

**PEMANFAATAN LIMBAH CAIR TAHU MENJADI MINUMAN FUNGSIONAL
OLEH BAKTERI ASAM LAKTAT DAN UJI AKTIVITASNYA DALAM
MENURUNKAN KADAR KOLESTEROL SECARA INVITRO¹**

***EXPLOITING TOFU LIQUID WASTE BECOME HEALTHY FOOD by LACTIC
ACID BACTERIA AND DETERMINATION OF Its CHOLESTEROL LEVELS
INVITRO***

Siti Nur Jannah², Endang Kusdiyantini¹, Arina Tri Lunggani¹

ABSTRACT

One advantage effect of Probiotics from human consumption of Lactic Acid Bacteria (LAB) is a reduction in serum **cholesterol** levels, as suggested by the results of several human and animal studies (Pereira and Gibson, 2002). Tofu Liquid waste represent discard materials which still contain high protein and not yet exploited. This waste can cause contamination and disease if not handled better. One of the way to overcome contamination of tofu liquid waste problem is by exploiting again the waste so that can yield high economic valuable product.

The aim of study was to make a healthy food (yoghurt) from combination of Tofu Liquid Waste (TLW) and fresh milk that fermented by Lactic acid bacteria, such as *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* and *L. acidophilus*; and study its activity in degrading cholesterol levels. At the research was conducted by making yoghurt with 5 treatments of TLW concentration (0; 25; 50 75 and 100%).

Result of this research indicated that yoghurt with various of TLW concentration can degrade cholesterol level *invitro* equal to 63,33 % , so that yoghurt can be made as functional food. Yoghurt with 25 %TLW had the good yoghurt criteria and its organoleptic value not different with control (0% TLW).

Key words : Yoghurt, Lactic Acid Bacteria, Tofu liquid waste

PENDAHULUAN

Kecenderungan meningkatnya penyakit-penyakit degeneratif seperti kanker, stroke, darah tinggi membuka peluang dikembangkannya makanan / minuman yang menyehatkan. Makanan/minuman fungsional dikembangkan sedemikian rupa disamping untuk tujuan memperbaiki fungsi-fungsi fisiologis agar dapat melindungi tubuh dari penyakit-penyakit tersebut juga dapat dikonsumsi sebagaimana layaknya makanan sehari-hari (Hartati, *et al.* 2003).

¹ Presented at International Seminar Lactic Acid Bacteria & Other Important Microbes "their role in food, health, and industry", Yogyakarta, 16-17 January 2009

² Education staff of Biology Dept. FMIPA UNDIP Semarang, Jl. Prof Sudiarto, SH, Tembalang Semarang Selatan.

351/K1/mipa10
SA¹⁰

Handwritten signature

Perhatian terhadap peranan bakteri asam laktat bagi kesehatan sangat besar. Industri pangan dewasa ini mengarahkan produk-produk barunya lebih spesifik sebagai makanan fungsional (*functional food*) dengan melibatkan bakteri asam laktat yang bersifat probiotik (Santon, *et al* 2001; Surono, 2004). Probiotik didefinisikan sebagai makanan yang mengandung mikroba hidup yang mempunyai efek menguntungkan pada inang (*host*) untuk memperbaiki keseimbangan mikroba intestinal.

Pengembangan minuman kesehatan yang mengandung probiotik dari bahan non susu belum banyak dikembangkan. Salah satu alternatif produk probiotik yang bisa dikembangkan dengan memanfaatkan cairan limbah tahu. Limbah ini merupakan hasil pembuangan industri tahu yang sampai saat ini belum banyak dimanfaatkan. Limbah cair tahu masih mengandung kadar protein yang relatif tinggi. Protein ini merupakan sisa dari proses pembuatan tahu yang tidak tergumpalkan. Limbah ini umumnya dibuang begitu saja dalam saluran-saluran air atau kolam yang terdapat di sekitar industri tahu. Padahal pada konsentrasi tertentu, limbah ini dapat mencemari air dengan meningkatkan nilai BOD (Biological Oxygen Demand) dan menurunkan DO (Dissolved Oxygen). Hal ini dapat mengganggu siklus kehidupan dalam air juga akan menyebabkan berbagai reaksi kimia, serta dapat pula menimbulkan bau yang tidak enak (Santoso, 1989).

