|  |  |
| --- | --- |
| Jurnal Biologi dan Pembelajarannya (JB&P) | **F:\UNP KEDIRI\Jurnal Biologi dan Pembelajarannya-semnas 2015\admin jurnal dan logo\revisi-oke.jpg** |
| Nomor e-ISSN: 2406 – 8659  http://efektor.unpkediri.ac.id/index.php/biologi |

**Pengembangan Minuman Probiotik dari Buah Kawista *(Feronia limonia)***

**dengan Bakteri Asam Laktat Indigenous**

**Elysabet Herawati dan Pingkan Aditiawati**

KK Bioteknologi Mikroba

Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung

**Abstrak**

Kawista *(Feronia limonia)* merupakan tanaman suku jeruk-jerukan (*Rutaceae*) berpotensi sebagai tanaman obat. Menurut penelitian yang pernah dilaksanakan, buah kawista baru diolah menjadi sirup, dodol, selai dan madumongso. Semakin meningkatnya perhatian terhadap pengaruh makanan dan minuman terhadap kesehatan, memicu berkembangnya produk kesehatan dengan pemanfaatan bahan alami. Berdasarkan manfaat buah kawista, penelitian bertujuan untuk mengembangkan produk sirup buah kawista sebagai minuman probiotik dengan pemanfaatan bakteri indigenous genus *Lactobacillus* yang diisolasi dari buah kawista. Pembuatan minuman probiotik kawista diawali dengan pembuatan sirup dengan metode maserasi. Bakteri indigenous diisiolasi dari kulit luar, kulit dalam dan sirup buah kawista dengan teknik pengenceran bertingkat. Isolasi dilakukan pada media NA yang dimodifikasi dengan sirup kawista. Sebanyak 35 isolat bakteri yang didapat diseleksi dengan pemindahan ke media MRS. Dilakukan uji metode difusi sumur untuk mengetahui aktivitas antimikroba isolat terhadap bakteri patogen pencernaan yakni *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Diamati zona bening yang terbentuk pada 3 bakteri uji sehingga didapatkan 3 isolat bakteri terpilih dengan diameter zona 15,5 mm; 17 mm dan 30,5 mm. Isolat terpilih didentifikasi dengan metode perwarnaan gram sehingga diketahui jenis bakteri adalah gram positif. Identifikasi molekuler dilakukan oleh Macrogen-Korea. Dari hasil sekuensing didapatkan spesies *Lactobacillus paracasei* strain FT179 sebagai isolat fermentasi. Dilakukan pembuatan kurva baku dan kurva tumbuh untuk mengetahui pertumbuhan optimal sebagai acuan pembuatan starter. Waktu pertumbuhan optimum *Lactobacillus paracasei* didapatkan pada jam ke 12.

**Kata kunci** :

Buah kawista, *Lactobacillus paracasei*, minuman probiotik

|  |
| --- |
|  |

**PENDAHULUAN**

Kawista atau *Feronia limonia* merupakan jenis tanaman yang termasuk suku jeruk-jerukan (*Rutaceae*) dan berpotensi sebagai tanaman obat. Buah kawista dapat digunakan dalam pengobatan tumor, asma, sembelit, lemah jantung, dan hepatitis (Ilango and Chitra, 2010).

Prospek buah kawista di masa depan sangat besar untuk dikembangkan karena didukung oleh beberapa faktor, terutama keunggulan komperatif daerah tropis dan dukungan pemerintah (Dewi, 2013). Buah kawista dimanfaatkan oleh warga Kabupaten Rembang untuk diolah menjadi sirup dan minuman penyegar. Sirup kawis atau *Cola van Java* ini mulai diproduksi massal oleh masyarakat Rembang, Jawa Tengah, sejak puluhan tahun yang lalu (Apriyantono dan Kumara, 2004). Menurut penelitian yang pernah dilaksanakan, buah kawista baru diolah sebatas menjadi menjadi sirup, dodol, selai, dan madumongso (Nugroho, 2012).

Dalam bidang kesehatan dan ilmu makanan fungsional akhir-akhir ini telah berkembang suatu cara yang dapat dilakukan untuk menjaga agar tubuh tetap sehat. Cara ini dapat dilakukan dengan mengkonsumsi makanan dan minuman yang mengandung “probiotik”. Saat ini istilah probiotik telah digunakan untuk mikroba yang mempunyai efek terapeutik pada manusia dan hewan yang mengkonsumsinya. Makanan dan minuman probiotik dipercaya dapat mencegah penyakit jantung koroner, diare dan gangguan pencernaan (Usman, 2012).

