



**POTENSI BAKTERI ASAM LAKTAT HASIL ISOLASI DARI
FERMENTASI SPONTAN SUSU KAMBING LOKAL SEBAGAI
BAKTERI PROBIOTIK UNTUK PRODUKSI MINUMAN
FUNGSIONAL YOGHURT SUSU KAMBING**

DISERTASI

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Doktor**



Oleh :

**AFRIZA YELNETTY
107050100111031**

**PROGRAM STUDI ILMU TERNAK
MINAT TEKNOLOGI HASIL TERNAK**

**PROGRAM PASCASARJANA
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2014





DISERTASI

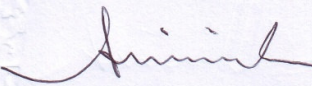
Judul Disertasi : Potensi Bakteri Asam Laktat Hasil Isolasi dari Fermentasi Spontan Susu Kambing Lokal sebagai Bakteri Probiotik untuk Produksi Minuman Fungsional Yoghurt Susu Kambing

N a m a : Afriza Yelnetty
N I M : 107050100111031

Disetujui
Komisi Pembimbing


Prof. Dr. Ir. Hari Purnomo, M.App.Sc
Ketua


Dr. Ir. Purwadi, MS
Anggota


Dr. Ir. Arie Dp. Mirah, MS
Anggota

Diketahui

**Ketua Program Studi Ilmu Ternak
Program Pascasarjana Fakultas Peternakan**

**Dekan Fakultas Peternakan
Universitas Brawijaya**


Prof. Dr. Ir. Djalal Rosyidi, MS
Ujian Akhir : 24 Juli 2014

Prof. Dr. Ir. Kusmartono



IDENTITAS TIM PENGUJI

JUDUL DISERTASI : POTENSI BAKTERI ASAM LAKTAT HASIL ISOLASI DARI
FERMENTASI SPONTAN SUSU KAMBING LOKAL SEBAGAI
BAKTERI PROBIOTIK UNTUK PRODUKSI MINUMAN
FUNGSIONAL YOGHURT SUSU KAMBING

NAMA MAHASISWA : Afriza Yelnetty

NIM : 107050100111031

PROGRAM STUDI : Ilmu Ternak

MINAT : Teknologi Hasil Ternak

KOMISI PROMOTOR

Promotor : Prof. Ir. Hari Purnomo, M.App.Sc. Ph.D.

Ko-Promotor 1 : Dr. Ir. Purwadi, MS.

Ko-Promotor 2 : Dr. Ir. Arie Dp. Miran, MS.



TIM DOSEN PENGUJI

Dosen Penguji 1 : Prof. Dr. Ir. Sutardi, M.App. Sc.

Dosen Penguji 2 : Prof.(Ris). Dr. Leonardus Broto Sugeng Kardono

Dosen Penguji 3 : Dr. Ir. Joni Kusnadi, MS.

Tanggal Ujian : 24 Juli 2014

SK Penguji : 1787/UN.10.5/ AK/PPS/2013

PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah DISERTASI ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah DISERTASI ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia DISERTASI ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (DOKTOR) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, 24 Juli 2014

Mahasiswa,



Nama : **Afriza.Yelnetty**
NIM : **.107050100111031**
PS : **.Ilmu.Ternak...**
PPS FAPET-UB



Lembar Peruntukan

*Jidak ada perjuangan yang menghasilkan kesia-siaan
Dan hasil dari sebuah perjuangan selalu
ada campur tangan Allah yang Maha Pengasih.*

Karya ini kupersembahkan untuk ayahanda (alm)
Ibunda, suami dan anak-anak tercinta
Terima kasih atas segala kasih dan cinta, serta doa
Yang selalu dipanjatkan.



RIWAYAT HIDUP

Afriza Yelnetty, lahir di kota Padang 10 April 1961 anak ketiga dari Ayah Drs. Makmur T (Alm) dan Ibu Janewar. Pendidikan formal ditempuh di SD sampai SMP di kota Talu Kabupaten Pasaman Provinsi Sumatera Barat. Pendidikan Menengah Atas di SMA Negeri II Padang, Provinsi Sumatera Barat. Lulus dari SMA 2 Negeri Padang pada Tahun 1981. Dan melanjutkan pendidikan S1 pada jurusan Produksi Ternak minat Teknologi Hasil Ternak di Universitas ANDALAS Padang pada Tahun 1986. Menyelesaikan pendidikan srata S2 pada program studi Teknologi Pangan dan Gizi pada Program Pasja Sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, pada Tahun 1999.

Pada saat ini sebagai Dosen tetap pada Fakultas Peternakan Universitas Sam Ratulangi Manado, dalam jabatan akademik Lektor kepala.

Malang, Juli 2014

Penulis



UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas karunia dan pertolongan yang diperoleh sehingga penulis mendapatkan kekuatan, keiklasan dan kesabaran dalam menyelesaikan penulisan disertasi. Penulisan dan penyelesaian tugas akhir ini tidak lepas dari bimbingan dan arahan serta support dari berbagai pihak, untuk itu penulis menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Prof. Ir. Hari purnomo, M.App.Sc, Ph.D selaku promotor yang telah memberikan waktu, bimbingan serta motivasi yang diberikan, baik selama menempuh studi maupun dalam penyelesaian akhir studi (disertasi). Penulis sangat bersyukur telah mendapatkan kesempatan untuk dibimbing beliau.
2. Dr. Ir. Purwadi, MS selaku ko promotor yang telah membimbing dan memberikan arahan serta memberikan kesempatan dan bantuan untuk materi dan perbaikan penulisan dengan sangat teliti dan sabar.
3. Dr. Ir. Ari Dp Mira, MS selaku ko promotor yang telah membimbing, memberikan dorongan semangat serta sabar dalam memberikan revisi materi disertasi, meskipun banyak keterbatasan dan ketidak mampuan dari penulis untuk melengkapi kesempurnaan materi yang diperlukan.
4. Prof. Dr. Ir. Sutardi, M.App.Sc. selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan waktu dan tenaga untuk saran dan perbaikan, guna penyempurnaan disertasi yang sangat berarti.
5. Prof. (Ris) Dr. Leonardus Broto Sugeng Kardono selaku dosen penguji yang telah memberikan banyak masukan dan saran guna perbaikan disertasi ini.
6. Dr. Ir. Joni Kusnadi, MS selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan guna sempurnanya disertasi ini.
7. Prof. Dr. Ir. Marie Najoan, MS selaku mantan Dekan Fakultas Peternakan UNSRAT Manado yang telah memberikan kesempatan bagi penulis mengikuti Program Doktor (S3) di Universitas Brawijaya, Malang.
8. Prof. Dr. Ir. Charles Kaunang, MS selaku Dekan Fakultas Peternakan UNSRAT Manado yang memberikan kesempatan dan fasilitas bagi penulis dalam rangka penyelesaian studi penulis.
9. Dekan, Direktur dan seluruh staf pengelola Pasca Sarjana Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang yang telah memberikan kesempatan bagi penulis untuk mengikuti program doktorol.
10. Kepala laboratorium mikrobiologi Pusat Studi Pangan Dan Gizi-UGM yang telah memberikan fasilitas alat-laboratorium, dan juga Mas Djoko, Mas Agus, Mas Pri, Mbak



Isti selaku teknisi yang telah banyak membantu, dan meluangkan waktu bagi penulis dalam menyelesaikan kegiatan penelitian.

11. Kepala Laboratorium Bioteknologi Pusat Studi Bioteknologi UGM dan Mbak Tri yang telah banyak membantu dalam analisa DNA.
12. Teman-teman seperjuangan di Lab Mikrobiologi PAU Pangan Gizi UGM, bu Dhani, bu Irin, bu Rita dan Mbak Eny, terima kasih atas semua kebersamaan dan diskusi-diskusi yang berharga dalam penelitian, dan juga buat sahabatku Rahmawaty hadju, bu Muli, Syalom Sakul, bu Minarny Gobel dan teman-teman lainnya yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu disini, terimakasih atas segala bantuan yang diberikan dan terimakasih untuk kebersamaan selama pendidikan dan penyelesaian study.
13. Terima kasih tak terhingga kepada almarhum ayahanda (Drs Makmur.T) dan Ibunda tercinta (Djanewar) yang telah memberikan didikan, kasih sayang dan doa yang tiada henti-hentinya kepada penulis, dalam pendidikan dan penyelesaian disertasi. Limpahan kasih sayang, cinta kasih yang diberikan buat penulis selama ini tidak akan bisa terbalaskan.
14. Terima kasih yang tulus dan tak terhingga kepada suami tercinta Drs Yan Falza Apt, ananda terkasih Dessy Danianty, Fariz M falza, dan Wulanda R. R. Falza atas segala kesabaran, kasih sayang, support dan pengertiannya dalam menghadapi masa-masa yang berat yang harus dilalui dalam pendidikan penulis.

Malang, Juli 2014

Penulis,



SUMMARY.

Afriza Yelnetty, Post Graduate Program, Faculty of Animal Husbandry, Brawijaya University. Potential of Lactic Acid Bacteria isolated from spontaneous fermented local goat milk as probiotic bacteria for production of functional drink goat milk yoghurt. Supervisor: Prof. Ir. Hari Purnomo, M.App.Sc., Ph.D. Co-supervisors: Dr. Ir. Purwadi, MS and Dr. Ir. Arie Dp. Mirah, MS.

Probiotic are living microorganisms if consumed will provide a therapeutic effects on consumers health by improving the microflora balance in digestive tract. Probiotic functional food give a development space for food industries using the probiotic concept. The utilization of probiotic could be implemented by using varied application which will give beneficial for either human or animal health. Functional drinks either produced by using modern or traditional methods have the potential in preventing several diseases. Probiotic bacteria could be isolated from various sources such as spontaneous fermented milk products. The obtained probiotic isolate could be reutilized in origin materials by controlled fermentation, and hence a desirable fermented products which have desired functional value in giving positive effect on health could be produced.

The aims of this study was to get probiotic bacteria isolated from spontaneous fermented goat milk which have the ability as starter in goat milk yoghurt fermentation in order to produce a functional food.

This research consisted of first stage: Isolation and identification of LAB with proteolytic characteristic and the ability of protein degradation during fermentasi. The first stage were carried out with some experiments and the first experiment was isolation of Lactic Acid Bacteria from spontaneous fermented goat milk and the isolates were then tested for following properties: catalase activity, Gram staining, cells form and its motility. While the second experiment was to investigate the proteolytic characteristic of the selected bacteria, and the third experiment was to study the physiological properties, and the fourth experiment was to study the biochemical characteristics on sugar fermentation using Kit API 50 CHL (*Bioumeret*, 2010). Identification of species of isolates beside using conventional method, and computerised analysis using API soft ware was also carried out.

The research results showed that 26 isolates were Lactic Acid Bacteria in the form of rod and coccus with following characteristics: catalase negative, non-motile and was able to grow in limited amount of oxygen. The proteolytic test results indicated that there were 5 isolates namely YN 1.1, YN 1.3, YN 1.6, YN 1.8 dan YN 2.25 which have the proteolytic characteristic and only 3 of them that were YN 1.1, YN 1.3 and YN 1.6. had the best proteolytic characteristic. Those 5 identified isolates namely YN 1.1, YN 1.3, YN1.8 and YN 2.25 were belong to *Lactobacillus plantarum* species, while YN 1.6 isolate was *L. pentosus*.

The second stage of this study was to identify proteolytic isolates using 16S rRNA method and was carried out by following steps: DNA isolation, purification, electrophoresis analysis and amplification using PCR and sequencing. The identification analysis results indicated that isolates of YN 1.1, YN 1.3, YN 1.8 and YN 2.25 were *L. plantarum* species with 99.9% similarity index while isolate YN 1.6. similarity index is 100%.

While the third stage of this study was to utilize the selected isolate as starter in order to understand their probiotic capability by following experiments: 1. to understand their probiotic characteristic; 2. To study their antimicrobial activity of those isolates; and 3. To test their ability to grow in 0.5 % bile salt solution and at low pH value. Based on the ability of these isolates to stand against antibiotic it was found that *L. plantarum* isolate of YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6 were able to stand to 20 ppm chloramphenicol, but were not able to stand against rimphasin and ampicillin. While the ability of these isolates to stand against pathogenic bacteria, there for *L. plantarum* isolate of YN 1.1. was not able to inhibit the growth of pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes*, however this isolate had the ability to inhibit other indicator bacteria. On the other hand, *L. plantarum* isolate of YN 1.3



and YN 1.6 were not able to inhibit *L. monocytogenes* and other indicator bacteria. Based on the isolate resistance in 0.5 % Bile salt solution and, low pH, however *L. plantarum* isolate of YN1.1 and YN 1.3 were isolates with the resistant ability to 0.5 % Bile salt solution and low pH, while *L. plantarum* isolate of YN 1.6 was only resistant to 0.5 % bile salt solution, but was not able to grow at low pH. It can be concluded that LAB namely *L. plantarum* isolate of YN 1.1 and YN 1.3, were able to be used as probiotic bacteria.

The aims of the fourth stage of this study was to investigate the capability of selected isolates as starter in fermentation. This stage consist of three experiments that were selected were the growth of isolates in MRS media and changes of pH during microbial growth, and the second experiment was to study the growth capability of selected isolates in milk fermentation by measuring the isolates viability during growing in 8% skim milk and also measuring the pH changes during fermentation. The third experiment was carried out for measuring organic acids during isolates growth in MRS media. The experiment results showed that *L. plantarum* isolate of YN 1.1, YN 1.3 and YN 1.6 have the capability in milk fermentation or they were able to be used as starter in yoghurt fermentation. Lactic acid is the highest level of organic acid produced during fermentation if it was compared to other organic acids produced such as acetic, propionic and butiric acid. *L. plantarum* isolates of YN 1.3 and YN 1.6 were belong to *L. plantarum* species which produced a higher amount of lactic acid compared to *L. plantarum* isolates of YN 1.1.

The fifth stage of this study was designed to investigate the characteristic of goat milk functional drink and two experiments were carried out that were the quality of microbial produced functional yoghurt and chemical characteristic, sensory and functional properties of goat milk yoghurt. The functional properties of goat milk yoghurt characterized by the living ability of yoghurt bacteria in digestive tract and measured using the living ability after inoculated in low pH and 0.5% Bile salt media. The results of this experiment showed that *L. plantarum* isolates of YN 1.3 and YN 1,6 produced good quality of functional goat milk yoghurt that was indicated by total LAB counts, pH value and total acid content. As overall results *L. plantarum* isolates were able to produce functional goat milk yoghurt as shown by total LAB count i.e. 10^9 cfu/ml. Based on the sensory evaluation point of view that functional goat milk yoghurt produced by using *L. plantarum* isolates of YN 1.6 and YN 1.3 were more preferred compared to other isolates. *L. plantarum* isolates of YN 1.3 was observed has a better living capability in 0,5 % bile salt solution and low pH compared to the other isolates. The selected *L. plantarum* isolates of YN 1.1, YN 1.3 and YN 1.6, had a better capability of living in 0,5% Bile salt solution and low pH as starter in yoghurt production. This result of study give a conclusion that LAB isolated from spontaneous fermented goat milk had the probiotic characteristic and it was able to ferment goat milk. *L. plantarum* isolates of YN 1.1, YN 1.3 and YN 1.6 were potential to be utilized in the production of functional drink of goat milk yoghurt. As overall reseach *L. plantarum* isolate YN 1.3 had the best isolate as probiotic bacteria and produce good quality functional goat milk yoghurt.



RINGKASAN.

Afriza Yelnetty, Program Pascasarjana Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Potensi Bakteri Asam Laktat Hasil Isolasi Dari Fermentasi Spontan Susu Kambing Lokal Sebagai Bakteri Probiotik Untuk Produksi Minuman Fungsional Yoghurt Susu Kambing. Komisi Pembimbing, Ketua: Prof. Ir. Hari Purnomo, M.App.Sc, PhD. Anggota: Dr. Ir. Purwadi, MS. dan Dr. Ir. Arie Dp. Mirah, MS.

