya. Yogurt yang disimpan pada suhu 4 °C, dilaporkan terjadinya penurunan kandungan vitamin B<sub>12</sub>, demikian juga penyimpanan yogurt pada suhu 5°C selama 16 hari terjadi penurunan asam folat, dan vitamin B<sub>12</sub> yang cukup berarti, demikian juga penurunan biotin, niasin dan asam pantothenat, yang merupakan akibat gabungan antara katabolisme mikrobial dan dekomposisi secara kimia selama penyimpanan dingin.

Vitamin-vitamin yang meningkat selama proses fermentasi yogurt adalah niasin dan asam folat, sebab secara aktif disintesis oleh kultur bakteri yogurt. Tabel 17 memperlihatkan pengaruh berbagai suhu pada sintesis vitamin selama fermentasi yogurt

Tabel 17. Pengaruh suhu pada sintesis vitamin selama fermentasi yogurt

Vitamin(µg/100g)	susu pasteurisasi + 2 % susu bubuk skim	Yogurt (diinkubasi 3 jam, °C)			
		37	40	42	45
Asam folat	0,371	3,736	4,042	4,317	3,928
Niasin	120	126	130	142	1,36

Sumber: Reddy, Shahani dan Kulkarni di dalam Tamime dan Robinson, 1989

Deeth dan Tamime (1981) menyimpulkan, bahwa kultur bakteri yogurt mensintesis niasin dan asam folat, dan juga vitamin B<sub>6</sub> selama fermentasi yogurt.

## IV. Berbagai Teknik Identifikasi Bakteri Asam Laktat

---

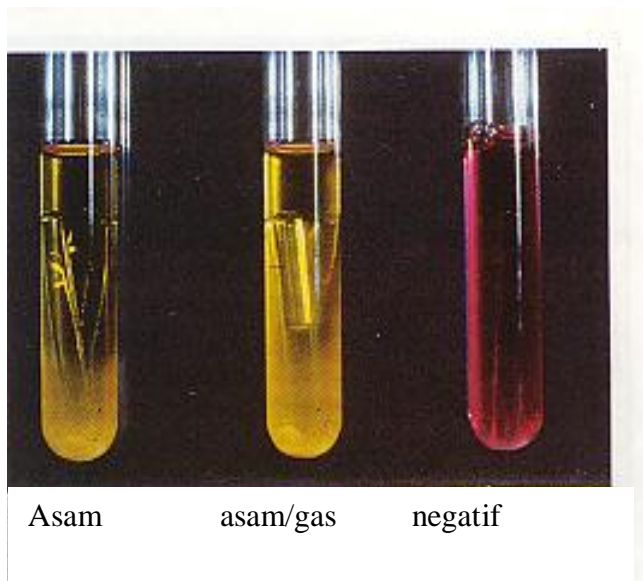
Kategori taksonomi bagi bakteri secara berurutan dimulai dari Kingdom, divisi, klas, order, family, tribe, genus, spesies dan subspecies. Meskipun spesies yang umumnya diberikan setelah nama genus merupakan bagian dari kesatuan taksonomi, tetapi strain mempunyai arti penting dalam aplikasi bakteri pada prakteknya. Hal ini berarti bahwa suatu strain bakteri secara biologis berbeda terhadap strain lain pada suatu spesies yang sama.

Metode taksonomi untuk identifikasi bakteri asam laktat berdasarkan sifat morfologi, yaitu bentuk sel, pewarnaan gram, uji katalase, dan fisiologi secara umum lainnya hanya mampu mengelompokkan sampai dengan taraf genus dan tidak dapat mengidentifikasi sampai tingkat spesies.

Teknik identifikasi konvensional bakteri dilakukan secara mikroskopis, dan sifat-sifat fermentative dan kemampuan biokimiawi bakteri. Kemampuan bakteri asam laktat dalam memfermentasi berbagai jenis karbohidrat menjadi andalan identifikasi secara konvensional, menunjukkan metabolisme bakteri asam laktat yang spesifik, disamping pembentukan gas dari glukosa, suhu optimum, maksimum dan minimum untuk pertumbuhan, terbentuknya isomer asam laktat, serta toleransinya terhadap kondisi keasaman (pH) dan toleransi terhadap garam yang merupakan implikasi dari kemampuan pada kondisi air bebas ( $a_w$ ) yang rendah.

Peralatan anaerobik seperti *laminar flow* khusus untuk kondisi anaerobic, atau tabung reaksi yang dipenuhi gas yang bebas oksigen, membantu menciptakan kondisi yang bebas oksigen, meskipun memerlukan peralatan logistik yang rumit.

Gambar 11 menunjukkan perubahan warna pada media cair yang mengandung karbohidrat tertentu, dan pembentukan gas pada media cair dengan menggunakan tabung Durham.



Gambar 11. Uji fermentasi karbohidrat dan pembentukan gas pada media cair

Penggunaan tes kit dalam identifikasi bakteri asam laktat juga bisa dilakukan. Suatu tes kit API CH 50 Bio Merieux, Perancis, yang terdiri dari 49 jenis karbohidrat dalam mikrotube, satu set dengan media yang mengandung indikator bromocresol purple steril dengan mudah dan teknik aseptis yang sederhana. Satu set mikrotube diinokulasi dengan suspensi bakteri dan ditambahkan media yang berwarna ungu, untuk kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Perubahan warna ungu menjadi jingga dan kuning, maka berarti positif terjadi fermentasi terhadap karbohidrat tersebut. Identifikasi bakteri asam laktat dibantu dengan program komputer dengan memasukkan data yang diperoleh. Hasil identifikasi dapat diketahui persentase ketepatannya.

Gambar 12 memperlihatkan dua tabung di samping tes kit dari 50 mikrotube, yang berisi media steril dan aquades steril untuk membuat suspensi bakteri asam laktat yang diambil menggunakan *cotton bud* steril, dengan swab koloni yang ditumbuhkan dalam media agar dalam cawan petri secara aseptis.

Mikrotube nomer satu tidak mengandung karbohidrat dan sebagai kontrol perubahan warna yang terjadi terhadap 49 mikrotube berisi 49 jenis karbohidrat yang diinokulasi dengan suspensi bakteri asam laktat.

Metode identifikasi dengan tes kit, relatif mudah, sederhana dan cepat,



namun ketepatannya masih dipertanyakan sampai taraf strain. Disamping itu, harga tes kit relatif mahal.



Gambar 12. Identifikasi bakteri asam laktat dengan tes kit API CH 50

Homologi atau kesamaan genetik antar strain yang kuat secara biologis berbeda masuk dalam kategori subspecies. Sedangkan suatu strain yang secara genetik berbeda tetapi secara biologis identik sementara disebut sebagai satu spesies, hingga perbedaan phenotip terbukti. Suatu strain masuk dalam satu spesies tertentu bila terbukti mempunyai 70% atau lebih kesamaan dengan tipe strain suatu spesies melalui hibridisasi DNA-DNA dan kesamaan biologis dengan tipe strain tersebut.

Parameter genetik meliputi sekuen basa rRNA, kadar G + C dan DNA-DNA homology dan lebih kuantitatif dan lebih jelas dibandingkan parameter konvensional yaitu parameter biologis atau fenotip.

Selanjutnya karakteristik fenotip seperti morfologi, sifat biokimiawi, komponen dan kandungan seluler membantu identifikasi ke taraf spesies.

Identifikasi bakteri asam laktat sampai taraf strain, memerlukan data pendukung sifat biokimiawinya dan tes data DNA-DNA hibridisasi. Akhir-akhir ini, sekuen (urutan) basa 16S rRNA (ribosomal RNA) digunakan sebagai tolok ukur yang berguna bagi identifikasi spesies bakteri.

Dengan adanya database 16S rRNA sebagai pembandingan sekuen 16S rRNA suatu bakteri untuk melihat hubungan secara genetik antar bakteri tersebut. 16S rRNA berisi wilayah sekuen basa nukleotida yang sangat dijaga dan dikenal sebagai wilayah V, berisi tanda grup filogenik dan bahkan spesies. Informasi taksonomik yang terkandung dalam gen 16S rRNA menjadi dasar metode analisis molekuler.

Identifikasi hingga taraf spesies yang tidak cukup dilakukan secara konvensional, bisa menggunakan pendekatan molekuler dengan mengetahui 16S rRNA sekuen basa dibandingkan dan dianalisis homology dengan sekuen basa dalam database di Data Bank DNA di Jepang. Tipe strain yang memperlihatkan homologi tertinggi dengan strain yang diuji disiapkan dan digunakan dalam tes hibridisasi DNA-DNA.

Hibridisasi DNA-DNA cukup berarti dalam menentukan proporsi grup bakteri spesifik terkandung dalam mikrobiota. Studi yang dilakukan di Perancis terhadap subyek 27 orang, ekstrak feses mengandung 37% kelompok *Bacteroides-Prevotella-Porphyrromonas*, 16% *Clostridium coccoides* dan 14% grup *Clostridium leptum*. Bifidobacteria, enterobacteria dan *Lactobacillus – Streptococcus – Enterococcus* masing-masing hanya 1% dari total mikrobiota tinja (Sghir dkk., 2000).

Identifikasi bakteri asam laktat menggunakan sekuen 16S atau 32S rRNA telah dilakukan terhadap *Lactococci* dan *Enterococci*, *Lactobacilli* dari berbagai habitat, *S. thermophilus*, bahkan untuk membedakan strain *Lactococcus lactis* pada taraf subsp antara *lactis* dan *cremoris*.

Gen *acm A*, suatu gen penyandi enzim N-asetilmuramidase yang bertanggung jawab terhadap hidrolisis peptidoglikan, dan menyebabkan pecahnya dinding sel atau sel lisis. Terjadinya lisis pada sel akan mengakibatkan aktivitas enzim peptidase yang memecah protein sehingga membantu proses pematangan (aging) pada proses pembuatan keju. Hasil amplifikasi gen *acm*, menunjukkan bahwa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* memberikan nilai amplifikasi sebesar 1131 bp, sehingga hasil amplifikasi 16S rRNA dan gen *acm* dengan PCR mampu mengidentifikasi bakteri asam laktat hingga taraf strain secara cepat, tepat dan akurat.

Uji sekuen RNA dilakukan dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk amplifikasi sekuen rRNA strain yang diuji, untuk kemudian dilihat urutan atau sekuen basa nitrogennya dengan gel elektroforesis, dan dibandingkan dengan sekuen basa nitrogen dari standar bakteri yang sudah jelas diketahui genus dan spesiesnya.

Pendekatan molekuler ini dikenal sebagai Randomly Amplified

Polymorphic DNA yaitu membandingkan pola elektroforetik PCR dari DNA bakteri yang diamplifikasi dengan random primer. Uji ini banyak dilakukan pada mikrobiologi klinis.

Penanda DNA ditujukan pada target asam nukleat dari sel bakteri. Manfaat dari teknik ini adalah sekali penanda telah didisain, pekerjaan yang melelahkan dan memakan waktu untuk mempersiapkan DNA tidak diperlukan lagi. Cukup menguji koloni-koloni pada media agar secara langsung dengan metode hibridasi yang umum pada koloni. Namun demikian, penanda spesifik hanya dapat mendeteksi satu spesies atau strain spesifik saja. Jadi teknik penanda harus dibarengi dengan kriteria dan metode identifikasi lainnya untuk mempersempit pendugaan strain. Teknik penandaan ini mungkin hanya cocok untuk menjawab pertanyaan seperti berapa spesies bakteri yang ada dalam suatu sampel.

Hal penting dalam penanda DNA adalah dalam menemukan satu untai DNA atau RNA yang spesifik untuk satu spesies. Ada dua pendekatan yang bisa dilakukan, yaitu metode empiris berdasarkan *trial and error*. Suatu database DNA dari spesies tertentu dipilah terhadap potongan DNA yang apabila diuji sebagai penanda menunjukkan kekhasan spesies tersebut. Metoda ini telah dilakukan terhadap penanda dari *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii* dan *Lactobacillus helveticus*.

Metoda lainnya yaitu dimulai dari sekuen asam nukleat yang diketahui melalui sekuen penanda oligonukleotida. Asam nukleat yang dipilih adalah rRNA, yaitu 16S dan 23S rRNA, mengandung sekuen yang jelas. Jadi, penanda dapat didisain untuk berbagai level grup filogenetik, dari Kingdom sampai spesies. Manfaat lain dari rRNA adalah molekul ini tersedia dalam beberapa copy hingga  $10^4$  dalam tiap sel, sehingga metoda yang menggunakan rRNA lebih sensitive dan *reproducible* (akurat) ketimbang DNA dari plasmid atau khromosom yang digunakan sebagai penanda yang dikenal sebagai *ribotyping*.

Metode molekuler menggunakan Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) atau ribotyping menggunakan copy rRNA dalam khromosom. Bakteri secara khas mempunyai 5 – 7 copy dari tiap gen rRNA dalam khromosom. DNA khromosom suatu strain yang dipecah oleh enzim restriksi dipisahkan dalam gel agarose menggunakan gel elektroforesis, dan dihibridisasi, sehingga diperoleh fingerprint dan dapat dianalisis secara manual atau dengan teknik komputer. Metode ini terbukti berguna bagi pengenalan spesies dan subspecies *Lactococci* dan *Lactobacillus plantarum*.

Beragam dan sejumlah besar bakteri hidup dalam saluran usus manusia. Keseimbangan bakteri dalam saluran usus berkaitan erat dengan kondisi kesehatan seseorang. Untuk memahami mikrobiota saluran usus dengan menggunakan metoda tradisional membutuhkan teknik kutlur yang kompleks, waktu yang panjang serta sangat melelahkan. Itulah sebabnya digunakan metode yang tidak tergantung pada penumbuhan bakteri, yaitu metode pendekatan molekuler, hibridisasi 16S rRNA probe, metoda PCR, dan temperatur gradien gel elektroforesis (TGGE).

Suatu alternatif metode pendekatan molekuler yaitu Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP), bisa digunakan untuk menganalisis keragaman komunitas bakteri yang kompleks dalam berbagai ekosistem, seperti oral bakteri dalam air liur, dan fekal mikrobiota. Sakamoto dkk (2002) melaporkan analisis kompleks Bifidobacterium dalam feses orang sehat, dan terbukti metode T-RFLP sangat cepat dan sensitif.

Tannock dkk (2000) juga melaporkan penggunaan PCR-DGGE untuk memonitor perubahan komunitas Bifidobacterium dalam feses setelah pemberian galaktooligosakarida dan bakteri probiotik *Bifidobacterium lactis* Bb-12.

## V. Susu Fermentasi

---

Berbagai jenis makanan fermentasi baik tradisional maupun modern melibatkan bakteri asam laktat. Secara umum, makanan fermentasi lebih awet dari bentuk segarnya karena kondisi asam tidak disukai oleh bakteri kontaminan. Disamping itu, makanan fermentasi citarasanya lebih enak dibanding bentuk segarnya, dan nilai gizinya lebih tinggi, karena umumnya lebih mudah dicerna karena telah mengalami penguraian selama proses fermentasi dan terbentuk molekul-molekul yang lebih sederhana dan lebih mudah dicerna.

Meskipun bakteri asam laktat dijumpai dalam fermentasi buah, sayur, ikan, daging dan produk-produk susu serta saluran pencernaan, namun perhatian para peneliti terhadap sifat probiotiknya lebih difokuskan pada bakteri asam laktat yang berasal dari saluran pencernaan, khususnya manusia.

Produk makanan fermentasi yang melibatkan bakteri asam laktat dikelompokkan menjadi dua yaitu produk fermentasi susu dan produk fermentasi non-susu. Dalam buku ini akan dibahas produk fermentasi susu, khususnya berbagai jenis susu fermentasi.

Asal mula susu fermentasi masih belum jelas. Namun demikian, ketika kambing mulai dipelihara di Mesopotamia sekitar 5000 tahun Sebelum Masehi, bangsa nomad atau yang suka berpindah tempat menyimpan susu hangat dalam kantung kulit hewan pada suhu udara yang panas yang memungkinkan terjadinya pembentukan curd secara spontan dan alami. Jadi bisa dikatakan, pada saat pola hidup manusia berubah dari pengumpul makanan menjadi produser makanan (Pederson, 1979).

Susu fermentasi bisa jadi berasal dari Timur Tengah. Sejak zaman nabi Ibrahim, proses fermentasi susu sudah dikenal, sebagaimana disebut pada Kitab Kejadian 18 : 8, yang menyebutkan susu asam sebagai makanan yang disuguhkan kepada tamu. Namun, popularitas susu fermentasi dan yogurt di berbagai negara baru mulai sekitar kurang dari setengah abad yang lalu, setelah seminar IDF di Paris tahun 1963.

Selain yogurt, banyak sekali jenis susu fermentasi yang dibuat diberbagai tempat di dunia, dan di seluruh dunia terdapat sekitar 400 nama yang digunakan untuk produk susu fermentasi baik yang diproduksi secara

tradisional maupun dalam skala industri.

Secara umum, jenis susu fermentasi dibedakan berdasarkan metoda fermentasi atau prosesnya, yang terkait dengan mikroba yang terlibat di dalamnya. Tiap jenis susu fermentasi melibatkan mikroba spesifik. Namun demikian, terdapat kesamaan yang kuat dalam teknologi produksi yang digunakannya.

Fermentasi susu secara umum melibatkan metabolisme laktosa, disakarida dalam susu menjadi asam laktat, oleh bakteri asam laktat terutama *Lactococci* dan *Lactobacilli* menjadi asam laktat oleh bakteri asam laktat. Untuk menghasilkan susu fermentasi yang baik, perlu diperhatikan hal-hal sebagai berikut : susu segar bermutu tinggi, rendah kandungan bakterinya, dipasteurisasi dengan tepat, menggunakan kultur starter yang aktif dan tepat, pendinginan yang cepat dan sanitasi proses yang baik. Seleksi kultur starter, dan kondisi fermentasi memegang peranan penting dalam proses fermentasi susu.

Perubahan komposisi kimia susu fermentasi meliputi produksi asam laktat dari laktosa, produksi peptida dan asam amino dari protein dan produksi asam lemak dari lemak, seperti dapat dilihat pada Tabel 18.

Kultur starter tersedia secara komersial dalam kondisi daya hidup atau viabilitas dan aktivitas prima. Penanganan kultur starter yang tepat, dan ditambahkan ke dalam susu yang bermutu, dibarengi dengan teknologi produksi yang tepat akan menghasilkan produk susu fermentasi yang stabil. Saat ini standar proses baku bagi kebanyakan jenis susu fermentasi dengan mudah dapat diperoleh.

Tabel 18. Perubahan komposisi susu setelah fermentasi

Sebelum fermentasi	Setelah fermentasi	
	Berkurang	Bertambah
Laktosa	laktosa	asam organik (suksinat, fumarat, benzoat, dll) asam laktat galaktosa, glukosa polisakarida
Protein	Protein	peptida asam amino bebas ammonia
Urea	urea	volatil dan asam lemak bebas rantai panjang
Lemak	lemak	vitamin (asam folat, niasin, B <sub>6</sub> )
Vitamin	B <sub>12</sub> , C, biotin, cholin dll) asam organik (piruvat, dll)	asam nukleat (CMP, AMP, UMP, GMP, NAD) senyawa flavor (asetaldehida, setoin, diasetil) enzim ( $\beta$ -galaktosidase, proteinase, peptidase, laktat dehidrogenase) komponen sel bakteri (asam nukleat, lipid, karbohidrat, protein dll)

Sumber : Yukuchi dkk, 1992. Di dalam Nakazawa dan Hosono, 1992

### A. Pola konsumsi susu fermentasi

Produksi dan konsumsi yogurt di Timur Tengah, Balkan, India, Eropa Timur, dan suku bangsa yang hidup diberbagai bagian tempat di dunia. Namun demikian, perilaku konsumen terhadap konsumsi yogurt dan susu fermentasi lainnya telah berubah, kemungkinan karena alasan-alasan berikut : a) adanya lemari es; b) adanya ‘generasi baru’ yogurt, yaitu adanya buah-buahan dan gula sirup menjadikan produk memberikan citra segar dan menjadi makanan jajanan yang tidak mahal; c) penambahan probiotik bakteri ke dalam produk yogurt dan susu fermentasi telah meningkatkan manfaat kesehatan dari susu fermentasi.

Sampai awal tahun 1990 an, susu fermentasi diklasifikasikan sebagai buttermilk, yogurt dan lainnya, menurut data statistik yang dipublikasi oleh International Dairy Federation. Susu fermentasi yang masuk dalam kelompok fermentasi laktat (tipe mesofilik) banyak dikonsumsi di negara-negara Eropa Utara, sementara susu fermentasi laktat dan khamir populer di negara-negara Federasi Rusia, negara-negara Eropa Timur dan Mongolia. Sedangkan yogurt natural terkenal di negara-negara antara Balkan dan India sub kontinental, dan yogurt yang ditambahkan rasa buah disukai di seluruh dunia.

Hanya sedikit data tersedia bagi produksi susu fermentasi probiotik, tetapi selama satu dekade terakhir terjadi peningkatan yang dramatis pada berbagai negara. Di Perancis, pasar susu fermentasi yang mengandung *Bifidobacterium spp.* dan *Lactobacillus acidophilus* meningkat dari 1.500 menjadi 91.000 ton antara tahun 1986 sampai 1990 (Renard, 1998).

Tabel 19 memperlihatkan perkembangan pasar di beberapa negara antara tahun 1970 sampai 1999.

Tabel 19. Konsumsi per tahun per orang (kg/kapita) susu dan susu fermentasi

Negara	1975	1980	1990	1999
Australia	1	1,8	3,5	5,8
Austria	7,9	9,8	10,4	15,1
Belgium	11,8	7,7	8,4	20,3
Canada	5,1	2,3	3,7	4,2
Chili	TD <sup>a</sup>	1,4	3,9	6,7
Czech/Slovakia	3,9	7,3	TD <sup>a</sup>	20,0
Denmark	36,1	26,7	21,6	29,8
Federasi Jerman	16,5	10,1	14,2 <sup>b</sup>	25,5 <sup>b</sup>
Finland	32,6	41,0	38,3	TD <sup>a</sup>
Perancis	9,6	9,3	16,4	27,4
Islandia	1,7	5,7	24,6	TD <sup>a</sup>
Israel	14,1	14,3	TD <sup>a</sup>	29,3
Italia	TD <sup>a</sup>	1,3	4,0	TD <sup>a</sup>
Jepang	2,5	2,4	7,8	TD <sup>a</sup>
Belanda	24,7	27,3	32,5	TD <sup>a</sup>
Norwegia	9,8	10,1	14,9	19,9
Polandia	3,2	2,0	TD <sup>a</sup>	7,9
Spanyol	3,4	6,0	8,0	15,4
Swedia	24,1	23,5	29,1	30,2
Swiss	16,4	14,8	19,0	TD <sup>a</sup>
Inggris Raya	1,7	2,8	4,4	TD <sup>a</sup>
Amerika	9,9	3,1	3,5 <sup>c</sup>	TD <sup>a</sup>

<sup>a</sup>TD : tidak dilaporkan

<sup>b</sup>Data mencakup Republik Demokrasi Jerman

<sup>c</sup>Data tahun 1993

Sumber : gabungan dari Tamime dan Robinson (1999) dan IDF (2000)

## B. Jenis susu fermentasi

Fermentasi bakteri asam laktat hanya melibatkan bakteri asam laktat, baik merupakan kultur tunggal maupun campuran yang mesofil maupun termofil. Susu asidofilus, yakult, dan yogurt melibatkan starter termofil,



sedangkan dadih dan dahi melibatkan starter mesofil (Tabel 20).

Tabel 20. Kultur starter utama dalam fermentasi susu

Mesofil	Termofil
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
subsp. <i>lactis</i>	subsp. <i>bulgaricus</i>
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
biovar <i>diacetylactis</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	subsp. <i>paracasei</i>
<i>Leuconostoc sp.</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>

Fermentasi bakteri asam laktat dan khamir, tidak hanya melibatkan bakteri bakteri asam laktat, tetapi juga khamir yang bertanggung jawab terhadap pembentukan alkohol. Produknya yang dikenal di Asia berupa koumiss, sanyuu, Calpis dan kefir.

Kandungan alkohol pada kefir berkisar antara 0,5 – 1,0 persen, dan memberikan rasa *effervescent* dan citarasa yang khas. Sedangkan pada koumiss, berkisar antara 0,7 – 2,5 persen alkohol, tergantung dari jenis koumiss yang dihasilkan.

Berbagai jenis susu fermentasi terdapat di seluruh dunia, kira-kira sekitar 400 nama diberikan baik kepada susu fermentasi tradisional maupun modern. Secara umum berbagai jenis susu fermentasi ini dikelompokkan berdasarkan metode fermentasi/proses produksinya, terutama berdasarkan jenis mikroba yang terlibat dalam fermentasi.

Produk susu fermentasi dikelompokkan menjadi tiga, yaitu (1) produk fermentasi bakteri asam laktat yang melibatkan starter mesofil atau termofil, dan (2) produk fermentasi yang diperoleh melalui fermentasi asam laktat dan alkohol, dalam hal ini melibatkan bakteri laktat dan khamir, dan (3) produk disamping jenis (1) dan ke (2), yaitu adanya pertumbuhan kapang.

Dasar penentu identitas bagi tiap jenis susu fermentasi merupakan gabungan dari mikroba spesifik yang terlibat dan kondisi lingkungan selama proses fermentasi. Metabolisme yang terjadi pada suatu spesies atau strain berperan penting dalam penyediaan senyawa metabolit yang berkaitan erat dengan kelangsungan reaksi-reaksi kimia yang kompleks, menghasilkan tekstur, citarasa dan berkontribusi terhadap mutu sensoris susu fermentasi.

Seleksi spesies maupun strain secara cermat adalah penting agar dapat digunakan sebagai kultur starter dan dapat menjaga identitas setiap jenis produk susu fermentasi.

### **C. Fermentasi laktat pada susu**

Ada dua tipe fermentasi laktat berdasarkan suhu inkubasi proses fermentasi susu yang melibatkan bakteri asam laktat, yaitu fermentasi mesofil yang melibatkan starter mesofil, dan fermentasi termofil yang melibatkan starter termofil.

Produk susu fermentasi laktat seperti buttermilk, cultured cream, “lactofil”, “filmjolk”, susu berlendir asal Norwegia, “Ymer”, “Shrikhand”, dan “Chakka” adalah jenis-jenis produk yang diperoleh melalui fermentasi mesofil, sedangkan fermentasi yogurt, “laban”, “zabady”, “labneh”, “skyr”, “yakult”, susu asam asidofilus, dan buttermilk Bulgaria melibatkan bakteri asam laktat termofil.

#### **1. Fermentasi mesofil**

Fermentasi mesofil melibatkan kultur starter mesofil, yang tumbuh pada kisaran suhu 10 – 40 °C, dengan suhu optimum sekitar 30 °C, yang mencakup *Streptococci* dan *Leuconostoc*. Karakteristik penting susu fermentasi mesofil adalah konsistensinya yang merupakan penggumpalan protein susu dengan terbentuknya asam laktat, dan aroma dan flavour yang dihasilkan oleh fermentasi sitrat dan laktosa.

Produksi asam laktat oleh *Streptococcus* dan *Lactococcus* berkisar antara 0,5–0,7%, dan *Leuconostoc* menghasilkan asam laktat sekitar 0,1 – 0,2%. Keasaman susu fermentasi yang melibatkan starter mesofil adalah pada pH 4,3 – 4,5.

##### **a. Cultured buttermilk dan Cultured cream**

Kedua produk susu fermentasi ini tingkat keasamannya rendah, dan melibatkan bakteri *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* dan *Lc. lactis* subsp. *lactis* untuk pembentukan asam, sedangkan *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* dan *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* yang bertanggung jawab terhadap pembentukan citarasa dan aroma. Senyawa diasetil, suatu senyawa volatil dihasilkan dan memberikan aroma khas mentega. Suhu fermentasi optimum adalah 22 °C, agar dihasilkan produk yang memberikan citarasa yang khas (Tabel 23).

Apabila fermentasi susu skim pasteurisasi dilakukan pada suhu yang lebih tinggi akan mengakibatkan pertumbuhan *Lactococcus*

*lactis* subsp. *lactis* yang lebih dominan, sehingga produksi asam menjadi berlebihan dan mengurangi produksi aroma oleh *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* pada produk cultured buttermilk.

Buttermilk merupakan produk susu fermentasi yang paling terkenal di Jerman dan negara-negara Skandinavia. Sedangkan produk yang dikenal sebagai *cultured cream* atau krim asam, adalah susu fermentasi yang sangat kental dengan aroma dan citarasa seperti buttermilk.

#### **b. Susu Fermentasi Skandinavia**

Jenis produk susu fermentasi yang banyak dijumpai di Skandinavia mempunyai ciri khas yang unik, yaitu sangat kental dan berlendir, karena melibatkan *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* suatu *Lactococcus* yang membentuk kapsul.

Apabila disendok, akan terlihat seperti benang-benang panjang yang terjurai. Lendir yang dihasilkan ini akibat terbentuknya EPS. Di Sweden dikenal sebagai “langfil” atau “tattmjolk”, rasa asamnya lembut, dan kental. Sedangkan di Norwegia dikenal sebagai “tettetmelk”. “Ymer” yang diproduksi di Denmark dan “lactofil” dari Swedia setelah proses fermentasi dipisahkan dengan menyingkirkan whey, dan fermentasi dilakukan melibatkan kultur starter yang tidak menghasilkan lendir.

### **2. Fermentasi termofil**

#### **a. Yogurt**

Yogurt mempunyai rasa asam yang sedang, dengan konsistensi lembut dari gel kental dengan citarasa almon. Bakteri yogurt, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*, secara alami terdapat dalam susu atau sengaja ditambahkan sebagai kultur starter sebanyak 2–5%, dengan perbandingan 1 : 1. Suhu fermentasi optimum adalah 42 – 45 °C selama 3 - 6 jam, hingga dicapai pH 4,4 dan kadar asam tertitrasi mencapai 0,9 – 1,2 %.

Citarasa yang enak adalah hasil kerjasama protokooperasi antara kedua bakteri yogurt, yang dipengaruhi oleh suhu inkubasi dan asam yang dihasilkan. Senyawa-senyawa volatile dalam jumlah kecil termasuk asam asetat, diasetil dan asetaldehida dihasilkan oleh *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* membentuk citarasa khas yogurt.

Yogurt dan produk serupa yogurt banyak diproduksi di daerah Mediterania, Asia, Afrika dan Eropa Tengah.

**b. Buttermilk Bulgarian**

Buttermilk Bulgarian merupakan produk fermentasi susu yang sangat asam, melibatkan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* saja, yaitu 2% kultur starter diinokulasi pada susu full cream yang dipasteurisasi pada suhu 38 – 42 °C selama 10–12 jam sampai terbentuk gumpalan dengan total asam tertitrasi sebesar 1,4%, sehingga citarasa asamnya sangat tajam. Produk ini hanya dikenal di Bulgaria.

**c. Susu asam asidofilus**

Produk susu non fermentasi yang dikenal sebagai “sweet acidophilus milk” diperkenalkan di Amerika pada tahun 1970an. Citarasanya sama dengan susu biasa, karena hanya sedikit membentuk asam pada suhu lemari es. Susu asam asidofilus dibuat dengan menggunakan kultur starter tunggal *Lactobacillus acidophilus*, strain yang berasal dari saluran usus. Namun demikian pertumbuhannya pada susu lambat, hanya meningkat 5 kali dalam 18 – 24 jam dengan keasaman di bawah 0,8% (Marshall dkk, 1982, Marshall, 1986).

Pada saat susu asidofilus pertama kali diperkenalkan di pasaran negara-negara Barat, produk ini tidak terlalu diterima oleh konsumen, karena citarasanya yang kurang disukai. Dengan mencampurkan *Lactobacillus acidophilus* dengan kultur starter susu fermentasi lainnya, penerimaan konsumen dan pangsa pasar menjadi meningkat.

Susu asidofilus menggunakan kultur starter *Lactobacillus acidophilus* yang fungsi utamanya adalah menghasilkan asam laktat dari laktosa. Bakteri ini diperhitungkan sebagai bakteri probiotik (akan dibahas pada bab tersendiri), dan telah diklaim memberikan berbagai manfaat nutrisi dan kesehatan bagi konsumen. Kemampuannya bertahan terhadap kondisi asam dan garam empedu mengakibatkan bakteri ini bisa bertahan dalam saluran usus.

Produk susu asidofilus harus mengandung  $5 \times 10^8$  koloni/ml *L. acidophilus* pada saat dikonsumsi (sekitar 14 – 21 hari setelah diproduksi), sehingga harus dijaga suhu penyimpanan tidak lebih dari 5 °C selama distribusi dan penjualan.

Stabilitas *L. acidophilus* dalam susu asidofilus bisa dicapai

diantaranya dengan : (1) penambahan ekstrak khamir ke dalam susu untuk meningkatkan pertumbuhan *L. acidophilus* (Alm, 1981); (2) fortifikasi protein susu dengan pekatan susu skim (Alm, 1983), dan (3) penggunaan inokulum campuran kultur starter yogurt dan *L. acidophilus* untuk menstabilkan jumlah sel dan memperbaiki citarasa. Keasaman harus dimonitor karena bakteri asam laktat yang satu ini tidak tahan asam, agar bisa bertahan selama 14 hari.

#### **d. Yakult**

Setelah Restorasi Meiji (1868) di Jepang, produk olahan susu semakin dikenal dan diterima serta dihargai sebagai makanan khusus untuk mengatasi berbagai jenis penyakit, sebab saat itu merupakan periode dimana rakyat Jepang menderita kekurangan gizi kronis dan menderita penyakit infeksi, khususnya infeksi saluran usus seperti disentri dan colitis.

Pada saat itu, Minoru Shirota sangat menaruh perhatian terhadap peranan mikroba penduduk asli saluran usus dalam menjaga daya tahan tubuh, termasuk kompetisinya dengan bakteri patogen. Tahun 1929, Dr. Minoru Shirota dari Universitas Kyoto berhasil mengisolasi dan menumbuhkan *Lb. casei* strain Shirota, dan di tahun 1935 dikembangkan minuman susu fermentasi yang diberi nama yakult (Akuzawa dan Surono, 2002). Yakult berasal dari bahasa Esperanto “yohurto” yang berarti susu asam, dikenal di Jepang berdasarkan sifatnya yang menjaga kesehatan.

Difermentasi dengan *Lactobacillus casei* Shirota strain, suatu bakteri asam laktat yang tetap bertahan hidup dalam saluran pencernaan manusia, dikenal sebagai bakteri probiotik. Waktu fermentasi yakult adalah selama 7 hari pada suhu 37°C, dalam kondisi yang sangat higienis. Yakult adalah minuman susu fermentasi berbentuk cair, dengan penambahan 14% gula. Yakult diproduksi dengan menggunakan kultur starter tunggal yang merupakan bakteri probiotik, dan bakteri hidup yang terkandung pada produk akhir adalah  $10^8$  koloni/ml (Kurmann dkk., 1992).

Bahan baku susu dipanaskan pada suhu yang sangat tinggi dengan proses UHT (140°C selama 3-4 detik) bersama-sama dengan gula yang ditambahkan sehingga warnanya menjadi agak coklat akibat terjadinya reaksi Maillard. Menurut Tamime dan Robinson (1988), komposisi kimia dalam 100 ml yakult adalah 3,1% lemak, 3,1% protein, 4,5% laktosa, 6,1% gula dan kadar abu 0,7%.

#### e. Susu fermentasi probiotik

Susu fermentasi probiotik diproduksi dengan melibatkan bakteri probiotik, yaitu bakteri asam laktat maupun Bifidobakteria yang bersifat probiotik, diantaranya adalah *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus GG* dan *Bifidobacterium sp.* Kedua bakteri yogurt, yaitu *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* tidak bisa mencapai usus dalam keadaan hidup, namun keduanya membantu memperbaiki pemanfaatan laktosa pada orang yang intoleran terhadap laktosa.

Berbagai produk susu fermentasi yang melibatkan bakteri probiotik semakin banyak dipasarkan pada sepuluh puluh tahun terakhir ini, dan biasanya menggunakan lebih dari satu jenis mikroba, meskipun produk yang diproses dengan kultur tunggal seperti yakult juga dapat dijumpai di pasaran.

Gefilac atau Gelifus di Finlandia adalah susu fermentasi yang mengandung strain bakteri asam laktat yang berasal dari manusia, yaitu *Lactobacillus rhamnosus GG* (singkatan dari dua peneliti Gorbach dan Goldin). Semula dikenal sebagai *Lactobacillus parcasei* subsp. *parcasei* (Dong, dkk, 1987), namun sekarang diidentifikasi sebagai *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (Meurman dkk, 1994). Menurut Kahala dkk (1993), kultur starter Gefilus terdiri dari tiga strain *Lactococcus sp.*, *Leu mesenteroides* subsp. *cremoris* dan *Lactobacillus GG*.

Susu fermentasi yang mengandung Enterococci dikenal sebagai Gaio telah dipasarkan di Denmark dan beberapa negara-negara Eropa. Kultur bakterinya disebut Causido yang terdiri dari *Enterococcus faecium* yang berasal dari manusia, dan dua strain *S. thermophilus* dengan jumlah bakteri hidup adalah  $2 \times 10^8$  koloni/ml dan  $7 \times 10^8$  koloni/ml masing-masing untuk *Enterococcus faecium* dan *S. thermophilus* (Holund, 1993; Hougaard, 1994). Uji klinis efek positif penurunan kolesterol dari Gaio pada orang sehat setengah baya di Denmark dilaporkan oleh Agerbaek dkk (1995).

Di Jerman, dikenal Bifighurt, Bioghurt, Biogarde, sedangkan produk yang dikenal sebagai Cultura dari Denmark diproses dengan *Bifidobacterium bifidum* dan *Lactobacillus acidophilus*. Seringkali susu fermentasi yang beredar pada berbagai tempat mencerminkan tradisi setempat pada memproduksi susu fermentasi.

## **D. Fermentasi laktat dan khamir pada susu**

### **1. Kefir**

Kefir berasal dari pegunungan Kaukasian sebelah Utara atau sebelah Timur Laut Mongolia, telah diproduksi ratusan tahun dalam skala rumah tangga secara tradisional dalam kantung kulit, atau dalam tembikar, terbuat dari susu sapi atau susu kambing. Susu fermentasi ini diproduksi di negara-negara Rusia, dan hanya sedikit diproduksi di negara-negara Eropa.

Menurut Standar Identitas no 149 A : 1997 dari International Dairy Federation (IDF), mikroflora butir-butir kefir (*kefir grains*) berisi berbagai spesies bakteri asam laktat dan khamir. Produksi kefir unik, yaitu melibatkan campuran fermentasi asam laktat dan alkohol pada laktosa.

Bakteri asam laktat dan khamir bekerjasama secara mutualisme, yaitu saling menguntungkan, dimana asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri asam laktat lebih lanjut, akan dimanfaatkan oleh khamir, dan  $H_2O_2$  yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat akan disingkirkan oleh katalase yang dihasilkan oleh khamir. Selanjutnya khamir akan menghasilkan senyawa yang menstimulir pertumbuhan bakteri asam laktat.

Kefir grain (Gambar 13) warnanya putih atau kekuningan, dan konsistensinya elastis, diameternya 1 - 6 mm, namun demikian, saat kefir grain dipanen dari susu dan dicuci dengan air, diameternya menjadi 0,5 - 3,5 cm, bentuknya tidak beraturan berlekuk-lekuk, menyerupai sayuran kembang kol (*cauliflower*), elastis, berwarna krem atau kuning gading setelah dicuci dan dikeringkan. Setelah dicuci dalam air dan disimpan dalam larutan garam tahan disimpan hingga satu bulan pada suhu dingin.

Kefir grain kadar airnya 85-90%, berat keringnya 57% karbohidrat, 33% protein, 4% lemak dan 6% abu, merupakan sejumlah 30 spesies bakteri dan khamir, dan didominasi oleh bakteri asam laktat homofermentatif. Kandungan utamanya kefiran, suatu polisakarida kapsular dihasilkan oleh *Lactobacillus kefiranofaciens*, suatu polisakarida bercabang yang terdiri dari glukosa dan galaktosa dalam jumlah yang sama. Dalam larutan, kefiran hanya sedikit meningkatkan kekentalan larutan.

Kefir adalah susu fermentasi asam, minuman susu yang terkarbonasi melalui proses fermentasi dan beralkohol, konsistensi seperti krim asam dengan citarasa yang enak. Minuman fermentasi yang berbuih dan mengandung gas ini mengandung 0,9-1,1% asam laktat dan 0,3 - 1,0%

alkohol dan sangat terkenal di Eropa Timur, namun distribusinya sangat terbatas, karena harus disimpan pada suhu rendah, agar khamir tidak menghasilkan alkohol dan gas CO<sub>2</sub> selama penyimpanan.

Suhu inkubasi selama proses fermentasi kefir adalah 18 – 22 °C, dan setelah 20 jam akan dihasilkan kefir yang mengandung 0,8% etanol dan 1,0 % CO<sub>2</sub>. Setelah selesai proses fermentasi produk kefir didiamkan selama beberapa jam agar konsistensi dan stabilitas koagulumnya meningkat.



Gambar 13. Kefir grains

Kefir menghasilkan senyawa eksopolisakarida yang disebut sebagai kefiran, yaitu suatu polisakarida yang terdiri dari glukosa : galaktosa = 1 : 1, dengan ukuran molekul 1000~4000 kDa., berfungsi sebagai pengental dan emulsifier makanan, sebagai pelembab untuk kosmetik, dan dapat menstimulir sistem imun dan anti tumor. Kefiran mencakup kapsular dan senyawa ekstraseluler.

Kefir grain kering mengandung 45 % kefiran, yang diproduksi di pusat grain oleh bakteri homofermentatif. Kandungan utamanya protein yang tidak larut dalam air dan mukopolisakarida netral. Kefir grain dalam bentuk kering beku (*freeze dried*) dengan kadar air 3,5 %, terdiri dari 4,4 % lemak, 12,1 % abu, 45,7 % mukopolisakarida, total protein 34,3 %



yang berupa protein tidak larut dalam air 27,0%, protein larut air sebanyak 1.6% dan asam amino bebas 5,6%, serta sejumlah kecil senyawa yang tidak diketahui.

Kefir grain apabila dikeringkan dengan diangin-anginkan, tahan disimpan selama 12 sampai 18 bulan, sehingga memungkinkan produksi kefir menyebar ke seluruh dunia. Saat ini, kefir diproduksi oleh industri olahan susu di beberapa negara di Eropa Tengah dan Timur, Skandinavia dan Asia.

Berbagai spesies mikroba telah diisolasi dan diidentifikasi dalam kefir grain, yang merupakan 4 kelompok genus, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Acetobacter* dan Khamir (Tabel 21). Mikroba dan khamir hidup secara simbiosis, yaitu bertahan dan memperbanyak diri dengan memanfaatkan produk samping atau senyawa metabolitnya sebagai sumber energi untuk pertumbuhannya (Macrae dkk., 1993). Menurut Molska dkk (1980), mikroflora yang terdapat dalam kefir grain terdiri dari Bacilli baik sel tunggal, berpasangan maupun rantai sebanyak 66 % (62-69%), *Streptococcus* yang berpasangan maupun rantai, 16 % (11-18%), dan Khamir sel tunggal 18 % (16-20%).

Tabel 21. Empat Genus berbagai mikroflora dalam kefir grain

<b>Lactobacilli</b>	<b>Streptococci/Lactococci)</b>	<b>Acetobacter</b>	<b>Khamir</b>
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lactococci lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Candida kefir</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>Lc. lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>	<i>A. rasens</i>	<i>C. pseudotropicalis</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>		<i>C. racens</i>
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	<i>Streptococci</i> <i>thermophilus</i>		<i>C. tenuis</i>
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>pseudoplatantum</i>	<i>S. lactis</i>		<i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>Enterococcus</i> <i>durans</i>		<i>Kluyveromyces marxianus</i> var <i>marxianus</i>
<i>Lb. cellobiosus</i>	<i>Leuconostoc</i> <i>cremoris</i>		<i>K. bulgaricus</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Leu. mesenteroides</i>		<i>K. fragilis/marxianus</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>			<i>Saccharomyces</i> subsp. <i>Tloopsis</i> <i>holmii</i>
<i>Lb. fructivorans</i>			<i>Saccharomyces lactis</i>
<i>Lb. helveticus</i> subsp. <i>lactis</i>			<i>S. carlsbergensis</i>
<i>Lb. hilgardii</i>			<i>S. unisporus</i>
<i>Lb. kefir</i>			<i>Debaryomyces</i> <i>hansenii</i> **
<i>Lb. kefiranoferiens</i>			<i>Zygosaccharomyces</i> <i>e rouxii</i> **
<i>Lb. kefirgranum</i> sp. <i>nov*</i>			
<i>Lb. parakefir</i> sp. <i>nov*</i>			
<i>Lb. lactis</i>			
<i>Lb. plantarum</i>			

Sumber : Macrae, R., Robinson, R.K., and Sadler, M.J. (1993).

\*International Journal of Systematic Bacteriology (1994), 44 (3) 435 – 439

\*\* Loretana, T., Mosterta, J.F. and Viljoen, B.C. (2003)

## 2. Koumiss

Koumiss atau Kumys adalah susu fermentasi asam laktat-alkohol yang unik berasal dari Asia Tengah, nama ini diambil dari suku Kumanese, yang bertahan sampai tahun 1235 di Asia Tengah.

Susu fermentasi yang mengandung asam dan alkohol secara tradisional diproses dengan menggunakan susu kuda, melibatkan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan khamir yang memfermentasi laktosa,

seperti *Saccharomyces lactis*. Gas CO<sub>2</sub> yang dihasilkan mengakibatkan produk koumiss tampak seperti minuman berkarbon dan membentuk citarasa juga.

Kandungan lemak susu kerbau lebih rendah daripada susu sapi, sehingga ketika susu kuda telah difermentasi secara sempurna, tidak terbentuk curd atau penggumpalan dan mengandung whey protein yang lebih tinggi dan kandungan casein lebih rendah. Dewasa ini mengingat susu kuda semakin sulit diperoleh koumiss diproduksi dengan menggunakan susu sapi.

Kultur starter ditambahkan sebanyak 10 – 30% pada suhu 26-28 °C agar keasaman awal mengandung asam laktat 0,45 % untuk kemudian diinkubasi lebih lanjut. Produk akhir akan mencapai keasaman: 0,6% asam laktat dan 0,7% alkohol, atau 0,8% asam laktat dan 1,1 – 1,7% alkohol atau 1,0 % asam laktat dan 1,7 – 2,5% alkohol, tergantung lamanya proses fermentasi.

Khamir yang memfermentasi laktosa seperti *Candida spp.*, *Kluyveromyces lactis* dan *Torula sp*, serta starter termofil *Lactobacillus delbureckii* subsp. *bulgaricus* terlibat dalam proses fermentasi koumiss. Bakteri asam laktat berperan dalam memproduksi asam, dan khamir bertanggung jawab dalam menghasilkan etanol dan karbon dioksida.

Produksi koumiss dalam skala besar dari susu sapi dilakukan dengan menambahkan 2,5% gula dan 10% kultur starter (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus* dan *Saccharomyces lactis*). Jumlah bakteri hidup dilaporkan 4,97 x 10<sup>7</sup> koloni/ml dan khamir sejumlah 1,43 x 10<sup>7</sup> koloni/ml (Akuzawa dan Suro, 2002).

### 3. Susu asidofilus-khamir

Jenis susu fermentasi asidofilus yang melibatkan khamir ini hanya diproduksi di negara-negara Rusia. Susu full krim atau susu skim dipanaskan pada suhu 90 – 95 °C selama 10–15 menit, didinginkan sampai suhu 35°C dan diinokulasikan dengan 3 – 5% kultur starter campuran. Mikroba yang terlibat adalah *Lactobacillus acidophilus* dan khamir *Saccharomyces lactis* dengan suhu inkubasi 35 °C, sampai terbentuk 0,8 % asam laktat dan 0,5% etanol. Produk akhir sedikit asam, kental dan mempunyai rasa khamir.

## **E. Fermentasi laktat dan kapang pada susu**

### **Viili**

Kapang tidak umum digunakan sebagai bagian dari kultur starter dalam fermentasi susu. Pengecualian dijumpai pada produk viili, susu fermentasi asal Finlandia. Kultur starter termasuk *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar *diacetylactis* dan *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, bersama-sama dengan suatu kapang, *Geotrichum candidum*.

Susu yang mengandung 2,5–3,9% lemak, diinokulasi dengan kultur starter pada suhu 18 – 21°C, dan diinkubasi sehingga terbentuk 0,9% asam laktat. *Ropy* atau lendir dalam produk viili dihasilkan oleh *Lactococcus* yang membentuk kapsul.

## **F. Standar Identitas**

Tiap negara mempunyai standar masing-masing bagi susu yang digunakan sebagai bahan baku, kultur starter, prosedur proses fermentasi, dan juga mutu serta aspek legal setempat.

Standard umum dari IDF (1992) untuk susu fermentasi dijabarkan sebagai berikut : susu fermentasi dipersiapkan dari susu atau produk susu (salah satu atau kombinasi dari keseluruhan, sebagian atau seluruhnya susu skim, susu bubuk atau susu konsentrat, konsentrat atau bubuk whey, protein susu termasuk whey protein, konsentrat whey protein, protein susu larut air, kasein yang dapat dimakan). Spesifikasi lain yang tercakup dalam IDF termasuk kultur starter viabel atau hidup, aktif dan jumlahnya setidaknya  $10^7$  koloni/g pada produk akhir selama di pasaran, dan khususnya yogurt, harus menggunakan kultur starter *S. salivarius* subsp. *thermophilus* dan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Secara umum di Amerika yogurt mengandung lemak lebih rendah atau sama dengan 1,7 persen. Yogurt dengan kandungan lemak 3,3 persen rasanya lebih enak dan citarasanya lebih kuat, serta lebih lembut di mulut dibanding dengan yogurt dengan kadar lemak lebih rendah.

Di Amerika, Code of Federal Regulation (CFR) dari FDA membuat daftar standar identitas untuk yogurt. Ada tiga kategori yaitu yogurt, yogurt rendah lemak, dan yogurt tanpa lemak, seperti terlihat pada Tabel 22.

Tabel 22. Standar komposisi untuk yogurt di Amerika Serikat

Komposisi (%)	Yogurt	Yogurt rendah lemak	Yogurt tanpa lemak
Lemak	>3,25	>0,5<2,0	<0,5
Protein	4,4	5,7	5,2
Karbohidrat	7,5	7,5	6,9
Padatan susu tanpa lemak	>8,25	>8,25	>8,25
Total asam tertitrasi	>0,9	>0,9	>0,9

Perlakuan panas setelah fermentasi yogurt akan memperpanjang masa simpan, tetapi membunuh kultur yogurt. Standar International Dairy Federation menjabarkan susu fermentasi sebagai produk yang tidak mendapatkan perlakuan panas setelah proses fermentasi. Codex Alimentarius, yang mengatur bahan makanan, membedakan secara jelas dengan label antara produk yogurt yang dipasteurisasi yang tidak mengandung kultur aktif, dengan yang mengandung bakteri hidup bagi konsumennya.

International Dairy Federation memberikan standar metode perhitungan total viabel bakteri yogurt, dan jumlah minimum sebagai acuan adalah sebanyak  $10^7$  -  $10^8$  koloni per gram yogurt pada saat diproduksi dan selama distribusi dan pemasaran (Surono dan Hosono, 2002a). Menurut Tamime (2002), spesifikasi IDF juga mencakup masa simpan minimum 30 hari pada suhu 4 – 7 °C.

Beberapa negara memiliki identitas standar sendiri untuk yogurt dan susu fermentasi lainnya, umumnya berdasarkan kandungan lemak, total padatan bukan lemak dan keasamannya. Codex Alimentarius Commission FAO/WHO telah membuat rancangan konsep tentang yogurt sebagai yogurt, semi skim dan skimmed, dan termasuk empat jenis yaitu yogurt, yogurt flavor, yogurt manis dan yogurt yang dipasteurisasi setelah difermentasi.

### G. Kultur starter

Setelah Lister berhasil mengisolasi kultur murni bakteri asam laktat yang berperan dalam mengasamkan susu pada tahun 1878, orang mulai memperhitungkan pentingnya kultur starter. Pada tahun 1880-an, perbaikan terhadap standardisasi dan *aging* mentega dibuat dengan memperkenalkan kultur starter murni (Storch in Denmark, Conn di Amerika Serikat, dan Weigmann di Jerman).

Sebelum tahun 1910, kultur starter tidak dikenal orang. Fermentasi susu secara tradisional memanfaatkan bakteri asam laktat dari berbagai sumber

seperti wadah untuk fermentasi, susu segar, saluran pencernaan hewan dan manusia, serta dari tanaman. Sampai saat teknologi pengolahan susu mulai berkembang dan mempunyai standar dalam pembuatan mentega, sehingga diperkenalkan perlunya kultur starter. Tahun 1910 – 1920, para ahli mikrobiologi susu seperti Orla-Jensen, von Freudenreich, Sherman, Hammer dan lainnya masing-masing memproduksi kultur murni untuk susu fermentasi. Mulailah produksi komersial berbagai produk susu fermentasi dan penggunaan starter berkembang dengan cepat di awal abad ke 20.

Kultur starter merupakan bagian terpenting dalam fermentasi susu untuk menghasilkan susu fermentasi bermutu tinggi, yang seragam dan stabil. Kultur starter harus berupa mikroba yang aman dan memang digunakan untuk produksi makanan, baik kultur tunggal maupun multi kultur, bakteri asam laktat yang aktif tumbuh dalam susu atau whey, atau media formulasi lainnya yang menghasilkan citarasa dan tekstur yang disukai dan sudah dikenal.

Kultur starter harus memenuhi kriteria seperti bisa diproduksi dalam skala besar, mudah diproduksi, viabilitas kultur selama masa simpan susu fermentasi yang tinggi, sedikit menghasilkan asam selama transportasi dan penyimpanan, cepat menghasilkan asam selama fermentasi, membentuk flavor, dan tekstur yang diinginkan. Tak kalah penting adalah bebas kontaminan, sehingga inokulasi harus dilakukan dalam kondisi aseptis ke dalam media yang steril, bebas dari senyawa penghambat pertumbuhan starter seperti antibiotik. Sejak awal tahun 1970, perkembangan teknologi starter difokuskan pada teknik penyimpanan dan konsentrasi starter.

Indikator penting bagi kultur starter meliputi: (1) adaptasi terhadap berbagai kondisi proses, (2) menghasilkan asam dalam waktu singkat selama proses fermentasi, (3) menghasilkan asam seminimal mungkin selama distribusi dan penyimpanan, (4) tetap hidup selama penyimpanan susu fermentasi, (5) membentuk citarasa dan konsistensi yang khas (Surono dan Hosono, 2002b)

Kriteria yang diperhatikan dalam menseleksi strain kultur starter adalah laju pertumbuhan dan produksi asam laktat, produksi aroma dan gas CO<sub>2</sub>, ketahanan terhadap serangan phage, kemampuan membentuk viskositas, menjaga proporsi kultur starter apabila menggunakan starter campuran, viabilitas selama persiapan kulturs tarter, tahap pengawetan, penyimpanan dan distribusi.

## H. Jenis kultur starter

Secara umum mikroba yang tumbuh optimum pada suhu 25-30°C, disebut starter mesofil dan yang tumbuh baik pada suhu 37 – 45°C dikenalebagai starter termofil, seperti terlihat pada Tabel 20 .

Kefir, koumiss, dahi, dan dadih melibatkan starter mesofil. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* yang termasuk starter mesofil, biasanya merupakan salah satu dari multi starter .

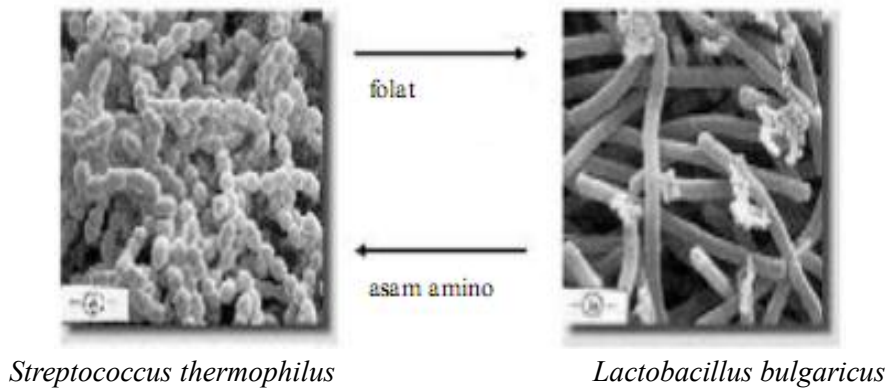
Yogurt dan susu asidofilus melibatkan starter termofil. Ada dua kelompok, yaitu starter termofil spontan (tidak pasti jenis strainnya) dan starter termofil yang dikenal yaitu *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus* yang tumbuh secara **protokooperatif** dalam meningkatkan produksi asam laktat, dimana *Streptococcus thermophilus* menghasilkan asam folat, yang dibutuhkan oleh *Lactobacillus bulgaricus*, dan *Lactobacillus bulgaricus* menghasilkan asam amino dan peptida yang dibutuhkan oleh *S. thermophilus* (Gambar 14). *Lactobacillus acidophilus*, bakteri probiotik yang digunakan untuk produksi susu asidofilus; dan *Lactobacillus casei* subsp. *casei* untuk produksi yakult (Tabel 24).

Pette dan Lolkema (1950) memperhatikan pembentukan asam laktat lebih cepat pada kultur campuran *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus*, dibandingkan dengan masing-masing kultur tunggalnya. Ternyata jumlah *Streptococcus thermophilus* lebih banyak pada kultur campuran ketimbang menumbuhkannya sebagai kultur tunggal, meskipun jumlah *Lactobacillus bulgaricus* tidak berbeda, antara kultur tunggal dan campuran.

*S. thermophilus* membutuhkan 2 - 5 jenis asam amino, sedangkan *Lactobacillus delbreuckii* ssp *bulgaricus* membutuhkan antara 3 - 14 asam amino. Pertumbuhan bakteri asam laktat pada susu sangat tergantung pada sistem proteolitik yang menghidrolisis kasein susu menjadi peptida dan asam amino (Thomas dan Mills, 1981). Proteinase dinding sel dari bakteri asam laktat berperan sangat penting dalam proses hidrolisis ini, yang secara bertahap memecah kasein susu.