Tujuan penelitian adalah untuk mengembangkan produk sirup buah kawista sebagai minuman probiotik dengan pemanfaatan bakteri indigenous genus *Lactobacillus* yang diisolasi dari buah kawista. Penelitian sejenis belum pernah dilakukan, sehingga penelitian yang dilakukan diharapkan akan memiliki nilai penting dan memberi kontribusi pada bidang pangan dan kesehatan.

**METODE PENELITIAN**

**A. Bahan dan Alat**

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah erlenmeyer, gelas kimia 500 mL, inkubator 37°C, autoklaf, tabung reaksi, rak tabung reaksi, mikropipet, gelas ukur 100 mL, gelas ukur 10 mL, cawan petri, batang L, pembolong agar diameter 7 mm dan 9 mm, microtube, batang pengaduk, oose, kuvet, kulkas, blender, hot plate, timbangan, spatula, bunsen, vortex, pH meter, spektrofotometer dan mikroskop

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain buah kawista umur 3, 6 dan 9 bulan yang didapat dari kota Tuban Jawa Timur, alkohol 96%, alkohol 70%, spirtus, aquades, tips 1mL dan 200ul, medium NA, MRS, Na asetat, glukosa, yeast extract, bacto agar, tisu, plastik tahan panas, karet, korek api, aluminium foil, kapas lemak, kertas saring, kain kasa, plastik wrap, kristal violet, safranin dan lugol.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah NAOH 0,1 N dan HCl untuk mengatur pH medium, buffer pH 4 dan pH 7 untuk mengatur standar pH meter (Pramono dkk, 2003).

**B. Prosedur Penelitian**

**Pembuatan sirup buah kawista**

Sirup buah kawista dibuat dengan metode maserasi (Apriyantono dan Kumara 2004) yaitu daging buah yang telah dihancurkan sebanyak 100 gram diekstrak dengan 100 mL pelarut (aquades) perbandingan 1:1. Campuran buah dan pelarut dipisahkan dengan kertas saring.

**Isolasi bakteri dari sirup buah kawista**

Pengenceran bertingkat dilakukan pada 10 gram kulit luar dan kulit dalam serta 10 mL sirup buah kawista dari ketiga umur tanaman dengan akuades sampai 10-9. Sebanyak 1 mL ekstrak buah kawista ditanam dalam media agar yang telah dimodifikasi dengan ekstrak buah kawista sebagai media pertumbuhan adaptif dengan metode *pour plate* (agar tuang). Inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Semua isolat bakteri yang didapatkan dipindah ke media seleksi MRSA sehingga bakteri asam laktat saja yang akan tumbuh.

**Uji aktivitas antibakteri isolat indigenous pada bakteri patogen pencernaan**

Metode difusi sumur dilakukan untuk mengetahui aktivitas antimikroba isolat terhadap bakteri patogen pencernaan yakni *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi SITH ITB.

*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* ditumbuhkan pada medium Nutrient Broth selama 24 jam, kemudian ditanam sebanyak 1 mL pada medium NA menggunakan metode tuang Medium yang telah diinokulasi bakteri tersebut kemudian didiamkan selama 30 menit hingga agar mengering. Lubang sumuran dibuat pada medium menggunakan pembolong agar dengan diameter 7 mm dan 9 mm secara aseptik. Pada sumuran yang telah dibuat dimasukkan supernatan isolat bakteri asam laktat yang ditumbuhkan pada medium kaldu MRS selama 48 jam sebelumnya. Selain itu pada lubang yang lainnya dimasukkan juga aquades sebagai kontrol. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu ruang, diukur zona bening yang terbentuk.

**Identifikasi bakteri hasil seleksi**

Identifikasi dilakukan dengan pewarnaan gram dan sekuensing gen 16S rRNA. Perwarnaan gram dilakukan pada isolat dengan zona bening terbaik dengan zat pewarna safranin dan kristal violet agar diketahui sifat gram bakteri. Dilakukan pengamatan di bawah mikroskop agar diamati bentuk dan warna dinding sel bakteri.

Identifikasi secara molekuler dengan metode sekuensing gen 16S rRNA diakukan dengan pengiriman sampel ke Mcrogen-Korea. Hasil sekuensing diolah dengan software Sequence Scanner dan Bio-edit, hasil dicocokkan dengan data di NCBI untuk mengetahui spesies bakteri yang telah diidentifikasi.