Probiotik adalah mikrobia hidup yang bila dikonsumsi akan menimbulkan efek terapeutik pada tubuh dengan cara memperbaiki keseimbangan mikroflora dalam saluran pencernaan. Makanan fungsional probiotik memberikan ruang bagi berkembangnya industri pangan, dengan menggunakan konsep probiotik. Pemanfaatan probiotik dapat dilakukan dengan berbagai ragam aplikasi agar dapat menguntungkan baik bagi kesehatan manusia ataupun hewan ternak. Minuman fungsional yang dibuat baik secara moderen maupun secara tradisional mempunyai potensi untuk pemeliharaan kesehatan. Bakteri probiotik dapat diperoleh dari berbagai sumber, diantaranya dari susu yang difermentasi secara spontan. Isolat probiotik yang diperoleh dapat diaplikasikan kembali pada bahan asal dengan fermentasi terkendali, sehingga fermentasi yang diinginkan menghasilkan produk pangan fungsional dan memberikan dampak positif bagi kesehatan.

Tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan isolat bakteri probiotik dari susu kambing hasil fermentasi spontan dan mempunyai kemampuan sebagai inokulum untuk fermentasi yoghurt susu kambing sebagai pangan fungsional.

Penelitian dilaksanakan pada bulan September 2011 - Oktober 2013. Penelitian Tahap I dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG), UGM, penelitian Tahap II di laboratorium Bioteknologi Pusat Studi UGM. Penelitian Tahap III di Laboratorium Mikrobiologi Pusat Studi Pangan Gizi UGM, penelitian Tahap IV dan V dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM serta Laboratorium Gizi Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM.

Penelitian Tahap I: Terdiri atas isolasi dan identifikasi BAL proteolitik yang mampu memecah protein. Luaran penelitian tahap I adalah isolat BAL proteolitik. Secara keseluruhan penelitian ini terdiri atas beberapa percobaan. Percobaan 1: Isolasi bakteri asam laktat susu kambing segar yang difermentasi secara spontan, kemudian diuji sifat isolat yang meliputi uji aktivitas katalase, pengecatan Gram, bentuk dan ukuran sel, dan motilitas sel bakteri. Percobaan 2: Uji kemampuan isolat sebagai bakteri proteolitik. Percobaan 3: Uji sifat fisiologis isolat, dan percobaan 4: Uji sifat biokimia dari isolat dalam memfermentasi ragam jenis gula dengan Kit API 50 CHL (*Biomeret*, 2010). Untuk mengetahui spesies isolat selain engujian dengan metode konvensional juga digunakan secara komputerisasi menggunakan perangkat lunak API. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 26 isolat yang diperoleh merupakan bakteri asam laktat dengan ciri bentuk batang dan bulat katalase negatif, tidak motil serta dapat tumbuh dengan sedikit oksigen. Hasil uji sifat proteolitik dapat diperoleh 5 isolat yakni YN 1.1, YN 1.3, YN 1.6 YN 1.8 dan YN 2.25. masing-masing adalah proteolitik dan 3 dari 5 isolat tersebut mempunyai kemampuan proteolitik terbaik yakni isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6. Hasil identifikasi dari 5 isolat tersebut menunjukkan bahwa isolat YN 1.1, YN 1.3, YN 1.8 dan YN 2.25 adalah merupakan spesies *Lactobacillus plantarum* sedangkan YN 1.6 merupakan spesies *Lactobacillus pentosus*.



Penelitian Tahap II: identifikasi isolat proteolitik menggunakan metode 16S rRNA. Luaran penelitian adalah isolat dipastikan spesiesnya secara molekular. Pelaksanaan penelitiannya terdiri atas beberapa percobaan yakni; percobaan 1: isolasi DNA; percobaan 2: purifikasi DNA; percobaan 3: elektroforesis dan percobaan 4: amplifikasi dengan PCR dan sequencing. Hasil identifikasi isolat menggunakan metode 16 S rRNA diketahui 5 isolat proteolitik yakni isolat YN 1.1, YN 1.3, YN 1.6, YN 1.8 dan YN 2.25 adalah masuk dalam spesies *L. plantarum*, dengan indek kemiripan ,99 % untuk isolat YN 1.1, YN 1.3, YN 1.8 dan YN 2.25, sedangkan isolat YN1.6 memiliki indek kemiripan 100 %.

Penelitian Tahap III: aktivitas probiotik isolat terpilih yang dapat digunakan sebagai inokulum. Luaran penelitian adalah diketahuinya kemampuan probiotik isolat. Penelitian Tahap III terdiri atas beberapa percobaan, percobaan 1: sifat isolat terhadap antibiotik, percobaan 2: kemampuan anti-mikroba isolat, dan percobaan 3: kemampuan isolat tumbuh pada pH rendah dan larutan Bile salt. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat terpilih mampu melawan antibiotik yaitu *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6 tahan terhadap khlorampenikol pada kosentrasi 20 ppm, dan semua isolat yang diuji tidak tahan terhadap rimpafisin dan ampisilin. Kemampuan isolat melawan bakteri patogen, ditunjukkan oleh *L. plantarum* isolat YN 1.1. tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Listeria monocytogenes* tetapi mampu menghambat bakteri indikator lainnya, Sedangkan *L. plantarum* isolat YN 1.3 dan YN 1.6 mampu menghambat *L. monocytogenes* dan bakteri indikator lainnya. Berdasarkan ketahanan isolat dalam larutan Bile salt dan pH rendah maka diketahui isolat *L. plantarum* isolat YN1.1 dan YN 1.3 mampu bertahan terhadap pemapatan larutan Bile salt dan pH rendah (3,0) sedangkan *L. plantarum* isolat YN 1.6 hanya bisa bertahan terhadap pemaparan larutan *Bile salt* tapi tidak bisa hidup pada pH rendah (3,0). Keseluruhan hasil uji dapat disimpulkan bahwa BAL *L. plantarum* YN 1.1 dan YN 1.3, dapat digunakan sebagai inokulum probiotik, sedangkan *L. plantarum* YN 1.6 masih dapat dikatakan bersifat probiotik namun perlu dilakukan cara lain untuk melindungi sel dari pH rendah sehingga dapat hidup pada kondisi pH tersebut.

Penelitian Tahap IV: kemampuan isolat terpilih sebagai inokulum dalam fermentasi. Luaran penelitian adalah isolat yang terbaik untuk fermentasi susu kambing lokal. Penelitian Tahap IV terdiri atas beberapa percobaan, percobaan 1: pertumbuhan isolat terpilih pada media MRS dan perubahan pH selama pertumbuhan. Percobaan 2: kemampuan isolat dalam fermentasi susu kambing dengan melihat viabilitas dari isolat selama pertumbuhan pada skim milk 8 % dan juga perubahan pH selama fermentasi. Percobaan 3: menentukan kandungan asam organik selama pertumbuhan pada media MRS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6 secara keseluruhan mempunyai kemampuan memfermentasi susu kambing, dan dapat dijadikan sebagai inokulum untuk pembuatan minuman fermentasi, khususnya yoghurt. Selama fermentasi diketahui bahwa asam organik terutama asam laktat adalah yang tertinggi jika dibandingkan dengan asam asetat, propionat dan butirat. *L. plantarum* isolat YN 1.3 dan YN 1.6 merupakan isolat bakteri *L. plantarum* yang menghasil asam laktat terbesar dibandingkan dengan *L. plantarum* isolat YN 1.1.

Penelitian Tahap V: Karakterisasi minuman fungsional dari susu kambing. Luaran penelitian yang diperoleh adalah isolat penghasil minuman fungsional terbaik. Penelitian terditi atas beberapa percobaan; percobaan 1: penentuan kualitas yoghurt fungsional hasil fermentasi 2; karakteristik kimia, sifat sensoris dan kualitas fungsional yoghurt susu kambing. Sifat fungsional yoghurt susu kambing yang dianalisis adalah kemampuan hidup bakteri yoghurt pada saluran pencernaan dengan cara melihat kemampuan hidup BAL probiotik yoghurt setelah dipapar dengan larutan Bile salt 0,5 % dan pH rendah. Hasil



penelitian menunjukkan bahwa *L. plantarum* isolat YN 1.3 dan YN 1,6 menghasilkan yoghurt susu kambing fungsional yang terbaik dilihat dari total BAL, pH dan total asam namun secara keseluruhan dapat diketahui bahwa semua *L. plantarum* yang diuji menghasilkan yoghurt susu kambing fungsional dengan mutu baik dengan total BAL sebesar 10^9 cfu/ml. Berdasarkan sifat sensoris dapat diketahui, bahwa yoghurt susu kambing dengan inokulum *L. plantarum* isolat YN 1.3 dan YN 1.6 lebih disukai dibandingkan dengan YN 1.1. Ditinjau dari kemampuan BAL yoghurt fungsional dapat diketahui bahwa *L. plantarum* isolat YN 1.3 lebih baik kemampuan hidupnya pada larutan *Bile salt* 0,5% dan pH rendah dari pada isolat lainnya. Namun secara keseluruhan semua isolat *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6, setelah digunakan sebagai inokulum yoghurt mampu bertahan pada larutan bile salt 0,5 % dan pH rendah.

Hasil isolasi dari susu kambing yang difermentasi secara spontan adalah BAL proteolitik dan probiotik serta mampu dalam memfermentasi susu kambing. *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6 berpotensi sebagai inokulum probiotik untuk pembuatan minuman fungsional yoghurt susu kambing. Dari hasil keseluruhan penelitian isolat *L. plantarum* YN 1.3 merupakan isolat terbaik sebagai bakteri probiotik dan menghasilkan minuman fungsional yoghurt susu kambing lokal dengan kualitas terbaik.



DAFTAR SINGKATAN

mm	: millimeter
µm	: micro meter
°C	: derajat celsius
mM	: milli moular
ACE	: Angiotensin Converting Enzyme
API	: Analytical Profile Index
BAL	: Bakteri Asam Laktat
Bp	: Base pair
Cfu	: Colony Forming Unit
DNA	: Deoxy Ribo Nucleac Acid
EDTA	: Ethylene Diamide Tetra Acetic Acid
FAO	: Food and Agriculture Organization of The United Nayions
FNCC	: Food and Nutrition Culture Colection
FOSHU	: Food for Specified Health Use
GRAS	: Generally Recognized as Safe
GYP	: Glocose Yeast Pepton
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
HCL	: Hydro Chloride Acid
kb	: kilo bait
MRS	: deMan Rogosa Sharpe
NaCl	: Natrium Chloride
OD	: Optical Density
TSA	: Trypticase Soy Agar
PE	: Peranakan Etawa
pH	: Potential Hydrogen
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PRS	: Profile Recognition System
rRNA	: Ribosomal Ribo Nucleic Acid
RAPD	: Rabdomly Amplyfied Polymorphic DNA
rpm	: Revolution Per-minute
SDS-PAGE	: Sodium Disulfate Polyacrilamide Gel Electroforesis
Sp	: Species
TAE	: Tris Acetate EDTA
TCA	: Tricloro Acetic Acid
TE	: Tris -EDTA
TPC	: Total Plate Count



KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Alhamdulillah, penulis panjatkan puji dan syukur kehadirat Allah SWT, berkat rahmat dan karuniaNya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi dengan judul “ Potensi Bakteri Asam Laktat Hasil Isolasi Dari Fermentasi Spontan Susu Kambing Lokal Sebagai Bakteri Probiotik Untuk Produksi Minuman Fungsional Yoghurt Susu Kambing”.

Penelitian ini didasari atas pemikiran bahwa bakteri asam laktat probiotik penting untuk meningkatkan sifat fungsional dari suatu minuman fermentasi. Minuman fermentasi dari susu kambing yang ditambahkan bakteri probiotik akan memberikan efek positif bagi kesehatan konsumen. Penggunaan bakteri probiotik hasil isolasi susu kambing lokal sebagai bakteri probiotik belum banyak di eksplorasi oleh peneliti sebelumnya. Berdasarkan itulah penulis tertarik untuk meneliti bakteri probiotik yang di isolasi dari susu kambing lokal yang difermentasi secara spontan guna meningkatkan sifat fungsional susu kambing lokal. Pada penelitian ini ditentukan spesies dari isolat yang dihasilkan baik dengan metode konvensional maupun dengan metode 16S rRNA, kemudian ditentukan sifat probiotiknya, dan dilanjutkan dengan kemampuan isolat yang diperoleh sebagai inokulum dalam fermentasi susu kambing serta kualitas produk fermentasi yakni yoghurt susu kambing yang dihasilkan.

Penulis berharap semoga tulisan dalam disertasi ini dapat menjadi bahan rujukan ilmiah bagi peneliti lain dan juga dapat menjadi sumber ilmu pengetahuan yang bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan khususnya bidang mikrobiologi pangan. Semoga tulisan ini dapat memberikan manfaat bagi para pembaca sekalian,.....Amin.

Malang, Juli 2014

Penulis,



DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN PENGESAHAN	i
IDENTITAS PENGUJI	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI	iii
HALAMAN PERUNTUKAN	iv
RIWAYAT HIDUP	v
UCAPAN TERIMAKASIH	vi
DAFTAR ISTILAH DAN PENGERTIAN	viii
SUMMARY	ix
RINGKASAN	xi
KATA PENGANTAR	xiv
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	xix
DAFTAR GAMBAR	xxi
DAFTAR LAMPIRAN	xxiii
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar belakang.....	1
1.2. Rumusan masalah.....	4
1.3. Tujuan penelitian.....	5
1.4. Manfaat penelitian.....	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Bakteri Asam Laktat (BAL).....	7
2.1.1. Karakteristik Bakteri Asam Laktat.....	7
2.1.2. BAL sebagai probiotik.....	7
2.1.3. Senyawa antimikroba yang dihasilkan BAL.....	9
2.2. Bakteri probiotik sebagai inokulum yoghurt.....	12
2.3. Pangan fungsional.....	15
2.4. Yoghurt probiotik sebagai pangan fungsional.....	16
2.5. Susu kambing.....	17
2.6. Identifikasi BAL probiotik.....	19



III. KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN.....

3.1 Kerangka pikir penelitian.....	28
3.2 Hipotesis.....	29
3.3 Alur cakupan penelitian.....	
4.1. Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian.....	30
4.2. Penelitian Tahap I.....	30
4.2.1. Cakupan percobaan penelitian.....	31
4.2.2. Tempat penelitian.....	31
4.2.3. Bahan penelitian.....	32
4.2.4. Alat penelitian.....	32
4.2.5. Metode penelitian.....	32
4.2.5.1. Isolasi Bakteri Asam Laktat.....	33
4.2.5.1. Identifikasi Bakteri Asam laktat.....	34
4.3 Penelitian Tahap II.....	37
4.3.1. Cakupan penelitian.....	37
4.3.2. Tempat penelitian.....	36
4.3.3. Bahan penelitian.....	37
4.3.4. Alat penelitian.....	38
4.3.5. Metode penelitian.....	38
4.3.5.1. Isolasi DNA dengan 16S rRNA.....	38
4.3.5.2. Purifikasi sequencing.....	40
4.3.5.3. Re- konstruksi silsilah filogram.....	41
4.4. Penelitian Tahap III.....	41
4.4.1. Cakupan penelitian.....	41
4.4.2. Tempat penelitian.....	42
4.4.3. Bahan penelitian.....	42
4.4.4. Alat penelitian.....	42
4.4.5. Metode penelitian.....	42
4.4.5.1. Uji aktivitas antibakteri.....	42
4.4.5.2. Kemampuan daya tahan isolat bakteri terhadap Bile salt.....	43
4.4.5.3. Kemampuan hidup pada pH rendah.....	44



4.5. Penelitian Tahap IV.....

4.5.1. Cakupan penelitian.....	44
4.5.2. Tempat Penelitian.....	
4.5.3. Bahan Penelitian.....	45
4.5.4. Alat penelitian.....	45
4.5.5. Metode penelitian.....	45
4.5.5.1. Pertumbuhan bakteri pada media MRS. broth.....	45
4.5.5.2. Pertumbuhan bakteri pada media skim milk 8 %.....	46
4.5.5.3. Perubahan pH selama fermentasi.....	46
4.5.5.4. Analisis asam organik selama fermentasi.....	46
4.5.5.5. Analisis statistik.....	46

4.6. Penelitian Tahap V.....

4.6.1. Cakupan penelitian.....	47
4.6.2. Tempat penelitian.....	47
4.6.3. Bahan penelitian.....	47
4.6.4. Alat penelitian.....	48
4.6.5. Metode penelitian.....	48
4.6.5.1. Pembuatan inokulum isolat.....	48
4.6.5.2. Pembuatan minuman susu kambing fermentasi.....	49
4.6.5.3. Analisis yoghurt fungsional.....	49
4.6.5.4. Analisis statistik.....	51

V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....