Pada yogurt, *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus* saling mendukung dalam menghasilkan asam laktat dan aroma. Dalam hal ini , *S. thermophilus* menghasilkan asam piruvat, asam format dan CO<sub>2</sub>, serta asam folat yang menstimulir pertumbuhan *L. bulgaricus*. Sebagai imbalannya, *L. bulgaricus* menyediakan peptida dan asam amino yang menstimulir pertumbuhan *S. thermophilus*, mengingat bakteri ini kemampuan proteolitiknya lebih rendah dibanding *L. bulgaricus* (Hickey

dkk, 1983).



Gambar 14. Protokooperatif bakteri yogurt

### 1. Produksi kultur starter

Metoda produksi starter untuk keperluan produksi secara tradisional biasanya dilakukan dengan mentransfer dari kultur stok baik dalam bentuk cair maupun kering beku, atau bekuan yang disimpan dalam nitrogen cair (-196°C) dibuat kultur induk (*mother culture*) kira-kira sebanyak 100 ml, untuk ditransfer tiap hari ke dalam 3 botol atau lebih, dipilih satu botol terbaik untuk kemudian diinokulasikan sebanyak 1% ke dalam media starter yang lebih besar jumlahnya atau *intermediate*, untuk kemudian diinokulasikan ke dalam media fermentasi. Meskipun perbanyak starter membutuhkan banyak waktu, memerlukan keahlian operator dan rawan kontaminasi, tetapi cara ini banyak digunakan oleh industri.



Tabel 23. Aktivitas mikrobiologi dan biokimia starter mesofil

Karakteristik	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>
Bentuk sel dan konfigurasi	Cocci, pairs, rantai pendek	Cocci, pairs, rantai pendek/panjang	Cocci, pairs, rantai pendek	Cocci, pairs, rantai pendek/panjang	Cocci, pairs, rantai
Katalase	-	-	-	-	-
Suhu pertumbuhan (°C)	28-31 8-10 Optimum Minimum Maximum	22 8-10 37-39	28 8-10 40	20-25 4-10 37	20-25 4-10 37
Suhu inkubasi (°C)	21-30	22-30	22-28	22	22
Toleransi panas (60°C /30 menit)	±	±	±	-	-
Isomer asam laktat	L (+)	L (+)	L(+)	D(-)	D(-)
Produksi asam laktat dalam susu (%)	0.8-1.0	0.8-1.0	0.8-1.0	0.1-0.3	0.1-0.3
Produksi asam asetat (%)	-	-	-	0.2-0.4	0.2-0.4
Produksi Gas (CO <sub>2</sub> )	-	-	+	±	±
Aktivitas proteolitik	+	+	+	±	±
Aktivitas lipolitik	±	±	±	±	±
Fermentasi sitrat	-	-	+	+	+
Senyawa citarasa	+	+	+++	+++	+++
Produksi mukopoli-sakarida	±	±	±	Negatif dextran dari sukrosa	Positif dextran dari sukrosa
Produksi Hydrogen peroxida	+	+	+	±	±
Produksi alkohol	±	±	±	±	±
Toleransi garam (% max)	4-6.5	4.0	4-6.5	6.5	6.5

Sumber : Heller (2001). dan Pettersson (1988)

Susu biasa digunakan untuk media persiapan inokulasi ke dalam media fermentasi. Selain susu, digunakan juga susu skim yang diperkaya dengan garam fosfat, dekstrosa, dekstrin, pankreatin, dan bisa juga ditambahkan natrium sitrat, tepung khamir, laktosa dan sukrosa. Beberapa senyawa yang menyerupai peptida diketahui dapat menstimulir pertumbuhan bakteri.

Hal yang penting diperhatikan dalam mentrasfer kultur starter, sub-kultur, yaitu transfer kultur berkali-kali bisa memicu terbentuknya strain yang termutasi, yang akan mengubah sifat starter. Terlalu sering transfer akan mengakibatkan hilangnya fungsi plasmid tertentu seperti Lac<sup>+</sup>, suatu plasmid yang berperan dalam produksi asam laktat (McKay, 1983; Davidson dkk., 1995), produksi bakteriosin dan resistensinya (Klaenhammer, 1993), atau Prt<sup>+</sup> suatu plasmid yang bertanggung jawab terhadap resistensi terhadap fag dan pemanfaatan sitrat (McKay, 1983).

Preservasi kultur starter terbagi menjadi tiga kelompok besar, yaitu starter cair, yaitu menumbuhkan starter ke dalam susu skim 10-12 %, starter kering dengan pengeringan vakum, *spray drying*, dan kering beku atau *freeze drying*, dan starter beku, yaitu dengan membekukan kultur starter pada suhu *sub-zero* (-30 sampai -40°C), atau suhu pembekuan ultra rendah (-196 °C). dalam nitrogen cair.

Starter cair harus dipelihara dan disimpan dalam lemari es, dan sebaiknya di sub kultur hanya sebanyak 15 – 20 kali secara berurutan, meskipun pada prakteknya banyak faktor yang harus sangat diperhatikan seperti misalnya tenaga terampil, agar terhindar dari mutasi strain dan kehilangan plasmid.

Tabel 24. Karakteristik Starter Thermofil

Karakteristik	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>
Bentuk sel dan konfigurasi	Sferikal – ovoid, pairs – rantai panjang	Rod, tunggal, rantai pendek	Rod	Rod, tunggal, pairs, rantai pendek	Rod, rantai pendek/panjang
Katalase	-	-	-	-	-
Suhu tumbuh(°C)					
Optimum	40-45	40-45	40-45	37	37
Minimum	20	22	22	20-22	15-20
Maximum	50	52	52	45-48	40-45
Suhu inkubasi (°C)	40-45	42	40-45	37	37
Toleransi panas (60°C/ 30 min)	++	+	+	-	-
Isomer asam laktat	L (+)	D (-)	D (-)	DL	L(+)
Produksi asam laktat dalam susu (%)	0.7-0.8	1.5-4.0	1.5-3.0	0.3-2.0	1.2-1.5
Asam asetat (%)	Sedikit	Sedikit	Sedikit	+	+
Produksi gas(CO <sub>2</sub> )	-	-	-	-	-
Aktivitas proteolitik	±	+	+	±	±
Aktivitas lipolitik	±	±	±	±	±
Fermentasi sitrat	-	-	-	-	-
Senyawa flavor	++	++	+	+	±
Produksi mukopolisakarida	±	++	-	-	±
Produksi hidrogen peroksida	±	+	+	+	+
Produksi alkohol	-	Sedikit	Sedikit	Sedikit	Sedikit
Toleransi garam (% max.)	2.0	2.0	2.0	6.5	2.0

Sumber: Heller (2001) dan Dellaglio (1988)

Penggunaan kultur starter kering bertujuan untuk mengurangi pekerjaan pemeliharaan kultur sebagaimana pada kultur cair. Kultur kering beku atau *freeze dried* yang paling banyak digunakan dibandingkan dengan jenis kultur starter kering lainnya, mengingat jumlah bakteri hidup relatif stabil pada kultur kering beku. Namun demikian, dibutuhkan biaya investasi yang sangat mahal mengingat peralatan kering beku yang sangat mahal.

Pembekuan kultur starter induk (*mother culture*) dan *intermediate* yang dipersiapkan dengan menginokulasikan starter ke dalam susu pada suhu

*sub zero*, yaitu -30 sampai  $-40^{\circ}\text{C}$  dapat dilakukan dalam alkohol dan es kering (*dry ice*), dan dapat disimpan selama beberapa bulan pada suhu  $-40^{\circ}\text{C}$ ; sedangkan pembekuan pada suhu pembekuan ultra rendah dapat digunakan dengan menggunakan nitrogen cair, sehingga tercapai suhu pembekuan  $-196^{\circ}\text{C}$ , dan metode ini adalah terbaik diantara kultur starter beku.

Saat ini tersedia kultur starter dalam bentuk kering beku atau beku konsentrat yang bisa digunakan langsung ke dalam media fermentasi atau dibuat starter **bulk**. Penggunaan secara langsung ke media fermentasi mencegah terjadinya kontaminasi selama persiapan starter dan juga ketepatan jumlah maupun keseimbangan kultur campuran.

Produksi komersial kultur starter secara modern dimulai pertengahan tahun 60-an, dengan menumbuhkan kultur starter pada kondisi pH optimum, dipanen dengan sentrifusi atau ultrafiltrasi, standardisasi suspensi sel pada aktivitas spesifik, menambahkan bahan pelindung terhadap kondisi beku (*cryoprotectant*), seperti gliserol, sukrosa, laktosa atau susu skim, pengemasan, pembekuan cepat dalam nitrogen cair ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) atau dalam campuran es kering dan alkohol ( $-35^{\circ}\text{C}$ ) dan penyimpanan dalam freezer bersuhu  $-80^{\circ}\text{C}$ . Konsentrat sel diatur pHnya 6,6 untuk *Lactococci* dan untuk *Lactobacillus* adalah 5,4 – 5,8.



Gambar 15. Penyimpanan kultur kering beku di dalam ampul di laboratorium

Penggunaan kultur starter kering beku (*freeze dried*) memerlukan masa adaptasi yang lebih lama, yaitu sekitar 30 sampai 60 menit dalam memfermentasi susu, meskipun demikian, kultur starter kering beku lebih mudah dan sederhana penggunaannya sebagai starter susu fermentasi.

Kultur starter dalam bentuk bekuan konsentrat mengandung  $10^{10}$  sampai  $10^{11}$  koloni bakteri per gram, suatu jumlah bakteri hidup yang cukup untuk diinokulasikan ke dalam 70 ml susu, sehingga selanjutnya dapat digunakan untuk ditambahkan ke dalam 1000 l media kultur bulk. Untuk membekukan kultur starter *Lactobacilli*, sebaiknya tidak menggunakan ekstrak khamir, tetapi pankreatin. Penggunaan kultur starter bekuan konsentrat tidak memerlukan waktu fermentasi yang lama, sebab kultur starter ini sangat aktif sehingga tidak memerlukan *lag phase* atau masa adaptasi, dibanding penggunaan kultur starter kering beku.

Tahun 1982, perusahaan kultur starter Perancis, Eurozyme, memperkenalkan jenis kultur starter baru di pasaran, yaitu konsentrat kering beku dalam kantung aluminium foil, yang mengandung satu atau campuran kultur starter yang jelas identitasnya dan kadar airnya kurang dari 3 persen. Tiap kantung mengandung  $10^{11}$  sel bakteri hidup per gram, dan tahan di simpan dalam lemari es ( $4^{\circ}\text{C}$ ) selama 1 tahun tanpa kehilangan aktivitasnya.

Menurut Morichi (1972), kultur starter bakteri asam laktat umumnya berhasil diawetkan dengan pembekuan maupun kering beku, kecuali *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan *Lactobacillus helveticus*, dan suhu optimum untuk rehidrasi adalah  $20^{\circ}\text{C}$ , baik untuk kultur starter mesofil maupun termofil.

Penelitian terhadap metoda pengawetan kultur starter menunjukkan bahwa pembekuan cepat dengan menggunakan nitrogen cair ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) adalah yang terbaik bagi *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* dan *Leuconostoc paramesenteroides* terhadap viabel sel setelah pembekuan, dibandingkan dengan pembekuan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Demikian juga daya ikat terhadap senyawa mutagen Trp-P1 berkurang pada suhu pembekuan lebih rendah, dan ternyata yang bertanggung jawab adalah senyawa polisakarida dalam dinding sel bakteri asam laktat, yang rusak selama proses pembekuan (Suroño dan Hosono, 2000c).

## **2. Senyawa penghambat aktivitas kultur starter**

Beberapa faktor yang bisa menghambat aktivitas starter dan bisamempengaruhi mutu susu fermentasi akan merugikan produsen. Penghambatan kultur starter bisa disebabkan oleh variasi komposisi susu akibat terinfeksi mastitis, ketengikan hidrolitik susu, atau faktor iklim yang berpengaruh terhadap komposisi mikronutrien, prosedur pembuatan, dan senyawa penghambat alami yang terkandung dalam susu seperti

laktenin, laktoperoksidase, hidrogen peroksida, tiosianat, agglutinin dan lisozim. Senyawa penghambat alami ini tidak tahan terhadap pemanasan, sehingga pasteurisasi susu yang tepat sangat diperlukan.

Produksi asam laktat pada kultur starter yang melambat bisa disebabkan oleh perubahan genetik atau faktor dari luar. Transfer kultur starter yang tidak rutin, suhu inkubasi yang tidak tepat, atau adanya senyawa penghambat seperti antibiotik yang dikonsumsi ternak, senyawa antimikroba dari bakteri kontaminan, senyawa sanitasi seperti senyawa ammonium, iodofor, hipoklorit, dan hidrogen peroksida, dan bakteriofage akan mengganggu kultur starter.

Aktivitas kultur starter diuji dengan perhitungan langsung jumlah bakteri secara mikroskopis (*direct microscopic counts*), menggunakan pewarna *methylene blue*, yang akan mendeteksi kondisi fisiologis sel kultur starter. Kekurangan nutrisi dan sel tua, sel yang berada dalam media yang terlalu asam, adanya senyawa penghambat dalam susu, memberikan kondisi tertekan, sehingga bentuk sel bakteri akan berubah. Kultur starter yogurt diukur kemampuan pembentukan asam dengan mengukur pH dan total asam tertitrasi pada 12 % susu skim yang diinkubasi pada suhu 40°C selama 8 jam yang diharapkan menghasilkan susu fermentasi dengan pH 4,2 serta total asam tertitrasi 1,05 persen.

Starter termofil lebih tahan terhadap gangguan bakteri kontaminan dibandingkan dengan starter mesofil, dan *Lactobacillus bulgaricus* lebih tahan terhadap gangguan dibanding dengan *Streptococcus thermophilus*.

Upaya mengantisipasi gangguan terhadap kultur starter bisa dilakukan dengan menggunakan kultur campuran, pengerjaan aseptis, dan pemanasan susu yang tepat, yaitu 85°C selama 30 menit.

Bakteriofag dalam proses produksi berasal dari lisogenik bakteri dalam kultur starter dan bisa juga berasal dari peternakan susu. Tidaklah mungkin mengeliminasi masuknya fag ke dalam proses produksi bila menggunakan susu segar sebagai bahan baku, sebab secara kontinu susu segar masuk ke dalam ruangan proses produksi. Namun demikian, pertumbuhan fag dapat dikendalikan dengan sanitasi yang efektif dan penerapan HACCP.

## **I. Produk susu fermentasi di Asia**

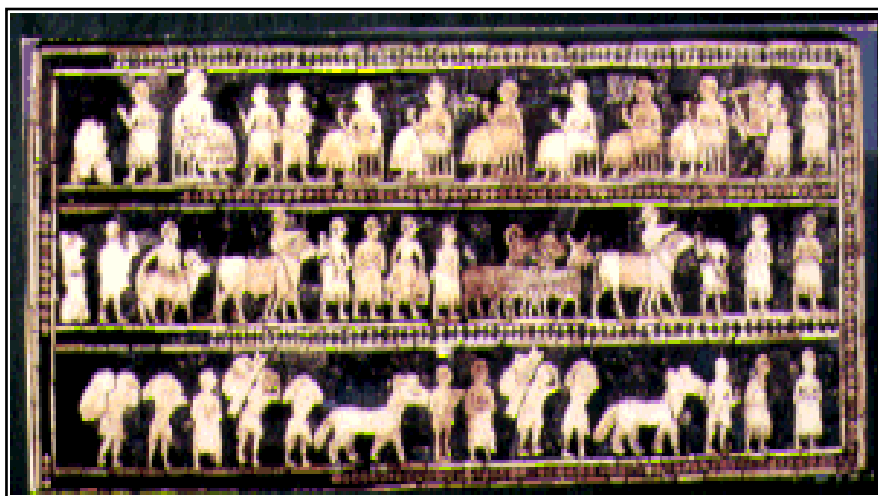
Asal usul susu fermentasi tidak bisa dipastikan secara jelas. Namun demikian, ketika kambing mulai ditenakkan di Mesopotamia kira-kira 5000 tahun Sebelum Masehi, kelompok nomad (yang hidup berpindah dari satu tempat ke tempat lain) menyimpan susu yang baru diperah dari

ternaknya dalam kulit hewan atau dalam belanga dari tanah liat pada iklim yang panas, sehingga terbentuk “curd”, yaitu penggumpalan susu..

Maka mulailah sejarah pengolahan fermentasi susu secara tradisional, melibatkan proses fermentasi spontan yang terjadi secara alami. Bakteri asam laktat yang berperan dalam fermentasi adalah kontaminan alami pada susu tersebut. Tidak ada catatan yang jelas kapan orang mulai menggunakan susu sebagai salah satu bahan makanan, tetapi konsumsi susu tercatat dalam kitab Kejadian 18 : 8, yang menceritakan bahwa untuk menjamu 3 orang tamunya, nabi Ibrahim memilih satu dari sapi ternaknya, dan menyediakan *curd* susu sapi (dadih) kepada tamunya.

Tradisi Kerajaan Roma Heliogabalus (218 – 222) mencatat dua jenis susu asam yaitu “*opus lactorum*” dan “*oxygala*” Rasic dan Kurmann, 1978. Para ahli sejarah setuju bahwa susu pertama kali digunakan sebagai bahan makanan di Asia Barat. Ciri khas susu fermentasi adalah terbentuknya asam laktat.

Bangsa Samaria memperkenalkan budaya penyimpanan susu dalam belanga tanah liat dan pembuatan mentega melalui pahatan relief di Mesopotamia kira-kira 3000 tahun Sebelum Masehi (Gambar 16). Selanjutnya dari Asia Barat terus berkembang ke Mongolia, India dan Tibet oleh bangsa Tartar, Huns dan Mongol yang nomad. Jalan Sutra (Silk Road) merupakan jalur utama penyebaran susu fermentasi. Menurut catatan Marco Polo yang terkenal akan pengalamannya di Asia, disebutkan bahwa suku Dattan (Mongolia) mempunyai kebiasaan minum susu asam.



Gambar 16. Ukiran relief pembuatan mentega pada abad 3000 SM

Berbagai jenis metoda proses fermentasi susu secara tradisional beragam dari satu tempat ke tempat lainnya. Asal bakteri asam laktat yang aktif dalam fermentasi bisa dari wadah untuk fermentasi, susu segar, saluran pencernaan hewan dan manusia, serta tanaman. Berbagai nama susu fermentasi yang dikonsumsi di Asia dapat di lihat pada Tabel 25.

Jika awalnya berbagai jenis susu fermentasi di seluruh dunia diproses secara tradisional dengan pertumbuhan spontan dari mikroba yang terlibat dan bisa tumbuh baik di media susu, sekarang proses fermentasi susu telah dikendalikan dengan cermat dengan menggunakan kultur starter yang tertentu, jelas dan merupakan hasil riset dan pengembangan. Maka, teknologi fermentasi susu yang melibatkan fisiologi dan biokimia mikroba yang terlibat, telah memungkinkan produksi susu fermentasi dalam jumlah besar, dan mutu yang stabil.

Dua dekade terakhir ini, kebanyakan riset difokuskan ke arah biokimia dan biologi molekuler kultur starter. Keberhasilan fermentasi susu untuk menghasilkan produk yang berkualitas tinggi khususnya citarasa dan stabilitasnya, perlu memperhitungkan reaksi-reaksi katabolisme dan juga anabolisme dalam hal ini menghasilkan polisakarida yang memperbaiki tekstur, dan senyawa metabolit lain sebagai biopreservasi maupun yang bermanfaat bagi kesehatan manusia, sehingga dapat digunakan sebagai makanan fungsional.

Tabel 25. Susu fermentasi tradisional di Asia

<b>Nama</b>	<b>Asal negara</b>
Dadih	Indonesia
Dahi	India
Dough	Iran
Ayran	Turki
Jubjug	Lebanon
Kashk, kasg, Mast	Iran
Katyk	Armenia
Koumiss, Kefir	Rusia
Laban rayeb	Arab Saudi
Labneh, lebneh	Lebanon dan negara Saudi lainnya
Yogurt	Turki, Bulgaria
Zabadi, Zabade	Sudan
Airag, Edosensuu, Tsege, Sanyuu	Mongolia

Sumber : Hosono, A (1992)

Dadih, yang menyerupai dahi dari India, telah diproduksi ratusan tahun di Indonesia, khususnya diproduksi di Sumatra Barat dari susu kerbau



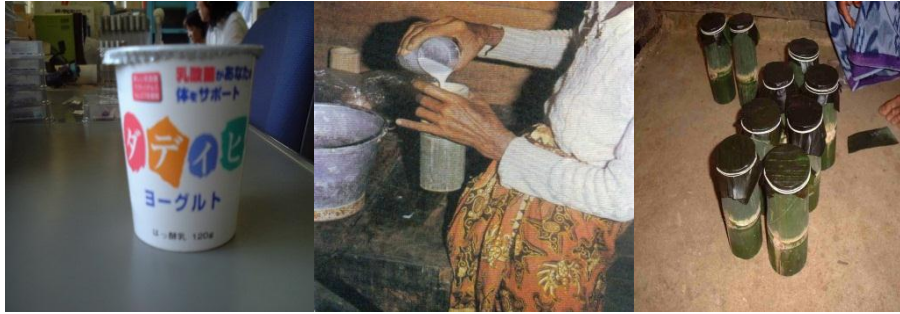
dengan cara yang lebih sederhana lagi. Akar kata dahi dan dadih menunjukkan kesamaan jenis susu fermentasi ini. Suku Minangkabau memproses susu kerbau yang baru diperah tanpa dimasak, dimasukkan ke dalam potongan tabung bambu, kira-kira sebanyak 150 ml, ditutup dengan daun pisang atau plastik dan didiamkan semalam hingga dua malam pada suhu ruang sampai menjadi kental menyerupai yogurt.

Hal yang menarik disini adalah bahwa susu segar tidak diberi perlakuan panas, jadi susu segar dan mentah difermentasi secara spontan, dan produk akhir dadih didominasi oleh bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat indigenus dalam susu kerbau berperan dalam proses fermentasi dadih, mengalahkan bakteri kontaminan yang terkandung dalam susu kerbau mentah tadi, mengingat proses pembuatannya dilakukan secara tradisional, sederhana dan tidak memperhatikan faktor higienis.

Fenomena inilah yang menarik untuk diteliti dari bakteri asam laktat yang terlibat dalam fermentasi dadih, karena cukup kuat berkompetisi dengan bakteri kontaminan lainnya. Diakhir fermentasi jumlah bakteri asam laktat hidup mencapai  $10^8$  koloni/gram.

Riset terhadap sifat probiotik bakteri asam laktat asal dadih yang diawali dilakukan di Shinshu University – Jepang selama hampir 23 tahun, berhasil menemukan bakteri probiotik, dan di Jepang telah diproduksi bio yogurt, yang diberi nama dadihi yogurt, yang melibatkan bakteri yogurt *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* dengan menambahkan bakteri probiotik *Lactobacillus* asal dadih dan difermentasi secara modern (Gambar 17).

Spesies bakteri yang mendominasi fermentasi dadih diantaranya adalah *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis* dan *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Penelitian yang dilakukan oleh Wardojo, dkk. (1987), Surono dan Nurani (2000), dan Surono (2003) mendapatkan bahwa strain bakteri asam laktat yang terlibat dalam fermentasi dadih sangat beragam dari satu tempat ke tempat lainnya, mengingat proses fermentasi berlangsung secara spontan, dan juga tergantung kondisi fermentasi setempat.



Gambar 17. Modern dadih, bioyogurt (kiri), dan tradisional dadih (tengah dan kanan)

Beberapa spesies toleran terhadap asam dan garam empedu secara *in vitro*, sehingga berpotensi sebagai bakteri probiotik, dan dinding selnya mampu mengikat senyawa mutagen 3-amino-1,4-di-methyl-5H-pyrido-[4,3]-indole atau Trp-P1, suatu senyawa hasil pirolisis asam amino tryptophan, baik *in vitro* maupun *in vivo* (Gambar 24)

Penulis telah meneliti beberapa strain bakteri asam laktat asal dadih yang berasal dari Bukit Tinggi, berkolaborasi dengan peneliti dari Jepang dan Singapore, secara komprehensif mempelajari sifat probiotik secara *in vitro*, *in vivo* dan uji klinis pada anak-anak dan lansia Indonesia. Dari 5 strain probiotik potensial telah dilakukan identifikasi secara molekuler dengan PCR dan dengan sequencer sehingga diketahui urutan nukleotidanya di Functional Food Forum University of Turku, Finlandia pada tahun 2004-2006.

Penduduk setempat di Sumatera Barat percaya bahwa dadih mempunyai efek positif bagi kesehatan. Diharapkan hasil riset secara klinis berhasil membuktikan sifat probiotik strain bakteri asam laktat asal dadih sehingga dapat menambah daftar bakteri probiotik yang saat ini telah digunakan secara komersial dalam produksi susu fermentasi di dunia.

Koumiss, salah satu jenis susu fermentasi dari susu kuda dan mengandung alkohol, mulai dikenal di Ukraina-Rusia, Asia Tengah sekitar 2000 tahun Sebelum Masehi. Kandungan lemak susu kuda juga lebih rendah dibanding susu sapi (Tabel 26).

Tabel 26. Komposisi berbagai susu asal hewan ternak untuk fermentasi susu

Jenis ternak	Lemak (%)	Ccasein (%)	Whey Protein (%)	Laktosa (%)	Abu (%)	Total padatan (%)
Sapi	3,7	2,8	0,6	4,8	0,7	12,6
Kerbau	7,45	3,2	0,58	4,9	0,78	16,91
Kambing	4,5	2,5	0,8	4,4	0,8	13,0
Biri-biri	7,5	4,2	1,4	4,4	0,87	18,37
Kuda	1,6	1,0	1,1	6,0	0,4	10,1
Unta	4,2	-----3,7 <sup>a</sup>		4,1	0,75	12,75

<sup>a</sup>Kandungan protein total

Sumber : Kon SK dkk

(1961), di dalam Akuzawa dan Surono, 2003

Koumiss tidak membentuk “curd”, karena kandungan protein susu kuda berbeda dengan susu lainnya, yaitu sedikit mengandung *casein* dan lebih banyak mengandung *whey* protein. Rasanya asam dan apabila dikocok akan membentuk gelembung-gelembung udara karena adanya gas CO<sub>2</sub>. Alkohol dan gas CO<sub>2</sub> diproduksi oleh khamir seperti *Candida* spesies, *Kluyveromyces lactis* dan *Torula spp.*, khamir yang memfermentasi laktosa, sedangkan asam laktat dihasilkan oleh bakteri asam laktat. Kandungan alkohol koumiss bervariasi antara 0,7 – 1,8 persen. Kandungan bakteri asam laktat hidup sekitar 10<sup>7</sup> koloni/ml.

Secara tradisional semula koumiss menggunakan bahan baku susu kuda, namun dengan semakin sedikitnya ketersediaan susu kuda, digantikan dengan susu sapi. Untuk mengatasi perbedaan kandungan kasein dan whey protein antara susu kuda dengan susu sapi, suatu ultrafiltrasi membran digunakan untuk mengatur kandungan whey protein, sehingga whey protein dipekatkan, tetapi tidak memekatkan laktosa.

Berdasarkan lamanya fermentasi, koumiss dibagi menjadi tiga kategori, koumiss bercitarasa lemah, yaitu kadar asam laktat 0,6-0,8%, dengan kandungan alkohol 0,7-1,0%, koumiss bercitarasa medium, mengandung 0,8–1,0% asam laktat dengan 1,1-1,8 % alkohol, dan koumiss bercitarasa kuat dengan kadar asam laktat 1,0–1,2% dengan kandungan alkohol 1,8–2,5%. Dengan demikian, kandungan asam laktat dan alkohol mempengaruhi citarasa koumiss.

Asam laktat, alkohol dan CO<sub>2</sub> yang terkandung dalam koumiss menyebabkan rasa asam dan soda serta akan timbul gelembung-gelembung ketika dikocok.

Dahi difermentasi di India sejak 1500 tahun Sebelum Masehi dan dadih diproduksi di Sumatra Barat selama ratusan tahun. Ada kesamaan nama

antara dadih Indonesia dan dahi India yang mengindikasikan penyebarannya melalui aktivitas perdagangan pada masa itu, mengingat bakat dagang orang awak. Dadih dan dahi adalah produk serupa yogurt, baik di Indonesia maupun di India masih diproduksi secara tradisional sebagai industri rumah. Baik dadih maupun dahi mengandung  $10^8$  koloni/g bakteri asam laktat hidup.

Di India digunakan berbagai jenis susu, seperti susu sapi, susu kerbau, dan susu kambing. Campuran susu kerbau dan susu sapi banyak digunakan untuk produksi dahi. Pengolahan dahi di India sangat sederhana, dimulai dengan merebus susu, setelah dingin diinokulasikan dahi sisa sehari sebelumnya, dan diinkubasi selama empat sampai enam jam sampai konsistensi susu menjadi kental. Dahi yang terbuat dari susu kerbau lebih kental dibanding susu sapi, mengingat susu kerbau lebih tinggi kandungan bahan padatnya. Di India dahi dikonsumsi sebagai minuman yang dikenal sebagai “lassi”, atau sebagai dessert bersama-sama dengan pisang, potongan jeruk mangga dan buah-buahan lain, bahkan dahi juga dikonsumsi sebagai lauk ketika makan nasi.

Dahi yang mempunyai citarasa lembut dihasilkan oleh bakteri *Lactococcus* yang bersifat mesofil. *Leuconostoc* bisa juga digunakan sebagai campuran mikroba, untuk menghasilkan aroma dan citarasa mentega. Dahi yang citarasa asamnya kuat dihasilkan oleh bakteri tambahan yang bersifat termofil, yaitu bakteri yogurt (Tabel 24). Di India saat ini dahi diproduksi skala industri di kota-kota besar dan kota metropolitan.

Berbagai metode digunakan dalam proses fermentasi susu tradisional. Bakteri yang penting bagi terjadinya proses fermentasi bisa saja berasal dari wadah susu yang akan difermentasi, dari susu segarnya sendiri, dari saluran pencernaan ternak dan juga dari tanaman. Dengan demikian, bakteri asam laktat umumnya terlibat secara spontan dan merupakan indigenous bakteri dan fermentasi yang terjadi merupakan fermentasi tradisional.

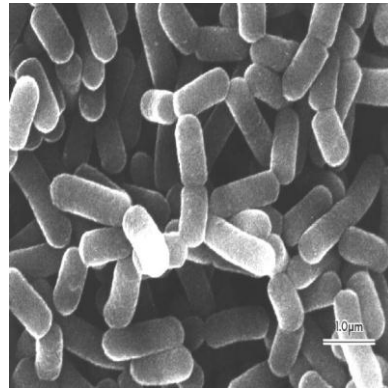
Dr. Minoru Shirota (Gambar 18) sangat prihatin terhadap peranan bakteri indigenous dalam saluran usus yang berperan dalam mekanisme pertahanan tubuh, termasuk kompetisinya dengan bakteri patogen. Pada tahun 1935 beliau mengembangkan produk minuman susu fermentasi yang diberi nama yakult.

Yakult saat ini merupakan produk susu fermentasi modern yang sangat dikenal, diproduksi pertama kali tahun 1935 di Jepang yang

memfermentasi susu skim dengan *Lactobacillus casei* strain Shirota pada suhu 37°C selama 7 hari dan mengandung  $10^8$  koloni/ml bakteri hidup *Lactobacillus casei* strain Shirota, dan merupakan salah satu jenis bakteri probiotik. Yakult merupakan susu fermentasi yang bentuknya cair, dan warna coklat muda terbentuk hasil reaksi Maillard, non enzimatis browning, antara asam amino dari susu skim dengan 14 persen glukosa yang ditambahkan dalam susu skim sebelum perlakuan panas.



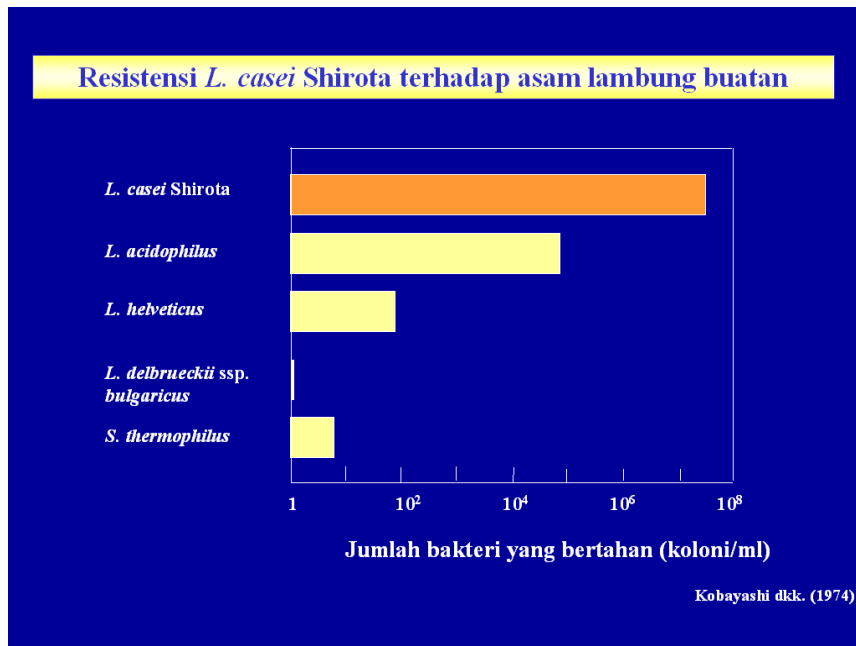
a



b

Gambar 18a. Dr. Minoru Shirota (1899 – 1982) : *A healthy intestine leads to a long life*; b. Scanning electron mikroskop dari *Lactobacillus casei* Shirota strain

*Lactobacillus casei* Shirota strain mampu mencapai usus dalam keadaan hidup. Strain bakteri yakult tahan terhadap asam lambung dan garam empedu. Gambar 19 memperlihatkan ketahanan strain bakteri yakult terhadap kondisi asam dalam lambung.



Gambar 19. Resistensi *L. casei* Shirota strain terhadap asam lambung

Gambar 19 memperlihatkan bahwa kultur bakteri yogurt, baik *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* maupun *S. thermophilus* resistensi terhadap asam lambungnya sangat rendah dibanding dengan bakteri yakult dan *L. acidophilus*, dan *L. casei* Shirota strain merupakan bakteri asam laktat yang sangat resisten terhadap asam lambung, dan masih dapat mempertahankan jumlah bakteri hidup sampai 10<sup>7</sup> koloni/ml.

Susu fermentasi Mongolia melibatkan bakteri asam laktat dan khamir dalam proses fermentasinya. Edosensuu terbuat dari susu sapi, mikroba yang terlibat adalah *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis* dan khamir difermentasi pada suhu rendah yaitu 17 – 20°C, dan mengandung sedikit asam laktat (0,8%) dan alkohol (0,2%). Lapisan lemak disingkirkan setelah fermentasi.

Sedangkan Airag, yang dikenal juga sebagai Tsege merupakan susu kuda yang difermentasi dan didominasi oleh *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* dan khamir dan mengandung sekitar 1–3% alkohol. Kultur starter serupa digunakan di Jepang untuk memfermentasi susu fermentasi yang dipasteurisasi dikenal sebagai calpis. Satu jenis susufermentasi Mongolia yang dikenal sebagai Tsege mengandung

*Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus fermentum* dan *Saccharomyces cerevisiae* sangat mirip dengan minuman Calpis di Jepang, susu asam dari susu skim yang difermentasi dengan *Lactobacillus helveticus* dan *Saccharomyces cerevisiae*.

Calpis diproduksi pertama kali tahun 1919 di Jepang sebagai minuman fermentasi pasteurisasi yang melibatkan *Lactobacillus helveticus*. Dengan total padatan hanya 8,7 persen dan tidak membentuk “curd”. Beberapa studi yang dilakukan membuktikan adanya efek positif fisiologis, bahwa minuman Calpis terbukti mencegah peningkatan tekanan darah pada tikus maupun manusia, berkat peptida yang dihasilkannya.

Tarag, yang kadang disebut juga sebagai airag, terbuat dari susu sapi, kambing atau susu biri-biri. Bakteri *Lactobacillus kefiranofaciens* mendominasi mikroflora pada produk ini. Tarag mengandung kadar asam laktat yang cukup tinggi, yaitu mencapai pH 3,6 – 3,9.

## **J. Susu Fermentasi di Negara-negara Skandinavia**

Susu fermentasi sudah dikonsumsi sejak lama dalam jumlah besar di negara-negara Skandinavia. Kekentalan susu fermentasi asal Skandinavia sangat khas, dan berbeda dengan susu fermentasi dari negara lainnya.

Susu fermentasi di Norwegia dikenal sebagai “Taette” dan menggunakan susu yang kandungan krim atau lemaknya tinggi, yaitu 36 %. Keasamannya mencapai 2,5 % dan tahan simpan hingga 1 – 2 tahun.

Di Finlandia, susu dibiarkan secara alami menjadi asam, dan dikenal sebagai “fiili”. Setiap wilayah menghasilkan susu fermentasi yang berbeda, di Finlandia Utara dikenal sebagai “piima”, di bagian Timur dikenal susu fermentasi padat, “kurz” sedangkan di Tenggara Finlandia, susu fermentasi kental disebut “villia” atau “pitkapiima”. Dilaporkan, strain penghasil lendir yang menyerupai *Lactococcus lactis* var *hollandicus* dan *Streptococcus taette* diisolasi dari “fiili” maupun “piima”.

Viili umum dijumpai di Finlandia dan diproduksi skala industri. *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc citrovorum* dan *Geotricum candidum* digunakan sebagai starter, dan 20 % dari *Lactococcus* adalah menghasil lendir, yang berkontribusi terhadap kekentalan viili. Produk susu fermentasi ini tidak terlalu asam rasanya.

Produk serupa viili juga dijumpai di Swedia, dan dikenal sebagai langfil, tattermjolk, dan melibatkan *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*. Jenis produk fermentasi susu lainnya yang dapat ditemui di

Swedia adalah Laktofil, susu fermentasi Swedia yang pekat dan menyerupai ymer di Denmark. Kandungan proteinnya 6,5 %, dan menggunakan starter mentega.

Ymer adalah produk susu fermentasi di Denmark. Kandungan proteinnya lebih dari 6 %, lemak lebih dari 3%, dan padatan terlarut non fat lebih dari 11%. Fermentasi susu ymer melibatkan *Leuconostoc cutrovorum*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis* dan *Lactococcus lactis* var *diacetylactis*.

### **K. Susu Fermentasi di Eropa Timur**

Susu fermentasi Bulgaria dikenal sebagai yogurt, susu Bulgarian, dan Brano mliake. Sejak peneliti Rusia Metchnikoff, pemenang hadiah nobel untuk Kedokteran di tahun 1908 mengemukakan teorinya tentang masyarakat yang panjang umur di Bulgaria adalah karena yogurt, maka yogurt Bulgaria menjadi sangat terkenal dan tersebar ke seluruh dunia.

Di Bulgaria sendiri konsumsi yogurt sudah sangat mendarah daging dalam kehidupan sehari-hari masyarakatnya, sehingga konsumsi perorangan per tahunnya mencapai 35 kg. Starter yang digunakan adalah *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*.

Produk susu fermentasi yang dikenal sebagai susu Bulgarian, menggunakan starter *Lactobacillus bulgaricus* saja ataupun campuran dengan *Streptococcus thermophilus*. Rasanya sangat asam, dan keasamannya sekitar 1,4% bahkan kadang-kadang bisa sampai 4% keasamannya. Baik yogurt maupun susu Bulgarian difermentasi pada suhu 40 – 45 °C.

Satu lagi produk susu fermentasi di Bulgaria adalah Brano mliake, yang menggunakan kultur starter yogurt, namun difermentasi pada suhu rendah, yaitu 15 – 20 °C selama 25 – 30 hari, dan biasanya produksi yang dilakukan pada bulan September dan Oktober citarasanya prima, karena pada saat itu suhu udara berkisar antara 15 – 20 °C. Penduduk yang tinggal di pegunungan bahkan membuat susu fermentasi jenis ini dalam kantong kulit.

Di Rumania dikenal “oxygala”, suatu jenis susu fermentasi yang pekat, dengan menyingkirkan whey. Susu fermentasi yang dikenal di Rumania adalah yogurt, susu asam asidofilus, kefir dan susu asam yang dibuat dari susu skim.



Tabel 27. Berbagai jenis susu fermentasi yang dikenal di Asia dan kultur starter

Jenis Produk	Kultur starter	Negara Asal
Susu asidofilus*	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Eropa
Dahi <sup>a</sup>	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	India
Dadih <sup>a</sup>	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> <i>Leuconostoc paramesenteroides</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> <i>Lactobacillus brevis</i>	Indonesia
Kefir <sup>a</sup>	<i>Lactobacillus kefir</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Candida kefir</i>	Rusia, Eropa Timur
Koumiss <sup>a</sup>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Saccharomyces lactis</i> <i>Torula koumiss</i>	Rusia
Calpis*	<i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Jepang
Yakult*	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	Jepang
Yogurt*	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Timur Tengah, Asia, Afrika, Eropa
Sanyuu	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mongolia
Tsege	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Mongolia
Airag	<i>Lactobacillus kefirgranum</i>	Mongolia

Keterangan : \* diproduksi secara modern

<sup>a</sup>Suhu inkubasi 28-30°C; suhu inkubasi jenis susu fermentasi lainnya berkisar antara 37-45 °C.

Sumber : Lang and Lang (1973); Marshall (1987); Tamime and Robinson (1988), dimodifikasi

# VI. Susu Fermentasi dan Pangan Fungsional

---

Fermentasi susu melibatkan bakteri asam laktat dan menghasilkan produk-produk olahan susu (*dairy product*) seperti yogurt, yakult, keju, susu asam, mentega (*butter*), dan produk sejenis lainnya.

Sebagaimana produk makanan fermentasi lainnya, produk-produk tersebut di atas rasanya enak, dan lebih awet dibanding susu segar, karena proses fermentasi menghasilkan citarasa dan aroma yang enak, serta kandungan nutrisinya lebih baik karena mudah diserap dan dicerna.

Bakteri asam laktat yang terlibat dalam proses fermentasi susu juga bisa memberikan manfaat positif bagi kesehatan, khususnya menjaga keseimbangan mikroflora dalam saluran pencernaan. Produk akhir susu fermentasi yang demikian dikenal sebagai makanan fungsional.

## A. Pangan Fungsional

Saat ini, konsep penilaian makanan tidak hanya berdasarkan citarasa enak dan bergizi serta aman untuk dikonsumsi saja, tetapi diharapkan mampu memberikan manfaat positif dalam mencegah atau menanggulangi berbagai penyakit, dan dikenal sebagai makanan fungsional.

Kementrian Kesehatan dan Kesejahteraan Jepang mengidentifikasi 12 komponen bahan pangan yang dikategorikan dapat meningkatkan kesehatan, dan bakteri asam laktat termasuk salah satu diantaranya. Komponen bahan pangan ini bisa terkandung secara alami dalam bahan pangan, atau dapat dihasilkan dengan melibatkan proses bioteknologi. Saat ini di Jepang lebih spesifik lagi menjabarkan makanan fungsional sebagai Food For Specified Health Use (FOSHU), yaitu makanan yang digunakan untuk tujuan kesehatan yang tertentu, dan probiotik serta prebiotik termasuk di dalamnya.

Manfaat kesehatan yang berkaitan dengan bakteri asam laktat, diantaranya memperbaiki daya cerna laktosa, mengendalikan bakteri patogen dalam saluran pencernaan, penurunan serum kolesterol, menghambat tumor, antimutagenik dan antikarsinogenik, menstimulir sistem imun, pencegahan sembelit, produksi vitamin B, produksi

bakteriosin dan inaktivasi berbagai senyawa beracun.

Industri pangan dewasa ini mengarahkan produk-produk barunya lebih spesifik sebagai makanan fungsional dan komponen makanan fungsional menjawab kebutuhan konsumen terhadap makanan yang lebih menyehatkan. Munculnya fenomena probiotik menyebabkan semakin meningkatnya pemanfaatan bakteri probiotik sebagai komponen utama makanan fungsional, dan diperkenalkan istilah baru yang lebih sederhana, yaitu makanan probiotik.

Makanan probiotik terbukti efektif dalam menangani berbagai penyakit seperti tukak lambung, diare, intoleransi terhadap laktosa, alergi makanan, dan juga kanker saluran pencernaan (Zubillaga dkk., 2001). Salah satu dari berbagai studi terhadap makanan probiotik dilakukan oleh Heenan dkk (2002), yang menambahkan bakteri probiotik ke dalam makanan vegetarian. Shimakawa dkk. (2003) menumbuhkan *Bifidobacterium breve* strain Yakult ke dalam susu kedelai sebagai makanan fungsional.

Bakteri asam laktat menghasilkan berbagai senyawa metabolit lainnya disamping asam laktat, di antaranya adalah hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) - karena tidak memiliki enzim katalase yang bisa memecah  $H_2O_2$ , bakteriosin, enzim  $\beta$ -galactosidase, enzim *Bile Salt Hidrolase*, berbagai jenis vitamin, eksopolisakarida (EPS), peptida spesifik dalam  $\beta$ -casein (Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pr-Gln), dan asam lemak rantai pendek, yang jumlahnya spesifik pada tiap strain bakteri. Berbagai jenis senyawa metabolit ini umumnya memberikan manfaat positif terhadap kesehatan manusia, yaitu menjaga keseimbangan mikroflora saluran pencernaan dan mencegah berbagai penyakit degeneratif.

Disamping senyawa metabolit yang dihasilkan, bakteri asam laktat sendiri juga memegang peranan dalam meningkatkan kesehatan, terutama dinding sel bakteri asam laktat diketahui dapat mengikat senyawa mutagen dan karsinogen pemicu kanker, dan juga dapat menyerap kolesterol, yaitu membran selnya.

Dewasa ini, aplikasi probiotik dalam makanan fungsional tidak hanya terbatas pada produk olahan susu, tetapi sudah berkembang ke produk-produk makanan baru seperti fermentasi sereal, makanan formula bayi, jus buah, fermentasi produk-produk kedelai, dan berbagai makanan yang bersifat menanggulangi penyakit (Lee and Salminen, 1995)

Berbagai reaksi metabolisme bakteri asam laktat yang memberikan manfaat positif bagi kesehatan diantaranya adalah sebagai berikut :

## 1. Aktivitas antibakteri

Hidrogen peroksida, asam organik dalam hal ini terutama asam laktat, dan bakteriosin bersifat antimikroba terhadap bakteri patogen, sehingga berfungsi sebagai senjata pamungkas bakteri kompetitor yang tidak dikehendaki semisal bakteri patogen, dalam saluran pencernaan.

Bakteriosin merupakan senyawa metabolit sekunder, dihasilkan pada fase stasioner yaitu rata-rata setelah 24 jam inkubasi, dengan demikian peranannya akan lebih baik, apabila bakteri asam laktat terus menerus disuplai dan mampu melekat pada sel epithelial serta melakukan kolonisasi di usus, mengingat perjalanan makanan maupun bakteri hanya membutuhkan waktu kira-kira 12 jam dari mulut ke rektum, sehingga konsumsi bakteri probiotik harus dilakukan secara rutin setiap hari. Bakteriosin digunakan sebagai biopreservasi berbagai jenis makanan seperti keju, ikan segar dan berbagai jenis pikel buah dan sayuran.

Bakteri fakultatif anaerobik menjaga potensial redoks (Eh) dalam usus tetap rendah karena segera memanfaatkan oksigen yang masuk ke dalam usus. Bayi yang baru lahir, beberapa hari setelah itu dalam saluran pencernaan akan ditemui bakteri aerobik, setelah bayi berhubungan dengan dunia luar. Pertumbuhan bakteri ini menurunkan potensial redoks, membuat suasana menjadi anaerob dan mendukung pertumbuhan *Bifidobacteria*, *Bacteroides* dan *Eubacteria*.

Asam organik sebagai produk utama hasil fermentasi dalam saluran pencernaan akan menghambat masuknya bakteri “jahat”. Asam laktat menurunkan keasaman (pH) usus, sehingga tidak sesuai bagi pertumbuhan bakteri “jahat” dan menjadi kalah bersaing dengan bakteri “baik”. Makanan fermentasi yang melibatkan bakteri asam laktat seperti yogurt, yakult, berbagai pikel buah dan sayuran lebih awet ketimbang bentuk segarnya.

Efek antagonistik atau antibakteri bakteri asam laktat ada dua kelompok besar, yaitu berupa metabolit primer yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat seperti asam laktat, CO<sub>2</sub>, diasetil, asetaldehida dan hidrogen peroksida; dan bakteriosin suatu senyawa protein yang menunjukkan aktivitas antibakterial terhadap bakteri sejenis.

Produksi asam dan rendahnya Eh potensial, merupakan kondisi yang mendukung bakteri asam laktat untuk menang bersaing dalam pertumbuhan, dan didukung dengan kemampuan melekat pada sel epithelial usus, akan membantu menekan pertumbuhan bakteri “jahat” dalam usus.

Dengan adanya oksigen, bakteri asam laktat akan memproduksi

hidrogen peroksida dengan bantuan enzim-enzim flavoprotein oksidase, yaitu NADH oksidase dan superoksida dismutase. Efek bakterisidal, yaitu membunuh bakteri dari hidrogen peroksida adalah akibat daya oksidasi yang sangat kuat pada sel bakteri; gugus sulfhidril dari protein sel dan membran lipid bisa dioksidasi. Hidrogen peroksida juga dapat mengikat oksigen, sehingga menyebabkan kondisi anaerob yang tidak disukai oleh bakteri aerob.

Dalam susu terkandung laktoperoksidase dan thiosianat (SCN<sup>-</sup>). Hidrogen peroksida akan mengoksidasi thiosianat dengan bantuan enzim laktoperoksidase menghasilkan hipothianit (OSCN<sup>-</sup>), yang merusak dan mengubah struktur membran bakteri. Efek antibakteri terutama disebabkan oleh penghambatan glikolisis, sehingga menghambat transpor glukosa akibat teroksidasinya gugus sulfhidril pada metabolik enzim. Hidrogen peroksida bersifat bakteristatik terhadap bakteri gram positif termasuk bakteri asam laktat, dan bakterisidal kuat terhadap bakteri gram negatif.

Bakteri asam laktat heterofermentatif menghasilkan CO<sub>2</sub> yang memiliki efek antimikroba ganda: menciptakan kondisi anaerobik, dan CO<sub>2</sub> sendiri bersifat antibakteri karena menghambat dekarboksilasi enzimatik.

Diasetil diidentifikasi oleh Niel dkk. (1929) sebagai komponen aroma dan flavor dalam mentega. Diasetil, dihasilkan oleh strains dari *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, dan *Streptococcus*, dan beberapa jenis mikroba lainnya, senyawa ini juga mempunyai aktivitas antimikroba terhadap *Bacillus* sp. Metabolisme sitrat menjadi diasetil melalui jalur piruvat. Menurut Jay (1982), diasetil lebih efektif pada pH asam. Glukosa, asetat dan Tween 80 akan menurunkan daya antimikrobanya. Diasetil lebih efektif menghambat bakteri gram negatif, kapang dan khamir dibanding bakteri gram positif, dan bakteri asam laktat paling tidak sensitif. Diasetil mengintervensi pemanfaatan arginin pada bakteri gram negatif.

Bifidobakteria juga menghasilkan senyawa antagonistik yang menghambat pertumbuhan bakteri lain, akibat produksi asam asetat dan asam laktat selama pertumbuhannya. Berbagai spesies bakteri Bifidobakteria menghambat pertumbuhan bakteri "jahat", dan *Bifidobacterium infantis* dan *Bifidobacterium longum* dilaporkan menghasilkan senyawa antibakteri yang potensial terhadap berbagai jenis bakteri patogen. *Bifidobacterium infantis* NCFB 2255 dan *Bifidobacterium breve* NCFB 2258 menghasilkan jenis antimikroba yang berbeda, yaitu masing-masing berupa senyawa sejenis protein yang menghambat bakteri

gram positif, dan senyawa non protein yang menghambat bakteri gram negatif.

## **2. Metabolisme laktosa**

Laktosa, kandungan gula utama pada susu seringkali tidak tercerna dengan sempurna baik akibat penyakit saluran pencernaan maupun penurunan kondisi fisik dengan bertambahnya usia, sehingga aktivitas laktase dalam usus menurun.

Bangsa Asia dan Afrika umumnya kekurangan enzim laktase (*β-galactosidase*) yang berfungsi memecah laktosa. Prevalensi kondisi rendahnya enzim laktase pada orang dewasa bervariasi diantara populasi dan ras dari orang Australia dan Oceania, Asia Timur dan Asia Tenggara, tropis Afrika dan Amerika. Sedangkan populasi yang tinggal di Eropa Tengah dan Utara umumnya laktase persistant, yang semakin rendah dengan semakin ke bagian Selatan, pada bangsa nomad (yang berpindah-pindah tempat) di Afrika Utara dan Saudi Arabia. Secara keseluruhan, 70-90 persen orang dewasa di dunia dan 30– 50 persen orang dewasa di Eropa kekurangan laktase dalam saluran pencernaannya.

### **a. Pencernaan laktosa**

Laktosa suatu gula susu, disakarida yang hanya dijumpai di susu. Terdiri dari galaktosa dan glukosa yang dihubungkan dengan ikatan β-1,4. Kandungan laktosa pada ASI rata-rata 70g/l, sedangkan susu sapi 45 g/l. Untuk bisa dicerna, laktosa harus dihidrolisis terlebih dahulu oleh enzim laktase menjadi glukosa dan galaktosa sehingga bisa diserap.

Enzim laktase dalam usus dikenal sebagai lactase-phlorizin hydrolase (LPH) (EC 3.2.1.23-3.2.1.62). Aktivitas LPH yang tinggi dijumpai dalam jejunum, sedangkan dalam duodenum dan ileum tidak dijumpai atau rendah aktivitasnya. Bayi yang lahir premature mula-mula aktivitas LPH-nya lebih rendah dibanding bayi yang lahir normal. Pada saat bayi diberi makanan tambahan, aktivitas LPH berkurang 10% dari ketika baru lahir. Sebaliknya, orang dewasa yang mempunyai aktivitas laktase yang tinggi nampaknya karena adanya peningkatan biosintesis laktase.

### **b. Faktor yang mempengaruhi pencernaan laktosa**

Pencernaan laktosa dipengaruhi oleh tiga faktor yaitu pencernaan/absorpsi permukaan, jumlah laktase dan laju transit dalam saluran pencernaan. Pencernaan/absorpsi laktosa akan

menurun pada penderita penyakit akut atau kronis.

Regulasi aktivitas laktase mempengaruhi jumlah laktase. Aktivitas laktase dalam usus tidak dapat distimulir oleh laktosa, dan penurunan jumlah laktase secara alami tidak bisa dicegah dengan pemberian laktosa. Penurunan aktivitas laktase bisa disebabkan oleh adanya protease pankreatik, ataupun protease bakterial dalam usus halus apabila bakteri yang memiliki protease tumbuh dengan pesat.

Dengan demikian anggapan bahwa bangsa Asia dan Afrika kekurangan enzim laktase dalam tubuhnya dan bangsa Barat memiliki cukup enzim laktase karena kebiasaan minum susu yang berbeda, di mana bangsa Barat lebih banyak mengkonsumsi susu adalah tidak benar, sebab laktase usus tidak dapat distimulir oleh laktosa, dan kenyataannya 70-90 persen orang dewasa di dunia kekurangan laktase dalam ususnya.

Menurut Sahi (1994) dan Flatz (1995), hubungan antara awal pemberian makanan padat dan mulai menurunnya aktivitas enzim laktase bukan merupakan hubungan sebab akibat. Bagi orang yang kekurangan enzim laktase, waktu transit atau laju laktosa ke dalam jejunum dimana LPH mencapai aktivitas tertinggi, ditentukan oleh pengosongan perut. Faktor yang menunda kosongnya perut memperbaiki pencernaan laktosa. Hal ini dapat menjelaskan mengapa laktosa dari susu full cream lebih baik dicerna ketimbang laktosa dari susu skim, dan juga bahwa laktosa yang dikonsumsi bersama-sama dengan bubuk coklat atau serat pangan ataupun makanan padat lebih mudah dicerna ketimbang laktosa saja.

### **c. Ketidaksempurnaan pencernaan laktosa**

Pada orang dewasa, enzim laktase semakin berkurang dengan bertambahnya usia seseorang. Faktor lain yang juga berakibat intoleransi terhadap laktosa adalah penyakit perut akut atau kronik yang disebabkan oleh virus (rotavirus diare), bakterial, atau parasit, kekurangan kalori protein, alergi susu sapi, pesatnya pertumbuhan bakteri “jahat” pada usushalus, sehingga transit laktosa di usus menjadi terlalu cepat.

Laktosa yang tidak bisa dihidrolisis menimbulkan efek osmosis yang menstimulir sekresi air dan natrium. Absorpsi nutrisi lainnya seperti protein, kalsium, magnesium dan fosfat juga terjadi sebagaimana terdeteksi banyaknya nutrisi tersebut dalam ileum penderita intoleransi laktosa, setelah minum susu.

Laktosa juga akan masuk ke dalam usus besar dan akan digunakan baik oleh bakteri laktat maupun bakteri *E. coli* dan bakteri usus lainnya, akibatnya populasi *E. coli* lebih banyak ketimbang bakteri laktat, akan menang bersaing sehingga terjadi diare. Apabila *E. coli* yang dominan termasuk ke dalam enterotoksigenik *E. coli* (ETEC), akan dihasilkan toksin yang selain menstimulir diare juga keracunan. *Lactose intolerance* merupakan akibat dari malabsorpsi atau maldigesti laktosa. Penderita *lactose intolerance* biasanya menjadi kembung dan flatulensi karena hasil metabolisme *E. coli* adalah gas H<sub>2</sub> dan CO<sub>2</sub>, namun *E. coli* tidak menghasilkan H<sub>2</sub>S. Pada beberapa orang bahkan terbentuk gas metan (CH<sub>4</sub>).

Berapa batas toleransi laktosa penderita *lactose intolerance*? Hanya sedikit sekali yang tidak bisa mentoleransi laktosa 3 gram atau kurang. Newcomer dan McGill (1984) menyatakan rata-rata intoleransi terhadap 1 gelas besar susu (mengandung 12 g laktosa) adalah 19 persen dari 14 studi yang dilakukan, di antara para penderita maldigesti laktosa, dengan kisaran yang cukup luas, yaitu 0 – 75 persen.