Bakteri Asam Laktat (BAL) terutama dari genus *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* dan *Streptococcus* telah digunakan secara tradisional sebagai kultur-kultur starter untuk produk pangan terfermentasi seperti pickel sayuran, sosis fermentasi, dadih, yoghurt, susu asam dan sebagainya karena kontribusinya terhadap pembentukan cita rasa dan aroma serta penghambatan kerusakan (De Vuyst and Vandamme, 1994).

Gilliland *et al.* (2002) menyebutkan bahwa beberapa bakteri asam laktat (BAL), terutama Lactobacilli, berpotensi untuk menurunkan kadar kolesterol. Surono (2004) menyebutkan bahwa kebutuhan asam amino untuk pertumbuhan maksimum (BAL) *Streptococcus thermophilus*, khususnya glutamin, sistin dan histidin melebihi asam amino bebas yang terkandung dalam susu, sehingga perlu ditambahkan pada medium kultur. Kandungan asam amino esensial (terutama sistin) dalam limbah cair tahu memungkinkan bahan tersebut dapat menjadi salah satu komponen substrat bagi pertumbuhan BAL.

Berdasarkan latar belakang tersebut diharapkan limbah cair tahu dapat dimanfaatkan sebagai alternatif komponen bahan pembuatan minuman fermentasi seperti yogurt yang memberikan manfaat bagi kesehatan, yaitu menurunkan kadar kolesterol.

Tujuan penelitian : Menganalisis potensi minuman fungsional yang dibuat dengan berbagai konsentrasi limbah cair tahu dan difermentasi oleh *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus acidophilus* dalam menurunkan kadar kolesterol secara *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiogenetika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro pada bulan November 2005 – Juni 2006.

Bahan dan Metode

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah cair tahu (LCT) berupa cairan sisa penggumpalan tahu yang diperoleh dari industri tahu di daerah Mrican, Semarang dan susu sapi segar. Bahan-bahan lain yang digunakan adalah susu bubuk skim *Indomilk Calci Skim*, starter yogurt komersial *Yogourmet*, Agar, MRS (deMann Rogosa Sharpe, Oxoid), NaOH 0,1 N, sodium thioglycolate, sodium taurocholate, NaHCO₃, Phenolphthalien 1%, kolesterol, tween 80, asam asetat anhidrid, asam asetat glasial, asam sulfat pekat, natrium sulfat anhidrat, *Anaerobic Gas Pack* (Oxoid), indikator anaerob (Oxoid), aquades, etanol 70% dan 95%, KOH, heksan, buffer pH 7 dan 4.

Cara Kerja

a. Pembuatan starter

Pembuatan Starter Tahap 1

Starter tahap 1 dibuat dengan melarutkan 125 g susu bubuk skim dalam 1 L air panas pada suhu 80°C. Larutan skim didinginkan hingga 42°C. Starter

Yogourmet sebanyak 5 g dimasukkan ke dalam larutan skim dan dicampur hingga rata, kemudian diinkubasi pada suhu 42°C selama 6 jam.

Pembuatan Starter Tahap 2

Starter tahap 2 dibuat dengan melarutkan 10 g susu bubuk skim dalam 100 mL susu sapi segar yang sudah dipasteurisasi pada suhu 80°C selama 15 detik. Larutan campuran selanjutnya didinginkan hingga 42°C, kemudian diinokulasi dengan starter tahap 1 sebanyak 4% (v/v) dan diinkubasi pada suhu 42°C selama 6 jam. Kultur tersebut mengandung $10^8 - 10^9$ sel/mL.

b. Pembuatan Medium Fermentasi

Perlakuan Limbah Cair Tahu

Limbah cair tahu yang akan digunakan sebagai medium terlebih dahulu disaring dengan kertas saring dan dinetralisasi menggunakan NaHCO_3 hingga pH 7, kemudian dipasteurisasi pada suhu 80°C selama 15 detik.

