

VIABILITAS DAN STABILITAS BAKTERI PROBIOTIK *L. acidophilus* FNCC 0051 PADA SUSU KEDELAI FERMENTASI SELAMA DI SALURAN CERNA *IN VITRO* DAN PENYIMPANAN

Ida Bagus Agung Yogeswara¹⁾, I Gusti Ayu Wita Kusumawati¹⁾, Ni Wayan Nursini¹⁾

Fakultas Ilmu Kesehatan, Sains dan Teknologi
Universitas Dhyana Pura, Tegal Jaya, Dalung
ibayogeswara@yahoo.com, wita_kusumawati@yahoo.co.id, nursini_2811@yahoo.com

Abstrak: Bakteri asam laktat merupakan mikroorganisme yang berperan penting dalam fermentasi pangan dan memberikan efek kesehatan terhadap yang mengkonsumsi. Untuk menjadi organisme probiotik, bakteri asam laktat harus bertahan selama di saluran cerna dan memiliki stabilitas dan viabilitas yang baik selama penyimpanan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mempelajari viabilitas dan stabilitas *L. acidophilus* FNCC 0051 pada susu kedelai fermentasi selama di saluran cerna *in vitro* dan penyimpanan. Strain *L. acidophilus* FNCC 0051 memiliki viabilitas dan stabilitas yang baik selama 10 hari penyimpanan pada suhu 5⁰ C dan 25⁰ C. Strain *L. acidophilus* FNCC 0051 mengalami penurunan 1,9 log cycle pada *simulated gastric juice* selama 10 hari penyimpanan dan di fase *simulated intestinal juice*. Nilai total asam dan pH susu kedelai fermentasi menunjukkan peningkatan yang signifikan selama 10 hari penyimpanan yaitu 2.5% dan 3,4 berturut – turut. Penelitian ini menunjukkan bahwa strain *L. acidophilus* FNCC 0051 memiliki viabilitas dan stabilitas yang baik selama di saluran cerna dan penyimpanan.

Kata-kata kunci: probiotik, susu kedelai fermentasi, penyimpanan, simulasi saluran cerna *in vitro*

Abstract: Lactic acid bacteria as probiotic organism play an important role in food fermentation and gives beneficial effect to the host. In order to be a probiotic organism, lactic acid bacteria must survive through the digestive tract and has a good stability and viability during storage and under simulated gastrointestinal conditions. The aim of this research is to investigate viability and stability of *L. acidophilus* FNCC 0051 in fermented soymilk during storage. *L. acidophilus* FNCC 0051 in fermented soymilk has a good viability and stability during 10 days of storage at 5⁰ C and 25⁰ C. *L. acidophilus* FNCC 0051 decreased 1,9 log cycle in simulated gastric juice during 10 days of storage as well as in simulated intestinal juice. The acidity and pH of fermented soymilk exhibited a significant increase during 10 days of storage i.e. 2.5% and 3.4 respectively. This research has shown that *L. acidophilus* FNCC 0051 has a good viability and stability in fermented soymilk during storage and under simulated gastrointestinal conditions.

Keyword: probiotic, fermented soymilk, storage, simulated gastrointestinal juice

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat sebagai mikroorganisme probiotik memegang peranan penting dalam meningkatkan dan menjaga kesehatan sehingga mendorong penggunaan bakteri asam laktat untuk pengembangan pangan fungsional dan farmasetikal. Menurut WHO (2001) probiotik adalah sel hidup yang dikonsumsi dalam jumlah tepat dapat memberikan efek kesehatan bagi inang. Bakteri probiotik mempunyai mekanisme untuk memperbaiki

mikroflora saluran pencernaan sehingga dapat mengatasi masalah gangguan pencernaan. Untuk dapat berfungsi sebagai probiotik, bakteri harus memenuhi persyaratan antara lain; berasal dari manusia, tidak bersifat patogen, toleran terhadap asam lambung dan garam empedu dan kemampuan untuk menempel dan mengkoloni usus minimal dalam jangka waktu pendek juga merupakan salah satu syarat dari galur probiotik untuk dapat memberikan manfaat sepenuhnya (Lick *et al.*,2001;