**Pembuatan kurva standar bakteri asam laktat hasil seleksi**

Kultur bakteri yang telah diidentifikasi diaktivasi dengan medium PTT yang dicampur dengan sirup buah kawista. Perbandingan medium PTT dan sirup kawista adalah 50:50. Aktivasi dilakukan dengan menginokulasi kultur menggunakan metode gores pada medium PTT agar selama 48 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya, 1 loop koloni dimasukkan ke dalam 100 mL medium kaldu PTT yang telah ditambah sirup kawista yang telah dipasteurisasi. Inkubasi dilakukan pada inkubator suhu 37°C selama 24 jam. Aktivasi dilakukan sebanyak 3x24 jam.

Dilakukan pengukuran OD kultur hasil aktivasi. Diambil 3 titik sampel yakni titik OD 0,3 ; 0,5 dan 0,7. Pada masing-masing titik diambil kultur sebanyak 100 ul dan ditanam secara duplo dengan metode spread plate pada media agar PTT yang dicampur sirup kawista Dilakukan inkubasi selama 24 jam dan pada masing-masing titik dilakukan TPC. Dari data OD dan jumLah bakteri dapat ditentukan persamaan kurva standar (kurva baku).

**Pembuatan kurva tumbuh bakteri asam laktat hasil seleksi**

Pembuatan kurva tumbuh berdasarkan pertumbuhan bakteri dalam inokulum sehingga didapatkan kurva pertumbuhan bakteri yang optimum untuk menjadi dasar pembuatan starter dan proses fermentasi.

Kultur bakteri yang telah diidentifikasi selanjutnya diaktivasi dengan medium PTT yang dicampur dengan sirup buah kawista. Perbandingan medium PTT dan sirup kawista adalah 50:50. Aktivasi dilakukan dengan menginokulasi kultur menggunakan metode gores pada medium PTT agar selama 48 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya, 1 loop koloni dimasukkan ke dalam 50 mL medium kaldu PTT yang telah disterilisasi pada Erlenmeyer 250 mL. Kultur tersebut kemudian ditambah sirup kawista yang telah dipasteurisasi sebanyak 50 mL. Inkubasi dilakukan pada inkubator suhu 37°C selama 24 jam. Aktivasi dilakukan dengan langkah yang sama sebanyak 3 kali.

Sebanyak 10 % kultur yang telah teraktivasi kemudian diinokulasi pada 200 mL medium campuran sirup kawista dan kaldu PTT pada erlenmeyer 500 mL. Dilakukan inkubasi selama 24 jam. Pengambilan sampel dilakukan setiap 2 jam sehingga dihasilkan 13 titik representatif pertumbuhan bakteri.

Parameter yang dihitung dalam setiap sampling yaitu jumLah bakteri dengan pengukuran OD menggunakan spektrofotometer dan pengukuran pH. Untuk mengetahui kinetika bakteri dihitung dengan persamaan Monod :

µ = µ Max S

Ks + S

dimana :

µ Max = kecepatan pertumbuhan maksimum (jam-1)

S = konsentrasi substrat awal (µM)

Ks =konstanta Monod (µM jam-1)

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Isolat bakteri indigenous hasil isolasi dari buah kawista**

Didapatkan total 35 isolat indigenous dari hasil isolasi bakteri buah kawista. Sebanyak 19 isolat didapat dari buah kawista umur 3 bulan (buah mentah), 5 isolat didapat dari buah kawista umur 6 bulan (buah setengah matang), dan 11 isolat didapat dari buah kawista umur 9 bulan (buah matang). Bentuk koloni bakteri bervariasi namun secara umum berwarna putih dan koloni berbentuk bulat kecil sesuai ciri khas bakteri asam laktat.

**Aktivitas antibakteri isolat indigenous pada bakteri patogen pencernaan**

Screening dilakukan pada 35 isolat bakteri. Berdasarkan zona bening yang terbentuk pada *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus,* didapatkan 3 isolat bakteri terpilih dengan diameter zona 15,5 mm; 17 mm dan 30,5 mm.

**Hasil identifikasi isolat bakteri terpilih**

Pewarnaan gram dilakukan pada 3 isolat bakteri dengan ukuran zona terbaik. Hasil pewarnaan gram menunjukkan dinding sel ketiga bakteri mempertahankan zat pewarna kristal violet sehingga berwarna ungu, maka disimpulkan ketiga isolat terpilih termasuk bakteri gram positif. Hasil pengamatan di bawah mikroskop menunjukkan ketiga isolat berbentuk 2 basil dan 1 kokus.

