

**PEMBERIAN MINUMAN PROBIOTIK SARI BUAH NANAS TERHADAP
MIKROFLORA DAN STATUS ANTIOKSIDAN TIKUS PERCOBAAN**

(Skripsi)

Oleh

ARIZAL DARMAWAN



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2018**

ABSTRACT

THE ADMINISTRATION OF PINEAPPLE JUICE PROBIOTIC BEVERAGES ON MICROFLORA AND MICE ANTIOXIDANT STATUS

By

ARIZAL DARMAWAN

Pineapple juice probiotic beverages are included into functional foods that contain active components and giving positive effect on health. One of the healthy beneficial effects of probiotics is maintaining the balance of intestinal microflora. Pineapple juice probiotic beverages will give an effect to microflora and antioxidant activity, in consequence, it needs the administration of pineapple juice probiotic beverages to mice. The aim of this study is determining the administration effect of pineapple juice probiotic beverages to microflora and mice antioxidant status. This research method used is Completely Randomized Design (RAL). The experimental mice were divided into two groups for two type of treatments, one group was given pineapple juice probiotic beverages and another was given standard beverages for 30 days. Each treatment was initiated on 0, 10, 20 and 30 day to determine the total BAL, pH, E. coli and antioxidant

activity. Based on this research, there is the best effect of administrating pineapple juice probiotic beverages to intestinal microflora of experimental mice, i.e pineapple juice probiotic beverages can increase population of lactic acid bacteria (BAL) in normal limits and they are able to depress the growth of E.coli. Moreover, the administrating of pineapple juice probiotic beverages has a good effecton pH value in the intestine mice. The best antioxidant status in mice is found after administrating pineapple juice probiotic beverages to them, pineapple juice probiotic beverages works well in depressing free radical in mice body.

Keywords: Probiotic drink, pineapple juice, microflora, antioxidant status, mice.

ABSTRAK

PEMBERIAN MINUMAN PROBIOTIK SARI BUAH NANAS TERHADAP MIKROFLORA DAN STATUS ANTIOKSIDAN TIKUS PERCOBAAN

Oleh

ARIZAL DARMAWAN

Minuman probiotik sari buah nanas termasuk ke dalam makanan fungsional yang memiliki kandungan komponen aktif dan dapat memberi efek positif terhadap kesehatan. Salah satu pengaruh probiotik yang menguntungkan kesehatan adalah mempertahankan keseimbangan mikroflora usus. Minuman probiotik sari buah nanas akan memberikan pengaruh terhadap mikroflora serta aktivitas antioksidan, oleh karena itu perlu adanya percobaan pemberian minuman probiotik sari buah nanas terhadap tikus percobaan. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian minuman probiotik sari buah nanas terhadap mikroflora dan status antioksidan tikus percobaan. Metode penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Tikus percobaan yang dibagi menjadi dua kelompok yang

mendapat dua perlakuan, yaitu satu kelompok diberi minuman probiotik sari buah nanas dan satu kelompok diberi minuman standar selama 30 hari. Masing-masing perlakuan diawali pada hari ke 0, 10, 20 dan 30 untuk mengetahui total BAL, pH, *E.Coli* dan aktivitas antioksidan. Minuman probiotik sari buah nanas dapat meningkatkan populasi bakteri asam laktat (BAL) namun masih dalam batas normal dan BAL yang terdapat di usus tikus percobaan mampu menekan jumlah pertumbuhan *E.coli*. Selain itu pemberian minuman probiotik sari buah nanas juga berpengaruh baik terhadap nilai pH di dalam usus tikus percobaan. Status antioksidan terbaik pada tikus percobaan yaitu setelah tikus diberikan minuman probiotik sari buah nanas, minuman probiotik sari buah nanas berperan baik dalam menekan radikal bebas dalam tubuh tikus percobaan.

Kata kunci: Minuman probiotik, sari buah nanas, mikroflora, status antioksidan, tikus percobaan.

**PEMBERIAN MINUMAN PROBIOTIK SARI BUAH NANAS TERHADAP
MIKROFLORA DAN STATUS ANTIOKSIDAN TIKUS PERCOBAAN**

Oleh

ARIZAL DARMAWAN

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN

Pada

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Pertanian Universitas Lampung



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDARLAMPUNG
2018**

Judul Skripsi : **PEMBERIAN MINUMAN PROBIOTIK SARI
BUAH NANAS TERHADAP MIKROFLORA DAN
STATUS ANTIOKSIDAN TIKUS PERCOBAAN**

Nama Mahasiswa : **Arizal Darmawan**

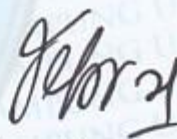
No. Pokok Mahasiswa : 1114051008

Program Studi : Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas : Pertanian

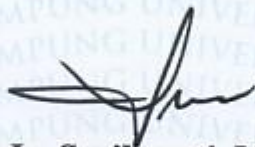


Ir. Samsul Rizal, M.Si.
NIP 19690225 199403 1 002



Ir. Fibra Nurainy, M.T.A.
NIP 19680225 199603 2 001

2. Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian



Ir. Susilawati, M.Si.
NIP 19610806 198702 2 001

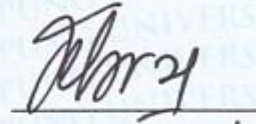
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : **Ir. Samsul Rizal, M.Si.**



Sekretaris : **Ir. Fibra Nurainy, M.T.A.**



Penguji

Bukan Pembimbing : **Dr. Ir. Suharyono, A.S., M.S.**



2. Dekan Fakultas Pertanian



Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si.

NIP. 19611020 198603 1 002



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **06 Juni 2018**

PERNYATAAN KEASLIAN HASIL KARYA

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Arizal Darmawan

NPM : 1114051008

dengan ini menyatakan bahwa apa yang tertulis dalam karya ilmiah ini adalah hasil kerja saya sendiri yang berdasarkan pengetahuan dan informasi yang telah saya dapatkan. Karya ilmiah ini tidak berisi material yang telah dipublikasikan sebelumnya atau dengan kata lain bukanlah hasil dari plagiat karya orang lain.

Demikianlah pernyataan ini saya buat dan dapat dipertanggungjawabkan. Apabila dikemudian hari terdapat kecurangan dalam karya ini, maka saya siap mempertanggungjawabkannya.

Bandar Lampung, Juli 2018
Pembuat pernyataan



Arizal Darmawan
NPM. 1114051008

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Gunung Madu, 18 Maret 1993. Penulis merupakan anak kedua dari tiga bersaudara buah hati pasangan Bapak Hi. Husaini dan Ibu Hj. Suryani.

Penulis menyelesaikan pendidikan Taman Kanak-kanak di TK Satya Dharma Sudjana Gunung Madu pada tahun 1999, Sekolah Dasar di SD Negeri 1 Gunung Madu pada tahun 2005, Sekolah Menengah Pertama di SMP Satya Dharma Sudjana Gunung Madu pada tahun 2008, dan Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 1 Terbanggi Besar pada tahun 2011.

Pada tahun 2011, penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung melalui Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN). Selama menjadi mahasiswa penulis melaksanakan Praktik Umum (PU) di Gunung Madu Plantation Lampung Tengah. Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) Tematik di Desa Baturaja Kecamatan Pesisir Utara Kabupaten Pesisir Barat pada bulan Januari 2016.

Selama kuliah penulis merupakan anggota penuh himpunan mahasiswa HMJ THP FP Unila, dan penulis juga pernah menjadi anggota Bidang 3 (Pengabdian Masyarakat) HMJ THP pada periode 2013-2014.

SANWACANA

Alhamdulillah rabbil 'alamiin, puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas nikmat, petunjuk serta ridho-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si. selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
2. Ibu Ir. Susilawati, M.Si., selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung atas izin penelitian yang diberikan.
3. Bapak Ir. Samsul Rizal, M.Si. selaku pembimbing satu skripsi yang telah banyak memberikan pengarahan, saran, masukan dalam proses penelitian dan kesabaran yang diberikan selama penelitian hingga penulisan skripsi ini selesai.
4. Ibu Ir. Fibra Nurainy, M.T.A. selaku pembimbing dua yang telah banyak memberikan pengarahan, saran, masukan dalam proses penelitian dan kesabaran yang diberikan selama penelitian hingga penulisan skripsi ini selesai.
5. Bapak Dr. Ir. Suharyono, A.S., M.S. selaku pembahas yang telah memberikan pengarahan, saran, masukan dalam proses penelitian dan kesabaran hingga penulisan skripsi ini selesai.

6. Bapak Ir. Samsul Rizal, M.Si. selaku pembimbing akademik yang selalu memberikan arahan dan motivasi hingga penulis menyelesaikan skripsi.
7. Seluruh Bapak dan Ibu dosen pengajar, staf administrasi dan laboratorium di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
8. Kedua orang tua Mamah dan Bapak, Cak Anang, Dek Astri, yang telah memberikan dukungan, motivasi, dan yang selalu menyertai penulis dalam doanya untuk melaksanakan dan menyelesaikan skripsi.
9. *InsyAllah* calon pendamping dunia akhirat Nungky Kurnia Putri, S.Pd., M.Pd. atas bantuan, nasihat serta motivasi yang tulus diberikan untuk penulis.
10. Sahabat penulis Bundo, Dea, Sihol, Shely, Mboy, Icul, Indra, Jon, Oos, Wahyu, Wayan, Isnaini, serta Angkatan 2011 “Janji Gerhana” yang tidak bisa disebutkan satu persatu atas bantuan, keceriaan, dan dukungan yang diberikan selama penulis mengerjakan skripsi.
11. Keluarga besar HMJ THP FP Unila atas segala kebersamaan dan kebahagiaan yang mengisi hari-hari penulis selama kuliah.
12. Teman-teman Toyota Kijang Club Indonesia untuk suka dan duka yang menghiasi kehidupan penulis dan atas kebersamaannya selama ini.

Penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala amal dan kebaikan semua pihak di atas dan skripsi ini dapat bermanfaat. Aamiin.

Bandar Lampung, Juli 2018
Penulis

Arizal Darmawan

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Tujuan Penelitian	4
1.3. Kerangka Pemikiran	4
1.4. Hipotesis	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Pangan Fungsional	6
2.2. Probiotik	7
2.3. <i>Lactobacillus casei</i>	9
2.4. Buah Nanas	11
2.5. Bakteri Asam Laktat (BAL)	13
2.6. <i>Escheria Coli</i>	14
2.7. pH	15
2.8. Antioksidan	17
2.9. Hewan Percobaan	18

III. BAHAN DAN METODE	21
3.1. Tempat dan Waktu	21
3.2. Bahan dan Alat	21
3.3. Metode Penelitian	22
3.4. Pelaksanaan Penelitian	23
3.4.1. Persiapan Starter	23
3.4.2. Pembuatan Sari Buah Nanas	24
3.4.3. Proses Pembuatan Minuman Probiotik Sari Buah Nanas	25
3.4.4. Uji Mikroflora dan Status Antioksidan Menggunakan Tikus Percobaan	26
3.5. Pengamatan	27
3.5.1. Total BAL (Bakteri Asam Laktat)	27
3.5.2. <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>)	28
3.5.3. pH (<i>potential of Hydrogen</i>)	29
3.5.4. Aktivitas Antioksidan	29
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1. Total Bakteri Asam Laktat (BAL) dalam Usus Tikus	31
4.2. Total <i>Escherichia Coli</i> di dalam Usus Tikus	35
4.3. Nilai pH (<i>potential of Hydrogen</i>) Usus Tikus	38
4.4. Aktivitas Antioksidan Darah Tikus	40
V. KESIMPULAN DAN SARAN	43
5.1. Kesimpulan	43
5.2. Saran	43

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kandungan zat gizi yang ada dalam 100g buah nanas	12
2. Total bakteri asam laktat pada mikroflora usus tikus log cfu/gram	31
3. Total <i>E.coli</i> pada mikroflora usus tikus log cfu/gram	35
4. Nilai pH pada usus tikus	38
5. Aktivitas antioksidan darah tikus percobaan	40

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Buah nanas (<i>Ananas sativus</i>)	11
2. Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	19
3. Diagram alir persiapan starter (Rizal, dkk., 2006) yang telah dimodifikasi	24
4. Diagram alir pembuatan sari buah nanas (Rizal, dkk., 2006) yang telah dimodifikasi	25
5. Diagram alir pembuatan minuman probiotik sari buah nanas (Rizal, dkk., 2006) yang telah dimodifikasi	26
6. Grafik total BAL usus tikus percobaan (Hasil Penelitian, 2017)	33
7. Grafik <i>E.coli</i> di dalam usus tikus (Hasil Penelitian, 2017)	37
8. Grafik nilai pH didalam usus tikus (Hasil Penelitian, 2017)	39
9. Grafik aktivitas antioksidan darah tikus (Hasil Penelitian, 2017)	41

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Saat ini jenis makanan yang dikonsumsi oleh masyarakat bukan hanya untuk pemenuhan kepuasan, namun juga harus memiliki manfaat bagi kesehatan. Salah satu jenis makanan ataupun minuman yang memiliki manfaat kesehatan dan banyak dikonsumsi yaitu pangan fungsional. Pangan fungsional merupakan produk pangan dengan ciri-ciri fungsional yang berperan dalam perlindungan atau pencegahan, pengobatan penyakit, pengoptimalan fungsi tubuh, dan memperlambat proses penuaan (Sampoerno dan Fardiaz, 2001).

Minuman probiotik termasuk ke dalam makanan fungsional yang memiliki kandungan komponen aktif dan dapat memberi efek terhadap kesehatan. Minuman probiotik mengandung bakteri asam laktat (BAL) hidup dan merupakan antagonis terhadap pertumbuhan bakteri patogen di dalam saluran pencernaan manusia (Prangdimurti, 2001). Menurut Rizal dan Nurainy (2016), probiotik dikenal sebagai makanan atau minuman kesehatan karena probiotik merupakan bahan pangan dengan kandungan mikroba hidup yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi kesehatan dan kehidupan inangnya. Minuman probiotik

harus mampu memberikan asupan gizi yang baik bagi tubuh dan meningkatkan kesehatan bagi manusia (Ichikawa, 1994).

Salah satu pengaruh probiotik yang menguntungkan kesehatan adalah mempertahankan keseimbangan mikroflora usus. Minuman probiotik atau yang sering disebut sebagai minuman fermentasi asam laktat merupakan minuman yang mampu meningkatkan mikroflora usus dan mampu bertahan hidup pada kondisi keasaman lambung dalam jumlah besar yang memiliki keuntungan bagi saluran pencernaan (Waspodo, 1997).

Salah satu produk probiotik adalah minuman fermentasi laktat dari sari buah nanas. Sari buah nanas merupakan cairan yang diperoleh melalui proses ekstraksi dari buah nanas, yang terbagi menjadi dua yaitu dapat diminum langsung dan difermentasi menjadi minuman kesehatan (Rizal dan Nurainy, 2016). Buah nanas dikenal sebagai salah satu *famili Bromeliaceae* merupakan buah yang kaya akan karbohidrat, terdiri atas beberapa gula sederhana misalnya sukrosa, fruktosa, dan glukosa, serta enzim bromelain yang dapat merombak protein menjadi asam amino agar mudah diserap tubuh, nanas merupakan buah yang terdiri dari sebagian besar daging buah yang banyak mengandung gula, vitamin A, vitamin C dan mengandung mineral yang diperlukan tubuh (Collins, 1960). Kandungan gizi dalam 100 g buah nanas sebagai berikut : air 86 g, kalori 218 kJ, protein 0.5 g, lemak 0.2 g, karbohidrat 13.5 g, serat 0.5 g, dan abu 0.3 g. Kandungan mineralnya sebagai berikut : kalsium 18 mg, besi 0.3 mg, magnesium 12 mg, pospor 12 mg, kalium 98 mg dan Na 1 mg. Kandungan vitamin sebagai

berikut: vitamin C 10 mg, tiamin 0.09 mg, riboflavin 0.04 mg, niasin 0.24 mg dan vitamin A (Irfandi, 2005).

Nanas juga dikenal dengan buah yang kandungan antioksidannya tinggi. Aktivitas antioksidan yang diperankan vitamin C dan A mampu menghambat laju oksidasi molekuler target yang pada gilirannya dapat menghentikan reaksi berantai pembentukan radikal bebas dalam tubuh yang diyakini sebagai dalang atau provokator berbagai penyakit (Sugiarto, 2009).

Minuman probiotik sari buah nanas juga memiliki sifat antioksidan yang berasal dari sari buah nanas. Antioksidan adalah suatu senyawa yang dapat menetralkan dan meredam radikal bebas serta menghambat terjadinya oksidasi pada sel sehingga mengurangi terjadinya kerusakan sel (Rejeki dan Ningsih, 2012).

Namun demikian, belum diketahui jumlah kadar antioksidan yang terdapat pada minuman fermentasi laktat sari buah nanas serta bagaimana pengaruh yang dihasilkan dari pemberian minuman probiotik sari buah nanas terhadap mikroflora usus dan status antioksidan tikus percobaan. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan pengujian untuk mengetahui jumlah kadar antioksidan yang terdapat pada minuman fermentasi laktat sari buah nanas serta pengujian efek pemberian minuman probiotik sari buah nanas terhadap mikroflora usus dan status antioksidan tikus percobaan.

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui pengaruh pemberian minuman fermentasi laktat sari buah nanas terhadap mikroflora usus halus tikus percobaan.
2. Mengetahui status antioksidan pada tikus percobaan setelah perlakuan pemberian minuman fermentasi laktat sari buah nanas.

1.3. Kerangka Pemikiran

Kandungan BAL di dalam minuman probiotik mampu membantu meningkatkan kesehatan mikroflora usus. Syarat minimum nilai total BAL yang baik ialah 10^6 koloni/ml (BSN, 2009). Berdasarkan hasil penelitian Rizal dan Nurainy (2016) menyatakan bahwa nilai total bakteri asam laktat yang dihasilkan oleh minuman probiotik sari buah nanas berkisar antara 11,94 log koloni/ml hingga 12,47 log koloni/ml. Maka nilai total BAL di dalam minuman probiotik sari buah nanas telah memenuhi standar minuman fermentasi laktat.

Salah satu pengaruh probiotik yang menguntungkan kesehatan adalah mempertahankan keseimbangan mikroflora usus. Minuman probiotik atau yang sering disebut sebagai minuman fermentasi asam laktat merupakan minuman yang mampu meningkatkan mikroflora usus dan mampu bertahan hidup pada kondisi keasaman lambung dalam jumlah besar yang memiliki keuntungan bagi saluran pencernaan (Waspodo, 1997). Untuk itu pada penelitian ini perlu dilakukan

pemberian minuman fermentasi laktat sari buah nanas untuk mengetahui pengaruh yang terjadi di dalam mikroflora usus halus tikus percobaan. Usus halus manusia dan hewan memiliki komponen mikroflora normal yang menunjang proses pencernaan makanan. Keseimbangan mikroflora normal usus halus sangat penting untuk menjaga kesehatan saluran pencernaan. Pada hewan tikus, telah dilaporkan jumlah populasi mikroflora normal pada usus sebesar 10^{14} cfu (*colony forming unit*), terdiri atas $0-10^5$ cfu di jejunum dan 10^3-10^9 cfu di ileum (Qi *et al.* 2008). Mikroflora usus yang seimbang dapat menstimulasi sistem imun, memproduksi enzim pencernaan, dan membantu mengontrol pembentukan radikal bebas (Dutcosky *et al.*, 2006). Selain itu, karena produk ini diduga memiliki aktivitas antioksidan yang cukup tinggi, juga akan dilakukan pengujian status antioksidan pada tikus percobaan.