5.1. Penelitian Tahap I.....

5.1.1. Isolasi bakteri asam laktat.....	51
5.1.2. Identifikasi Bakteri Asam Laktat.....	53
5.1.2.1. Pengujian morfologi.....	53
5.1.2.2. Pengujian motilitas.....	54
5.1.2.3. Pengecatan Gram.....	55
5.1.2.4. Uji katalase.....	55
5.1.3. Uji tipe fermentasi.....	58
5.1.4. sifat proteolitik BAL.....	58
5.1.5. Uji fisiologis.....	61
5.1.6. Kemampuan fermentasi karbohidrat.....	63



5.1.7. kesimpulan penelitian Tahap I.....	68
---	----

5.2. Penelitian Tahap II.....

5.2.1. Isolasi dan pemurnian DNA.....	69
5.2.2. Electroforesis DNA.....	70
5.2.3. Uji PCR.....	71
5.2.4. Sequensing 16S rRNA.....	73
5.2.5. Re konstruksi silsilah filogeni.....	76
5.2.6. Perbedaan hasil spesies Tahap I dan Tahap II.....	81
5.2.7. Kesimpulan penelitian.....	82

5.3. Penelitian Tahap III.....

5.3.1. Uji ketahanan BAL terhadap antibiotik.....	83
5.3.2. Uji BAL terhadap bakteri patogen dan pembusuk.....	85
5.3.2.1. Uji aktivitas anti-bakteri oleh supernatan asam.....	85
5.3.2.2. Aktifitas anti bakteri isolat pada supernatan netral.....	89
5.3.3. Kemampuan pertumbuhan isolat bakteri dalam Bile salt dan pH rendah.....	92
5.3.3.1. Ketahanan isolat dalam larutan Bile Salt.....	92
5.3.3.2. Ketahanan isolat BAL terhadap pH rendah.....	95
5.3.4. Kesimpulan penelitian Tahap III.....	98

5.4. Penelitian Tahap IV.....

5.4.1. Kinetika pertumbuhan BAL pada media MRS.....	99
5.4.2. Perubahan pH selama pertumbuhan isolat pada media MRS.....	102
5.4.3. Asam organik yang dihasilkan.....	103
5.4.4. Kemampuan Isolat sebagai inokulum.....	104
5.4.4.1. Viabilitas isolat probiotik pada media skim.....	104
5.4.4.2. Perubahan pH selama fermentasi.....	106
5.4.5. Kesimpulan Penelitian Tahap IV.....	107

5.5. Penelitian Tahap V.....

5.5.1. Viabilitas BAL selama fermentasi yoghurt susu kambing.....	108
5.5.2. Perubahan pH yoghurt susu kambing selama fermentasi.....	112
5.5.3. Total asam laktat yoghurt susu kambing.....	115



5.5.4. Kualitas kimia yoghurt susu kambing.....	118
5.5.4.1. Kadar Air.....	119
5.5.4.2. Kadar Abu.....	120
5.5.4.3. Kadar Lemak.....	120
5.5.4.4. Kadar Protein.....	121
5.5.5. Kualitas sensoris yoghurt susu kambing lokal.....	122
5.5.5.1. Rasa yoghurt.....	122
5.5.5.2. Aroma yoghurt.....	123
5.5.5.3. Warna yoghurt.....	124
5.5.5.4. Tekstur yoghurt.....	125
5.5.6. Kemampuan pertumbuhan BAL yoghurt pada pH rendah dan Bile salt	125
5.5.6.1. Ketahanan BAL yoghurt terhadap pH Rendah.....	125
5.5.6.2. Ketahanan isolat dalam larutan Bile salt.....	128
5.5.6.2. Kesimpulan penelitian Tahap.....	131
VI. KESIMPULAN DAN ARAN.....	132
DAFTAR PUSTAKA.....	134
DAFTAR LAMPIRAN.....	145



DAFTAR TABEL

Tabel	Teks	Halaman
2.1.	Mikroorganisme yang lazim digunakan untuk produk pangan probiotik.....	12
2.2.	Pengaruh kultur <i>Lactobacillus</i> Terhadap Pertumbuhan <i>Salmonellatyphimurium</i> SL.1344.....	14
2.3.	Standar Nasional Indonesia untuk yoghurt.....	18
2.4.	Komposisi susu kambing, susu sapi dan ASI.....	21
5.1.	Pertumbuhan isolat hasil isolasi pada media MRS-CaCO ₃	56
5.2.	Zona jernih isolat pada media MRS, CaCO ₃ dan media Skim milk.....	59
5.3.	Diameter zona jernih yang dibentuk isolat terpilih pada media skim milk.....	60
5.4.	Karakteristik BAL proteolitik hasil isolasi susu kambing.....	62
5.5.	Kemampuan fermentasi isolat terpilih menggunakan kit API 50 CHL.....	64
5.6.	Penghambatan antibiotik terhadap isolat <i>Lactobacillus .plantarum</i> pada konsentrasi 20 ppm.....	85
5.7.	Diameter zona hambat (mm) <i>L plantarum</i> YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6 terhadap <i>E coli</i> , <i>S. thyphimurium</i> , <i>B cereus</i> , <i>S aureus</i> dan <i>L monocytogenes</i>	86
5.8.	Diameter zona penghambatan (mm) supernatan netral isolat <i>L plantarum</i> YN1.1, YN1.3 dan YN 1.6 terhadap bakteri indikator.....	90
5.9.	Asam organik (laktat, asetat, propionat dan butirrat) yang di produksi <i>L. plantarum</i> YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6 selama 24 jam.....	104
5.10.	Kualitas kimia yoghurt susu kambing.....	119



DAFTAR GAMBAR

Gambar

Halaman

2.1.	Metabolisme glukosa oleh Bakteri Asam Laktat homofermentatif dan hetero fermentatif.....	8
3.1.	Alur cakupan penelitian untuk penyusunan disertasi.....	29
4.1.	Diagram alir proses pembuatan minuman fungsional susu kambing.....	50
5.1.	Pertumbuhan koloni bakteri dari susu kambing fermentasi pada media MRS yang ditambah CaCO ₃ 1%.....	52
5.2.	Pemurnian isolat YN 1.3 dan YN 1.6 hasil isolasi dengan teknik penggoresan.....	53
5.3.	Sifat motilitas dari beberapa isolate BAL.....	54
5.4.	Aktivitas enzim proteolitik isolat YN 1.6 dan YN 1.3 dalam menghasilkan zona jernih pada media Skim Milk Agar.....	60
5.5.	Proses inkubasi yang dilakukan selama isolasi DNA dan supernatan Sel DNA setelah proses sentrifugasi.	69
5.6.	Proses elektroforesis menggunakan Agarosa 8% dan DNA Hasil elektroforesis menggunakan UV.....	71
5.7.	Amplifikasi 16S rRNA isolat YN1.1, YN1.3, YN 1.6, YN 1.8 dan YN 2.25 dan Marker DNA.....	72
5.8.	Hasil Sequensing DNA masing-masing isolat.....	73
5.9.	Rekonstruksi silsilah filogeni menggunakan maximum parsimony.....	76
5.10.	Rekonstruksi silsilah filogeni menggunakan Likelihood.....	78
5.11.	Penghambatan klorampenikol terhadap isolat <i>Lactobacillus plantarum</i> isolat Y 1.1 dan <i>Lactobacillus plantarum</i> YN 1.3 pada konsentrasi 50 ppm.....	79
5.12.	Penghambatan <i>Lactobacillus plantarum</i> YN 1.3 terhadap <i>Salmonella typhimurium</i> (a) dan Penghambatan <i>Lactobacillus plantarum</i> YN 1.1 terhadap <i>Bacillus cereus</i> (b).....	88



5.13.	Zona penghambatan <i>Lactobacillus plantarum</i> isolat YN.1.1 terhadap <i>Stapylococcus aureus</i> (a) Zona Hambat <i>Lactobacillus plantarum</i> isolat YN 1.3 terhadap <i>Salmonella thypimurium</i>	91
5.14.	Jumlah sel hidup BAL setelah dan sebelum pemaparan pada larutan Bile Salt 0,5 % selama 4 jam	92
5.15.	Total BAL pada perlakuan pH rendah pH (3.0).....	97
5.16.	Pertumbuhan <i>Lactobacillus plantarum</i> isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6 selama inkubasi menggunakan MRS Broth.....	100
5.17.	Grafik perubahan pH selama pertumbuhan. <i>Lactobacillus plantarum</i> isolat YN 1.1, Yn 1.3 dan YN 1.6.....	102
5.18.	Pertumbuhan dari BAL selama proses fermentasi <i>Lactocillus plantarum</i> Isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6.....	105
5.19.	Perubahan pH selama proses fermentasi menggunakan inokulum <i>Lactobacillus plantarum</i> isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6.....	107
5.20.	Viabilitas BAL selama proses fermentasi yoghurt susu kambing.....	109
5.21.	Perubahan pH selama proses fermentasi Yoghurt Susu kambing.....	113
5.22.	Total asam laktat selama proses fermentasi yoghurt susu kambing dengan inokulum terpilih.....	116
5.23.	Total BAL pada yoghurt menggunakan inokulum berbeda sebelum dan setelah perlakuan pH rendah (3.0).....	128
5.24.	Jumlah sel hidup yoghurt dengan inokulum berbeda sebelum dan Setelah pemaparan 0,5 % Bile salt selama 4 Jam.....	130



DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN

Teks

Halaman

1.	Uji dekstran dan fermentasi glukosa.....	146
2.	Uji organoleptik untuk mutu yoghurt. susu kambing menggunakan inokulum yang berbeda (uji rasa).....	147
3.	Uji organoleptik untuk mutu yoghurt. susu kambing menggunakan inokulum yang berbeda (uji aroma).....	148
4.	Uji organoleptik untuk mutu yoghurt. susu kambing menggunakan inokulum yang berbeda (uji warna).....	149
5.	Uji organoleptik untuk mutu yoghurt. susu kambing menggunakan inokulum yang berbeda (uji tekstur).....	150
6.	Hasil analisis total BAL pada media MRS selama fermentasi.....	151
7.	Hasil analisis perubahan pH pada media MRS selama fermentasi.....	154
8.	Hasil analisis total BAL pada media skim milk.....	157
9.	Hasil analisis perubahan pH pada media skim milk.....	160
10.	Hasil analisis total BAL (Log cfu/ml) selama proses fermentasi yoghurt Susu kambing.....	163
11.	Hasil Analisis pH Selama Proses Fermentasi Yoghurt. Susu kambing.....	165
12.	Hasil analisis total asam laktat selama fermentasi yoghurt susu kambing.....	168
13.	Hasil analisis kemampuan hidup dalam Bile, Salt dan pH rendah.....	171
14.	Hasil analisis sensoris (rasa, aroma, warna dan tekstur.).....	173
15.	Strain bakteri acuan untuk rekonstruksi pohon filogeni.....	177
16.	Hasil Analisis Indeks similaritas 1solat terpilih dengan Stran acuan.....	178



LAMPIRAN

Teks

Halaman

17 Sertifikat Seminar International 205

18 Jurnal hasil Publikasi 207



DAFTAR SINGKATAN

mm : millimeter

µm : micro meter

°C : derajat celsius

mM : milli moular

ACE : Angiotensin Converting Enzyme

API : Analytical Profile Index

BAL : Bakteri Asam Laktat

Bp : Base pair

Cfu : Colony Forming Unit

DNA : Deoxy Ribo Nucleac Acid

EDTA : Ethylene Diamide Tetra Acetic Acid

FAO : Food and Agriculture Organization of The United Nayions

FNCC : Food and Nutrition Culture Colection

FOSHU : Food for Specified Health Use

GRAS : Generally Recognized as Safe

GYP : Glucose Yeast Pepton

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HCL : Hydro Chloride Acid

kb : kilo bait

MRS : deMan Rogosa Sharpe

NaCl : Natrium Gloride

OD : Optical Density

TSA : Trypticase Soy Agar



PE : Peranakan Etawa

pH : Potential Hydrogen

PCR : Polymerase Chain Reaction

PRS : Profile Recognition System

rRNA : Ribosomal Ribo Nucleic Acid

RAPD : Rablymody Amplyified Polymorphic DNA

rpm : Revolution Per-minute

SDS-PAGE : Sodium Disulfate Polyacrilamide Gel Electroforesis

Sp : Species

TAE : Tris Acetate EDTA

TCA : Tricloro Acetic Acid

TE : Tris -EDTA

TPC : Total Plate Count

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository

Repository



I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Seiring dengan meningkatnya kesadaran masyarakat akan pentingnya hidup sehat, maka terjadi pula peningkatan penelitian dan pemasaran produk-produk makanan yang berpotensi dapat menjaga kesehatan tubuh. Produk makanan yang berkhasiat terapeutik lebih dikenal dengan istilah makanan fungsional dan salah satu makanan fungsional yang banyak dikenal oleh masyarakat, adalah makanan yang bersifat probiotik. Probiotik yaitu mikrobia hidup yang apabila dikonsumsi akan menimbulkan efek terapeutik pada tubuh dengan cara memperbaiki keseimbangan mikroflora dalam saluran pencernaan. Makanan fungsional probiotik juga memberikan ruang bagi berkembangnya industri pangan, dengan menggunakan konsep probiotik. Pemanfaatan probiotik dapat dilakukan dengan berbagai ragam aplikasi sehingga dapat menguntungkan bagi kesehatan baik bagi manusia ataupun hewan ternak.

Di Indonesia banyak dijual minuman fungsional yang merupakan minuman fermentasi probiotik baik yang dibuat secara modern maupun yang dibuat secara tradisional. Minuman fungsional yang dibuat baik secara modern maupun secara tradisional mempunyai potensi dalam memelihara kesehatan.

Salah satu minuman fungsional yang sudah umum dan banyak dijual di pasaran, disebut dan dikenal dengan "yoghurt" probiotik sebagai hasil fermentasi susu sapi menggunakan bakteri-bakteri yang bersifat probiotik baik bakteri dari golongan asam laktat maupun bakteri dari golongan *Bifidobacterium*. *Lactobacillus acidophilus* merupakan salah satu mikrobia probiotik, yang sering dijumpai dalam yoghurt.

Fungsi yoghurt yang mengandung bakteri yang bersifat probiotik dalam mencegah berbagai penyakit telah banyak dilaporkan. Beberapa hasil penelitian



menunjukkan bahwa bakteri probiotik mempunyai efek positif bagi saluran pencernaan. Manfaat lain mengonsumsi probiotik ialah sebagai anti-diare, memperbaiki intoleran laktosa dan dapat mencegah penyakit metabolisme seperti hipertensi, hiperkolesterol, diabetes serta ketidak seimbangan hormon.

Pembuatan minuman fungsional probiotik, bahan dasarnya dapat digunakan berbagai jenis susu hewan seperti sapi, kerbau, kambing, domba dll. Salah satu minuman fungsional probiotik yang dikenal di Indonesia adalah yoghurt dengan bahan utama susu sapi, sedangkan yoghurt yang dibuat dari susu kambing masih belum umum dilakukan di Indonesia.