Menurut Suarez dkk. (1997) orang yang menyatakan dirinya menderita *lactose intolerance* masih bisa mentoleransi dua gelas susu per hari bila dikonsumsi secara terpisah, pada saat sarapan dan makan malam. Beberapa penelitian membuktikan bahwa mengganti susu dengan produk-produk susu fermentasi mengurangi gejala pada penderita *lactose intolerance*.

Hipolaktasia atau rendahnya enzim laktase pada orang dewasa juga ditentukan oleh sifat genetik. Dengan sistem Mendel dapat dijelaskan, gen LPH berada dalam khromosom 2. Gen LAC\*R (*lactase restriction gene*) mengakibatkan kekurangan laktase, dan gen LAC\*P (*lactase persistence gene*) penyebab persisten terhadap laktosa.

Gallagher, Molleson dan Calwell (1974) yang pertama kali membuktikan toleransi yang lebih baik terhadap laktosa dari produk-produk fermentasi susu pada manusia. Penjelasan yang diberikan adalah bahwa bakteri asam laktat terus melanjutkan aktivitas laktasinya dalam usus setelah dikonsumsi, atau bisa juga sebagai akibat penundaan pengosongan perut dan gerak peristaltik usus. Hasil riset lainnya juga mendukung pernyataan Gallagher dkk.



Sepuluh tahun kemudian, Gilliland dan Kim melaporkan pertama kali bahwa pencernaan laktosa menjadi lebih baik setelah mengonsumsi yogurt yang mengandung bakteri hidup dibanding dengan yogurt yang dipasteurisasi. Savaiano dkk. (1984) juga mengkonfirmasi dengan memberikan kepada dua kelompok obyek penelitian masing-masing yogurt mengandung bakteri hidup ( $3 \times 10^8/g$ ) dan mengandung laktase 0,64 unit/g) dan yogurt pasteurisasi yang hanya mengandung bakteri hidup kurang dari  $3,4 \times 10^6/g$  dan laktase yang hanya 0,07 unit/g.

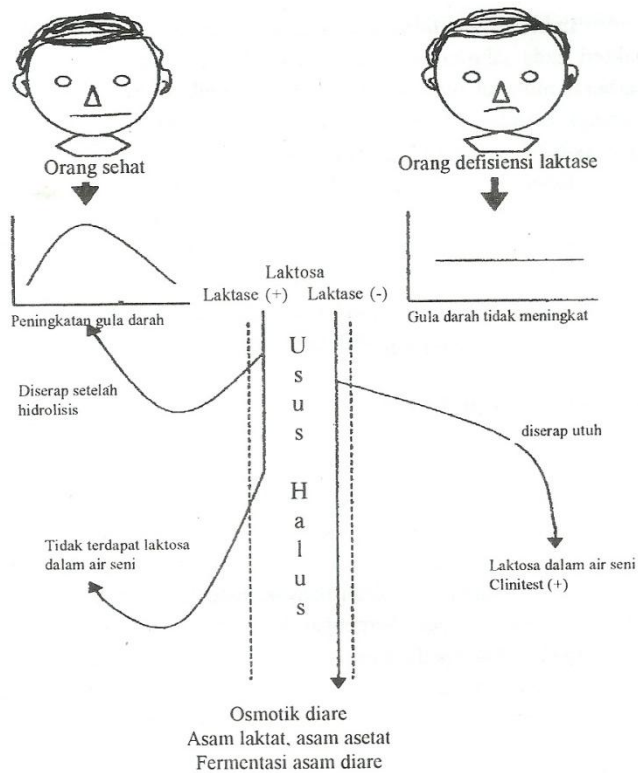
Selama fermentasi susu, sebagian laktosa terhidrolisis, dan enzim  $\beta$ -galactosidase yang dihasilkan oleh bakteri yogurt ditemui dalam duodenum yaitu bagian atas dari usus halus dan *ileum* (bagian ujung usus halus) setelah mengonsumsi yogurt yang mengandung bakteri hidup akan melanjutkan pekerjaannya dalam *ileum*. Konsumsi yogurt yang tidak dipasteurisasi lebih efektif dalam memperbaiki pencernaan laktosa bagi penderita *lactose intolerance* karena mengandung bakteri yang masih hidup.

Bakteri asam laktat menghasilkan enzim laktase yang jumlahnya berbeda pada tiap strain bakteri laktat, dan *S. thermophilus* aktivitas laktase nya relatif lebih tinggi dibanding *L. acidophilus* dan *Bifidobacterium*, sedangkan *Lactobacillus gasseri* sangat minim aktivitas laktasenya (Tabel 28).

Minissi dkk. (1992) mempelajari aktivitas enzim  $\beta$ -galactosidase bakteri yogurt *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus* dan membuktikan bahwa enzim lactase merupakan enzim endoseluler, sebab rata-rata konsentrasinya lebih tinggi pada sel yang disonikasi (enzim dikeluarkan setelah dinding sel dihancurkan), yaitu 24,4 UE ( $\mu\text{mol ONP}/\text{menit} \times \text{g}$ ) dibanding sel yang tidak disonikasi, hanya sekitar 23 % nya, yaitu 5,6 UE ( $\mu\text{mol ONP}/\text{menit} \times \text{g}$ ).

Hasil riset McDonough dkk. (1987) juga mendukung fenomena ini sehingga muncul hipotesis bahwa dengan adanya garam empedu, maka toleransi terhadap garam empedu membatasi masuknya laktosa ke dalam sel bakteri untuk dihidrolisis, mengingat laktase adalah enzim endoseluler.

Metabolisme dan absorpsi laktosa dapat dilihat pada Gambar 20.



Gambar 20. Metabolisme dan absorpsi laktosa

Intoleransi terhadap laktosa adalah sebagai akibat dari kurang atau tidak adanya aktivitas enzim laktase ( $\beta$ -galactosidase) dalam saluran usus. Pada orang yang sehat dan normal enzim laktasanya,  $\beta$ -galactosidase terdapat pada sel mukosa usus halus dan mengurai laktosa, yang kemudian diserap ke dalam darah dalam bentuk monosakarida, sehingga gula darah meningkat dan laktosa tidak lolos ke dalam air seni.

Pada orang yang kurang atau tidak mempunyai  $\beta$ -galactosidase, laktosa akan lolos ke dalam air seni, sebab laktosa diserap dalam bentuk utuh. Dan tentunya tidak ada peningkatan gula darah.

Laktosa yang tidak diserap akan diuraikan secara enzimatik oleh bakteri pada saluran usus halus bagian bawah menjadi asam organik berberat molekul rendah. Asam-asam organik ini bersamaan dengan meningkatnya tekanan osmotik dari laktosa yang tidak terhidrolisis akan mengakibatkan ternyadinya diare (Gambar 20).

Tabel 28 berikut menunjukkan perbedaan aktivitas laktase bakteri laktat dan *Bifidobacterium* dengan mengukur senyawa *o*-nitrofenil yang dihasilkan oleh enzim laktase pada substrat ONPG.

Ada tiga penjelasan mengenai daya cerna yang lebih baik terhadap laktosa, pentingnya peranan bakterial laktase yang ada dalam usus, transit saluran pencernaan yang lebih lama, dan stimulasi laktase endogen.

Tabel 28. Perbedaan aktivitas enzim laktase berbagai jenis bakteri asam laktat dan Bifidobacteria

Genus dan spesies	Strain	Aktivitas laktase*
<i>L. gasseri</i>	LE1	<0,01
<i>L. acidophilus</i> (A1)	LF1	4,62
<i>L. johnsonii</i> (B2)	LG1	4,73
<i>L. johnsonii</i> (B2)	LG9	0,02
<i>L. acidophilus</i> (A1)	LH1	4,43
<i>L. gallinarum</i> (A4)	LH7	1,11
<i>B. longum</i>	BE1	5,53
<i>B. animalis</i>	BF1	2,44
<i>B. longum</i>	BG1	4,93
<i>B. longum</i>	BG9	1,95
<i>B. bifidum</i>	BH1	1,53
<i>S. thermophilus</i>	SF1	77,2
<i>S. thermophilus</i>	SF8	189,0
<i>S. thermophilus</i>	SH1	26,4
<i>S. thermophilus</i>	SH7	11,8
<i>S. thermophilus</i>	SG1	36,5
<i>S. thermophilus</i>	SG9	44,9

\*Mikrogram *o*-nitrofenil x 10<sup>-7</sup>/cfu per menit

Sumber : Sanders dkk., 1996

#### d. Mekanisme perbaikan daya cerna laktosa

Mekanisme toleransi dan daya cerna laktosa yang lebih baik dengan mengkonsumsi produk susu fermentasi dapat dijelaskan dengan tiga hipotesis, yaitu: 1) bahwa kandungan laktosa pada susu fermentasi lebih rendah dibandingkan dengan susu akibat aktivitas  $\beta$ -galaktosidase dari kultur starter. Namun demikian banyak penelitian yang membuktikan masih ada faktor lain yang berpengaruh, yaitu: 2) perubahan sensitivitas usus tanpa berubahnya daya cerna laktosa, dan 3) daya cerna yang lebih baik dari yogurt dan susu fermentasi lainnya, yang lebih dipertimbangkan menjadi mekanisme utama toleransi terhadap laktosa.

#### **d.1. Peranan bakteri transit**

Bakterial laktase tidak aktif pada pH sangat rendah sebagaimana pH lambung. Yogurt mengandung buffer yang prima, karena kandungan kasein, laktat dan kalsium fosfatnya, sehingga setelah konsumsi yogurt maka pH dalam lambung tetap dijaga berada di atas 2,7 selama 3 jam.

Bakterial laktase adalah enzim intraselular, sehingga untuk dapat mencerna substrat dalam hal ini laktosa harus masuk ke dalam sel bakteri melalui sistem permease, atau laktase harus dilepaskan melalui lisis bakteri. Bakteri yogurt tidak toleran terhadap asam empedu dan akan segera mati dalam usus halus karena asam empedu merusak struktur selnya. Sensitivitas bakteri yogurt terhadap asam empedu dalam hal ini berkontribusi positif dalam membantu pengiriman laktase yang aktif ke dalam saluran usus. Dengan demikian, bakteri probiotik seperti *L. gasseri* yang aktivitas laktasanya rendah dan resistan terhadap asam empedu kurang efisien dalam mengatasi daya cerna laktosa ketimbang bakteri yogurt (Tabel 28).

#### **d.2. Penundaan transit gastrointestinal**

Penundaan kosongnya lambung, akan memberikan kesempatan bagi LPH endogen untuk aktif dan memperbaiki daya cerna laktosa. Marteau dkk. (1991) mengukur laju pengosongan lambung pada orang setelah mengkonsumsi susu dan yogurt. Ternyata, laju pengosongan lambung setelah mengkonsumsi yogurt lebih lambat ketimbang susu, artinya yogurt lebih lama berada dalam lambung ketimbang susu. Komposisi makanan termasuk nilai kalori, kandungan lemak, protein dan pH mempengaruhi laju pengosongan lambung. Bentuk semi padat yogurt menyebabkan penundaan pengosongan lambung.

#### **d.3. Stimulasi laktase endogen**

Konsumsi yogurt menstimulir aktivitas laktase dalam usus. Besnier dkk.(1983) meneliti aktivitas laktase usus tikus yang meningkat setelah diberi diet yang ditambahkan yogurt. Demikian juga Collington, Parker dan Armstrong (1990) melaporkan bahwa terapi probiotik yang mengandung campuran *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei* dan *Enterococcus faecium* sedikit meningkatkan aktivitas enzim-enzim laktase, sukrase dan tripeptidase pada hewan percobaan anak babi sebelum diberi

makanan tambahan. Namun demikian, penelitian pada manusia yang dilakukan oleh Lerebours dkk.(1989), menyatakan bahwa pemberian 125 g yogurt yang mengandung bakteri hidup *L. bulgaricus*, dan *S. thermophilus* tiga kali sehari selama 8 hari tidak memberikan peningkatan aktivitas laktase dalam usus secara nyata pada 16 orang penderita hipolaktasia.

Mekanisme yang menjelaskan perbaikan daya cerna laktosa oleh bakteri asam laktat tidak melibatkan transformasi atau keterlibatan bakteri usus lainnya, sehingga lebih tepat disebut sebagai efek langsung dari bakteri laktat yang transit dalam saluran pencernaan, ketimbang efek probiotik.

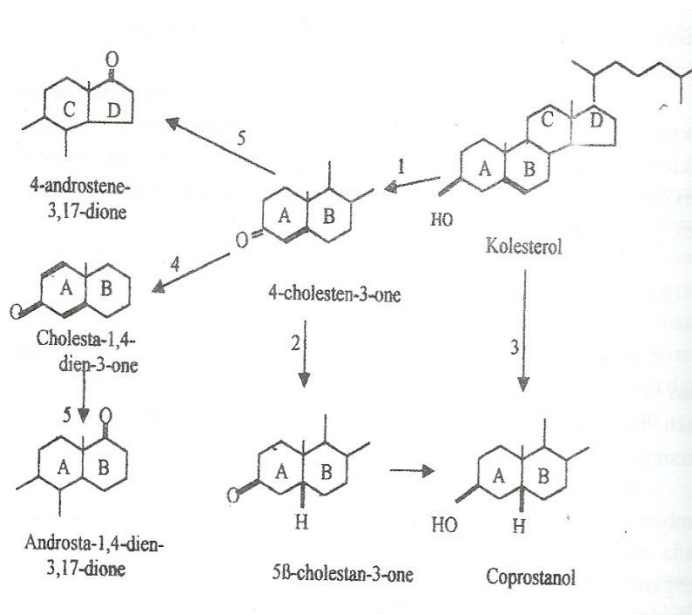
### **3. Penurunan serum kholesterol**

Konsumsi lemak yang tinggi akan meningkatkan sterol dalam usus besar dan meningkatkan sekresi garam empedu, yang selanjutnya akan dimetabolis oleh bakteri dalam usus menghasilkan senyawa karsinogenik.

Kholesterol dalam bahan pangan lewat dengan selamat melalui lambung ke duodenum, dan dalam usus dalam fase minyak triasilgliserol. Pada manusia, laju penyerapan kholesterol secara bertahap menurun dengan meningkatnya konsumsi kholesterol, dan absorpsi maksimum per hari adalah 2 gram. Asam empedu disekresikan oleh empedu sebagai respons adanya lemak pangan.

Asam empedu diabsorb dari bagian bawah ileum dan kembali ke hati. Ini adalah sirkulasi hepatis. Kumpulan asam empedu di hati, kira-kira 3 – 5 gram disirkulasikan 6 – 10 kali per hari. Tiap kali, kira-kira 1 persen, yaitu sekitar 500 mg per hari lolos dari absorpsi dan disekresikan melalui feses. Lebih lanjut, kholesterol tubuh disekresikan melalui usus oleh dinding usus. Metabolisme kholesterol oleh bakteri usus dapat dilihat pada Gambar 21.

Tergantung dari jenis makanannya, kira-kira 50 persen sterol netral dalam feses dalam bentuk coprostanol, yang dihasilkan oleh bakteri usus *Eubacterium*. *E. coli* yang diisolasi dari penderita kanker usus dapat memecah rantai kholesterol.



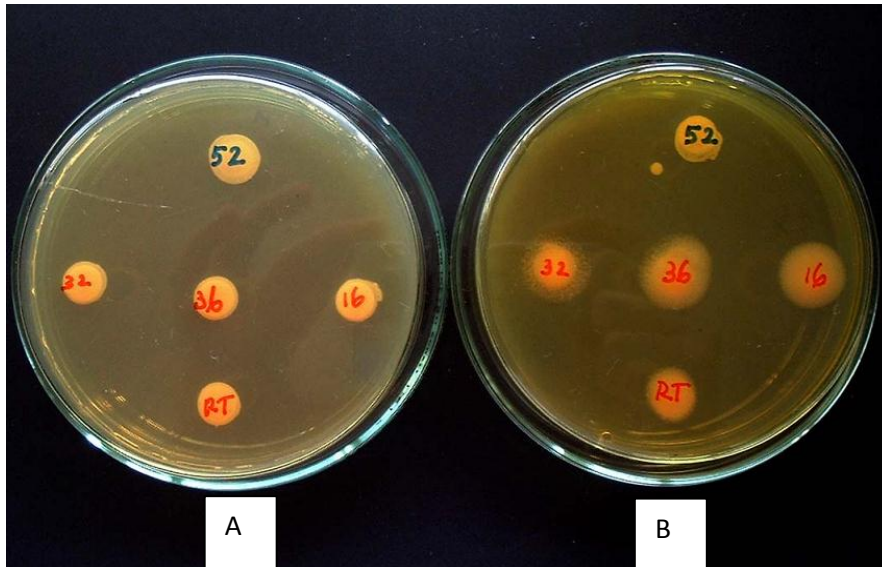
Gambar 21. Metabolisme kolesterol oleh bakteri usus

Salah satu penyebab utama risiko penyakit jantung koroner adalah hiperkholesterolemia, yaitu tingginya kadar kolesterol dalam darah. Kolesterol dan garam empedu sangat berkaitan erat. Garam empedu merupakan produk akhir dari metabolisme kolesterol larut air dibuang, sehingga digunakan kolesterol yang ada untuk membentuk garam empedu lagi, sehingga kandungan kolesterol berkurang. Garam empedu terkonjugasi bisa ditransformasi oleh aktivitas enzimatis beberapa bakteri usus selama sirkulasi enterohepatik.

Berbagai mekanisme terjadinya penurunan kolesterol oleh bakteri asam laktat telah banyak dibuktikan dalam riset. Enzim *bile salt hidrolase* (BSH) (E.C.3.5.1.24) bertanggung jawab terhadap dekonjugasi asam empedu, di mana glisin atau taurin dipisahkan dari steroid, sehingga menghasilkan garam empedu bebas atau terdekonjugasi. *Bile Salt Hidrolase* (BSH) dimiliki oleh beberapa strain bakteri saluran pencernaan seperti *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus* dan *Bacteroides*.

Gambar 22 menunjukkan aktivitas BSH secara *in vitro* pada berbagai jenis bakteri asam laktat, pada Gambar cawan petri sebelah kanan terlihat endapan sekitar beberapa strain bakteri asam laktat yang diuji, karena asam kholat hasil dekonjugasi oleh enzim BSH, dengan  $\text{CaCl}_2$  akan membentuk

garam yang mengendap.



Keterangan : Aktivitas bile salt hidrolitik (BSH) dengan metoda spot test menggunakan kertas cakram steril. A : MRS sebagai kontrol, dan B : MRS yang diberi 0,5% TDCA dan 0,37 g/l  $\text{CaCl}_2$ . (RT): *S. thermophilus* Rolly T; (16) *L. brevis* IS-26958, (52) *L. casei* IS-7257, (32) *Lc. lactis* subsp. *lactis* IS-11857, and (36) *Lc. lactis* subsp. *lactis* IS- 10285

Gambar 22. Aktivitas enzim Bile Salt Hydrolase (BSH) *in vitro*.

Mann dan Spoerry (Mann, 1977) adalah yang pertama kali melaporkan efek hipokolesterolemik atau penurunan kolesterol oleh susu yang difermentasi dengan indigenus *Lactobacilli* ssp. suku Maasai. Grunewald (1982) melaporkan potensial susu fermentasi yang melibatkan *Lb. acidophilus* dalam menurunkan serum kolesterol pada tikus secara *in vivo*. Berbagai peneliti lain juga melaporkan aktivitas penurunan kolesterol oleh susu fermentasi (Agarbæk dkk., 1995; Akalin dkk., 1997; Kawase dkk., 2000).

Riset *in vitro* menunjukkan bahwa bakteri asam laktat asal dadih memperlihatkan potensi pengikatan kolesterol (Hosono and Tono-oka. 1995; Surono, 2002; Usman, 2003). Penurunan serum kolesterol dan LDL kolesterol pada tikus setelah pemberian susu yang diinokulasi oleh *Lactococcus* IS-10285 asal dadih sebagaimana yang diperlihatkan pada uji

*in vitro* menghasilkan enzim BSH pada Gambar 22 (Surono, 2003). Enzim BSH menghasilkan asam empedu terdekonjugasi, dalam bentuk asam kholat bebas yang kurang diserap oleh usus halus dibanding asam empedu terkonjugasi (Schiff dkk., 1972). Dengan demikian asam empedu yang kembali ke hati selama sirkulasi enterohepatik menjadi berkurang, sehingga total kolesterol dalam tubuh menjadi berkurang.

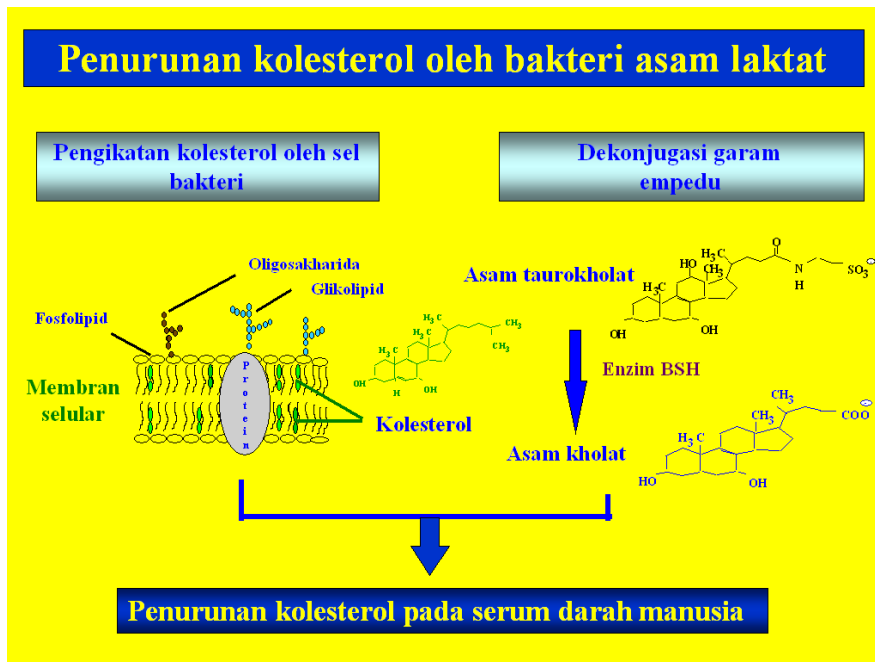
Hipotesa para peneliti adalah bahwa dekonjugasi garam empedu membantu menurunkan kadar kolesterol karena garam empedu yang tidak terikat (dekonjugasi) akan lebih mudah terbuang dari saluran pencernaan dibanding garam empedu yang terkonjugasi. Penelitian lain juga membuktikan bahwa garam empedu yang terdekonjugasi tidak diserap oleh usus.

Garam empedu terbuang melalui feses dan mengakibatkan semakin banyak kolesterol yang dibutuhkan untuk mensintesis garam empedu lagi sehingga menurunkan kadar kolesterol. Pada tahun 1994, De Smet dkk. membuat hipotesis bahwa *Lactobacillus* dengan aktivitas BSH yang tinggi bisa menurunkan kadar kolesterol, dan satu tahun kemudian mereka membuat hipotesis lain bahwa aktivitas BSH merupakan faktor penting bagi toleransi terhadap asam empedu. Dengan demikian, *Lactobacillus* dengan aktivitas BSH tinggi cukup beruntung untuk dapat bertahan dan mengkolonisasi usus halus bagian bawah di mana siklus enterohepatik terjadi.

Beberapa jenis bakteri asam laktat bahkan dinding selnya mampu mengikat kolesterol dalam usus halus sebelum kolesterol diserap oleh tubuh. *Lactobacillus acidophilus* yang umumnya terdapat dalam saluran pencernaan orang dewasa sehat, termasuk salah satu jenis bakteri asam laktat yang mampu mengikat kolesterol dalam selnya. Noh dkk.(1997) melaporkan bahwa membran sel bakteri berperan dalam mengikat kolesterol.

Mekanisme penurunan kolesterol oleh bakteri asam laktat untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 23 berikut.

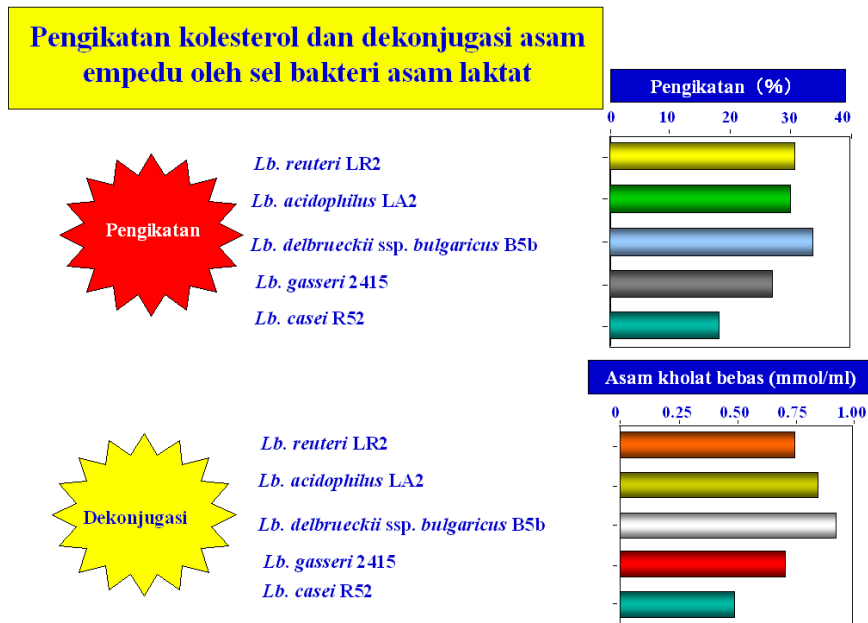




Gambar 23. Mekanisme peranan bakteri laktat dalam penurunan kadar kolesterol

Peneliti lain, Klaver dan van der Meer (1993) mengindikasikan bahwa berkurangnya kolesterol pada media pertumbuhan *L. acidophilus* yaitu media cair kaldu MRS dengan sejumlah tertentu garam empedu dan kolesterol, adalah karena terjadinya ko-presipitasi kolesterol dengan garam empedu dalam kondisi asam.

Penelitian du Toit dkk. (1998), membuktikan secara *in vivo* pada anak babi, bahwa bakteri probiotik *Lactobacillus johnsonii* BFE 1059, *Lactobacillus reuteri* BFE 1058, dan *Lactobacillus johnsonii* BFE 1061 yang diisolasi dari feses babi berperan nyata menurunkan kadar serum kolesterol setelah 3 minggu, disertai dengan peningkatan kadar air feses dan jumlah sel bakteri *Lactobacillus* dalam feses.



Gambar 24. Pengikatan kolesterol dan dekonjugasi asam empedu oleh berbagai jenis bakteri asam laktat (Hosono, 2001)

Gambar 24 memperlihatkan bahwa *Lactobacillus reuteri* LR2 mampu mengikat kolesterol sebesar 30% secara *in vivo*, sekaligus mendekonstruksi asam empedu menjadi asam kholat bebas, demikian juga halnya dengan *Lactobacillus acidophilus* LA2, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B5b dan *Lactobacillus gasseri* 2415.

#### 4. Aktivitas antikarsinogenik

Virus, radiasi dan senyawa kimia bisa menyebabkan kanker, dan para peneliti berpendapat bahwa kebanyakan kanker pada manusia disebabkan oleh senyawa kimia yang terdapat di dalam atau di luar tubuh.

Diet dan penyakit kanker sangat erat hubungannya. Berbagai jenis senyawa karsinogenik dihasilkan selama proses pengolahan makanan. Para vegetarian lebih sedikit terkena risiko kanker ketimbang non vegetarian. Makanan yang tinggi lemak dan tinggi protein, serta rendah serat pangan (*dietary fiber*), seperti yang dijumpai pada makanan Barat, memberikan kontribusi positif terhadap terbentuknya senyawa karsinogenik. Makanan Asia memang lebih sehat, karena lebih banyak proporsi karbohidratnya. Sayangnya, di kota-kota besar Asia, telah terjadi pergeseran pola konsumsi

akibat kesibukan dan banyaknya tawaran berbagai restoransiap saji, sehingga generasi muda cenderung meninggalkan makanan tradisional dan lebih menyukai makanan modern.

**a. Mutagen dan Karsinogen, senyawa pemicu kanker**

Proses karsinogenesis terdiri dari dua tahapan yaitu inisiasi, yaitu modifikasi DNA oleh senyawa karsinogen kimiawi, dan promosi yaitu proses lanjutan yang menuju ke proses terjadinya kanker, seperti misalnya asap rokok.

Semenjak tahun 1949, berbagai bahan tambahan makanan kimia telah diteliti efek mutagen dan karsinogennya. Penelitian membuktikan, bahwa 85 persen senyawa mutagen juga karsinogenik. Dikhawatirkan senyawa pemicu kanker tersebut sedikit demi sedikit terakumulasi dalam tubuh, sehingga dosis sekecil apapun apabila terkandung dalam diet dalam waktu yang lama, akan berbahaya bagi kesehatan kita.

Terdapat hubungan yang sangat erat antara diet dan peluang terjadinya mutasi genetik, dan dapat dilihat dari jumlah senyawa mutagen yang terdapat dalam makanan dikonsumsi.

Senyawa pemicu kanker tersebut bisa terkandung secara alami dalam bahan makanan, merupakan cemaran dalam makanan, terbentuk dalam usus akibat aktivitas enzim yang dihasilkan oleh bakteri dalam usus, ataupun yang terbentuk akibat pengolahan makanan. Yang disebut terakhir ini, lebih mudah dihindari dengan mengendalikan diet. Sedangkan peranan bakteri usus dapat diatur dan dikendalikan untuk menekan terbentuknya senyawa karsinogen dalam saluran pencernaan.

**b. Karsinogen alami**

Senyawa karsinogen alami terkandung dalam berbagai jenis bahan makanan nabati. Hydrazine pada jamur pangan, dalam jamur champignon (*Agaricus bisporus*), terkandung 300 mg agaritine (*4-hydroxymethylphenylhydrazine*)/100g jamur. Agaritine ini apabila dimetabolis oleh jamur menjadi turunan *diazonium* akan sangat karsinogenik, sejumlah 400 ng/g mengakibatkan 30% tumor lambung pada tikus.

Kentang berwarna hijau, mengandung glikoalkaloid yang disebut *solanin* dan *chaconine*, suatu senyawa karsinogen dan menyebabkan kentang beracun. Quinon dan beberapa prekursor fenol terkandung dalam apel, pisang, roti panggang dan makanan lain yang

mengalami pencoklatan, akan menghasilkan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dan mengakibatkan oksidasi lemak dalam membran sel, dan akan mengakibatkan kerusakan DNA.

### c. Cemaran karsinogen

Beberapa jenis bahan kimia pertanian seperti pestisida yang digunakan berlebihan, akan menimbulkan residu dalam buah maupun sayuran yang karsinogenik.

Makanan Asia banyak menggunakan bumbu dapur, seperti lada, ketumbar, kayu manis dan berbagi jenis herbal seperti jahe, kencur dan lainnya. Fukuoka dkk. (1980), Nagao (1981), Hosono dkk. (1986) dan Damhoeri dkk.(1985) membuktikan bahwa dill, thyme, oregano, marjoram, biji pala, kayu manis, lada dan jahe bersifat mutagenik secara *in vitro*. Terasi daya mutageniknya separuh dari senyawa mutagen kimia Trp-P1, dan susu yang difermentasi dengan *Lactobacillus casei* subsp. *casei* R-52 asal dadih yang mengandung  $10^{10}$  cfu/ml bakteri hidup mempunyai daya antimutagenik terhadap terasi yang dipanggang sebesar 95,48 persen (Surono dan Hosono, 1996).

Aflatoksin adalah metabolit sekunder dan senyawa mutagen yang bisa terkandung dalam makanan akibat makanan tercemar oleh sejenis kapang yang namanya *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus*. Asam lemak bebas dihasilkan oleh oksidasi lemak, dan juga merupakan hasil metabolisme kapang tertentu. Ketengikan pada jagung, kacang tanah, keju, bumbu pecel serta selai kacang merupakan indikasi agar tidak dikonsumsi. Beberapa jenis kapang juga menghasilkan racun yang karsinogenik, sehingga disarankan untuk tidak mengkonsumsi makanan berjamur.

Hati ayam terutama, disinyalir kandungan aflatoksinnya tinggi, mengingat Indonesia tidak memiliki peraturan yang cukup ketat terhadap kandungan minimum aflatoksin pada pakan. Di luar negeri, ketentuan kandungan aflatoksin pada bahan pangan dan pakan sangat ketat, masing-masing tidak boleh melebihi 10 dan 20 ppb.

Hati merupakan organ yang menyaring racun, sehingga aflatoksin akan terakumulasi pada hati. Pemberian hati ayam pada balita, yang tujuannya meningkatkan asupan nutrisi dikhawatirkan malah mensuplai senyawa karsinogenik pada makhluk yang masih lemah ini. Konsumsi produk kacang tanah seperti kacang atom atau kacang sukro, yang disalut tepung, perlu dicermati. Dikhawatirkan,

menggunakan kacang tanah di bawah standar, sehingga cemaran aflatoksinnya tinggi.

Penggunaan beberapa bahan tambahan makanan kimia yang sembarangan dalam industri makanan seperti misalnya pewarna tekstil, pemanis buatan yang berlebihan, juga merupakan tindakan pencemaran senyawa karsinogen dalam makanan.

#### **d. Diet dan Kanker**

Studi epidemis peneliti Amerika, Dole dan Peto (1981), menyatakan bahwa sekitar sepertiga kanker yang diderita manusia disebabkan oleh pola konsumsi makanan. Kanker ditakuti oleh penduduk negara maju dan makmur sebagai dampak pola hidup modern. Mengenal senyawa-senyawa pemicu mutasi sel (senyawa mutagen) berarti dapat menghindari terjadinya kanker. Umumnya senyawa mutagen juga karsinogenik.

Mutasi adalah perubahan mendadak pada sifat genetik yang disebabkan oleh perubahan jumlah, struktur molekul atau urutan nukleotida yang menyusun gen. Mutasi spontan sangat jarang terjadi, peluangnya hanya satu dalam sejuta. Sedangkan mutasi yang disebabkan oleh faktor luar penyebabnya adalah virus, radiasi atau senyawa kimia yang dapat mengancam kehidupan.

Kanker lebih mudah terjadi pada sel yang terus menerus membelah dan memperbanyak diri seperti misalnya pada kulit, sel-sel epitel lambung, saluran pencernaan dan paru-paru, karena secara intensif berhubungan dengan faktor lingkungan seperti misalnya udara dan makanan, sehingga mudah dipengaruhi oleh senyawa penyebab kanker (karsinogenik).

Sel-sel tersebut di atas membutuhkan kira-kira 20 tahun sebelum dapat terdeteksi dan memperlihatkan gejala penyakit kanker. Data penelitian menunjukkan bahwa untuk 1 ng sel kanker menjadi 1 g, dibutuhkan 30 siklus pembelahan sel, yang melibatkan proses mutasi, akan tetapi tahap berikutnya, hanya membutuhkan beberapa siklus untuk mengubah 1 g sel kanker menjadi 1 kg.

Dengan demikian, upaya pencegahan mempunyai peranan yang sangat berarti, yaitu mencegah terjadinya mutasi sebagai awal dari pembentukan kanker. Salah satu upaya pencegahan adalah mengenali senyawa pemicu kanker sehingga dapat dihindari ataupun dijaga agar sesedikit mungkin terdapat dalam diet.

#### **d.1. Pengolahan makanan dan kanker**

Pengolahan makanan yang melibatkan suhu tinggi seperti menggoreng, memanggang, dan membakar makanan berprotein dan lemak tinggi, akan menghasilkan senyawa karsinogen.

Menggoreng dilakukan pada suhu minyak 180°C, selama sekitar 10 menit. Selama proses penggorengan, terjadi pengeluaran kandungan air dalam bahan pangan yang akan mengakibatkan terjadinya proses hidrolisis pada minyak goreng, sehingga minyak goreng semakin lama digunakan semakin tengik. Masalahnya tidak hanya bau tengik yang mengganggu citarasa makanan saja, tetapi selama terjadinya proses ketengikan, akan terbentuk senyawa-senyawa radikal bebas bersifat karsinogen.

Minyak goreng yang dipergunakan berkali-kali akan mengandung radikal bebas yang tinggi. Sebaiknya menggoreng dilakukan dengan api kecil, dan minyak goreng jangan digunakan lebih dari dua kali. Minyak goreng bekas yang warnanya berubah menjadi coklat kehitaman bersifat karsinogenik.

Bagi para penderita jantung koroner, oleh dokter dianjurkan untuk menggunakan minyak goreng yang sekali pakai saja, agar beban kerja jantung tidak bertambah berat.

Pengolahan makanan berprotein tinggi juga dapat membentuk senyawa mutagen semisal proses pemanggangan makanan berprotein dan lemak tinggi (pirolisis), yaitu sate, *well done steak*, hamburger, *yakiniku*, dan berbagai jenis masakan Cina yang menumis daging maupun ikan pada suhu tinggi dan dijadikan kaldu, akan banyak mengandung asam amino terpirolisis yang membentuk *heterocyclic amine* (HAs), suatu mutagen kuat. Senyawa mutagen kimia lainnya, misalnya Trp-P1, Trp-P2, berasal dari tryptophan dalam bahan makanan. Kandungan asam glutamat dalam makanan yang diolah pada suhu tinggi akan menghasilkan Glu-P1 dan Glu-P2. Demikian juga kandungan nitrosamin, nitrosamida dan senyawa nitroso dalam bahan makanan dan minuman berbentuk volatil seperti misalnya NDMA, NDEA, maupun NQO dan MNNG.

Berbagai jenis ikan bakar banyak mengandung senyawa mutagen IQ, MeIQ. Daging yang diolah dengan menambahkan garam dan nitrat (sendawa), untuk membuat daging menjadi berwarna merah cerah, lebih awet dan lebih lezat, yang dikenal sebagai daging korned, dan juga ikan asin serta terasi sangat tinggi kandungan

nitrosamin dan menghasilkan radikal bebas. Kanker lambung erat kaitannya dengan termakannya senyawa nitrosamin dan senyawa nitroso.

Berdasarkan penelitian, waktu dan suhu pemasakan akan sangat berperan dalam pembentukan senyawa mutagen dalam makanan. Diketahui pula bahwa pemanggangan ikan menghasilkan 1000 kali lebih tinggi daya mutageniknya dibandingkan dengan pemanggangan hamburger pada suhu dan waktu yang sama. Senyawa *heterocyclic amine* (HAs) dikenal sebagai pemicu kanker payudara, usus dan pankreas.

Senyawa pemicu kanker lainnya adalah PAHs (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*) yang terbentuk melalui quinon, banyak terkandung dalam bagian daging atau ikan yang hangus ketika dipanggang, dan pada waktu pengasapan, terutama benzopyrene dalam konsentrasi setinggi 200 ppb bersifat karsinogen kuat.

Makanan berkadar lemak tinggi yang diolah pada suhu tinggi (mencapai 200°C), dan penggunaan minyak goreng berkali-kali dikhawatirkan dilakukan oleh restoran ayam goreng, mengakibatkan terjadinya oksidasi, polimerisasi yang menghasilkan asam lemak *trans*, yang berpengaruh negatif bagi kesehatan.

Perlu disadari bahwa tidak ada diet manusia yang sama sekali bebas dari senyawa pemicu kanker dan contoh makanan di atas hanya merupakan contoh yang mewakili saja.

Terjadinya kanker dan penyakit degeneratif serta penuaan banyak dipengaruhi oleh pola hidup, dan bagi manusia modern dimana makan sudah tidak lagi hanya dipandang untuk bertahan hidup, maka perlu adanya pemahaman tentang menu makanan yang baik dan benar.

#### **d.2. Pembentukan senyawa karsinogen oleh bakteri usus**

Karsinogen berkorelasi dengan aktivitas bakteri usus. Enzim-enzim  $\beta$ -glukuronidase, menghidrolisis glukuronida, azoreduktase dan nitroreduktase mereduksi gugus *nitro* dan *azo* senyawa mutagen menjadi senyawa karsinogen. Enzim  $\beta$ -glukuronidase dihasilkan oleh beberapa jenis bakteri usus seperti *E. coli*, *Bacterioides*, dan beberapa bakteri anaerob, dalam jumlah yang cukup banyak. Pemecahan ikatan  $\beta$ -glukuronida oleh bakteri usus juga menghasilkan aglycones seperti diethyl-stilbesterol- $\beta$ -glukuronide dan N-hydroxyfluoreny-lacetamide  $\beta$ -glukuronide yang sangat

karsinogenik.

Dengan demikian, apabila pada feses manusia terdeteksi jenis enzim  $\beta$ -glukuronidase, azoreduktase dan nitroreduktase yang tinggi, didukung dengan tingginya populasi bakteri penghasil enzim-enzim ini dalam feses, dapat diketahui bahwa terjadi pola makan yang salah sehingga peluang terbentuknya senyawa karsinogen besar sekali. Perlu diantisipasi dengan diet yang baik dan benar untuk menekan populasi bakteri “jahat” dan menekan terbentuknya senyawa karsinogen.

Konsumsi lemak yang tinggi akan meningkatkan sterol dalam usus besar dan meningkatkan sekresi garam empedu, yang selanjutnya akan dimetabolis oleh bakteri usus menghasilkan senyawa karsinogenik.

Tergantung dari jenis makanannya, kira-kira 50 persen sterol netral dalam feses adalah dalam bentuk coprostanol, yang dihasilkan oleh bakteri usus *Eubacterium. E. coli* yang diisolasi dari penderita kanker usus dapat memecah rantai kolesterol.

#### **d.3. Susu fermentasi dan aktivitas antimutagenik**

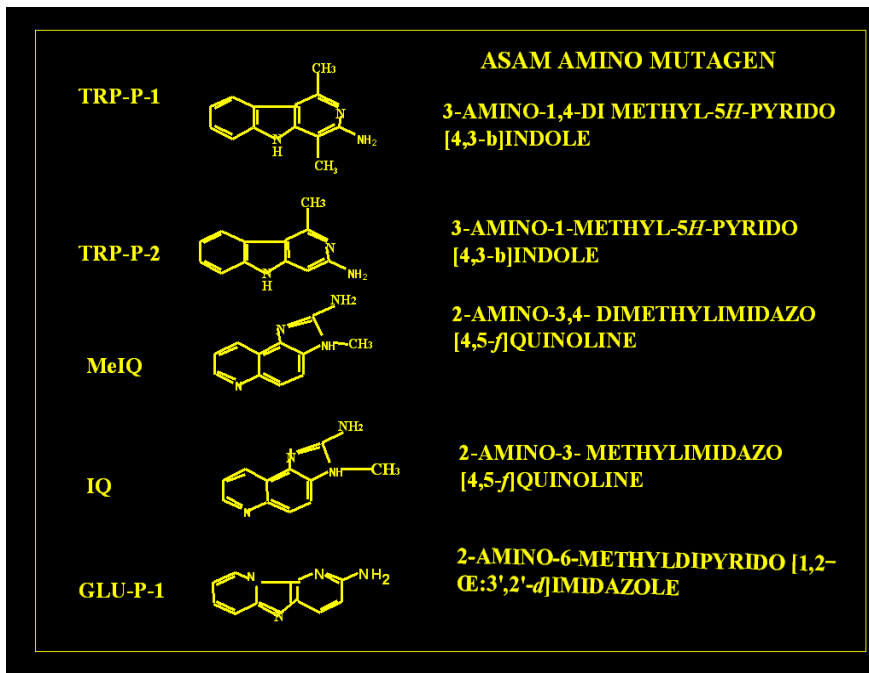
Senyawa antimutagen terdiri dari dua kelompok berdasarkan mekanisme kerjanya. Senyawa tersebut termasuk dalam kelompok desmutagen apabila bereaksi langsung dengan senyawa mutagen sehingga menjadi inaktif atau terhambat aktivitasnya, dan apabila aktivitasnya terhadap sel, disebut antimutagen atau bioantimutagen, seperti misalnya yang terjadi pada senyawa-senyawa yang bersifat antioksidatif. Susu fermentasi termasuk dalam kelompok desmutagen.

Mekanisme penekanan senyawa karsinogen dalam saluran pencernaan oleh bakteri asam laktat ada dua macam, yaitu bakteri asam laktat mengurangi populasi bakteri jahat yang menghasilkan enzim-enzim yang membentuk senyawa karsinogen dalam usus, dan juga beberapa penelitian membuktikan kemampuan dinding sel bakteri asam laktat, terutama peptidoglikan dapat mengikat senyawa mutagen, seperti Tp-P1, Trp-P2 Glu-P1, dan senyawa mutagen lainnya (Gambar 25). Kemampuan mengikat senyawa mutagenik oleh dinding sel bakteri asam laktat terbukti dimiliki bakteri asam laktat baik dalam keadaan hidup maupun mati.

Hosono, Kashina dan Kada (1986) melaporkan pertama kali bahwa susu yang difermentasi dengan *L. bulgaricus* IFO 3533,



*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IFO 12546 atau *Enterococcus faecalis* menunjukkan aktivitas antimutagenik terhadap 4NQO, suatu mutagen kimiawi dengan metode Ames, menggunakan bakteri *Salmonella typhimurium* SD 510, yaitu *Salmonella typhimurium* TA 98 yang tergantung pada streptomisin.



Gambar 25. Struktur kimia berbagai asam amino terpirolisis

Pada tahun yang sama Hosono, Sague dan Tokita juga melaporkan bahwa aktivitas mutagenik bakteri asam laktat dalam susu lebih tinggi ketimbang media lainnya, dan ternyata casein susu, terutama  $\beta$ -casein juga mempunyai daya antimutagenik seperti terlihat pada Tabel 29.

Bodana dan Rao (1990) menemukan bahwa susu yang difermentasi oleh dua bakteri yogurt, *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus*, mempunyai aktivitas antimutagenik yang lebih tinggi daripada susu yang difermentasi dengan *S. thermophilus* saja.

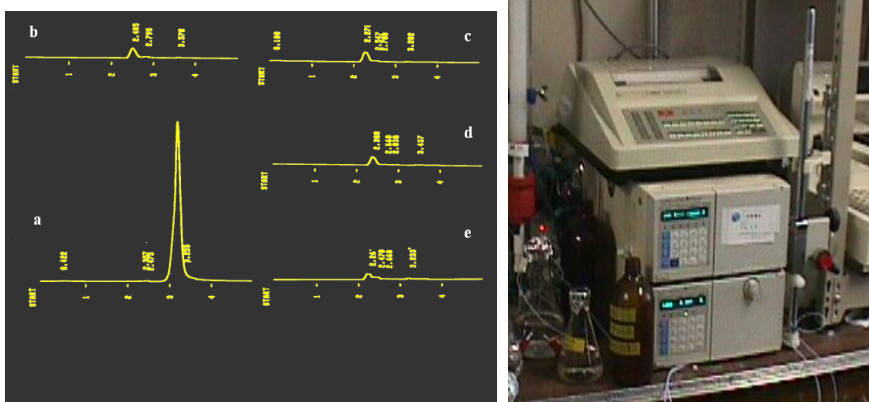
Hosoda dkk. (1992) melaporkan bahwa susu yang difermentasi dengan *L. acidophilus* LA 106 mempunyai daya antimutagenik tertinggi terhadap senyawa MNNG, yaitu sebesar 77 persen

penghambatan.

Pengikatan yang tinggi dari senyawa mutagen Trp-P1 oleh peptidoglikan dinding sel *Leu. mesenteroides* ssp. *dextranicum* T-180 yang diisolasi dari kefir Mongolia dijumpai oleh Tanabe, Otani dan Hosono (1991).

Hosono dan Hisamatsu (1995) melaporkan kemampuan *Enterococcus faecalis* FK-23 yang diisolasi dari usus manusia dalam mengikat asam amino terpirolisis seperti Trp-P1 dan Trp-P2 lebih tinggi dibanding pengikatan aflatoxin B1, B2, G1 dan G2. Namun demikian, terbukti bahwa dengan semakin banyak sel bakteri *Enterococcus faecalis* FK-23, daya ikat terhadap aflatoxin semakin meningkat.

Surono dan Hosono (1996), dan Surono (2003) melaporkan daya antimutagenik dinding sel bakteri asam laktat asal dadih, susu fermentasi tradisional asal Sumatra Barat, yaitu pengikatan senyawa mutagen oleh dinding sel bakteri asam laktat terhadap ekstrak terasi yang mutagen dan senyawa Trp-P1 secara *in vitro*, yaitu dengan menggunakan HPLC (Gambar 26).



Gambar 26. (Kiri) High Performance Chromatograph 100  $\mu$ g Trp-P1 dgn 5 mg sel BAL kering beku; a. larutan Trp-P1, b. Trp-P1 dgn IS-7257, c. Trp-P1 dgn IS-261082, d. Trp-P1 dgn IS-16183, dan. e. Trp-P1 dgn IS-27526; (kanan) Instrumen HPLC

Tabel 29. Aktivitas antimutagenik casein dan albumin terhadap mutagen alami ekstrak lada dengan metode Ames

Jenis senyawa	Revertants/plate
Kontrol (ekstrak etanol lada) + air	2012
Casein utuh	844
$\alpha_{s1}$ -Casein	1085
$\beta$ -Casein	609
k-Casein	1741
Albumin telur	495
Bovin serum albumin	760

Sumber : Hosono, Sashikanth dan Otani (1989)

Goldin dan Gorbach di tahun 1980 meneliti kanker usus besar tikus yang diinduksi dengan senyawa karsinogen kimiawi yaitu 1,2-dimethylhydrazine (DMH). Senyawa DMH ini diaktivasi dalam usus besar oleh enzim  $\beta$ -glukuronidase yang dihasilkan oleh bakteri dalam usus. Setelah 20 minggu, ternyata hanya 40 persen tikus yang diberi *Lactobacillus acidophilus* dalam ransum makanannya menderita tumor usus besar, sedangkan yang tidak diberi *Lactobacillus acidophilus* sebanyak 77 persen menderita tumor usus besar.

Tahun 1984 Goldin dan Gorbach melalui dua laporan risetnya menyatakan bahwa suplementasi oral bakteri *L. acidophilus* hidup pada manusia dan tikus mengakibatkan penurunan secara nyata kandungan  $\beta$ -glukuronidase, azoreduktase dan nitroreduktase dalam feses. Enzim enzim ini diketahui berkontribusi terhadap patogenesis kanker usus akibat kemampuannya mengubah prokarsinogen menjadi proksimat karsinogen. Karsinogenik amin pada feses tikus yang diberi prekursor karsinogen menjadi berkurang pada tikus yang diberi  $10^{10}$  cfu *L. acidophilus*. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *Lactobacillus* mampu menekan aktivitas metabolisme mikroflora usus dan mengurangi pembentukan senyawa karsinogen dalam usus.

Pemecahan ikatan  $\beta$ -glukuronida oleh bakteri usus juga akan melepaskan aglikon yang aktif secara biologis, seperti diethylstilbestrol- $\beta$ -glukuronidase dan N-hidroksifluorenilacetamid- $\beta$ -glukuronidase, yang merupakan karsinogen potensial.

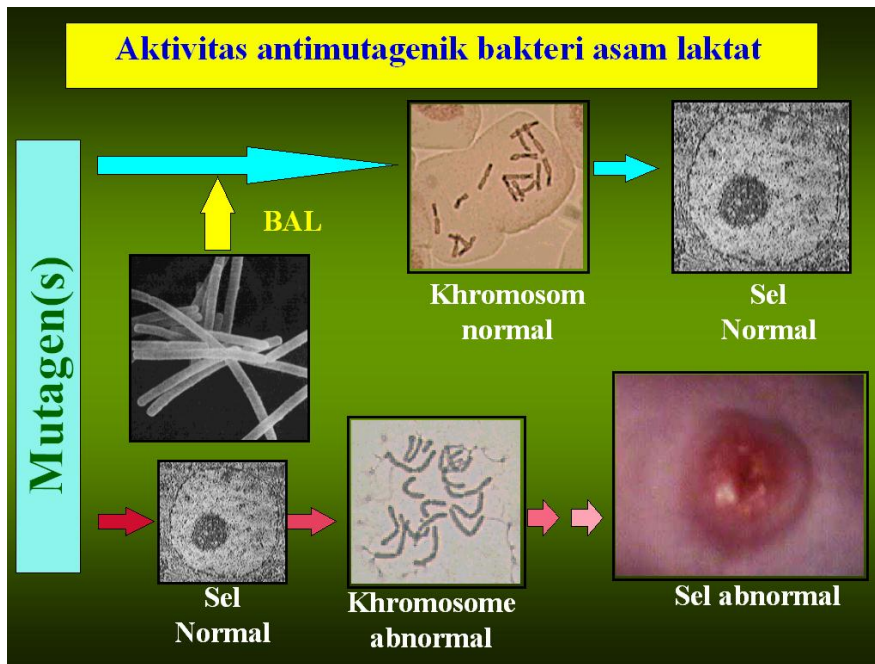
Penelitian pada manusia dilakukan juga dengan mengamati aktivitas mutagenik dari feses dan saluran pencernaan. Konsumsi daging sapi goreng diketahui berkontribusi terhadap senyawa

karsinogenik dalam saluran pencernaan. Lidbeck dkk. (1992) melaporkan bahwa konsumsi susu asidofilus yang mengandung *L. acidophilus* (NFCB 1748), mengurangi fekal mutagenik. Riset serupa juga dilakukan terhadap relawan Jepang yang mengkonsumsi *L. casei* dalam bentuk (tepung Biolactis) selama mengkonsumsi daging cincang goreng dalam jumlah banyak, yang menurunkan secara nyata sebesar 47,5 persen fekal mutagenisitasnya. Disimpulkan bahwa penurunan mutagenisitas dari feses disebabkan oleh perubahan populasi bakteri usus.

Sembelit bisa mengakibatkan kanker rektum apabila mutagenisitas feses tinggi, sebab feses tertahan dalam waktu yang cukup lama, sehingga lama kelamaan akan memberi kesempatan untuk terjadinya mutasi sel-sel rektum.

Indol dan fenol merupakan senyawa metabolit yang dihasilkan oleh *E. coli*, *Clostridium*, dan *Bacteroides spp.* dalam usus. Senyawa-senyawa ini akan diserap dari saluran pencernaan dan dimetabolisme lebih lanjut dalam hati, di mana indol didetoksifikasi, dan dibuang melalui air seni sebagai indican.

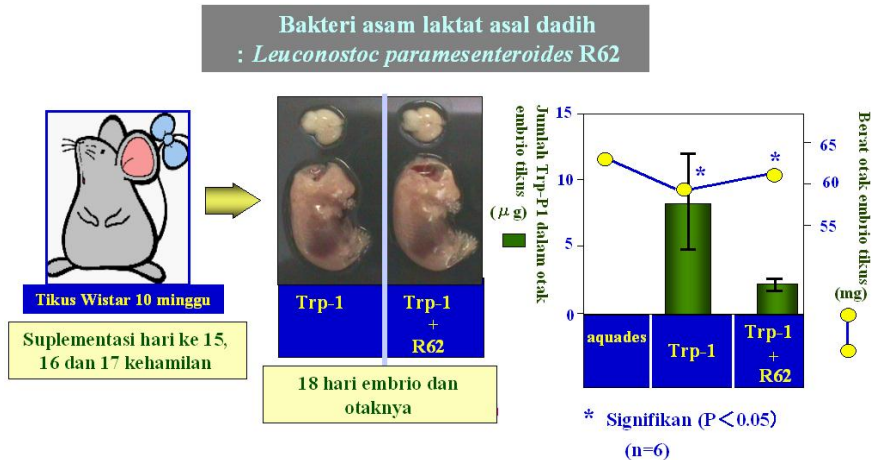
Penelitian Tanaka dkk. (1981) menunjukkan bahwa indican dan fenol serta *para-cresol*, senyawa karsinogenik, dalam air seni berkurang selama pemberian susu yang mengandung *L. casei* sebanyak  $10^{10}/g$  kepada 5 orang sehat selama minggu berturut-turut, menunjukan bahwa bakteri “jahat” yang bertanggung jawab terhadap pembentukan indol dan fenol berkurang jumlahnya.



Gambar 27. Mekanisme pengikatan senyawa mutagen oleh dinding sel bakteri asam laktat, sehingga mencegah terjadinya mutasi sel

Percobaan yang dilakukan oleh Tabuchi dkk. (2002) dengan menggunakan 18 ekor tikus Wistar berumur 10 minggu dan sedang hamil yang dibagi menjadi 3 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor, dimana kelompok pertama hanya diberi ransum diet normal, kelompok kedua diberi diet normal ditambah Trp-P1 sebanyak 1 mg, dan kelompok ketiga diberi diet normal ditambah 1 mg Trp-P1 dan sel kering beku *Leuconostoc mesenteroides* R-62 yang berasal dari dadih. Ternyata jumlah Trp-P1 dalam otak embrio tikus yang diberi isolat bakteri asam laktat asal dadih secara nyata lebih rendah ketimbang tikus yang hanya diberi senyawa Trp-P1, tanpa dadih isolat. Demikian juga berat otak embrio tikus yang diberi isolat dadih lebih berat ketimbang hanya Trp-P1 tanpa isolat dadih (Gambar 28). Dengan demikian, isolat dadih *Leuconostoc paramesenteroides* R62 dapat mengikat senyawa mutagen Trp-P1 dan mencegah terjadinya pengecilan otak oleh Trp-P1

## Efek pemberian dadih laktat pada berat otak embrio tikus Wistar



Gambar 28. Efek pemberian isolat dadih laktat *Leuconostoc paramesenteroides* R62 terhadap kandungan Trp-P1 dalam otak embrio tikus dan berat otak embrio tikus

### 5. Anti hipertensi

Hipertensi atau penyakit darah tinggi adalah faktor risiko terhadap penyakit atherosklerosis dan berbagai penyakit yang mengancam jiwa seperti lumpuh, dementia (pikun), penyakit jantung dan penyakit gagal ginjal.

Fraksi larut air dari sel *L. casei* strain Yakult dapat menurunkan tekanan darah, yang terdiri dari gula (20%), protein (45%), asam nukleat (10%), dan abu (10%), yang merupakan senyawa-senyawa dari dinding sel, membran sel dan sitoplasma.