Shortt, 1999). Papamanoli *et al.*, (2002) melaporkan bahwa, bakteri *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus* dan *L. plantarum* yang diisolasi dari sosis kering terfermentasi memiliki sifat probiotik dengan karakteristik resisten terhadap garam empedu 0,3% dan 0,1%, tahan terhadap pH rendah, tumbuh pada konsentrasi NaCl 6,5%, mampu menghambat tiga strain bakteri *Listeria monocytogenes* dan dua strain bakteri *Staphylococcus aureus*.

Indonesia kaya akan makanan fermentasi yang telah dikonsumsi masyarakat sejak dulu. Biasanya makanan fermentasi dibuat secara tradisional menggunakan inokulum spontan (indogenous). Berbagai isolat bakteri asam laktat telah diisolasi dan diidentifikasi dari berbagai makanan fermentasi seperti dadih, tempoyak, asinan sawi, gatot, growol dan sebagainya. Beberapa spesies bakteri asam laktat yang diisolasi pada fermentasi makanan tradisional tersebut adalah *L. plantarum* Mut7 dan *L. sakei* Mut13 (gatot), *L. casei subsp. rhamnosus* TGR2 (growol), *L. plantarum* (tape singkong), *L. fermentum* (tempoyak), *L. acidophilus* (asinan rebung), *L. casei subsp. rhamnosus* TTE1 (tempe). Isolat-isolat tersebut memiliki potensi probiotik karena memiliki ketahanan terhadap cairan asam di saluran cerna, tahan terhadap garam empedu dan memiliki aktivitas antimikroba (Rahayu *et al.*, 1996). Jumlah sel bakteri asam laktat hidup yang dianjurkan berada dalam saluran pencernaan agar memperoleh efek positif terhadap kesehatan sebesar 10^6 - 10^8 cfu/ml (Klingberg and Budde, 2006).

Dalam rangka penganekaragaman produk minuman fermentasi, kacang kedelai dapat digunakan dalam pembuatan minuman fermentasi pembawa agensia probiotik. Kacang kedelai cukup digemari oleh masyarakat Indonesia. Kacang kedelai sering dikonsumsi dalam bentuk tempe, tahu

dan susu kedelai. Agar dapat dikonsumsi dalam waktu yang cukup lama maka kultur probiotik harus memiliki stabilitas dan viabilitas yang tinggi selama penyimpanan agar saat dikonsumsi memiliki efek kesehatan. Perlakuan suhu memegang peranan penting dalam menjaga stabilitas kultur probiotik selama penyimpanan, oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mempelajari viabilitas bakteri probiotik *L. acidophilus* FNCC 0051 pada suhu penyimpanan yang berbeda serta mempelajari perubahan sifat probiotik yang terjadi selama penyimpanan.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kacang kedelai, susu skim, sukrosa, kultur probiotik *L. acidophilus* FNCC 0051. Media yang digunakan adalah NaCl (Merck), de Man Ragosa Sharp broth (Oxoid), MRS Agar (Oxoid), pepsin (*porcine gastric mucosa*, sigma), garam empedu (oxoid), larutan saline 5%, susu skim, HCl 5 M, NaOH 1 M.

Pembuatan Susu Kedelai dan Fermentasi Susu Kedelai

Kedelai direndam selama 4 jam sampai kulit ari kedelai terlepas dari bijinya. Selanjutnya kedelai ditiriskan dan dimasukkan ke dalam air mendidih dan direbus selama 10 menit, kemudian ditiriskan kembali. Kedelai dihancurkan dalam blender sambil ditambah air hangat ($70 - 80^{\circ}$ C) dengan perbandingan 1 : 5. Penggilingan dilakukan selama 5 menit dengan kecepatan tinggi. Bubur tersebut diaduk dan disaring untuk diambil filtratnya.