Secara umum susu kambing mempunyai aroma yang kurang disukai oleh masyarakat, karena aroma khas susu kambing sangat kuat atau berbau "brangus" (*goaty flavor*). Oleh karena itu perlu dilakukan pengolahan tambahan agar susu kambing dapat dimanfaatkan secara baik dan maksimal, mengingat susu kambing mempunyai nilai gizi yang setara dengan susu sapi.

Susu kambing mempunyai banyak komponen bioaktif yang bermanfaat untuk pencegahan beberapa penyakit, diantaranya diare, gagal ginjal, TBC, penyakit kulit terutama sebagai anti-alergi bagi anak-anak yang tidak bisa mengonsumsi susu sapi. Komponen bioaktif pada susu kambing diantaranya *casomorphins* yang mempunyai aktivitas pencegahan diare, dan *casokinins* mempunyai aktivitas meningkatkan aliran darah ke ephitel intestin, *emmuopeptida* yang meningkatkan respon imun, *lactoferin* sebagai anti-mikrobia, oligosakarida yang bersifat probiotik dan lain sebagainya.

Pada proses pembuatan minuman fungsional dengan cara fermentasi seperti "yoghurt" secara umum lazim digunakan bakteri asam laktat yang bersifat probiotik seperti *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus acidophilus*. Penggunaan bakteri probiotik biasanya digabung dengan bakteri asam laktat yang sudah umum digunakan dalam pembuatan yoghurt seperti *Streptococcus thermophilus* dan



Lactobacillus bulgaricus. Penggunaan bakteri tersebut dimaksudkan untuk meningkatkan sifat fungsional yoghurt yang dihasilkan.

Sifat fungsional yoghurt, selain ditentukan oleh bahan yang digunakan juga ditentukan oleh sifat dan kemampuan bakteri dalam fermentasi. Sifat dan kemampuan bakteri yang digunakan dalam fermentasi tidaklah selalu sama, baik dalam hal perbaikan produk yang dihasilkan maupun kemampuannya dalam menghasilkan metabolit selama fermentasi berlangsung. Sifat fungsional yoghurt yang menggunakan bakteri probiotik, juga ditentukan oleh kemampuan bakteri untuk bertahan hidup dalam sistem saluran pencernaan. Penggunaan bakteri probiotik untuk pembuatan minuman fermentasi diharapkan mampu mengkolonisasi sel bakteri probiotik dalam saluran pencernaan, mempunyai sifat antagonistik terhadap bakteri patogen serta menghasilkan metabolit-metabolit yang dapat memperbaiki dan memelihara kesehatan.

Bakteri probiotik dari spesies bakteri asam laktat (BAL), dapat diperoleh melalui isolasi dari suatu produk atau sumber tertentu, baik dari produk jadi maupun bahan mentah seperti daging, susu, tumbuh-tumbuhan atau produk hasil fermentasi alami.

Penelitian difokuskan untuk isolasi dan identifikasi BAL proteolitik dari susu kambing yang difermentasi secara spontan dan mempunyai kemampuan sebagai bakteri probiotik. Berdasarkan karakteristik isolat yang ditentukan secara makroskopik, mikroskopik dan kimiawi, dapat digunakan sebagai dasar penetapan isolat probiotik untuk produk fermentasi, khususnya untuk fermentasi susu kambing. Hasil isolasi selanjutnya diidentifikasi baik secara konvensional berdasarkan morfologis, fisiologis maupun secara biokimiawi menggunakan kit API 50 CHL. Identifikasi dilanjutkan secara molekuler menggunakan metode 16S rRNA, agar dapat dikenali identitas jenis dari bakteri probiotik yang dihasilkan. Pada penelitian ini kemampuan isolat sebagai bakteri probiotik, dianalisis melalui



penentuan kemampuan adaptasi isolat terhadap antibiotik dan anti-mikrobia dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan bakteri pembusuk serta kemampuan isolat bertahan pada saluran pencernaan secara invitro. Isolat terbaik yang dihasilkan selanjutnya dilihat kemampuannya sebagai starter atau inokulum pada pembuatan yoghurt susu kambing dan tahap akhir penelitian adalah identifikasi karakteristik dan sifat fungsional yoghurt susu kambing yang dihasilkan.

Berdasarkan beberapa hal diatas maka dilakukan penelitian tentang "Potensi bakteri asam laktat hasil isolasi dari fermentasi spontan susu kambing sebagai bakteri probiotik untuk produksi minuman fungsional yoghurt susu kambing" dengan harapan hasil yoghurt yang diperoleh dapat dikembangkan sebagai pangan fungsional dengan menggunakan BAL probiotik hasil isolasi dari susu kambing yang difermentasi secara spontan selama 96 jam atau pada pH susu mencapai 4,0.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas, maka dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah isolat BAL dari hasil fermentasi spontan susu kambing bersifat proteolitik ?.
2. Bagaimana karakteristik biokimia isolat BAL yang bersifat proteolitik serta sifat nukleotida yang dihasilkan diuji dengan metode 16S rRNA, agar jenis BAL yang diperoleh dapat diidentifikasi dengan harapan dapat dikembangkan lebih lanjut menjadi inokulum ?.
3. Bagaimana sifat probiotik isolat BAL proteolitik yang di isolasi dari fermentasi susu kambing secara spontan (kemampuan *antagonistik* dengan bakteri pembusuk dan patogen) serta kemampuan hidup isolat BAL dalam saluran cerna secara invitro ?.



4. Bagaimana kemampuan isolat BAL probiotik sebagai inokulum untuk fermentasi susu kambing sebagai minuman fungsional ?.

5. Bagaimana karakteristik minuman fermentasi susu kambing dengan menggunakan isolat BAL probiotik hasil isolasi fermentasi spontan susu kambing ?.

1.3. Tujuan Penelitian:

Secara umum tujuan penelitian adalah untuk memperoleh isolat BAL yang bersifat proteolitik dan memiliki kemampuan sebagai BAL probiotik untuk produksi minuman fermentasi susu kambing fungsional.

Tujuan khusus penelitian adalah untuk:

1. Memperoleh isolat BAL proteolitik yang memiliki kemampuan probiotik dari hasil fermentasi spontan susu kambing.
2. Mengetahui kemampuan proteolitik isolat BAL yang diperoleh.
3. Identifikasi isolat secara mikrobiologis dan kimiawi serta uji nukleotida dengan sequensing menggunakan 16S rRNA.
4. Mengetahui kemampuan isolat BAL hasil isolasi fermentasi spontan susu kambing, sebagai isolat probiotik
5. Mengetahui kemampuan isolat sebagai starter atau inokulum untuk fermentasi susu kambing.
6. Mengetahui karakteristik fisiko-kimiawi dan mikrobiologis minuman probiotik susu kambing hasil fermentasi dengan inokulan isolat BAL

1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut :

1. Memberikan informasi kepada masyarakat produsen minuman fungsional khususnya yoghurt probiotik susu kambing sebagai minuman fungsional.



2. Sebagai sumbangan Ilmu Pengetahuan bagi Perguruan Tinggi dalam mengkaji karakteristik yoghurt probiotik sebagai minuman fungsional, dengan inokulum atau starter isolat BAL hasil isolasi dari fermentasi spontan susu kambing.
3. Sebagai bahan rujukan bagi peneliti dalam melakukan kajian tentang yoghurt probiotik sebagai minuman fungsional dengan starter isolat BAL hasil isolasi fermentasi spontan susu kambing.
4. Sebagai sumbangan bagi masyarakat industri yang bergerak di bidang pangan fungsional khususnya minuman fungsional berbasis susu kambing fermentasi.



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri Asam Laktat.

2.1.1. Karakteristik Bakteri Asam Laktat.

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri Gram positif, tidak mempunyai sitokrom, lebih menyukai kondisi anaerobik, tahan asam, bersifat fermentatif.

Bakteri ini menghasilkan asam laktat sebagai produk utamanya selama fermentasi berlangsung dengan memfermentasi karbohidrat (Axelsson, 2004). Bakteri asam

laktat dapat dibedakan menjadi dua kelompok berdasarkan metabolisme karbohidrat yang dilakukan, antara lain kelompok homo-fermentatif yang terdiri atas

Lactococcus, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* dan beberapa

Lactobacillus menggunakan jalur glikolisis untuk transfer sumber karbon menjadi asam laktat (Mozzi *et al.*, 2010).

Berbagai spesies bakteri asam laktat *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* mendapatkan GRAS (*Generally Recognized As Safe*), yakni aman bagi manusia

dan tidak ditemukan efek negatif terhadap subjek. Kelompok bakteri ini tidak membusukkan protein, dan dapat memetabolisme berbagai jenis karbohidrat

secara fermentatif menjadi asam laktat (Saarela, 2000). *L. acidophilus* merupakan

salah satu bakteri asam laktat yang bersifat homofermentatif yang telah banyak

diteliti sebagai probiotik, dan bakteri ini sangat berpotensi dalam mencegah

karsinogenesis, diare, infeksi usus, konstipasi, flatulensi, gastroinfeksi dan

hiperkolesterolemia (Kulisaar *et al.*, 2002).

Secara morfologis BAL terdiri atas dua familia, yaitu *Lactobacillaceae* yang

berbentuk batang dan *Streptococcaceae* yang berbentuk bulat. Famili

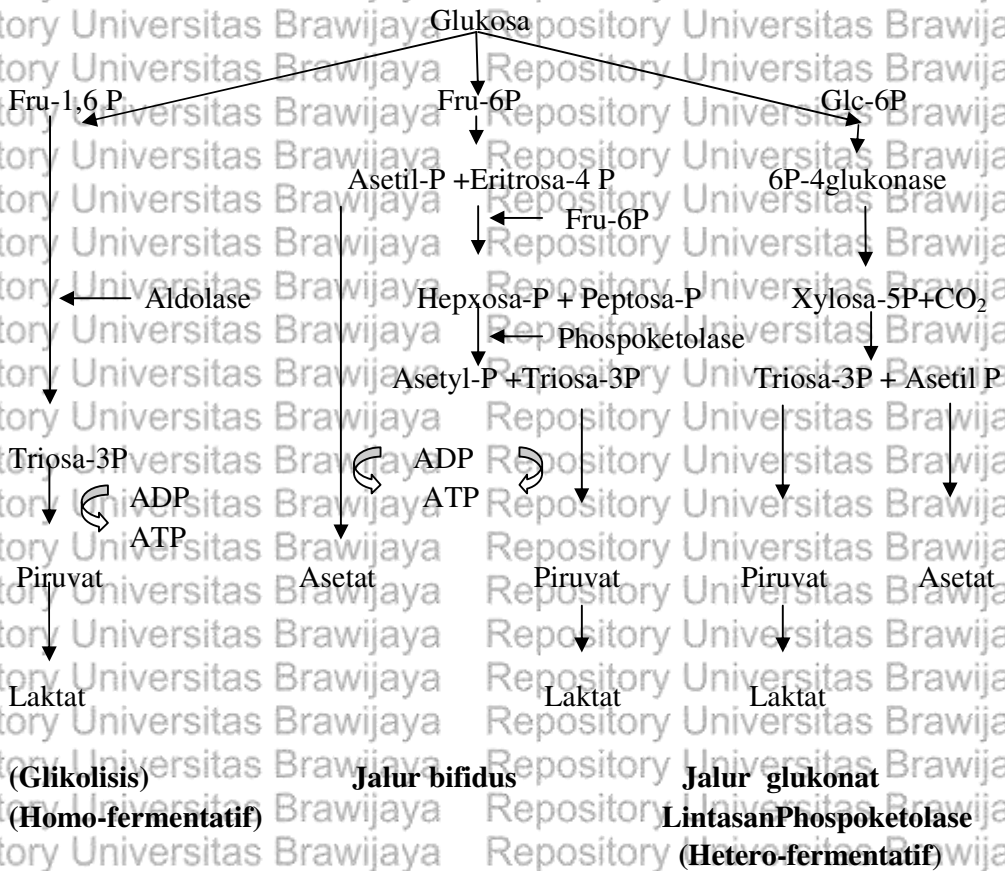
Lactobacillaceae terdiri atas genus *Lactobacillus*, sedangkan famili

Streptococcaceae terdiri atas genus *Streptococcus*, *Leuconostoc* dan *Pediococcus*

(Wood, 1995).



Metabolisme glukosa oleh bakteri homo-fermentatif dan hetero-fermentatif dari bakteri asam laktat dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Metabolisme glukosa oleh bakteri asam laktat homofermentatif dan hetero-fermentatif (Wood dan Holzapel, 1995)

Bakteri asam laktat (BAL) terdistribusi secara luas di alam dan secara alami merupakan mikroflora pada susu segar dan produk olahannya seperti yoghurt.

Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang sangat penting perannya dalam fermentasi. Beberapa spesies bakteri dari genus *Lactobacillus* (*Lb*) masuk dalam kelompok BAL. Fermentasi yang melibatkan bakteri asam laktat sudah lama diketahui dan dimanfaatkan oleh manusia untuk membuat aneka ragam makanan olahan, dan merupakan pengawet alami bahan makanan (Azadnia *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2003; Fujisawa dan Mitsuoka, 1996).



Khalid (2011) menyatakan bahwa BAL merupakan bakteri yang penting pada produk fermentasi, dimana BAL selain berperan dalam fermentasi juga meningkatkan nilai nutrisi produk fermentasi. Sedangkan Moulay *et al.*, (2013) menyatakan bahwa BAL secara intensif telah digunakan untuk fermentasi pangan termasuk-produk olahan susu, dan aktivitas proteolitik BAL sangat penting pada produk fermentasi dimana BAL memberikan kontribusi pada komponen aroma produk. Selanjutnya Desai *et al.*, (2004) menyatakan bahwa penggunaan BAL genera *Lactobacillus* pada saat ini mengalami peningkatan dan penting bagi teknologi pangan terutama di industri fermentasi, dan beberapa strain *Lactobacillus* dipercaya dapat menghasilkan komponen bioaktif yang memberikan efek positif bagi kesehatan seperti perlindungan terhadap diare, bersifat anti-biotik dan anti-tumor.

Penggunaan kultur strain BAL penting untuk produksi beberapa jenis susu fermentasi diantaranya *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*), *Lactococcus lactis* (*L. lactis*), *Lactobacillus helveticus* (*L. helveticus*), dan *Lactobacillus delbueckii sub-sp bulgaricus*. BAL mempunyai peran penting dalam fermentasi pangan karena kemampuannya sebagai bakteri proteolitik khususnya dalam fermentasi susu (Christensen *et al.*, 1999).

2.1.2. Bakteri asam laktat sebagai bakteri probiotik.

Probiotik adalah mikrobia hidup, yang apabila dimakan akan memberikan efek menguntungkan bagi inang disaluran pencernaan. Sedangkan pernyataan *The International Scientific Association* tentang probiotik dan prebiotik sama seperti pernyataan komisi di Eropah yang mengadopsi istilah probiotik sebagai definisi yang sah (Reid *et al.*, 2003).

Penggunaan strain BAL yang dapat dijadikan inokulum probiotik mempunyai persyaratan tertentu. Oleh karena itu tidak semua strain bakteri dapat



dimanfaatkan sebagai “agen” probiotik. Dengan demikian BAL yang dapat dijadikan sebagai bakteri probiotik mempunyai persyaratan tertentu, minimal satu dari beberapa karakteristik berikut:

1. Memiliki aktivitas anti-mikrobia.

Dalam hal ini strain bakteri probiotik dapat berperan sebagai anti-biotik alami. Beberapa strain BAL mampu membentuk asam organik, hidrogen peroksida dan bakteriosin.

2. Tahan terhadap kondisi dalam sistem saluran pencernaan seperti asam lambung, cairan empedu, dan getah pankreas.

3. Memiliki aktivitas anti-karsinogenik, seperti nitrosamin yang masuk ke saluran pencernaan, akan dapat dicegah penyerapannya oleh bakteri probiotik tersebut dengan membentuk selaput protein dan vitamin.

4. Mampu berkoloni dalam saluran pencernaan, dan mampu bersimbiosis dengan flora usus, sehingga dapat melakukan proses yang diinginkan dan tidak cepat terbuang bersama tinja.