Ikatan antara polisakarida dan glikopeptida larut air tersebut terdiri dari glukosa, rhamnosa, galaktosa, N-asetilglukosamin asam N-asetilmuramat, asparagin, glutamin, alanin dan lisin. Uji klinis yang dilakukan oleh Sawada dkk (1990) dan Nagaoka dkk (1990) terhadap 28 orang relawan hipertensi di Jepang (14 orang laki-laki dan 14 orang perempuan) menunjukkan bahwa setelah dua bulan diberi ekstrak sel bakteri *L. casei* strain Yakult tekanan darahnya menjadi normal, dan pengaruhnya nyata.

Beberapa jenis bahan makanan dan komponen bahan pangan diketahui

mempunyai efek anti hipertensi. Kandungan mannan pada khamir dan ekstrak *Ganoderma lucida*, suatu jamur pangan memberikan efek positif yang sama.

Sistem enzim *angiotensin vasoconstrictor* dan sistem enzim kallikrein/kinin vasodilator berperan penting dalam menjaga tekanan darah. Peneliti Jepang menemukan adanya penghambatan aktivitas angiotensin converting enzim pada yogurt, berupa peptida hasil penguraian enzimatik dari  $\alpha_{s1}$ -casein, dan  $\beta$ -casein.

Calpis, salah satu jenis minuman susu fermentasi dari Jepang melibatkan *Lactobacillus helveticus*. Kasein hidrolisat yang dihasilkan oleh proteinase ekstraselular *Lactobacillus helveticus* (CP790) dilaporkan menurunkan tekanan darah pada tikus yang hipertensi dan uji pada manusia juga membuktikan hal yang sama. Analisis menggunakan AAS (Amino Acid Sequences), peptida tersebut ternyata berupa urutan Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln pada  $\beta$ -casein. Peptida yang bersifat anti hipertensi ini memperlihatkan penghambatan aktivitas angiotensin converting enzim I, dan aktivitasnya meningkat setelah pencernaan pankreatin.

## **6. Meningkatkan ketersediaan biologis mineral**

Kandungan mineral dalam susu fermentasi berasal dari susu sapi, dan jumlahnya hampir tidak berubah setelah fermentasi (Tabel 30). Namun demikian, pemanfaatan kalsium, fosfor dan besi dalam tubuh lebih baik bila mineral-mineral tersebut berasal dari susu fermentasi ketimbang susu sapi.

Mineral dalam susu fermentasi diserap alam usus halus sebagai senyawa berberat molekul rendah yang larut dalam air. Kalsium dan fosfor penting bagi pertumbuhan tulang dan gigi, sedangkan zat besi membentuk otot, kulit dan butir darah merah, menstimulir syarat, menjaga elastisitas otot dan menjaga tekanan osmotik.

Bakteri asam laktat probiotik juga berfungsi memperbaiki ketersediaan biologis mineral. Susu fermentasi mempunyai keasaman yang tinggi, terutama bakteri asam laktat penghasil D(-) asam laktat, sehingga memperbaiki penyerapan mineral, terutama kalsium, sebab kalsium lebih mudah diserap dalam kondisi asam.

## **7. Meningkatkan kandungan vitamin B**

Seperti halnya dengan mineral, kandungan vitamin dalam susu fermentasi berasal dari susu sapi. Vitamin B<sub>1</sub>, dan B<sub>2</sub> lebih tinggi pada susu

fermentasi Secara umum, kandungan vitamin larut lemak lebih rendah dalam susu fermentasi dibanding dalam susu sapi. Kandungan vitamin A tergantung dari kadar lemak dari susu fermentasi. Sedangkan vitamin C dalam susu fermentasi akan banyak yang hilang, mengingat aktivitas metabolisme bakteri asam laktat menghasilkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, suatu oksidator kuat (Tabel 30).

Bakteri asam laktat mengubah kandungan vitamin B dalam susu fermentasi. Beberapa vitamin B digunakan dan beberapa dihasilkan. Secara umum, susu fermentasi kandungan vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, dan asam pantothenat lebih tinggi dan lebih optimal dibandingkan dengan susu segar. Beberapa jenis bakteri laktat menghasilkan vitamin B<sub>1</sub> dan vitamin E. *L. bulgaricus* menggunakan asam folat, sedangkan *S. thermophilus* dan *L. acidophilus* menghasilkan asam folat.

Selama fermentasi yogurt, vitamin yang meningkat adalah niasin, dan asam folat, karena disintesis secara aktif oleh kultur starter. Bakteri asam laktat tidak menghasilkan vitamin B<sub>12</sub>, kecuali *Lactobacillus reuteri*.

Dalam tubuh kita, vitamin diserap dari usus halus dan disimpan dalam hati untuk kemudian dimetabolisme menjadi bentuk aktifnya yaitu *coenzyme*, dan dikirimkan ke jaringan-jaringan yang membutuhkannya.

Tabel 30. Komposisi kimia susu segar dan susu fermentasi per 100 g

Komponen kimia	Susu sapi	Susu fermentasi (yogurt)		
		Ful krim tanpa gula	Rendah lemak manis	Skim manis
Air (g)	88,7	88,0	78,9	80,0
Protein (g)	2,9	3,2	4,0	3,5
Lemak (g)	3,2	3,0	0,9	0,1
Gula (g)				
Laktosa	4,5	5,0	6,3	5,5
Gula lainnya	0	0	9,0	10,0
Abu (g)	0,7	0,8	0,9	0,9
Mineral				
Ca (mg)	100	110	130	120
P (mg)	90	100	110	100
Fe (mg)	0,1	0,1	0,2	0,1
Na (mg)	50	50	60	60
K (mg)	150	140	150	150
Vitamin				
A (SI)	110	100	32	0
B <sub>1</sub> (mg)	0,03	0,04	0,05	0,03
B <sub>2</sub> (mg)	0,15	0,20	0,20	0,15
Niasin (mg)	0,1	0,1	0,1	0,1
C (mg)	0,05	0	0	0

Sumber : Yukuchi dkk (1992)



## **8. Menstimulir sistem kekebalan tubuh**

Mengapa sebagian orang tidak gampang sakit, dan sebagian lainnya rentan terhadap penyakit, mengapa semakin bertambah usia menjadi mudah lelah, rasa nyeri di tulang dan sendi ? Daya tahan tubuhnya berbeda pada tiap orang. Bahkan pada orang yang sama, daya tahan tubuhnya bisa tidak stabil. Mengawali hari dengan daya tahan tubuh yang kuat, bisa saja tiba-tiba daya tahan tubuh melemah. Apakah daya tahan tubuh bisa dipertahankan tetap kuat ? Bisa, asal tahu penyebab melemahnya daya tahan tubuh dan dilakukan upaya menjaga daya tahan tubuh agar tetap prima.

Daya tahan tubuh manusia mencapai puncaknya di usia 20 an, dan lambat tapi pasti, mulai terjadi penurunan di usia 30 an, dan semakin pesat menurun di usia 50 tahunan. Pola makan mempegaruhi kondisi daya tahan tubuh. Hal ini berkaitan dengan *health conscious* atau peduli terhadap kesehatan. Pengetahuan mengenai berbagai jenis makanan yang berfungsi menjaga dan meningkatkan daya tahan tubuh akan sangat bermanfaat terhadap pencegahan berbagai penyakit.

### **8.1. Peranan sistem kekebalan tubuh**

Apa jadinya kalau tubuh manusia tidak dilengkapi dengan sistem kekebalan tubuh? Sistem kekebalan tubuh bisa diibaratkan prajurit yang sangat disiplin, teratur, cerdas, dan pekerja keras yang melindungi tubuh dari musuh eksternal, khususnya musuh seperti bakteri atau virus yang berupaya memasuki tubuh.

Masih ingat bocah David dari Texas, yang sebelum lahir diketahui tidak sempurnanya sistem kekebalan tubuhnya ? David bermasalah pada sumsum tulang belakangnya sehingga tidak bisa memproduksi limfosit, yang merupakan bagian dari prajurit siap tempur mempertahankan tubuh terhadap berbagai serangan bakteri, virus dan penyakit yang mencoba masuk ke dalam tubuh melalui makanan, saluran pernafasan maupun lingkungan sekitar. Tanpa adanya perlindungan dari sistem kekebalan tubuh, meskipun dilahirkan dengan operasi Caesar yang steril, dan hidup dalam ruangan steril, menghirup udara steril, minum air steril dan makanan yang steril, David hanya bertahan selama 12 tahun setelah gagal transplantasi sumsum tulang dari kakaknya. Ilustrasi tadi memperjelas peranan penting sistem kekebalan bagi daya tahan tubuh kita.

Limfosit ibarat prajurit, yang dihasilkan oleh sumsum tulang disebut limfosit B sedangkan yang diproduksi di kelenjar timus disebut limfosit T. Limfosit B akan memproduksi semacam senjata yang disebut antibodi.

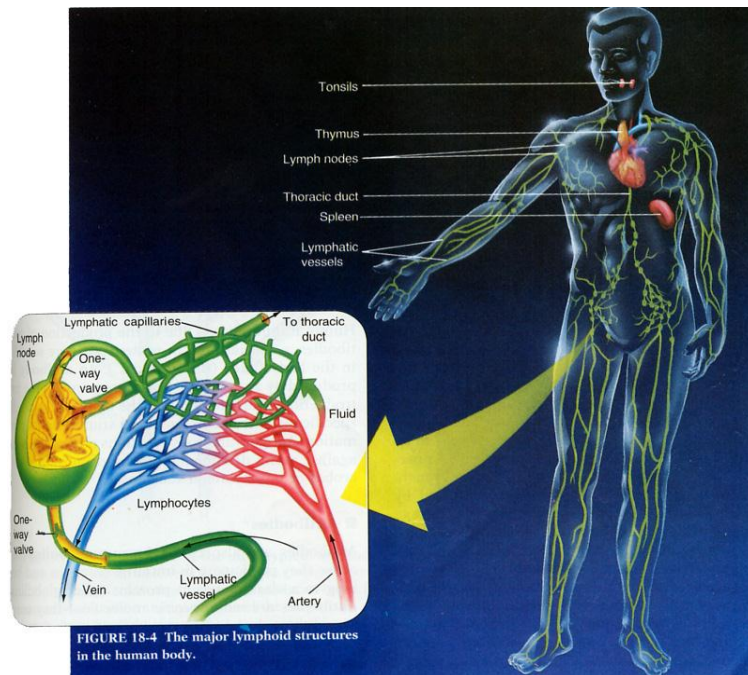
Kondisi sistem kekebalan tubuh menentukan kualitas hidup. Dalam tubuh yang sehat terdapat sistem kekebalan tubuh yang kuat, sehingga daya tahan tubuh terhadap penyakit juga prima. Bayi yang baru lahir, pembentukan sistem kekebalan tubuhnya belum sempurna, dan memerlukan ASI yang membawa sistem kekebalan tubuh sang ibu untuk membantu daya tahan tubuh bayi. Semakin dewasa, sistem kekebalan tubuh terbentuk sempurna. Namun, pada orang lanjut usia, sistem kekebalan tubuhnya secara alami menurun. Itulah sebabnya timbul penyakit degeneratif atau penyakit penuaan.

Sistem pertahanan tubuh secara garis besar terbagi menjadi dua berdasarkan mekanisme responsnya, yaitu respons mencegah invasi benda-benda asing melalui kulit, mukosa, dan permukaan tubuh, yang dikenal sebagai respons imun alami (*innate immunity*), suatu respons imun non spesifik; dan respons untuk memproses benda asing; atau respons imun spesifik (*adaptive immunity*), yang terdiri dari dua sistem yaitu humoral dan selular, dalam hal ini, mukosa usus merupakan sisi penting yang berhubungan dengan mikroba.

Sel darah putih non fagositik disebut limfosit yang bertanggung jawab terhadap respons imun. Limfosit mempunyai reseptor yang dapat mengenali antigen spesifik, dan teraktivasi pada saat antigen hadir dan terikat pada permukaannya. Setelah teraktivasi limfosit mengendap pada imun humoral atau selular. Gambar 28 memperlihatkan struktur limfosit utama dalam tubuh manusia.

Sistem imun humoral merupakan produk limfosit yang matang dari sel limfosit B, yang terdapat pada jaringan limfatik saluran pencernaan, sumsum tulang belakang atau bahkan tonsil. Jenis limfosit lainnya dihasilkan oleh limfosit T melalui kelenjar timus, yang dikenal sebagai imun selular. Sel T tidak menghasilkan antibodi, tetapi kehadiran antigen, sel asing tersebut akan segera dibunuh atau dikeluarkan senyawa kimia yang membantu penghancuran benda asing tersebut. Beberapa sel T juga membantu mengatur respons imun humoral dan selular.

Sistem imun humoral menghasilkan antibodi, suatu protein khusus yang larut dalam cairan tubuh ("humors"). Antibodi yang disebut juga immunoglobulin, dihasilkan sebagai respons adanya antigen dalam tubuh, dan secara spesifik terikat dengan antigen yang distimulirnya. Antibodi termasuk dalam serum protein yang disebut globulin, sehingga disebut immunoglobulin. Reaksi antigen-antibodi melindungi tubuh dari berbagai efek negatif seperti mikroba dan benda-benda asing lainnya.



Gambar 29. Struktur limfosit utama dalam tubuh manusia

## 8.2. Antibodi, senjata otomatis dan selalu siaga

Tiap kali ada benda asing yang masuk ke dalam tubuh, diperlukan sekitar 10 – 14 hari untuk membentuk antibodi. Jadi, antibodi merupakan respon terhadap gangguan dari luar, senjata yang dibentuk oleh sekelompok prajurit limfosit B dalam sistem kekebalan. Antibodi tersusun dari protein, disebut juga sebagai immunoglobulin, disingkat Ig, suatu serum protein globulin. Antibodi akan menghancurkan musuh-musuh penyerbu atau disebut juga antigen seperti bakteri dan virus penyebab penyakit, dengan cara mengikatkan diri pada antigen dan menandai molekul-molekul asing tempat mereka mengikatkan diri. Selanjutnya sel pasukan dapat membedakan dan melumpuhkannya.

Ada 5 jenis immunoglobulin, yaitu IgG, IgM, IgA, IgE dan IgD. IgG adalah antibodi yang paling banyak terdapat dalam darah, yaitu 80 persen. Antibodi IgG adalah satu-satunya antibodi yang dapat masuk ke dalam plasenta ibu hamil karena kemampuan dan ukurannya yang kecil, sehingga IgG seorang ibu akan membantu melindungi janinnya dari kemungkinan infeksi. Selanjutnya bayi yang baru lahir dari rahim yang steril, tidak mempunyai pengalaman melawan penyakit. Untunglah, immunoglobulin

dalam ASI yang pertama kali atau dikenal sebagai kolostrum, memberikan bantuan perlindungan terhadap infeksi, sementara bayi memperkuat sistem kekebalannya hari demi hari.

IgG mengikuti aliran darah, mempunyai efek kuat antibakteri, melindungi tubuh terhadap bakteri dan virus dan menetralkan asam dalam racun.

Jenis lainnya yaitu IgM, IgA, IgE dan IgD. Antibodi IgA ada dua macam, yaitu serum IgA, dan sekretori IgA yang banyak ditemukan dalam air liur, mukus, air mata dan sekresi eksternal lainnya. IgE bertanggung jawab terhadap reaksi alergi, seperti pada penyakit asma. Sedangkan IgD paling sedikit dijumpai pada darah.

Mukus disekresikan pada permukaan mukosa usus, dan mengandung faktor pelindung humoral seperti lactoferrin, lysozyme, asam empedu dan faktor pelindung selular seperti *neutrofil* dan makrofag.

### **Interaksi probiotik dengan sistem imun saluran pencernaan**

Kemampuan sistem imun mukosal berperan baik secara immunogenik maupun tolerogenik untuk menjaga tubuh terhadap infeksi dan peradangan usus, serta menginduksi toleransi sel T terhadap antigen dalam makanan, mengantar studi terhadap mekanisme bakteri asam laktat probiotik menginduksi respon imun mukosa yang tepat tanpa efek samping. Sistem imun mukosal bertanggung jawab terhadap 60 % immunoglobulin yang dihasilkan setiap harinya (Mestecky dan McGhee, 1987); namun demikian, riset induksi respon imun pada usus sulit dibuktikan.

Vintini dkk (2000) melaporkan bahwa telah diketahui beberapa bakteri asam laktat yang dapat menstimulir berbagai respon imun mukosal baik spesifik maupun non spesifik. Ternyata bakteri asam laktat berkomunikasi dengan sistem imun mukosa usus melalui sel M atau sel *follicle associated epithelium* (FAE) dari Peyer's patches atau melalui sel-sel epithelial dari usus halus maupun usus besar. Interaksi probiotik dengan sel M terutama menstimulir respon imun spesifik (Neutra dan Kraehen Buhl, 1992), sedangkan interaksi dengan sel FAE menstimulir non spesifik atau respon inflammatory, meskipun bisa juga menstimulir respon imun spesifik. Interaksi dengan sel epithelial bisa menghantar perbaikan imunitas local atau non respons oleh antigen clearance (Campbell dkk., 1999).

Bakteri asam laktat probiotik yang mengkolonisasi saluran pencernaan bisa menanamkan paling tidak ada masa transient suatu rekombinan

komensal strain diantara mikroflora endogen, sebagaimana diketahui bahwa mamalia membentuk antibody serum dan antibodi mukosal (Warner dkk., 1987). Diharapkan terjadinya kolonisasi transient oleh bakteri probiotik akan menstimulir respon imun pada antigen yang diekspresikan.

Bakteri asam laktat dan bifidobakteria terbukti menstimulir sistem imun pada orang sehat maupun yang sakit. Beberapa strain dari BAL telah terbukti meningkatkan respon imun humoral spesifik IgA.

Sistem imun melibatkan berbagai sel termasuk makrofag, sel T, sel B, granulocyte (neutrofil, basofil dan eosinofil), kesemuanya membentuk jaringan kerjasama yang kuat menghasilkan sistem kekebalan tubuh. Sel-sel tersebut dikenal sebagai sel imun, kira-kira jumlahnya sebanyak 1 triliun dan pada orang dewasa beratnya mencapai 1 kg.

Apabila sistem imun dianggap sebagai suatu organ tubuh, ukurannya masuk dalam tiga besar setelah hati dan otak. Namun demikian, sel imun terdapat dalam seluruh tubuh, sehingga sistem imun merupakan organ yang mengapung bebas, atau organ yang mengalir. Kemampuannya dalam mengenali benda asing dan antigen setara dengan sistem syaraf kita.

Semakin meningkatnya kondisi ekonomi suatu bangsa akan meningkatkan umur harapan hidup, sehingga populasi lansia di negara-negara maju maupun berkembang dewasa ini semakin meningkat. Namun demikian, sistem pertahanan tubuh atau sistem imun berbanding terbalik dengan penuaan. Proses penuaan berakibat pada menurunnya imunitas selular, khususnya terhadap limfosit kelenjar timus, akibatnya ketahanan terhadap penyakit infeksi maupun non infeksi seperti penyakit degeneratif, menurun sehingga meningkatkan morbiditas.

Gill dkk (2001) melaporkan bahwa pemberian susu rendah lemak sebanyak 200 ml yang mengandung bakteri probiotik *Bifidobacterium lactis* HN019  $5 \times 10^{10}$  koloni setiap hari selama 3 minggu kepada 30 orang subyek lansia sehat berusia 63–84 tahun (rata-rata 69 tahun), meningkatkan fungsi imunitas selular, yaitu aktivitas NK sel sebesar 61,8 %.

#### **a. Respon imun**

Tubuh kita terpisah dari dunia luar oleh kulit dan membran mukus kerongkongan, saluran pencernaan dan saluran air seni dilapisi musin, sebagai lapisan pertama sistem pertahanan tubuh sejak kita dilahirkan, yang menghambat invasi benda-benda asing. Namun demikian, sistem pertahanan tubuh ini masih bisa ditembus oleh bakteri, yang segera berhadapan dengan sel myeloid dari sel

*dendritic* dan *macrophages* yang morfologinya menyerupai amoeba juga fungsi dan bentuknya.


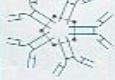

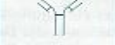

Sel *dendritic* “menelan” bakteri dan mengeluarkan antigen bakteri pada permukaan sel. Sebaliknya, *macrophage* membunuh bakteri yang masuk ini dengan hidrogen peroksida, dilanjutkan dengan aktivitas enzim seperti *lysozyme* dan memberikan antigen pada permukaan selnya.

Makrofag dan *neutrofil* disebut sel fagosit karena melumat bakteri. Sel-sel ini dapat dijumpai pada kelenjar getah bening dimana sel sel imun bertemu, dan mereka juga terdapat tepat di bawah kulit dan membran mukus dan siap siaga menghadapi musuh yang masuk. Sel-sel imun ini bisa disebut sebagai pasukan yang berpatroli berjaga-jaga, dan disebut sebagai respons imun alami.

Sel *dendritic* dan makrofag berfungsi sebagai mediator, menggerakkan sel T dari kelenjar timus dan sel B dari kelenjar sumsum tulang belakang (*bone marrow*). Sel T mengenali antigen dengan menggunakan molekul yang menyerupai antenna, sedangkan sel B mengenalinya dengan reseptor antigennya sendiri, kemudian sel B diaktivasi oleh cytokine yang disekresikan oleh sel T, sehingga disekresikan antibodi yang terdiri dari 5 jenis yaitu IgA, IgG, IgM, IgE dan IgD seperti yang dilihat pada Tabel 31.

Timus dan sum-sum tulang belakang merupakan organ limfoid primer tempat cikal bakal sel limfoid (*limphopoeisis*). Timus merupakan organ tempat pematangan sel limfosit T sedangkan sum-sum tulang belakang merupakan tempat pematangan sel limfosit B, dan keduanya berperan dalam memproduksi IgA. Organ dan jaringan limfoid sekunder meliputi limpa, limfonodus dan MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*), dimana pada tempat-tempat ini akan muncul respon imun seluler dan humoral sehingga diproduksi antibodi. (Erickson dan Hubbard, 2000).

Tabel 31. Sifat berbagai jenis antibodi

Immuno-globulin Class	Structure	Molecular Weight	Percent in Blood	Location	Crosses Placenta?	Fixes Complement?
IgG		150,000	75-80	Blood and tissue fluids	Yes	Yes
IgM		900,000	6-7	Blood and tissue fluids	No	Yes
IgA		170,000*	15-21	Saliva, mucus, and secretions	No	No
IgE		200,000	<1	Skin, respiratory tract, and tissue fluids	No	No
IgD		180,000	<1	Serum	No	No

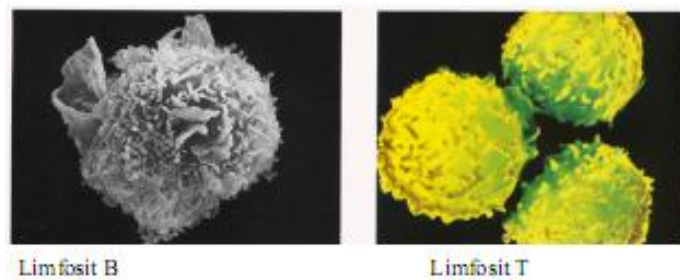
\*This is the mass of each immunoglobulin in the secretory IgA dimer illustrated here.

Antigen adalah peptida yang terdiri dari 10 - 15 asam amino, dan senyawa lainnya seperti lipid, asam nukleat, dan metal anorganik juga dikenal sebagai antigen oleh sistem imun.

Sel epithelial usus, butir darah putih, limfosit B dan T semuanya berperan dalam sistem imun manusia. Senyawaan dari bakteri yang menstimulir imun diantaranya adalah lipopolisakarida endotoxic, peptidoglikan, dan asam lipoteichoat. Khususnya asam lipoteichoat dari bakteri gram positif seperti *Bifidobacteria* mempunyai daya afinitas yang tinggi pada membran sel epithelial, dan juga berperan sebagai pembawa antigen lain, mengikat ke jaringan target agar dapat terjadi reaksi imun. Bakteri asam laktat yang melekat pada sel epithelial usus manusia dapat mengaktifkan makrofag.

Menurut Ouwehand, dkk. (1999), stimulasi sistem imun bakteri asam laktat adalah melalui komponen dinding sel, yaitu peptidoglikan yang menginduksi pada permukaan mukosa. Glukan pada dinding sel bakteri akan merangsang makrofag memproduksi interleukin, meningkatkan aktivitas proliferasi sel limfosit. Sel limfosit membelah menjadi limfosit T dan limfosit B. Limfosit T akan melepaskan interferon, kembali mengaktifkan makrofag dan limfosit B dalam memproduksi antibodi. Selain itu, glukan juga akan merangsang makrofag lebih banyak memproduksi lisozim. Antibodi yang dihasilkan ini merupakan respon mekanisme humoral dalam mekanisme kekebalan spesifik (Andersen, 1992; Perdigon, 1994).

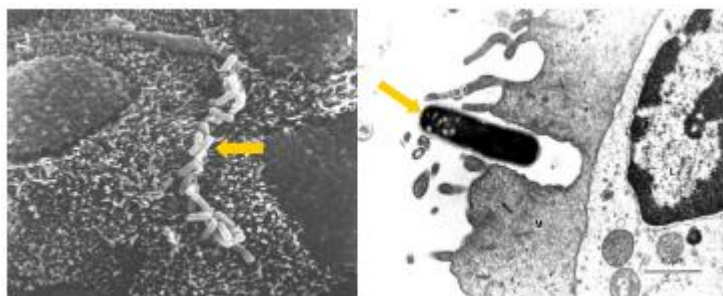
Gambar 30 memperlihatkan limfosit B dan T dengan skaning elektron mikroskop.



Gambar 30. Skaning elektron mikroskop limfosit B dan T

Jaringan limfoid yang tersebar seperti tonsil, Peyer's Patch, *bronkus-associated lymphoid tissue* dan *urogenital lymphoid tissue*, ditemukan pada lamina propia dan area submukosa dan merupakan penyusun MALT (Erickson dan Hubbard, 2000). Pada saluran pencernaan, jaringan limfoid didistribusikan tersebar misalnya pada Peyer's Patch, yang banyak terdapat pada lamina propia usus dan lapisan epitel. Payer's Patch berfungsi memfasilitasi transport antigen melalui sel M, yang menyerap dan mentransfer antigen sehingga meningkatkan respon imun. Limfosit difus pada lamina propia sebagian besar adalah limfosit B, yang beberapa diantaranya sudah matang sebagai sel penghasil antibodi. Semua kelas antibodi diproduksi dengan dominasi IgA (Burkitt dkk., 1995).

Gambar 31 memperlihatkan fagositosis *Lactobacillus casei* Shiota strain oleh sel M pada Peyer's patch.



Gambar 31. Fagositosis *L. casei* Shiota strain pada Peyer's patch (Takahashi, dkk., 1991).



Salah satu respon imun yang paling banyak terjadi pada mukosa adalah respon imun humoral dan produksi sIgA (IgA sekretori) (Isolauro, 2001; Brassart dan Schiffrin, 2000). Berbeda dengan IgA pada serum, sIgA dalam bentuk dimer atau polimer. sIgA tahan terhadap proteolisis intraluminal dan tidak menimbulkan respon inflamasi, sehingga sIgA ideal untuk menjaga permukaan mukosa dari antigen dengan cara mencegah pelekatan antigen pada sel epitel.

sIgA paling banyak diproduksi oleh MALT dan sangat baik untuk merefleksikan respon saluran pencernaan daripada monomerik IgA (plasma), yang tidak merefleksikan respon saluran pencernaan secara spesifik. Antibodi sIgA lebih sulit diukur daripada monomerik IgA, sampel terbaik untuk mendapatkan sIgA dapat diperoleh dari cairan usus dan *saliva*. Mendapatkan sampel untuk analisis sIgA dari cairan manusia bersifat invasif. Saliva mungkin bukan sumber yang optimal, namun sampelnya mudah didapat dari manusia dan *saliva* dapat merefleksikan aktivitas MALT (Erickson dan Hubbard, 2000).

Menurut Isolauro dkk. (2001) sistem imun mukosa yang diaktifkan oleh GALT dapat mempengaruhi respon imun permukaan mukosa lainnya seperti saluran pernapasan, dan saliva sehingga sampel untuk mengetahui respon imun spesifik pada saluran pencernaan dapat diambil dari saliva.

Ekosistem mikroba bagian bawah saluran pencernaan dapat dibagi setidaknya menjadi dua sub ekosistem, yaitu bakteri luminal dan bakteri mukosal. Komposisi bakteri dalam saluran pencernaan lumen hanya ditentukan oleh ketersediaan nutrisi dan pengaruh senyawa antimikroba, sedangkan komposisi bakteri mukosal ditentukan oleh laju produksi mukus, produksi imunoglobulin (Ig) yang disekresikan, ekstrusi bahan selular dari membran ke mukus, serta ekspresi inang terhadap tempat pelekatan.

Efek keterikatan pada sisi luminal lebih efisien pada beberapa mikroba, tanpa perlu melekat pada mukosa.

Saluran pencernaan adalah pintu masuk berbagai mikroba ke dalam tubuh, dan yang saluran pencernaan mengandung jaringan limfoid khusus dikenal sebagai jaringan limfoid saluran pencernaan (Gut-Associated Lymphoid Tissue, GALT). Terdapat komponen imun seperti limfosit intraepitelial usus dan limfosit lamina propria

mukosa, yang terdifusi dan komponen agregat imun yang mencakup Peyer's patches yang mengandung B limfosit dan sel T yang mengandung CD4 atau sel T helper, dan kelenjar getah bening.

IgA penting pada beberapa permukaan sel epitel dan bekerja sebagai barier pelindung potensial pada beberapa titik masuk seperti saluran pencernaan, saluran pernapasan, saluran genital, dan mata. IgA adalah immunoglobulin yang paling banyak terdapat pada kolostrum dan susu, juga ditemukan pada keringat, air mata dan saliva (Crowther, 1995).

Jaringan limfoid saluran pencernaan, atau dikenal sebagai GALT (*gut-associated lymphoid tissue*) adalah yang pertama kontak dengan komponen makanan, berbagai antigen dari makanan, bakteri "baik" dan "jahat", dan komponen lainnya dari luar tubuh. Melalui berbagai tahapan, GALT masa terbesar dari jaringan limfoid dihubungkan dengan sistem mukosal lainnya, suatu sistem kekebalan mukosal dan kekebalan sistemik.

Saluran pencernaan tidak hanya berperan dalam pencernaan makanan dan penyerapan nutrisi saja, tetapi juga sangat penting bagi sistem imun pada mamalia.

Mikrobiota saat ini digunakan untuk menggantikan istilah mikroflora dalam saluran pencernaan, karena masih banyak bakteri yang masih belum dapat dikulturkan, sehingga tidak terdeteksi dalam analisis mikroflora dalam saluran pencernaan, sehingga istilah mikrobiota lebih mewakili. Mikrobiota dalam usus mempengaruhi imunitas mukosal dan sistemik.

Mikrobiota dalam usus juga berfungsi sebagai penghambat biologis pertumbuhan bakteri patogen, dengan berkompetisi sumber karbon dan energi, mengurangi potensial redoks, menurunkan pH, menghasilkan asam laktat dan asam lemak bebas.

Respons imun tergantung pada kemampuan sistem imun yang dikenal sebagai limfosit dalam mengenali molekul asing (antigen) pada bakteri patogen, sehingga memberikan reaksi yang tepat untuk menyingkirkannya. Tugas makrofag adalah melakukan aktivitas terhadap antigen agar dapat berinteraksi dengan limfosit, sehingga limfosit berproliferasi untuk selanjutnya berdiferensiasi membentuk sel B, sel T dan sel fagosit.

Beberapa strain bakteri asam laktat yang bersifat probiotik menstimulir sistem imun seperti memperbaiki aktifitas makrofag,

meningkatkan antibodi, mengaktivasi sel Natural Killer.

Bakteri asam laktat probiotik dapat meningkatkan respons imun baik spesifik maupun non-spesifik, serta mengendalikan infeksi saluran usus. Bahwa bakteri asam laktat adalah non patogen dan aman untuk dikonsumsi manusia, menjadi menarik untuk memanfaatkan bakteri asam laktat dalam membantu sistem imun mukosal atau vektor hidup bagi oral vaksin (Mercenier dkk., 1995, Boersma dkk., 2000).

Untuk memastikan bakteri asam laktat yang dikonsumsi melakukan kontak dengan sistem kekebalan dalam usus, maka bakteri asam laktat harus memiliki sifat-sifat penting seperti toleran terhadap asam dan asam empedu, viabilitas dalam saluran pencernaan, respons komponen modifier pada permukaan bakteri, bertahan terhadap hambatan dalam usus seperti mukus, epitelium, mikroflora kompleks, pelekatan pada mukosa usus, dan pelekatan bakteri asam laktat pada mukosa.

## **b. Imunitas dan mikrobiota usus**

### **b.1. Bakteri usus dan pembentukan sistem imun**

Riset membandingkan tikus yang dipelihara dalam kondisi steril dibandingkan dengan tikus yang dipelihara pada kondisi normal yang bebas patogen, dengan jelas membuktikan peranan mikrobiota usus dalam membentuk sistem imun. Senyawa dinding sel bakteri, lipopolisakarida bereaksi dengan sel T, dan mikrobiota usus mengaktifkan makrofag dan sel-sel pembawa antigen.

Kemampuan sistem imun mukosal dalam menjaga tubuh terhadap infeksi dan peradangan saluran usus, dan menstimulir sel T menjadi toleran terhadap antigen yang masuk bersama makanan, mengantar studi bagaimana mekanisme bakteri asam laktat menstimulir respons imun mukosal tanpa efek samping. Sistem imun mukosal bertanggung jawab terhadap 60% produksi imunoglobulin setiap hari (Mestecky dan Mc Ghee, 1987); namun demikian, riset dalam menginduksi respons imun ditingkat saluran usus tentunya sangat sulit.

Cytokine yang dikeluarkan oleh sekumpulan sel-sel imun membantu respons imun Th1, Th2 humoral atau tolerogenik atau hanya respons peradangan. Lebih lanjut, meskipun cytokine berperan dalam mekanisme pertahanan tubuh, tetapi apabila

disekresikan secara berlebihan akan menstimulir kelainan imunopatologikal.

Probiotik mampu mensitmulir sistem imun, akibat adanya senyawa peptidoglikan dan lipopolisakarida dalam dinding selnya. Komponen dinding sel bakteri probiotik yang dikenal sebagai muramil peptida dapat memacu sistem imun. Berbagai jenis riset mengenai probiotik, khususnya respons imun telah dilakukan baik secara *in vivo*, yaitu dengan menggunakan hewan percobaan, maupun secara klinis.

Bakteri asam laktat melakukan kontak dengan sistem imun yang berada pada mukosa saluran usus melalui sel M atau sel folikel epitelium dari Peyer's patches atau melalui sel epitelial saluran usus halus atau usus besar (Perdigon dkk, 2000). Penemuan ini dapat menjelaskan adanya beragam stimulasi respons imun mukosal. Interaksi antara bakteri asam laktat probiotik dengan sel M hanya menstimulir respons imun spesifik (Neutra dan Kraehen Buhl, 1992), sedangkan interaksi antara bakteri asam laktat probiotik dengan sel folikel epitelium menstimulir respons imun non-spesifik atau peradangan, meskipun juga dapat meningkatkan respons imun spesifik. Interaksinya dengan sel epitelial dapat mengarah ke peningkatan lokal imunitas atau non-respons dengan bebas antigen.

Dengan demikian terbukti pentingnya celah tempat berkembang biaknya probiotik agar lebih baik efek imunnya di usus halus maupun usus besar. Perdigon dkk (2002) membuktikan secara *in vivo* dengan tikus BALBc bahwa pemberian *L. casei*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* dan *L. acidophilus* masing-masing sejumlah  $10^9$  koloni/hari masing-masing selama 2, 5 dan 7 hari, mampu meningkatkan Bc12, suatu protein usus halus yang bertanggung jawab terhadap aktivasi seluler dalam menstimulir produksi cytokine, pada potongan histologis dengan uji imunofluoresens. Komponen dan struktur dinding sel bakteri probiotik bertanggung jawab terhadap beragamnya respons imun.

## **b.2. Mikrobiota usus dan perlindungan terhadap infeksi**

Berbagai cara mikrobiota usus menegah infeksi patogen diantaranya adalah kompetisi nutrisi, mikrobiota usus mampu memanfaatkan musin dan polisakarida dari bahan pangan, tetapi mikroba dari luar tidak dapat memanfaatkannya; asam lemak bebas yang dihasilkan oleh mikrobiota usus menghambat proliferasi

patogen dengan menurunkan keasaman usus, dan juga beberapa bakteri menghasilkan bakteriosin; mikrobiota usus mempercepat mengeluarkan kotoran dengan menstimulir motilitas usus; dan mikrobiota usus menstimulir imunitas usus

Beberapa contoh gangguan pada usus misalnya alergi makanan, akut rotavirus diare pada anak-anak, dan gangguan pada usus. Kemampuan bakteri probiotik melakukan kolonisasi terutama tergantung pada kemampuan melekat pada permukaan epitelial usus dan memperkuat hambatan mukosal sehingga mengubah mikroflora usus, mencegah pelekatan bakteri “jahat” dan aktivasi patogen, modifikasi dietary protein oleh bakteri usus, modifikasi aktivitas bakterial enzim, dan modifikasi atau mengendalikan pengambilan antigen seperti tercantum pada Tabel 32.

Gangguan pada sel epitelial dan normal mikrobiota oleh patogen, virus, senyawa kimia, atau radiasi, akan merusak mekanisme perlindungan tersebut, sehingga permeabilitas berubah dan memungkinkan bagi patogen, antigen asing, dan senyawa berbahaya lainnya untuk menyerang, sehingga mengakibatkan diare, inflamasi mukosa, atau aktivasi senyawa berbahaya dalam usus.

Terdapat beberapa sel-sel imuno kompeten pada mukosa usus, seperti intraepithelial limposit, makrofag dan juga limposit T dan B pada mukosa yang lebih dalam. Pada sisi luminal Peyer’s patches, sel M dengan aktivitas fagosit juga ada bersama-sama sel epitelial usus. Sel M berfungsi sebagai pertahanan terhadap masuknya mikroba dan antigen, dan untuk menunjukkan respon imun terhadap makro molekul antigen dari luar ke dalam usus.

Pada manusia, kolonisasi bakteri pada usus dimulai segera setelah dilahirkan dan mikrobiota usus akan bervariasi tergantung kondisi dan usia. Itulah sebabnya aktivitas imun berbeda pada tiap individu mengingat mikrobiota usus berperan dalam sistem imun.

Yasui dkk. (1999) menyatakan bahwa, *Bifidobacterium breve* YIT4064, suatu strain Yakult, dapat meningkatkan produksi anti rotavirus IgA dan anti virus influenza Ig G secara *in vivo* pada tikus percobaan.

Konsumsi susu fermentasi menstimulir produksi cytokin, seperti  $\gamma$ -interferon oleh limposit, juga menstimulir pertumbuhan sel B dan sel NK, produksi antigen spesifik, yaitu antibody IgM dan Ig G.

Tabel 32. Bakteri probiotik dan efek imun

Strain	Hasil studi klinis
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA1 ( <i>L. johnsonii</i> )	meningkatkan kekebalan tubuh, melekat pada sel usus manusia
<i>Lactobacillus</i> GG (ATCC 53103)	meningkatkan kekebalan tubuh, efek penghambatan dalam saluran pencernaan, proteksi reinfeksi rotavirus
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	meningkatkan kekebalan tubuh dan cegah diare rotavirus
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	cegah diare karena virus
<i>Lactobacillus casei</i>	meningkatkan kekebalan tubuh

Sumber : Isolauri, Salminen, dan Salminen di dalam Salminen dan Wright (1998)

Sampel cairan untuk analisis sIgA pada manusia membutuhkan invasi. *Saliva* meskipun bukan sumber yang optimal, namun sampelnya mudah didapat dari manusia dan *saliva* dapat merefleksikan aktivitas MALT (Erickson dan Hubbard, 2000).

Metode untuk mengukur respon imun humoral (antibodi) dapat dibagi menjadi tiga kelas yaitu *primary binding test*, *secondary binding test* dan *tertiary binding test* (Tabel 33). Metode yang paling sensitif dalam arti jumlah antibodi yang dapat dideteksi adalah *primary binding test*, pengukuran langsung dilakukan pada interaksi antibodi-antigen. Uji ELISA dan Radioimmunoassay (RIA) termasuk di dalamnya. Sebaliknya, pada *secondary binding test*, pengukuran dilakukan pada konsekuensi hasil pembentukan kompleks imun *in vitro*. Secara teori, metode ini sangat kurang sensitif dibanding *primary binding test*, namun metode ini lebih sederhana untuk dilaksanakan. *Tertiary binding test* mengukur konsekuensi dari respon imun secara *in vivo*. Metode ini biasanya kurang sensitif dibanding *primary binding test*, namun lebih banyak merefleksikan sistem imun (Tizard, 1982).

Tabel 33. Metode analisis respon imun humoral pada saluran pencernaan

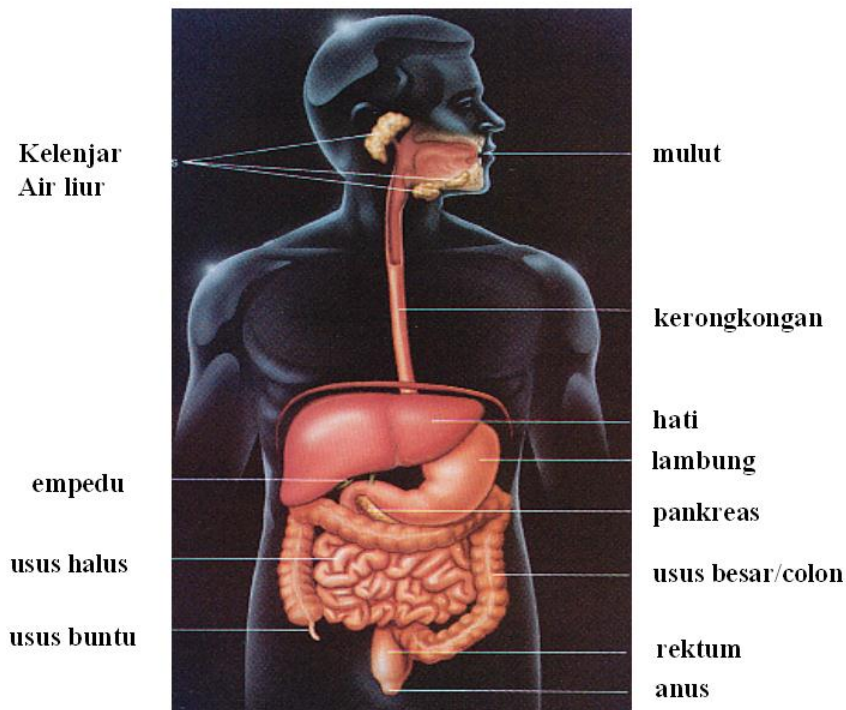
Pengukuran	Metode	Keuntungan	Kekurangan
<b>IgA dan s IgA</b>	ELISA, RIA atau immuno-fluorescene	IgA mudah dan sIgA lebih sulit pada manusia.	Monomeric IgA kebanyakan diproduksi di <i>bone marrow</i> ; tidak
• Blood-sIgA atau IgA sirkulasi-sel produksi		sIgA kebanyakan diproduksi pada sisi mukosal, respon <i>intestine</i> . Mudah diukur, merefleksikan MALT.	merefleksikan respon kolonik. Aktivitas proteolitik hanya merefleksikan respon kolonik.
• Feses		Respon imun saluran pencernaan.	-
• Saliva			
• Gut fluid (cairan usus)	Lavage (cairan usus)	Menggantikan IgA pada sistem imun mukosa orang yang kekurangan IgA	Invasif Lebih sedikit dibandingkan IgA
<b>IgM</b>			
<b>IgG</b>			Sedikit merefleksikan respon imun mukosa

Sumber : Erickson dan Hubbard, 2000

## VII. Kondisi saluran pencernaan

---

Saluran pencernaan mempunyai struktur dasar dengan komponen utama terdiri dari dinding yang dilapisi mukosa terbentuk dari epitelium mukosal, dan submukosa. Epitelium mukosal dari mulut ke kerongkongan dan pada area anus berupa satu lapisan. Pada usus halus, epitelium mukosal lumen lapisannya terlihat putih di bawah mikroskop cahaya., dan mikrovili terlihat di bawah mikroskop elektron. Gambar 32 memperlihatkan sistem saluran pencernaan.



Gambar 32. Sistem saluran pencernaan

Lapisan musin setebal 400  $\mu$ m menyelimuti dinding usus manusia, agar terlindung dari kerusakan mekanis dan invasi bakteri patogen, disamping berfungsi sebagai habitat dan nutrisi mikroflora alami pada epithelial (Matsumoto dkk., 2001). Pengelupasan dan sekresi selalu berulang pada lapisan musin dan dipengaruhi oleh diet dan proses



penuaan. Musin glikoprotein baru sebagai komponen utama mukus, secara teratur disekresikan. Mukus yang melapisi sel epitelial merupakan permukaan pertama bagi mikroba yang termakan beradesi dan berkolonisasi. Jadi bakteri bisa melekat pada mukus tetapi tidak bisa mencapai sel epitelial, terbuang bersama musin yang terdegradasi bersama isi luminal. Peranan terpenting adalah mencegah adesi mikroba pada jaringan epitelial. Itulah sebabnya, lapisan musin sangat penting bagi adesi dan kolonisasi mikroba usus. Dilaporkan bahwa bakteri *E. coli* enteropatogen memulai penyakit infeksi dengan adesi ke musin usus, dan reseptor untuk flagella *E. coli* enteropatogen terdapat di musin usus.

Menurut Suzuki dkk (1993), kuat atau lemahnya sifat adesif *Bifidobacterium* pada musin usus akan mengendalikan perubahan mikroflora usus dengan bertambahnya usia.

Salah satu kriteria utama untuk menseleksi strain probiotik adalah kemampuannya melekat pada permukaan usus. Pelekatan pada mukosa memperpanjang waktu probiotik untuk berperan dalam sistem imun saluran pencernaan dan mikrobiota. Jadi, kemampuan melekat pada permukaan usus berhubungan dengan efektifitas strain probiotik dalam memberikan efek positif bagi kesehatan. Pelekatan bakteri memungkinkan terjadinya interaksi spesifik antara dua permukaan yaitu adhesin (biasanya protein) dan reseptor yang sesuai.

Sekresi endokrin sel yang mensekresi hormon saluran lambung berada pada epitelium mukosal. Di bawah epitelium mukosal terdapat lapisan mukosa dan dari kerongkongan ke usus besar, dimana membran mukosa itu sendiri motil.

Motilitas saluran pencernaan, mempunyai fungsi transport makanan sehingga bisa terjadi absorpsi pencernaan yang lancar dan efisien. Makanan yang kita telan masuk ke dalam mulut dengan pergerakan bibir, gigi dan lidah, dan dihancurkan oleh gigi sehingga mudah ditelan dan dicampur dengan air liur.

#### **A. Sekresi berbagai cairan pencernaan**

Berbagai cairan pencernaan disekresikan oleh organ-organ pencernaan, dan sebagian besar dari cairan-cairan ini menghambat perjalanan bakteri dari mulut ke usus besar.

Air liur disekresikan dari kelenjar air liur sebanyak sekitar 1000 – 1500 ml per hari. Senyawa organik yang terkandung didalamnya selain enzim ptialin, suatu enzim  $\alpha$ -amilase, juga terdapat musin dan lisozim. Aktivitas

optimum enzim ptyalin pada pH 6,7. jadi, begitu makanan masuk ke dalam lambung enzim ini menjadi inaktif. Sekresi air liur dikendalikan oleh sistem syaraf, sehingga pada saat stres dan merasa khawatir, sekresi air liur menjadi berkurang. Enzim lisozim menghidrolisis komponen penyusun dinding sel bakteri yaitu peptidoglikan, sehingga mengakibatkan terjadinya lisis dan kematian pada bakteri, khususnya bakteri gram negatif. Itulah sebabnya air liur didominasi oleh bakteri gram positif berbentuk batang (*Lactobacilli* dan *Actinomyces*) dan berbentuk kokus (*Streptococci* dan *Micrococci*) seperti yang dapat dilihat pada Tabel 34.

Tabel 34. Mikrobiota dalam mulut

Gram positif	Gram negatif
<b>Batang</b>	
<i>Actinomyces</i>	<i>Bacteroides</i>
<i>Arachnia</i>	<i>Wallinella</i>
<i>Bifidobacteria</i>	<i>Selenomonas</i>
<i>Lactobacilli</i>	<i>Fusonacteria</i>
<i>Bacterionema</i>	<i>Leptotrichia</i>
<i>Eubacteria</i>	<i>Capnocythophaga</i>
<i>Propionibacteria</i>	<i>Haemophilus</i>
<b>Cocci</b>	
<i>Streptococci</i>	<i>Nisseria</i>
<i>Micrococci</i>	<i>Veillonella</i>
<i>Enterococci</i>	<i>Branhamella</i>

Sumber : Hill, 1995

Asam lambung disekresikan setiap hari sebanyak 2.000 – 3.000 ml berupa asam hidroklorat, mukus dan enzim-enzim pencernaan, seperti enzim pepsin suatu enzim penghidrolisis protein yang optimum pada pH 1,5 – 2,5. Alkohol dan kafein menstimulir mukosa lambung dan memacu sekresi asam lambung. Semua bakteri yang bisa hidup dalam tubuh manusia akan mati pada pH di bawah 3,0. Drasar dkk (1969) menemukan bahwa pada pH rendah di bawah 2, pada saat lambung dalam keadaan istirahat, asam lambung steril, sedangkan pada pH di atas 4 – 5 bakteri dapat bertahan dan berkembang biak.

Stres selular dimulai di dalam lambung, yang mempunyai pH serendah 1,5. Setelah bakteri lolos dari lambung, akan masuk ke saluran usus bagian atas dimana garam empedu disekresikan ke dalam saluran pencernaan. Konsentrasi empedu dalam sistem pencernaan manusia bervariasi dan sulit

diduga. Selanjutnya, bakteri yang lolos pada tahap ini akan berkolonisasi pada epitelium saluran usus bagian bawah.

Dengan demikian, strain probiotik harus bisa bertahan pada kondisi asam setidaknya selama 90 menit, tahan asam empedu, melekat pada epitelium, dan tumbuh dalam saluran usus bagian bawah sebelum memulai aktivitasnya dalam memberikan manfaat bagi kesehatan.

Marshall dan Warren (1984) pertama kali mengisolasi bakteri *Helicobacter pylori* dari mukosa lambung, bakteri penyebab tukak lambung, gastritis bahkan bisa mengakibatkan kanker lambung.

Getah pankreas disekresikan sejumlah 200 ml per hari ke dalam usus dua belas jari, mengandung berbagai enzim pencernaan (Tabel 35).

Asam empedu terbentuk dalam hati dan disalurkan ke usus melalui usus dua belas jari. Asam empedu merupakan cairan kompleks dan komposisinya bervariasi pada tiap orang tergantung nutrisi yang dikonsumsi dan toksin terhadap mikroba, mengirimkan limbah tubuh kita ke usus

Asam dan garam empedu merupakan larutan iso-osmotik ekstraseluler yang disekresikan setiap hari sebanyak 500 – 700 ml. Garam empedu banyak mengandung kation  $\text{Na}^+$ , dan anion anorganik seperti  $\text{Cl}^-$  dan  $\text{HCO}_3^-$  serta protein seperti albumin, IgA dari plasma, dan 5'-nukleotida dari sel hati. Asam empedu mencapai konsentrasi 35 mM, mengandung padatan seperti garam empedu, terbanyak garam Na dan pigmen empedu seperti bilirubin glukuronida, sulfat steroid dan senyawa beracun lainnya, juga terkandung sejumlah lipid seperti fosfolipid dan kolesterol (Klaasen dan Watris, 1984; Burwen dkk., 1992).

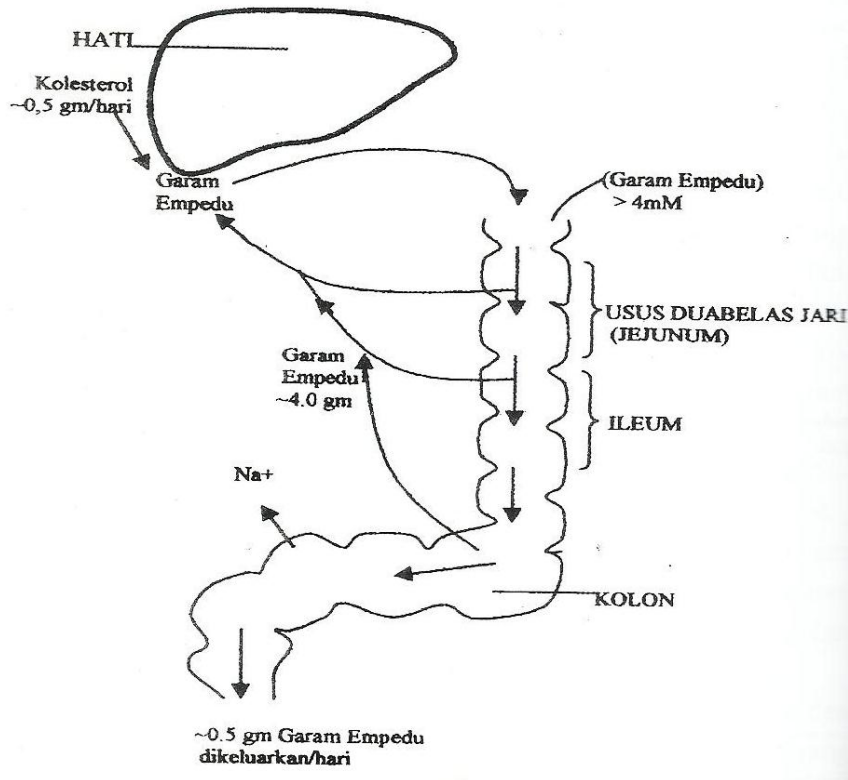
Tabel 35. Berbagai enzim pencernaan

Kelenjar	Enzim	Aktivator	Substrat	aktivitas katalitik
air liur	$\alpha$ -amilase		pati	ikatan $\alpha$ 1,4, menghasilkan oligosakarida, iso-maltosa dan maltosa
lambung	pepsin (pepsinogen)	HCl	protein, polipeptida	memecah ikatan peptida
Pankreas eksokrin	tripsin tripsinogen khimotripsin khimotripsinogen karboksipeptidase A prokarboksipeptidase A karboksipeptidase B prokarboksipeptidase B	enterokinase tripsin	protein polipeptida protein polipeptida protein polipeptida protein polipeptida	memecah ikatan peptida
	lipase pankreatik $\alpha$ -amilase pankreatik elastase	surfaktan Cl- tripsin	trigliserida pati elastin	digliserida, monogliserida sama dengan $\alpha$ -amilase air liur memecah asam amino
	ribonuklease deoksiribonuklease fosfo lipase A enterokinase aminopeptidase		RNA DNA lesitin tripsinogen polipeptida	menghasilkan nukleotida menghasilkan nukleotida lisolesitin tripsin memecah asam amino
mukosa usus	dipeptidase maltase laktase sukrase isomaltase	tripan	dipeptida maltosa asam laktat sukrosa $\square$ -limit dekstran	menghasilkan 2 mol asam amino glukosa galaktosa dan glukosa fruktosa dan glukosa glukosa
	nuklease		asam nukleat monogliserida	pentosa, purin dan pirimidin
	lipase usus		gliserol dan asam lemak	

Sumber : Ando dan Oi, di dalam Nakazawa dan Hosono, 1992

Asam empedu diserap kembali dari ileum bagian bawah dan kembali ke hati, untuk disekresikan lagi ke empedu. Asam empedu yang tidak diserap kembali dan lolos ke usus besar didekonjugasi oleh bakteri usus menjadi asam empedu sekunder, yaitu asam deoksikholat dari asam kholat, dan lithokholat dari chenodeoksikholat. Asam deoksikholat diserap dari

mukosa usus besar, dan kembali terkonjugasi di hati dan disekresikan dalam empedu. Mekanisme penyerapan, sintesis kembali dan sekresi asam empedu di usus halus dan usus besar dikenal sebagai sirkulasi hepatic seperti dapat dilihat pada Gambar 33.



Gambar 33. Skema diagram sirkulasi entero-hepatik asam empedu

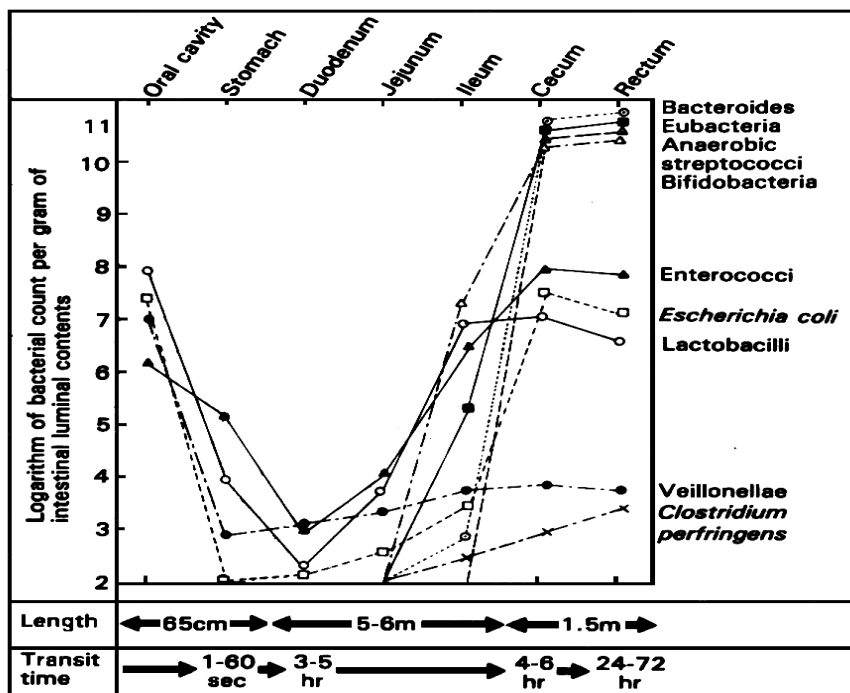
## B. Bakteri dalam saluran pencernaan

Luas permukaan usus manusia mencapai  $200 \text{ m}^2$ , dihuni oleh lebih dari 400 jenis bakteri, yang jumlah keseluruhannya mencapai lebih dari  $10^{14}$  bakteri.