Medium Fermentasi

Susu sapi segar dipasteurisasi pada suhu 80°C selama 15 detik kemudian ditambahkan limbah cair tahu dengan konsentrasi 0, 25, 50, 75 dan 100% (v/v). Larutan ini selanjutnya diaduk dan didinginkan hingga suhu 42°C.

c. Pembuatan Minuman Fungsional

Medium fermentasi dengan berbagai konsentrasi LCT diinokulasi dengan kultur starter tahap 2 sebanyak 2,5% (v/v), kemudian diinkubasi pada suhu 42°C selama 6 jam.

d. Pengukuran kadar kolesterol

Pengukuran kadar kolesterol dilakukan sebelum dan sesudah inkubasi sampel dalam medium uji (mMRS). Sampel yogurt sebanyak 1% (v/v) diinokulasikan ke dalam mMRS dan diinkubasi secara anaerob pada suhu 37°C selama 12 jam. Kultur dalam mMRS selanjutnya disentrifuse dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Supernatan sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah 1 mL KOH 50% serta 2 mL etanol 95%, kemudian divortex selama 1 menit. Campuran tersebut dipanaskan dalam penangas air dengan suhu 60°C selama 10 menit. Setelah dingin ditambah 3 mL heksan dan divortex selama 20 detik. Setelah homogen ditambah 2 mL aquades, divortex kembali selama 1 menit dan dibiarkan pada suhu kamar selama 15 menit untuk memisahkan hasil ekstraksi kolesterol oleh heksan. Larutan heksan diambil sebanyak 2 mL kemudian diuapkan sehingga diperoleh residu. Setelah dingin residu ditambah 5 mL larutan pereaksi dan didiamkan selama 10 menit pada suhu 37°C. Larutan berubah menjadi hijau-biru dan ditera dengan spektrofotometer pada λ 570 nm. Absorbansi yang diperoleh dibandingkan dengan kurva standar kadar kolesterol.

Analisis

Analisis yang dilakukan meliputi : potensi penurunan kadar kolesterol secara *in vitro*, kadar asam laktat tertitrasi, total BAL, pH dan sifat organoleptik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Penurunan Kadar Kolesterol

Kolesterol merupakan komponen lipid yang penting untuk mempertahankan fungsi tubuh, tetapi bila dalam darah jumlahnya berlebihan dapat mengakibatkan

Berdasarkan Gambar 1 dapat diketahui bahwa nilai penurunan kadar kolesterol tertinggi diperoleh pada yogurt dengan konsentrasi LCT sebanyak 75% (63,33 $\mu\text{g/mL}$) sedangkan nilai terendah diperoleh pada yogurt tanpa penambahan LCT (0% LCT) yaitu 23,33 $\mu\text{g/mL}$. Beberapa peneliti menyebutkan mekanisme penurunan kadar kolesterol terjadi karena adanya pengikatan kolesterol ke dalam membran sel BAL dan dekonjugasi enzimatik garam empedu oleh BAL (Noh *et al.*, 1997; Pereira & Gibson, 2002; Liong & Shah, 2005). Hal ini berarti mekanisme penurunan kadar kolesterol oleh yogurt berkaitan erat dengan aktivitas BAL yang terkandung dalam minuman tersebut.