Proses pembuatan susu kedelai fermentasi mengikuti metode yang dilakukan oleh Jenie *et al.*, (1996) dengan sedikit modifikasi. Kedalam susu kedelai ditambahkan susu skim sebanyak 10% dan sukrosa 3%. Campuran diaduk

merata, dipanaskan pada suhu 80⁰ C selama 5 menit, kemudian didinginkan hingga susu 37⁰ C. susu kedelai selanjutnya diinokulasi dengan kultur *L. acidophilus* FNCC 0051 sebanyak 10% kemudian difermentasi pada suhu 37⁰ C selama 24 jam.

Penyimpanan Susu Kedelai Terfermentasi

Susu kedelai yang sudah selesai difermentasi kemudian dilanjutkan dengan penyimpanan pada suhu yang berbeda yaitu pada suhu 5⁰ C, dan 25⁰ C. Penyimpanan dilakukan selama 10 hari dan analisa mikrobiologi dilakukan pada hari ke 0, 2, 4, 6, 8, dan hari ke- 10.

Analisa yang dilakukan adalah total bakteri asam laktat susu kedelai fermentasi, total bakteri asam laktat selama penyimpanan, perubahan sifat probiotik kultur bakteri asam laktat selama penyimpanan (meliputi ketahanan terhadap *simulated gastric juice*, *simulated intestinal juice*), serta total asam dan pH susu kedelai fermentasi selama penyimpanan.

Ketahanan terhadap *Simulated Gastric Juice* dan *Simulated Intestinal Juice* (Lian et al., 2003)

Uji ketahanan terhadap *simulated gastric juice* dilakukan dengan metode plate count. Ketahanan dilakukan dalam larutan saline 5% yang ditambahkan pepsin (3 g/l) kemudian pH diatur menggunakan HCl sehingga pH media diperoleh 2,0. Kultur segar diinokulasi ke dalam *simulated gastric juice* (SGJ), selanjutnya diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 90 menit.

Setelah pengujian di SGJ kultur selanjutnya diuji secara berkesinambungan terhadap *simulated intestinal juice*. Uji ketahanan terhadap SIJ menggunakan konsentrasi garam empedu yang terbuat dari larutan KH₂PO₄ 0,05 M dengan pH 8,2 ditambah garam empedu sebesar 0,5%.

Kultur bakteri asam laktat yang telah diinokulasikan ke dalam SGJ steril kemudian diambil 1 ml dan diinokulasikan kembali ke larutan SIJ steril yang memiliki konsentrasi garam empedu 0,5%. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 1 jam. Jumlah bakteri yang tumbuh dihitung menggunakan *Quebec Colony Counter* (*Quebec*).

Penentuan Total Asam dan pH

Total asam dari susu kedelai fermentasi dilakukan dengan menggunakan metode titrasi. Hasil titrasi dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ asam laktat} = \frac{V_x N_x P_x B M_x 100\%}{\text{volsampel} \times 1000}$$

(1)

Keterangan :

V = Jumlah larutan NaOH untuk titrasi (ml)

N = Normalitas NaOH

P = Jumlah pengenceran

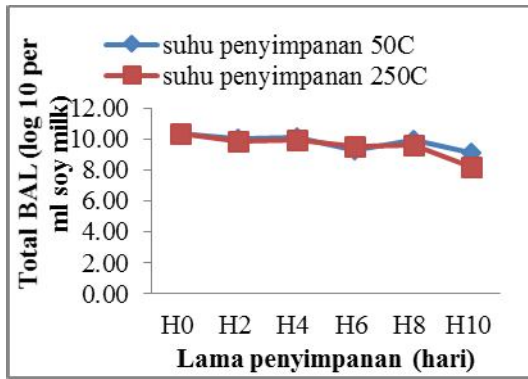
BM = bobot molekul asam laktat (90)

Pengukurun pH dari susu kedelai fermentasi menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi dengan buffer pH 4,0 dan 7,0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Total Bakteri Asam Laktat

Gambar 1 menunjukkan bahwa total BAL *fermented soy milk* yang disimpan pada suhu 5⁰C adalah 1,36 x 10⁹ – 2,09 x 10¹⁰ cfu/ml dan yang disimpan pada suhu 25⁰C adalah 1,72 x 10⁸ – 2,09 x 10¹⁰ yang telah mencapai syarat sebagai probiotik yaitu syarat minimal total BAL yaitu 10⁶ cfu/ml dan untuk syarat total BAL pada susu terfermentasi yaitu 1,0 x 10⁸ cfu/ml (Tamime dan Robinson, 2002).