Sistem pencernaan manusia diawali dari mulut hingga usus, dan saluran pencernaan dari esophagus atau kerongkongan hingga rektum atau anus. Waktu yang dibutuhkan (*transit time*) makanan dan panjang saluran pencernaan dari mulut sampai rektum yang harus ditempuh, serta populasi bakteri pada berbagai saluran pencernaan, dapat dilihat pada Gambar 34. Lebih dari 99 persen bakteri tinggal dalam saluran usus besar atau kolon,

dan lebih dari 99% berupa bakteri anaerob mutlak, diantaranya adalah *Clostridium*, *Bacterioides*, *Bifidobacterium* dan lain-lain, dan hanya kurang dari 1% berupa bakteri fakultatif anaerobik, seperti *E. coli*, *Proteus*, *Enterobacter* dan bakteri patogen lainnya.. Dengan demikian, diperlukan adanya efek antagonis terhadap bakteri patogen, terutama bakteri penyebab diare.

Mikrobiota usus manusia merupakan komunitas bakteri kompleks yang didominasi oleh bakteri obligat anaerob atau anaerob mutlak. Sekitar 400 spesies bakteri menempati saluran usus manusia, sekitar 30 – 40 spesies mendominasi (Drasar dan Barrow, 1985). Sekelompok bakteri membentuk populasi yang besar dan terdapat dalam tinja sekitar  $10^{11}$  sel per gram (Franks dkk., 1998).



Gambar 34. Populasi berbagai jenis bakteri pada saluran pencernaan orang dewasa

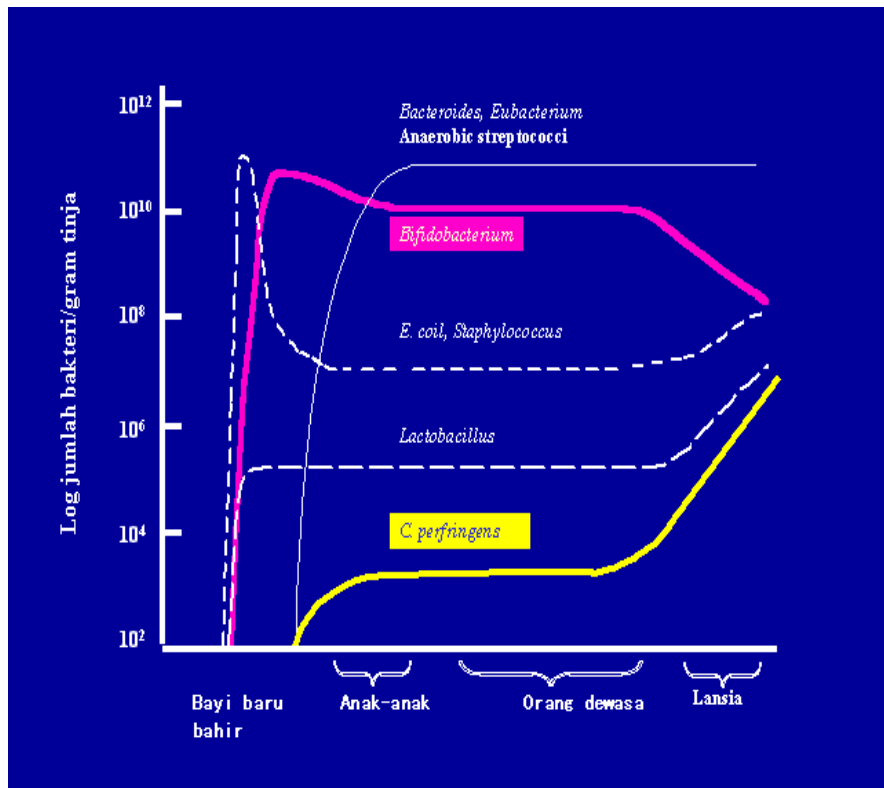
Sulit mendapatkan data akurat dalam menghitung keberadaan bakteri dalam saluran pencernaan, karena masalah pengambilan sampel termasuk cara pengambilan sampel dari tiap organ pencernaan, penanganan selama perjalanan ke laboratorium, dan penyimpanan sampel.

Masalah lainnya adalah dalam hal kultivasi yang mencakup isolasi, perhitungan secara kuantitatif, dan identifikasi, mengingat secara umum, bakteri anaerob mutlak sulit untuk ditumbuhkan, karena sangat sensitif terhadap oksigen, sehingga banyak jenis dan jumlah bakteri yang masuk ke dalam kelompok ini tidak dapat dikulturkan pada kondisi laboratorium (*unculturable microbes*). Sekitar 60 % dari total mikroba tidak dapat dikultivasi, meskipun dengan metoda kultivasi anaerobik terbaik sekalipun (Tannock dkk., 2000). Pendekatan analisis dengan metode molekuler, berdasarkan DNA, dengan target khromosom bakteri untuk metode DNA, yaitu gen 16S rRNA dapat mengatasi masalah mikroba yang tidak dapat dikulturkan pada kondisi laboratorium tersebut di atas.

Perhitungan mikrobiota yang relatif mudah dilakukan adalah pada tinja dan air liur, sedangkan pada bagian lainnya seperti di antara kerongkongan dan anus sulit untuk diakses, sehingga tidak ada metoda pengambilan sampel yang tepat untuk digunakan.

Diet merupakan salah satu faktor penentu komposisi bakteri usus, disamping faktor di dalam saluran pencernaan itu sendiri. Penelitian membuktikan populasi bakteri “jahat” dalam tinja pengonsumsi diet makanan Barat (tinggi lemak dan protein, rendah serat) lebih tinggi dibanding makanan Asia yang lebih banyak mengonsumsi sayuran. Komposisi bakteri usus bayi yang minum ASI didominasi oleh *Bifidobacterium*, sedangkan usus bayi yang diberi susu formula, ditempati bakteri laktat dan berbagai bakteri “jahat”. Dalam ASI, terkandung *colostrum*, *N-acetyl glucosamine*, yang mendukung pertumbuhan bakteri *Bifidobacterium*.

Populasi bakteri semakin kompleks baik jenis maupun jumlahnya, dengan bertambahnya usia di sepanjang saluran pencernaan (Gambar 30). Lambung hanya mengandung bakteri yang tahan terhadap asam, sebagaimana diketahui, pH atau keasaman lambung sangat rendah, sekitar 1,7 dan bakteri laktat bisa bertahan dalam bilangan ribuan ( $10^3$ ) bakteri. Usus besar atau *colon* ditempati 400 – 500 jenis bakteri yang jumlahnya triliunan ( $10^{12-14}$ ) bakteri, dan bakteri laktat jumlahnya sekitar  $10^4 - 10^9$  bakteri (Gambar 34 dan 35). Sepertiga berat tinja merupakan bakteri baik hidup maupun yang mati.

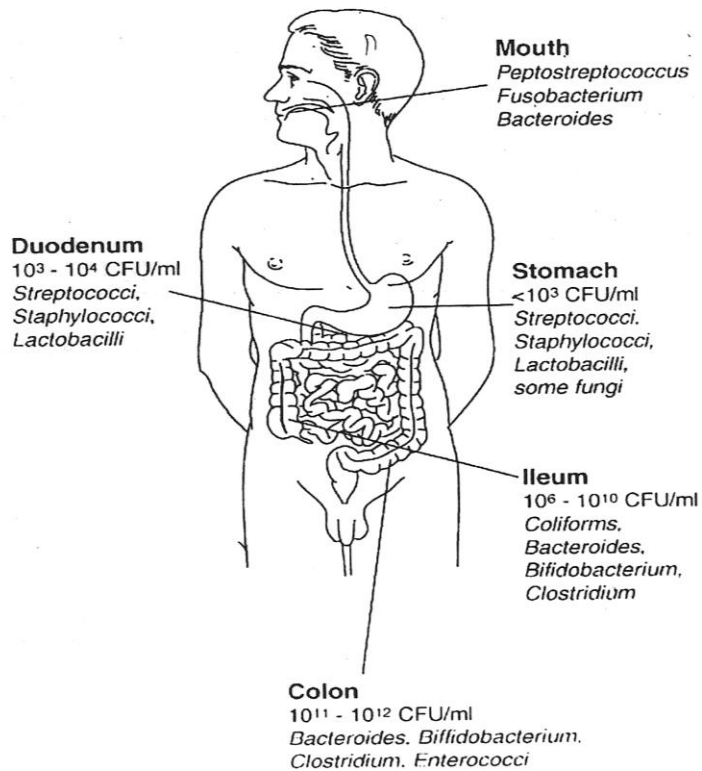


Gambar 35. Pengaruh penuaan pada fekal flora (Mitsuoka, 1989)

Pada Gambar 35 terlihat saat bayi diberi makanan tambahan sampai pada masa kanak-kanak, populasi bakteri anaerob mutlak seperti *Bacteroides*, *Eubacteria* dan anaerob kokus mendominasi saluran pencernaan. Sedangkan populasi *Bifidobacteria* sedikit menurun pada saat mencapai usia dewasa. Pada usia lanjut, terjadi peningkatan populasi *Clostridium perfringens*, yaitu bakteri pembusuk, diikuti dengan penurunan *Bifidobacteria*.

Mikrobiota usus berbeda pada tiap individu tergantung dari nutrisi, kesehatan (sehat, sakit atau stress), obat yang dimakan, dan kondisi lingkungan hidupnya. Menurut Mitsuoka (1985), mikrobiota usus lansia yang panjang umur sama dengan pada orang dewasa sehat.





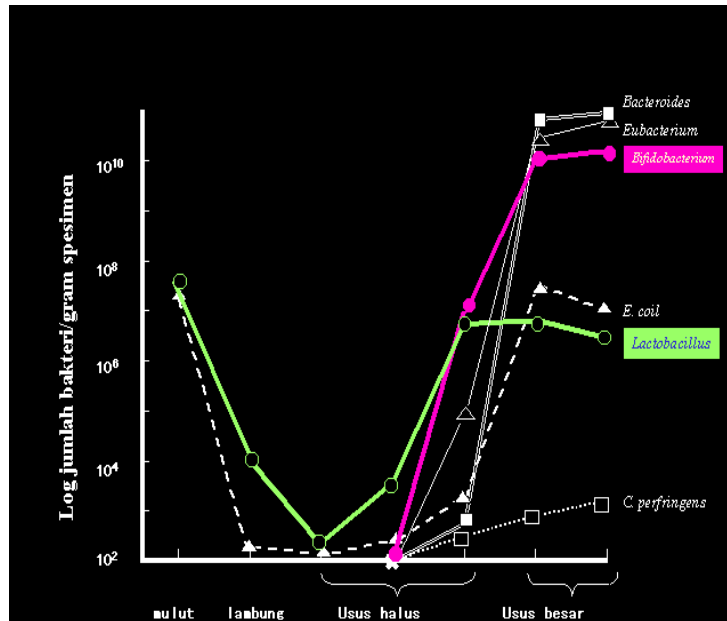
(Sumber : Young dan Huffiman, 2003)

Gambar 36. Populasi bakteri pada berbagai saluran pencernaan manusia

Tabel 36 memperlihatkan berbagai jenis mikroba yang terdapat dalam saluran pencernaan manusia, dimulai dari mulut sampai usus besar.

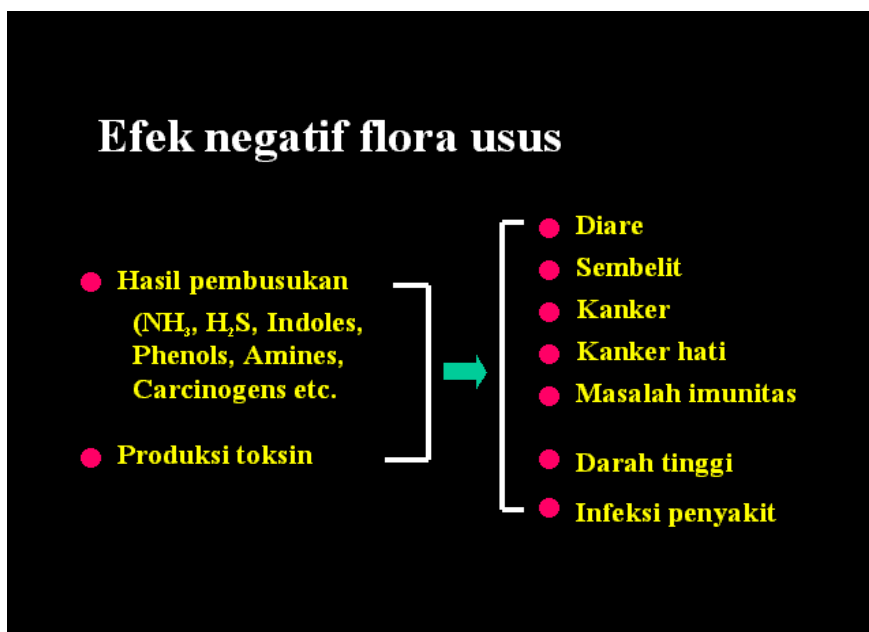
Tabel 36. Komposisi mikroflora dalam saluran pencernaan manusia

Jenis mikroba	Jumlah mikroba (koloni/ml atau per g)				
	Orofaring	Lambung	Jejunum	Ileum	Usus besar
Jumlah total viabel	$10^8 - 10^{10}$	$0 - 10^4$	$0 - 10^5$	$10^4 - 10^8$	$10^{10} - 10^{12}$
<b>Mikroba aerobik</b>					
<i>Streptococcus</i>	$10^6 - 10^8$	$1 - 10^3$	$0 - 10^4$	$10^2 - 10^4$	$10^3 - 10^5$
<i>Enterococcus</i>	jarang	jarang	$0 - 10^2$	$10^2 - 10^4$	$10^5 - 10^{10}$
<i>Staphylococcus</i>	$0 - 10^2$	$0 - 10^2$	$0 - 10^3$	$10^2 - 10^5$	$10^4 - 10^6$
<i>Enterobacteria</i>	jarang	$0 - 10^2$	$0 - 10^3$	$10^2 - 10^7$	$10^4 - 10^{10}$
Khamir	$0 - 10^3$	$0 - 10^2$	$0 - 10^2$	$10^2 - 10^4$	$10^2 - 10^5$
<b>Mikroba anaerobik</b>					
<i>Peptostreptococcus</i>	$10^4 - 10^6$	$1 - 10^3$	$0 - 10^3$	$10^2 - 10^6$	$10^{10} - 10^{12}$
<i>Bifidobacterium</i>	$0 - 10^2$	$0 - 10^2$	$0 - 10^4$	$10^3 - 10^9$	$10^8 - 10^{11}$
<i>Lactobacillus</i>	$0 - 10^3$	$0 - 10^3$	$0 - 10^4$	$10^2 - 10^5$	$10^6 - 10^8$
<i>Clostridium</i>	jarang	jarang	jarang	$10^2 - 10^4$	$10^6 - 10^9$
<i>Eubacterium</i>	$10^2 - 10^3$	jarang	jarang	jarang	$10^9 - 10^{12}$
<i>Veillonella</i>	$10^3 - 10^8$	$0 - 10^2$	$0 - 10^3$	$10^2 - 10^4$	$10^3 - 10^6$
<i>Fusobacterium</i>	$10^4 - 10^8$	$0 - 10^2$	$0 - 10^3$	$10^3 - 10^4$	$10^6 - 10^8$
<i>Bacteroides fragilis</i>	jarang	jarang	$0 - 10^3$	$10^3 - 10^7$	$10^{10} - 10^{12}$
<i>Prevotella</i>	$10^6 - 10^8$	$0 - 10^2$	$10^2 - 10^4$	$10^3 - 10^4$	$10^4 - 10^5$



Gambar 37. Populasi mikrobiota dalam saluran pencernaan pada orang dewasa sehat (Mitsuoka, 1982)

Mikrobiota dalam saluran pencernaan bisa membantu pencernaan makanan, bahkan beberapa jenis bakteri menghasilkan berbagai jenis vitamin yang dibutuhkan oleh kita, namun demikian beberapa efek negatif juga bisa terjadi yang secara umum adalah dihasilkannya senyawa-senyawa hasil pembusukan protein, produksi toksin, serta berbagai senyawa penyebab kanker (Gambar 38)



Gambar 38. Efek merugikan flora usus terhadap kesehatan manusia

Berbagai jenis bakteri usus tidak bisa dihindari keberadaannya, sebab tempat hidup kita tidak steril, dan disebut sebagai normal mikrobiota. Masalah baru timbul apabila bakteri “jahat”, yaitu patogen (penyebab penyakit) jumlahnya berlebihan. Terjadi diare, sekiranya bakteri enteropatogen *E. coli*, *Vibrio cholerae* atau *Salmonella typhi* tumbuh pesat. Masalah lainnya adalah, bakteri melepaskan enzim bermanfaat dan juga yang tidak diinginkan (Gambar 39). Enzim  $\square$ -glukuronidase, azoreduktase dan nitroreduktase membantu proses terbentuknya senyawa karsinogenik dalam saluran pencernaan. Pemberian antibiotik akan mengganggu keseimbangan mikroflora usus yang berakibat diare.

ActivitiesEnzim fekal flora	Produk
Tryptophanase	Indole
Decarboxylase	Amines
Deaminase	H <sub>2</sub> S
Urease	NH <sub>3</sub>
Azoreductase	N-nitroso compounds
N-nitrosation	Nitrite
Nitrate reductase	Hormonal substances
N-nitroreductase	Secondary amines
Nitrification	Neutral steroids
N-dealkylation	Acid steroids
Deconjugation	
Dehydroxylation	
Aromatization	
β-glucuronidase	
β-glucosidase	

Gambar 39. Berbagai jenis enzim yang dihasilkan oleh bakteri dalam tinja

### C. Berbagai hambatan dalam saluran pencernaan

Berbagai rintangan harus dihadapi oleh mikroba dalam saluran pencernaan mulai dari mulut sampai anus. Pada perjalanannya melintasi berbagai sistem pencernaan, khususnya dari mulut hingga usus halus, hambatan yang dijumpai diantaranya enzim lisozim pada air liur, asam lambung, garam empedu dan senyawa metabolit yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat, terutama asam laktat.

Diantara yang telah disebutkan di atas, hambatan paling berarti adalah asam lambung dan garam empedu. Sedangkan pada usus besar hampir tidak ditemukan lagi hambatan yang cukup berarti, kecuali terjadinya kompetisi terhadap nutrisi.

Bakteri probiotik harus mampu bertahan dalam menghadapi rintangan-rintangan tersebut, agar dapat mencapai usus dalam keadaan tetap hidup dalam jumlah yang cukup memadai untuk berkembang biak dan menyeimbangkan mikrobiota dalam usus.

## VIII. Efek Probiotik, Prebiotik dan Synbiotik

---

Ketahanan terhadap penyakit tiap orang berbeda. Faktor-faktor yang ikut berperan diantaranya yaitu :

### **Ras**

Beberapa penyakit infeksi lebih banyak menyerang ras tertentu. Sebagai contoh, penyakit TBC lebih ganas terhadap penduduk asli Amerika dibanding orang-orang Eropa. Sedangkan orang Eropa lebih mudah menderita penyakit sipilis dibanding orang Cina, yang telah terkena penyakit ini ribuan tahun lebih lama, sehingga terjadi seleksi alami yang menghasilkan populasi yang lebih tahan terhadap sipilis. Demikian juga orang-orang kulit hitam lebih resisten terhadap malaria ketimbang orang kulit putih.

### **Usia**

Bayi dan lansia paling rentan terhadap penyakit infeksi. Sistem imun pada bayi belum matang benar. Efisiensi sistem imun meluruh dengan bertambahnya usia. Banyak orang yang meninggal pada usia tua sebenarnya akibat penyakit infeksi yang menyerang bertubi-tubi.

### **Jenis kelamin**

Perbedaan anatomi, hormon, dan reaksi biokimiawi dalam tubuh antara pria dan wanita membantu menjelaskan mengapa beberapa penyakit lebih suka singgah pada jenis kelamin tertentu. Wanita lebih mudah terserang infeksi kandung kemih dan penyakit saluran air seni, sebab urethra nya lebih pendek, sehingga lebih mudah diserang mikroba.

### **Status imun**

Orang Asia lebih kuat ketahanan tubuhnya ketimbang orang Barat, karena sering dan banyaknya infeksi yang menyerang. Sama halnya dengan vaksinasi yang menstimulir proteksi.

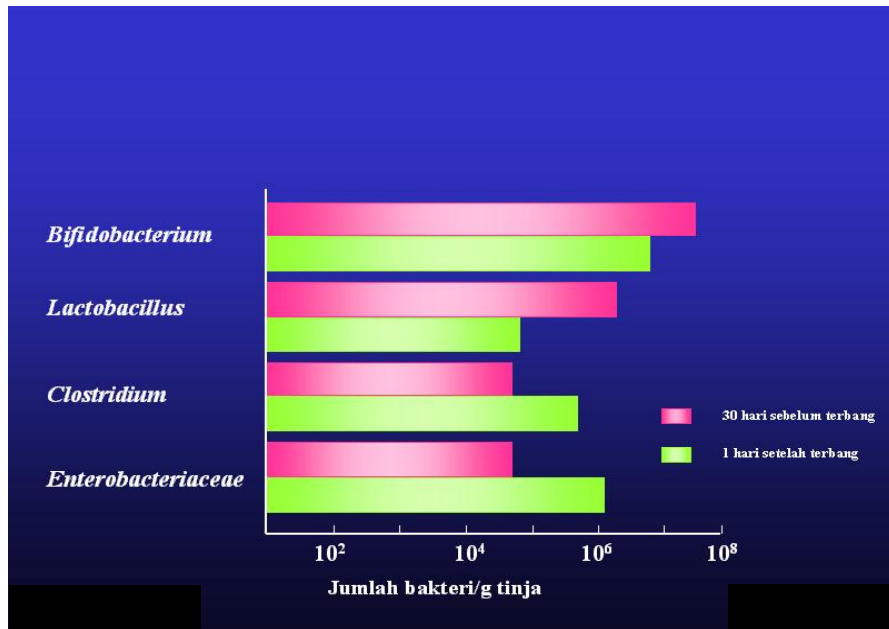
### **Jenis Pekerjaan**

Profesi tertentu semisal dokter hewan dan yang bertanggung jawab terhadap inspeksi hewan lebih rentan terhadap penyakit rabies.

### **Stess**

Kelelahan dan depresi akan mengubah keseimbangan hormon sehingga mengurangi ketahanan terhadap penyakit. Disamping itu, stres juga akan mengubah komposisi polulasi mikroba dalam saluran pencernaan seperti

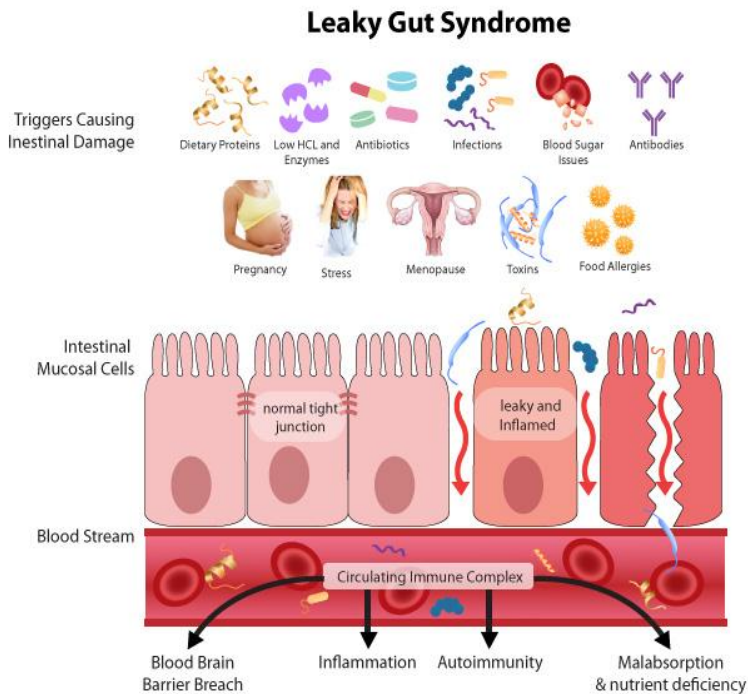
yang dapat dilihat pada Gambar 40.



Gambar 40. Pengaruh stres mental terhadap populasi fekal mikroba astronout Rusia (Sumber : Lizko dkk., 1984, dari Yakult Research Institute

### Zat Gizi

Malnutrisi atau salah gizi berperan terhadap timbulnya berbagai penyakit. Kholera biasanya fatal pada orang yang kurang gizi. Penyakit cacar air 100 sampai 400 kali lebih banyak menyerang anak-anak Afrika kurang gizi ketimbang di Amerika. Keseimbangan mikrobiota saluran cerna berperan penting dalam menjaga agar tidak terjadi kerusakan sel epitel dan *tight junction* sehingga penyerapan zat gizi menjadi tidak optimal dan memberi peluang bagi bakteri patogen untuk dapat menempel dan berkompetisi dengan bakteri baik serta berkembang biak pada sel epitel, yang pada gilirannya menimbulkan penyakit infeksi.



Gambar 41. Sindroma ”*Leaky Gut*”, kerusakan pada mukosa usus dan *tight junction*

### Habitat dan higienis

Kota besar yang penduduknya padat dan buruknya higienis komunitas lebih mudah terserang penyakit, jadi masalahnya bukan karena menurunnya ketahanan terhadap penyakit, tetapi lebih disebabkan oleh meningkatnya risiko terserang penyakit.

Para peneliti di dunia membuktikan pentingnya peranan mikroflora atau bakteri saluran pencernaan bagi kesehatan. Di antaranya adalah bakteri asam laktat yang berperan positif menjaga keseimbangan mikroflora usus serta membantu meningkatkan sistem kekebalan tubuh, dikenal sebagai efek probiotik.

Pada kenyataannya ekosistem mikroflora usus mempengaruhi munculnya penyakit degeneratif. Karena itu komposisi bakteri dalam tinja seseorang bisa jadi indikator kondisi kesehatan seseorang. Di Jepang, uji mikrobiologis feses biayanya bisa 100 ribu yen, sekitar delapan juta rupiah. Karena itu upaya menjaga keseimbangan mikroflora usus menjadi

signifikan diperlukan.

Diet adalah faktor utama penentu komposisi bakteri usus, di samping faktor di dalam saluran pencernaan itu sendiri. Penelitian membuktikan populasi bakteri "jahat" dalam tinja pengonsumsi diet makanan Barat (tinggi lemak dan protein, rendah serat) lebih tinggi dibanding makanan Asia yang lebih banyak mengonsumsi sayuran.

Komposisi bakteri usus bayi yang minum ASI didominasi oleh *Bifidobacterium*, sedangkan usus bayi yang diberi susu formula, ditempati bakteri laktat dan berbagai bakteri "jahat". Dalam ASI, terkandung colostrum, suatu oligosakarida *N-acetyl glucosamine*, yang mendukung pertumbuhan bakteri *Bifidobacterium*.

Populasi bakteri di sepanjang saluran pencernaan semakin kompleks baik jenis maupun jumlahnya, dengan bertambahnya usia. Lambung hanya mengandung bakteri yang tahan terhadap asam, sebagaimana diketahui, pH atau keasaman lambung sangat rendah, sekitar 1,7 dan bakteri laktat bisa bertahan dalam bilangan ribuan ( $10^3$ ) bakteri. Usus besar atau colon ditempati 400-500 jenis bakteri yang jumlahnya triliunan ( $10^{12}$ ) bakteri, dan bakteri laktat jumlahnya sekitar  $10^4$ - $10^9$  bakteri. Karena itu sepertiga berat feces merupakan bakteri baik hidup maupun mati.

Berbagai jenis bakteri usus tidak bisa dihindari keberadaannya, sebab tempat hidup kita tidak steril. Masalah baru timbul apabila bakteri "jahat", yaitu patogen (penyebab penyakit) jumlahnya berlebihan. Terjadinya diare misalnya, akibat bakteri enteropatogen *E coli*, *Vibrio cholerae* atau *Salmonella typhi* yang tumbuh pesat. Pemberian antibiotik juga bisa mengganggu keseimbangan mikroflora usus yang berakibat diare.

Namun bakteri tidak hanya melepaskan enzim bermanfaat, melainkan juga yang tidak diinginkan. Enzim  $\beta$ -glukuronidase, azoreduktase dan nitroreduktase misalnya, justru membantu proses terbentuknya senyawa karsinogenik dalam saluran pencernaan.

Tiga baris sistem pertahanan tubuh terhadap invasi benda asing, yaitu pertahanan tubuh di tingkat permukaan yang non-spesifik, pertahanan terhadap faositik yang non-spesifik, dan sistem imun yang spesifik terhadap tiap penyakit dapat dilihat pada Tabel 37.



Tabel 37. Berbagai sistem pertahanan tubuh non spesifik dan spesifik

Pertahanan tubuh	Melalui
<b>Permukaan (non-spesifik)</b>	
Mekanis	kulit, mukosa, silia, batuk, bersih, rambut
Kimia	pH rendah, asam lemak, lysozyme, musin
Mikrobial	kompetisi bakteri (antagonisme mikroba)
<b>Fagositik (non-spesifik)</b>	sel fagositik. Respons peradangan
<b>Sistem imun (spesifik)</b>	imun humoral (sel B), imun selular (T sel)

### A. Bakteri probiotik

Sejarah perkembangan probiotik dimulai semenjak tahun 1900-an, ketika ilmuwan Rusia Ellie Metchnikoff (1907), seorang pemenang hadiah nobel menyatakan bahwa konsumsi yogurt bisa memperpanjang umur seseorang. Kemudian pada tahun 1965, konsep probiotik sudah mulai dikenal, pertama digunakan oleh Lily dan Stillwell (1965), "probiotic" dari kata yang berarti "untuk kehidupan" dalam bahasa Yunani, untuk menjelaskan istilah yang berlawanan dengan antibiotik. Seperti pada tahun 1971 menggunakan istilah probiotik terhadap ekstrak jaringan yang menstimulir pertumbuhan mikroba. Di tahun 1974, Parker pertama kali menjabarkan arti probiotik sebagaimana yang digunakan saat ini, yaitu untuk keseimbangan mikroflora usus. Lebih lanjut Fuller pada tahun 1989 mencoba memperbaiki definisi probiotik, yaitu suplemen mikroba hidup yang memberikan efek positif manusia atau hewan dengan memperbaiki keseimbangan mikroflora usus. Hingga tahun 1990, masih diperdebatkan apakah konsep probiotik itu fakta, fiksi, mitos atau suatu realitas. Tahun 1995 diakui mulai memasuki era probiotik.

Hingga saat ini tercatat sejumlah 8,000 subyek yang digunakan dalam lebih dari 200 uji klinis probiotik, tanpa mengalami efek negatif dan membahayakan.

Definisi Salminen dkk (1998) juga menguatkan pentingnya viabilitas probiotik, yaitu preparasi mikroba hidup yang bermanfaat bagi kesehatan, dan efek menyehatkan dan keamanannya harus secara ilmiah teruji pada manusia melalui uji klinis. Saat ini definisi probiotik adalah adanya penekanan perlunya jumlah mikroba yang cukup agar memberikan efek positif bagi kesehatan, bisa berkolonisasi sehingga bisa mencapai jumlah tertentu selama waktu tertentu.

Probiotik didefinisikan sebagai "mikroorganisme hidup yang apabila diberikan dalam jumlah yang memadai memberikan manfaat kesehatan pada inangnya" (FAO and WHO, 2002). Kata-kata dalam definisi ini

dipilih secara hati-hati untuk mewakili cara pemberian probiotik. Penggunaan kata konsumsi dan menelan menjadi terlalu ketat sehingga digunakan kata *administered*, yang artinya diberikan.

Pedoman bagi produk probiotik yang diterbitkan oleh FAO/WHO pada tahun 2002 menyatakan bahwa probiotik bersifat spesifik terhadap strain, teridentifikasi secara benar, dan mempertahankan viabilitasnya pada akhir masa simpannya pada formula produk dan terbukti secara klinis aman, fungsi dan manfaatnya sebagai probiotik.

Seleksi probiotik asal Indonesia yang aman, toleransi terhadap kondisi gastrointestinal, kemampuan untuk menempel pada mukosa gastrointestinal dan eksklusi kompetitif patogen telah dilakukan secara *in vitro* (Collado et al., 2007a; Collado et al., 2007b). Adesi pada mukosa usus akan memfasilitasi kolonisasi, meskipun sifatnya sementara, hanya transit dan tidak permanen pada saluran usus manusia dan berhubungan dengan kemampuan untuk memodulasi sistem kekebalan tubuh (Schiffirin et al., 1997). Efektifitas fungsi probiotik bersifat spesifik terhadap strain dan dosisnya. Probiotik yang memenuhi kriteria tersebut secara umum merupakan bakteri asam laktat terutama *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* spesies, namun beberapa strain *Lactococcus*, *Streptococcus*, dan *Enterococcus* spesies, serta beberapa strain non patogen *Escherichia* sp dan khamir juga berpotensi sebagai probiotik.

Klein dkk (1998) melaporkan taksonomik dan fisiologi spesies *Lactobacillus* probiotik yaitu termasuk ke dalam kelompok a) *Lactobacillus acidophilus*, b) *Lactobacillus casei* dan c) *Lactobacillus reuteri/Lactobacillus fermentum*, Kebanyakan strain *Lactobacillus acidophilus* yang digunakan dalam produksi susu fermentasi probiotik diidentifikasi sebagai *Lactobacillus johnsonii* atau *Lactobacillus gasseri*, keduanya masuk dalam grup *Lactobacillus acidophilus*.

Hingga pertengahan 1980-an, genus *Bifidobacterium* diklasifikasi sebagai *Lactobacillus* spp, dan saat ini 30 jenis spesies berbeda telah diidentifikasi. Enam spesies telah digunakan dalam produk bahan susu sebagaimana dapat dilihat pada Tabel 38 , tetapi menurut Klein dkk (1998), sebagian besar strain dalam susu fermentasi probiotik adalah *B. animalis*, meskipun dicantumkan dalam label sebagai *B. longum*. *B. animalis* diberi nama baru sebagai *B. lactis* pada akhir tahun 1990 an (Meile dkk., 1997).

Bakteri asam laktat dan *Bifidobacteria* secara alami terdapat dalam saluran pencernaan manusia dan hewan, dan dalam makanan fermentasi

seperti yakult, yogurt, keju, berbagai produk salami, pickel buah dan sayuran, dan dikenal aman (status GRAS, Generally Recognized as Safe). Tidak semua bakteri laktat bersifat probiotik, dan hanya jenis bakteri laktat tertentu menempati saluran pencernaan.

### 1. Strain dan Habitat spesifik

Adalah tidak bijaksana mengasumsikan bahwa semua strain *Lactobacillus acidophilus* mempunyai sifat-sifat probiotik yang memadai; lebih lanjut, tidak semua produk fermentasi susu probiotik yang dijumpai di pasaran menyatakan secara jelas strain atau spesies yang digunakan atau juga jumlah sebenarnya. Tabel 38 menunjukkan bakteri probiotik yang digunakan dalam fermentasi susu.

Tabel 38. Mikroba probiotik dalam susu fermentasi

Genus	Spesies
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. acidophilus</i> strains LC1, La5, La1, La7, Gilliland <i>Lb. casei</i> strains Shirota, GG* atau LGG, imunitass, NCC 2008 <i>Lb. rhamnosus</i> strain GG <i>Lb. johnsonii</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lb. gasseri</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> dan subsp. <i>tolerans</i> <i>Lb. reuteri</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i> , <i>breve</i> , <i>longum</i> , <i>adolescentis</i> , <i>infantis</i> , <i>lactis</i> , <i>animalis</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i> , <i>faecalis</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardii</i> *

Sumber : Tamime dkk (1995), Tamime dan Marshall (1997), Shortt (1997), Lee dkk (1999) dan Sanders dan Huis in't Veld (1999)

\* bukan *Lb. rhamnosus* GG

\*\* pada fermentasi kefir

Strain yang berbeda dari bakteri probiotik akan memberikan efek yang berbeda berdasarkan kemampuan spesifik dan aktivitas enzimnya, bahkan dalam satu spesies sekalipun, di tingkat strain, bisa berbeda aktivitas

probiotiknya. Kolonisasi bakteri harus melekat kuat pada epitelium mukosa. dan harus bisa beradaptasi pada lingkungan tempat melekat atau beradesi. Kompetisi reseptor adhesi antara bakteri probiotik dan patogen adalah habitat spesifik. Empat mikrohabitat dalam saluran pencernaan adalah :a) permukaan sel epitelium, b) crypt ileum, cecum dan usus besar, c) mukul gel yang melapisi epitelium, dan d) lumen usus.

Untuk mengetahui bagaimana probiotik bekerja, perlu dipahami pengetahuan dasar sistem pencernaan manusia. Makanan yang dikunyah mengalami proses pemecahan secara fisik maupun kimiawi oleh asam lambung dan berbagai macam enzim, proses pencernaan ini membuat makanan akan terserap oleh usus halus dalam 4 – 6 jam setelah makan. Tidak banyak mikroba yang hidup dalam lambung atau usus bagian atas, karena banyak terdapat asam dan enzim, tetapi mikroba akan tumbuh cepat setelah masuk ke usus halus bagian bawah. Bahkan di dalam usus besar, mikroba menyempurnakan proses pencernaan bahan makanan yang belum tercerna dalam usus halus, seperti laktosa pada orang-orang yang tidak tahan terhadap laktosa, ataupun serat larut yang tidak dapat dicerna oleh enzim dalam usus halus.

## 2. Kriteria seleksi strain probiotik

Beberapa karakteristik penting yang harus dipertimbangkan dalam memilih strain probiotik potensial mencakup aspek keamanan, fungsional dan teknologi (Saarela dkk., 2000), sebagaimana yang diilustrasikan pada Gambar 43 di bawah ini.



Gambar 43. Kriteria seleksi bakteri probiotik (Saarela dkk., 2000)

### **3. Aspek Keamanan**

Salah satu karakteristik penting dalam menseleksi strain probiotik untuk manusia adalah aspek keamanannya. Idealnya berasal dari manusia dan diisolasi dari saluran pencernaan orang sehat, sebab efek positif kesehatan biasanya sangat bergantung pada lingkungan dan spesies (Lee and Salminen, 1995; Saarela dkk., 2000).

Penting juga bahwa strain probiotik tersebut juga telah terbukti dalam penggunaannya tidak bersifat patogen atau berkaitan dengan penyakit maupun kelainan saluran pencernaan. Selain itu, bakteri probiotik juga harus tidak mentransfer gen resisten terhadap antibiotik.

Strain bakteri asam laktat tradisional telah terbukti aman dikonsumsi sejak ratusan tahun yang lalu. Berbagai spesies bakteri asam laktat *Lactobacillus* dan *Enterococcus* menjadi menu sehari-hari sejak manusia memanfaatkan susu fermentasi sebagai bahan makanan. Spesies probiotik seperti *Lactobacillus acidophilus* telah digunakan dan terbukti aman selama lebih dari 70 tahun. Namun demikian aspek keamanan harus selama dipertimbangkan untuk dievaluasi. Genus *Lactococcus* dan *Lactobacillus* adalah yang paling umum mendapatkan status GRAS, sedangkan genus *Streptococcus* dan *Enterococcus* dan genus bakteri asam laktat lainnya mungkin bersifat patogen oportunistik.

Data hasil riset klinis terkontrol tidak memperlihatkan efek membahayakan untuk *Lactobacillus* dan *Bifidobacteria*. Sebagaimana disebutkan di atas dari sebanyak 200 uji klinis probiotik terhadap 8000 subyek, tidak ditemukan efek negatif terhadap subyek. Namun demikian spesies baru ataupun strain spesifik probiotik sebelum digunakan ke dalam produk makanan harus secara cermat diuji keamanan dan efektivitasnya.

#### **a. Studi keamanan probiotik**

##### **a.1. *In vivo* dan uji dengan hewan percobaan**

Uji toksisitas akut terhadap semua strain yang ada, peranan probiotik dalam mendegradasi mukus secara *in vivo* dengan hewan percobaan, efek samping terhadap sistem imun, tidak memberikan hasil positif, pada hewan percobaan. Demikian juga halnya dengan dosis yang dapat digunakan pada tingkat aman.

##### **a.2. Riset pada relawan sehat dan uji klinis**

Uji klinis pada orang sehat sebagai sukarelawan dalam waktu singkat telah membuktikan amannya probiotik (Lidbeck dkk., 1987; Saxelin, 1997). Tabel 39 memperlihatkan hasil uji keamanan strain probiotik secara klinis

Tabel 39. Uji keamanan dan efek yang dilaporkan pada beberapa strain probiotik dan strain yogurt

Strain probiotik	Efek yang dilaporkan	Aman/in vivo/ klinis	vitro/in
<i>L. acidophilus</i> NFCO 1748	Penanganan sembelit, menurunkan fekal enzim		+
<i>L. casei</i> Shirota	keseimbangan flora usus, cegah gangguan usus, penanganan kanker bladder, menurunkan fekal enzim, meningkatkan kekebalan		+
<i>Lactobacillus</i> GG (ACTT 53103)	penanganan diare virus dan bakteri akut, mencegah diare akibat antibiotik, meningkatkan sistem imun		+
<i>L. acidophilus</i> ( <i>johnsonii</i> ) LCI	meningkatkan sistem imun, pembawa vaksin, keseimbangan flora usus		+
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	cegah diare rotavirus		+

Sumber : Alander dkk., 1997 dan Salminen, 1996) .

### a.3. Data epidemiologis

Hingga saat ini, sejarah panjang keamanan probiotik yang dikonsumsi masih merupakan bukti terbaik. Studi yang dilakukan oleh Saxelin dkk. (1996) menganalisis apakah strain *Lactobacillus* yang terlibat dalam infeksi klinis identik dengan strain produk olahan susu, atau strain komersial lainnya, dan hasilnya ternyata infeksi klinis oleh strain *Lactobacillus* bukan berasal dari strain probiotik.

### b. Efek negatif probiotik secara teoritis

Probiotik adalah mikroba hidup. Secara teoritis, bisa mengakibatkan empat efek samping yaitu infeksi sistemik, risiko aktivitas metabolik, risiko terhadap stimulasi imun, dan risiko transfer gen. Probiotik GMO (genetically modified organisms) tidak tersedia untuk digunakan dalam bahan pangan, sehingga efek negatifnya tidak diperhitungkan.

#### b.1. Infeksi

Tidak ada efek infeksi yang dilaporkan hingga saat ini terhadap penggunaan bakteri asam laktat probiotik dalam makanan (Adams dan Marteau, 1995). Sedangkan penggunaan khamir *Sacharomyces*

*boulardii* dilaporkan ada beberapa kasus fungemia terhadap pasien yang menggunakan kateter pada uji klinis (Zunic dkk., 1991).

Kasus infeksi lokal atau sistemik sangat jarang termasuk *septicaemia* dan *endokarditis* oleh *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* atau bakteri asam laktat lainnya, dan jumlahnya sangat rendah dibanding kasus bakteremia lainnya, insiden untuk *Enterococcus* 5-15%, *Lactobacillus* 0,1%, dan *Leuconostoc* < 0,01 % (Acuirre dan Collins, 1993; Gasser, 1994. Saxelin dkk., 1996). Bahkan, strain *Lactobacillus* telah diberikan pada uji klinis anak-anak prematur tanpa memberikan efek samping (Donohue dan Salminen, 1996)

#### **b.2. Efek-efek metabolik dan enzimatis**

Kolonisasi sejumlah besar bakteri pada usus halus akan menginduksi diare dan lesion usus, terutama melalui dekonjugasi dan dehidroksilasi garam empedu akibat enzim *bile salt hydrolase* dalam bakteri probiotik (Donohue dkk., 1998). Riset yang dilakukan oleh Marteau dkk. (1995), terhadap orang sehat, ternyata *L. acidophilus* dan *Bifidobacterium spp.* yang dikonsumsi bersama susu fermentasi bisa mengubah garam empedu primer terkonjugasi menjadi garam empedu sekunder yang tidak beracun dalam usus halus, sehingga tidak berbahaya, mengingat efek biologisnya sangat minimal, tentunya tidak akan menimbulkan efek samping yang berbahaya.

#### **b.3. Efek imun**

Sejauh ini tidak ada efek samping sistem imun yang negatif terhadap orang oleh bakteri probiotik yang pernah dilaporkan. Riset pada manusia yang dilakukan penulis membuktikan bahwa strain probiotik asal Dadih aman dan tidak terdeteksi efek samping meskipun dilakukan terhadap immune compromised subject, yaitu gizi kurang anak balita, lansia dan penderita HIV baik anak-anak maupun orang dewasa.

#### **b.4. Efek negatif probiotik yang dilaporkan**

Hingga saat ini tidak ada kasus infeksi klinis terdeteksi setelah mengkonsumsi probiotik bakteri asam laktat per oral dengan dosis berkisar  $10^6$ - $10^{11}$  cfu/hari baik pada balita, dewasa maupun lansia, mengingat syarat bakteri probiotik mendapatkan status GRAS.

### **c. Terjadinya resistensi antibiotik**

Selama kurun waktu 30 tahun (1950 – 1980), beberapa riset terhadap sensitivitas dan resistensi antibiotik dari kultur starter produk olahan susu telah dilakukan (Whitehead dan Lane, 1956; Sozzi dan Smiley, 1980),

mengingat residu antibiotik pada bahan baku susu segar mengakibatkan gagalnya pengasaman susu.

Starter termofil yogurt lebih sensitif terhadap penisilin ketimbang cocci mesofil, sementara streptomisin memberikan efek sebaliknya, yaitu cocci mesofil lebih sensitive terhadap streptomisin ketimbang termofil yogurt. Meskipun demikian, resistensi probiotik spesifik terhadap strain atau spesies tertentu. Nampaknya faktor pertumbuhan secara positif menseleksi strain yang resisten, sebagaimana halnya dengan bacitracin sebagai faktor pertumbuhan pada sapi dan ayam broiler terhadap strain *Lactobacillus brevis*, namun strain *Lactobacillus* yang resisten terhadap bacitracin banyak dijumpai pada ternak dan unggas.

Plasmid antibiotik resisten pada probiotik penting dari sudut pandang keamanan probiotik, sebab plasmid ini bisa ditransfer ke strain, spesies atau bahkan genus lain termasuk bakteri patogen.

Vancomycin termasuk antibiotik glikopeptida, yang menghambat sintesis peptidoglikan suatu komponen struktur dinding sel bakteri penting. Itulah sebabnya bakteri gram positif khususnya rentan terhadap vancomycin.

Resistensi vancomycin pada bakteri asam laktat khususnya dijumpai pada *Enterococcus* dan merupakan epidemik di rumah sakit. Dua tipe sistem genetik konjugatif pada *Enterococcus* adalah *vanA* dan *vanB* sistem.

Tynkkynen dkk (1998) membuktikan bahwa *Lactobacillus rhamnosus* GG tidak dapat mentransfer resistensi terhadap vancomycin maupun menerima resistensi antibiotik dari donor *Enterococcus* dalam percobaan konjugasi. Uji biologi molekuler membuktikan tidak ditemukan gen vancomycin resisten *Enterococcus* dalam *Lactobacillus GG*.

Bakteri asam laktat dan *Bifidobacteria* kecuali *Enterococcus* bisa dikatakan tidak pernah mengakibatkan penyakit infeksi. Dengan demikian, jangan menggunakan *Enterococcus* yang resisten terhadap vancomycin sebagai probiotik baik untuk manusia maupun ternak.

Uji terbaik untuk keamanan probiotik adalah sejarah penggunaannya yang aman dikonsumsi manusia. Strain yang tidak mempunyai kejelasan taksonomi sebaiknya tidak dikomersialkan, dan strain probiotik harus disimpan dalam kultur koleksi yang dikenal secara internasional, agar dapat diuji ulang keamanannya.



#### 4. Aspek Fungsional

Salah satu persyaratan fungsional dalam menseleksi strain probiotik yaitu bakteri harus tahan asam lambung dan empedu untuk bisa bertahan di lambung dan saluran usus. Adesi pada permukaan epithelial dan ketahanannya dalam saluran pencernaan manusia dan juga kemampuan menstimulir respons imun merupakan kriteria lain dalam seleksi probiotik untuk dapat berfungsi sebagai strain probiotik. Disamping itu, strain probiotik juga harus memberikan efek antagonis terhadap bakteri patogen serta bersifat antimutagen dan antikarsinogen.

Bakteri probiotik harus bertahan hidup dalam saluran pencernaan setelah dikonsumsi. Bakteri ini tahan terhadap lisozim, enzim di air liur, pemecah dinding sel bakteri, asam, asam empedu, untuk sampai di usus dalam keadaan hidup, mampu melekat pada sel epithelial, berkolonisasi dan menjaga keharmonisan komposisi bakteri saluran pencernaan. Selanjutnya, juga membantu mengatasi intoleransi terhadap laktosa, mencegah diare, sembelit, kanker, hipertensi, menurunkan kolesterol, menormalkan komposisi bakteri saluran pencernaan setelah pengobatan antibiotik, serta meningkatkan sistem kekebalan tubuh.

Bakteri probiotik yang sudah melalui uji klinis, di antaranya adalah *Lactobacillus casei* subsp. *casei* Shirota strain yang terdapat dalam yakult, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* dan beberapa bakteri asam laktat lainnya (Tabel 36). Bakteri yogurt, yaitu *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* tidak termasuk bakteri probiotik; meskipun enzim yang dihasilkan mengatasi intoleransi laktosa, namun tidak bisa lolos berbagai rintangan dalam saluran pencernaan untuk tetap hidup di usus. Yogurt biasanya ditambah bakteri probiotik seperti *Lactobacillus acidophilus*, agar mempunyai efek fungsional bagi kesehatan.

Telah banyak penelitian dan publikasi ilmiah mengenai manfaat probiotik bagi kesehatan manusia, baik studi *in vitro*, pada hewan percobaan (*in vivo*) maupun studi klinis terhadap kelompok manusia. Bakteri probiotik untuk manusia harus aman dikonsumsi dan teruji secara klinis bermanfaat bagi kesehatan. Penggunaan probiotik untuk kesehatan mempunyai keunggulan karena merupakan pendekatan alami dengan tidak mengganggu mikroflora alami dalam usus manusia. Telah tercatat bahwa probiotik dapat merangsang fungsi antibodi dalam sistem kekebalan tubuh dan meningkatkan daya tahan tubuh itu sendiri.

Kultur probiotik dalam usus juga dapat mengurangi bahaya penyerapan bahan kimia yang bersifat karsinogen dengan menetralkan atau merusak

lingkungan yang menyebabkan mikroba pencetus bahan karsinogenik tidak bisa tumbuh dalam usus, menguraikan nitrosamin yang bersifat karsinogen, mencegah kerusakan DNA pada sel tertentu, menghasilkan komponen yang menghambat pertumbuhan sel tumor atau merangsang sistem kekebalan untuk lebih tahan terhadap pembelahan sel kanker. Satu penelitian yang dilakukan terhadap 13 wanita menunjukkan bahwa konsumsi yogurt yang mengandung *Lactobacillus acidophilus* mengurangi kasus infeksi jamur *Candida sp.* yang menimbulkan keputihan.

Penggunaan antibiotik yang bertujuan untuk membunuh bakteri jahat, akan membunuh bakteri baik pula. Hal ini akan menyebabkan ketidakseimbangan mikroflora usus, yang akan berakibat terjadinya diare berkepanjangan. Probiotik merupakan suatu keharusan untuk mengatasi kasus seperti ini. Orang yang tidak tahan terhadap laktosa tetap dapat mengkonsumsi yogurt, walaupun jumlah laktosanya tinggi. Karena bakteri laktat akan menghasilkan enzim pemecah laktosa dan memecah laktosa susu sebelum mencapai usus besar, sedangkan *Lactobacillus acidophilus* dan *bifidobacteria* akan meningkatkan penyerapan laktosa.

Dadih, susu fermentasi tradisional asal Sumatra Barat, melibatkan fermentasi spontan susu kerbau mentah dalam tabung bambu. Ternyata mengandung bakteri laktat yang berpotensi sebagai probiotik. Karena itu konsumsi dadih tidak pernah menimbulkan diare atau keracunan, padahal susu kerbau mentah tanpa pemanasan langsung difermentasi. Nampaknya bakteri laktat di dalamnya mengusir bakteri "jahat" yang mencoba untuk tumbuh dalam "susu. Namun bila puting susu kerbau terkena mastitis, barangkali lain lagi ceritanya.

Di Jepang telah dipasarkan yogurt yang diberi nama yogurt Dadihi (dalam katakana), karena di dalamnya ditambahkan satu jenis bakteri laktat asal Dadih yang telah diteliti hampir 15 tahun, dan teruji bersifat probiotik. Di Sumatera Barat sendiri sayangnya generasi muda tidak menyukai dadih, sebaliknya generasi tua sangat percaya bahwa dadih bermanfaat bagi kesehatan tubuh.

Probiotik bermanfaat bagi kesehatan, diantaranya :

Sintesis vitamin.

Aktivitas Beta-Galactosidase

Dekonjugasi garam empedu.

Menghasilkan hydrogen peroksida

Memproduksi D dan L asam laktat

Memproduksi antibiotik

Mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen  
Beradesi (melekat) dan kolonisasi pada permukaan usus  
Mampu berkompetisi pelekatan pada permukaan usus dengan patogen  
Menstimulir sistem imun

## **5. Aspek Teknologi**

Salah satu aspek teknologi terpenting yang harus dipertimbangkan dalam seleksi strain probiotik untuk makanan khususnya, bakteri harus dapat digabungkan ke dalam makanan dan memberikan sifat sensoris yang baik, tanpa menghasilkan aroma yang menyimpang atau tekstur yang tidak diinginkan. Itulah sebabnya, penting untuk memastikan stabilitas sifat bakteri probiotik dalam produk bahan makanan selama proses pengolahan maupun selama penyimpanan.

Kriteria seleksi bakteri probiotik pada proses produksi diantaranya adalah :

- Kemampuan untuk tumbuh dengan cepat dalam jumlah yang banyak pada media fermentasi sederhana dan murah
- Kemampuan untuk tumbuh dan bertahan pada kondisi mikroaerofilik atau kondisi aerobik
- Kemampuan bertahan selama penanganan secara fisik tanpa terjadi turunnya viabilitas yang berarti
- Kemampuan untuk segera aktif pada saat diaplikasikan dalam proses pengolahan produk olahan susu
- Kemampuan untuk bertahan dalam berbagai jenis matriks makanan dan proses pengolahan pangan

Sedangkan kriteria seleksi probiotik selama masa simpan dan transit dalam saluran pencernaan diantaranya :

- Ketahanan simpan probiotik hidup pada berbagai kondisi penyimpanan
- Toleransi terhadap asam lambung pada pH 2,0 selama 2 jam
- Toleransi terhadap garam empedu pada konsentrasi fisiologis
- Kemampuan memanfaatkan prebiotik untuk tumbuh
- Resistensi terhadap berbagai jenis antibiotik

Dengan demikian, kriteria bakteri probiotik yang ideal yaitu dapat memberikan efek positif bagi kesehatan, tidak patogen dan tidak menghasilkan toksin, dikonsumsi dalam keadaan hidup dalam jumlah besar, mampu bertahan dalam saluran pencernaan, misalnya tahan

terhadap keasaman tinggi, serta stabil dan tetap hidup selama proses pengolahan, penyimpanan dan kondisi lapang.

Tantangan teknologi harus bisa menjamin stabilitas fungsi dan viabilitas probiotik. Mikroenkapsulasi merupakan salah satu terobosan teknologi yaitu pengeringan menggunakan Fluid Bed Dryer (FBD) pada suhu 30 -37°C, dan penyalutan dengan alginate sehingga dihasilkan serbuk kering probiotik untuk dapat memenuhi regulasi pangan dengan pelabelan yang tidak mengelabui konsumen (*misleading*).

Tabel 40. Bakteri Probiotik komersial

Strain	Nama perusahaan
<i>L. acidophilus</i> NCFM®	Rhodia, Inc. (Madison, WI)
<i>L. acidophilus</i> DDS-1	Nebraska Cultures, Inc. (Lincoln, NE)
<i>L. acidophilus</i>	SBT-20621
<i>B. longum</i> SBT-29281	Snow Brand Milk Products Tokyo
<i>L. acidophilus</i> R0011	
<i>L. rhamnosus</i> R0052	Institut Rosell (Montreal, Canada)
<i>L. acidophilus</i>	LA-1
<i>L. paracasei</i>	CRL 431
<i>B. lactis</i> Bb-12	Chr. Hansen (Horsholm, Denmark)
<i>L. casei</i>	Shirota1
<i>B. breve</i> strain Yakult1	Yakult (Tokyo, Japan)
<i>L. casei</i> Immunitas	Danone (Paris, France)
<i>L. fermentum</i>	RC-14
<i>L. rhamnosus</i> GR-1	Urex Biotech (London, Ontario, Canada)
<i>L. johnsonii</i> La1	Nestlé (Lausanne, Switzerland)
<i>L. plantarum</i>	299V
<i>L. rhamnosus</i> 271	Probi AB (Lund, Sweden)
<i>L. reuteri</i> SD2112	Biogaia (Raleigh, NC)
<i>L. rhamnosus</i> GG1	Valio Dairy (Helsinki, Finland)
<i>L. rhamnosus</i>	LB21
<i>Lactococcus lactis</i> L1A	Essum AB (Umeå, Sweden)
<i>L. salivarius</i> UCC118	University College (Cork, Ireland)
<i>B. longum</i> BB5361	Morinaga Milk Industry Co., Ltd. Japan
<i>B. lactis</i> HN019 (DR10)	New Zealand Dairy Board
<i>L. acidophilus</i> LB	Lacteol Laboratory, (Houdan, France)
<i>L. paracasei</i> F19	Arla Dairy (Stockholm, Sweden)

## 6. Manajemen mikrobiota

Sejumlah ratusan triliun sel mikrobiota, hidup bersama sel tubuh manusia, merupakan bagian dari genome manusia, membentuk mikrobiome dan memberi pengaruh besar pada fisiologi manusia. Kemampuan bakteri probiotik memasuki ekosistem ini dapat mempengaruhi aktivitas kolonisasi mikrobiota dalam saluran cerna, efek langsung pada mukosa usus, kontribusi enzim fungsional atau produk metabolit; dengan kata lain ikut serta memprogram kesehatan tubuh sejalan dengan konsep dasar probiotik. Dalam pengembangan produk pangan fungsional berbasis probiotik berfokus pada jumlah bakteri hidup yang dapat mencapai saluran cerna.