Ketiga bakteri yang sudah dilakukan pewarnaan dipindah ke disposible disk untuk dikirim ke Macrogen-Korea untuk dilakukan identifikasi molekuler. Data sekuensing Macrogen-Korea yang sudah diolah dengan software Sequence Scanner dan Bio-edit, kemudian dicocokkan dengan data di NCBI menunjukkan hasil spesies ketiga bakteri terpilih yakni :

1. *Sthaphylococcus hominis partial*
2. *Lactobacillus paracasei* stain FT179 16 S ribosomal
3. *Bacillus subtilis* strain CS-2

Berdasarkan hasil sekuensing, maka bakteri yang dapat dipakai sebagai starter fermentasi kawista adalah bakteri asam laktat *Lactobacillus paracasei* strain FT179 16 S ribosomal.

**Kurva standar bakteri *Lactobacillus paracasei* strain FT179**

Dari hasil TPC memakai 3 titik OD 0,3 ; 0,5 dan 0,7 didapati bahwa jumLah bakteri mencapai 30-300 sehingga dapat digunakan sebagai acuan pembuatan kurva standar. Sehingga didapatkan kurva standar sebagai berikut :

**Gambar 1. Kurva standarbakteri : hubungan OD dengan jumLah sel bakteri**

Dari kurva di atas diperoleh persamaan linier Y=5E+07x-1E+07 R2=0,957

**Waktu pertumbuhan optimum bakteri *Lactobacillus paracasei* strain FT179 sesuai kurva tumbuh**

Data hasil kurva tumbuh yang diselaraskan dengan persamaan kurva baku, maka diperoleh kurva tumbuh :

**Gambar 2. Kurva pertumbuhan bakteri : hubungan waktu (t) dengan jumLah sel bakteri**

Berdasarkan kurva tumbuh maka dapat dilihat waktu optimum untuk pertumbuhan bakteri *Lactobacillus paracasei*  adalah pada jam ke -12. Waktu pertumbuhan optimum menunjukkan bakteri dalam fase log sehingga paling baik digunakan sebagai kultur starter fermentasi. Karena syarat bakteri fermentasi adalah fase lag yang pendek dan berada pada fase log sehingga jumlah bakteri memadai untuk melakukan proses fermentasi.

**SIMPULAN**

Berdasarkan hasil dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa pada buah kawista terdapat bakteri asam laktat indigenous *Lactobacillus paracasei* yang memiliki efek antimikroba terhadap bakteri patogen pencernaan sehingga berpotensi sebagai bakteri starter pembuatan minuman probiotik buah kawista.

**SARAN**

Berdasarkan kesimpulan di atas, saran yang dapat diberikan adalah :

1. Penelitian terkait buah kawista masih sangat sedikit dilakukan di Indonesia, sehingga peluang untuk melakukan penelitian masih sangat besar.
2. Perlu dilakukan uji ketahanan terhadap isolat bakteri *Lactobacillus paracasei* pada pH asam dan garam empedu sehingga bisa dijadikan mikroba potensial pembuatan minuman probiotik.

**DAFTAR PUSTAKA**

Apriyantono dan Kumara .2004. Identifikasi Character Impact Odorants Buah Kawista (*Feronia limonia*). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan 15* (1) : 35-4.

Dewi, Resvina. 2013. Bioaktivitas Buah Kawista (Limonia acidissima) Bima dan Penentuan Sidik Jarinya Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis. Fakultas MIPA Institut Pertanian Bogor

Illango,et al.2009. Wound Healing and Anti-oxidant Activities of the Fruit Pulp pf *Limonia acidissima* Linn (Rutaeae) in Rats.*Tropical Jurnal of Pharmaceutical Research 9* (3) : 223-230

Nugroho, Adi.2012. Keragaman Morfologi dan Anatomi Kawista (*Limonia acidissima*) di Kabupaten Rembang. Bogor : Fakultas MIPA Institut Pertanian Bogor

Pramono, dkk. 2003. Kinetika Pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus sp* pada Media MRS Cair*. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan 14(1) :46-50*

Usman. 2012. Probotik : Prospek dan Implementasi dalam Bidang Makanan Fungsional dan Kesehatan. Universitas Riau.