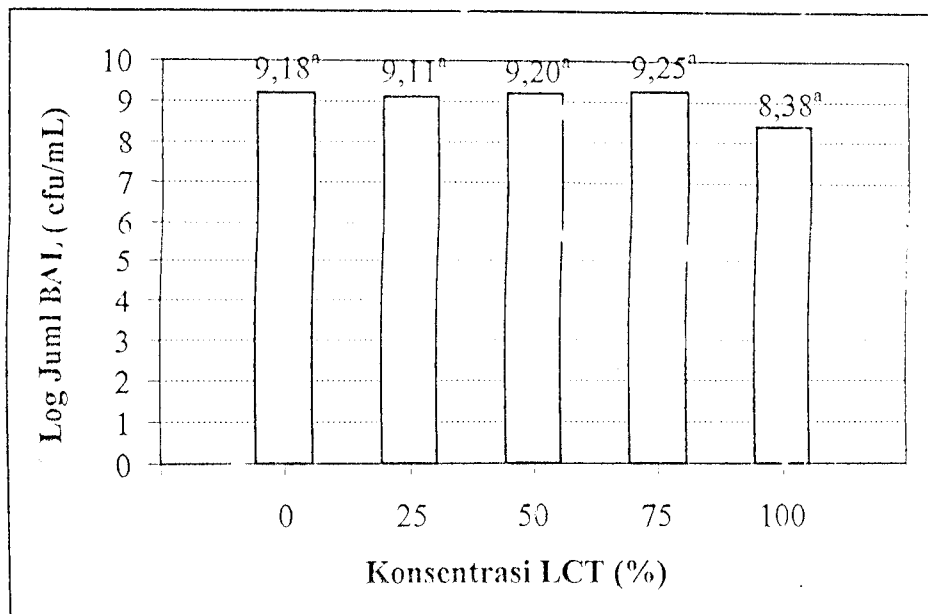
Noh *et al.* (1997) menyebutkan bahwa BAL genus *Lactobacillus* terutama *L. acidophilus* mampu mengikat kolesterol dari medium. Pengikatan kolesterol ini memerlukan kondisi anaerob dan adanya garam empedu (Gilliland *et al.*, 1985). Garam bile dalam medium pertumbuhan BAL dapat meningkatkan permeabilitas membran sel terhadap absorpsi kolesterol (Noh & Gilliland, 1993). Kolesterol yang terabsorpsi diikat dalam lapisan lipid bilayer membran sel (komponen hidrofobiknya) selama pertumbuhan BAL.

Pengikatan kolesterol dalam membran sel dapat menyebabkan perubahan komposisi asam lemak yang menyusun membran sel bakteri asam laktat. Liong & Shah (2005) menyebutkan pengikatan kolesterol dapat mengubah profil asam lemak membran sel terutama heksadekanoat, oktadekanoat, asam lemak jenuh dan asam lemak tidak jenuh.

Mekanisme penurunan kadar kolesterol melalui pengikatan oleh membran sel bakteri asam laktat dapat terjadi secara *in vitro* dan *in vivo* (di dalam tubuh),

sedangkan mekanisme dekonjugasi garam empedu oleh bakteri asam laktat terjadi secara *in vivo*. Liong & Shah (2005) menyebutkan bahwa EAL menghasilkan enzim *bile salt hidrolase* (BSH) (EC. 3.5.1.24) yang menghidrolisis garam empedu menjadi asam empedu bebas yang kurang diserap oleh usus halus dan dibuang bersama feces, sehingga kolesterol dalam tubuh menjadi berkurang.

Penurunan kadar kolesterol dalam penelitian ini berkaitan erat dengan aktivitas BAL yang terkandung dalam yogurt hasil fermentasi. Rata-rata total BAL yogurt hasil penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Diagram batang total BAL yogurt berdasarkan berbagai konsentrasi LCT setelah diinkubasi selama 6 jam. Keterangan: superskript huruf yang sama menunjukkan nilai berbeda tidak nyata pada ANOVA ($\alpha=0,05$).