Gambar 1. Total bakteri asam laktat selama penyimpanan

Secara keseluruhan, terjadi peningkatan pertumbuhan BAL dari 0 hari sampai penyimpanan 4 hari kemudian terjadi penurunan sampai pada akhir pengamatan. Hal ini disebabkan karena selama penyimpanan sampai hari ke 4 masih terjadi proses fermentasi dan telah mencapai fase

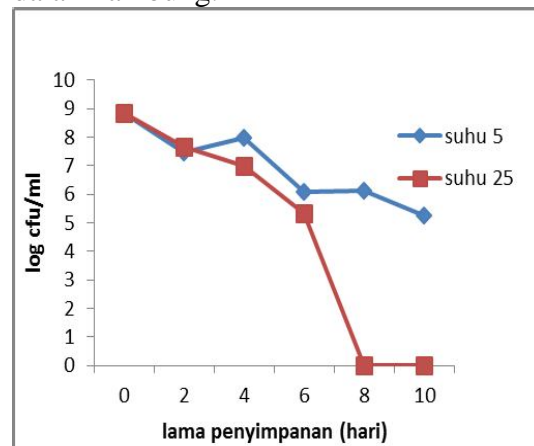
pertumbuhan tetap (statis) kemudian diikuti dengan fase menuju kematian karena konsentrasi substrat semakin berkurang, kepadatan populasi yang tinggi, dan timbunan produk metabolisme yang toksik seperti asam laktat, asam asetat dan asam propionat (Fardiaz, 1993; Schlegel, 1994).

Asam-asam yang dihasilkan selama fermentasi dan penyimpanan menyebabkan penurunan viabilitas dengan beberapa cara yaitu asam-asam laktat (CH_3COOH) terdisosiasi atau terpecah menjadi CH_3CHOO^- dan H^+ . Molekul asam yang tidak terdisosiasi masuk ke dalam sitoplasma kemudian akan terdisosiasi menjadi H^+ sehingga terjadi penurunan pH sitoplasma yang menyebabkan protein atau enzim akan terdenaturasi. Selain itu, diduga karena asam-asam organik yang dihasilkan oleh BAL menyebabkan terganggunya dinding sel sehingga sel *injury* yang diikuti dengan terjadinya penurunan viabilitas sel (Ray, 2004). Pada umumnya viabilitas sel tergantung pada strain yang digunakan, kondisi kultur, kandungan oksigen, keasaman pada produk dan konsentrasi asam laktat.

Faktor utama yang menyebabkan penurunan viabilitas strain *Lactobacillus* adalah penurunan pH media dan akumulasi asam organik sebagai hasil fermentasi (Yoon *et al*, 2004).

Ketahanan Terhadap *Simulated Gastric Juice*

Ketahanan kultur bakteri asam laktat selama penyimpanan terhadap SGJ diperlukan untuk mengetahui kemampuan bakteri asam laktat dapat bertahan pada asam lambung dan enzim pepsin. Pengujian pada SGJ dilakukan secara *in vitro* pada larutan saline 5% dengan penambahan enzim pepsin. Pengujian dalam SGJ dilakukan selama 90 menit. Pemilihan waktu tersebut berdasarkan waktu transit minuman di dalam lambung.