Populasi bakteri dalam ekosistem saluran pencernaan orang sehat yang mengkonsumsi diet berimbang umumnya stabil. Perubahan pola hidup, pola makan dan kondisi sakit mengubah stabilitas ekosistem tersebut. Berangkat dari fenomena ini, dapat dilakukan manajemen mikroflora usus : proporsi bakteri "baik" ditingkatkan, dan bakteri "jahat" ditekan jumlahnya. Caranya, dengan mengkonsumsi bakteri probiotik, dan menyediakan nutrisi sesuai untuk bakteri probiotik agar dalam usus berkembang lebih pesat.

Kelompok oligosakarida, seperti rafinosa, stakhiosa, galakto-oligosakarida, frukto-oligosakarida, inulin, serta beberapa jenis peptida dari protein, tidak dapat dicerna manusia, sehingga mencapai usus dan mendukung pertumbuhan bakteri "baik" dalam usus. Untungnya, bakteri "jahat" tidak menyukai jenis nutrisi ini, sehingga pada akhirnya bakteri "baik" mendominasi populasi. Substrat yang demikian dikenal sebagai prebiotik. Kombinasi probiotik dan prebiotik yang meningkatkan manfaat kesehatan tubuh disebut synbiotik.

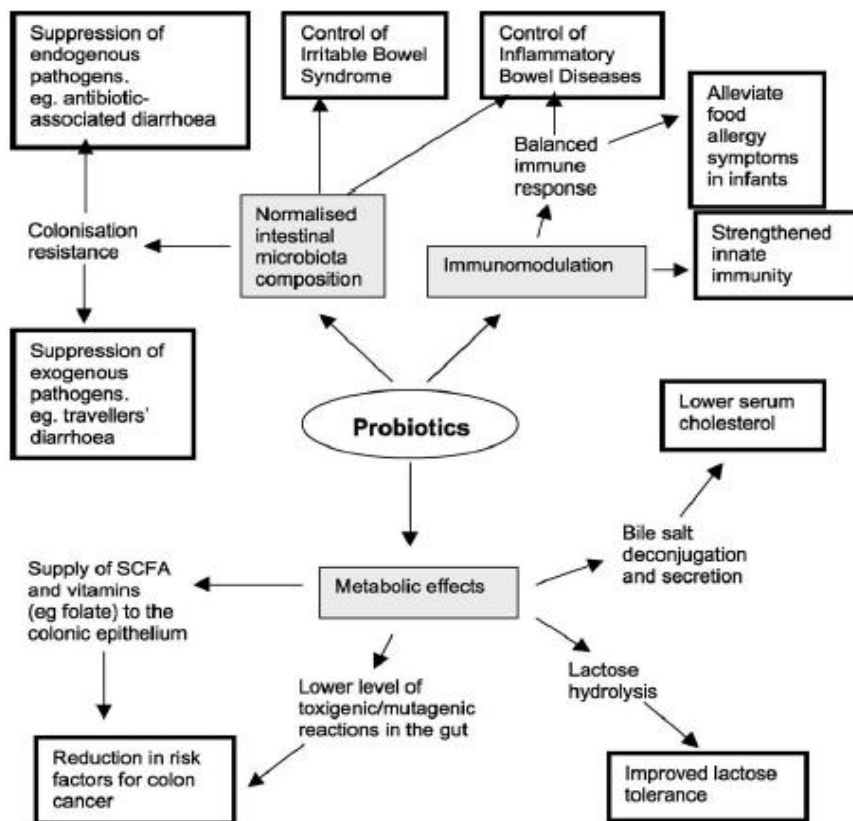
Berbagai senyawa hasil metabolisme bakteri "baik", seperti asam laktat,  $H_2O_2$ , bacteriocin, bersifat antimikroba bagi bakteri "jahat". Senyawa-senyawa racun yang dihasilkan dari metabolisme protein dan lemak, serta hasil pemecahan enzim tertentu jadi semakin berkurang, mengurangi beban organ hati. Selanjutnya, bakteri "baik" mulai menjalankan peranannya dalam meningkatkan kesehatan kita.

Berbagai jenis enzim seperti laktase, membantu mengatasi intoleransi terhadap laktosa, *bile salt hydrolase*, membantu menurunkan kolesterol. Senyawa dinding sel bakteri baik yang disebut peptidoglycan, menyerap senyawa karsinogenik daging panggang yang kita konsumsi, seperti halnya serat makanan. Asam laktat yang dihasilkan juga merangsang gerak

peristaltik usus sehingga mencegah sembelit, dan meningkatkan penyerapan kalsium sehingga mencegah osteoporosis.

Di negara maju, probiotik sudah dimulai diminati konsumen lebih dari 10 tahun lalu. Pola hidup modern supersibuk dan bergesernya pola makan seyogyanya diimbangi dengan konsumsi beragam makanan fungsional, yang menyehatkan.

Gambar 42 memperlihatkan manfaat kesehatan yang dapat diberikan oleh bakteri probiotik. Manfaat probiotik bagi kesehatan manusia, terutama bagi saluran pencernaan, juga mencegah kanker usus, penurunan kadar kolesterol, pencegahan bakteri patogen, menstimulir respons imun, mengurangi sembelit, pencegah diabet, meningkatkan daya cerna laktosa pada penderita intoleransi laktosa dan menangani alergi terhadap makanan.



Sumber : Salminen dkk, 1996; 1998a; Kaur dkk., 2002; Saarela dkk., 2002; Ouwehand dkk, 2002

Gambar 42. Manfaat positif bakteri probiotik bagi kesehatan manusia

Pada Tabel 41 dapat dilihat ringkasan manfaat kesehatan susu fermentasi probiotik, pada saluran pencernaan, mikrobiota usus, diare, dan lainnya.

Tabel 41. Ringkasan manfaat kesehatan susu fermentasi probiotik

Aktivitas/efek	Manfaat kesehatan
saluran pencernaan	aktif terhadap infeksi <i>H. pylori</i> Memperbaiki pencernaan laktosa Menstimulir imunitas saluran usus Menstimulir gerak peristaltik usus
mikrobiota usus	keseimbangan populasi mikrobiota Mengurangi aktivitas fekal enzim Kolonisasi pada saluran usus Mengurangi kesempatan infeksi <i>Salmonella</i> spp.
Diare	pencegahan/penanganan diare akut dan rotavirus mencegah diare akibat konsumsi antibiotik penanganan diare akibat <i>Clostridium difficile</i>
Efek lainnya	memperbaiki kekebalan terhadap penyakit menekan terjadinya kanker Menurunkan serum kolesterol Menurunkan tekanan darah tinggi

Sumber : Tamime dan Robinson (1999)

Hasil uji klinis membuktikan beberapa strain bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus rhamnosus* strain GG, *Lactobacillus casei* strain Shirota, *Bifidobacterium bifidum* dan *Lactobacillus acidophilus* strain LC1 termasuk dalam bakteri probiotik berdasarkan studi yang dilaporkan oleh Lee and Salminen (1995) mengenai manfaatnya bagi saluran pencernaan secara klinis.

Viabilitas bakteri probiotik penting agar dapat beradesi atau melekat pada sel epitelial, untuk selanjutnya berkolonisasi sehingga dapat berkompetisi dengan bakteri patogen dan menstimulir sistem imun.

Tabel 42 memperlihatkan strain probiotik dan sifat fungsionalnya, dimana secara umum berasal dari manusia, aman, tahan asam dan garam empedu, serta beberapa sifat lain yang beragam dan spesifik untuk tiap strain bakteri probiotik

Tabel 42. Berbagai strain bakteri probiotik dan fungsinya

Sifat	<i>L. casei</i> Shirota	<i>L. rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)	<i>L. johnsonii</i> LA1	<i>L. acidophilus</i> NCFB 1748
Asal	manusia	manusia	manusia	*
Keamanan	aman	aman	aman	aman
Stabil thd asam	baik	baik	baik	baik
Stabil thd empedu	resisten	resisten	resisten	resisten
Kolonisasi	tidak	ya	ya	tidak
Produksi bakteriosin	tidak		ya	tidak
Adesi (Caco-2)	tidak	ya	ya	tidak
Adesi (mukosa)		ya	ya	ya

## 7. Mekanisme kerja probiotik

Manfaat kesehatan yang diberikan probiotik dapat dikupas berdasarkan faktor yang mempengaruhi ekologi mikroba saluran pencernaan dan mekanisme kerjanya diantaranya adalah sebagai berikut :

### a. Antagonisme langsung

Strain probiotik bersifat antibakteri patogen karena senyawa antimikroba yang dihasilkan (Saarela dkk., 2000). Selain metabolit primer seperti asam laktat, asetat dan propionat, grup yang paling penting dari senyawa antimikroba bakteri probiotik dikenal sebagai bakteriosin, suatu metabolit sekunder, peptida berberat molekul tinggi. Senyawa antimikroba lainnya merupakan metabolit berberat molekul rendah seperti hidrogen peroksida, diasetil, asam organik lainnya dan senyawa aroma.

Beberapa jenis bakteri patogen mengganggu kesehatan tubuh melalui sifat patogennya ataupun melalui toksin yang dihasilkannya. Bakteri patogen bisa hidup di dalam sel inang (intraseluler parasit) atau dalam cairan tubuh dan jaringan (ekstraseluler parasit). Kebanyakan pertahanan tubuh diarahkan ke penyerangan ekstraseluler. Jadi, patogen ekstraseluler punya cara menghindari mekanisme pertahanan tubuh, yaitu dengan melekat, berkolonisasi, merusak sel, membentuk biofilm.

Contoh parasit intraselular adalah bakteri tuberculosis, yaitu *Mycobacterium tuberculosis*. Sedangkan virus menstimulir produksi interferon yang membantu kesembuhan. di luar sel inang, virus dinetralisis oleh antibodi.



Jadi, penyakit infeksi diawali dengan kolonisasi mikroba pada membran kulit atau mukus. Apabila masih bisa disingkirkan tanpa mengganggu sel inang, kolonisasi disebut sebagai *transient*, atau hanya mampir. Sedangkan kalau kolonisasi tersebut stabil, berarti terjadi infeksi. Infeksi bisa saja tidak memberikan efek negatif pada tubuh manusia. Penyakit infeksi hanya terjadi bila mikroba atau senyawa metabolit yang dihasilkan secara langsung merusak jaringan yang terinfeksi, atau mengakibatkan reaksi tubuh terhadap jaringan yang rusak tersebut.

Beberapa patogen menghasilkan toksin baik berupa eksotoksin maupun endotoksin sehingga melemahkan sistem pertahanan tubuh. Enterotoksin suatu eksotoksin yang mempengaruhi mukosa usus, mengakibatkan diarre atau muntah yang membantu patogen ini bersembunyi dan berpindah menular ke orang lain. Demikian juga toksin pertussis melalui semburan batuk.

Endotoksin adalah suatu lipida dari komponen lipopolisakarida terdapat dalam dinding sel bakteri gram negatif. Meskipun bakteri gram negatif mati, masih bisa mengakibatkan reaksi endotoksin. Selama terjadinya infeksi, endotoksin tidak menstimulir pembentukan antibodi, tetapi merusak jaringan tubuh. Beberapa contoh enterik patogen adalah sebagai berikut :

*Escherichia coli* 0157:H7, suatu gram negatif berbentuk batang, mengakibatkan keracunan makanan. Peradangan pada usus besar bisa berakibat diare yang disertai darah dan sakit pada pinggang. Pada kondisi yang berat, bisa mengakibatkan gagal ginjal permanen akibat pembekuan darah dalam ginjal, bahkan kerusakan otak akibat perdarahan internal (Garbutt, 1997).

*Salmonella typhimurium* suatu gram negatif berbentuk batang melekat dan menyerang sel usus, termasuk sel Caco-2 (Lee dan Salminen, 1998). Infeksi usus oleh *S typhimurium* berakibat demam tifus enteric. Bakteri ini masuk ke dalam aliran darah melalui usus dan dialirkan ke seluruh tubuh (Garbutt, 1997). Mencegah pelekatan *Salmonella* ke sel usus dan permukaan mukosa bisa menghambat kolonisasi dan infeksi usus.

#### **b. Kompetisi terhadap reseptor adesi dan nutrisi**

Pencegahan berbagai bakteri patogen untuk berkolonisasi pada saluran pencernaan, selain antimikroba yang dihasilkan probiotik, juga melalui kompetisi terhadap reseptor pelekatan pada permukaan saluran

usus. Ketika bakteri probiotik terikat pada mukus usus, patogen tidak dapat tempat lagi untuk melekat, sehingga mengurangi kesempatan menginfeksi usus. Lebih lanjut, kandungan saluran pencernaan yang kaya akan nutrisi untuk mikroba, persaingan dalam mendapatkan nutrisi antara bakteri probiotik dan patogen bisa mengurangi kemampuan patogen mendominasi saluran pencernaan.

Adesi atau pelekatan bakteri patogen pada permukaan mukosa menjadi tahap awal infeksi saluran usus. Pelekatannya pada sel epitelial usus akan mengakibatkan kolonisasi, kerusakan sel, gangguan mekanisme pengaturan sel, dan pertumbuhan dan perkembangan biakan intraselular (Coconnier dkk, 1993a). Adesin pada permukaan bakteri patogen dapat dihambat aktivitasnya dengan menghalangi reseptor pada epitelium dengan analog adesin spesifik atau steric hindrance (Ouweland and Conway, 1996). Itulah sebabnya probiotik dapat menyingkirkan patogen yang melekat pada lapisan mukus.

Beberapa riset berhasil membuktikan bahwa strain probiotik mampu menghambat adesi bakteri penyebab diare seperti *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia pseudotuberculosis* pada Caco-2 usus dan sel HT29-MTX (Coconnier dkk., 1993a; 1993b; Hudault dkk., 1997; Gopal dkk., 2001).

Kompetisi untuk reseptor adesi bakteri probiotik menjelaskan bahwa, mengkonsumsi multi strain probiotik harus memperhatikan hal ini. Apabila multi strain probiotik berupa bakteri asam laktat dan *Bifidobacterium*, tidak terjadi kompetisi reseptor adesi, karena berbeda habitatnya, dimana *Bifidobacterium* habitatnya pada usus besar, sedangkan bakteri asam laktat pada usus halus. Namun apabila multi strain terdiri dari berbagai jenis bakteri asam laktat, perlu dicermati agar tidak malah saling berkompetisi.

### **c. Sifat adesi bakteri probiotik**

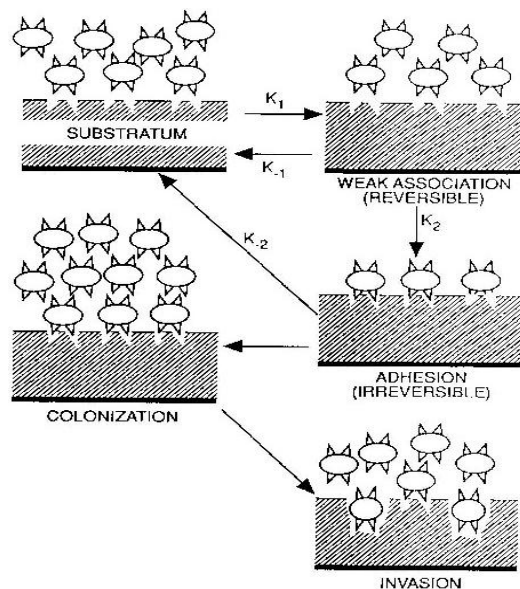
Adesi bakteri probiotik pada mukosa usus dianggap penting untuk memberikan manfaat positif kesehatan pada manusia. Adesi merupakan prasyarat kolonisasi (Alander dkk., 1999), aktivitas antagonistik terhadap enteropatogen (Coconnier dkk., 1993), modulasi sistem imun (Schiffirin dkk., 1997) dan untuk memperbaiki kesembuhan kerusakan mukosa lambung (Elliot dkk., 1998). Itulah sebabnya adesi adalah salah satu dari kriteria utama dalam seleksi bakteri probiotik.

Bakteri beradesi dan tumbuh pada hampir semua permukaan. Menurut Ofek and Doyle (1994), pelekatan merupakan persatuan antara

bakteri dan substratum yang dapat dihitung. Dengan demikian, bakteri melekat pada substratum dan untuk memisahkannya dibutuhkan energi. Pelekatan bakteri probiotik menyebabkan bisa berkolonisasi pada saluran pencernaan manusia, supaya tidak disingkirkan oleh kontraksi saluran pencernaan.

Terjadi interaksi antara strain probiotik dan permukaan mukosa dalam saluran usus sehingga terjadi kompetisi dengan bakteri patogen dan menstimulir sistem imun. Artinya semakin lama bakteri tinggal pada permukaan mukosa, semakin memberi kesempatan untuk melakukan metabolisme dan menstimulir sistem imun. Namun demikian, bakteri probiotik tidak berkolonisasi secara tetap. Pemberian probiotik dapat dideteksi pada tinja selama beberapa hari atau beberapa minggu setelah cessation dan akan secara bertahap berkurang, artinya hanya terjadi kolonisasi sementara.

Mekanisme adesi bakteri probiotik pada substratum, yaitu musin, menghasilkan invasi melalui proses bertahap seperti yang dapat dilihat pada Gambar 45. Ada dua tahap adesi dimulai dengan interaksi fisik non spesifik yang mengantar bakteri ke kontak pada permukaan substratum secara reversible, menuju ke pelekatan spesifik yang kuat atau ireversibel, yang seringkali diikuti dengan kolonisasi dan invasi jaringan.



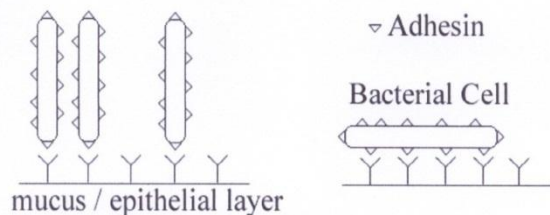
Gambar 45. Mekanisme adesi bakteri pada substratum (Ofek and Doyle, 1994)

Idealnya mukus saluran usus dapat diperoleh dari usus, tetapi hal ini tentunya sulit dilakukan pada prakteknya. Untuk keperluan riset sifat adesi, mukus dapat diperoleh dari mengekstrak musin dari tinja, sehingga riset sifat adesi dapat dilakukan bahkan untuk tiap orang. Ekstrak musin dari tinja dan glikoprotein epithelial usus halus dapat digunakan sebagai model yang mewakili mukus usus besar dan usus halus.

Mengisolasi sel-sel usus (*enterocyte*) juga salah satu metode untuk riset adesi sebagai substratum sel-sel usus, karena lapisan permukaan (*glycocalyx*) mengatur penggunaan nutrisi dan air, serta menyediakan sisi pengikat mikroba. Namun, sulit mendapatkan jaringan usus manusia, dan viabilitasnya juga sulit dipertahankan. Maka pada berbagai studi *in vitro* digunakan sel kultur jaringan Caco-2, HT-29 dan HT-29 MTX penghasil mukus, sebagai model sel-sel usus (Chauvière *et al.*, 1992a; Greene and Klaenhammer, 1994; Tuomola and Salminen, 1998).

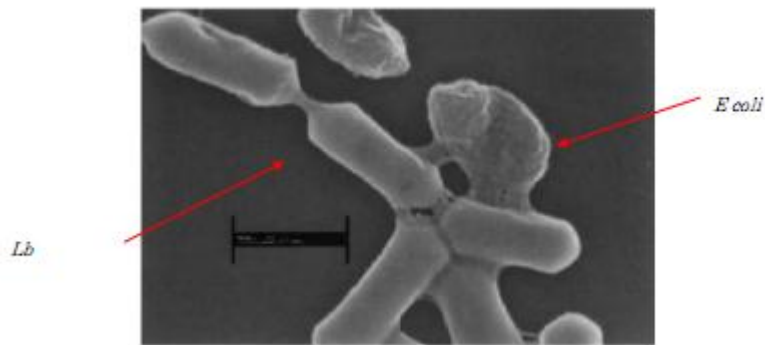
Caco-2 cell diisolasi dari usus besar manusia yang terkena kanker adeocarcinoma, selain berasal dari usus besar, juga secara spontan berdiferensiasi sehingga akan lebih menyerupai sifat sel-sel usus halus dibandingkan usus besar. Dengan demikian dapat digunakan di bawah kondisi tertentu dengan uji perbanyakan sederhana untuk menghitung bakteri yang melekat.

Pada umumnya adesi spesifik difasilitasi oleh komponen permukaan bakteri, yang dikenal sebagai adhesin, akan terikat pada reseptor yang sesuai pada epithelium usus (Gambar 46). Interaksi antara adhesin dan reseptor akan menuju ke adesi yang tetap (ireversibel) dan bisa dihalangi oleh senyawa yang menyerupai karbohidrat pada sisi reseptor pada permukaan sel. Sebaliknya, adesi non spesifik sifatnya hidrofobik



Gambar 46. Adesi sel bakteri pada permukaan lapisan epithelial atau mucus pada densitas tinggi dan rendah

Bakteri probiotik dan patogen dapat membentuk gabungan agregat, yang dikenal sebagai ko-agregasi, atau membentuk kelompok sebagai mekanisme lain dalam mencegah patogen beradesi pada permukaan usus (Tuomola dkk., 1998b; Bibiloni dkk., 1999b; Ouwehand dkk., 1999). Gambar 47 memperlihatkan ko-agregasi antara *Lactobacillus paracasei* B21070 dan *Esherichia coli* ATCC 35401. Menurut Reid dkk (1988), probiotik yang mampu berko-agregatsi dengan patogen bisa membunuh patogen lebih baik karena senyawa antimikrobal yang dihasilkan dapat beraktivitas langsung pada patogen. Namun demikian, pada beberapa kasus ko-agregasi dapat meningkatkan adesi patogen pada permukaan mukosa dengan bantuan probiotik, sehingga memungkinkan membantu invasi patogen ke dalam usus.



Gambar 47. Skaning electron mikroskop Ko-agregasi antara *Lb paracasei* B21070 and *E coli* ATCC 35401; bar = 1 $\mu$ m (Drago et al., 1997)

#### d. Menstimulir sistem imun

Mekanisme bakteri probiotik dalam memperbaiki dan menstimulir sistem imun adalah dengan meningkatkan aktivitas makrofag (Perdigon dkk., 1986), meningkatkan kandungan antibodi (Bloksma dkk., 1979), mengaktivasi sel NK (Kato dkk., 1984), memfasilitasi transport antigen (Kaur dkk, 2002), dan membantu perbaikan mukosa (Kirjavainen dkk., 1999). Tidak mengherankan, riset terhadap aspek ini berkembang dengan pesat sehingga hasilnya memperluas ruang lingkup dan potensi probiotik.

Idealnya bakteri probiotik harus viabel agar memberikan manfaat positif bagi kesehatan secara optimum. Namun demikian, bukan berarti bakteri probiotik yang mati tidak memberikan manfaat positif, meskipun viabel probiotik lebih memberikan efek positif bagi

kesehatan.

Namun demikian khusus dalam menstimulir sistem imun, probiotik viabel jauh lebih efektif ketimbang sel mati probiotik., karena yang disebut terakhir kemampuan terikat pada mukosa usus lebih rendah, sehingga kurang mampu menstimulir sistem imun.

Inaktivasi probiotik dengan pemanasan menurunkan sifat adesi, namun tidak berlaku secara umum. Inaktivasi sel oleh  $\gamma$ -irradiasi mengakibatkan efek yang sama pada adesi sebagaimana halnya perlakuan panas.

Riset yang dilakukan oleh Ouwehand dkk (2000) melaporkan bahwa meskipun secara umum inaktivasi dengan  $\gamma$ -irradiasi mengurangi kemampuan adesi, tetapi *L. casei* Shirota malah kemampuan adhesinya meningkat hingga hampir 4 kali setelah diinaktivasi dengan  $\gamma$ -irradiasi. Hal ini kemungkinan akibat radikal yang dihasilkan oleh  $\gamma$ -irradiasi menghasilkan adhesin lebih banyak atau mengubah struktur dinding sel sehingga meningkatkan sifat adesi. Jadi, mungkin diakibatkan adanya perubahan pada dinding sel dari strain yang inaktif, jadi bukan karena sel tersebut mati.

Strain Probiotik membantu sistem imun dengan cara sebagai berikut :

- Modulasi system imun, meningkatkan produksi antibodi dan mengaktifkan makrofag, limfosit dan sel-sel sistem imun lainnya
- Meningkatkan produksi musin dalam usus, sehingga meningkatkan respons imun alami
- Menghambat patogen dalam saluran air seni dan usus karena persaingan dalam mendapatkan nutrisi dan membentuk pertahanan yang mencegah pelekatan patogen pada sel epithelial
- Menghasilkan senyawa antibakteri, seperti bakteriosin
- Menurunkan pH dengan dihasilkannya asam laktat, sehingga tidak nyaman bagi patogen untuk tumbuh
- Menekan aktivitas enzim penghasil amin yang toksik dan karsinogenik dari bakteri usus lainnya

## **B. Prebiotik**

Istilah prebiotik diperkenalkan oleh Gibson dan Roberfroid (1995), dan didefinisikan sebagai suatu bahan makanan yang tidak dapat dicerna yang memberikan manfaat positif bagi tubuh karena secara selektif menstimulir pertumbuhan dan aktivitas bakteri baik dalam usus besar.

Prebiotik pada umumnya merupakan karbohidrat yang tidak dapat dicerna, tapi mempunyai pengaruh baik terhadap ekosistem mikroflora probiotik dalam usus sehingga dapat memberikan efek kesehatan pada manusia dan binatang. Di dalam usus besar, bahan prebiotik akan difermentasi oleh bakteri probiotik terutama *Bifidobacteria* dan *Lactobacillus* dan menghasilkan asam lemak rantai pendek dalam bentuk asam asetat, propionat, butirrat, L-laktat, juga karbondioksida dan hydrogen. Oleh tubuh asam lemak rantai pendek tersebut dapat dipakai sebagai sumber energi.

Sumber prebiotik alami adalah air susu ibu dalam bentuk oligosakarida yang terkandung dalam *colostrum*, yaitu oligosakarida *N-acetyl glucosamine*, yang hanya sedikit sekali dapat tercerna di usus (<5%), dan mendukung pertumbuhan bakteri *Bifidobacterium*. Selain itu, secara alami fruktooligosakarida terdapat dalam berbagai sayur dan buah misalnya onion, asparagus, chicory (mengandung inulin), pisang, oligosakarida pada kedelai, dan artichoke. Bahan prebiotik yang paling sering dipakai ialah FOS (Fruktooligosakarida) yang dari penelitian ternyata disukai dan difermentasi oleh *bifidobacteria*. Beberapa jenis prebiotik yang secara komersial tersedia di pasaran dapat dilihat pada Tabel 43.

Tabel 43. Berbagai jenis prebiotik komersil

Commercially-Available Oligosaccharides	1995 Production (t)
Cyclodextrins*	4 000
Fructo-oligosaccharides	12 000
Galacto-oligosaccharides	15 000
Gentio-oligosaccharides	400
Glucosylsucrose*	4 000
Isomalto-oligosaccharides	11 000
Lactulose	20 000
Lactosucrose	1 600
Malto-oligosaccharides*	10 000
Palatinose-polycondensates	5 000
Soybean-oligosaccharides	2 000
Xylo-oligosaccharides	300

\*Digestible oligosaccharides

### **Aplikasi prebiotik**

Bayi yang masih mengkonsumsi ASI akan mempunyai kesehatan yang lebih baik dari bayi yang tidak mengkonsumsi ASI, karena ASI mengandung pre- dan probiotik sehingga mikroflora usus akan didominasi oleh bakteri probiotik yang dapat tumbuh subur karena adanya faktor pertumbuhan (*growth factor*) yang terdapat pada ASI yaitu prebiotik. Setelah bayi disapih, secara perlahan-lahan jumlah bakteri probiotik dalam usus akan menurun sehingga mikroekosistem mikrobiota tidak lagi didominasi oleh bakteri probiotik tetapi oleh bakteri lain.

Pemberian bahan prebiotik tentunya tidak lagi memberi manfaat seperti yang diharapkan. Bila diharapkan mikroekosistem mikroflora dalam usus tetap didominasi oleh bakteri probiotik maka perlu dipertimbangkan pemberian formula yang mengandung pro dan prebiotik kepada bayi yang telah disapih sehingga manfaat pro dan prebiotik yang menguntungkan kesehatan tetap dapat dipertahankan sampai masa anak-anak.

### **C. Efek Synbiotik**

Istilah synbiotik digunakan manakala suatu produk mengandung probiotik dan prebiotik, berasal dari kata sinergis. Sebagai contoh, produk yang mengandung oligofruktosa dan probiotik *Bifidobacteria* memenuhi kriteria synbiotik. Berbagai jenis produk synbiotik terdapat dipasaran baik dalam bentuk bio yogurt yang mengandung prebiotik, maupun dalam sache berisi serpihan prebiotik dan butiran bakteri probiotik seperti yang dapat dilihat pada Gambar 48.





Gambar 48. Produk synbiotik, mengandung inulin dan *Bifidobacteria* (butir kuning), yang dilapisi dua pelindung, yaitu lemak nabati dan pelindung terhadap asam lambung

Butiran kuning merupakan bakteri probiotik *Bifidobacteria* dilapisi dua senyawa pelindung agar dapat tetap hidup ketika mencapai usus besar..

Gambar 49 adalah contoh produk susu UHT synbiotik, yang mengandung bakteri probiotik dan prebiotik, serta yogurt synbiotik di Jepang.

## Examples of Synbiotic Products



Gambar 49. Produk synbiotik yang dipasarkan Jepang

Sedangkan Gambar 50 memperlihatkan yogurt synbiotik yang dipasarkan di Selandia Baru.



Gambar 50. Yogurt synbiotik di Selandia Baru

# IX. Infeksi *H. pylori*: Tukak Lambung Hingga Kanker Lambung

---

Semula, sakit maag atau tukak lambung dianggap sebagai akibat terlalu banyak mengkonsumsi makanan pedas, *spicy*, dan alcohol sehingga terapi yang diberikan berupa istirahat total dan diet makanan hambar. Kemudian asam lambung dan makanan yang rasanya asam masuk dalam daftar kambing hitam penyebabnya, sehingga diberi obat antasid (anti asam). Sampai akhirnya di tahun 1982, Dr. Barry Marshall, seorang dokter gastroenterolog dari Perth – Australia menemukan bakteri ini, konon beliau menyediakan dirinya sebagai kelinci percobaan, dan sejak tahun 1983 bakteri ini selalu dijumpai pada penderita peradangan di lambung dan tukak lambung, sakit maag atau penyakit gastritis. Lucunya, makanan asam tidak bisa dikonsumsi penderita sakit maag sudah menjadi sugesti yang salah kaprah.

*H. pylori* tumbuh sangat lambat, sehingga pada awalnya sulit mendapatkan isolatnya, sebab pemeraman bakteri yang umum dilakukan selama 2-3 hari tidak berhasil menumbuhkannya, jadi merupakan salah satu diantara bakteri yang tidak dapat dikulturkan pada awalnya.

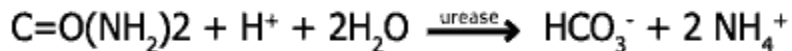
Penemuan bakteri ini secara kebetulan, ketika liburan Paskah, Dr. Marshall memeram isolat bakteri dalam cawan petri, karena hari libur, dengan tidak disengaja pemeraman berlangsung selama 5 hari, dan ternyata tumbuh koloni yang teridentifikasi sebagai *H. pylori*, bakteri gram negatif berbentuk spiral, mempunyai multi-flagella, sehingga bisa “berenang”, hidup di dalam lapisan lambung dan usus dua belas jari. Bakteri ini suka pada kelembaban yang tinggi, sedikit O<sub>2</sub> dan ekstra CO<sub>2</sub>, serta bersifat patogen.

## A. Bersembunyi dalam lambung

Urease, enzim penghidrolisis urea menjadi ammonia dan CO<sub>2</sub> dihasilkan oleh *H. pylori*. Lambung mengandung sekitar setengah galon asam lambung, terdiri dari enzim pencernaan dan HCl pekat ber pH 1,7 – 2,0 yang dengan mudah melumatkan makanan sekeras apapun, termasuk

bakteri dan virus. Jadi, seyogyanya lambung kita steril terhadap bakteri. Namun rupanya *H. pylori* punya kebolehan bertahan dan berkembang biak dalam lambung, karena mempunyai enzim urease, sehingga terbentuk kabut hasil netralisasi asam lambung di sekitarnya dengan ammonia yang “mengamankan” bakteri ini.

Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :



### **B. Infeksi *H. pylori***

Terinfeksi bakteri *H. pylori* tidak berarti otomatis menderita tukak lambung. Hanya 10% yang terinfeksi menjadi sakit semasa hidupnya. Infeksi banyak terjadi pada anak balita, khususnya di negara2 berkembang dan ekonomi lemah, serta padat penduduknya. Penularan bisa terjadi melalui air atau makanan yang terkontaminasi oleh feses, dan pada air liur orang yang terinfeksi bakteri ini juga dijumpai *H. pylori*, sehingga penyebaran melalui mulut seperti ciuman juga bisa terjadi. Bukan mustahil *H. pylori* bisa “bersembunyi” pada karang gigi. Namun pada umumnya infeksi bakteri ini prevalensinya tinggi pada daerah di mana kebersihan tidak diindahkan, sehingga banyak ditemukan di daerah2 ekonomi lemah dan rawan gizi khususnya di negara berkembang. Penyebarannya sulit diduga, dan saat ini para peneliti sedang berupaya untuk menemukan vaksin untuk mencegah infeksi ini.

Sebaliknya di Amerika, infeksi bakteri ini jarang dijumpai pada anak2, umumnya pada orang dewasa berusia di bawah 40 tahun mencapai 20%, sedangkan di atas 60 tahun sekitar 50%. Jepang termasuk negara maju yang penduduknya banyak terinfeksi *H. pylori* dan mencapai lebih dari 80% populasi. Di Indonesia sendiri masih belum ada data mengenai infeksi bakteri *H. pylori*.

### **C. Menimbulkan tukak dan pemicu kanker lambung**

Tukak lambung adalah luka pada lapisan lambung atau usus dua belas jari, dikenal juga sebagai sakit maag. Salah satu penyebabnya adalah infeksi bakteri, tetapi tukak atau luka juga bisa disebabkan oleh penggunaan obat-obatan nonsteroidal anti-inflammatory agents (NSAIDs) seperti aspirin. Pada beberapa kasus, tumor yang berkembang menjadi kanker pada lambung atau pankreas dapat menyebabkan tukak atau luka.

*H. pylori* sebenarnya bakteri yang tidak tahan asam, namun bisa mengamankan dirinya pada lapisan mukosa lambung. Keberadaannya di situ terbenam dalam lapisan mukosa lambung dan melemahkan lapisan lambung sehingga asam bisa menembusnya, dengan demikian baik asam lambung maupun bakteri melukai lapisan lambung sehingga terbentuk luka atau tukak.

Sistem kekebalan tubuh akan merespons infeksi *H. pylori* dengan mengirimkan butir darah putih, sel T killer, dan pelawan infeksi lainnya. Namun demikian, semuanya tidak dapat melawan infeksi, sebab tidak dapat mencapai lapisan lambung tetapi juga tidak bisa dibuang, sehingga respons kekebalan tumbuh dan tumbuh. Polymorph mati, dan mengeluarkan senyawa perusak radikal superoksida pada sel lapisan lambung. Nutrisi ekstra dikirim untuk menguatkan sel butir darah putih, dan merupakan sumber nutrisi juga bagi *H. pylori*. Dalam beberapa hari, gastritis dan bahkan tukak lambung akan terbentuk. Dengan demikian bisa saja tidak hanya *H. pylori* sendiri penyebab tukak lambung, tetapi inflamasi/peradangan lapisan lambung terjadi sebagai respons terhadap infeksi *H. pylori*.

Para peneliti di Inggris telah menemukan “benang merah” antara infeksi *H. pylori* dengan berkembangnya kanker lambung. Usia di atas 45 tahun bagi yang terinfeksi bakteri ini rentan terkena kanker lambung. Alarm seperti perdarahan di dubur, kehilangan berat badan, menderita anemia, sakit kuning, berlatar belakang keluarga penderita kanker lambung, pernah menderita tukak lambung, dan anorexia patut diwaspadai.

Pada tahun 1994, *H. pylori* disebut sebagai *grade 1 carcinogen* – karsinogen kelas I oleh WHO, dan hasil riset mutakhir membenarkan peranan *H. pylori* sebagai patogen bagi kanker lambung pada hewan percobaan.

Pada kondisi *H. pylori* mencapai  $10^{10}$  sel dalam lambung bisa mengakibatkan hipoklorhidria, yaitu berkurangnya asam lambung yang akan mengundang *Escherichia coli* dari usus untuk berkoloni di lambung dan berpeluang bagi terjadinya diare.

### **1. Gejala tukak lambung**

Pegal-pegal di punggung adalah gejala umum, datang dan pergi selama beberapa hari atau beberapa minggu, terjadi 2-3 jam setelah makan, terjadi tengah malam ketika perut kosong, bisa diatasi dengan makan, atau minum obat antasid. Gejala lainnya yaitu berat badan berkurang, kurang nafsu makan, kembung, mual, muntah<sup>2</sup>. Beberapa orang hanya mengalami

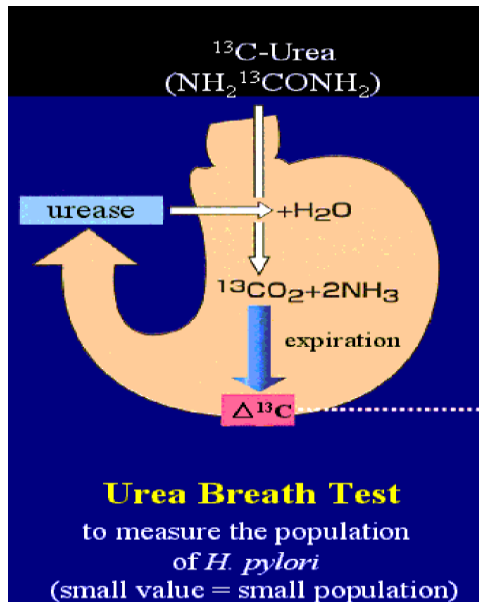
gejala ringan atau bahkan tidak ada gejala sama sekali.

Apabila mengalami gejala-gejala seperti ini, tiba-tiba sakit perut berkepanjangan, feses berdarah atau berwarna hitam, muntah darah atau muntah seperti bubuk kopi, sebaiknya temui dokter, bisa jadi terinfeksi bakteri ini.

## 2. Diagnosis

Diagnosa infeksi bakteri ini dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu invasif yang memerlukan endoskop, dan non invasif, yaitu salah satu di antaranya tes urea-pernapasan (*urea breath test*), yang cukup akurat untuk mendiagnosa maupun mengevaluasi efektivitas pengobatan terhadap infeksi *H. pylori*. Sedangkan tes darah melalui tusukan pada jari, mendeteksi antibodi terhadap bakteri ini, hanya baik dilakukan untuk uji awal, sebab setelah pengobatan bisa jadi hasil tes darah tetap positif meskipun *H. pylori* telah berhasil disingkirkan.

Sebelum melakukan uji pernapasan, diwajibkan untuk berpuasa selama 6 jam dari tengah malam, dan tidak mengonsumsi antibiotik dan obat pengurang asam lambung (PPI) dalam 2 minggu sebelum dan setelah dilakukan uji ini. Napas ditiupkan ke dalam suatu tabung, kemudian meminum larutan C-<sup>13</sup> urea dalam air, yaitu urea berlabel non radioisotop yang aman untuk dikonsumsi dalam tes ini. Contoh napas diambil untuk diukur C<sup>13</sup> dalam napas dengan mass spektrofotometer. Adanya *H. pylori* dalam lambung berakibat terhidrolisisnya C<sup>13</sup>-urea oleh urease menjadi asam bikarbonat, yang lebih lanjut akan terurai CO<sub>2</sub> yang keluar sebagai napas dan H<sub>2</sub>O. Uji pernapasan dengan urea mempunyai ketepatan 96-98%, dan sangat spesifik, sebab yang diukur adalah aktivitas urease yang dihasilkan oleh *H. pylori* yang aktif. Gambar 50 memperlihatkan mekanisme uji *urea breath test*.



Gambar 51. Mekanisme uji urea breath test

### 3. Penanganan infeksi *H. pylori*

Obat-obatan yang digunakan dapat untuk pengobatan tukak lambung akibat *H. pylori* yaitu antibiotik seperti tetracycline, amoxilin, obat-obatan untuk mengurangi asam lambung seperti penghalang H<sub>2</sub> dengan memblokir histamin yang menstimulir sekresi asam, dan proton pump inhibitor (PPI) mengurangi produksi asam, dengan menahan mekanisme pemompaan asam ke dalam lambung. Bismuth subsalicylate merupakan pelindung lapisan lambung terhadap asam lambung, dan juga membunuh *H. pylori*.

Perlu diingat, antibiotik yang digunakan bisa memberikan efek yang tidak menyenangkan seperti resistensi, mual, muntah<sup>2</sup>, diare, feses yang hitam, rasa sepat di mulut, panas dingin dan sakit kepala.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy tahun 2001 melaporkan peranan bakteri probiotik *Lactobacillus gasseri* (LG21) terhadap infeksi *H. pylori* pada manusia, yang secara nyata menekan infeksi. Suatu alternatif penanganan yang aman dibanding terapi antibiotik dan obat-obatan lainnya.

## X. Probiotik Asal Dadih

---

Hasil-hasil riset terbaru mikrobiota saluran cerna membuka misteri mekanisme kekebalan tubuh, permeabilitas usus, sensitivitas insulin, dan manajemen berat badan. Disamping itu, pencegahan dan pengobatan obesitas, menghambat terjadinya kanker usus, kesehatan mulut seperti bau mulut dan kerusakan gigi, perawatan kulit seperti *antiaging* dan *biomoisturizer*, dan mengelola stres psikologis dan hubungan antara saluran cerna dengan otak dapat dikelola oleh microbiome saluran cerna. Termasuk dadih, beberapa produk susu telah dilaporkan mengandung bakteri probiotik, yang bila dikonsumsi hidup dalam jumlah memadai dan memberikan manfaat kesehatan bagi inangnya (FAO / WHO 2002).

### Fungsi Probiotik

Proses pembuatan dadih melibatkan fermentasi spontan, yaitu bakteri asam laktat alami yang terkandung dalam susu kerbau, sehingga tidak melibatkan kultur starter. Susu kerbau yang digunakan merupakan susu segar yang baru diperah, tanpa dilakukan proses pemanasan sama sekali, langsung di simpan dalam tabung bamboo yang ditutup oleh daun pisang atau plastik dan diperam selama semalam, sehingga keesokan harinya terbentuk dadih, susu fermentasi tradisional asal Sumatera Barat.

Meskipun tidak dilakukan proses pemanasan, dan proses fermentasi tradisional yang sederhana dan tidak menerapkan praktik higienis yang memadai, namun tidak terjadi kegagalan proses fermentasi atau terjadinya penyakit yang ditularkan melalui makanan pada orang-orang yang mengkonsumsi dadih. Lebih lanjut, generasi tua percaya bahwa mengkonsumsi dadih memberikan efek yang menyehatkan. Fenomena ini yang menginspirasi penulis dalam mengeksplorasi lebih dalam lagi bakteri asam laktat asli indigenus Indonesia yang terlibat dalam fermentasi spontan dadih, yang bias menghambat pertumbuhan kontaminan serta bakteri patogen baik dari susu kerbau segar yang tidak dipanaskan, maupun dari lingkungan proses pembuatan dadih.

Seleksi probiotik baru diawali dengan uji *in vitro* terhadap sifat bakteri probiotik, yaitu ketahanan terhadap asam dan garam empedu, adesi pada mukosa usus, penghambatan, kompetisi, dan eksklusi terhadap bakteri patogen, kemudian dilanjutkan dengan uji secara *in vivo* terhadap



keamanan, bakteri asam laktat fekal hidup, dan dengan deteksi molekuler dapat di telusuri keberadaan bakteri probiotik dengan menggunakan real time PCR (Collins *et al.* 1998. Ouwehand *et al.* 2002, Collado *et al.* 2005).

Menurut Surono dan Nurani (2001) *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, dan *Leuconostoc sp.* dominan pada proses fermentasi dadih. Selanjutnya, untuk mengeksplorasi isolat probiotik, Surono (2003) mengisolasi dan mengidentifikasi 70 koloni bakteri asam laktat diisolasi dari dadih berasal dari Bukittinggi, Sumatera Barat, dan 10 strain dadih bakteri laktat, yaitu *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Leuconostoc mesenteroides* dan *Lactobacillus casei* memiliki daya tahan hidup yang moderat (dalam kisaran 4,83-5,49 log CFU /ml) pada pH 2.0 selama 2 jam.

Toleransi garam empedu dari isolat bakteri asam laktat asal dadih *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* secara *in vitro* baik. Selain itu, satu strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* yang diisolasi dari dadih memiliki tingkat kelangsungan hidup yang baik (8.11 log CFU /ml) di hadapan lisozim setelah 60 menit inkubasi. Kemampuan beradesi pada mukosa usus memungkinkan terjadinya kolonisasi pada saluran usus manusia, meskipun sifatnya hanya sementara (Alander *et al.* 1999), dan memfasilitasi dalam memodulasi sistem kekebalan tubuh, (Schiffrin *et al.* 1997). Karenanya, adesi adalah salah satu kriteria seleksi utama untuk strain probiotik baru (Havenaar *et al.* 1992, Salminen *et al.* 1999).

Collado *et al.* (2007a) melaporkan bahwa ke lima strain dadih asal menunjukkan sifat dan kemampuan beradesi yang baik, dan yang paling kuat ditunjukkan oleh *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506. Semua strain bakteri asam laktat yang diisolasi dari dadih susu fermentasi mampu secara bermakna mengurangi tingkat adesi dari semua patogen yang diuji. *Lactobacillus plantarum* IS-10506 dan *Enterococcus faecium* IS-27526 memiliki kemampuan penghambatan tertinggi. Dapat disimpulkan, *Lactobacillus plantarum* IS-10506 dan *Enterococcus faecium* IS-27526 memiliki adesi terbaik, bersifat menghambat bakteri patogen seperti *E. coli*, *Salmonella sp.*, (Collado *et al.* 2007a) dan menunjukkan daya penghambatan, mampu berkompetisi dengan bakteri patogen, dan mengusir bakteri pathogen. Dengan demikian *Lactobacillus plantarum* IS-10506 dan *Enterococcus faecium* IS-27526 adalah kandidat yang menjanjikan sebagai probiotik.

Patogen penghambatan bakteri pathogen oleh kandidat probiotik berperan penting dalam perlindungan terhadap infeksi. Dharmawan *et al.* (2006) melaporkan bahwa di antara 10 strain bakteri asam laktat yang

diisolasi dari dadih terhadap adesi pada permukaan mukosa usus manusia, terjadi autoaggregation antara *E. faecium* IS-27526 dan *E. coli* serta *S. typhimurium*, dengan mekanisme antara lain probiotik mencegah menempelnya patogen secara langsung pada permukaan usus (Bibiloni et al 1999, Ouwehand et al 1999, Tuomola et al 1999, Canzi et al 2005). Kemampuan dari kedua strain IS-16183 dan IS-10506 dalam bersaing dengan *E. coli* juga dilaporkan (Collado et al. 2007a).

Kemampuan agregasi berhubungan dengan sel sifat adesi (Vandevoorde et al 1992, Boris et al 1997, Del Re et al, 2000.). Collado et al. (2007b) melaporkan bahwa ke lima strain yang diisolasi dari susu fermentasi Indonesia menunjukkan persentase kemampuan autoagregasi yang lebih tinggi.

*Lactobacillus plantarum* IS-10506 dan *Enterococcus faecium* IS-23427 dan IS-27526 mempunyai kemampuan adesi tertinggi. Lebih lanjut, Surono et al. (2010) melaporkan peningkatan yang signifikan dari viabilitas bakteri asam laktat pada feses tikus setelah 3 hari diberi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 dan *Lactobacillus plantarum* IS-20506 masing-masing sebesar  $1,2 \times 10^{10}$ - $1,6 \times 10^{10}$  CFU /hari, yaitu masing-masing sebanyak 3,25-3,5 dan 0,35-0,65 siklus log, dan terus meningkat setelah 7 hari, masing-masing sebesar 1,8-2,0 dan 2,1-2,3 siklus log. Kemampuan isolat bakteri asam laktat asal dadih dalam mendetoksifikasi mutagen dan racun cyanobacteria, yaitu Mycrocistin-LR telah dilaporkan. Detoksifikasi mutagen dilakukan dengan penyerapan dan terikat pada dinding sel (Hosono et al 1990, Surono dan Hosono 1996), sedangkan racun cyanobacteria dimetabolisme (Surono et al 2008, Surono et al 2009).

Hosono et al. (1990) melaporkan kemampuan 36 isolat bakteri asam laktat asal dadih untuk mengikat senyawa mutagen seperti asam amino pyrolysates, yakni, 3-amino-1,4-dimetil-5H-pyrido [4,3-b] indole (Trp-P1), 3-amino-1-metil-5H-pyrido [4,3-b] indole (Trp-P2), dan 2-amino-6-methylidipyrido [1,2-a: 3', 2'-d] imidazole (Glu-P1). *Leuconostoc paramesenteroides* R-62 menunjukkan kemampuan mengikat tertinggi terhadap Trp-P1, Trp-P2, dan Glu-P1, masing-masing 99,74%, 99,65%, dan 45,2%. Surono dan Hosono (1996) melaporkan sifat antimutagenik susu yang difermentasi dengan bakteri asam laktat asal dadih terhadap sifat mutagenik dari terasi, dan *Lactobacillus casei* subsp. *casei* R-52 ditemukan memiliki daya antimutagenik tertinggi. Surono et al. (2009) juga melaporkan bahwa *Enterococcus faecium* IS-27526 menunjukkan

daya antimutagenik terhadap Trp-P1 secara *in vivo* pada hewan coba tikus Wistar.

Microcystin-LR merupakan racun yang dihasilkan oleh cyanobacteria, suatu peptida siklik yang diklasifikasikan sebagai hepatotoxins, dan promotor tumor. Pedoman yang dikeluarkan oleh WHO untuk air minum adalah dengan batas 1 mg microcystin-LR (MC-LR) per liter untuk perlindungan kesehatan manusia (WHO 1998). Microcystins secara kimiawi merupakan senyawa yang stabil (Harada 1996, Lahti et al 1997). Surono et al. (2008) melaporkan bahwa *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 dan IS-20506 dari dadih memiliki kemampuan menghilangkan microcystin-LR (MC-LR) tertinggi.

Nybom et al. 2008 juga melaporkan kemampuan tertinggi dalam menghilangkan microcystin-LR diperoleh dari *Lactobacillus plantarum* IS-20506 dibandingkan dengan strain probiotik *Lactobacillus plantarum* komersial lainnya yang diuji.

Para peneliti melaporkan aktivitas hipokolesterolemik dari isolat asal dadih. Hosono dan Tonooka (1995) melaporkan *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. diacetyllactis R-43 dan R-22 asal dadih menunjukkan kemampuan mengikat kolesterol yang tinggi, yaitu masing-masing 33,91% dan 29,73%.

Surono (2003) melaporkan *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IS-10285 dan IS-29862 memiliki kemampuan dekonjugasi taurokolat. Pato dkk. (2004) menyatakan bahwa tikus yang diberi susu fermentasi yang melibatkan *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IS-10285 menunjukkan total asam empedu dalam serum yang secara bermakna ( $p < 0,05$ ) lebih rendah.

### **Novel Probiotik asal Dadih**

Fungsi dan sifat probiotik dari beberapa strain yang diisolasi asal dadih dapat memberikan bukti potensi bakteri asam laktat indigenous yang berasal dari susu kerbau mentah segar dalam memerangi kontaminan, baik bakteri perusak maupun bakteri patogen, selama berlangsungnya fermentasi dadih secara spontan. Hasil penelitian membenarkan satu sama lain dan identifikasi molekuler menunjukkan betapa pentingnya sebagai kandidat probiotik. Selain itu, beberapa tim dari laboratorium yang berbeda di Indonesia, Singapura, Jepang, dan Finlandia telah terlibat dalam penelitian dadih yang hasilnya saling mendukung satu sama lain.

*Lactobacillus plantarum* IS-10506 dan *Enterococcus faecium* IS-27526 terbukti memiliki sifat dan fungsi probiotik secara *in vitro* dan *in vivo*, dan

telah terdeteksi secara molekuler sebagai salah satu syarat bakteri probiotik harus jelas identitaskan karena sangat spesifik terhadap strain.

### **Dadih Probiotik untuk Promosi Kesehatan Manusia**

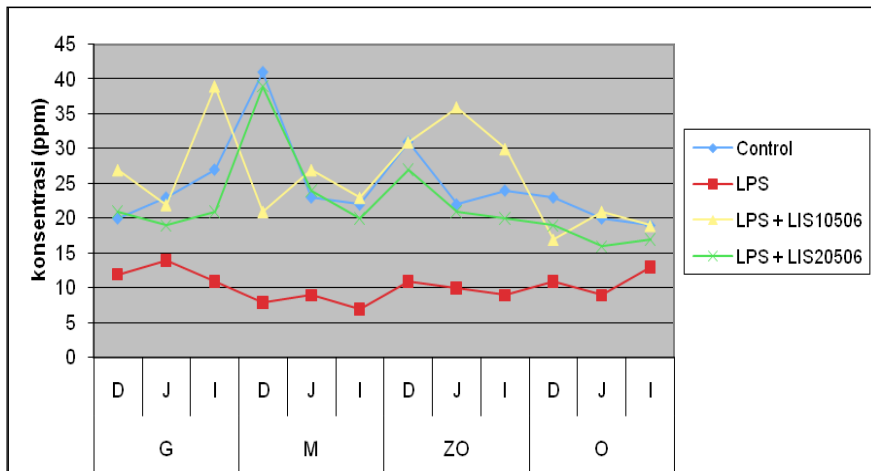
Indonesia kaya akan keragaman makanan tradisional dan keragaman hayati, dari berbagai daerah yang potensial terhadap manfaat kesehatan. Dadih adalah susu fermentasi tradisional dari susu kerbau asal Sumatra Barat yang melibatkan fermentasi spontan dan bakteri asam laktat indigenus yang terlibat dalam fermentasi, dengan hasil produk menyerupai yogurt (Akuzawa dan Surono 2002), dan dipercaya oleh penduduk setempat dan sekitarnya memberikan manfaat kesehatan. Hal ini mungkin disumbangkan oleh sifat probiotik yang diberikan oleh bakteri asam laktat indigenus pada dadih.

Riset terhadap beberapa strain bakteri asam laktat asal dadih telah dilakukan untuk mengeksplorasi sifat dan fungsi probiotik baik secara *in vitro*, *in vivo* maupun uji pada manusia.

### **Novel Probiotik *Lactobacillus plantarum* IS-10506**

Berdasarkan hasil riset secara *in vitro*, telah terbukti isolate bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* toleran terhadap keasaman pH 2 dan 3 dan juga terhadap garam empedu. Lebih lanjut dilakukan deteksi molekuler dengan PCR dan dengan 16S rRNA gen sekuensing, sehingga diperoleh urutan nukleotida dan telah di daftarkan pada GenBank sebagai *L. plantarum* IS-10506, GenBank accession no. DQ860148. Dari hasil riset secara *in vitro*, dilanjutkan dengan *in vivo* menggunakan hewan coba tikus putih Wistar untuk mekanisme perbaikan kerusakan brush border usus, dan mencit Balb/c untuk mekanisme respon imun pada reaksi alergi.

Ranuh (2008) melaporkan mekanisme perbaikan kerusakan brush border tikus putih Wistar akibat pemberian LPS *E. coli* serotype 055 dengan dosis 2.5 mg/kg berat badan pada hari pertama dan kemudian diberi probiotik *Lactobacillus plantarum* IS-10506 maupun IS-20506 pada dosis  $2.6 \times 10^9$  CFU/hari selama pada hari ke dua selama 7 hari.



Gambar 52. Profil Protein intestinal Brush Border usus pada duodenum (usus dua belas jari), jejunum (usus kosong) dan ileum (usus penyerapan) (Sumber: Ranuh, 2008)

Keterangan :

Control : ransum standar

LPS : Lipopolisakarida *E. coli*

LPS + LIS 10506 : Lipopolisakarida *E. coli* + *Lactobacillus plantarum* IS-10506

LPS + LIS 20506 : Lipopolisakarida *E. coli* + *Lactobacillus plantarum* IS-20506

Protein penyusun brush border

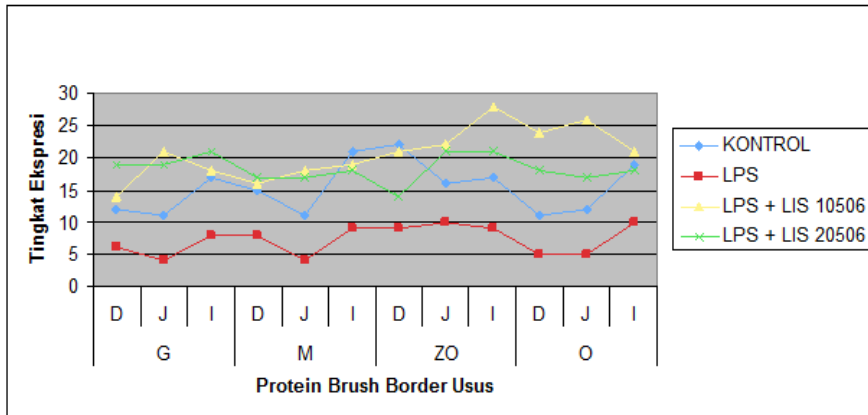
G : Galectin-4

M: Myosin-1a

O : Occludin

ZO-1 : Zonula Occludens

Gambar 53 memperlihatkan bahwa pemberian LPS *E. coli* pada tikus putih Wistar merusak brush border usus, dan pemberian probiotik *Lactobacillus plantarum* baik IS-10506 maupun IS-20506 menimbulkan perbaikan kerusakan brush border dengan tingkat respon yang berbeda, melalui aktivasi jalur ERK1/MAP dan JNK/MAP, yaitu Mitogen Activated Protein kinase (Gambar 53). Hal ini menunjukkan juga bahwa strain probiotik berpengaruh terhadap fungsi probiotik.