Berdasarkan Gambar 2 diketahui bahwa jumlah BAL terbesar diperoleh pada yogurt dengan konsentrasi LCT sebanyak 75% sedangkan jumlah BAL terkecil diperoleh pada yogurt dengan konsentrasi LCT 100%. Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa yogurt yang dibuat dengan berbagai konsentrasi LCT

mempunyai jumlah BAL yang berbeda tidak nyata. Yogurt dengan konsentrasi LCT 100% mempunyai jumlah BAL lebih rendah daripada perlakuan lainnya. Hal ini disebabkan medium fermentasi dengan konsentrasi 100% LCT lebih sedikit mengandung sumber karbon dan asam amino yang menstimulasi pertumbuhan BAL dibandingkan dengan medium fermentasi campuran susu segar dan LCT, sehingga pertumbuhan BAL terhambat.

Suhu inkubasi 42°C yang digunakan dalam penelitian ini merupakan suhu optimum untuk pertumbuhan kultur campuran BAL. Surono (2004) menyebutkan terdapat interaksi yang saling menguntungkan antara *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus*. Selama proses fermentasi, *L. bulgaricus* membebaskan asam amino valin, histidin dan glisin yang diperlukan *S. thermophilus* selama pertumbuhannya. *S. thermophilus* menurunkan pH dan mensintesa asam lemak yang dapat menstimulasi pertumbuhan *L. bulgaricus*.

Penambahan *L. acidophilus* sebagai starter dalam fermentasi yogurt dimaksudkan selain untuk meningkatkan produksi asam laktat juga untuk memberikan manfaat probiotik. Menurut Surono (2004) dan Siswono (2005) *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* tidak termasuk bakteri probiotik karena meskipun dapat mengatasi intoleransi laktosa, namun tidak dapat lolos dalam saluran pencernaan untuk tetap hidup di usus.

Jumlah BAL pada keseluruhan perlakuan telah memenuhi kriteria yogurt berkualitas baik. Rahayu dkk. (1993) menyatakan bahwa yogurt yang baik mempunyai total BAL 10^8 cfu/mL atau lebih.

Rahayu & Sudarmadji (1988) menyebutkan bahwa *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus acidophilus* merupakan BAL homofermentatif yang memfermentasikan laktosa menjadi asam laktat. Hasil penelitian rata-rata kadar asam laktat yogurt berkisar antara 0.06-1.15%.

Proses pembentukan asam laktat dari laktosa oleh BAL dimulai dengan absorpsi laktosa melalui membran sel dengan bantuan enzim galaktosida permease. Laktosa selanjutnya akan dihidrolisis menjadi glukosa dan galaktosa atau galaktosa-6-fosfat oleh enzim β -D-galaktosidase (laktase) dan β -D-phosphogalaktosidase yang dihasilkan oleh *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* dan *L. acidophilus*. Glukosa mengalami metabolisme melalui jalur glikolisis menjadi asam piruvat. Asam piruvat selanjutnya diubah menjadi asam laktat melalui aktivitas enzim laktat dehidrogenase (Famime & Robinson, 1981).

Pembentukan asam laktat oleh BAL selama proses fermentasi menyebabkan penurunan pH atau menaikkan keasaman medium fermentasi. Hasil pengukuran rata-rata pH yogurt berdasarkan berbagai konsentrasi LCT berkisar antara 3,87-5,85.

BAL merupakan bakteri yang memegang peranan sangat penting dalam fermentasi yogurt. Selama proses fermentasi, BAL menghasilkan komponen-komponen seperti asam laktat dan senyawa volatil yang berperan dalam pembentukan cita rasa dan aroma yogurt. Frazier & Westhoff (1988) menyebutkan bahwa *S. thermophilus* dan *L. acidophilus* berperan dalam pembentukan cita rasa asam sedangkan *L. bulgaricus* mempunyai peranan penting dalam pembentukan cita rasa dan aroma yogurt.

Kesan panelis terhadap produk ditentukan oleh penerimaan panelis terhadap warna, kekentalan, aroma dan rasa produk yang dikonsumsi. Nilai kesan yogurt hasil penelitian berkisar antara 1–5 (tidak suka sampai suka). Rata-rata nilai kesan panelis terhadap yogurt hasil penelitian dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Rata-rata nilai kesan yogurt berdasarkan berbagai konsentrasi LCT.