Gambar 2. Ketahanan terhadap *simulated gastric juice*

Pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa kemampuan sel bakteri asam laktat bertahan pada SGJ semakin menurun selama penyimpanan pada suhu 5°C dan 25°C . Selama penyimpanan pada suhu 5°C bakteri asam laktat mengalami penurunan terhadap SGJ pada hari ke-2 sebesar 1 log cycle. Pada hari ke 6 sel bakteri asam laktat mengalami penurunan sebesar 1,9 log cycle dari jumlah sel awal. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa suhu penyimpanan sangat mempengaruhi viabilitas dan stabilitas bakteri probiotik terhadap asam lambung. Penelitian yang dilakukan oleh

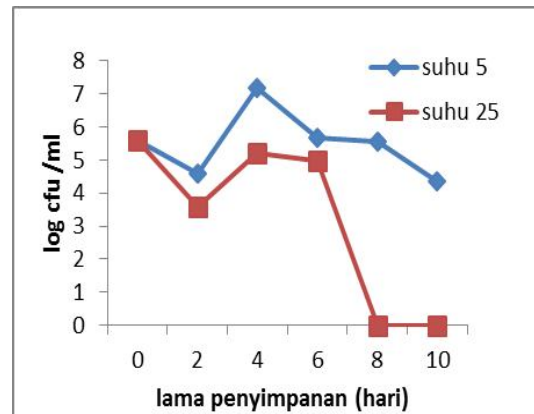
Champagne dan Gardner (2008) menunjukkan bahwa strain *L. acidophilus* LB2 dan LB3 menunjukkan penurunan sebesar 4 log cycle selama 40 hari penyimpanan pada suhu 4^o C pada sari buah probiotik. Pengaruh waktu penyimpanan juga mempengaruhi kemampuan strain *L. acidophilus* LB3 bertahan terhadap paparan asam lambung selama 2 jam inkubasi. Strain *L. acidophilus* LB3 mengalami penurunan sebesar 5 log cycle terhadap asam lambung pada hari ke 35 penyimpanan.

Penambahan susu skim sebanyak 10% dan sukrosa 3% memberikan perlindungan terhadap sel *L. acidophilus* FNCC 0051 terhadap asam lambung selama penyimpanan. Saarela *et al.*, (2006) menyatakan bahwa susu skim dan sukrosa dapat melindungi sel bakteri asam laktat terhadap pH rendah sehingga memberikan viabilitas yang tinggi jika diaplikasikan pada produk yang memiliki pH rendah. Lebih lanjut dikatakan bahwa sel *B. animalis* yang diberi kryoprotektan dari susu skim dan sukrosa menunjukkan penurunan 1 log cycle selama proses kering beku. Komponen protein pada susu skim berfungsi sebagai buffer pada sari kedelai terfermentasi sehingga dapat melindungi sel *L. acidophilus* FNCC 0051 terhadap paparan asam lambung.

Pada penyimpanan pada suhu 25^o C, sel mengalami penurunan viabilitas terhadap SGJ sebesar 3,5 log cycle selama penyimpanan pada hari ke 6. Sedangkan pada hari ke 8 dan 10, semua sel bakteri asam laktat tidak mampu bertahan pada SGJ selama 90 menit inkubasi. Pada penyimpanan suhu 25^o C sel bakteri asam laktat memiliki aktivitas seluler yang tinggi dalam substrat. Selama penyimpanan, aktivitas seluler bakteri asam laktat akan menurun sehingga sel tidak mampu lagi bertahan dalam paparan SGJ.

Ketahanan Terhadap *Simulated Intestinal Juice*

Ketahanan terhadap garam empedu merupakan salah satu syarat penting untuk bakteri asam laktat yang akan digunakan sebagai probiotik. Asam empedu merupakan racun bagi sel hidup, oleh karena itu mikroba pada saluran pencernaan harus mempunyai suatu mekanisme pertahanan untuk melindungi diri dari aktivitas racun tersebut.