5. Mampu meningkatkan kemampuan penyerapan nutrisi oleh usus, karena BAL dapat menguraikan laktosa susu yang dikonsumsi menjadi monosakarida (glukosa dan galaktosa) (Anonymous, 2000)

Jacobsen dan Lei (2004) menyatakan bahwa bakteri asam laktat jenis *L. plantarum* dan *L. fermentum* dilaporkan merupakan BAL terbanyak pada produk pangan fermentasi yang dilakukan secara spontan. Sedangkan Soomro *et al.*, (2002) melaporkan bahwa BAL menghasilkan substansi anti-mikrobia yang sangat menguntungkan dalam kompetisi dengan bakteri patogen dan bakteri pembusuk.

BAL yang bersifat probiotik dan banyak atau lazim dipakai sebagai kultur inokulum diantaranya *Lac lactis* (Bolotin *et al.*, 2010), *L.sakei* (Chaillou *et al.*, 2005), *L. plantarum* (Kleerebezem *et al.*, 2003), *L. acidophilus* (Altermann *et al.*, 2005) dan *L. johnsonii* (Prindmore *et al.*, 2004).



BAL sebagai bakteri probiotik banyak digunakan pada produk susu fermentasi, dan karakteristik bakteri probiotik selain memberikan manfaat pada kesehatan juga memberi nilai tambah pada produk seperti umur simpan produk. Selain itu bakteri probiotik juga mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk dan bakteri patogen pada bahan makanan (Holzapfel *et al.*, 2001; Boonme *et al.*, 2003; Rustall *et al.*, 2005; Ahmed *et al.*, 2010; Khalid, 2011 dan Francois *et al.*, 2013).

Beberapa keuntungan dari penggunaan mikrobia probiotik terhadap kesehatan dan telah terbukti diantaranya penurunan kolesterol darah, meningkatkan imunitas, memperbaiki gejala intoleransi laktosa, pencegahan penyakit diare, anti-karsinogenik, anti-hipertensi serta meningkatkan keseimbangan hormonal pada perempuan yang memasuki masa *menopause* (Fuller, 1992; Hattingh dan Viljoen, 2001). Hasil penelitian lain juga menunjukkan bahwa makanan probiotik telah terbukti efektif dalam mengendalikan berbagai penyimpangan kesehatan seperti tukak lambung, intoleransi laktosa, alergi makanan hingga kanker saluran pencernaan (Shah, 2000).

Lee (2009) menyatakan bahwa bakteri probiotik mempunyai kemampuan dalam mengurangi terjadinya diare akut pada anak-anak yang disebabkan oleh bakteri dan virus rota. Pemberian inokulum probiotik dari *L.acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *S. thermophilus* dan *Bifidobacterium* dengan populasi $4,0 \times 10^7$ sampai $6,0 \times 10^{10}$ cfu/g dapat menurunkan frekwensi diare yang disebabkan oleh bakteri dan virus rota sampai 30%.

Dosis efektif yang memberikan manfaat positif bagi tubuh konsumen per hari sebaiknya populasinya lebih dari 10^{8-10} (cfu/ml), dan pada populasi tersebut dapat menurunkan frekwensi diare (Salminen, 1996).



Rojo *et al.* (2006), Olanrewaju (2007) dan Thamurat dan Shah (2009) menyatakan bahwa bakteri asam laktat probiotik mempunyai kemampuan mengkolonisasi dan berkembang dalam kolon dan saluran pencernaan. Jenis-jenis bakteri yang sering digunakan dalam produk pangan probiotik dapat dilihat pada Table 2.1

Tabel 2.1. Mikrobia yang lazim digunakan untuk produk pangan probiotik

Spesies <i>Lactobacillus</i> (L)	Spesies <i>Bifidobacterium</i> (B)	Spesies Lain
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. breve</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Lactococcus lactis sub spesies....?</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>B. Logum</i>	<i>Lactococcus lactis sub spesies</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. salivarius</i>	<i>B. adolascensis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. jhonsonii</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. gallinarum</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. fermentum</i>		
<i>L. helveticus</i>		

Sumber.Yavazdurmaz, (2007).

2.1.3. Senyawa anti-mikrobia yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat.

BAL diketahui memiliki aktivitas anti-mikrobia, sehingga dapat menghambat dan membunuh bakteri patogen maupun bakteri pembusuk, dan juga dapat berperan sebagai anti-biotik alami terutama sumber bakteri yang dapat menyebabkan kematian pada bakteri lain (Holzapfel *et al.*, 2001).



Bakteriosin adalah senyawa protein yang mempunyai sifat antimikrobia dengan spektrum sempit, yang dapat membunuh bakteri sejenis dan bakteri Gram positif lainnya termasuk bakteri patogen. Bakteriosin merupakan "inhibitor" yang hanya dihasilkan oleh BAL (Navaro *et al.*, 2000). Bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL dilaporkan mempunyai kemampuan sisi aktif pada membran luar sel untuk dapat menembus membran sel bakteri Gram negatif dan bakteri lainnya sehingga menyebabkan sel bakteri menjadi tertanggu, dan dilaporkan juga bahwa kerja dari bakteriosin dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan seperti suhu rendah, asam organik dan deterjen (Alokomi *et al.*, 2000). Selanjutnya Ray (1996) juga mengungkapkan bahwa bakteriosin menghambat pertumbuhan bakteri lainnya melalui destabilisasi membran sitoplasma sehingga mempengaruhi sintesis energi dan permeabilitas dinding sel yang mengakibatkan lisisnya sel.

Lactococci, *Lactobacilli*, *Pediococci*, *Leuconostoc*, *Streptococci* dan *Enterococci* diketahui menghasilkan bakteriosin dan bakteriosin yang paling dikenal adalah nisin yaitu suatu peptida yang dihasilkan oleh beberapa *Lac. lactis sub-sp. lactis*. Nisin dapat berinteraksi dengan fosfolipid dalam membran sitoplasma bakteri kontaminan seperti *C. botulinum* dan *L. monocytogenes*, serta bakteri pembusuk makanan lainnya (Surono, 2004; Wiedeman *et al.*, 2004; Zendo *et al.*, 2003).

Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat mendapat banyak perhatian karena senyawa tersebut dapat sebagai bahan tambahan makanan (*food additive*), potensial sebagai penghambat bakteri patogen yang pengontaminasi makanan. Bakteri *Lactobacillus plantarum* juga menghasilkan beberapa jenis bakteriosin diantaranya *plantarisin* SIK-83, *plantarisin* A, *laktolin* dan *plantarisin* B (Klaenhammer, 1992)

Prachyakij *et al.*, (2007); Rouse *et al.*, (2007); Sim *et al.*, (2012) dan Francois *et al.*, (2013) menyatakan bahwa BAL mempunyai kemampuan



menghasilkan senyawa anti-mikrobia selain bakteriosin antara lain asam organik seperti asam asetat, propionat, butirat, dan benzoat. Selain asam organik juga dihasilkan hidrogen peroxida (H_2O_2). Semua senyawa yang dihasilkan tersebut mempunyai kemampuan menghambat dan membunuh bakteri patogen dan bakteri pembusuk.

Chuayana *et al.*, (2003) menyatakan bahwa beberapa produk fermentasi susu yang potensial sebagai probiotik mempunyai kemampuan anti-mikrobia dengan menghambat pertumbuhan bakteri indikator seperti *Salmonella thypimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* dan *Candida albicans*. Hasil penelitian tentang yoghurt probiotik oleh Nestle menunjukkan kemampuan membunuh bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*, tetapi hanya bersifat menghambat *Salmonella thypimurium*. Selanjutnya bakteri probiotik susu dengan merek dagang Neslac dapat membunuh *Escherichia coli* dan *Salmonella thypimurium* tetapi hanya dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans*. Pengaruh kultur *Lactobacillus* terhadap viabilitas strain *Salmonella typhimurium* SL 1344 dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel. 2.2. Pengaruh kultur *Lactobacillus* terhadap pertumbuhan strain *Salmonella typhimurium* SL 1344.

Media dan spesies <i>Lactobacillus</i> (10^8 cfu/ml)	Penghambatan terhadap <i>S. typhimurium</i> (mm)
Kontrol	$8,77 \pm 0,02$
Non asan MRS	$8,52 \pm 0,10$
MRS-HCL (pH 4,5)	$8,65 \pm 0,08$
MRS-LA (60 mmol/l pH 4,5)	$4,23 \pm 0,84$
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	$2,00 \pm 0,05$



Lactobacillus casei shirota YIT 9092

2,11 ± 0,14

Lactobacillus Johnsonii La1

2,18 ± 0,21

Lactobacillus plantarum CAA-DC-287

2,13 ± 0,16

Sumber : Messaoudi *et al.*, 2007

Davidson *et al.*, (2005) menyatakan bahwa BAL adalah penghasil asam organik dan dapat menghambat bakteri lain dengan cara berdifusi kedalam sel dalam bentuk molekul yang tidak terdisosiasi. Setelah berada dalam sel maka asam tersebut mengalami disosiasi yang mengakibatkan terjadinya perbedaan gradien proton di dalam dan luar sel. Akibatnya proton dalam sel mengalami desakan dan keluar dari dalam sel dan menyebabkan kematian sel.

Asam asetat dan propionat yang dihasilkan oleh strain tertentu bakteri asam laktat melalui fermentasi hetero-fermentatif, akan berinteraksi dengan membran sel dan terjadi asidifikasi intraseluler dan denaturasi protein. Asam asetat dan propionat lebih kuat daya anti-mikrobiana dibandingkan dengan asam laktat, karena tingginya nilai pKa (asam laktat 3,08, asetat 4,75 dan propionat 4,87) (Surono, 2004).

2.2. Bakteri Probiotik Sebagai Inokulum Yoghurt.

Bakteri asam laktat sebagai inokulum merupakan bakteri Gram positif, tidak mempunyai sitokrom, lebih menyukai kondisi anaerobik, *fastidious*, tahan asam, dan bersifat fermentatif. Bakteri asam laktat menghasilkan asam laktat sebagai produk utamanya selama fermentasi berlangsung dengan memfermentasi karbohidrat (Axelsson, 1998).

Kultur inokulum merupakan bagian terpenting dalam fermentasi susu untuk menghasilkan yoghurt bermutu tinggi, seragam dan stabil. Kultur inokulum harus merupakan mikrobia yang aman dan memang digunakan untuk produksi makanan, baik kultur tunggal maupun kultur campuran (Surono dan Hosono, 2002).



Selanjutnya Surono (2004) mengatakan bahwa secara umum mikrobia yang tumbuh optimum pada suhu 25° - 30° C, dikenal dengan inokulum termofil.

Yoghurt dan susu asidofilus melibatkan inokulum termofil, dan yang lazim digunakan untuk pembuatan yoghurt adalah spesies *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus*, yang secara bersama-sama meningkatkan produksi asam laktat selama berlangsungnya fermentasi yoghurt.

Penggunaan bakteri probiotik memberikan pengaruh nyata pada kesehatan, dan inokulum probiotik tahan terhadap cairan lambung dan asam empedu, serta memiliki aktivitas β -galaktosidase dan hidrofobisitas (Vinderola dan heimer 2005).

Minuman fermentasi seperti yoghurt agar supaya lebih bermanfaat maka inokulum yang lazim digunakan adalah bakteri probiotik. Ketahanan bakteri probiotik terhadap asam dan garam empedu dalam saluran pencernaan merupakan kunci utama dalam mengatasi permasalahan umum pada bakteri yoghurt dimana bakteri yang bukan probiotik tidak akan mampu bertahan dan tidak sampai dalam saluran pencernaan. Beberapa penyakit yang tidak banyak diketahui dapat dicegah dengan mengonsumsi yoghurt yang mengandung bakteri probiotik dan salah satu contoh adalah penurunan kadar kolesterol darah serta sebagai anti-karsinogenik (Hattingh dan Viljoen, 2001).

2.3. Pangan Fungsional.

Makanan fungsional adalah makanan yang mampu memberikan manfaat dalam mencegah ataupun lebih utama adalah untuk memelihara kesehatan. Pada saat ini di Jepang lebih spesifik lagi menjabarkan makanan fungsional sebagai Food For Specified Health Uses (FOSHU), yaitu makanan yang digunakan untuk tujuan memelihara kesehatan dan makanan atau minuman probiotik merupakan salah satu makanan fungsional yang berkembang pada saat ini (Surono, 2004)



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

2.4. **Yoghurt probiotik sebagai pangan fungsional.**

Yoghurt adalah salah satu pangan fungsional, yang memberikan efek kesehatan (memelihara kesehatan) pada saat dikonsumsi. Makanan probiotik, prebiotik dan sinbiotik, termasuk kelompok makanan fungsional. Probiotik dapat dinyatakan sebagai makanan “suplemen” dari mikrobia hidup yang memberikan pengaruh baik bagi kesehatan hewan maupun manusia, serta dapat meningkatkan keseimbangan mikrobia dalam saluran pencernaan (Champagne *et al.*, 2005). Yoghurt adalah produk fermentasi menggunakan *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus delbrueckii sub-sp. bulgaricus*. Metabolik yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yang digunakan sebagai inokulum pada pembuatan yoghurt adalah asam laktat, senyawa pembentuk aroma, dan juga *eksopolisakarida*. Hubungan sinbiotik antara kedua mikrobia yang digunakan untuk menghasilkan senyawa asam, pengembangan aroma dan peningkatan tekstur akan lebih baik dengan cara menggunakan kultur campuran dibandingkan dari penggunaan bakteri secara sendiri-sendiri (Beal *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 2001). Selanjutnya Reid *et al.*, (2005) menyatakan bahwa yoghurt yang menggunakan bakteri asam laktat probiotik dapat menyehatkan tubuh.

Yoghurt mempunyai cita-rasa asam sedang, dengan konsistensi lembut dan gel kental dengan cita-rasa almon. Bakteri yoghurt seperti *L. delbrueckii sub-sp.*



bulgaricus dan *S. thermophilus*, secara alami terdapat dalam susu atau sengaja ditambahkan sebagai inokulum dengan konsentrasi 2 – 5% dengan perbandingan 1 : 1, suhu fermentasi optimum 42^o – 45^o C selama 3 - 6 jam, sehingga dicapai pH 4,4 dan kadar asam tertitrasi mencapai 0,9 – 1,2%. Cita-rasa enak adalah sebagai hasil kerjasama antara kedua spesies bakteri yoghurt dan keberhasilan pembentukan senyawa cita-rasa sangat dipengaruhi oleh suhu inkubasi dan jumlah asam yang dihasilkan (Surono, 2003).

Untuk memenuhi persyaratan mutu yoghurt di Indonesia maka Badan Standarisasi Nasional Indonesia mengeluarkan syarat mutu untuk yoghurt di Indonesia.

Standar Nasional Indonesia untuk yoghurt dapat di lihat pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3. Standar Nasional Indonesia untuk Yoghurt.

Kriteria Uji	Persyaratan
Keadaan kenampakan	Cairan kental/semi padat
Bau	Normal/khas
Rasa	Khas/asam
Konsistensi	Homogen
Lemak (% b/b)	Maksimum 3,8
Berat kering tanpa lemak (BKTL) (% b/b)	8,2
Protein (% b/b)	Minimal 3,5
Abu (% b/b)	Maksimal 1,0
Jumlah asam (sebagai asam laktat)(% b/b)	0,5 – 2,0
Cemaran logam (mg/kg)	
Timbal (Pb)	Maksimum 0,3



Tembaga (Cu)	Maksimum 20
Timah (Zn)	Maksimum 40
Raksa (Hg)	Maksimum 0,03
Arsen (As)	Maksimum 0,1
Cemaran mikrobial	
Bakteri coliform (angka yang paling mungkin)	Maksimum 10
<i>Escherichia coli</i>	< 3
Salmonella	Negatif

Sumber: Dewan Standardisasi Nasional No 2981 (Anonim, 2009).