1.4. Hipotesis

1. Terdapat pengaruh pemberian minuman fermentasi laktat sari buah nanas terhadap mikroflora usus halus tikus percobaan.
2. Terdapat status antioksidan pada tikus percobaan setelah perlakuan pemberian minuman fermentasi laktat sari buah nanas.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pangan Fungsional

Menurut Astawan (2009), fungsi utama (primer) pangan bagi tubuh manusia adalah untuk memenuhi kebutuhan yang dibutuhkan oleh tubuh sesuai dengan jenis kelamin, umur, berat badan, serta aktivitas fisik yang dikeluarkan sehari-hari. Selain fungsi primer, bahan pangan juga memiliki fungsi sekunder, yaitu memiliki penampilan dan cita rasa yang baik. Seiring berjalannya waktu akan kesadaran masyarakat dengan pentingnya hidup sehat, maka permintaan konsumen terhadap bahan pangan juga semakin meningkat.

Menurut Badan POM, pangan fungsional adalah pangan yang secara alami atau pangan yang telah melalui tahapan proses, yang mengandung senyawa dan mempunyai fungsi-fungsi fisiologis bagi kesehatan tubuh, yang layak dikonsumsi berupa makanan atau minuman, serta memiliki karakteristik sensori yang dapat diterima oleh konsumen, seperti: warna, tekstur, atau cita rasa.

Menurut Ardiansyah (2008), perkembangan dalam ilmu pengetahuan, teknologi pangan dan farmasi yang mulai pesat telah membuktikan bahwa sebagian besar jenis-jenis pangan yang diyakini orang terdahulu memiliki manfaat sebagai

kesehatan serta pengobatan. Sebagian besar kandungan yang ada dalam bahan pangan telah dapat diidentifikasi serta diisolasi. Perkembangan inilah yang mendorong munculnya berbagai produk pangan fungsional dengan manfaat dan khasiatnya. Dimasa depan kita pasti tidak ingin bergantung diri pada produk pangan fungsional yang diproduksi diluar negeri tetapi memakai bahan baku dari dalam negeri, atau diproduksi dengan memakai lisensi dari negara lain sedangkan kandungan pangan fungsional tersebut adalah kandungan yang dihasilkan dari bahan baku pangan kita.

2.2. Probiotik

Probiotik merupakan mikroba hidup yang dapat menguntungkan bagi sel inang karena dapat meningkatkan keseimbangan mikroflora usus. Untuk mendapatkan *strain-strain* probiotik yang unggul maka dilakukan seleksi mikroba khususnya bakteri asam laktat (BAL). Hal ini dikarenakan tidak semua BAL berpotensi menjadi probiotik (Fuller, 1989). Menurut Winarno (1997), probiotik merupakan mikroba hidup pada suatu preparat yang dimasukkan ke organ manusia atau hewan ternak secara oral. Yang diharapkan dari probiotik adalah mampu memberikan hal positif bagi kesehatan manusia atau hewan ternak, dengan cara yaitu memperbaiki sifat-sifat yang dimiliki oleh mikroba alami yang ada di dalam saluran pencernaan makhluk hidup.

Probiotik adalah mikroba hidup yang menempel pada dinding usus dan bersifat menguntungkan bagi kesehatan inangnya (Salminen *et al.* 1999), Hull *et al.*

(1992) menyatakan probiotik sebagai suplemen makanan yang menguntungkan bagi manusia atau hewan dengan cara menjaga keseimbangan mikroba indigenus. Bakteri probiotik menurut *Food and Agriculture Organization* (FAO) dalam Burn et al. (2008) adalah mikroorganisme hidup yang bila diberikan dalam jumlah yang cukup akan memberikan manfaat kesehatan bagi penggunanya. Salah satu karakteristik terpenting yang diperlukan untuk pemilihan kandidat probiotik adalah ketahanan terhadap keasaman asam lambung dan garam empedu (Hattingh & Viljoen 2001).

Beberapa syarat yang harus dipenuhi oleh bakteri asam laktat yang berfungsi sebagai probiotik antara lain (Salminen et al. 2004):

- 1) Stabil terhadap asam (terutama asam lambung).
- 2) Stabil terhadap garam empedu dan mampu bertahan hidup selama berada pada bagian atas usus kecil.
- 3) Memproduksi senyawa antimikroba antara lain asam-asam organik, hidrogen peroksida dan bakteriosin.
- 4) Mampu menempel dan mengkolonisasi sel usus manusia.
- 5) Tumbuh baik dan berkembang dalam saluran pencernaan.
- 6) Aman digunakan oleh manusia.
- 7) Koagregasi membentuk lingkungan mikroflora yang normal dan seimbang.

Keberadaan bifidobakteri dan laktobasili dalam saluran pencernaan penting untuk menjaga keseimbangan ekosistem mikroflora dalam usus (Bernet et al.1993).

Bakteri-bakteri ini menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap bakteri patogen

Listeria monocytogenes, *E. Coli*, dan *Salmonella sp.* (Jenie 2003). Bakteri asam laktat menghasilkan asam organik, hidrogen peroksida, bakteriosin untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen.

Jumlah sel mikroba hidup yang harus terdapat pada produk probiotik masih menjadi perdebatan, akan tetapi umumnya adalah sebesar 10⁶-10⁸ cfu/g (Tannock 1999) dimana jumlah (viabilitas) mikroorganisme setelah melalui saluran pencernaan adalah sekitar 10⁶-10⁷ cfu/g mukosa (Charterist et al. 1998).

Charterist *et al.* (1998) juga menyatakan bahwa jumlah minimal mikroorganisme probiotik dalam bioproduk untuk dapat memberikan manfaat kesehatan adalah 10⁷-10⁸ cfu/g produk. Codex standar: 243 (2003), menguatkan bahwa jumlah mikroba hidup yang diinginkan dalam suatu produk susu fermentasi yaitu minimal 10⁶ cfu/g. Jenie (2003) menyatakan bahwa permasalahan yang dihadapi oleh kultur probiotik adalah pertumbuhannya yang lambat, serta sifat sensori seperti flavour yang kurang baik. Permasalahan ini dapat diatasi dengan penggunaan kultur starter campuran sehingga lama fermentasi dapat direduksi serta menghasilkan sifat sensori dan tekstur yang lebih baik.

2.3. *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei merupakan bakteri G positif, anaerob fakultatif, non-motil, tidak membentuk spora, dan berbentuk batang. Bakteri ini sama seperti bakteri asam laktat lainnya, *L. casei* bersifat toleran terhadap asam, tidak dapat mensintesis porfirin, dan menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir

metabolisme. Bakteri ini termasuk ke dalam *genus Lactobacillus* yang bersifat fakultatif hetero fermentatif (Axelsson 1998). *Lactobacillus casei* dapat tumbuh antara suhu 15 –45 0C dan membutuhkan riboflavin, asam folat, kalsium pantotenat, dan niasin. Bakteri ini termasuk spesies yang adaptif dan dapat diisolasi dari susu yang mentah dan yang telah difermentasi, usus manusia dan hewan lainnya (Kandler & Weiss 1986). Pada industri makanan, *L. casei* digunakan sebagai kultur awal untuk fermentasi susu, mempercepat dan memperbesar pembentukan rasa pada varietas keju tertentu, dan saat ini juga digunakan sebagai probiotik (Fonden et al. 2000). Hutkins (2006) menegaskan bahwa *L. Casei* sering digunakan sebagai kultur pembuatan keju dan produk-produk fermentasi susu lainnya.

Lactobacillus casei menghasilkan peptidase dan enzim hidrolase protein lainnya yang diperlukan untuk membentuk rasa dan tekstur produk yang tepat. Selain itu, *L. casei* menghasilkan asam sitrat, komponen diasetil rasa, dan gas karbon dioksida. Proses pengasaman susu yang dilakukan oleh bakteri ini lambat sehingga membantu mengurangi pengendapan protein pada produk (Kang & Lee 1985). Menurut Mitsuoka (1990), *L. casei* diisolasi dari keju dan merupakan flavor utama keju. Nama pertama yang diberikan adalah *Bacillus casei*, “*casei*” adalah nama latin untuk keju. Sebagai mikroorganisme yang meningkatkan kesehatan, *Lactobacillus casei* telah digunakan pada kombinasi yang berbeda dengan kultur bakteri asam laktat lainnya untuk memproduksi produk-produk fermentasi. (Tamime & Robinson 2007).

2.4. Buah Nanas

Buah nanas yang memiliki nama latin *Ananas sativus* merupakan salah satu jenis buah tropis yang tersedia banyak di Indonesia, khususnya di Sumatra dan Jawa. Kata *Ananas* berasal dari daerah di negara Brazil yang merupakan kependekan dari kata *pine ananas* dan kata *comosus* yang berarti “berumbai” yang berdasarkan pada bentuk batang buah yang memiliki daun berumbai-umbai (Fianti, 2010).

Klasifikasi buah nanas (*Ananas sativus*) :

Divisi : *Spermatophyta*
Subdivisi : *Angiospermae*
Kelas : *Angiospermae*
Bangsa : *Farinosae (Bromeliales)*
Famili : *Bromiliaceae*
Marga : *Ananas*
Varietas : *Ananas sativus*

Sumber: Muslinah (2000).



Gambar 1. Buah nanas (*Ananas sativus*) (Muslinah, 2000).