Gambar 3. Ketahanan terhadap *simulated intestinal juice*

Pengujian terhadap garam empedu dilakukan secara *in vitro* dengan penambahan garam empedu 0, 5% dengan pH 8,2 serta lama inkubasi 90 menit. Pengujian ini dilakukan setelah sel mengalami paparan terhadap SGJ selama 90 menit dan kemudian dilanjutkan dengan SIJ selama 1 jam. Pada Tabel 3 dapat dilihat bahwa setelah inkubasi selama 1 jam di SIJ sel mengalami penurunan sebesar 1-2 log cycle pada suhu penyimpanan 5^o dan 25^o C hari ke-2. Penyimpanan hari ke - 4 sel mengalami peningkatan viabilitas terhadap SIJ pada suhu 5^o dan 25^o C. Peningkatan viabilitas terhadap SIJ diduga sel bakteri asam laktat mampu menghidrolisis garam empedu oleh enzim BSH (bile salt hydrolase). Menurut Antara (2009) enzim BSH merupakan enzim yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yang mampu menghidrolisa garam empedu dan mengubah kemampuan fisikokimia yang dimiliki garam empedu, sehingga tidak

toksik bagi bakteri tersebut. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Hartati *et al.*, (2003) menunjukkan bahwa strain *L. plantarum* Mut 7 yang difortifikasi pada sari buah pepaya nanas memiliki kemampuan mendekonyugasi garam empedu pada penyimpanan selama 2 bulan. Pada bulan ke 3 penyimpanan strain *L. plantarum* Mut 7 mengalami penurunan kemampuan mendekonyugasi garam empedu pada suhu penyimpanan 4 °C.

Pada hari ke-6 penyimpanan, sel mengalami penurunan viabilitas terhadap SIJ sebesar 1,5 log cycle pada suhu penyimpanan 5°. Pada suhu 25° C, sel *L. acidophillus* tidak mampu bertahan terhadap paparan garam empedu selama penyimpanan. Sel *L. acidophillus* mengalami penurunan yang drastis pada hari ke 6 penyimpanan sebesar 6 log cycle. Penurunan viabilitas sel terhadap SIJ diduga karena terjadinya penurunan aktivitas seluler bakteri asam laktat selama penyimpanan, sehingga sel tidak memiliki kemampuan untuk bertahan pada paparan SIJ selama 1 jam. Penurunan viabilitas sel selama penyimpanan juga diakibatkan turunnya pH substrat dan meningkatnya total asam pada sari kedelai terfermentasi menjadi 3,0 dan 2,5% (Gambar 4 dan 5) pada suhu 25° C.

Ketahanan bakteri asam laktat terhadap garam empedu sangat tergantung dari strain yang digunakan dan konsentrasi garam empedu. Nighswonger *et al.*, (1995) melaporkan bahwa beberapa strain *L. acidophillus* L1, O16 dan MUH41 yang diinokulasi pada mentega dan yogurt dapat tumbuh pada media yang mengandung garam empedu 0,15% setelah melalui proses penyimpanan selama 28 hari dengan suhu penyimpanan 5° dan 7° C.

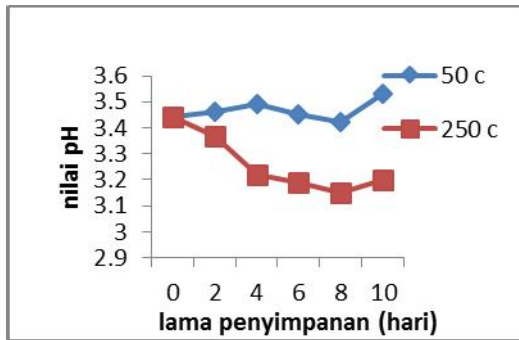
Total Asam dan pH Susu Kedelai Fermentasi

Total asam dan pH dari susu kedelai terfermentasi dapat dilihat pada Gambar

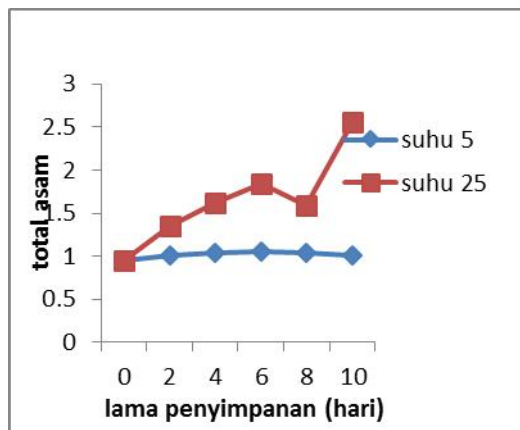
4 dan 5. Pada awal penyimpanan total asam susu kedelai terfermentasi sebesar 0,95% sedangkan pH awal sebesar 3,4. Pada penyimpanan suhu 5° C, total asam susu kedelai terfermentasi tidak mengalami penurunan sampai akhir penyimpanan. Sedangkan pH susu kedelai terfermentasi mengalami peningkatan pH 3,4 pada awal penyimpanan menjadi 3,5 pada akhir penyimpanan.