Selama fermentasi, maka asam laktat yang dihasilkan merupakan hasil metabolisme laktosa oleh bakteri yoghurt dan populasi bakteri asam laktat naik dari 100 - 10.000 cfu/ml pada awal fermentasi dan pada akhir fermentasi mencapai jumlah 10^9 cfu/ml. Penurunan pH yoghurt disebabkan oleh asam laktat, dan asam laktat tersebut menyebabkan destabilisasi kasein misel pada pH 5,1 dan 5,2 dan koagulasi kasein terjadi pada pH 4,6 (Surono, 2003).

Aktivitas bakteri asam laktat untuk pembuatan yoghurt harus memiliki viabilitas dan derajat fisiologis tinggi dan erat kaitannya dengan keasaman media dan aktivitas enzim yang dihasilkan (Founden *et al.*, 2000). Kultur bakteri probiotik dalam yoghurt sangat besar kemampuannya dalam mengubah lingkungan dalam sistem pencernaan dan juga dapat mengubah komposisi mikrobial dalam saluran pencernaan (Alander *et al.*, 1999; Canzi *et al.*, 2000).

Konsumsi yoghurt probiotik makin meningkat sehubungan dengan berkembangnya penyakit vaskuler, dan salah satu hasil penelitian menunjukkan bahwa yoghurt mempunyai kemampuan dalam menurunkan kadar kolesterol serum (Ganji dan Kafai, 2004) dan juga mempunyai efek besar dalam pencegahan stroke. Konsumsi yoghurt dalam kurun waktu 42 hari dapat menurunkan kadar



kolesterol darah (Canzi *et al.*, 2000). Yoghurt yang mengandung mikrobia hidup atau mikrobia yang mati mempunyai kemampuan dalam menghambat aktivitas α -amilase, α -glukosidase, α -amilase pankreas, dan dihasilkannya “angiotensin-converting-enzyme-1” (ACE-I), adalah cocok untuk di konsumsi oleh penderita diabetes dan orang-orang yang mengidap penyakit jantung (Apostolidis *et al.*, 2006).

Beberapa hasil penelitian memperlihatkan bahwa yoghurt dengan bakteri asam laktat probiotik dapat digunakan sebagai anti-diabetes. Matsuzaki *et al.*, (1997) melaporkan bahwa konsumsi *L. casei* secara oral dapat mencegah tingginya kadar glukosa darah dan mengurangi kenaikan insulin melalui pencegahan kerusakan sel β -pankreas, dan mengonsumsi *L. casei* dalam jumlah cukup dapat menghambat kehilangan sel β dan meningkatkan produksi nitrit oxide pada tikus yang diinduksi dengan “alloxan”.

2.5. Susu Kambing.

Susu kambing merupakan sumber protein terbaik setelah telur dan hampir setara dengan air susu ibu. Pada daerah tandus seperti Afrika dan sebagian India, masyarakatnya mengandalkan konsumsi susu kambing untuk menggantikan cairan tubuh yang hilang. Beberapa manfaat susu kambing antara lain dapat menyembuhkan alergi pada kulit, saluran pernafasan dan pencernaan. Susu kambing dapat mencegah berbagai kelainan ginjal, serta asam urat, mencegah reumatik, pengeroposan tulang, membantu pencernaan melalui netralisasi asam lambung, mencegah penyakit asma, TBC serta infeksi paru-paru (Sodiq, *et al.*, 2002). Susu kambing mengandung nutrisi lengkap dan tidak menimbulkan alergi pada anak-anak terutama anak-anak yang tidak bisa mengonsumsi susu sapi (*lactose intolerance*). Pemanfaatan susu kambing sebagai makanan sangat baik untuk memelihara kesehatan, meningkatkan fungsi *fisiologis*, dan sebagai sumber



nutrisi bagi anak-anak maupun orang dewasa dan tidak menimbulkan efek negatif seperti halnya susu sapi (Albenzio dan Santillo, 2011, Olalla *et al.*, 2009)

Park (1994.) mengatakan bahwa susu kambing berbeda dengan susu sapi maupun air susu ibu dan hal ini disebabkan susu kambing mempunyai daya cerna yang lebih baik, bersifat basa, mempunyai sifat penyangga (buffer) serta mempunyai nilai nilai terapi dalam pengobatan dan pemenuhan nutrisi manusia.

Menurut Moeljanto dan Wiryanto, (2002) kadar flourin susu kambing sebesar 10 - 100 kali lebih besar dibandingkan susu sapi, dan bermanfaat sebagai anti-septik alami serta dapat membantu menekan pertumbuhan bakteri dalam tubuh. Susu kambing bersifat basa sehingga aman dikonsumsi dan bermanfaat bagi tubuh.

Disamping itu protein susu kambing sangat lembut dan efek laksatifnya kecil, sehingga tidak menimbulkan diare.

Tingkat keasaman susu kambing relatif rendah, sehingga cocok untuk mereka yang mengalami gangguan perut dan pencernaan. Lambung dalam kondisi asam maka susu kambing bisa menetralkannya. Globula lemak susu kambing memang lebih kecil dibandingkan susu sapi. Oleh sebab itu susu kambing mudah diserap oleh tubuh manusia dan lebih khusus dapat diminum oleh bayi diatas usia 6 bulan (Moeljanto dan Wiryanto, 2002). Susu kambing baik untuk

dikonsumsi oleh anak-anak dan orang dewasa sebab komposisi susu kambing mendekati air susu ibu (ASI) sehingga di beberapa negara, banyak dipergunakan sebagai pengganti air susu ibu (ASI) terlebih bagi bayi-bayi yang alergi terhadap susu sapi. Komposisi susu kambing susu sapi dan air susu ibu dapat dilihat pada

Tabel 2.4.

Tabel 2.4. Komposisi susu kambing susu sapi dan ASI

Komponen	Kambing	Sapi	ASI
----------	---------	------	-----



Air (%)	83,3 - 87,5	87,2	88,3
Karbohidrat (%)	4,6	4,7	6,9
Energi (kkal)	67	66	69,1
Protein(%)	3,3 - 4,9	3,3	1
Lemak (%)	4,0 - 7,3	3,7	4,4
Ca (mg)	129	117	33
P (mg)	106	151	14
Fe (mg)	0,05	0,05	0,05
Vit A (mg)	185	138	240
Thiamin (mg)	0,04	0,03	0,01
Riboflavin (mg)	0,14	0,17	0,04
Niacin (mg)	0,3	0,08	0,2
Vit B-12 (mg)	0,07	0,36	0,84

Sumber : Moeljanto dan Wiryanto, 2002.

Disisi lain dilaporkan bahwa susu kambing mengandung lemak dan mineral cukup tinggi terutama di daerah yang mempunyai 4 musim dibandingkan dengan susu sapi didaerah dengan 2 musim, meskipun diketahui sapi jenis Holstein kandungan lemak susunya sama dengan kambing Swiss (Park, 1989).

2.6. Identifikasi Bakteri Asam Laktat.

Identifikasi BAL secara konvensional berdasarkan pada sifat morfologi, biokimia dan fisiologi bakteri. Penentuan sifat morfologi didasarkan pada bentuk dan ukuran koloni, bentuk pinggiran koloni serta tekstur koloni bakteri. Seleksi koloni bakteri didasarkan pada pengecatan Gram untuk mengetahui sifat Gram positif maupun Gram negatif, kemudian dilanjutkan dengan melihat bentuk sel dengan mikroskop (Wang *et al.*, 2010; Sneath (dalam Bergey's manual of Systematic Bacteriology Methode, 1987).



Isolasi bakteri yang didasarkan pada sifat proteolitik dapat dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat pada media yang mengandung skim milk 2%.

Pengukuran aktivitas proteolitik didasarkan pada diameter zona jernih yang terbentuk di sekeliling koloni (Walter, 1984).

Uji fisiologi adalah uji berdasarkan kemampuan bakteri tumbuh pada suhu tertentu (15° , 25° , 40° , 45° dan 55° C) dan pada pH tertentu (3,0, 4,0, 6,0 dan 7,0) (Hammes dan Vogel, 1995; Ray, 1996).

Identifikasi bakteri atas dasar sifat biokimia adalah dengan melihat kemampuan bakteri dalam melakukan fermentasi dengan media bermacam-macam sebagai sumber gula, dan kemampuan bakteri dalam memecah dekstrin dan tipe fermentasi yang dilakukan (Maqsood *et al.*, 2013). Kemampuan bakteri untuk memfermentasi berbagai macam sumber gula diidentifikasi dengan kit API 50 CHL (Bukola *et al.*, 2008).

Pengujian sifat biokimia bakteri dengan Kit API (Analytical Profile Index) - 50 atau 38 CHL menggunakan sebuah strip plastik yang terdiri atas 50 tabung mikro yang masing-masing tabung mikro berisi masing-masing jenis gula, dan sebuah couple di atasnya. Pengujian dilakukan dengan inokulasi isolat yang diperoleh pada masing-masing tabung mikro yang sudah disediakan. Inokulasi dilakukan secara hati-hati dan setelah inokulasi tabung ditutup. Inkubasi dilakukan selama 48 jam sampai terlihat perubahan warna yang terjadi pada setiap tabung mikro yang diinokulasi. Setelah inkubasi selesai dilakukan tabulasi data fermentasi dan selanjutnya diidentifikasi menggunakan sistim komputer kit API, yang dinamakan PRS (Profile Recognition System) (Yang *et al.*, 2010).

Identifikasi bakteri asam laktat diperlukan penggunaan ribosom RNA karena beberapa bakteri memiliki kebutuhan nutrisi dan pertumbuhan yang sama, sehingga sangat sulit ditentukan dan diidentifikasi dengan metode tradisional yang



hanya mengandalkan media Rogosa standar atau uji secara konvensional (Yang *et al.*, 2010).

Kajian bakteri asam laktat oleh Balcazar *et al.* (2007) dan diperkuat oleh hasil penelitian Parente *et al.* (2010) menunjukkan bahwa beberapa spesies bakteri asam laktat mampu membentuk katalase dalam media yang mengandung “hematin” atau sejenisnya. Produksi non-heme katalase (*pseudokatalase*) tersebut oleh beberapa bakteri asam laktat dapat membingungkan dalam identifikasi bakteri apabila digunakan metode tradisional (Vasques *et al.*, 2005). Singh dan Ramesh (2009) menjelaskan bahwa dengan perkembangan dan penggunaan metode molekuler, banyak ditemukan spesies *Lactobacillus* yang telah mengalami perubahan untuk dapat dikeluarkan atau dimasukkan dalam golongan bakteri asam laktat.

Penggunaan untaian gen ribosomal RNA untuk klasifikasi mikrobia saat ini merupakan salah satu metode akurat untuk menentukan kekerabatan di antara mikrobia (Suryadi dan Machmud, 2002). Bakteri pada umumnya memiliki tiga jenis RNA ribosomal, yaitu berturut-turut 5S, 16S dan 23-S rRNA, namun demikian 16S yang memiliki 1500-3000 nukleotida adalah paling sering digunakan untuk pengujian. Analisis gen penyandi 16S rRNA telah menjadi prosedur baku untuk menentukan hubungan “filogenetik” dan untuk analisis suatu ekosistem (Pangastuti, 2006).

16S rRNA dapat digunakan sebagai penanda molekuler karena molekul ini bersifat “ubiquitous” dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme. Sekuen pada 16S rRNA juga bersifat “hipervariabel” yang banyak digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan “galur” dalam 1 spesies (Suwanto, 1994).

Bao *et al.* (2011) telah melakukan isolasi dan identifikasi BAL pada dadiah susu yang merupakan makanan tradisional dari susu kambing dengan metode konvensional dan metode molekuler 16S rRNA dan didapatkan BAL yang



mayoritas merupakan spesies *Lac.lactis sub-sp lactis* (72,45%). Selanjutnya Veles et al., (2006) melakukan identifikasi dan karakterisasi BAL pada produk-produk susu fermentasi di beberapa pasar di Colombia dengan metode konvensional dan 16S rRNA, dan didapatkan beberapa BAL adalah spesies *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus*.



III. KERANGKA PIKIR / KONSEPTUAL PENELITIAN

3.1. Kerangka Pikir Penelitian

Perkembangan ilmu pengetahuan pada saat ini berakibat bertambahnya pengetahuan konsumen dalam memilih suatu produk pangan untuk dikonsumsi. Kecenderungan yang berkembang di masyarakat pada saat ini adalah mengonsumsi produk-produk pangan fungsional yang dapat mencegah ataupun membantu penyembuhan suatu penyakit. Tujuan makan tidak hanya untuk sekedar mengenyangkan perut tetapi juga untuk memelihara kesehatan yang diperoleh setelah mengonsumsi makanan. Selama ini yang dipertimbangkan terhadap suatu makanan adalah kandungan gizi yang dimiliki, tetapi saat ini zat atau senyawa non-gizi seperti senyawa bioaktif, sangat penting dalam menjaga dan mempertahankan kesehatan konsumen.

Pangan fungsional sudah menjadi pertimbangan yang utama bagi konsumen untuk meningkatkan kesehatan yang diinginkan, disamping nilai gizi yang terkandung didalamnya. Salah satu pangan fungsional yang diminati masyarakat pada saat ini adalah produk pangan hasil fermentasi. Banyak karya ilmiah yang memberikan penjelasan bahwa produk pangan hasil fermentasi terutama yang menggunakan BAL probiotik merupakan produk kaya manfaat. Hal ini disebabkan karena BAL probiotik mempunyai berbagai sifat yang menguntungkan bagi kesehatan dan juga menghasilkan berbagai macam metabolit yang bermanfaat bagi tubuh.

Sifat metabolit yang dihasilkan, selain memiliki kemampuan membantu peningkatan metabolisme tubuh, juga meningkatkan imunitas serta mampu menghambat ataupun membunuh bakteri patogen penyebab penyakit.

Manfaat yang dapat diperoleh dari produk pangan hasil fermentasi oleh bakteri asam laktat probiotik dapat memperbaiki fungsi produk yang dimulai dari



perbaikan sifat bahan dasar, juga peningkatan kemampuan menghasilkan “flavor” (senyawa pembentuk cita-rasa) yang lebih baik bila dibandingkan dengan produk yang tidak difermentasi. Sifat produk yang dihasilkan tidak terlepas dari kemampuan bakteri asam laktat dalam memfermentasi karena BAL memiliki aktivitas “proteolitik” yang menjadikan bahan yang difermentasi berubah bentuk dan sifatnya yang berbeda dari tampilan fisik awalnya.

Salah satu produk pangan fungsional yang sedang populer di masyarakat adalah susu fermentasi terutama yoghurt. Hal ini telah dibuktikan oleh berbagai kajian ilmiah bahwa yoghurt memiliki khasiat terhadap kesehatan manusia. Yoghurt hasil fermentasi dengan bakteri asam laktat (BAL) probiotik memberikan manfaat yang besar untuk peningkatan kesehatan tubuh terutama pada saluran pencernaan. Hasil beberapa penelitian menunjukkan bahwa susu fermentasi dapat menurunkan bakteri patogen dalam saluran pencernaan, serta dapat menurunkan kadar kolesterol darah.

Bakteri asam laktat probiotik sangat potensial digunakan untuk produksi minuman fermentasi probiotik, dan digunakan sebagai inokulum pada pembuatan pangan fungsional. Isolasi BAL dimaksudkan untuk mendapatkan BAL probiotik, yang dapat berasal dari suatu produk atau sumber tertentu, baik dari produk yang sudah jadi ataupun dari bahan mentah seperti daging, susu tumbuh-tumbuhan atau dari produk hasil fermentasi secara alami. Isolat hasil isolasi BAL perlu diidentifikasi agar dapat diketahui jenis bakteri pada isolat yang diperoleh. Identifikasi menggunakan 16S rRNA untuk mutu DNA dengan cara ekstraksi dan pemurnian DNA agar DNA lepas dari sel bakteri, baik secara kimia ataupun secara fisik. DNA murni di *amplifikasi* menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR) dan hasilnya di “sequensing” untuk mendapatkan ragam nukleotida yang dimiliki oleh bakteri yang bersangkutan. Metode molekuler yang sering digunakan untuk identifikasi spesis tersebut digunakan untaian gen ribosomal RNA untuk klasifikasi



mikrobia dan merupakan salah satu metode analisis yang akurat untuk menentukan klasifikasi mikroorganisme. Metode 16S rRNA merupakan salah satu cara analisis yang tepat untuk menentukan kekerabatan diantara mikroorganisme. Bakteri memiliki tiga jenis RNA ribosomal, yaitu berturut-turut 5S, 16S serta 23 rRNA, namun 16S yang memiliki 1500-3000 nukleotida adalah paling sering digunakan. Penelitian ini difokuskan untuk meneliti BAL proteolitik yang mempunyai kemampuan probiotik yang dapat digunakan untuk fermentasi susu kambing dan dimanfaatkan bagi peningkatan mutu dan aseptabilitas produk fermentasi khususnya yoghurt susu kambing.