Kandungan air yang terdapat dibuah nanas sebanyak 90%. Selain itu, nanas memiliki kandungan karbohidrat berupa gula saat dipanen. Dalam daging buah nanas terdapat karbohidrat pati yang dapat diubah secara langsung menjadi gula ketika nanas mengalami proses pemasakan (Herliani, 2010). Berikut kandungan yang ada dalam buah nanas dapat disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan zat gizi yang ada dalam 100 g buah nanas.

Keterangan	Jumlah
Energi (kkal)	50
Karbohidrat (g)	12,63
Serat (g)	9,26
Lemak (g)	1,40
Protein (g)	0,12
Gula (g)	0,54
Thiamin (Vit. B1) (mg)	0,079
Riboflavin (Vit. B2) (mg)	0,031
Niacin (Vit. B3) (mg)	0,489
Pantothenic acid (Vit. B5) (mg)	0,205
Vitamin B6 (mg)	0,110
Folate (Vit. B9) (mg)	15
Vitamin C (mg)	36,2
Kalsium (mg)	13
Besi (mg)	0,28
Magnesium (mg)	12
Fosfor (mg)	8
Potassium (mg)	115
Zinc (mg)	0,10

Sumber: Herliani, 2010

Nanas memiliki banyak manfaat bagi kesehatan tubuh kita antara lain yaitu antioksidan, antibakteri, dan antifungi yang terdapat pada *saponin, flavonoid, dan polifenol* dari buah nanas tersebut (Daniswara, 2008). Nanas juga merupakan salah satu buah yang mengandung banyak mineral antara lain: kalsium, potasium, mangan magnesium, dan fosfor. Beberapa mineral tersebut sangat dibutuhkan

oleh tubuh kita untuk memproduksi enzim *Superoxide Dismutase* (SOD) yang berfungsi sebagai antioksidan endogen (Lingga, 2012). Selain itu, di dalam buah nanas terkandung vitamin A, C dan betakaroten, kalsium, fosfor, magnesium, besi, natrium, kalium dan enzim bromelin. Kandungan seratnya dapat mempermudah buang air besar pada penderita sembelit (Septiatin, 2009). Kandungan yang ada di dalam buah nanas sebagai antioksidan semakin lengkap karena buah nanas mengandung banyak vitamin C dan β -karoten yang cukup tinggi. Vitamin C inilah yang dikenal sebagai antioksidan penumpas radikal bebas.

2.5. Bakteri Asam Laktat (BAL)

Bakteri asam laktat (BAL) adalah kelompok bakteri G positif yang berbentuk batang atau kokus, tidak membentuk spora, bersuhu optimum $\pm 40^{\circ}\text{C}$, memiliki sifat anaerob, sebagian besar tidak motil, berkatalase negatif dan oksidase positif, dan dengan asam laktat sebagai produk utama fermentasi karbohidrat. Bakteri asam laktat memiliki beberapa sifat khusus yaitu mampu tumbuh pada kadar gula, alkohol, serta garam yang tinggi, dan juga mampu memfermentasi monosakarida dan disakarida (Syahrurahman, 1994). BAL juga memiliki sifat probiotik yang merupakan suatu kumpulan mikroba hidup yang dapat menguntungkan kesehatan dengan cara memperbaiki komposisi mikrobiota usus. Maka dari itu, BAL yang memiliki sifat probiotik ini memiliki banyak memberikan sisi positif antara lain yaitu antimikroba, aktivitas antikolesterol, efek stimulasi sistem imun, meningkatkan penyerapan laktosa oleh tubuh, dapat

mencegah diare, dan juga dapat mencegah penyakit kanker usus karena adanya aktivitas antimutagenik (Fuller, 1992; Surono, 2004; dan Hill, 1995).

Suatu BAL memiliki sifat probiotik apabila memiliki syarat sebagai berikut, antara lain: memiliki ketahanan terhadap asam dan garam empedu, serta aktivitas antagonistik terhadap bakteri patogen (Gillilan *et al.*, 1984 dan Salminen, 1993). Sedangkan pada produk fermentasi asam laktat, perlu ditambahkan susu skim serta glukosa sebagai sumber energi bagi BAL yang diinokulasikan untuk pertumbuhan BAL itu sendiri. Susu skim yang mengandung protein dan juga laktosa, serta glukosa yang akan difermentasi oleh kultur BAL menjadi asam laktat yang akan menurunkan pH produk dan memberikan rasa yang khas pada produk tersebut (Cahyono, 1996). Selain itu juga, penambahan susu skim ini bertujuan untuk memperbaiki flavor dan juga tekstur produk yang dihasilkan, sedangkan penambahan glukosa bertujuan untuk merangsang BAL dan meningkatkan kekentalan produk (Paul dan Southgate, 1998).

2.6. *Escherichia coli*

E. coli dari anggota *famili Enterobacteriaceae*. Ukuran sel dengan panjang 2,0 – 6,0 µm dan lebar 1,1 – 1,5 µm. *E. coli* berbentuk batang dan merupakan bakteri G negatif yang tidak berspora. Selnya bisa terdapat tunggal, berpasangan, dan dalam rantai pendek, biasanya tidak berkapsul. Bakteri ini bersifat aerobik dan dapat juga anaerobik fakultatif. *E. coli* merupakan penghuni normal usus, seringkali menyebabkan infeksi (Pelczar dan Chan, 1986) Biasanya *E. coli* bergerak dengan

flagella peritrik. *E. coli* memiliki macam– macam fimbria atau pili sesuai struktur dan spesifitas antigen, antara lain filamentus dan proteinaceus. Fimbria merupakan rangkaian hidrofobik dan merupakan organ spesifik yang bersifat adhesi.

E. coli merupakan bakteri fakultatif anaerob, kemoorganotropik, mempunyai tipe metabolisme fermentasi dan respirasi tetapi pertumbuhannya paling sedikit banyak di bawah keadaan anaerob. Pertumbuhan yang baik pada suhu optimal 37°C pada media yang mengandung 1% peptone sebagai sumber karbon dan nitrogen. *E. coli* memfermentasikan laktosa dan memproduksi indol yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri pada makanan dan air. *E. coli* berbentuk besar (2-3 mm), circular, konveks dan koloni tidak berpigmen pada nutrien dan media darah. *E. coli* dapat bertahan hingga suhu 60°C selama 15 menit atau pada 55°C selama 60 menit (Fardiaz, 1992).

2.7. Nilai pH

pH atau derajat keasaman digunakan untuk menyatakan tingkat keasaman atau basa yang dimiliki oleh suatu zat, larutan atau benda. pH normal memiliki nilai 7 sementara bila nilai $pH > 7$ menunjukkan zat tersebut memiliki sifat basa sedangkan nilai $pH < 7$ menunjukkan keasaman. pH 0 menunjukkan derajat keasaman yang tinggi, dan pH 14 menunjukkan derajat kebasaaan tertinggi.

Umumnya indikator sederhana yang digunakan adalah kertas lakmus yang berubah menjadi merah bila keasamannya tinggi dan biru bila keasamannya rendah. Selain menggunakan kertas lakmus, indikator asam basa dapat diukur dengan pH meter yang berkerja berdasarkan prinsip elektrolit / konduktivitas suatu larutan. Sistem pengukuran pH mempunyai tiga bagian yaitu elektroda pengukuran pH, elektroda referensi dan alat pengukur impedansi tinggi. Istilah pH berdasarkan dari “p”, lambang matematika dari negatif logaritma, dan “H”, lambang kimia dari unsur Hidrogen.

Asam dan basa adalah besaran yang sering digunakan untuk pengolahan sesuatu zat, baik di industry maupun kehidupan sehari-hari, pada industri kimia, keasaman merupakan variabel yang menentukan mulai dari pengolahan bahan baku, menentukan kualitas produksi yang diharapkan sampai pengendalian limbah industry agar dapat mencegah pencemaran pada lingkungan. Pada bidang pertanian, keasaman pada waktu mengelola tanah pertanian perlu diketahui. Untuk mengetahui dasar pengukuran derajat keasaman akan diuraikan dahulu pengertian derajat keasaman itu sendiri.

Pada prinsipnya pengukuran suatu pH adalah didasarkan pada potensial elektro kimia yang terjadi antara larutan yang terdapat di dalam elektroda gelas (membran gelas) yang telah diketahui dengan larutan yang terdapat diluar elektroda gelas yang tidak diketahui. Hal ini dikarenakan lapisan tipis dari gelembung kaca akan berinteraksi dengan ion hydrogen yang ukurannya relatif kecil dan aktif, elektroda gelas tersebut akan mengukur potensial elektro kimia dari ion hydrogen.

Untuk melengkapi sirkuit elektrik dibutuhkan elektroda pembanding. Sebagai catatan alat tersebut tidak mengukur arus tetapi hanya mengukur tegangan.

2.8. Antioksidan

Antioksidan adalah zat yang diperlukan tubuh untuk menangkap radikal bebas yang terbentuk secara berlebih di dalam tubuh (Prakasih, 2001). Radikal bebas adalah atom atau molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif. Hal ini disebabkan karena radikal bebas mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Antioksidan memiliki peranan yang sangat penting dalam memerangi radikal bebas. Antioksidan dalam tubuh bermanfaat untuk mencegah reaksi oksidasi yang ditimbulkan oleh radikal bebas baik berasal dari metabolisme tubuh maupun faktor eksternal lainnya, seperti cahaya matahari, bakteri, dan lain-lain. Radikal bebas akan bereaksi dengan molekul di sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron supaya mencapai kestabilan atom atau molekul. Reaksi ini berlangsung terus menerus dalam tubuh dan bila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit degeneratif, seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, serta penyakit lainnya (Kikuzaki dan Nakatani, 1993).