Gambar 53. Distribusi Protein Brush Border usus pada duodenum (usus dua belas jari), jejunum (usus kosong) dan ileum (usus penyerapan) (Ranuh, 2008)

Keterangan :

Control : ransum standar

LPS : Lipopolisakarida *E. coli*

LPS + LIS 10506 : Lipopolisakarida *E. coli* + *Lactobacillus plantarum* IS-10506

LPS + LIS 20506 : Lipopolisakarida *E. coli* + *Lactobacillus plantarum* IS-20506

Protein penyusun brush border

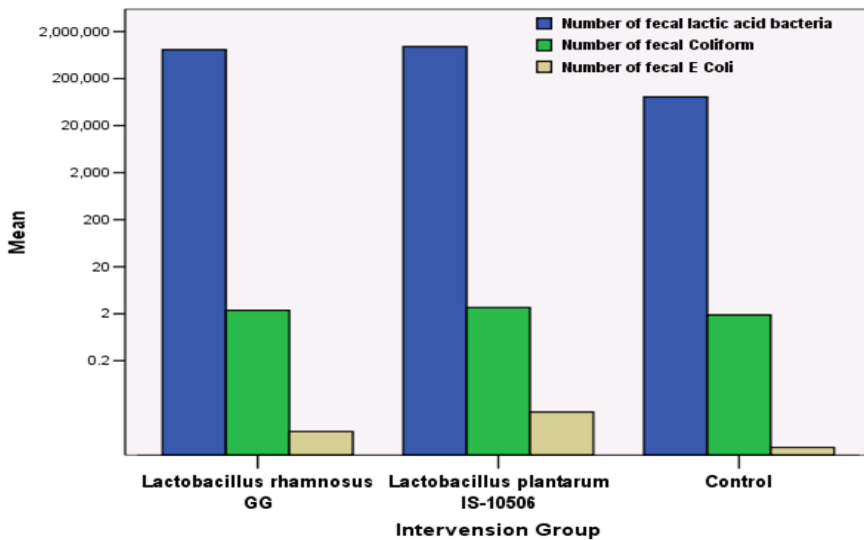
G : Galectin-4

M: Myosin-1a

O : Occludin

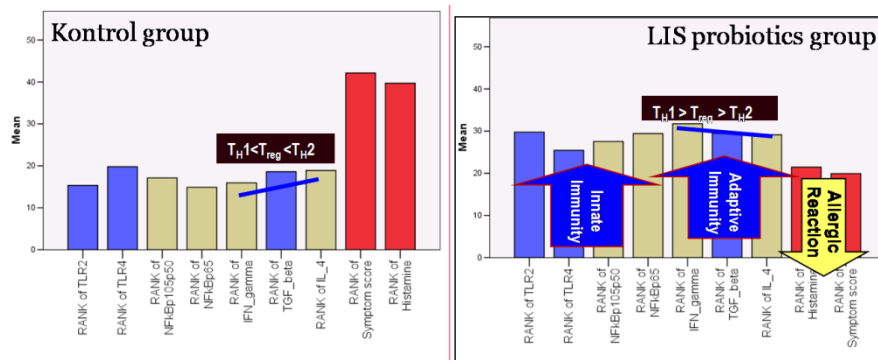
ZO-1 : Zonula Occludens

Endaryanto (2006) melaporkan, bahwa pemberian *Lactobacillus plantarum* IS-10506 maupun *Lactobacillus rhamnosus* GG, masing-masing dengan dosis  $10^9$  CFU/hari selama 90 hari, pada mencit Balb/c yang dibuat alergi dengan ovalbumin, memperlihatkan viable bakteri asam laktat fekal dari mencit yang secara bermakna lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol yang hanya diberi ransum standar (Gambar 54)



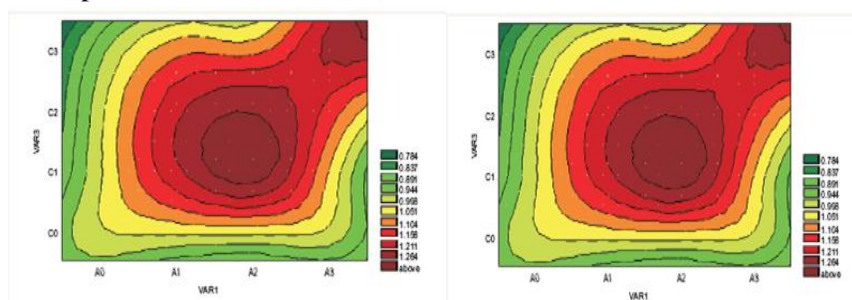
Gambar 54. Pengaruh pemberian probiotik pada viabel bakteri asam laktat fekal pada mencit Balb/c (Endaryanto, 2006)

Lebih lanjut dilaporkan oleh Endaryanto (2006) mekanisme respon imunologis dari kelompok yang diberi probiotik *Lactobacillus plantarum* IS-10506 menunjukkan terbentuknya keseimbangan baru dimana Th1 lebih besar daripada Treg dan Th2, sehingga menekan reaksi alergi, dibandingkan dengan kelompok kontrol dimana Th2 lebih tinggi daripada Treg dan Th1 (Gambar 55).



Gambar 55. Respon imun sel T dan mekanisme penekanan terjadinya reaksi alergi, dengan keseimbangan Th1, Treg dan Th2 pada mencit Balb/c yang dibuat alergi dengan ovalbumin, perbandingan antara kelompok kontrol dan kelompok probiotik *L. plantarum* IS-10506 (Endaryanto, 2006)

Surono (2010) melaporkan bahwa tikus putih Spraque Dawley yang diberi probiotik *L. plantarum* IS-10506 maupun IS-20506 pada dosis  $1.3-1.4 \times 10^{10}$  CFU/hari selama 3 dan 7 hari dilanjutkan dengan 3 hari masa penghilangan efek probiotik (*washout periode*) dibandingkan dengan kontrol. Pada kelompok probiotik, baik *L. plantarum* IS-10506, IS-20506 maupun *L. casei* komersial, terlihat peningkatan secara bermakna viable bakteri asam laktat fekal setelah 3 hari dan terus meningkat hingga 7 hari pemberian probiotik, dan setelah 3 hari *washout period*, terjadi penurunan jumlah secara bermakna viable bakteri asam laktat fekal, meskipun demikian di atas jumlah awal sebelum pemberian probiotik dan pada kelompok kontrol (Gambar 55a).



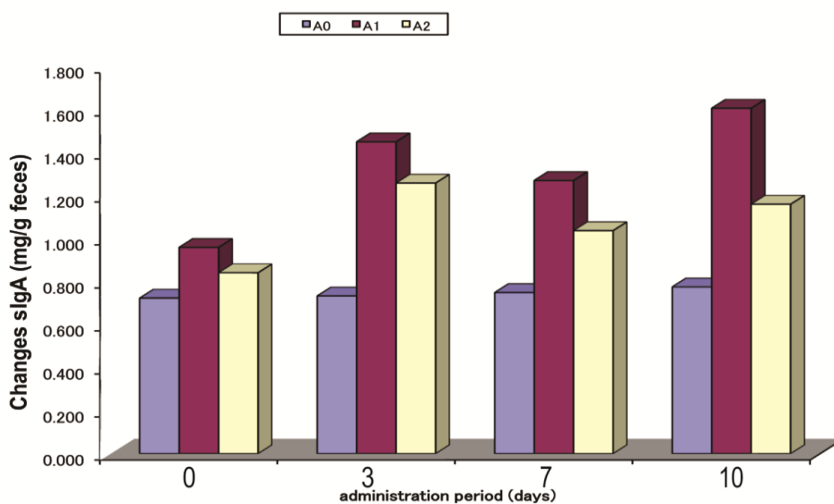
Keterangan : A<sub>0</sub> : control, A<sub>1</sub> : *L. casei* komersial, A<sub>2</sub> : *L. plantarum* IS-10506, A<sub>3</sub> : *L. plantarum* IS-20506

Gambar 56 Pengaruh Pemberian probiotik *L. plantarum strain* IS-10506, IS-20506 maupun *L. casei* komersial pada viabel bakteri asam laktat fekal pada 3, 7 hari dan washout period (56a), dan Pengaruh Pemberian probiotik *L. plantarum strain* IS-10506, IS-20506 maupun *L. casei* komersial pada viabel bakteri coliform fekal pada 3, 7 hari dan washout period (56b)

Sebaliknya, pada kelompok probiotik, baik *L. plantarum* IS-10506, IS-20506 maupun *L. casei* komersial, terlihat penurunan secara bermakna viable bakteri coliform fekal setelah 3 hari dan terus menurun hingga 7 hari pemberian probiotik, dan setelah 3 hari *washout period*, terjadi penurunan jumlah secara bermakna viable bakteri asam laktat fekal, mendekati jumlah awal sebelum pemberian probiotik dan pada kelompok kontrol (Gambar 56b).



Pengaruh pemberian probiotik asal dadih *L. plantarum* IS-10506 maupun IS-20506 terhadap respon imun sIgA fekal dilaporkan oleh Surono (2009), pada dosis  $10^{10}$  CFU/hari secara bermakna meningkatkan sIgA fekal setelah 3 hari dan 7 hari pemberian, dibandingkan dengan kelompok kontrol, dimana respon pemberian *L. plantarum* IS-10506 cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan strain IS-20506, dan setelah periode penghilangan pengaruh probiotik *L. plantarum* IS-10506 selama 3 hari (*washout period*), yaitu tanpa pemberian probioik selama 3 hari setelah 7 hari pemberian, terlihat respon imun sIgA fekal masih secara bermakna meningkat (Gambar 57).

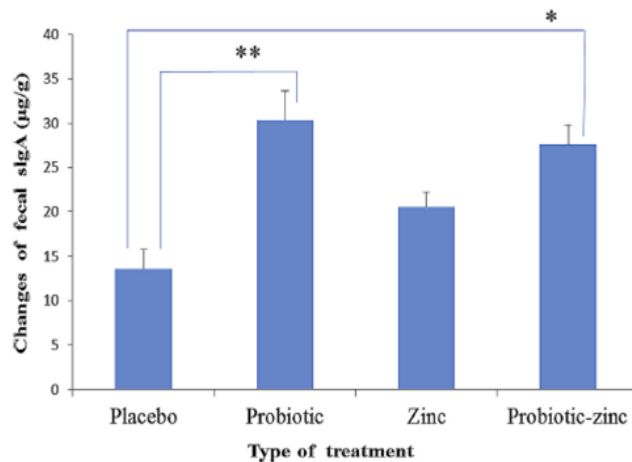


Gambar 57 Perubahan sIgA fekal (mg/g feses) pada tikus putih Spraque Dawley (SD) pada 0, 3, 7 hari dan 3 hari periode washout akibat pengaruh pemberian *L. plantarum* IS-10506 maupun IS-20506.

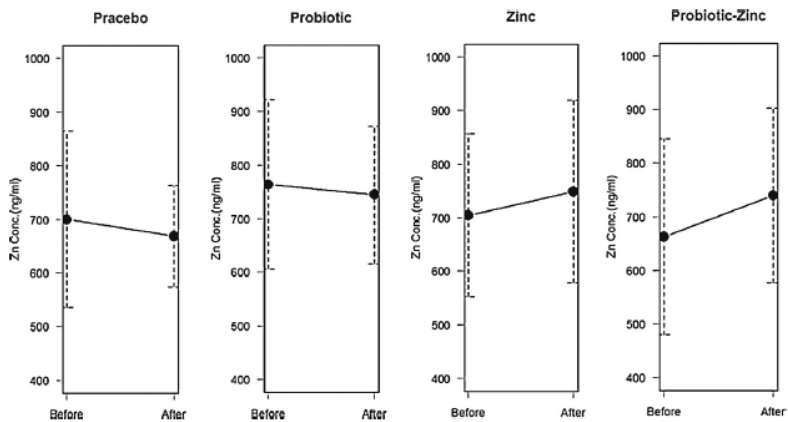
Berdasarkan hasil riset *in vitro* dan *in vivo* terhadap kandidat probiotik *L. plantarum* IS-10506, dan IS-20105, maka dilakukan uji pada manusia (*human study*) terhadap strain probiotik *L. plantarum* IS-10506 asal dadih.

Riset pra-pasca plasebo-kontrol acak buta ganda telah dilakukan terhadap anak Indonesia berusia 12-24 bulan, yang dibagi menjadi empat kelompok yaitu, plasebo, probiotik, seng, dan kombinasi probiotik dan seng terhadap 12 orang anak-anak dalam setiap kelompok, masing-masing secara berurutan, diberikan suplementasi plasebo, disuplementasi dengan

mikroenkapsulasi *L. plantarum* IS-10506 asal dadih pada dosis  $10^{10}$  CFU/hari, disuplementasi 20 mg seng sulfat monohidrat (8 mg seng elemental), dan diberi suplementasi *L. plantarum* IS-10506 asal dadih pada dosis  $10^{10}$  CFU/hari dan 20 mg seng sulfat monohidrat (8 mg seng elemental) selama 90 hari berturut-turut. Surono (2014) melaporkan, bahwa sIgA fekal meningkat secara bermakna pada kelompok probiotik,  $30,33 \pm 3,32 \mu\text{g/g}$  ( $p < 0,01$ ), dan pada kelompok probiotik dan seng,  $27,55 \pm 2,28 \mu\text{g/g}$  ( $p < 0,027$ ), dibandingkan dengan kelompok plasebo,  $13,58 \pm 2,26 \mu\text{g/g}$ . Perubahan konsentrasi serum seng dalam kelompok anak bawah dua tahun yang disuplementasi kombinasi kelompok probiotik dan seng menunjukkan peningkat tertinggi secara bermakna setelah disuplementasi selama 90 hari dibandingkan dengan suplementasi plasebo, probiotik dan seng saja. Kombinasi probiotik *L. plantarum* IS-10506 di  $10^{10}$  CFU/hari dan 8 mg seng suplemen elemental selama 90 hari secara bermakna meningkatkan serum seng dari anak-anak prasekolah, dan juga meningkatkan secara bermakna respon imun humoral sIgA fekal (Gambar 58) serta memperbaiki status seng dari anak bawah dua tahun (Gambar 58) (Surono et al. 2014).



Gambar 58. Perubahan sIgA fekal ( $\mu\text{g/g}$  feses) pada ke 4 kelompok anak bawah dua tahun sehat setelah pemberian probiotik *L. plantarum* IS-10506,  $10^{10}$  CFU/hari selama 90 hari (Surono et al., 2014)



Gambar 59. Perbandingan serum seng pada 4 kelompok anak bawah dua tahun sehat yang disuplementasi probiotik *L. plantarum* IS-10506,  $10^{10}$  CFU/hari dan 20 mg seng sulfat monohidrat selama 90 hari (Surono et al., 2014).

Berikut rekapitulasi riset yang telah dilakukan terhadap bakteri probiotik *L. plantarum* IS-10506 asal dadih (Tabel 45).

Table 45. Rekapitulasi riset *in vitro*, *in vivo* dan uji pada manusia on probiotic *Lb. plantarum* IS-10506 asal Dadih

Sifat probiotik yang diuji	Jenis riset	Referensi
Adesi, kolonisasi, koagregesi, eksklusi patogen dari strain IS-10506	<i>In vitro</i>	Dharmawan et al., 2006, Collado et al., 2007a, Collado et al., 2007b
Adesi, kolonisasi strain IS-10506, peningkatan viabel bakteri asam laktat fekal dari mencit Balb/c, menekan reaksi alergi dengan membentuk keseimbangan baru Th1/Th2	<i>In vivo</i>	Endaryanto, A., 2006
Adesi, kolonisasi strain IS-10506, meningkatkan viabel bakteri asam laktat fekal tikus Sprague Dawley	<i>In vivo</i>	Surono et al., 2010
Strain IS-10506 and strain IS-20506 memperbaiki kerusakan brush border akibat diinduksi oleh LPS <i>E. coli</i> dengan memperbaiki protein penyusun brush border melalui MAP kinase yaitu peningkatan ekspresi ERK dan JNK	<i>In vivo</i>	Ranuh, 2008
Adesi, kolonisasi strain IS-10506,	Uji pada	Surono et al., 2009

Sifat probiotik yang diuji	Jenis riset	Referensi
meningkatkan viabel bakteri asam laktat pada orang dewasa sehat	manusia	
Strain IS-10506 meningkatkan hitungan sel CD4+ pada orang dewasa penderita	Uji pada manusia	Surono et al., 2010
meningkatkan respon imun humoral sIgA fekal anak penderita HIV yang mendapat terapi antiretroviral	Uji pada manusia	Brahmantya, H 2013
Strain IS-10506 secara bermakna meningkatkan TGF- $\beta$ and IL-4 anak penderita HIV yang mendapat terapi antiretroviral	Uji pada manusia	Sitti Radhiah, 2013
Strain IS-10506 secara bermakna mengurangi LPS darah pada anak penderita HIV yang mendapat terapi antiretroviral	Uji pada manusia	Dwiastuti S, 2013
Strain IS-10506 memodulasi respon imun dari tikus <i>Wistar</i> lansia dengan model infeksi oleh LPS <i>E.coli</i>	<i>In vivo</i>	Kadir S, 2013
Kombinasi strain IS-10506 dan seng meningkatkan secara bermakna sIgA fekal, serum seng and selenium anak bawah dua tahun sehat	Uji pada manusia	Surono et al., 2014

Sumber : Surono, 2015 di dalam AK Puniya (Ed).

### **Novel Probiotik *Enterococcus faecium* IS-27526**

Kriteria pemilihan probiotik yang aman, toleransi terhadap kondisi gastrointestinal, kemampuan untuk mematuhi mukosa gastrointestinal dan eksklusi kompetitif patogen telah dilakukan secara *in vitro* (Collado et al., 2007a; Collado et al., 2007b). Adesi pada mukosa usus akan memungkinkan kolonisasi, meskipun sifatnya sementara, hanya transit dan tidak permanen pada saluran usus manusia dan berhubungan dengan kemampuan untuk memodulasi sistem kekebalan tubuh (Schiffrin et al., 1997). Efektifitas fungsi probiotik bersifat spesifik terhadap strain dan dosisnya. Probiotik yang memenuhi kriteria tersebut secara umum merupakan bakteri asam laktat terutama *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* spesies, namun beberapa strain *Lactococcus*, *Streptococcus*, dan *Enterococcus* spesies, serta beberapa strain non patogen *Escherichia* sp juga berpotensi sebagai probiotik.

Bakteri *Enterococcus faecium* IS 27526 merupakan salah satu dari isolat unggul bakteri asam laktat asal dadih yang telah terbukti berpotensi sebagai bakteri probiotik, dan terbukti secara *in vitro* bersifat probiotik seperti tahan asam, garam empedu, kemampuan beradesi pada sel epitel

usus, mampu berkompetisi dan menghambat bakteri pathogen tertentu, terutama *E. coli* (Surono et al., 2003; Collado et al., 2007a, Collado et al., 2007b). Probiotik *E. faecium* IS-27526 asal dadih telah diidentifikasi secara molekuler melalui 16SrRNA gen sekuen sebagai *E. faecium* (GenBank no akses EF068251).

### **Probiotik *E. faecium* IS-27526 dan promosi kesehatan pada anak balita**

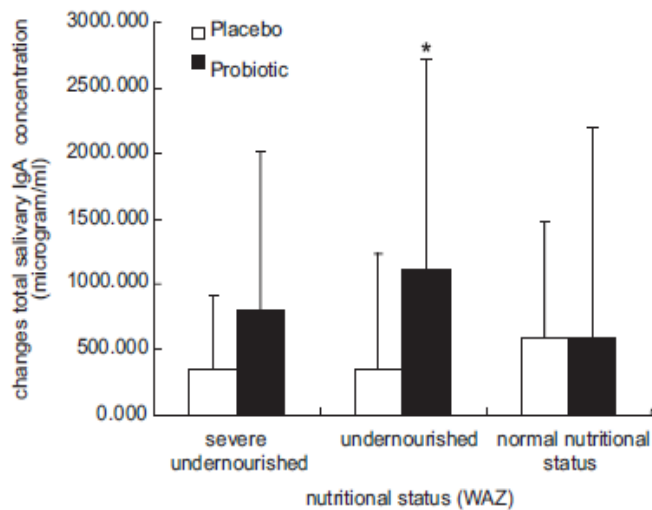
Mikrobiota di dalam usus manusia secara alamiah dihuni oleh sekitar 100-400 jenis bakteri yang secara sederhana dikelompokkan dalam ‘bakteri baik’ yang bermanfaat bagi kesehatan dan ‘bakteri jahat’ yang menyebabkan penyakit (bakteri patogen), keduanya hidup dalam keseimbangan. Komposisi mikrobiota dalam feses bisa menjadi indikator kondisi kesehatan manusia.

Usus manusia merupakan organ yang penting dalam penyediaan energi bagi tubuh, respon imun dan pemeliharaan kesehatan manusia secara umum. Dihuni oleh 400-500 spesies yang berbeda dari bakteri, baik berbahaya dan commensal (Suau et al., 1999). Mikrobiota berperan penting dalam kesehatan secara keseluruhan tuan rumah melalui aktivitas metabolisme merupakan mikrobiome dan meregulasi fisiologis seperti penyerapan zat gizi, sintesis senyawa bioaktif, peningkatan fungsi pertahanan saluran usus, motilitas, resistensi terhadap patogen atau modulasi sistem kekebalan tubuh (Kelly et al., 2005). Pengendalian mikrobiota dalam saluran cerna dapat menyebabkan pencegahan terhadap berbagai jenis penyakit baik menular maupun tidak melular, serta gangguan metabolisme (Cani dan Delzenne, 2009).

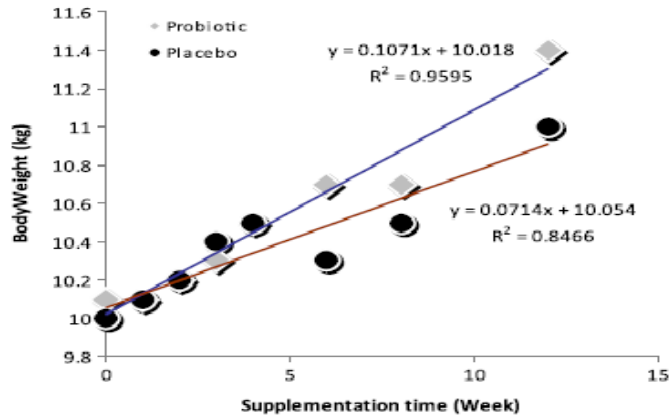
Profil mikrobiota usus yang sehat berperan penting untuk optimalisasi kekebalan mukosa dan sistemik. Mikrobiota usus dapat dimodifikasi oleh perubahan asupan zat gizi dalam makanan, khususnya konsumsi probiotik dan prebiotik dapat mengembalikan atau mempertahankan ekosistem usus.

Riset RCT (Randomized Clinical Trial) dilakukan pada balita bekerja sama dengan beberapa puskesmas, 3 Puskesmas di Cianjur dan 4 wilayah Puskesmas yaitu Cikakak, Bantar Gadung, Warung kiara dan Kedu Dampit, Kabupaten Sukabumi, Jawa Barat membuktikan bahwa balita yang disuplementasi biskuit protein tinggi dengan krim yang mengandung probiotik *E. faecium* IS-27526 baik dalam bentuk bubuk kering beku (freeze dried) maupun mikroenkapsulasi,  $10^8$ cfu/hari, dibandingkan plasebo menggunakan maltodekstrin terbukti meningkatkan berat badan

balita dan respon imun humoral (Riewpassa, 2005) dan Catur Adi, 2010). Hal ini sesuai dengan hasil riset RCT suplementasi *E. faecium dadih* IS-27526 pada susu UHT rendah lemak selama 3 bulan terhadap anak balita di Puskesmas Teluk Naga, Tangerang 2003-2004, yang dilaporkan di Anaerobe journal, yaitu meningkatkan respon imun humoral secara signifikan terutama pada balita gizi kurang (Gambar 59) dan meningkatkan berat badan balita berstatus gizi normal (Gambar 60) (Suroño et al., 2011).



Gambar 60. Nilai rata-rata peningkatan total sIgA saliva (mg/ml) berdasarkan status gizi skor Z (BB/Umur) balita sehat setelah suplementasi probiotik *E. faecium* IS-27526 (Suroño et al., 2011)



Gambar 61. Regresi linier berat badan pada kedua kelompok anak balita sehat, kelompok plasebo dan kelompok probiotik *E. faecium* IS-27526,  $10^8$ CFU/hari selama 90 hari (Surono et al., 2011).

Pemberian makanan tambahan berupa biskuit Fungsional yang mengandung protein tinggi baik mengandung protein ikan maupun protein isolat kedelai saja dengan krim probiotik *E. faecium* IS 27526 baik rutin tiap dan selang 1 hari secara signifikan meningkatkan berat badan dan Zskor BB/U, baik tiap hari maupun selang sehari, dengan peningkatan berat badan rata-rata yang tertinggi pada kelompok yang diberi biskuit tinggi protein ikan dengan krim probiotik tiap hari, setelah suplementasi 3 bulan. Suplementasi biskuit fungsional protein tinggi tanpa krim probiotik cenderung meningkatkan berat badan balita, setelah 90 hari. Hasil penelitian juga membuktikan bahwa terdapat perbedaan tidak bermakna antara penggunaan probiotik secara rutin setiap hari dan selang 1 hari (Catur Adi, 2009). Probiotik *Enterococcus faecium* IS 27526 telah terbukti secara *in vitro* memiliki sifat-sifat probiotik yang baik dan terindikasi mempunyai kemampuan sampai di usus dalam keadaan hidup, berkompetisi dengan pathogen. Usus halus berfungsi sebagai tempat utama pencernaan makanan dan tempat penyerapan zat gizi, sehingga daya cerna daya serap zat-zat gizi menjadi optimal, sehingga dapat meningkatkan berat badan balita.

Saluran cerna merupakan organ imun tersendiri karena 80 % system imun berada dalam saluran cerna, Pemberian biskuit fungsional yang mengandung protein ikan dan isolat kedelai dengan krim probiotik dapat meningkatkan sIgA fekal secara bermakna, Peningkatan sIgA fekal lebih besar terjadi pada balita dengan status gizi kurang di awal intervensi

dibanding balita status gizi buruk. Pemberian biskuit fungsional yang mengandung protein ikan dan isolat kedelai dengan krim probiotik maupun tidak, mampu memperpendek episode diare secara bermakna pada balita berat badan rendah (BBR) (Catur Adi, 2009).

Table 46. Rakapitulasi hasil riset in vitro, in vivo dan uji pada manusia probiotik *E. faecium* IS-27526 asal dadlh

Properties	Types of research	Tahun
Adesi, kolonisasi, ko-agregasi, eksklusi terhadap patogen	<i>In vitro</i>	Dharmawan et al., 2006, Collado et al., 2007a, Collado et al., 2007b
Adesi, kolonisasi IS-27526, meningkatkan viabel bakteri asam laktat fekal anak balita sehat, dan secara bermakna meningkatkan serum IgA, cenderung meningkatkan status gizi balita	Uji Pada manusia	Riewpassa, 2004
Susu plus Probiotik <i>Enterococcus faecium</i> IS 27526, cenderung meningkatkan konsentrasi total sIgA saliva lansia	Uji Pada manusia	Rusilanti, 2006
Adesi, kolonisasi of strain IS-27526, secara bermakna meningkatkan sIgA saliva dan peningkatan berat badan balita sehat	Uji Pada manusia	Surono et al., 2011
Adesi, kolonisasi strain IS-27526, meningkatkan viabel bakteri asam laktat fekal dan sIgA fekal anak balita sehat secara bermakna	Uji Pada manusia	Catur Adi, 2011

Sumber : Surono, 2015 di dalam AK Puniya (Ed).



# XI. Potensi Probiotik dalam Industri Pangan Fungsional

---

Sebagai pangan fungsional, target market merupakan masyarakat sehat yang sadar menjaga kesehatan tubuh (health conscious) melalui konsumsi makanan sehari-hari, agar terhindar dari penyakit infeksi maupun penyakit degeneratif. Probiotik sangat strain spesifik, tidak ada generik probiotik dan merupakan salah satu ingredien pangan fungsional. Terminologi probiotik berimplikasi pada bakteri hidup yang memberi manfaat bagi kesehatan manusia.

Berbagai produk makanan memanfaatkan bakteri asam laktat baik berupa makanan fermentasi, memperbaiki tekstur dan citarasa, biopreservasi dengan memanfaatkan senyawa metabolit dalam bentuk kering sehingga memperpanjang masa simpan produk makanan.

Aspek teknis yang menunjang produksi kultur bakteri asam laktat diantaranya adalah ilmu-ilmu : bioteknologi, mikrobiologi, dan teknologi pangan.

Industri makanan saat ini mengarahkan produk barunya ke makanan fungsional dan komponen bahan makanan fungsional, memenuhi kebutuhan konsumen akan makanan yang lebih menyehatkan. Munculnya fenomena probiotik terlihat dari semakin banyaknya aplikasi probiotik sebagai komponen bahan pangan utama makanan fungsional atau dengan istilah yang lebih sederhana dikenal sebagai makanan probiotik.

Makanan probiotik telah terbukti efektif dalam mengendalikan berbagai penyimpangan kesehatan seperti tukak lambung, diare, intoleransi laktosa, alergi makanan hingga kanker saluran pencernaan (Zubillaga *dkk.*, 2001).

Berbagai riset probiotik dan makanan fungsional telah dilakukan untuk menambahkan probiotik dalam makanan fungsional. Studi yang dilakukan oleh Heenan *dkk* (2002), menambahkan bakteri probiotik pada makanan vegetarian.

Charalampopoulos *dkk.*(2002) melaporkan penggunaan sereal sebagai substrat fermentasi bagi pertumbuhan bakteri probiotik untuk menghasilkan makanan fungsional. Lebih lanjut, Shimakawa *dkk.* (2003) melaporkan bahwa susu kedelai bisa dikembangkan sebagai makanan probiotik dengan menambahkan *Bifidobacterium breve* strain Yakult.

Klaim kesehatan harus didasarkan pada bukti ilmiah hasil uji klinis yang valid, agar dapat memberikan informasi yang valid, jelas dimengerti konsumen dalam membantu memilih diet sehat untuk menjaga kesehatan. Strain probiotik yang teruji secara klinis memiliki legitimasi pelabelan bagi pemasaran. Namun bukan berarti dengan mudahnya mengekstrapolasi cocktail probiotik dengan menggabungkan berbagai strain teruji lalu mencantumkan semua hasil uji klinis tiap strain dalam produk baru tersebut. Manfaat sebagai strain tunggal dan campuran belum tentu sama, diperlukan uji klinis lebih lanjut.

Matriks makanan dari pangan probiotik mengantarkan bakteri probiotik mencapai saluran cerna. Makanan itu sendiri bisa memberikan pengaruh positif ataupun negatif terhadap fungsi bakteri probiotik, mengingat probiotik bersama-sama matriks makanan melalui berbagai rintangan biologis pada saluran cerna. Sifat fisikokimia makanan (lemak, kadar protein, jenis protein, gula, pH), penambahan bahan tambahan makanan tertentu (penyedap, pengental, pemanis, penstabil) maupun bahan fungsional (komponen bioaktif) dalam matriks makanan yang kompleks dapat mempengaruhi kinerja fungsi dan efikasi bakteri probiotik. Titik kritis dalam formulasi pangan probiotik adalah optimalisasi semua variabel sehingga dapat meningkatkan kapasitas fungsi dan efektifitas probiotik, tidak memberikan efek negatif terhadap viabilitas dan fungsi bakteri probiotik sebagai kultur murni itu sendiri.

Parameter utama yang harus dipertimbangkan dalam pengembangan produk pangan fungsional probiotik adalah formulasi yang tepat, merupakan kombinasi antara komposisi bahan baku makanan, teknik pengolahan dan pengawetan, food matrix, aman, dan viabilitas serta fungsi strain probiotik tetap stabil selama pengolahan, distribusi, proses persiapan makanan sebelum dikonsumsi maupun selama penyimpanan, dan disukai konsumen secara sensoris, serta bergizi.

Gambar 61 memperlihatkan berbagai aplikasi bakteri asam laktat dalam industri makanan olahan maupun makanan fungsional.



Gambar 61. Berbagai aplikasi bakteri asam laktat dalam makanan (Sumber Quest International)

## **XII. Faktor Pendorong Pangsa Pasar Pangan Probiotik**

---

Pertumbuhan pasar pangan probiotik merupakan indikasi suksesnya konsep bio-terapi probiotik dalam pencegahan penyakit didukung dengan kemajuan teknologi mikroenkapsulasi yang meningkatkan stabilitas dan daya simpan probiotik, memungkinkan memasarkan probiotik sebagai bahan baku (ingridien) produk makanan yang dapat diaplikasikan dalam pengolahan makanan menggunakan suhu tinggi seperti bakery, coklat dan sosis.

Pasar probiotik di Jepang dan Eropa lebih berkembang ketimbang di Amerika Serikat. Jepang telah memimpin pasar produk probiotik global. Di Jepang probiotik tersedia sebagai makanan dan sebagai obat, budaya mengonsumsi makanan terfermentasi memberikan citra positif terhadap manfaat dan keamanan probiotik di masyarakat Jepang. Kategori “makanan yang diperuntukkan bagi kesehatan tertentu” (FOSHU), yang lebih fleksibel terhadap klaim manfaat kesehatan pada label memfasilitasi boomingnya tingkat penjualan 65 produk probiotik dari 16 jenis probiotik terdaftar di antara 579 produk FOSHU.

Meningkatnya permintaan pangan berbasis probiotik berbahan dasar non-susu seperti kedelai, air kelapa, jus buah, adalah faktor utama yang menstimulir perluasan pasar produk baru pangan probiotik. Pelaku industri pangan merespon dengan memperkenalkan produk-produk baru yang akan menambah nilai portofolio yang ada. Minat dan dapat diterimanya pangan fungsional menjadikan momentum pengembangan pengolahan produk baru, disamping kesiapan teknologi distribusi, tuntutan konsumen dan perubahan sikap sosial, bukti ilmiah manfaat kesehatan, dan mencari peluang baru untuk memberikan nilai tambah produk yang sudah ada dan untuk meningkatkan profit. Perubahan tuntutan konsumen mempengaruhi perilaku belanja. Konsumen berpendidikan dan mampu secara ekonomi, akan

Young J (1998) melaporkan dalam *British Journal of Nutrition*, perkembangan pasar di Eropa terhadap makanan yang mengandung probiotik dan prebiotik, umumnya dengan klaim memperbaiki kesehatan pencernaan, baik kombinasi keduanya maupun masing-masing secara

terpisah. Beberapa contoh produk diantaranya adalah :

1. Symbalance yang diproduksi oleh perusahaan Swiss, yaitu yogurt yang mengandung strain probiotik *Lactobacillus reuterii*, *L. acidophilus* dan *L. casei*.
2. Yakult : basis produksi untuk Eropa dimulai di Belanda pada tahun 1994. dan saat ini berkembang distribusinya ke Belgia, Luxemburg, Inggris Raya dan Jerman selama tahun 1995 dan 1996.
3. Actimel dari Danone Eropa, yang mengandung probiotik *L. casei*
4. Gelifus minuman whey, dari Valio (Finland) yang mengandung *Lactobacillus GG*.

Sementara masih sedikit riset terhadap dosis efektif minimum agar dapat memberikan manfaat fisiologis. Namun demikian Reid dkk (2001) menyarankan, konsumsi per hari sebaiknya lebih dari  $10^{8-10}$  koloni. Sedangkan efektif prebiotik untuk anak-anak adalah sekitar 1 – 3 g per hari dan 5 – 15 g per hari untuk orang dewasa.

Pengembangan produk yang menggunakan bakteri probiotik sebagai ingredient menghasilkan beberapa jenis makanan fungsional baik berupa suplemen makanan, susu formula, maupun snack seperti pada Gambar 62



Butiran kering beku



Susu formula



Coklat probiotik



Wafer probiotik

Gambar 62. Berbagai produk makanan fungsional mengandung probiotik

Kuatnya klaim kesehatan, memang memotivasi konsumen untuk memilih produk, namun sulit menjaring pelanggan setia tanpa

mendapatkan manfaat kesehatan dalam jangka panjang yang didukung hasil uji klinis, disamping sensitivitas harga, posisi pasar, iklan, kondisi pasar lokal dan sikap konsumen. Kualitas makanan fungsional yang prima harus mempunyai citarasa enak, bergizi, memberikan manfaat kesehatan dan tidak mengandung bahan yang memberikan dampak negatif bagi kesehatan seperti tingginya kandungan gula, kolesterol maupun lemak.

### **Pertumbuhan Pasar Probiotik**

Analisa pasar memperkirakan bahwa lebih dari 500 pangan probiotik dalam bentuk makanan dan minuman telah diperkenalkan selama dekade terakhir. Pasar pangan probiotik global diperkirakan bernilai sekitar 15,9 miliar dollar tahun 2008, meningkat menjadi 28,8 milyar dollar tahun 2011 dan diproyeksikan akan mencapai nilai 42 miliar dollar pada tahun 2016, dilaporkan oleh Global Industry Analysts, Inc.

Pasar probiotik di Amerika didominasi oleh suplemen, Eropa dalam bentuk makanan dan minuman dan terus meningkat. Di kawasan Asia Jepang memimpin, dan untuk mengantisipasi kejenuhan pasar, inovasi pangan probiotik berbasis kedelai berkembang. Meskipun Cina lebih lambat mulainya dari Jepang dan Eropa dalam bisnis pangan probiotik, namun minat terhadap suplemen yang tinggi mendongkrak pasar probiotik di Cina, mencapai 5,117 juta dollar di tahun 2011. India mengawali 1% dari industri probiotik global, namun berkembang sangat pesat, berpotensi menjadi pasar probiotik yang kuat dengan tingkat pertumbuhan tahunan 22,6% diperkirakan mencapai 8 juta dollar di tahun 2015.

Menjadi nomor dua pasar probiotik di Asia setelah Jepang, Indonesia didominasi oleh pelaku pasar Yakult, Danone, dan Nestle menggarap pangan probiotik untuk anak-anak. Meningkatnya usia harapan hidup di Indonesia lanjut usia semakin banyak. Saat ini jumlah lansia mencapai 28 juta jiwa, diprediksi tahun 2025 membengkak menjadi 40 jutaan. Bahkan di 2050 jumlah lansia menjadi 71,6 juta jiwa di Indonesia, untuk itu upaya pencegahan terhadap risiko berbagai infeksi penyakit maupun penyakit degeneratif perlu dilakukan, dan masalah gizi dan kesehatan pada anak-anak usia sekolah yang saat ini jumlahnya mencapai 50 juta anak, merupakan tantangan bagi peneliti probiotik untuk mendapatkan bukti ilmiah fungsi probiotik pada lansia maupun anak usia sekolah, khususnya dalam menjaga kesehatan saluran cerna, memperkuat daya tahan tubuh, dan peluang bagi pelaku industri untuk meluncurkan produk-

produk inovatif pangan fungsional berbasis probiotik, dengan mempertimbangkan segi sensoris bagi lansia.

Pasar global probiotik sebagai bahan baku pangan, suplemen dan makanan mencapai senilai \$ 14,9 milyar pada tahun 2007, dan terus meningkat, 15,9 miliar pada tahun 2008, dan 19,6 miliar pada 2013, sebagai dampak positif dari hasil riset ekstensif terhadap strain probiotik baru yang terbukti efektif bagi terapi penyakit gastrointestinal dan system imun. Compound Annual Growth Rate – CAGR adalah laju pertumbuhan keuntungan investasi per tahun selama periode waktu tertentu. CAGR pasar probiotik global mencapai 6,4% selama periode 2010-2015. Aplikasi terapi gen menggunakan bakteri baik di masa depan menjadi sangat menjanjikan dan akan berperan dalam perputaran bisnis makanan dan suplemen.

Eropa dan Jepang CAGR-nya relatif stagnan, sedangkan Asia Pasifik, Amerika Latin, Amerika Utara, Eropa Timur, meningkat 2 hingga 3 kali lipat; Timur Tengah meningkat hingga 8 kali lipat bahkan Australia Asia meningkat 30 kali lipat hingga tahun 2015. Mudah-mudahan setelah mencermati CAGR di Asia Pasifik maupun Asia Australia, pelaku industri pangan fungsional memanfaatkan peluang yang ada agar tercipta lapangan kerja, dan terbentuknya masyarakat yang sehat.

## XIII. Prospek Riset Probiotik

---

Fungsi probiotik dapat dipelajari melalui korelasi genotip dan fenotip. Ketersediaan sekuen genom spesies probiotik sebagai model akan sangat membantu mengukur kemampuan dan sifat strain probiotik.

Sekuen genom dan analisis kultur probiotik sangat penting dalam mengidentifikasi dua kategori utama sistem gen. Pertama yaitu sesuatu yang dibutuhkan untuk bertahan dan beraktivitas dalam kondisi lingkungan yang ekstrim berbeda seperti misalnya antara di dalam bahan pangan dengan saluran pencernaan. Kedua, responsif sistem gen yang bereaksi terhadap berbagai stimulus yang berasal dari makanan maupun saluran pencernaan.

Adesi, produksi bakteriosin, toleransi terhadap asam merupakan faktor yang menstimulir ekspresi sistem gen kritikal menjadi sangat penting dan penentu kemampuan bertahan, aktivitas dan kolonisasi kultur probiotik, dan semuanya ini diharapkan bisa terjadi di dalam tubuh manusia, khususnya dalam saluran pencernaan.

Diawali melalui makanan, probiotik harus bisa bertahan dalam jumlah besar dengan kerusakan seminimal mungkin. Selanjutnya dalam saluran pencernaan, mampu bertahan dalam melalui berbagai kondisi stress seperti asam dan empedu untuk dapat beraktivitas secara fungsional seperti kompetitif dan aktivitas fungsionalnya pada lokasi target *in vivo*. Semuanya ini terjadi di tingkat sistemik sehingga tidak mungkin ditelaah secara empiris.

Diperlukan pendekatan genomik fungsional yang dapat mengidentifikasi sistem gen yang dibutuhkan dan memperjelas sistem ekspresi gen yang dapat diinduksi yang bisa memandu aktivitas dan fungsi penting probiotik melalui kondisi lingkungan kontras tersebut di atas.

Berbagai kondisi stress dan stimulus dikenali untuk menstimulir ekspresi gen terkoordinasi dalam mikroba yang membantu mengarahkan ke kondisi toleran. Kondisi sublethal terhadap asam, panas, dingin, atau garam dan mencapai masa tumbuh stasioner diketahui dapat menstimulir respons genetik pada bakteri yang dapat meningkatkan toleransi dan juga proteksi terhadap kondisi stress lainnya. Sistem gen yang responsif terhadap kondisi stress sedang diidentifikasi pada kultur probiotik dan nantinya dapat dieksploitasi untuk mengatasi maupun meningkatkan



kemampuan bertahan dalam proses pengolahan makanan, selama penyimpanan, maupun dalam lambung dan saluran pencernaan (Walker dan Klaenhammer, 1996).

Akan banyak kesempatan untuk memperbaiki sifat-sifat khas yang saat ini ada, dan mengembangkan sifat-sifat unggul kultur probiotik dengan modifikasi genetik. Target modifikasi dan perbaikan genetik mencakup stimulasi imun dan pengembangan vaksin oral, antimikroba, bakteriosin, sintesis dan produksi vitamin, adesi dan kolonisasi, enzim pencernaan, dan rekayasa metabolik untuk mengubah produk seperti misalnya polisakarida, asam organik, atau menggabungkan probiotik dengan prebiotik yang khusus untuk meningkatkan fungsi probiotik.

Area riset yang menantang dan akan sangat mempengaruhi terapi probiotik dan prebiotik adalah komunikasi sel-sel. Jelas sekali bahwa mikroba berkomunikasi dengan inangnya, dalam hal ini tubuh manusia, dan dengan mikroba lainnya. Mengingat “pesan-pesan” dapat melintas antar spesies bakteri, adalah mungkin bagi bakteri probiotik “membujuk” bakteri patogen untuk tidak menginfeksi tubuh manusia.

Konsep probiotik yang telah berumur 100 tahun akan membutuhkan strategi yang kompleks dan melibatkan riset multidisiplin ilmu, yang merupakan gabungan dari mikrobiologi, ekologi, imunologi, biologi sel, genomik, bioinformatik, ilmu pangan dan kedokteran, agar dapat dibuktikan secara ilmiah paradigma baru bagi probiotik dan prebiotik dalam memelihara kesehatan dan mencegah penyakit. Validitas ilmu pengetahuan tentang probiotik akan terbentuk dengan mengetahui korelasi antara mekanisme dengan efektifitas dan aplikasinya.

## **XIV. Inovasi Pangan Probiotik Dalam Industri**

---

Pangan fungsional telah banyak dipromosikan selama dekade terakhir, dan studi multidimensi hadir untuk dapat digunakan baik teknologi maupun di industri, terhadap strain probiotik yang menonjol (Lourens-Hattingh dan Viljoen 2001). Aplikasi probiotik dalam makanan kebanyakan dalam produk olahan susu seperti yogurt, kefir, dan minuman fermentasi mewakilikategori utama, dan produk yoghurt mendominasi penjualan, yang mewakili 36,6%, dan perkembangan ilmiah yogurt memperlihatkan daya terima yang paling tinggi secara sensoris (Almeida et al., 2008, 2009, Zoellner et al., 2009); disusul oleh keju probiotik dan es krim (Cruz et al., 2009a, 2009b), wafer atau bar bergizi, sereal untuk sarapan, susu formula, dan banyak lainnya.

Berbagai inovasi produk pangan diformulasi dengan penambahan kultur probiotik dengan melibatkan beragam jenis matriks makanan seperti berbagai jenis keju, es krim, puding, susu bubuk, mentega, mayones, jus buah, bahkan bakery, disamping yogurt.

Dalam memproduksi pangan probiotik, matriks pangan, seperti kandungan lemak, jenis protein, karbohidrat dan pH dapat mempengaruhi pertumbuhan dan daya tahap hidup probiotik. Susu dan produk olahannya seperti keju, yogurt, es krim, dan produk olahan susu lainnya, merupakan media yang ideal bagi probiotik untuk mencapai saluran cerna manusia, karena mengandung bahan-bahan fungsional yang mendukung pertumbuhan bakteri probiotik dalam saluran cerna.

Yogurt dengan kandungan lemak tinggi menghambat bakteri probiotik, terutama *B. bifidum* BBI. Penambahan probiotik pada es krim perlu memperhatikan resistensi terhadap oksigen mengingat keberadaan oksigen pada produk es krim, sehingga strain probiotik mikroaerofilik dan anaerobik harus di mikroenkapsulasi agar tetap bertahan hidup pada produk es krim. Frozen yogurt (Froyo) dan es krim memfasilitasi stabilitas jumlah bakteri hidup probiotik karena penyimpanannya pada suhu rendah, dan disukai oleh lintas generasi.

Menurut Euromonitor (2008) di Amerika Utara konsumsi yogurt padat meningkat dari 112 juta dollar pada tahun 2001 menjadi 294 juta dollar

pada tahun 2006. Sementara itu, konsumsi probiotik juga kuat di Eropa. Euromonitor Intl. (2008) melaporkan bahwa antara tahun 2002 dan 2007, di Eropa Barat tumbuh 13% CAGR, dan di Eropa Timur meningkat hampir 18% CAGR.

Pentingnya produk probiotik non susu (sub judul, bold) Produk probiotik non susu menjadi penting di dunia besar karena tren vegetarian dan tingginya prevalensi intoleransi laktosa pada banyak populasi di dunia. Pangan fungsional sangat terkait dengan probiotik, mewakili 33% pangsa pasar, sementara sereal produk mencapai lebih dari 22% (LFI, 2006). Sejumlah 78% penjualan probiotik di dunia saat ini dalam bentuk yoghurt, sedangkan jus buah, makanan penutup, dan produk-produk berbasis sereal menjadi media yang cocok untuk menambahkan probiotik (Cargill, 2009).

Produk susu dan olahannya mempunyai keterbatasan karena memerlukan suhu dingin dan adanya alergen. Bagi yang alergi terhadap susu karena kasein dan whey nya, pengembangan yogurt susu kedelai menjadi solusi. Matriks pangan lainnya adalah buah, sayur, sereal yaitu produk pangan probiotik berbasis *oat*. Menambahkan probiotik pada jus buah memerlukan teknologi mikroenkapsulasi untuk melindungi terhadap kondisi asam jus buah.

Daya terima sensoris, stabilitas fungsi dan viabilitas probiotik, dan harga menjadi pertimbangan penting dalam pengembangan pangan fungsional probiotik non susu.

Mayones, susu kedelai, daging, makanan bayi, es krim, sari buah, sari sayuran telah dikembangkan dengan menambahkan probiotik (Champagne et al., 2005, Homayouni et al., 2008).

*Bifidobacterium* dan bakteri asam laktat, terutama *Lactobacillus*, yang banyak digunakan dalam produksi pangan, banyak digunakan dalam fermentasi sayuran, sosis, dan susu, dalam makanan berbasis buah dan sayuran, seperti wortel, bit, dan seledri (Karovicova et al., 2002), bawang putih (Castro et al., 1998), buah zaitun (Sanchez et al., 2000), jus mentimun (Lu et al., 2001), bawang dan kacang polong (Karovicova et al., 1993), dan sereal (Angelov et al., 2006).

Penambahan probiotik dalam produk non susu merupakan tantangan besar. khususnya terhadap viabilitas probiotik dalam matriks pangan yang tergantung pada faktor-faktor seperti pH, suhu penyimpanan, kadar oksigen, dan keberadaan mikroba lain yang mungkin menjadi pesaing dan penghambat probiotik.

Faktor-faktor seperti aktivitas air, tekanan oksigen, dan suhu menjadi

semakin penting untuk pengembangan produk probiotik non susu.

Penyimpanan pada suhu ruang, yang umum untuk berbagai jenis produk non susu, seperti produk sereal, minuman, permen, dan sebagainya, merupakan tantangan besar terhadap stabilitas probiotik (Matilla-Sandholm et al., 2002).

Menambahkan probiotik pada makanan berbasis buah dan sereal lebih sulit dibandingkan produk berbasis susu, karena bakteri probiotik membutuhkan perlindungan dari kondisi asam pada sari buah.

Teknologi mikroenkapsulasi telah dikembangkan dan berhasil diterapkan menggunakan berbagai matriks untuk melindungi sel bakteri probiotik dari kerusakan yang disebabkan oleh lingkungan eksternal. (Ding dan Shah 2009a, 2009b).

## DAFTAR PUSTAKA

- Adams MR, dan Marteau P, 1995. On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int. J. Food Microbiol.*, 27 : 263 – 264.
- Aguirre M dan Collins K, 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.*, 75 : 95 – 107.
- Alander M, Korpela R, Saxelin M, Vilpponen-Salmela T, Mattila-Sandholm T dan von Wright A, 1997. Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. *Lett. Appl. Microbiol.*, 24, 361 – 364.
- Alander M, Satokari R, Korpela R., Saxelin M, Vilpponen-Salmela T, Mattila-Sandholm dan von Wright AT, 1999. Persistence of Colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG. after oral consumption. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65. 351 – 354.
- Almeida MHB, Zoellner SS, Cruz AG, Moura MRL, Carvalho LMJ, SantAna AS, 2008. Potentially probiotic acai yogurt. *Int J Dairy Technol* 61:178–82.
- Almeida MHB, Cruz AG, Faria JAF, Moura MRL, Carvalho LMJ, Freitas MCJ, 2009. Effect of the acai pulp on the sensorial attributes of probiotic yoghurts. *Int J Prob Preb* 4:41–4.
- Ando T, dan Oi R, 1992. Functions of the Digestive Tract. Di dalam *Functions of Fermented Milk*. Nakazawa, Y dan Hosono, A (Eds). Elsevier Applied Science.
- Angelov A, Gotcheva V, Kuncheva R, Hrstožova T, 2006. Development of a new oat-based probiotic drink. *Int J Food Microbiol* 112:75–80.
- Agerbaek M, Gerdes LU dan Richelse, B, 1995. Hypocholesterolaemic effect of a new fermented milk product in healthy middle-aged men. *European J. of Clin. Nutr.* 39, 346 – 352.
- Akalin AS, S Gonc, and S Duzel. 1997. Influence of yogurt and acidophilus yogurt on serum cholesterol levels in mice. *J. Dairy Sci.* 80:2721-2725.
- Akuzawa R dan Surono IS, 2002. Fermented milks of Asia. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, eds. H. Roginski, J.W. Fuquay, and P.F. Fox, 1045–1048. London: Academic Press Ltd.
- Alander M, Satokari R, Korpela R, Saxelin M, Vilpponen-Salmela T, Mattila-Sandholm T dan von Wright AT, 1999. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain,

- Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 351–354.
- Alm L, 1981. The effect of fermentation on the biological value of milk proteins using rats : a study of Swedish fermented milk products. *Journal of Science Food and Agriculture*, 32, 1247 – 1253.
- Alm L, 1983. The effect of *Lactobacillus acidophilus* administration upon the survival of *Salmonella* in randomly selected human carriers. *Prog. Food Nutr. Sci*, 7, 13 – 17.
- Azria D, 1986. *Mikrobiologi Dalam Pembuatan Dadih Susu Sapi (Microbiology of Cow Milk Dadih)*. Graduate manu. Bogor, Indonesia: Bogor Agricultural University.
- Beachey EH, 1981. Bacterial Adherence: Adhesion-Receptor Interactions Mediating the Attachment of Bacteria to Mucosal Surfaces. *Journal of Infectious Diseases* **143** (3): 325-345.
- Benno Y, Sawada K, Mitsuoka T, 1984. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol Immunol.*, 28:975–86.
- Benno Y. dan Mitsuoka T, 1991. Effect of diet and aging on human fecal microflora. *Bifidobacteria and Microflora*, 10, 89 – 96.
- Benno Y, He F, Hosoda M, Hashimoto H, Kojima T, Yamazaki K, Iino H, Mykkanen H, dan Salminen S, 1996. Effects on *Lactobacillus* GG yogurt on human intestinal microecology in Japanese subjects. *Nutr. Today.*, 31, 9S –11S
- Bibiloni R, Pérez PF and De Antoni GL, 1999. Will a High Adhering Capacity in a Probiotic Strain Guarantee Exclusion of Pathogens from Intestinal Epithelia? *Anaerobe* **5** (5): 519-524.
- Blaser MJ, 1996. The Bacteria behind Ulcers. *Scientific American*. 92 – 97.
- Bloksma N, de Heer E, van Dijk M and Willers M, 1979. Adjuvanicity of Lactobacilli I Differential Effects of Viable and Killed Cells. *Clin Exp Immunol* **37**: 267-375.
- Bodana AR dan Rao D. R, 1990. Antimutagenic activity in milk fermented by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Dairy Sc.*, 73, 3379.
- Boersma W, Shaw M dan Claassen E, 2000. Probiotic bacteria as live oral vaccines. *Lactobacillus* as the versatile delivery vehicle. In *Probiotics 3. Immunomodulation by the Gut Microflora and*

- Probiotics. Fuller, R. dan Perdigon, G. (Eds.), pp 234–270. Dordrecht : Kluwer Academic.
- Boris S, Suarez JE dan Barbes C, 1997. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. *Journal of Applied Microbiology* 83(4): 413–420.
- Brahmantya H, 2013. *Effect of Lactobacillus plantarum IS-10506 Supplementation on Changes of Serum T Cell CD4+ Cells, Rasio T Cells CD4+/CD8+ and secretory IgA Feses Children Treated with Antiretroviral (ARV)*. Pediatric dissertation. Surabaya, Indonesia: Airlangga University.
- Burwen SJ, Schmucker DL dan Jones AL, 1992. Hepatic transport systems regulating pHi, cell volume and bile secretion, *Ann. Rev. Physiol.*, 54, 415– 438.
- Campbell N, Yio X, So L, Li Y dan Mayer L, 1999. The intestinal epithelial cells : Processing and presentation of antigen to the mucosal immune system. *Immunol. Rev.* 172, 315 – 321.
- Cani PD, Delzenne NM, 2009. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm* 2009;15:1546-58.
- Canzi E, Guglielmetti S, Mora D, Tamagnini I dan Parini C, 2005. Conditions affecting cell surface properties of human intestinal bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 88: 207–219.
- Cargill., 2009. Cargill beverage concepts will address consumer demands for health, taste and texture at IFT 2008. Available from: <http://www.cargill.com/news-center/news-releases/2008/NA3007612.jsp>. Accessed Jul 20, 2009.
- Catur Adi A, 2011. *Efficacy of Enriched Fish Isolate Protein and Powder of Cat Fish (Clarias garlepinus), Biscuit Complementary Feeding and Microencapsulated Probiotic Enterococcus faecium IS-27526 on Low Bodyweight Young Children (2–5 Years)*. PhD dissertation. Bogor, Indonesia: Bogor Agricultural University.
- Champagne CP, Roy D, Gardner N, 2005. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45:61–84.
- Chandan RC dan Shahani KM, 1995. Other fermented dairy products. In: *Biotechnology: Enzymes, Biomass, Food and Feed*, Vol. 9., eds. H-J Rehm and G Reed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Charalampopoulos D, Wang R, Pandiella SS and Webb C, 2002.