Pada Gambar 4 dan 5 terlihat bahwa, total asam mengalami peningkatan selama penyimpanan dan pH susu kedelai fermentasi pada suhu penyimpanan 25° C mengalami penurunan. Total asam susu kedelai fermentasi pada awal penyimpanan sebesar 0,95% dan pada akhir penyimpanan total asam mencapai 2,5%

Nilai pH susu kedelai fermentasi pada awal penyimpanan adalah 3,4 kemudian menurun menjadi 3,1 pada akhir penyimpanan. Semakin tinggi total asam pada susu kedelai maka nilai pH akan semakin menurun. Penambahan susu skim dan sukrosa pada pembuatan susu kedelai fermentasi memberikan pengaruh yang besar terhadap peningkatan total asam dan nilai pH susu kedelai selama penyimpanan. Bakteri asam laktat menggunakan laktosa yang terdapat di dalam susu skim dan sukrosa sebagai sumber karbon untuk menghasilkan asam laktat. Ostile *et al.*, (2005) menyatakan bahwa jumlah asam laktat yang dihasilkan selama proses fermentasi sangat bervariasi tergantung dari strain yang digunakan dan suhu fermentasi. Lebih lanjut dikatakan bahwa pada suhu 37° C strain *L. acidophillus* La5 dan 1748 menghasilkan jumlah asam laktat paling banyak selama proses 50 jam fermentasi. Pada suhu 45° C, strain bakteri asam laktat cenderung menghasilkan asam asetat, dimana pada pangan fermentasi kadar asam asetat yang terlalu tinggi tidak dapat diterima secara organoleptik.



Gambar 4. Nilai pH susu kedelai fermentasi selama penyimpanan



Gambar 5. Total asam susu kedelai fermentasi selama penyimpanan

SIMPULAN

Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah :

1. Total bakteri asam laktat pada *fermented soy milk* pada suhu 5⁰ C adalah $1,36 \times 10^9 - 2,09 \times 10^{10}$ cfu/ml, sedangkan total bakteri asam laktat pada suhu 25⁰ C adalah $1,72 \times 10^8 - 2,09 \times 10^{10}$ cfu/ml.
2. Viabilitas bakteri asam laktat terhadap SGJ semakin menurun seiringnya lama penyimpanan. Pada penyimpanan suhu 5⁰ C viabilitas BAL menurun 2 log cycle selama penyimpanan. Sedangkan pada penyimpanan suhu 25⁰ C, bakteri asam laktat tidak mampu bertahan pada SGJ pada akhir penyimpanan.
3. Pada penyimpanan suhu 5⁰ C, ketahanan BAL pada SIJ semakin menurun menjadi 3,5 log cycle setelah sebelumnya BAL terpapar

oleh SGJ. Sedangkan pada penyimpanan suhu 25⁰ C, BAL tidak mampu bertahan pada SIJ pada akhir penyimpanan.