Radikal bebas yang beredar dalam tubuh berusaha untuk merusak elektron yang ada pada molekul lain dalam tubuh. Kerusakan yang ditimbulkan dapat menyebabkan molekul yang terdapat pada sel dalam tubuh menjadi tidak stabil yang berpotensi menyebabkan proses penuaan dan kanker. Oleh karena itu, diperlukan antioksidan sebagai senyawa pendonor elektron kepada senyawa yang

bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut bisa dihambat (Winarsi, 2007).

2.9. Hewan Percobaan

Hewan percobaan (experimental animal) merupakan hewan vertebrata yang kehidupannya dipisahkan dari habitat alaminya untuk digunakan sebagai keperluan penelitian, pendidikan, dan pengujian. Penggunaan hewan percobaan antara lain untuk peramalan efek yang akan terjadi pada manusia, fisiologik, patologik, toksikologi, pencegahan, diagnosis infeksi, keracunan pada manusia dan hewan, dan analisis preparat yang tidak dapat diperiksa dengan metode fisik (Isbagio, 1992). Hewan percobaan adalah hewan yang sengaja dipelihara dan ditenakkan untuk dipakai sebagai hewan model guna mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pangamatan laboratorik. Tikus termasuk hewan percobaan mamalia, oleh sebab itu dampaknya terhadap suatu perlakuan mungkin tidak jauh berbeda dibanding dengan mamalia lainnya (Smith and Mangkoewidjojo, 1988).

Berikut merupakan taksonomi tikus (Robinson, 1979) :

Kingdom	: Animal
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata (Craniata)
Kelas	: Mamalia
Subkelas	: Theria
Infrakelas	: Eutharia
Ordo	: Rodentia

Subordo : Myomorpha
Superfamili : Muroidea
Famili : Muridae
Subfamili : Murinae
Genus : Rattus
Spesies : *Rattus sp.*



Gambar 2. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Robinson, 1979).

Dalam penggunaan hewan percobaan dalam penelitian perlu diperhatikan kondisi internal maupun eksternal kandangnya, cara pemberian pakan serta cara perlakuan terhadap hewan percobaan tersebut. Ruang yang digunakan harus bisa menyesuaikan dengan kebutuhan hidup hewan percobaan tersebut, yaitu dengan suhu ruangan antara 22° - 30°C, dengan kelembapan relatif 30 – 70%, penerangan 12 jam terang dan 12 jam gelap, serta kebersihan ruangan yang harus selalu dijaga. Selain itu juga, kandang yang digunakan sebaiknya kandang yang terbuat dari material kedap air, kuat, dan mudah untuk dibersihkan (BPOM RI, 2004).

Kebutuhan pakan bagi seekor tikus setiap harinya yaitu $\pm 10\%$ dari berat badan tikus tersebut jika pakan tersebut berupa pakan kering dan jika pakannya berupa pakan basah maka dapat ditingkatkan menjadi $\pm 15\%$ dari berat badan tikus.

Sedangkan kebutuhan minum seekor tikus setiap harinya yaitu sekitar 15-30 ml air. Jumlah kebutuhan minum ini dapat berkurang jika pakan yang dikonsumsi sudah memiliki kandungan air yang berlebih (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

Selain dari faktor internal, hal lain yang perlu diperhatikan yaitu dari segi eksternal hewan percobaan adalah perkandangan yang baik. Kandang yang digunakan untuk memelihara tikus biasanya berupa kotak yang terbuat dari plastik. Lalu tutup yang digunakan sebagai penutup kandang berupa kawat dengan ukuran lubang $1,6 \text{ cm}^2$ dan biasanya dengan alas dari guntingan kertas, serutan kayu, serbuk gergaji, atau sekam padi. Temperatur ideal untuk kandang hewan percobaan ini yaitu $18-27^\circ\text{C}$ atau rata-rata 22°C (Malole dan Pramono, 1989).

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Hasil Pertanian dan Laboratorium Analisis Hasil Pertanian, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung pada bulan Agustus 2017 - Oktober 2017.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang dipergunakan meliputi nanas madu yang diperoleh dari pedagang di daerah Raja Basa, kultur *Lactobacillus casei*, air mineral, glukosa, susu skim, MRS Agar sebagai media tumbuh Bakteri Asam Laktat dan MRS Broth untuk pembuatan kultur, *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC), akuades, PP, NaOH 0,1N, larutan NaCl, alkohol 70%, dan tikus (*Rattus norvegicus*).

Alat-alat yang digunakan terdiri dari tabung reaksi, cawan petri, inkubator 37°C, oven 60°C, autoclave 121 °C, lampu bunsen, neraca analitik (ketelitian 0,0001 g), pipet tip, tisu, sendok, blender, baskom, pisau, kain saring, hot plate stirrer, gelas

ukur, labu Erlenmeyer, aluminium foil, mikro pipet, alat gelas lainnya dan lemari pendingin atau refrigerator.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan sari buah nanas yang dijadikan minuman probiotik. Buah nanas yang dipilih buah nanas madu varietas Queen yang cukup matang, berwarna kuning oranye, dan layak dikonsumsi. Kemudian buah nanas diambil sarinya lalu sari buah nanas dijadikan minuman probiotik. Proses pembuatan minuman probiotik sari buah nanas diterapkan dengan metode pembuatan minuman probiotik dari kulit nanas yang dilakukan oleh Rizal, dkk., (2006). Sari buah yang didiamkan selama ± 30 menit dalam suhu ruang untuk memisahkan endapan selanjutnya ditambahkan susu skim dan gula sebanyak 4 % (b/v) dan 2% (b/v) serta CMC 0,2 % (b/v) pada minuman.

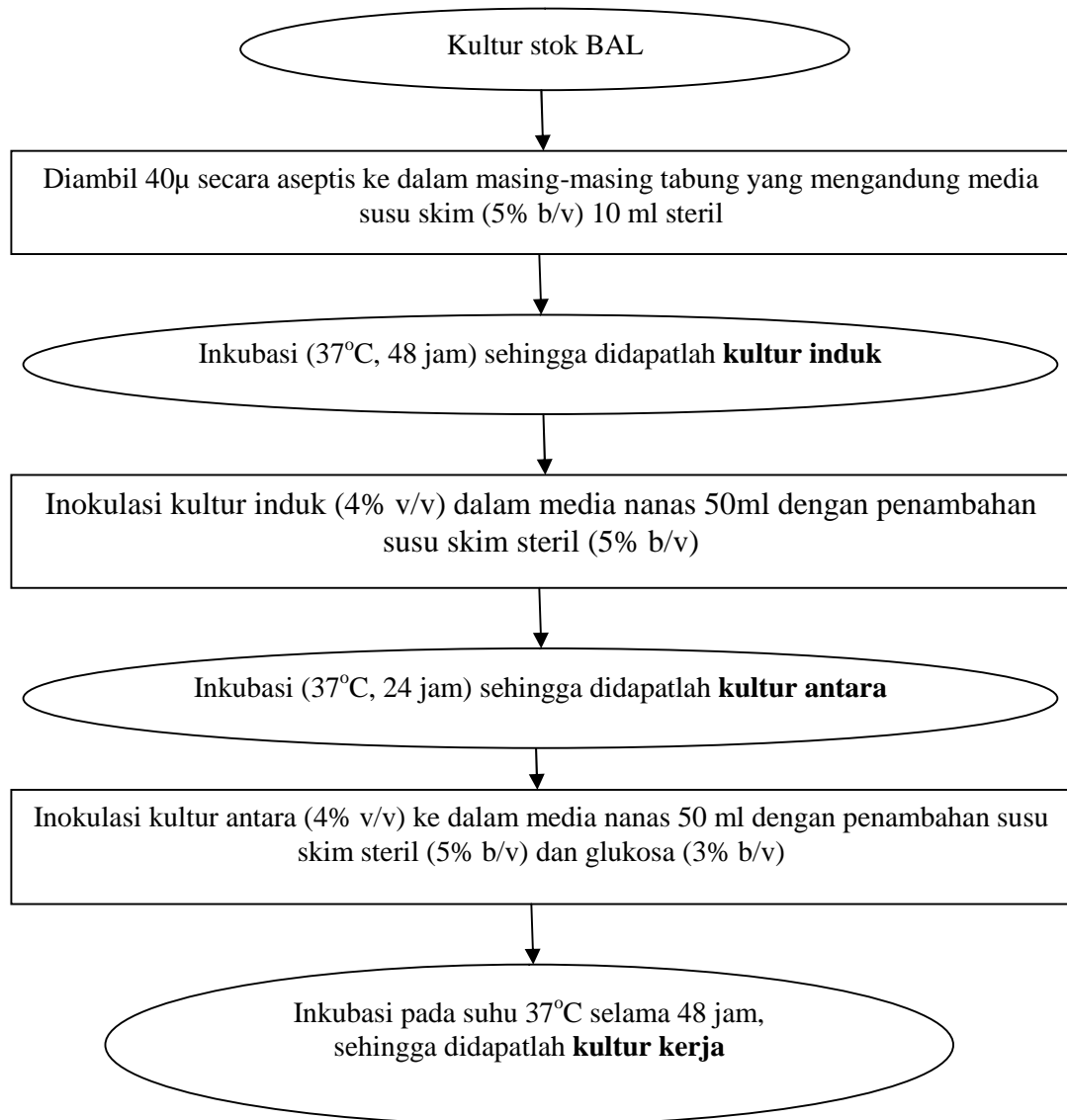
Penelitian dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Dalam penelitian ini menggunakan tikus percobaan yang dibagi menjadi dua kelompok yang mendapat dua perlakuan, yaitu satu kelompok diberi minuman probiotik sari buah nanas dan satu kelompok diberi minuman standar selama 30 hari. Masing-masing perlakuan diawali pada hari ke 0, 10, 20 dan 30 untuk mengetahui total BAL, pH, *E. Coli* dan aktivitas antioksidan. Pada masing-masing perlakuan terhadap 5 tikus (5 ulangan). Pada kondisi awal, tikus percobaan yang tidak diberi perlakuan diamati juga total BAL, pH, *E. Coli* dan aktivitas

antioksidannya. Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel dan dianalisis secara deskriptif.