Manfaat yoghurt telah banyak diteliti, mengonsumsi yoghurt secara rutin dapat menurunkan kadar kolesterol darah dan juga dapat mencegah terjadinya stroke. Yoghurt yang mengandung mikrobia hidup atau yang telah mati mempunyai kemampuan menghambat aktivitas α -amilase, α -glukosidase, α -amilase pankreas dan angiotensin-converting-enzyme-I (ACE-I) sehingga cocok untuk dikonsumsi bagi penderita diabetes dan orang yang memiliki resiko sakit jantung (Apostodilitis *et al.*, 2006).

Di Indonesia minuman susu sapi fermentasi telah umum dikonsumsi, sedangkan minuman susu kambing fermentasi belum begitu berkembang. Hal ini mungkin disebabkan karena susu kambing memiliki bau khas dan kuat yang tidak begitu disukai oleh masyarakat. Penggunaan susu kambing sebagai minuman seperti halnya susu sapi masih belum memasyarakat. Pemanfaatan susu kambing masih terbatas pada kalangan tertentu dan umumnya baru dalam batas untuk dikonsumsi bagi masyarakat yang menderita sakit tertentu yang di yakini bisa disembuhkan dengan mengonsumsi susu kambing.

Demikian juga halnya dengan pemanfaatan isolat bakteri *indigenus* susu kambing sebagai bakteri probiotik pada pangan fungsional, dan minuman fermentasi probiotik susu kambing secara khusus belum banyak dipublikasikan dan diteliti.



Pustaka mengenai penggunaan isolat BAL dari susu kambing dan potensi isolat hasil isolasi dari susu kambing masih sangat terbatas, baik di Indonesia maupun di negara lain. Penelitian mengenai isolasi bakteri probiotik dari susu kambing dan potensi isolat yang dimiliki untuk pengolahan susu kambing sebagai minuman fungsional perlu dilakukan.

Berdasarkan hal tersebut diatas maka perlu dilakukan penelitian tentang "Potensi bakteri asam laktat hasil isolasi dari fermentasi spontan susu kambing lokal sebagai bakteri probiotik untuk produksi minuman fungsional yoghurt susu kambing". Hal ini digunakan sebagai titik awal pengembangan pangan fungsional susu kambing menggunakan isolat BAL probiotik.

3.2. Hipotesis

1. Isolasi dan identifikasi BAL susu kambing lokal hasil fermentasi spontan dapat diperoleh BAL proteolitik.
2. Identifikasi BAL dari isolat proteolitik digunakan 16S rRNA, agar dapat diketahui spesies BAL proteolitik.
3. Kemampuan anti-bakteri isolat BAL proteolitik diuji dengan bakteri indikator dan kemampuan tumbuh isolat pada pH tertentu dan media garam empedu akan didapat bakteri probiotik yang bersifat proteolitik.
4. Isolat yang ditumbuhkan menggunakan media skim milk 8%, akan diperoleh bakteri proteolitik yang mempunyai kemampuan sebagai starter.
5. Fermentasi susu kambing dengan isolat proteolitik akan dihasilkan minuman fungsional susu kambing dengan berbagai sifat menguntungkan termasuk kemampuan isolat membentuk koloni dalam saluran pencernaan.



3.3. Alur cakupan penelitian tentang yoghurt susu kambing lokal dalam rangka penyusunan disertasi disajikan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Alur cakupan penelitian untuk penyusunan disertasi



IV. MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1. Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilaksanakan dalam lima tahap sebagai berikut:

Tahap I. Isolasi bakteri asam laktat probiolitik yang dilanjutkan dengan karakteristik biokimia dan pengujian dengan metode konvensional.

Tahap II. Identifikasi isolat proteolitik menggunakan metode 16S rRNA.

Tahap III. Kualitas probiotik dari isolat BAL proteolitik.

Tahap VI. Kemampuan isolat sebagai starter dalam fermentasi susu kambing lokal.

Tahap V. Karakteristik yoghurt susu kambing sebagai minuman fungsional.

Penelitian dilaksanakan dari September 2011 sampai Oktober 2013 di 5 laboratorium yang berbeda. Laboratorium Mikrobiologi, Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta tempat isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat serta pembuatan dan analisis yoghurt susu kambing. Pengujian DNA dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, PSPG Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pengujian organoleptik di Laboratorium Gizi PSPG UGM. Analisis secara kimiawi dilakukan di Laboratorium Kimia PSPG UGM dan Laboratorium Lembaga Pengembangan Perguruan Tinggi (LPPT), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

4.2. Penelitian Tahap I

Judul : Isolasi, dan identifikasi isolat BAL proteolitik susu kambing.

4.2.1. Cakupan percobaan penelitian

Secara keseluruhan percobaan penelitian terdiri atas beberapa percobaan.

Percobaan 1, dilakukan isolasi bakteri asam laktat dari susu kambing yang difermentasi secara spontan, kemudian sifat-sifat isolat yang diperoleh dilakukan pengujian yang meliputi uji aktivitas katalase, cat gram, bentuk sel dan sifat



motilitas dengan metode konvensional untuk penentuan sifat bakteri asam laktat (Sneath, 1994 dalam *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology methods*).

Percobaan 2, guna melihat kemampuan isolat yang diperoleh sebagai bakteri yang bersifat proteolitik digunakan metode menurut Walter (1984). Pada penelitian ini bakteri yang bersifat proteolitik dibutuhkan sebagai inokulum, untuk pembuatan yoghurt susu kambing. Bakteri proteolitik dapat mendegradasi casein susu kambing sehingga terbentuk dadih. Asam amino hasil pemecahan protein dibutuhkan oleh BAL untuk pertumbuhannya. Peningkatan total BAL juga akan mempengaruhi penurunan pH, dan sebaliknya meningkatkan keasam produk fermentasi. Berdasarkan hal di atas, maka isolat BAL untuk pembuatan yoghurt probiotik perlu diketahui sifat proteolitik isolat.

Percobaan 3, Uji sifat-sifat fisiologis isolat antara lain, kemampuan tumbuh pada berbagai pH (3,5; 4,5; 6,5; 7,5; dan 9), dan kemampuan isolat untuk dapat hidup pada berbagai suhu (15°, 20°, 40°, 50°, dan 55°C). Percobaan 4, penentuan sifat biokimia isolat dengan melihat kemampuan isolat melakukan fermentasi pada berbagai jenis gula dengan menggunakan Kit API 50 CHL dari *Biomeret*. Untuk mengetahui spesies isolat selain dengan metode konvensional juga digunakan analisis secara komputerisasi menggunakan perangkat lunak API.

4.2.2. Tempat Penelitian.

Penelitian Tahap I dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi PSPG, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

4.2.3. Bahan Penelitian.

Materi penelitian Tahap I adalah susu kambing segar jenis PE (Peranakan Etawa), yang diperoleh dari peternak kambing perah "Bapak Bondan" di Desa Cangkringan, Kabupaten Sleman, Yogyakarta. Susu kambing dari peternak dimasukkan dalam wadah stainless steel steril dan selanjutnya dibawa ke



Laboratorium Mikrobiologi di PSPG UGM. Susu kambing kemudian difermentasi secara spontan selama 4 hari (sampai susu kambing mencapai pH 4,7). Bakteri asam laktat yang tumbuh dalam susu kambing hasil fermentasi selanjutnya diisolasi. Bahan penelitian lain adalah bahan kimia diantaranya, Media MRS (de Man Rogosa and Sharpe) broth, untuk media isolasi dan identifikasi, yang tersusun atas glukosa 1%, yeast ekstrak 1%, pepton 0,5%, larutan "tween" 80 %, larutan mineral 0,5%, Na asetat trihidrat 0,2%, dan CaCO₃. Media SYP (sukrosa-yeast ekstrak- pepton) untuk uji pembentukan dekstran yang terdiri atas sukrosa 1%, yeast ekstrak 1%, peptone 0,5%, Na asetat "anhidrat" 0,12%, larutan mineral 0,5% dan larutan tween 1%. Bahan kimia pendukung terdiri atas sikloheksamid (Wako), natrium azida (Wako), cat Gram, H₂O₂, gliserol (Merck) skim milk, NaOH, HCl, indikator BTB dan MR, dan untuk uji kemampuan fermentasi pada media karbohidrat secara biokimia dengan Kit komersial API 50 CHL dari Sigma (Analytical Profile Index Bio Merieux). Media untuk peremajaan maupun persiapan sediaan kultur bakteri adalah media nutrein agar. Cadangan isolat disimpan pada suhu - 40° C dalam media campuran gliserol 20% dan susu skim 10%.

4.2.4. Alat penelitian

Alat penelitian Tahap I untuk isolasi dan identifikasi isolat yang diperoleh terdiri atas cawan petri, tabung reaksi, ose, mikro pipet (Gilson), lampu bunsen, "evendorf" dan laminar air flow, mikroskop fase kontras (Zhimazu, Jepang), inkubator (Fisher Scientific), autoclave (Express, Hirayama dan Eastern), sentrifuge (Heraeus), pH meter, timbangan analitik, vortex (Genie), Freez dryer (Modulyo Edwards), water bath (Haake SWB & GFC), Sonikator (Soniprep 150 MSE), oven pengering (Hareaus), almari pendingin dan alat-alat lainnya buatan lokal.



4.2.5. Metode penelitian

Penelitian ini digunakan metode percobaan dan diikuti pengumpulan data

Tahap I dengan ragam variabel penelitian:

4.2.5.1. Isolasi bakteri asam laktat

Untuk mendapatkan isolat yang dapat digunakan sebagai agensia probiotik, dan mempunyai kemampuan proteolitik, maka dilakukan isolasi bakteri asam laktat dari susu kambing yang baru diperah dan difermentasi secara spontan.

Fermentasi spontan dilakukan selama 4 hari atau sampai susu kambing memiliki pH 4. Susu kambing hasil fermentasi spontan kemudian digunakan sebagai sumber bakteri untuk isolasi.

Isolasi dilakukan dengan metode pengenceran yang dilanjutkan dengan *plating secara pour plate*. Media untuk isolasi adalah MRS broth yang ditambah oxgall 0,2% atau "Bile salt" 0,2%, kalsium karbonat 1%, dan 0,001% sikloheksamid serta natrium azida 0,001%. MRS adalah media umum untuk isolasi bakteri asam laktat, sedang oxgall atau "Bile salt" digunakan untuk seleksi bakteri asam laktat yang dapat bertahan hidup pada jalur intensin (Johnson *et al.*, 1987 dan Gilliland *et al.*, 1987). Kalsium karbonat digunakan sebagai petunjuk adanya pertumbuhan bakteri penghasil asam yaitu dengan munculnya zona jernih disekeliling koloni setelah inkubasi 48 jam. Sikloheksamid digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri yang "eukariotik" seperti jamur dan yeast, dan natrium azida digunakan untuk menghambat pertumbuhan mikrobia aerob. pH media diatur ± 5 dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam (Brashears dan Gilliland, 1995).

Isolasi BAL dilakukan dengan cara, susu kambing yang baru diperah dimasukkan dalam botol kaca steril yang berlabel, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 4 hari (96 jam) hingga susu kambing memiliki pH 4,7. Susu kambing hasil



fermentasi spontan, digunakan sebagai sampel isolasi. Proses yang dilakukan adalah dengan mengambil 1 ml susu kambing yang sudah terfermentasi dimasukkan pada larutan pengencer 9 ml yang berisi pepton water dan dilakukan pengenceran sampai 10^{-9} . Setiap pengenceran diambil 1 ml dan dibiakkan dalam cawan petri steril dan ditumbuhkan dengan penambahan 15 ml media MRS agar yang mengandung 0.2% CaCO_3 . Setelah media mengeras diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 48 jam. Koloni yang tumbuh dan membentuk zone jernih di sekeliling koloni maka masing-masing koloni diambil dan ditumbuhkan kembali pada cawan petri yang berisi MRS agar dan CaCO_3 dengan cara penggoresan agar didapatkan koloni murni. Penggoresan diulang sebanyak 3 kali sampai diyakini bahwa koloni yang tumbuh berasal dari satu sel bakteri.

Koloni yang sudah diyakini murni kemudian ditumbuhkan pada media agar miring yang berisi MRS Agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 Jam. Koloni yang sudah tumbuh disimpan guna pengujian lanjutan.

Uji koloni dilanjutkan dengan melihat bentuk koloni sel dan dilanjutkan dengan uji aktivitas katalase. Bakteri asam laktat mempunyai katalase negatif dan Gram positif. Isolat yang diperoleh dan sesuai dengan kriteria bakteri asam laktat kemudian disimpan dalam media campuran gliserol 20% dan susu skim 10% pada suhu -40°C .

4.2.5.2. Identifikasi bakteri asam laktat.

Identifikasi isolat bakteri asam laktat didasarkan pada morfologi (bentuk sel, batang atau bulat), pengecatan Gram (positif), motilitas (non-motil), katalase (negatif), pembentukan dekstran (tidak membentuk dekstran), pembentukan asam dari beberapa sumber karbon, kemampuan tumbuh pada berbagai pH maupun suhu, model fermentasi glukosa (homo-fermentatif).



Morfologi dan pengecatan Gram.

Isolat hasil pemurnian ditumbuhkan pada media cair MRS "broth" dan diinkubasi 24 jam. Kemudian dilakukan pengecatan Gram sekaligus diamati bentuk/morfologi selnya. Sebagai pembanding digunakan *Bacillus subtilis* (Gram positif) dan *Escherichia coli* (Gram negatif) (Wang *et al.*, (2010).

Uji aktivitas katalase.

Uji aktivitas katalase dengan cara meneteskan larutan H₂O₂ pada kultur sel bakteri dan reaksi negatif terhadap uji aktivitas katalase ditunjukkan oleh tidak munculnya gelembung gas sebagai indikasi bahwa tidak terbentuk gas CO₂.

Sebagai kultur pembanding digunakan *Sacharomyces cerevisiae* (katalase positif).

Uji motilitas.

Uji motilitas dengan menumbuhkan kultur pada media "GYP soft", dan setelah inkubasi 48 jam bakteri asam laktat yang hidup, (motil) akan tumbuh merata pada media dalam tabung reaksi. Bakteri yang tidak motil hanya tumbuh terbatas pada bekas goresan ose saat inokulasi dilakukan.

Uji tipe fermentasi (model fermentasi glukosa).

Uji tipe fermentasi dengan menumbuhkan kultur (biakan isolate) pada 5 ml media GYP cair selama 2-3 hari dalam tabung Durham yang diletakkan secara terbalik untuk menangkap gas yang dihasilkan. Bakteri asam laktat homo-fermentatif tidak menghasilkan gas, sedang yang hetero-fermentatif menghasilkan gas.

Uji sifat proteolitik.

Uji sifat proteolitik isolat dengan menumbuhkan kultur isolat yang mempunyai sifat bakteri asam laktat pada media skim milk 2%. Isolat bakteri yang tumbuh dan menghasilkan zona jernih disekeliling isolat menandakan kemampuan proteolitik (Walter, 1984).