Konsentrasi LCT (%)	Nilai Kesan
0	4,12 ^c
25	4,04 ^c
50	2,60 ^{ab}
75	3,08 ^b
100	2,16 ^a

Keterangan : superskript huruf yang sama menunjukkan nilai berbeda tidak nyata pada uji *Mann-Whitney U* ($\alpha=0,05$).

Berdasarkan Tabel 1 diketahui bahwa nilai rata-rata kesan tertinggi diperoleh pada yogurt tanpa LCT (0% LCT) dan nilai terendah diperoleh pada yogurt 100% LCT. Hasil analisis menggunakan *Mann-Whitney U* menunjukkan bahwa kesan panelis terhadap yogurt dengan konsentrasi LCT 0% berbeda tidak nyata dengan yogurt dengan konsentrasi LCT 25% yaitu cukup disukai.

KESIMPULAN

Yogurt dengan berbagai konsentrasi LCT dapat menurunkan kadar kolesterol secara *in vitro*, sehingga yogurt yang dihasilkan dapat menjadi minuman fungsional. Yogurt dengan konsentrasi LCT sebanyak 25% memenuhi kriteria yogurt berkualitas baik dan mempunyai nilai organoleptik yang berbeda tidak nyata dengan yogurt 0% LCT

(kontrol) yaitu cukup disukai. Hal ini berarti yogurt dengan konsentrasi 25% LCT dapat menjadi produk yang diterima oleh konsumen.

DAFTAR PUSTAKA

- De Vyust, L. dan E.J. Vandamme. 1994. Antimicrobial Potential of Lactic Acid Bacteria. *Di dalam : Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. De Vyust and E. J. Vandamme (editor). Blackie Academic and Professional, London
- Frazier, W.C and D.C. Westhoff. 1988. Food Microbiology. 4th Edition. Mc Graw-Hill Book Company Inc., New York.
- Gilliland, S.E., C.R. Nelson and C. Maxwell. 1985. Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 2(49): 377-381.
- Gilliland, S.E, R.M. Pigeon and E.P. Cuesta. 2002. Binding of Free Bile Acid by Cell of Yogurt Starter Culture Bacteria. *J. Dairy Sci* 85 : 2705-2710.
- Hadiwijoto, S. MS. 1994. Teori dan Prosedur Pengujian Mutu Susu dan Hasil Olahannya, Edisi Kedua. Liberty, Yogyakarta.
- Hartati S, Harmayani E, Rahayu ES, Utami T. 2003. Viabilitas dan Stabilitas *Lactobacillus plantarum* Mut7 FNCC 250 yang Disuplementasikan dalam Sari Buhan Pepaya-Nanas selama Penyimpanan. *J. Teknol dan Ind. Pangan*, 2: 182-187.
- Liong, M.T. and N.P. Shah. 2005. Acid and Bile Tolerance and Cholesterol Removal Ability of Lactobacilli Strains. *J. Dairy Sci*. 88: 55-66.
- Noh, D.O. and S.E. Gilliland. 1993. Influence of Bile on Cellular Integrity and β -galactosidase Activity of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci*.76: 1253.
- Noh, D.O., S.H. Kim, and S.E. Gilliland. 1997. Incorporation of Cholesterol into the Cellular Membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J. Dairy Sci*. 80: 3107-3113.
- Pereira, A.L dan Gibson R.G. 2002. Cholesterol Assimilation by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Isolated from The Human Gut. *Applied and Environmental Microbiology* 9(68): 4689-4693.
- Rahayu, K. dan Sudarmadji, S. 1988. Mikrobiologi Pangan. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi UGM, Yogyakarta.
- Rahayu, K. 1989. Mikrobiologi Pangan. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi UGM, Yogyakarta.
- Santon, C, Gardner G, Mechar, H, Collins K, Fitz GG, Lynch PB dan Ross RP. 2001. Market potential for Probiotics. *The am.J. Clin. Nut (suppl)* 73 : 471-473