3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Persiapan Starter

Pembuatan starter dilakukan dengan metode Rizal, dkk., (2006) yang dimodifikasi. Kultur bakteri yang akan digunakan dipindah ke tabung reaksi berisi MRS Broth steril, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C. Kemudian sebanyak 40 μ ditumbuhkan ke dalam susu skim 5 % (b/v) steril 10 ml. Kultur ini disebut kultur induk. Selanjutnya dari kultur induk diinokulasikan ke dalam media susu skim (5% b/v) dan glukosa (3% b/v) dalam media nanas 50 ml, dan diinkubasi selama 48 jam sehingga didapat kultur antara. Kultur antara diinokulasikan sebanyak 4% (v/v) ke dalam media susu skim 5% (b/v) dengan penambahan 3% (b/v) glukosa steril dalam media nanas 50 ml. Inkubasi dilakukan selama 48 jam pada suhu 37°C, sehingga didapatkan kultur kerja. Diagram proses pembuatan starter dapat dilihat pada Gambar 3.

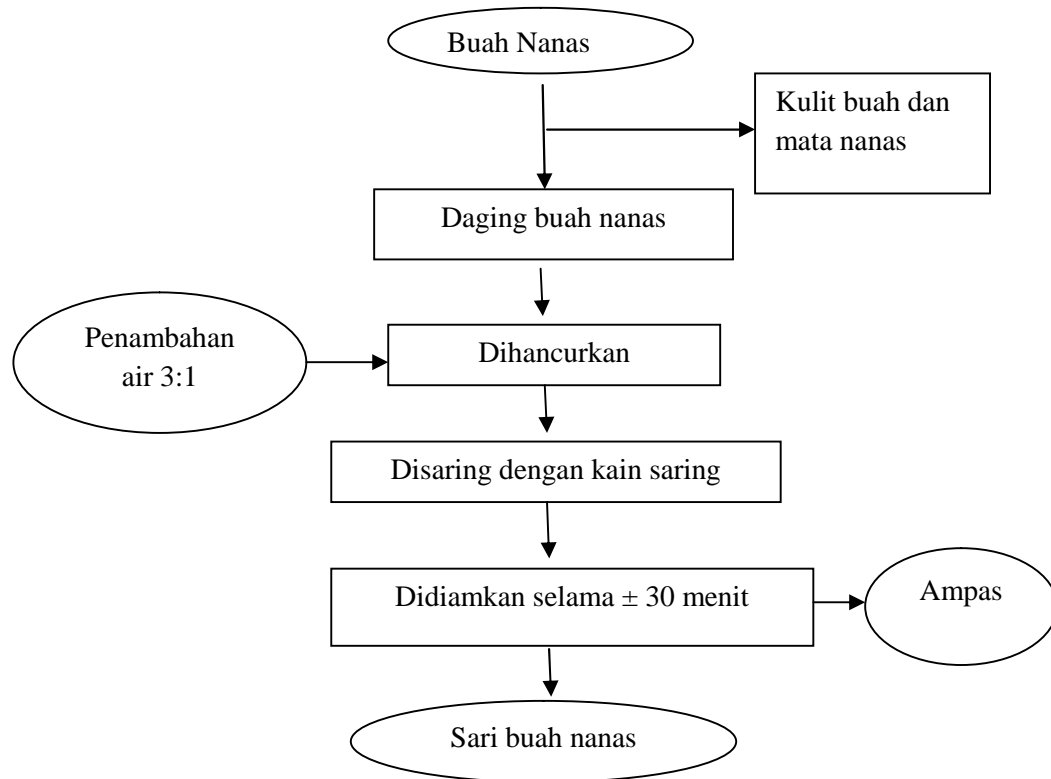


Gambar 3. Diag alir persiapan starter (Rizal, dkk., 2006) yang dimodifikasi.

3.4.2. Pembuatan Sari Buah Nanas

Buah nanas yang dipilih buah nanas madu varietas Queen yang cukup matang, berwarna kuning oranye, dan layak dikonsumsi. Buah nanas mula-mula dikupas kulitnya dan dibersihkan mata nanasnya baru dicuci. Tahap selanjutnya dilakukan penghancuran buah menggunakan blender, kemudian dilakukan penyaringan

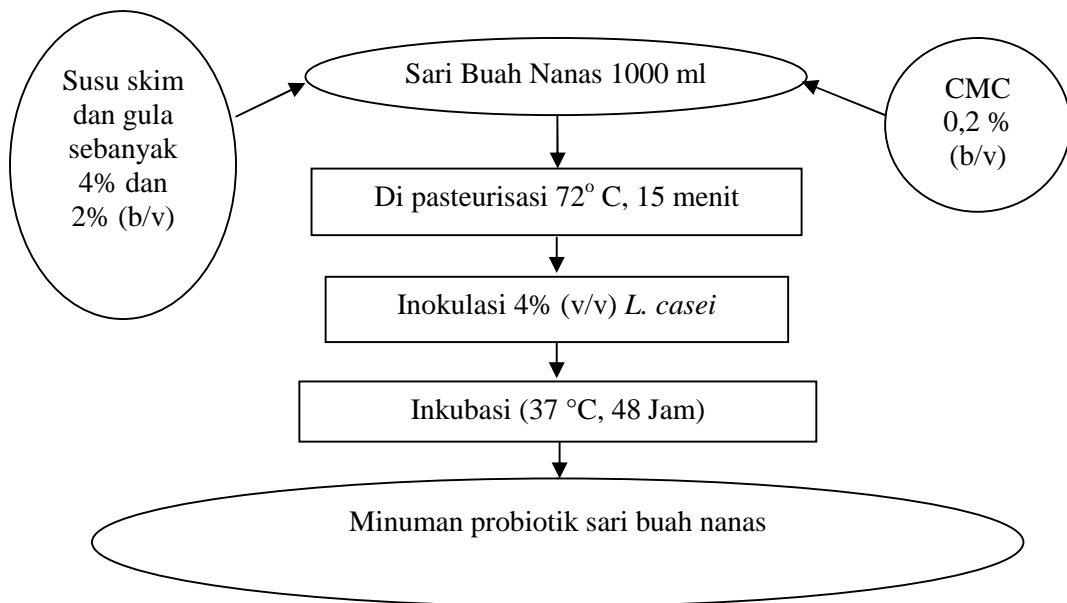
sehingga diperoleh sari buah nanas. Diag alir pembuatan sari buah nanas dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Diag alir pembuatan sari buah nanas (Rizal, dkk., 2006) yang dimodifikasi.

3.4.3. Proses Pembuatan Minuman Probiotik Sari Buah Nanas

Proses pembuatan minuman probiotik sari buah nanas diterapkan dengan metode pembuatan minuman probiotik dari kulit nanas yang dilakukan oleh Rizal, dkk., (2006). Sari buah yang didiamkan selama ± 30 menit dalam suhu ruang untuk memisahkan endapan selanjutnya ditambahkan susu skim dan gula sebanyak 4 % (b/v) dan 2% (b/v) serta CMC 0,2 % (b/v) pada minuman. Diag alir pembuatan minuman probiotik sari buah nanas dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Diag alir pembuatan minuman probiotik sari buah nanas (Rizal, dkk., 2006) yang dimodifikasi.

3.4.4. Uji Mikroflora dan Status Antioksidan Menggunakan Tikus Percobaan

Pengujian menggunakan tikus diawali dengan mengadaptasi tikus sebanyak 40 ekor. Adaptasi tikus dilakukan selama 3 hari dengan memberikan ransum standar dengan tujuan agar tikus dapat menyesuaikan diri dengan kondisi kandang. Selanjutnya tikus dibagi menjadi dua kelompok yang mendapat dua perlakuan, yaitu satu kelompok diberi minuman probiotik sari buah nanas dan satu kelompok diberi minuman standar selama 30 hari. Pada kondisi awal yaitu pada hari ke 0, tikus percobaan sebanyak 5 ekor yang tidak diberi perlakuan diamati total BAL, pH, *E.Coli* dan aktivitas antioksidannya. Selanjutnya tikus percobaan tersisa 35 ekor, 5 ekor tikus dipisahkan sebagai tikus cadangan. 30 ekor tikus lainnya dibagi menjadi dua kelompok yaitu masing-masing kelompok terdiri dari 15 ekor tikus untuk mendapat perlakuan pemberian minuman probiotik sari buah nanas dan

minuman standar. Pada hari ke 10 dari masing-masing kelompok tikus percobaan yang diberi perlakuan diambil masing-masing 5 ekor untuk diamati total BAL, pH, *E.Coli* dan aktivitas antioksidannya. Pada hari ke 20 dari masing-masing kelompok diambil 5 ekor tikus percobaan untuk diamati juga total BAL, pH, *E.Coli* dan aktivitas antioksidannya. Pada hari ke 30 dari masing-masing kelompok diambil 5 ekor tikus percobaan untuk diamati juga total BAL, pH, *E.Coli* dan aktivitas antioksidannya. Untuk mengamati hal tersebut, dilakukan pembedahan pada tikus percobaan untuk diamati organ tubuhnya yaitu pada usus tikus dan darah tikus. Langkah berikutnya mencari rata-rata dari data yang diperoleh dari tiap-tiap perlakuan pada tikus percobaan pada hari ke 0, 10, 20 dan 30.