4. Selama penyimpanan nilai pH dan total asam *fermented soy milk* semakin meningkat. Nilai pH *fermented soy milk* pada penyimpanan suhu 5⁰ C 3,5 dan pada suhu 25⁰ C 3,1. Total asam pada penyimpanan suhu 5⁰ C adalah 1,0%, sedangkan pada suhu 25⁰ C adalah 2,5%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibantu dari penelitian Dosen Pemula yang didanai DIKTI

DAFTAR RUJUKAN

- Antara, N. S. 2004. Isolation and identification of indigenous lactic acid bacteria, their role and application in production of *urutan*, a Balinese fermented sausage. Disertasi. Laboratory of Applied Microbiology, Departement of Molecular Bioscience Graduate School of Agriculture, Hokkaido University. pp : 11-12
- Champagne, C.P and Gardner., N., J. 2008. Effect of Storage in a Fruit Drink on Subsequent Survival of Probiotic Lactobacilli to Gastro-Intestinal Stresses. *Food Research International*, 41 : 539-543
- Fardiaz, S. 1993. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Jakarta: Raja Grafindo Persada. hal: 15-30
- Hartati, S., Harmayani, E., Rahayu, E.S dan Utami, T. 2003. Viabilitas dan Stabilitas *L. plantarum* Mut 7 Dalam Sari Buah Pepaya Nanas Selama Penyimpanan. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*.14 :182-186
- Jenie, B.S.L., E.Y. Candrasari. dan Lilis Nuraida. 1996. Aktivitas Antimikrobia dari Susu Kedelai yang Difermentasi

- oleh *Lactobacillus casei*. Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan. 1 : 16-26
- Klingberg, T. D and Budde, B.B. 2006. The Survival and Persistence in the Human Gastrointestinal Tract of Five Potential Probiotic Lactobacilli Consumed as Freeze dried Cultures or as Probiotic Sausage. *Intl. J.Food. Microbiol.* 109 : 157-159
- Lick, S., K. Drescher and K.J. Heller. 2001. Survival of *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the Terminal Ileum of Fistulated Gottingen Minipigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 : 4137-4143
- Lian, Wen-Chian., Hung-Chi Hsiao, and Cheng-Chun Chou. 2003. Viability of microencapsulation bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *Int. J. Food. Microbiol.* 86 : 293-301
- Nighswonger, B.D., Brashears, M.M., and Gilliland., S.E, 1995. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in Fermented Milk During Refrigerated Storage. *J. Dairy Sci.* 79 : 212 – 219
- Ostle, Hilde, M., Janneke Treimo, Judith A, Narvhurs. 2005. Effect of Temperature on Growth and Metabolism of Probiotic Bacteria in Milk. *International Dairy Journal.* 15:989-997
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Tzanetaki-Litopoulou, E., Kotzekidou, P. 2002. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from a Greek Dry Fermented Sausage in Respect of Their Techological and Probiotic Properties. *Meat Science.* 65 : 859-867
- Rahayu, E.S., Djafar, T.F., Wibowo, D dan S. Sudarmadji. 1996. Lactic Acid Bacteria from indigenous fermented foods and their antimicrobial activity. *Indonesian Food and Nutrion Progress.* Vol 3 (2) : 21-28
- Ray, B. 2004. *Fundamental Food Microbiology*, 3rd Ed. Boca Raton, Florida. CRC Press. p: 36-40.
- Sanders, M. E and Klaenhammer, T.R., 2000. The Scientific Basis of *L. acidophilus* NCFM Functionality as a probiotic. *J. Dairy Sci.* 84 : 319 – 331
- Saarela, M., Virkajarvi, I., Alakomi, Hanna lena., Mattila, P., S., Matto, J., 2006. Stability and Functionality of Freeze-dried Probiotic *Bifidobacterium* Cells During Storage in Juice and Milk. *International Dairy Journal.* 16 : 1477 – 1482.
- Schlegel, H.G. 1994. *Mikrobiologi Umum*, R.M. Tedjo Baskoro. Yogyakarta. Gajah Mada University Press. hal: 226
- Shortt C. 1999. The Probiotic Century : Historical and Current Perspective. *Revie Trends Food Science and Tech.* 10 : 411-417
- Tamime, A.Y. dan R.K. Robinson. 2002. *Yogurt Science and Technology*. New York. CRC Press. p: 1-9.
- Yoon, K.Y., E.E. Woodams and Y.D. Hang. 2004. Probiotication of Tomato Juice by Lactic Acid Bacteria. *J. Microbiol.* 42 (4) : 315-318