- Application of Cereals and Cereal Components in Functional Foods: A Review. *Intl J Food Microbiol* **79** (1-2): 131-141.
- Charteris QP, Kelly PM, Morelli L dan Collins JK, 2002. edible table (bio) spread containing potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species. *Interl. J. of Dairy Technol.*, 55 (1), 44–56.
- Castro A, Montano A, Sanchez AH, Rejano L, 1998. Lactic acid fermentation and storage of blanched garlic. *Int J Food Microbiol* 39:205–11.
- Chauvière G Coconnier M-H, Kerneis S, Darfeuille-Michaud A, Joly B dan Servin AL, 1992a. Competitive exclusion of diarrhegenic *Escherichia coli* (ETEC ) from human enterocyte-like Caco-2 cells by heat-killed *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Letters* 91, 213 – 218.
- Chauvière G Coconnier, MH Kerneis S, Fourniat J dan Servin AL, 1992b. Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *J. of Gen. Microbiol.*, 138, 1689 – 1696.
- Christensen DP dan Hutkins RW, 1992. Collaps of the proton motive force in *Lysteria monocytogenes* caused by a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 : 3312 – 3315.
- Coconnier M-H, Bernet M-F, Chauviere G, dan Servin AL, 1993a. Adhering heat killed human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB, inhibits the process of phatogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells. *J. Diarrhoeal Dis. Res.*, 11 : 235 – 242.
- Coconnier M-H, Bernet M-F, Kerneis S, Chauviere G, Fourniat J dan Servin AL, 1993b. Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiol. Lett.*, 110 : 299 – 306.
- Collado M, Gueimonde M, Hernandez M, Sanz Y dan Salmine, S, 2005. Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and its role in enteropathogen exclusion. *Journal of Food Protection* 68: 2672–2678.
- Collado MC, Surono IS, Meriluoto J dan Salminen S, 2007a. Cell surface properties of indigenous dadih lactic acid bacteria and their



- interactions with pathogens. *Journal of Food Science* 72: M89–M93.
- Collado MC, Surono IS, Meriluoto J dan Salminen S, 2007b. Potential probiotic characteristics of *Lactobacillus* and *Enterococcus* strains isolated from traditional dadih fermented milk against pathogen intestinal colonization. *Journal of Food Protection* 70: 700–705.
- Collins MD, Rodrigues U, Ash C, Aguirre M, Farrow JAE, Martinezmurcia A, Phillips BA, Williams AM dan Wallbanks S, 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S r RNA, *FEMS Microbiol. Lett.*, 77 : 5 – 12.
- Collins JK, Thornton G dan Sullivan GO, 1998. Selection of probiotic strains for human application. *International Dairy Journal* 8: 487–490.
- Cruz AG, Antunes AEC, Pilleggi ALOPS, Faria JAF, Saad SMI, 2009a. Ice cream as probiotic food carrier. *Food Res Int* 42:1233–9.
- Cruz AG, Buriti FCA, Souza CHB, Faria JAF, Saad SMI, 2009b. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends Food Sci Technol* 20:344–54
- Damhoeri, A, Hosono A, Itoh T, Matsuyama A, 1985. *Agric. Biol Chem* 49, 1519.
- Davidson CM dan F Cronin, 1973. Medium for the selective enumeration of lactic acid bacteria from foods. *Appl. Microbiol.* **26** : 439 – 440.
- Davidson BE, Kordias N, Baseggio N, Lim A, Dobos M, dan Hillier AJ, 1995. Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 5, 763 – 784.
- Davidson RH, Duncan SE, Hackney CR, Eigel WN dan Boling JW, 2000. Probiotic Culture Survival and Implications in Fermented Frozen Yogurt Characteristics. *J. Dairy Sci.*, 83, 666-673
- de Man JC, M Rogosa, dan ME. Sharpe, 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, **23** : 130 – 135.
- De Smet I, van Hoorde L, De Saeyer N, vande Woestyne M, Verstraete W, 1994. *In vitro* study of bile-salt hydrolase (BSH) activity of BSH isogenic *Lactobacillus plantarum* 80 strains and estimation of cholesterol lowering through enhanced BSH activity. *Micro. Ecol. Health Disease* 7, 315 – 329.

- Deeth HC dan Tamime AY, 1981. Yogurt : Nutritive and therapeutic aspects. *J. Fd Prod.*, 44, 78 – 86.
- Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M dan Palenzona D, 2000. Adhesion, auto-aggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology* 31: 438–442.
- Dellaglio F, 1988. Starters for fermented milks.3. Thermophilic starters. *International Dairy Federation Bulletin* 227 : 27 – 34.
- Delves-Broughton J, 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 44 (11).
- Dharmawan J, Surono IS dan YK Lee, 2006. Adhesion properties of indigenous dadih lactic acid bacteria on human intestinal mucosal surface. *Asian–Australasian Journal of Animal Sciences* 19: 751–755.
- Ding WK, Shah NP, 2009a. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *J Food Sci* 74:100–7.
- Ding WK, Shah NP, 2009b. An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. *J Food Sci* 74:53–61.
- Doco T, Wieruszkeski JM. Fournet B, Carcano D. Ramos P dan Loones A, 1990. Structure of an exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Carbohydrate Research* 198, 313 – 321.
- Dole R dan Peto R, 1981. The causes of cancer : quantitative estimate of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer, Inst.* 66, 1195 – 1308.
- Dong MY, Chang TW dan Gorbach SL, 1987. Effects of feeding *Lactobacillus* GG on Lethal irradiation in mice. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 7, 1 – 7.
- Donohue DC dan Salminen S, 1996. Safety of probiotic bacteria. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* : 25 – 28.
- Donohue D, Salminen S, Marteau P, 1998. Safety of probiotic bacteria. In Salminen, S., von Wright, A. (Eds)., *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker, New York, pp 369 – 384.
- Drago L, Gismondo MR, Lombardi A, de Haën C and Gozzini L, 1997. Inhibition of *In Vitro* Growth of Enteropathogens by New *Lactobacillus* Isolates of Human Intestinal Origin. *FEMS Microbiol Lett* **153** (2): 455-463.

- Drasar BS, Shiner M dan McLeod GM, 1969. Studies in the intestinal flora I. The bacterial flora of the gastrointestinal tract in healthy and achlorhydric person. *Gastroenterol.*, 56, 71 – 79.
- Drasar BS dan Barrow PA, 1985. *Intestinal Microbiology*, Washington. D.C., American Society for Microbiology.
- du Toit M, Franz CMAP, Dicks LMT, Schillinger U, Haberer P, Warlies B, Ahrens F, dan Holzapfel WH, 1998. Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *Int. J. of Food Microbiol.*, 40, 92 – 104.
- Dwiastuti S, 2013. *Changes of Blood LPS Level of Children Living with HIV and Treated with Antiretroviral (ARV) Therapy After Supplementation with Probiotic Lactobacillus plantarum IS-10506*. Pediatric dissertation. Surabaya, Indonesia: Airlangga University.
- Elliot SE, Buret A, McKnight W, Miller MJS dan Wallace JL, 1998. Bacteria rapidly colonize and modulate healing of gastric ulcers in rats. *Am. J. of Physiology*, 275, 6425 – 6432.
- Endaryanto A, 2006. *Immunoegulatory of Th1, Treg and Th2 Through TLR2 and TLR4 by LGG and L. plantarum IS-10506 in Suppressing Allergic Reaction*. PhD dissertation. Surabaya, Indonesia: Airlangga University.
- Erickson KL dan Hubbard NE, 2000. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J. Nutr.* 130 (Suppl), 403S – 409S.
- Euromonitor, 2008. Soy yoghurts as carrier of probiotic bacteria. Euromonitor international, London. Functional Times, Food Business.
- Fernandes CF, Chandan RC dan Shahani KM, 1992. Fermented dairy products and health. In: *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*, ed. B.J.B. Wood, 297–339. London: Elsevier Applied Science.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization, 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *World Health Organization*.

- Food and Health Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization, 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Working group rep. Washington DC.
- Fuller R, 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66, 365 – 378.
- Fundora O, González ME, Lezcano O, Montejo A, Pompa N, dan Enriquez AV, 2001. A comparative study of milk composition and stability of Murrah river buffaloes and Holstein cows grazing star grass. *Cuban Journal of Agricultural Science* 35: 219–222.
- Gallagher CR, Molleson AL dan Caldwell JH, 1974. Lactose intolerance and fermentation dairy products. *J. Am., Diet Assoc.*, 65, 418 – 419.
- Gandhi DN dan Natrajan AM. *Preparation of a Good Quality Dahi (Curd) and Probiotic Milk Products.* <http://s3-ap-southeast.amazonaws.com/jigsydney/general/PDF/49212~Dahi-Making.pdf>. Accessed on May 29, 2014.
- Garbutt J, 1997. Food-Borne Disease and Food Poisoning. In: Garbutt J. *Essentials of Food Microbiology*. London; Sydney; Auckland: Arnold. p135-181.
- Gassem MA dan Frank JF, 1991. Physical properties of yogurt made from milk treated with proteolytic enzymes. *Journal of Dairy Science* 74: 1503–1511.
- Gasser F, 1994. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bulletin del'Institute Pasteur* 92, 45 – 67.
- Gibson GR dan Roberfroid MB, 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota : introducing the concept of prebiotics. *J. of Nutrition* 125, 1401 – 1412.
- Gill H, Rutherford K, Prasad J dan Gopal PK, 2000. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus acidophilus* HN0017, and *Bifidobacterium lactis* HN019. *British J. of Nutrition*, 83, 167 – 176.
- Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML dan Gopal PK, 2001. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am J. Clin. Nutr.*, 74, 833 –839.
- Gilliland SE dan Kim HS, 1984. Effect of viable starter culture bacteria in yogurt on lactose utilization in humans. *J. Dairy Sci.*, 67, 1 - 6.

- Gilliland SE dan Lara RC, 1988. Influence of Storage at Freezing and Subsequent Refrigeration Temperatures on b-galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. And Environ. Microbiol.*, 54, 4, 898 – 902.
- Goldin BR dan Gorbach SL, 1980. Effect of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplements on 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 64, 263-265.
- Gopal PK, Sullivan PA dan Smart JB, 2001. Utilisation of galactooligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR20. *Internl. Dairy Journal*, 11, 19 – 25.
- Greene JD dan Klaenhammer TR, 1994. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol*; 60:4487–94.
- Grunewald KK, 1982. Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J. of Food Sci.*, 47, 2078 – 2079.
- Gruter M, Leeflang BR, Kuiper J, Kamerlang JP, Vleighthort JFG, 1992. Structure of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H414 grown in defined medium or skimmed milk. *Carbohydrate Res.* 231, 273 – 291.
- Harada K-I, 1996. Chemistry and detection of microcystins. In: *Toxic Microcystis*, eds. Watanabe MF, Harada KI, Carmichael WW dan Fujiki H, 103–148. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Havenaar R, ten Brink B dan Huis in't Veld JHJ, 1992. Selection of strains for probiotic use. In: *Probiotics: The Scientific Basis*, ed. Fuller R, 209–224. London: Chapman & Hall.
- Heenan CN, Adams MC, Hosken RW and Fleet GH, 2002. Growth Medium for Culturing Probiotic Bacteria for Applications in Vegetarian Food Products. *Lebensm Wiss u Technol* **35**: 171-176.
- Helander IM, von Wright A and Mattila-Sandholm TM, 1997. Potential of Lactic Acid Bacteria and Novel Antimicrobials against Gram-Negative Bacteria. *Trends Food Sci Technol* **8** (5): 146-150.
- Heller KJ, 2001. probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical nutrition* 73 (supplement) : 374S– 379S.

- Hickey MW, Hillier AJ, Jago GR, 1983. Enzymatic activities associated with lactobacilli in dairy products. *Aust. J. dairy Technol.*, 38, 154 – 157.
- Hill C, 1993. Bacteriophage and bacterial resistance in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12, 87 – 108.
- Hill MJ. (Ed.), 1995. Role of gut bacteria in human toxicology and pharmacology. Taylor and Francis, London.
- Hosoda M, Hashimoto H, Morita H, Chiba M, dan Hosono A, 1992. Studies on antimutagenic effect of milk cultured with lactic acid bacteria on the Trp-P-2 induced mutagenicity to TA 98 strain of *Salmonella typhimurium*. *J. Dairy Res.*, 59, 543.
- Hosoda M, Hashimoto H, He F, Morita H dan Hosono A, 1996. Effect of Administration of Milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* LA-2 on Fecal Mutagenicity and Microflora in the Human Intestine. *J. Dairy Sci.*, 79, 745 – 749.
- Hosono A, Kashina T dan Kada T, 1986a. Antimutagenic properties of lactic acid-cultured milk on chemical and fecal mutagens. *J. Dairy Sci.*, 69, 2237 – 2242.
- Hosono A, Sagae S dan Tokita F, 1986b. Desmutagenic effect of cultured milk on chemically induced mutagenesis in *Escherichia coli* B/r WP2 trp<sup>hrc</sup>. *Milchwissenschaft*, 41, 142 – 145.
- Hosono A, Sashikanth KN dan Otani H, 1988. Antimutagenic activity of whole casein on the pepper induced mutagenicity of Streptomycin-dependent strain SD 510 of *Salmonella typhimurium* TA 98. *J. Dairy Res.* 55, 435 – 442.
- Hosono A, Wardojo R dan Otani H, 1989. Microbial Flora in Dadih, a Traditional Fermented Milk in Indonesia. *Lebensm Wiss Technol* 22 (1): 20-24.
- Hosono A, Wardojo R dan Otani H, 1990. Binding of Amino Acid Pyrolyzates by Lactic Acid Bacteria Isolated from 'Dadih'. *Lebensm.-Wiss.u-Technol.*, 23, 149 – 153.
- Hosono A dan Tono-oka T, 1995. Binding of cholesterol with Lactic acid bacterial cells. *Milchwissenschaft*, 50 – 556 – 560.
- Homayouni A, Azizi A, Ehsani MR, Razavi SH, Yarmand MS, 2008. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chem* 11:50–5.

- Hudault S, Liévin V, Bernet-Camard M-F and Servin AL, 1997. Antagonistic Activity Exerted *In Vitro* and *In Vivo* by *Lactobacillus casei* (Strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 Infection. *Appl Environ Microbiol* **63** (2): 513-518.
- IDF, 1992. General Standard of Identity for Fermented Milks. Standard mo 163. Brussels : International Dairy Federation.
- IDF, 1997. Dairy Starter Cultures of Lactic Acid Bacteria (LAB) Standard of Identity. IDF Bulletin 149A.
- IDF, 2000. The World Dairy Situation, pp 45 – 53. Bulletin no 355. Brussels
- Imai K, Tekeuchi M, Sakane T and Ganjar I, 1987. Bacterial flora in Dadih. *IFO Research Communications* 13: 13–16.
- Indian Standard Institution, 1980. *Specification of Dahi: IS: 9617*. New Delhi, India: Bureau of Indian Standards. International Dairy Federation.
- Isolauri E, Arvola T, Sütas Y, Salminen ., 2000. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy*, 30: 1605-1610.
- Isolauri E, 2001a. Probiotics in human disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73 (suppl), 1142S – 1146S.
- Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S, 2001b. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nut.*, 73: S444 – S4450.
- Isolauri E, Rautava S, Kalliomaki M, Kirjavainen P, Salminen S, 2002. Role of probiotics in food hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.*, 2:263-71.
- Jack RW, Tagg JR dan Ray B. 1994. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, 59 : 171 – 200.
- Jay JM, 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Env. Microbiol.*, 44, 525 – 532.
- Jimenez-Diaz R, Rios-Sanchez RM, Desmazeaud M, Ruiz-Barba JL dan Piard JC, 1993. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Enviro. Microbiol*, 59, 1416 – 1424.
- Kadir S, 2013. *The Effect of Probiotic Lactobacillus plantarum IS-10506 Administration on Immune Response (Total CD4+, IL-2, IL-6, IgA) of Elderly in Rodent Model*. PhD dissertation. Surabaya,

Indonesia: Post Graduate Faculty of Public Health, Airlangga University.

- Kandler O dan Weiss N, 1986. Regular, non sporing Gram-positive rods, in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2 (P.H.A. sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, dan J.G. Holts, eds), Williams dan Wilkins, Baltimore, pp. 1208 – 1234
- Kahala M, Pakkala E dan Pihlanto-Leppala A, 1993. Peptides in fermented Finnish products. *Agric. Sci. Finland.*, 2, 379 – 385.
- Karita M, Li Q, Cantero D, dan Okita K, 1994. Establishment of a Small Animal model for Human *Helicobacter pylori* Infection Using Germ-Free Mouse. *American J. of Gastroenterol.*, 89. 2. 208 – 213.
- Karovicova J, Polonsky J, Drdak M, Simko P, Vollek V, 1993. Capillary isotachopheresis of organic acids produced by selected microorganisms during acid lactic fermentation. *J Chromat* 638:241–6.
- Karovicova J, Kohajdovaz Z, Hybenova E, Drdak M, 2002. Using of multivariate analysis for evaluation of lactic acid fermented cabbage juices. *Chem Papers* 56:267–74.
- Kaur IP, Chopra K and Saini A, 2002. Probiotics: Potential Pharmaceutical Applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **15** (1): 1-9.
- Kato I, Yokokura T dan Mutai M, 1984. Augmentation of mouse natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* and its surface antigens. *Microbiology and Immunology*, 28, 209 – 217.
- Kawase M dan Hosono A, 1995. Binding stability of lactic acid bacterial cells with mutagenic thryptophan pyrolysates. *Anim. sic. technol. (Jpn)*. 66, 430 – 435.
- Kawase M. Hashimoto H, Hosoda M, Morita H dan Hosono A, 2000. Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. *J. Dairy ci.* 83:255-263.
- Kawase M, Hashimoto H, Hosoda M, Morita H dan Hosono A, 2001. Effect of fermented milk with *Streptococcus thermophilus* TMC1543 on serum lipid levels induced by high cholesterol diet in adult subjects. *Milchwissenschaft* 56, 496 – 499.



- Kelly D, Conway S, Aminov R, 2005. Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. *Trends Immunol* 2005;26:326-33.
- Kelly AL dan Fox PF, 2006. Indigenous enzymes in milk: A synopsis of future research requirements. *International Dairy Journal* 16: 707–715.
- Kim HS dan Gilliland SE, 1983. Lactic acid bacteria as dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in human. *J. Dairy Sci.*, 66, 959.
- Kirjavainen PV, Ouweland AC, Isolauri E dan Salminen S, 1998. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol. Lett.*, 67, 185 – 189.
- Klaenhammer TR, Ahn C, Fremaux C dan Milton K, 1992. Molecular properties of *Lactobacillus bacteriocins*, in *Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics* (R. James, C. Lazdunski, dan F. Pattus, eds), Springer-Verlag, Berlin, pp 37 – 58.
- Klaenhammer TR, 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*, 12 : 39 – 86.
- Klaasen CD dan Watkins JB, 1984. Mechanisms of bile formation, hepatic uptake and biliary secretion, *Pharmacol. Rev.*, 36, 2 - 67.
- Klaver FM dan van der Meer R, 1993. The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1120 – 1124.
- Klein G Pack, A Bonaparte C dan Reuter G, 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *int. J. Food Microbiol.*, 41, 103 – 125.
- Kurmann JA, Rasic JLj dan Kroger M, 1992. *Encyclopedia of Fermented Fresh Milk Products*. New York : Van Nostrand Reinhold.
- Lahti K, Rapala J, Fardag M, Maija N, dan Sivonen K, 1997. Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR, in particulate material and dissolved in lake water. *Water Research* 31: 1005–1012.
- Lang F dan Lang A, 1973. A study of kumys manufacture as a potential new outlet for milk. *Milk Industry* 67 : 22 – 25.
- Law J dan Haandrikman A, 1997. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 7: 1–11.
- Lee YK dan Salminen S., 1995. The coming age of probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 6. 241- 245.

- Lee YK dan Salminen S, 1995. The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 241 – 245.
- Lee YK, Nomoto K, Salminen S dan Gorbach SL, 1999. *Handbook of probiotics*. New York, John Wiley, 197.
- Lee YK, Lim CY, Teng WL, Ouwehand AC, Toumola EM dan Salminen S, 2000. Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3692 – 3697.
- Lee YK, Kim YP, Ouwehand AC dan Salminen S, 2003. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *J of Med. Microbiol.* 52, 925 – 930.
- Lerebours EN dan CN, Lavoine A, Hellot MF, antoine JM dan Colin R, 1989. Yogurt and frmented-then-pasteurised milk: effects of short term and long-term ingestion on lactose absorption and mucosal lactase activity in lactase deficient subjects. *Amer. J. of Clin. Nutr.* 49, 823 – 827.
- Lidbeck A, Gustafssn JA dan Nord CE, 1987. Impact of *Lactobacillus acidophilus* supplements on the human oropharyngeal and intestinal microflora. *Scand. J. Infect. Dis.*, 19, 531 – 537.
- Lidbeck A, Overvik E, Rafter J, Nord CE dan Gustafsson JA, 1992. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplements on mutagen excretion in faeces and urine in humans. *Microbiol. Ecol. Health Dis.*, 5, 59 – 67.
- Lily DM dan Stillwell RH, 1965. Probiotics : growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747 – 748.
- Lindmark-Månsson H, Fondén R dan Pettersson H-E, 2003. Composition of Swedish dairy milk. *International Dairy Journal* 13: 409–425.
- Lourens-Hattingh A, Viljoen BC, 2001. Yoghurt as probiotic carrier food. *Int Dairy J* 11:1–17.
- Lu Z, Fleming HP, Feetrees RF, 2001. Differential glucose and fructose utilization during cucumber juice fermentation. *J Food Sci* 66:162–6.
- Mann GV, 1977. A factor in yogurt which lowers cholesterol in man. *Atherosclerosis* 28, 335 – 340.
- Marshall BJ dan Warren JR, 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1, 1311 – 1315.

- Marshall VM, Col, WM dan Mabbitt LA, 1982. Fermentation of specially formulated milk with single strain of Bifidobacteria. *Int. J. of Dairy Technol.*, 35, 143 – 144.
- Marshall VM, Cole WM dan Vega JR, 1982. A yogurt-like products made by fermenting ultra filtered milk containing elevated whey proteins with lactoac acid. *J. of Dairy Res.*, 49, 665 – 670.
- Marshall VME, 1986. The microflora and production of fermented milks. In *Progress in Industrial Microbiol. Microorganisms in the Production of Food*, vol 23. pp. 1 – 44, Adam, M.R. (Ed)., Elsevier Science, Amsterdam.
- Marshall VME, 1987. Fermented milk and their future trends; I. Microbiological aspects. *J. of Dairy Res.*, 54, 559 – 574.
- Marteau P, Gerhardt MF, Myara A, Bouvier E, Trivin F, Rambaud JC, 1995. Bifidobacteria and lactobacilli ingested in fermented dairy products can metabolize bile salts in the human small intestine. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 8, 151 – 157.
- Marteau P, de Verse M, Cellier CJ, dan Schrezenmeir J, 2001. Protection from Gastrointestinal disease with the use of probiotics. *Am. J. Clin. Utr.* 73 (Suppl), 430S – 436S.
- Marteau P, Seksik P dan Raymond J, 2002. probiotics and health : New facts and ideas. *Current Opinion in Biotech* 13, 486 – 489.
- Matsumoto M, Ohnishi H dan Benno Y, 2001a. Impact of LKM512 yogurt on improvement of intestinal environment of the elderly. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 31, 3, pp 181 – 186, Elsevier Science, B. V.
- Matsumoto M, Tani H, Ono H, Ohishi H and Benno Y, 2001b. Adhesive Property of *Bifidobacterium lactis* LKM512 and Predominant Bacteria of Intestinal Microflora to Human Intestinal Mucin. *Curr Microbiol* 44 (3): 212-215.
- Matsumoto M, Ohishi H, Kakizoe K dan Benno Y, 2004. Faecal Microbiota and Secretory Immunoglobulin A levels in Adult Patients with Atopic Dermatitis. *Microbiol. Ecol. in Health and Disease*, 16, 13 – 17.
- Mattila-Sandholm T, Matto J, dan Sarela M, 1999. Lactic acid bacteria with health claims,-interaction and interference with gastrointestinal flora. *Int. Dairy J.*, 9, 25 – 35.

- Matilla-Sandholm T, Myllarinen P, Crittenden R, Mogensen G, Fonden R, Saarela M. 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *Int Dairy J* 12:173–82.
- McDonald LC, RF McFeeters, MA Daeschel dan HP Fleming, 1987. A Differential Medium for the Enumeration of Homofermentative and Heterofermentative Lactic Acid Bacteria. *Appl and Environ, Microbiology*, pp 1382 – 1384, American Society for Microbiology.
- McDonough FE, Hitchins AD, Wong NP, Wells P. dan Bodwell CE, 1987. Modification of sweet acidophilus milk to improve utilization by lactose- intolerant persons. *Am. J. Clin. Nutr.*, 45, 570 – 574.
- McKay LL, 1983. Functional properties of plasmids in lactic streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49 : 259.
- Meile L, Ludwig W, Rueger U, Gut C, Kaufmann P, Dasen G, Wenger S dan Teuber M, 1997. *Bifidobacterium lactis* sp nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *System. Appl. Microbiol.*, 20 (1), 57 – 64.
- Metchnikoff E, 1907. The prolongation of Life. Optimistic studies, William Heineman, London, 69 – 114.
- Mitsuoka T (ed), 1989. A Profile of Intestinal Bacteria. Yakult Honsha Co., Ltd., Japan.
- Mitsuoka T, 1992. The human gastrointestinal tract. In *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Vol. 1. Wood, B. J. B (Ed), Elsevier Applied Science Publisher, London
- Mitsuoka T, 1992. Intestinal flora and aging. *Nutr. Rev.*, 50: 438 – 46.
- Nakazawa, Y. dan Hosono A. (Eds), 1992. *Functions of Fermented Milk. Challenges for the Health Sciences*. Elsevier Applied Science.
- Newcomer A dan McGil, D, 1984. Clinical importance of lactose deficiency. *New England J. Med.*, 310, 42 – 46.
- Nes IF, Diep DB, Havarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V dan Holo H, 1996. Biosynthesis bacteriocins in lactic acid bacteria. *A.v. Leeuwenhoek*, 70 : 113 – 128.
- Noh DO dan Gilliland SE, 1993. Influence of bile on cellular integrity and  $\beta$ -galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*. *J. of Dairy Sci.*, 76 (5), 1253 – 1259.
- Noh DO dan Gilliland SE, 1994. Influence of bile on  $\beta$ -galactosidase activity of component species of yogurt starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 77, 3532 – 3537.

- Noh DO, Kim SH dan Gilliland SE, 1997. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J. Dairy Sci.*, 82, 3107 – 3113.
- Nybohm SM, Collado MC, Surono IS, Salminen SJ dan Meriluoto JA, 2008. Effect of glucose in removal of microcystin-LR by viable commercial probiotic strains and strains isolated from dadih fermented milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 56: 3714–20.
- Ofek I dan Doyle, 1994. Principles of bacterial adhesions. In: Ofek I and Doyle R (eds). *Bacterial Adhesions to Cells and Tissues*. New York: Chapman and Hall Inc. pp 1-16.
- Ogden K dan Waites MJ, 1988. The action of nisin on beer spoilage lactic acid bacteria. *J. Int. Brew.* 92, 463 – 467.
- Ono J, Goto T dan Okonogi S, 1992. Metabolism and Propagation Rates in Lactic Acid Bacteria. In *Functions of Fermented Milk*. Nakazawa and Hosono (Eds), 1992
- Ouwehand AC dan Conway PL, 1996. Purification and characterization of a component produced by *Lactobacillus fermentum* that inhibits the adhesion of K88 expressing *Escherichia coli* to porcine ileal mucus., *J. Appl. Bacteriol.*, 80 : 311 – 318.
- Ouwehand AC, Kirhavaubebm PV, Shortt C. dan Salminen S, 1999. Probiotics : mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.* 9 : 43 – 52.
- Ouwehand AC, Isolauri E, Kirjavainen PV dan Salminen S, 1999. Adhesion of four *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups. *FEMS Microbiology Letter* 172: 61–64.
- Ouwehand AC, Tolkkö S, dan Salminen S, 2000. The mucus binding of *Bifidobacterium lactis* Bb12 is increased in the presence of *Lactobacillus* GG and *L. delbrueckii ssp bulgaricus*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 30, 10 – 13.
- Ouwehand AC, Tolkkö S, Kulmala J, Salminen S dan Salminen E, 2000. Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiol.*, 31, 82 – 86.
- Ouwehand AC, Tuomola EM, Tölkkö S dan Salminen SJ, 2001a. Assessment of Adhesion Properties of Novel Probiotic Strains to Human Intestinal Mucus. *Int J Food Microbiol* 64: 119-126.
- Ouwehand AC, Tuomola EM, Lee YK and Salminen SJ, 2001b. Microbial

- Interactions to Intestinal Mucosal Models. *Method Enzymol* **337**: 200-212.
- Ouwehand AC, Tölkö S and Salminen SJ, 2001c. The Effect of Digestive Enzymes on the Adhesion of Probiotic Bacteria *In Vitro*. *J Food Sci* **66** (6): 856-859.
- Ouwehand AC, Salminen SJ dan Isolauri E, 2002. Probiotics: An Overview of Beneficial Effects. *Antonie van Leeuwenhoek* **82** (1-4): 279-289.
- Ouwehand AC, Salminen S, Tolkkö S, Roberts P, Ovaska J dan Salminen E, 2002. Resected human colonic tissue: New model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **9**: 184–186.
- Pato U, Surono IS, Koesnandar dan Hosono A, 2004. Hypocholesterolemic effect of indigenous lactic acid bacteria by deconjugation of bile salts. *Asian–Australasian Journal of Animal Sciences* **17**: 1741–1745.
- Pederson C, 1979. *Microbiology of Food Fermentations*, 2<sup>nd</sup> Edn, pp 1 - 29, Connecticut AVI Publishers.
- Perdigo, G, Nader de Macias ME, Alvarez S, Medici M, Oliver G, dan Pesce de Ruiz- Holgado A, 1986. Immunopotentiating activity of lactic bacteria administered by oral route. Favourable effect in infantile diarrheas, *Medicine (B. Aires)*, **46** : 751.
- Perdigo G, Mecii, M, Bibos Bonet de Jurrat ME, Valvede de Nidguer M dan Pesce de Ruiz A, 1993. Immunomodulating effects of lactic acid bacteria on mucosal and tumoral immunity. *Int. J. Immunotherapy*, **9**, 29.
- Perdigo G, Fuller R. dan Raya R, 2001. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Curr. Iss. Intest. Microbiol.*, **2**, 27 – 42.
- Perdigo G, Galdenano CM, Valdez JC dan Medici M, 2002. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *European J. of Clinical Nutr.* **56**, Suppl 4, 521 – 526.
- Radhiah S, 2013. Changes on Immune Response TH1, TH2, TREG DAN TH17 of Children Living with HIV Supplemented with *Probiotic Lactobacillus plantarum* IS-10506. Pediatric dissertation. Surabaya, Indonesia: Airlangga University.
- Ranuh Gunadi Reza IGM, 2008. Effect of *Lactobacillus plantarum* IS-10506 and IS-20506 on Repairment of Brush Border Damage

- Induced by LPS *E. coli* by Protein Expression of Brush, Border Galectin-4, Myosin-1a, Occluding Dan ZO-1. PhD dissertation. Surabaya, Indonesia: Airlangga University.
- Rasic J.Lj dan Kurmann JA, 1978. *Yogurt Scientific Grounds, Technology, manufacture and Preparations*. Technical Dairy Publishing House, Vanlose, Copenhagen, Denmark.
- Ray B, 1992. Bacteriocins of starter culture bacteria as food biopreservatives. In *Food biopreservatives of microbial origin*, Ray, B. dan Daeschel, M.A. (eds). CRC Press. Boca Raton, FL., 177 - 205.
- Reddy GV, Shahani KM, Friend BA. dan Chanda.RC, 1983. Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. III. Production and partial purification of bulgarican from *Lactobacillus bulgaricus*. *Cult. Dairy Prod. J.* 18, 15 – 19.
- Reid G, Cook RL dan Bruce.AW, 1987. Examination of strains of lactobacilli for propertiesthat may influence bacterial interference in the urinary tract. *J. of Urology*, 138, 330 – 335.
- Reid G, McGroarty J., Angotti R dan Cook RL, 1988. Lactobacillus inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Canadians J. of Microbiol.*, 34, 344 – 351.
- Reid G, Andrew WB. dan Smeianov V, 1998. The role of Lactobacilli in Preventing Urogenital and Intestinal Infections. *Int. Dairy J.* 8., 555 – 562.
- Reid G, 1999. The scientific basis for probiotic strains of Lactobacillus. *Applied and environmental Microbiology*, 65, 3763 - 3766
- Reid G, Bruce AW, Fraser N, Heinemann C, Owen J dan Henning B, 2001. Oral probiotics can resolve urigenital infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 30, 49 – 52.
- Reid G, 2001. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am. J. Clin. Nutr.*, (Suppl), 73, 437S- 443S.
- Rei G, Sanders M, Gaskins HR, Gibson GR, Mercenier A, Rastall R, Roberfroid M, Rowland, I, Cherbut C dan Klaenhammer TR, 2003. New Scientific Paradigmas for Probiotics and Prebiotics. *J. Clin. Gastroenterol.*, 37 (2), 105 – 118.
- Riewpassa F, 2004. Effect of Fish Protein Concentrate Biscuit and Probiotic Complementary Feeding on Serum IgA and Nutritional

- Status of Children Younger than Five. PhD dissertation. Bogor, Indonesia: Bogor Agricultural University.
- Rogosa M, Mitchell JA dan Wiseman RF, 1951. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. *J. Bacteriol.* **62** : 132 – 133.
- Ryan MP, Rea MC, Hill C dan Ross RP, 1996. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** : 612 –619.
- Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J and Mattila-Sandholm T, 2000. Probiotic Bacteria: Safety, Functional and Technological Properties. *J Biotech* 84: 197-215. Saarela M, Lähteenmäki L, Crittenden R, Salminen SJ and Mattila-Sandholm T, 2002. Gut Bacteria and Health Foods – The European Perspective. *Int J Food Microbiol*, **78** (1-2): 99-117.
- Sanae Okada, 2003. Lactic Acid Bacteria of Plant Origin : Characteristics and Applications. Paper presented at the Second Asian Conference on Lactic Acid Bacteria, Taipei, Nov 14-15, 2003.
- Sanchez AH, De Castro A, Rejano L, Montano A, 2000. Comparative study on chemical changes in olive juice and brine during green olive fermentation. *J Agric Food Chem* 48:5975–80.
- Sahl H-G, Jack RW dan Bierbaum G, 1995. Biosynthesis and biological activities of latibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem*, **230** : 827 – 853.
- Sakamoto M, Hayashi H dan Benno Y, 2003a. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Human Fecal Microbiota and its Application for Analysis of Complex Bifidobacterial Communities. *Microbiol. Immunol.*, **47** (2), 133 – 142.
- Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, dan Benno , 2003b. Application of terminal RFLP analysis to characterize oral bacterial flora in saliva of healthy subjects and patients with periodontitis. *J. of Med. Microbiol.*, **52**, 79 – 89.
- Salminen S, Isolauri E, Salminen R, 1996a. Probiotics and stabilization of the gut mucosal barrier. *Asia Pacific. J. Clin. Nutr.* **5** : 53 – 56.



- Salminen S, Isolauri E, Salminen R, 1996b. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier : successful strains and future challenges. *Ant. Leeuwenhoek* 70 : 347 – 358.
- Salminen S dan von Wright, AT. (Eds), 1998a. *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker, Inc.
- Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault M-C, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau M-C, Robertfroid M dan Rowland I, 1998b. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British J. of Nutr.*, 80 (suppl.), S147 – S171.
- Salminen S, Deighton M, Benno Y dan Gorbach SL, 1998c. Lactic acid bacteria in health and disease. In *Lactic Acid Bacteria : Microbiology and Functional Aspects*, Salminen S., dan A von Wright (Eds). Marcel Dekker, New York, pp 211 – 254.
- Salminen S, von Wright AT, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, Fonden R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birkeland SE, Mattila-Sandholm T, 1998d. Demonstration of safety probiotics - a review. *Intl. J. of FoodMicrobiol.*, 44, 93 – 106.
- Salminen SJ, Ouwehand AC, Benno Y dan Lee YK, 1999. Probiotics: How Should They be Defined? *Trends Food Sci Technol* 10 (3): 107-110.
- Saono S dan Nur E. 1986, Dadih. In: Saono S, Hull RR and Dhamcharee B, editors. *A Concise Handbook of Indigenous Fermented Foods in the ASCA Countries*. Canberra: The Government of Australia. p95.
- Sanders ME, Walker DC, Walker KM, Aoyama K dan Klaenhammer TR, 1996. Performance of commercial cultures in fluid milk applications, *J. Dairy Sci.*, 79, 943 – 955.
- Sanders ME, Huis in't Veld J, 1999. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76, 293 – 315.
- Saviano DA dan Levitt MD, 1987. Milk intolerance and microbe-containing dairy foods. *J. Dairy Sci.*, 70, 397 – 406.
- Sawada H, Furushiro M, Hirai K, Motoike M, Watanabe T dan Yokokura T, 1990. Purification and characterization of an antihypertensive compound from *Lactobacillus casei*. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 3211 – 3219.

- Saxelin M, Rautelin H, Chassy B, Gorbach SL, Salminen S dan Makela H, 1996. *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers. *Int. J. Food Microbiol.*, 25 : 199 – 203.
- Saxelin M, 1997. *Lactobacillus* GG - a human probiotic strain with thorough clinical documentation. *Food Reviews International*. 13, 293 – 313.
- Schaafsma G, Meuling WJA, van Dokkum W, Bouley C, 1998. Effects of a milk product, fermented by *Lactobacillus acidophilus* and with fructo-oligosaccharides added, on blood lipids in male volunteers. *Eur J Clin Nutr.*, 52:436–40.
- Schellhaas SM, 1983. Characterization of the exocellular slime produced by bacterial starter cultures used in the manufacture of fermented dairy products. Thesis. University of Minnesota.
- Schiff ER, Small NC dan Dietschy JM, 1972. Characterization of the kinetics of passive and active transport mechanisms for bile absorption in the small intestine and colon of the rat. *J. Clin. Invest.* 51:1351-1362.
- Schiffrin EJ, Brassard D, Servin AL, Rochat F dan Donnet-Hughes A, 1997. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: Criteria for strain selection. *American Journal of Clinical Nutrition* 66: 515–520.
- Sedewitz B, Schleifer KH dan Goltz, F, 1984. Physiological role of pyruvate oxidase in the aerobic metabolism of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.*, 160 : 462 – 465.
- Sghir A, Gramet G. Suau A, Rochet V, Pochart P dan Dore J, 2000. Quantification of bacterial groups within the human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ, Microbiol.*, 66, 2263 – 2266.
- Shahani, KM. dan Chandan RC, 1979. Nutritional and healthful aspects of cultured and cultured-containing dairy foods. *J. Dairy. Sci*, 62, 1685 – 1700.
- Sharpe ME, 1981. The Genus *Lactobacillus* in *The Procaryotes : A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria* (M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel, eds), Springer-Verlag, Berlin, pp. 1653 – 1674.
- Shimakawa Y, Matsubara S, Yuki N, Ikeda M dan Ishikawa F, 2003. Evaluation of *Bifidobacterium breve* strain Yakult-fermented

- Soy milk as Probiotic Food. *Int J Food Microbiol.*, **81** (2): 131-136.
- Shortt C, 1997. Innovative ingredients for optimum gut health. *Eur. Food Drink Rev.* Winter, 31 – 35.
- Siragusa GR, 1992. Production of bacteriocin inhibitory to *Listeria* species by *Enterococcus hirae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3508 – 3513.
- Sreekumar O dan Hosono A, 1999. The heterocyclic amine binding receptors of *Lactobacillus gasseri* cells. *Mut. Res.*, 421, 65 – 72.
- Sreekumar O dan A Hosono, 2000. Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora and fecal enzymes of rats and the *in vitro* inhibition of *Escherichia coli* in coculture. *J. Dairy Sci.* 83:931-939.
- Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon J-J, Gibson G, Collins MD, 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:4799- 807.
- Surono IS, Saono JK.D, Tomomatsu A, Matsuyama A dan Hosono A, 1983. Traditional milk products made from buffalo milk by use of higher plants as coagulants in Indonesia. *Japanese Journal of Dairy and Food Science* 32: A103–A110.
- Surono IS dan Hosono A, 1995. Indigenous Fermented Foods in Indonesia. *Japanese J of Dairy and Food Sci.*, 44, 91 – 98.
- Surono IS dan Hosono A, 1996. Antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria from Dadih against mutagenic terasi, *Milchwissenschaft* 51 (9), 493 – 497.
- Surono IS dan Hosono A, 1996. Antimutagenic properties of Lactic Acid Bacteria isolated from dadih, an Indonesian traditional fermented milk. In *Proceeding of the fifth International Symposium on Lactic Acid Bacteria : Genetics, Metabolisms, and Applications*, 8 – 12 September, 1996. Veldhoven, The Netherlands . Abstract.
- Surono IS dan Hosono A, 2000. Performance of Dadih Lactic cultures at Low Temperature Milk Application. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, vol 13 (Suppl A) : 495 – 498.
- Surono, IS dan Nurani D, 2001. Exploration of Indigenous Dadih Lactic Bacteria for Probiotic and Starter cultures. Domestic Research Collaborative Grant-URGE-IBRD World Bank Project 2000 – 2001. Research Report.

- Surono IS dan Hosono A, 2002a. Fermented Milks/Starter Cultures. In *Encyclopaedia of Dairy Sciences*, pp 1023 – 1028. Roginski H, Fuqua, JW dan Fox PF. (eds). Elsevier Science Ltd, U.K.
- Surono IS dan Hosono A, 2002b. Fermented Milks/Types and Standards of Identity. In *Encyclopaedia of Dairy Sciences*, pp 1018 – 1022. Roginski, H., Fuquay, J. W., and Fox, P.F. (eds). Elsevier Science Ltd, U.K.
- Surono, I.S., 2003. *In vitro* Probiotic properties of indigenous dadih lactic bacteria. *Asian-Aust. J. of Anim. Sci.* 16, (5), 726 - 731.
- Surono IS, 2003. The effect of Freezing Methods on viability,  $\alpha$ -galactosidase activity and binding property towards Trp-P1 of dadih bactic bacteria. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 8 (1), 8 – 12.
- Surono IS, Collado MC, Salminen S dan Meriluoto J, 2008. Effect of glucose and incubation temperature on metabolically active *Lactobacillus plantarum* from dadih in removing microcystin-LR. *Food and Chemical Toxicology* 46: 502–507.
- Surono IS, Pato U, Koesnandar dan Hosono A, 2009. In vivo antimutagenicity of dadih probiotic bacteria towards Trp-P1. *Asian–Australasian Journal of Animal Sciences* 22: 119–123.
- Surono IS, Khomsan A, Sobariah E dan Nurani, D, 2010. Effect of oxygenated water and probiotic administration on fecal microbiota of rats. *Microbiology Indonesia* 4: 17–21.
- Surono IS dan Hosono A, 2011. Starter cultures. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, ed. H. Roginski, J.W. Fuquay, and P.F. Fox, 477–482. London: Academic Press Ltd.
- Surono IS, Koestomo FP, Novitasari N, Zakaria FR, Yulianasari dan Koesnandar, 2011. Novel probiotic *Enterococcus faecium* IS-27526 supplementation increased total salivary sIgA level and bodyweight of pre-school children: A pilot study. *Anaerobe* 17 (6): 496–500.
- Surono IS, Martono PD, Kameo S, Suradji EW dan Koyama H, 2014. Effect of probiotic *L. plantarum* IS-10506 and zinc supplementation on humoral immune response and zinc status of Indonesian pre-school children. *Journal of Trace Elements in Biology and Medicine* 28: 465–469.
- Surono IS, 2015. Indonesian Dadih. In *Fermented Milk and Dairy Products*. AK Puniya (Ed), 2015. CRC Press. ISBN 9781466577978

- Svrcek C dan Smith DW, 2004. Cyanobacteria toxin and the current state of knowledge on water treatment options: A review. *Journal of Environmental Engineering and Science* 3: 155–185.
- Tagg JR, Dajani AS dan Wannamaker LW, 1976 . Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriology Reviews*, 40, 722 – 756.
- Takahashi M, Iwata S, Yamazaki N dan Fujiwara H. 1991. Phagocytosis of the lactic acid bacteria by M cells in the rabbit peyer's patches. *J. Clin, electron. Microscopy*, 24, 5 – 6.
- Tamime AY dan Robinson RK, 1988. Fermented milks and their future trends ; II. Technological aspects. *J. Dairy Res.* 55, 281 – 307.
- Tamime AY, Marshall VME, dan Robinson RK, 1995. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *J. Dairy Res.*, 62, 151 – 187.
- Tamime, AY dan Marshall VME, 1997. Microbiology and Technology of Fermented Milks. In : *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, 2nd edn., ed. BA Law, pp 57– 152. London: Blackie Academic and Professional.
- Tamime AY dan Robinson RK, 1999. *Yoghurt Science and Technology*, 2<sup>nd</sup> edn., pp 261- - 366. Cambridge : Woodhead Publishing.
- Tanabe T, Otani H dan Hosono A, 1991. Binding of mutagens with cell wall peptidoglycan of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* T180. *Milchwissenschaft* 46, 622 – 625.
- Tanaka R, Tohyama K, Morotomi M, Takayama H, Nanno M, Kuroshima T dan Mutai M, 1981. Effect on the fecal flora and urinary metabolites of the administration of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium breve*. In *Proceeding of RIKEN Symposium on Intestinal Flora : intestinal Flora and Cancer* (Mitsuoka, T., ed). Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp 85 – 104.
- Tannock GW, 1997. Normal microbiota of the gastrointestinal tract of rodents. In *Gastrointestinal Microbiology* (Mickie, I. R., White, B.A. and Isaacson, A. E., Eds), pp 187 – 215. Chapman and Hall, New York.
- Tannock GW, 1998. Studies on the interstitial microflora : a prerequisite or the development of probiotics. *Int. dairy J.* 8, 527 – 534.
- Tannock GW, Munro K, Harmsen HJM, Welling G, Smart J dan Gopal PK, 2000. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2578 – 2588.

- Tamime AY, Marshall VME dan Robinson RK, 1995. Microbiological and Technological aspects of milks fermented by Bifidobacteria. *J. Dairy Res.*, 62 : 151 – 187.
- Tamime AY dan Robinson RK, 1989. *Yogurt. Science and Technology.* Pergamon Press.
- Tuomola EM dan Salminen SJ, 1998. Adhesion of Some Probiotic and Dairy *Lactobacillus* Strains to Caco-2 Cell Cultures. *Int J Food Microbiol.*, 41: 45-51.
- Tuomola EM, Ouwehand AC dan Salminen SJ, 1999a. The Effect of Probiotic Bacteria on the Adhesion of Pathogens to Human Intestinal Mucus. *FEMS Immunol Med Microbiol* 26 (2): 137-142.
- Tuomola EM, Ouwehand AC dan Salminen SJ, 1999b. Human ileostomy glycoproteins as a model for small intestinal mucus to investigate adhesion of probiotics. *Lett. Appl. Microbiol.*, 28, 159 – 163.
- Tynkkynen S, Singh KV, Varmanen P, 1998. Vancomycin resistance factor in *Lactobacillus rhamnosus* GG is not related to enterococcal vancomycin resistance genes. *Int. J. Food Microbiol.*, 42, 295 – 204.
- Tynkkynen S, Satokari R, Sarela M, Mattila-Sandholm T dan Saxelin M, 1999. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. *Applied and Environ. Microbiol.*, 65, 3908 – 3914.
- USDA Agricultural Research Service National Nutrient Data Base for Standard Reference Release 27. <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/105?fgcd=&manu=&lfacet=&format=&count=&max=35&offset=&sort=&qlookup=Yogurt%2C+plain%2C+whole+milk%2C+8+grams+protein+per+8+ounce>. Accessed on May 7, 2015.
- Usman dan Hosono A, 1999. Bile tolerance, Taurocholate deconjugation and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. *J. Dairy Sci.* 82:243-248.
- Usman dan Hosono A, 2000. Effect of administration of *Lactobacillus gasseri* on serum lipids and fecal steroids in hypercholesterolemic rats. *J. Dairy Sci.* 83:1705-1711.

- Usman dan. Hosono A, 2001. Hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus gasseri* SBT0270 on serum in rats fed a cholesterol-enriched diet. *J. Dairy Res.* 68:617-624.
- Usman P, 2003. Bile and acid tolerance of lactic acid bacteria isolated from dadih and their antimutagenicity against mutagenic heated tauco. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 16:1680-1685.
- Vandevoorde L, Christiaens H dan Verstraete W, 1992. Prevalence of coaggregation reactions among chicken lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 72: 214– 219.
- Venem, G, 1993a. Molecular biology and genetic modification of lactococci. *J. Dairy Sci.*, 76, 2133.
- Venema K, Abee T. Haandrikman AJ, Leenhouts KJ, Kok J, Konings WN dan Venema G, 1993b. Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1041 – 1048.
- Venema K, Venema G dan Kok J., 1995. Lactococcal bacteriocins : mode of action and immunity. *Trends Microbiol.*, 3, 299 – 303.
- Walker DR dan Gilliland SE, 1993. Relationship among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.*, 76, 956 – 961.
- Walker DC dan Klaenhammer TR, 1996. Cloning and molecular characterization of the *gro* ESL chaperone operon from *Lactobacillus johnsonii*. In : *Proceeding for the Annual Meeting of the Am. Soc. of Microbiol.*, p 487, Abstract H-26.
- Walker AW dan Duffy LC, 1998. Diet and bacterial colonization : Role of probiotics and prebiotics. *J. Nutr. Biochem.*, 9. 668 – 675.
- Walstra P, Geurts T, Noomen A, Jellema A dan Van Boekel M, 1999. *Dairy Technology—Principles of Milk, Properties and Processes*. New York: Marcel Dekker.
- Waspodo IS, 1997. Probiotik Bakteri Pencegah Kanker. Intisari, Agustus 1997
- Waspodo IS, 2001. Efek Probiotik, Prebiotik and Synbiotik bagi Kesehatan Kompas Cyber Media, Minggu, 30September, 2001.
- Waspodo IS, 2003. Infeksi *Helicobacter pylori*. Dari tukang hingga kanker lambung. Kompas, 6 Mei 2003.
- Whitehead HR dan Lane DJ, 1956. The influence of penicillin on the manufacture and ripening of cheddar cheeses. *J. Dairy Res.*, 23, 355 – 360.

- WHO, 1998. *Guidelines for Drinking-Water Quality. Second Edition, Addendum to Volume 2, Health Criteria and Other Supporting Information*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Woolford, M.K., 1984. The silage fermentation, pp 304 – 306. Marcel Dekker, Inc., New York
- Yasui H, Nagaoka N dan Hayakawa K, 1994. Augmentation of Anti-Influenza Virus Hemagglutinin Antibody Production by Peyer's Patch cells with *Bifidobacterium breve* YIT4064.
- Yasui H, Shida K, Matsuzaki T dan Yokokura T, 1999. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 383 – 389.
- Young J, 1998. European market developments in prebiotic- and probiotic-containing foodstuffs. *British Journal of Nutrition*, 80, Suppl., 2, S231 – S233.
- Yudoamijoyo M, Tirza Z, Herastuti SR, Tomomatsu A, Matsuyama A dan Hosono A, 1983. Chemical composition and microbiological properties of yogurt. *Japanese Journal of Dairy and Food Science* 32: A7.
- Yukuchi H, Goto T dan Okonogi S, 1992. The nutritional and physiological value of fermented milks and lactic milk drinks, in *Functions of Fermented Milk*. Nakazawa, Y. dan Hosono A (Eds.), Elsevier Appl. Sci., London, pp. 2 – 45.
- Zoellner SS, Cruz AG, Faria JAF, Bolini HMA, Moura MRL, Carvalho LMJ, SantAna AS, 2009. Whey Beverage with acai pulp as food carrier of probiotic bacteria. *Aus J Dairy Technol* 64:165–9.
- Zubillaga M, Weill R, Postaire E, Goldman C, Caro R dan Boccio J, 2001. Effects of Probiotics and Functional Foods and Their Use in Different Diseases. *Nutrition Research* 21: 569-579.



## GLOSARIUM

- Adesi :penempelan pada mukosa usus
- Administered*: diberikan
- Biopolymer: senyawa polimer pada makhluk hidup
- Bromoscresol : indicator bromocresol
- Cytochrome*:*berfungsi sebagai transfer elektron dalam jalur metabolisme respirasi seluler*
- Cytokin: sekresi sel imun, interferon, interleukin
- Dadih: susu fermentasi tradisional asal Sumatera Barat
- DNA: materi genetik, asam deoksiribonukleat
- Eksopolisakarida : biopolimer
- Feses : tinja
- Hipokolesterolemik:bersifat menurunkan kholesterol
- Homofermentative: fermentasi bakteri asam laktat yang menghasilkan 90 asam lakta
- Imun: kebal
- Kolostrum: air susu pertama yang keluar dari kelenjar susu mamalia, mengandung banyak antibodi
- Kontaminasi: pencemaran
- Metabolism: proses kimia pada makhluk hidup untuk berlangsungnya kehidupan
- Metabolit:senyawa yang dihasilkan dari proses metabolisme
- Mikronutrien: zat gizi mikro
- Mutagen: senyawa penyebab mutasi sel
- Oligosakarida: sejenis karbohidrat
- Pathogen: penyebab penyakit
- Probiotik: bakteri baik yang memberikan manfaat kesehatan
- Synbiotik : efek sinergis antara probiotik dan prebiotik bagi kesehatan
- Yogurt: fermentasi susu

## INDEKS

- A**
- Adesi, 44, 153, 160, 167, 169, 171, 194, 195, 199, 207  
Amino, 118, 221  
Asam, 4, 5, 6, 10, 18, 23, 24, 25, 30, 38, 45, 46, 50, 74, 82, 91, 97, 100, 107, 137, 138, 139, 164
- B**
- Bakteri, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 18, 21, 22, 23, 26, 27, 29, 30, 34, 36, 39, 40, 44, 46, 50, 58, 59, 62, 66, 78, 80, 83, 86, 89, 90, 91, 92, 96, 99, 118, 119, 123, 124, 126, 130, 131, 133, 140, 147, 152, 153, 159, 160, 163, 167, 168, 169, 172, 178, 195, 238  
*Bifidobacterium*, 4, 6, 7, 33, 34, 39, 40, 44, 51, 55, 56, 61, 90, 92, 96, 98, 101, 124, 132, 133, 136, 141, 142, 145, 151, 153, 154, 157, 158, 160, 166, 169, 174, 195, 200, 210, 215, 217, 219, 220, 224, 226, 227, 228, 233, 236, 239  
Bifidobakteria, 4, 61, 92
- C**
- Coventry, 34
- D**
- Dadih, 79, 83, 158, 161, 183, 186, 187, 194, 213, 221, 222, 232, 234, 235  
Diaseti, 29, 92  
DNA, 12, 16, 27, 37, 48, 49, 50, 106, 107, 139, 142, 161, 237
- E**
- Eksopolisakarida, 40, 42
- F**
- Fermentasi, 12, 17, 20, 21, 22, 52, 53, 55, 56, 57, 58, 62, 67, 68, 72, 74, 86, 87, 89  
Feses, 134, 214
- G**
- Goldin, 61, 114, 220
- H**
- Helicobacter*, 138, 223, 238  
Heteropolisakarida, 42  
Homofermentative, 227
- K**
- Koumiss, 65, 79, 81, 82
- L**
- Lactobacillus*, 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 32, 34, 35, 36,

37, 40, 41, 42, 44, 49, 50,  
55, 56, 58, 59, 60, 61, 62,  
64, 65, 66, 67, 70, 71, 74,  
75, 76, 77, 80, 84, 85, 86,  
87, 88, 92, 96, 101, 103,  
104, 105, 107, 114, 118,  
119, 127, 133, 145, 153,  
154, 156, 157, 158, 159,  
160, 161, 166, 172, 174,  
182, 184, 185, 186, 187,  
188, 189, 190, 195, 204,  
210, 212, 213, 214, 215,  
216, 217, 218, 219, 220,  
221, 222, 223, 224, 225,  
227, 228, 229, 230, 232,  
233, 234, 235, 236, 237,  
238

*Leuconostoc*, 6, 7, 8, 9, 12, 15, 17,  
26, 27, 29, 32, 35, 40, 41,  
56, 57, 58, 65, 67, 72, 76,  
80, 83, 85, 86, 87, 88, 92,  
116, 117, 158, 184, 185,  
236

Limfosit, 120, 121, 126, 127

## M

Metabolism, 228

Metabolit, 22

Mikrobiota, 129, 131, 137, 141,  
143, 146, 196

Mutagen, 106

## P

*Pediococcus*, 6, 7, 8, 9, 12, 15, 25,  
27, 29, 35, 44, 92, 154, 215

Probiotik, i, iii, iv, 2, 131, 148, 152,  
153, 157, 161, 163, 173,  
183, 186, 187, 195, 196,  
198, 199, 200, 203, 205,  
207, 209, 238, 243

## S

Shirota, 16, 22, 60, 83, 84, 85, 127,  
133, 154, 157, 160, 166,  
167, 173

Sukrosa, 41

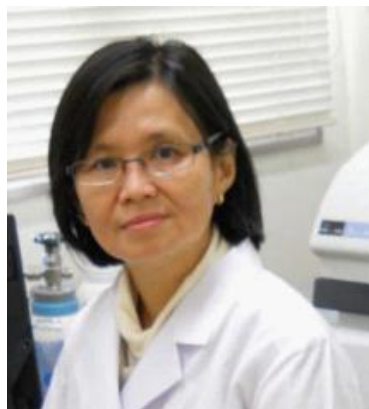
Synbiotik, 148, 175, 238

## Y

Yakult, v, 60, 83, 88, 90, 117, 132,  
149, 163, 200, 204, 205,  
227, 233

Yogurt, 45, 58, 59, 67, 68, 70, 79,  
88, 99, 160, 177, 209, 216,  
217, 225, 230, 237

## TENTANG PENULIS



**Ir. Ingrid S. Surono. M.Sc., Ph.D.**, lahir di Tegal 7 Februari 1957. Menyelesaikan studi S1 di bidang Teknologi Hasil Pertanian IPB tahun 1980, M.Sc di bidang proses pengolahan Pangan di Asian Institute of Technology (AIT), Bangkok Thailand pada 1984, dan memperoleh PhD di bidang Dairy Microbiology and Functional Foods di United Graduate School Gifu University Jepang, tahun 1996. Tahun 2004-2006, mendapat kesempatan Post Doctoral di Functional Foods Forum, University of Turku, Finland. Di Bidang Riset, meraih penghargaan Science and Technology Award 2011, Toray Foundation, dan tahun 2012 Ten best RISTEK KALBE Science Award. Tahun 2010, mendapat penghargaan oral presenter ketiga terbaik, pada XXXII International Congress on Microbial Ecology in Health and Disease, di Athena, Yunani dan tahun 2011 penghargaan yang sama pada FASEB Summer Research Conference di Carefree, Arizona, USA. Penulis telah meneliti probiotik selama 24 tahun, dan telah mempublikasikan 6 buku mengenai Mengkudu, Probiotik, Nutrition in Food Industry, Riset dan Pengembangan Produk Baru, Bahaya dan Risiko pada produk Pangan, dan Pengantar Keamanan pangan untuk Industri Pangan, menulis 3 chapter di Encyclopedia of Dairy Science, 2011. Elsevier, dan menulis 2 chapter buku yang diterbitkan oleh CRC pada tahun 2015 dan Taylor Francis, 2016. Saat ini sebagai Ketua Departemen Teknologi Pangan di Fakultas Teknik, Universitas Bina Nusantara dan Ketua Indonesian Scientific Society for Probiotics and Prebiotics (ISSPP), sejak 2010 hingga saat ini.