3.5. Pengamatan

3.5.1. Total BAL (Bakteri Asam Laktat)

Total BAL pada mikroflora usus tikus percobaan diukur dengan metode cawan tuang (Fardiaz, 1992), yaitu sebanyak 1 ml sampel dimasukkan ke dalam 9 ml larutan garam fisiologis steril. Campuran tersebut diperoleh pengenceran 10⁻¹. Campuran kemudian dihomogenkan dan diambil 1 ml larutan dari tabung pertama dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berikutnya yang berisi 9 ml larutan garam fisiologis sehingga diperoleh pengenceran 10⁻² dan seterusnya sampai diperoleh pengenceran yang sesuai (10⁻⁸ sampai dengan 10⁻¹⁰). Pengenceran yang dikehendaki diambil 1 ml sampel dengan pipet lalu dimasukkan ke dalam cawan

petri steril, kemudian ditambahkan kira-kira 15 ml media MRS Agar steril. Cawan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dan dihitung koloni yang tumbuh menggunakan Colony Counter. Total koloni yang terhitung harus memenuhi standar *International Commission Microbiology of Food (ICMF)* yaitu antara 30 sampai 300 koloni per cawan petri.

3.5.2. *Eschericia coli (E.coli)*

Pengukuran *E.Coli* pada mikroflora usus tikus percobaan diukur menggunakan metode *Total Plate Count (TPC)* (Fardiaz, 1992). Pengamatan *Eschericia coli* dilakukan dengan cara tikus dibedah kemudian dipisahkan mikroflora usus tikus dari organ tubuh tikus. Menurut Waluyo (2005), tahap pengenceran dimulai dari membuat larutan sampel sebanyak 10 ml (campuran 1 ml/gr sampel dengan 9 ml larutan fisiologis). Dari larutan tersebut diambil sebanyak 1 ml dan masukkan ke dalam 9 ml larutan fisiologis sehingga didapatkan pengenceran 10⁻². Dari pengenceran 10⁻² diambil lagi 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml larutan fisiologis sehingga didapatkan pengenceran 10⁻³, begitu seterusnya sampai mencapai pengenceran yang diharapkan. Setelah dilakukan pengenceran, kemudian penanaman ke media *eosin methylene blue agar (EMBA)*.

Penanaman menggunakan metode *Total Plate Count (TPC)* yaitu sampel sebanyak 0,1 ml dari masing-masing pengenceran dituangkan ke permukaan media agar yang steril dan padat. Sampel diambil menggunakan jarum ose yang telah disterilkan lalu digoreskan keseluruhan permukaan agar. Populasi *E.Coli*

dihitung dari cawan petri setelah diinkubasi selama 48 jam. Perhitungan *E. Coli* dapat menggunakan rumus *Total Plate Count (TPC)* adalah sebagai berikut :

$$\text{Jumlah Bakteri} = \text{Jumlah Koloni} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}} \text{ cfu/g}$$

3.5.3. pH (*potential of Hydrogen*)

Pengukuran nilai pH pada mikroflora tikus percobaan diukur menggunakan pH meter (Fardiaz, 1992). Sebelum dilakukan pengukuran, pH meter harus dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan larutan penyangga (buffer) 7,0. Selanjutnya dilakukan pengukuran terhadap larutan sampel dengan mencelupkan elektroda pada pH meter ke dalam larutan sampel dan biarkan beberapa saat ± 2 menit sampai diperoleh pembacaan yang stabil.

3.5.4. Aktivitas Antioksidan

Menurut Qurrathul (2007) penentuan aktivitas penangkapan radikal bebas dilakukan dengan cara DPPH (Diphenylpicrylhydrazyl). Absorbansi Kontrol, larutan DPPH dengan konsentrasi 0,08 mM dalam etanol 96% v/v diambil 10 ml, kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 30 menit. Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Absorbansi sampel, masing-masing sampel dicentrifuge dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Setelah terpisah sampel cair dengan padatan diambil sampel cair sebanyak 7,5 ml dan

ditambahkan larutan DPPH 0,08 mM dalam etanol 96% v/v sebanyak 2,5 ml. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 30 menit, kemudian dimasukkan ke dalam kuvet untuk diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Nilai % Aktivitas Antioksidan diperoleh dengan rumus (Molyneux, 2003).

$$\% \text{ Aktivitas Antioksidan} = \frac{(A \text{ sampel})}{(A \text{ kontrol})} 100\%$$

Keterangan:

A sampel: Absorbansi sampel

A kontrol: Absorbansi tidak mengandung sampel

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Pemberian minuman probiotik sari buah nanas dapat meningkatkan populasi bakteri asam laktat (BAL) yang terdapat di usus tikus percobaan mampu menekan pertumbuhan *E.coli*.
2. Pemberian minuman probiotik sari buah nanas mampu mempertahankan aktivitas antioksidan tikus percobaan dibandingkan tanpa pemberian minuman probiotik sari buah nanas.

5.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian minuman probiotik sari buah nanas terhadap mikroflora tikus percobaan dengan meningkatkan konsentrasinya tiap 10 hari dengan frekuensi dan dosis berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Anshori, R. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Arcan, Jakarta. 188 hlm.
- Ardiansyah. 2008. *Antioksidan dan peranannya bagi kesehatan*. Artikel Iptek. Diakses: 27 Oktober 2016 (http://ardiansyah.multiply.com/journal/item/14?&item_id=14&view:replies=-reverse).
- Artini, P.R. 2012. Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Sebagai Antioksidan Pada Penurunan Kadar Asam Urat Tikus Wistar. *Jurnal Kimia* Vol 6 (2): 127-137.
- Asni, E., Harahap, I.P., dan Wanandi, S.I.. 2009. Pengaruh Hipoksia Berkelanjutan Terhadap Kadar Malondialdehid, Glutation Tereoksidasi dan Aktivitas Katalase Ginjal Tikus. *Majalah Kedokteran Indonesia*. 595-600.
- Astawan, M. 2009. *Sehat dengan Hidangan Kacang dan Biji-bijian*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. 2014. Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik Secara In Vivo. Diakses pada 28 Oktober 2016 pukul 20.10 WIB (<http://jdih.pom.go.id/showpdf.php?u=b04A9w86hyKB%2Be6W2EBSvqz2wj0x%2FHHRSSRcBG%2F%2BwQE%3D>).
- Badan Standarisasi Nasional (BSN). 2009. SNI. 7552:2009. *Minuman Susu Fermentasi Berperisa*. Badan Standarisasi Nasional, Jakarta.
- Bourlioux, P., B. Kolletzko, F. Guarner and V. Braesco. 2003. *The Intestine and its Microflora are Partners For the Protection of the Host : Report On The Danone Symposium "The Intelligent Intestine"*, held in Paris, June 14, 2002. *Am. J. Clin. Nutr.* 78 : 675-83
- Cahyono, R. 1996. Pemanfaatan Wortel untuk Produksi Minuman Sehat Pencegah Diare Bervitamin B12 Melalui Proses Fermentasi Laktat. Skripsi. Fateta IPB Bogor. 30 hlm.

- Collins, J. L. 1960. The Pineapple. World Corps Series. *Leonard Hill Interscience Publ. Inc*, London. 295 Page.
- Daniswara, N. 2008. *Perbandingan efektivitas air perasan buah nanas (Ananas comosus (L.) Merr) 100%, zinc pyrithione 1% dan ketokonazol 1% secara in vitro terhadap pertumbuhan pityrosporum ovale*. Artikel Karya Tulis Ilmiah. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.
- De Man, and M. John. 1989. *Kimia Makanan*. Penerjemah Kosasih Padmawinata ITB. Bandung. 550 hlm.
- Desminarti, S, Rimbawan, F. Anwar dan A. Winarto. 2012. Efek Bubuk Tempe Instan Terhadap Kadar Malonadehid (MDA) Serum Tikus Hiperglikemik. *Jurnal Kedokteran Hewan* 6: 197-205.
- Dian, Yulia. 2011. Mikroorganisme pada Saluran Pencernaan. (Diakses melalui: <http://dhie-yulyulie.blogspot.co.id/2011/12/mikroorganisme-pada-saluran-pencernaan.html> tanggal 26 Mei 2018 pukul 18.30).
- Dutcosky, S.D., M.V.E, Grossmann RSSF Silva and A.K. Welsch. 2006. Combined Sensory Optimization of a Prebiotic Cereal Product Using Multicomponent Mixture Experiments. *Food Chem* 98: 630-638.
- Evanikasari. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Sampel Klinis yang Berpotensi sebagai Probiotik. Tesis. Institut Pertanian Bogor. Bogor. Hal 18.
- Fahlevi, A.A. 2015. *Naskah Publikasi : Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Buah Kurma Ajwah (Phoenix dactylifera) pada Tikus Putih Jantan yang diinduksi dengan Paracetamol*. Univeristas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta. Hal 9.
- Fardiaz, S. 1989. *Mikrobiologi Pangan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. PAU-Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor, Bogor. 142 hlm.
- _____. 1992. *Analisis Mikrobiologi Pangan I*. PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Fardiaz, S., R.Cahyono, dan H.D. Kusumaningrum. 1996. Produksi dan Aktivitas Antibakteri Minuman Sehat Kaya Vitamin B12 Hasil Fermentasi Laktat dari Sari Wortel. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*.1(2): 25-30.
- Fianti, Atiko. 2010. Khasiat Buah Nanas. (Diakses melalui : <http://atikofianti.wordpress.com/2010/03/23/khasiat-buah-nanas>. Pada tanggal 24 Oktober 2016).

- Fuller, R. 1989. Probiotic in Man and Animals. *Journal Appl Bacteriol.* 66:365378.
- _____. 1992. *Probiotics: The Scientific Basic. Chapman and Hall.* London.
- Gilliland, S. E., T. E. Stanley., and L. J. Bush . 1984. Importance of Bile Tolerance of *L. acidophilus* Used as a Dietary Adjunct. *Journal of Dairy Sci* 67:3045-3051
- Harimurti, S. dan E.S. Rahayu. 2009. Morfologi Usus Ayam Broiler yang disuplementasi dengan Probiotik Strain Tunggal dan Campuran. *Agritech Jurnal* (29) : 179-183.
- Herliani, Leni. 2010. *33 Macam Buah-Buahan Untuk Kesehatan.* Alfabeta, Bandung.
- Husodo, S.Y. 2004. *Pertanian Mandiri.* Penerbar Swadaya, Jakarta.
- Ichikawa, T. 1994. Functional Food in Japan. Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals. Edited by I. Goldberg. New York : *Chapman & Hall.* 453-467.
- Inggrid, S. 2016. Probiotik, Microbiome dan Pangan Fungsional. *Deepublish Publisher,* Yogyakarta 15 Hal.
- Isbagio, D. W. 1992. *Euthanasia pada Hewan Percobaan.* Media Litbangkes, Jakarta. 18-24.
- Irfandi. 2005. Karakterisasi Morfologi Lima Populasi Nanas (*Ananas Comosus* L.) Merr). Skripsi. Bidang Studi Holtikultura Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- Kikuzaki, H. and N. Nakatani. 1993. Antioxidant Effects of Some Ginger Constituents. *Journal Food Sci.* 58: 1407-1410.
- Kuswanto, K.R. dan S. Sudarmaji. 1989. Mikrobiologi Pangan. *Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi:* Yogyakarta. Hlm 49.
- Lingga, L. 2012. *The Healing Power of Antioxiidan.* PT. Gramedia, Jakarta. Hal. 64.
- Malole, M.B.M. dan C.S.U Pramono. 1989. Pengantar Hewan-hewan Percobaan di Laboratorium. *Pusat Antara Universitas Bioteknologi IPB:* Bogor.
- Mikelsaar, M. , R. Mandar, E. Sepp and H. Annuk. *Human Lactic Acid Microflora and its Role in the Welfare of the Host.* **In** : S. Salminen, A. Von

- Wright and A. Ouwehand (Editors). Lactic Acid Bacteria. *Marcell Dekker, Inc.* New York.
- Mitsuoka, T. 1989. *Microbes in the Intestine, Our Lifelong Partners*. Yakult Honsha Co., Ltd., Japan. Page 87
- Molyneux, P. 2003. The Use Of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Journal Science of Technology*. 26 (2): 211-219.
- Mukherjee, R.S., B.R. Chowdhury, R. Chakraborty and U.R. Chaudhuri. 2006. Effects of Fermentation and Drying Temperature On The Characteristics Of Goat Meat (Black Bengal Variety) Dry Sausage. *Afric Journal of Biotechnol.* 1499-1504.
- Muslinah, H. 2000. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas Potensi dan Aplikasi dalam Kesehatan*. Kanisius, Yogyakarta. 281 hlm.
- Naggar, M.Y.M. 2004. Comparative Study of Probiotic Culture to Control the Growth of Escherichia coli O157: H7 and Salmonella typhimurium. *Journal Biotechnol.* 173-180.
- Nakazawa, Y. and A. Hosono. 1992. Function of Fermented Milk : Challenges for the Health Sciences. *Elsevier Science Publisher Ltd., University Press, Cambridge*.
- Paul, A. A dan D. A. T. Southgate. 1989. McCance and Widdowson's the Composition of Food. Fourth edition. *HMSO, London*.
- Paterson, J.L. 1975. In meat. *Dalam : R.A. Lawrie (Editor)*. Ilmu Daging. Edisi ke-5. Terjemahan : A. Parakkasi. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Pelczar, M.J. dan E.C. S Chan. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi I*. Terjemahan : R.S. Hadjoetomo, dkk. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Pokorny, J, N. Yanishlieva and M. Gordon. 2001. Introduction Antioxidants in Food. In: Pokorny J. Yanishlieva N., Gordon M. (Eds.) Antioxidants in Food. *Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, England*.
- Prakasih, A. 2001. *Antioxidant Activity*. Medallion Laboratories Analytical Progress. Jakarta. Hal 19.
- Prangdimurti, E. 2001. Probiotik dan Efek Perlindungannya Terhadap Kanker Kolon. Makalah Falsafah Sains Program Pasca Sarjana/S3. IPB, Bogor.

- Prasetyo, B.B, Purwadi dan D. Rosyidi. 2015. Penambahan CMC (Carboxy Methyl Cellulose) pada Pembuatan Minuman Madu Sari Buah Jambu Merah (Psidium Guajava) ditinjau dari pH, Viskositas, Total Kapang dan Mutu Organoleptik. *Jurnal Universitas Brawijaya*. Universitas Brawijaya, Malang. p. 1-8.
- Putri, W.A. 2008. Profil Mikroflora Feses dan Usus Tikus Putih Rattus Norvegicus) dengan Konsumsi Daging yang Difermentasi oleh Lactobacillus Plantarum. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Qi ,B, R Yao, Y Yu and Y Chen. 2008. Influence of Different Ratios of Rice Straw to Wheat Bran on Production of Cellulolytic Enzymes by Trichoderma Viride ZY-01 in Solid State Fermentation. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural*.
- Qurrathul, A. 2007. Skripsi: Aktivitas Penangkap Radikal 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH) oleh Kurkumin dan Turunan 4-Fenilkurkumin. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Rejeki, S.R. dan D. Ningsih. 2012. Uji Aktivitas Antioksidan Buah Nanas Terhadap Radikal Bebas. *Biomedika Journal*. Universitas Setiabudi Surakarta. Surakarta. Hal 3.
- Rizal, S., Marniza dan S.U. Nurdin. 2006. Optimasi Proses Pengolahan Minuman Probiotik dari Kulit Nanas dan Pengaruhnya Terhadap Mikroflora Usus Besar Tikus Percobaan. *Laporan Akhir Penelitian TPSDP*. Universitas Lampung, Bandar Lampung.
- Rizal, S. dan F. Nurainy. 2016. Karakteristik Probiotik Minuman Fermentasi Laktat Sari Buah Nanas dengan Variasi Jenis Bakteri Asam Laktat. Universitas Lampung: Bandar Lampung.
- Robinson, H.J. Beker, J.R. Lindsay, S. Weisbroth 1979. Taxonomi and Genetic. *The Laboratory Rat London*. Academic Press, London.
- Salminen, S., A.V Wright and A Ouwehand. 2004. Lactic Acid Bacteria. Marckel Dekker. New York: *Food Chemistry* 7(9): 3239-3247.
- Sampoerno dan D. Fardiaz. 2001. Kebijakan dan Pengembangan Pangan Fungsional dan Suplemen di Indonesia. Dalam: Nuraida L dan Dewanti-Hariadi R, Editor. Pangan Tradisional Basis Bagi Industri Pangan Fungsional & Suplemen. *Pusat Kajian Makanan Tradisional*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Septiatin, E. 2009. *Apotek Hidup dari Tanaman Buah*. CV. Yrama Widya, Bandung. Hal. 81-88.

- Seveline. 2005. Pengembangan Produk Probiotik dari Isolat Klinis Bakteri Asam Laktat dengan Menggunakan Teknik Pengeringan Semprot dan Pengeringan Beku. (Tesis). Bogor: Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Sibuea, P. 1997. *Morfologi dan Distribusi Idioblas Kristal Kalsium Oksalat Bentuk Rafida pada Perkembangan Buah Nenas (Ananas comosus (L.) Merr.). Ilmu Pangan UGM, Yogyakarta.* Hal 8
- Smith, J.B. dan S. Mangkoewidjojo. 1988. Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis. Tikus Laboratorium (*Rattus norvegicus*): 37-57. Penerbit Universitas Indonesia.
- Sugiarto, Y. 2009. Manfaat Nanas Untuk Kesehatan. (Diakses melalui <http://doctor-yenny.blogspot.co.id/2008/08/nanas.html> pada tanggal 21 Januari 2017 pukul 18.45 WIB)
- Syahrurahman, A. 1994. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran Edisi Revisi*. Bina Rupa Aksara, Jakarta.
- Tamime, A.Y. 2005. Probiotic Dairy Product. Oxford: *Blackwell Publishing Ltd*.
- Tranggono, S., Haryadi, Suparmo, A. Murdiati, S. Sudarmadji, K. Rahayu, S. Naruki, dan M. Astuti. 1991. Bahan Tambahan Makanan (Food Additive). *PAU Pangan dan Gizi*. UGM, Yogyakarta. Hal. 44.
- Wahyudi, A. dan S. Samsundari. 2008. *Bugar dengan Susu Fermentasi*. Universitas Muhammadiyah Malang Press, Malang.
- Waspodo. 1997. *Probiotik Bakteri Pencegah Kanker*. Intisari, Jakarta. Hal 87.
- Winarno, F. G . 1997. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia Pustaka, Jakarta.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Wresdiyati T, M. Astawan, F. Dini, M.A. Ketut, N. Savitri, dan A. Sapti. 2007. Pengaruh -Tokoferol Terhadap Profil Superoksida Dismutase dan Malondialdehida pada Jaringan Hati Tikus di Bawah Kondisi Stress. *Jurnal Veteriner*. 202-209.
- Yan, F and D.B. Polk. 2010. Disruption of NF-kB Signaling by Ancient Microbial Molecules. *Novel Therapies of the Future*. 59(4): 421-426.
- Yunus, M. 2001. Pengaruh Antioksidan Vitamin C Terhadap MDA Eritrosit Tikus Wistar Akibat Latihan Anaerobik. *Jurnal Pendidikan Jasmani*. 9-16.

Yuwastina, R. 2009. Uji Aktivitas Penangkapan Radikal Dari Ekstrak Petroleum Eter, Etil, Asetat dan Etanol Rhizoma *Binahong* (*Anredera Cordifolia* (Tenor) Steen) Dengan Metode DPPH (2,2-difeni-1-pikrihidrazil). Skripsi. Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta. Hal 98.