Uji fisiologis

Uji fisiologis dengan melihat kemampuan tumbuh isolat pada media MRS yang diinkubasikan pada berbagai aras suhu berturut-turut 10°, 15°, 30°, 40°, 45°, dan 50°C selama berturut-turut 1, 3 dan 5 hari, tergantung pada kecepatan tumbuhnya. Sedang untuk mengetahui pengaruh pH terhadap pertumbuhan isolat dengan menumbuhkan isolat pada media MRS pada berbagai aras pH berturut-turut 3,5; 4,5; 7,5 dan 9,5 selama berturut-turut 1, 3, dan 5 hari, tergantung pada jenis kulturnya. Bakteri yang positif tumbuh dapat dilihat dari perubahan kondisi media dari bening menjadi keruh (Hammes dan Vogel, 1995).

Uji biokimia fermentasi

Uji biokimia fermentasi dengan kit komersial yaitu kit API 50 CHL (Bio-Merieux, Jepang), dengan berbagai sumber karbon yang tersedia. Sumber karbon yang dipakai ada 49 macam yaitu L-arabinosa, D-selebiosa, D-fruktosa, D-galaktosa, glukosa, glokonat, laktosa, D-maltosa, D-manitol, D-manosa, D-melibiosa, D-melezitosa, rafinosa, L-rhamnosa, D-ribosa, salisin, D-sorbitol, pati, sukrosa, D-trihalosa dan D-xilosa, dan jenis karbon lainnya. Dalam 1 paket kit bisa digunakan untuk analisis 10 isolat. Inokulasi pada uji dengan kit, maka kultur diinkubasi selama ± 20 jam. Kultur yang aktif diambil 500µl dimasukan kedalam larutan pengencer yang sudah disediakan, kemudian diinokulasi 100 µl kultur isolat untuk setiap vial yang berisi masing-masing jenis karbon berbeda dan diinkubasi pada suhu 37°C selama berturut-turut 1, 3 dan 5 hari. Kultur yang mengalami perubahan warna yaitu dari warna ungu menjadi warna kuning menandakan kemampuan memfermentasi karbohidrat.

Identifikasi terhadap isolat hasil uji kemampuan fermentasi karbohidrat kemudian dilanjutkan uji *software* dari kit API 50 CHL untuk penentuan identitas spesies dari isolat.



4.3. Penelitian Tahap II

Judul: Identifikasi BAL probiotik secara molekuler dengan metode 16 S rRNA.

4.3.1. Cakupan penelitian.

Penelitian Tahap II, adalah uji molekuler untuk penentuan spesies isolat hasil identifikasi menggunakan kit API 50 CHL. Uji dengan 16S rRNA, dimaksudkan untuk meyakinkan bahwa isolat yang dihasilkan secara molekuler masuk spesies bakteri asam laktat. Pelaksanaan percobaan penelitian terdiri atas beberapa percobaan yakni: percobaan isolasi DNA, purifikasi DNA, elektroforesis dan amplifikasi dengan Polymerase Chain Reaction (PCR) dan "sequencing".

4.3.2. Tempat penelitian.

Percobaan penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, Pusat Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada (PSB-UGM), Yogyakarta.

4.3.3. Bahan penelitian

Sampel penelitian Tahap II adalah isolat bakteri asam laktat hasil isolasi dari pelaksanaan percobaan penelitian pada Tahap I. Isolat yang digunakan pada Tahap II merupakan isolat yang mempunyai kemampuan proteolitik terbaik, yang ditandai oleh kemampuan proteolitik yang lebih besar dari pada isolat lainnya.

Isolat yang ditetapkan mempunyai kemampuan proteolitik terbesar digunakan untuk uji molekuler dengan metode sequencing 16S rRNA dan amplifikasi gen 16S rRNA (Sacchi *et al.*, 2002). Bahan kimia yang digunakan antara lain MRS broth (de Man Rogosa and Sharpe) (Merck), kit PCR Megamix blue (Microzone Ltd.), Lisosim (Roche), Proteinase (Roche), Agarose (Roche), marker DNA (1kb DNA Ladder, Promega), Primer 27f dan 1492r (Genetech Co., Ltd), kit purifikasi DNA Microclean (Microzone Ltd).

4.3.4. Alat penelitian



Peralatan percobaan penelitian Tahap II adalah untuk isolasi yang dilanjutkan dengan uji molekuler, terdiri atas cawan petri, tabung reaksi, ose, mikro pipet (Gilson), lampu bunsen, "laminar air flow", mikroskop fase kontras (Zhimadzu, Jepang), inkubator (Fisher Scientific), autoclave (Express, Hirayama dan Eastern), sentrifuge (Heraeus), pH meter (Toa HM 205), timbangan analitik (Heraeus), vortex (Genie), Freeze dryer (Modulyo Edwards), penangas air (Hawke SWB dan GFC), Sonikator (Soniprep 150 MSE), oven (Heraeus), pembentuk sumuran dari stainless steel, almari pendingin (Nasional), alat elektroforesis (Bio-rat mini Sub DNA cell, PCR (Mastercycler personal), evendorf Sequencer ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, spectrofotometer, gas pak, dan lain-lain.

4.3.5. Metode penelitian

Percobaan penelitian meliputi berbagai pengamatan hasil percobaan sebagai berikut :

4.3.5.1. Isolasi DNA bakteri dengan 16S rRNA

Isolasi DNA bakteri dengan metode miniprep (Pospiech dan Newmann, 1995). Sebanyak 5 ml kultur murni bakteri dalam medium MRS broth, dimasukkan dalam evendorf steril 1.5 ml dan disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Endapan yang didapat ditambah 410 µl larutan penyangga TE (10 mM tris HCl:1 mM EDTA, pH 8), selanjutnya endapan dihomogenkan dan ditambah 50 µl lisosim (100 mg/ml) dan disuspensikan kembali, kemudian diinkubasi dalam penangas air pada suhu 37°C, selama 1 jam sambil dilakukan penggojokan setiap 15 menit.

Selesai inkubasi kultur sel ditambah enzim proteinase sebanyak 20 µl selanjutnya diinkubasi dalam penangas air pada suhu 37°C selama 60 menit dan dilakukan penggojokan setiap 15 menit. Selesai inkubasi sel ditambah 50 µl SDS 10% dan kemudian diinkubasi lagi pada suhu 65°C selama 60 menit dan dilakukan



penggojogan setiap 30 menit. Selesai inkubasi kultur sel ditambah 167 ml NaCl 5M dan diinkubasi kembali pada suhu 65°C selama 60 menit dan dilakukan penggojogan selama inkubasi. Kultur sel hasil inkubasi kemudian ditambah ± 400 µl kloroform dingin, dan diinkubasi kembali pada suhu ruang selama 30 menit dan dilakukan penggojogan setiap 10 menit. Selanjutnya kultur sel disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindah pada evendorf baru dan ditambahkan 200 µl kloroform dingin dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke evendorf baru dan ditambah isopropanol (2D-propanol) sebanyak 10 kali volume supernatan dan digojog ± 50 kali, kemudian diinkubasi pada suhu 20°C selama 12 jam, selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang dan endapannya ditambah 100 µl etanol 70% dingin, kemudian disentrifugasi dan etanol dibuang, kemudian endapannya dikering anginkan, setelah kering ditambahkan larutan penyangga TE 20 sebanyak 80 µl.

Purifikasi DNA

Hasil isolasi DNA bakteri dipurifikasi dengan metode fenol kloroform. Sebanyak 100 µl DNA dalam larutan penyangga TE ditambah 100 µl campuran fenol kloroform (1:1), dihomogenkan dan disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Lapisan atas dipindah ke tabung evendorf baru dan ditambah 1x volume Na-asetat 3M dan 2x volume etanol absolut, kemudian diinkubasi pada suhu 20°C selama 5 menit. Endapan yang diperoleh ditambah 100 µl etanol 70% dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 13.00 rpm selama 5 menit. Endapan yang diperoleh dikering anginkan dan kemudian ditambah 20 µl larutan penyangga TE.

Elektroforesis DNA



DNA hasil isolasi diamati dengan elektroforesis menggunakan agarose 0,8% dengan voltase 90V selama 30 menit. Hasil elektroforesis diamati dibawah sinar UV. Jika terdapat DNA maka dilakukan langkah selanjutnya yaitu identifikasi menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR).

PCR (Polymerase chain reaction).

Sebanyak 10 μ l larutan (total 50 μ l pereaksi PCR) yang terdiri atas DNA sebagai template, megamix blue kit untuk amplifikasi dan Primer 27f dan Primer 1492 R. Sampel dimasukkan dalam mesin PCR, suhu PCR diatur yakni: 1. Kondisi denaturasi awal pada suhu 96°C selama 4 menit, 2. Duplikasi DNA menggunakan suhu awal 94°C selama 1 menit, Aneling 51,5°C selama 1,30 detik, dan ekstensi 68°C selama 8 menit, dan Ekstensi akhir pada suhu 68°C selama 10 menit.

Elektroforesis pada gel poliakrilamida 80%.

Elektroforesis hasil PCR menggunakan gel poliakrilamida 80% yang tersusun atas 12,5 ml akuabides, 5,3 ml poliakrilamide 30 %, 2 ml TBE (Tris Borat-EDTA) dan 20 μ l TEMED (Ausubel *et al.*, 1995). Elektroforesis hasil PCR sebanyak 5 μ l dihomogenkan dengan 1 μ l loading dye dan dimasukkan dalam tiap sumuran gel. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 70 volt selama 2,5 jam dengan media larutan penyangga TBE 1 kali.

4.3.5.2. Purifikasi sequencing.

Sebanyak 10 μ l campuran di dalam tabung PCR ditambahkan natrium asetat 3M sebanyak 1 μ l, ditambah etanol absolut dingin (suhu -20°C) sebanyak 25 μ l, selanjutnya divortex selama 10 menit. Selanjutnya sampel didiamkan selama 15 menit pada suhu ruang dan disentrifugasi kecepatan 15.000 rpm selama 20 menit suhu 4°C. Supernatan dibuang, setelah itu ditambah etanol 70% sebanyak 100 μ l dan digojog secara perlahan. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan



15.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C, kemudian supernatan dibuang sampel diuapkan secara vakum selama 10 menit untuk menguapkan etanol yang tersisa dan selanjutnya ditambah 10 µl formamide kemudian divortex selama 10 menit dan di bilas. Sebanyak 10µl hasil purifikasi PCR dimasukkan dalam tabung PCR atau tray dan dimasukkan dalam mesin "Sequenser Genetic Analyzer". Urutan DNA yang terbaca pada mesin "dicopy" ke program Bioedit dan dilakukan "BLASTING" pada DDBJ/NCBI untuk melihat kemiripan urutannya. Berdasarkan hasil tersebut kemudian dibuat silsilah filogenik dengan program Cluster -X dan hasilnya dibaca menggunakan program "Tree View".

4.3.5.3. Re-konstruksi silsilah filogram (Phylogeny Tree).

Pada pembuatan filogeni dibuat rekonstruksi dengan cara membandingkan sequence gen 16S rRNA isolat proteolitik terpilih dengan sequence gen 16S rRNA strain acuan dari database Gen Bank DNA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Guna melakukan alignment sequence 16S rRNA dari isolat digunakan program Clustal-X versi 1.6. (Thompson *et al.*, 1997).

4.4. Penelitian Tahap III.

Judul Penelitian : Kemampuan isolat BAL hasil isolasi dari susu kambing sebagai bakteri probiotik.

4.4.1. Cakupan penelitian.

Tujuan penelitian Tahap III adalah untuk mengetahui kemampuan isolat terpilih sebagai bakteri probiotik. Kemampuan sebagai probiotik dengan cara melihat setiap isolat terpilih apakah dapat tumbuh pada pH rendah dan larutan "Bile salt". Uji sifat anti-mikrobia yang dimiliki oleh setiap isolat terhadap bakteri indikator juga dilakukan, dan bakteri indikator yang digunakan adalah bakteri patogen maupun bakteri pembusuk. Bahan untuk uji dimaksud diatas adalah filtrat atau supernatan netral dan filtrat asam yang tidak dinetralkan dari isolat BAL probiotik.



4.4.2. Tempat penelitian.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, PSPG Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

4.4.3. Bahan penelitian

Materi penelitian Tahap III adalah isolat hasil isolasi dari bakteri asam laktat proteolitik dan probiotik hasil penelitian Tahap II, dan bakteri indikatornya adalah *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, dan *Bacillus cereus*, yang diperoleh dari Food and Nutrition Culture Collection (FNCC). Bahan penelitian lain adalah bahan kimia antara lain media MRS (de-Man Rogosa and Sharpe) (Merck), Nutrien broth (Oxoid), TSA (Trypticase Soy Agar) (Oxoid), "Bile salt" (Sigma), HCl (Sigma) dan Pepton water (Merck).

4.4.4. Alat Penelitian.

Alat penelitian Tahap III terdiri atas cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, vortex, mikro pipet (Gilson), gelas ukur 100 ml, autoclave (Express, Hirayama dan Eastern), timbangan analitik (Satorius), dan inkubator (Fisher Scientific), oven (Heraeus), mikroskop (Shimadzu), Coloni counter (Hirayama).

4.4.5. Metode penelitian.

Penelitian dilaksanakan dengan percobaan dan pengumpulan data melalui pengamatan sebagai berikut:

4.4.5.1. Uji aktivitas antibakteri.

Uji aktivitas anti-bakteri digunakan metode difusi agar untuk identifikasi senyawa penghambat menurut Groff dan Groper (2001). Isolat terpilih dari penelitian Tahap II di uji aktivitas penghambatannya terhadap bakteri patogen dan bakteri pembusuk. Bakteri indikator yang digunakan adalah *E.coli*, *L. monocytogenes* dan *S. typhimurium* yang mewakili bakteri yang bersifat Gram



negatif dan yang mewakili bakteri Gram positif yakni *S. aureus* dan *B. cereus*.

Senyawa anti-mikrobia yang digunakan adalah filtrat kultur inokulum yang bebas sel dan tidak dinetralkan serta filtrat kultur inokulum yang dinetralkan dengan NaOH agar pH mencapai 7.0.

Metode difusi agar dilakukan dengan cara menumbuhkan masing-masing bakteri indikator pada media TCA broth, kemudian koloni bakteri yang tumbuh ditambah sebanyak 50 μ l (10^6 sel bakteri/ml) selanjutnya dituang pada cawan petri yang berisi media TCA agar dan didiamkan sampai mengeras, dan kemudian dibuat sumuran dengan kedalaman sumuran yang dapat menampung 50 μ l kultur isolat bakteri asam laktat yang sudah disiapkan. Setelah didiamkan pada suhu 4°C selama 2 jam kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Penghambatan anti-bakteri diukur setelah terlihat zona jernih disekeliling kultur bakteri asam laktat yang diinokulasikan. Pada tahap percobaan penelitian ini maka pertumbuhan bakteri asam laktat digunakan media de Man Rogosa and Sharpe (MRS) dan untuk pertumbuhan bakteri indikator digunakan media Trypticase Soy Agar (TSA). Uji aktifitas anti-bakteri dilakukan dengan 3 kali ulangan dan setiap ulangan dibuat duplo (2 ulangan).

4.4.5.2. Kemampuan daya tahan isolate bakteri terhadap "Bile" salt

Penentuan kemampuan hidup isolat pada larutan "Bile salt" dilakukan dengan metode Vinderola dan Reinheimer (2003) dengan modifikasi. Sel dengan jumlah $\pm 10^8$ cfu/ml ditumbuhkan pada media MRS broth selama 24 jam. Teknik penentuan kemampuan hidup pada larutan "Bile salt" dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri terpilih pada media MRS broth yang mengandung 0,5% "Bile salt" (Oxoid), dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam.

Total bakteri asam laktat setelah inkubasi dihitung dengan teknik TPC (Total Plate Count) dan sebagai kontrol mikrobia digunakan *L. acidophilus*.



4.4.5.3. Kemampuan hidup pada pH rendah.

Kemampuan isolat bakteri terpilih untuk dapat bertahan hidup pada pH rendah (3,0) dilakukan dengan metode Psomas *et al.* (2001), dengan modifikasi. Kultur bakteri asam laktat yang dapat tumbuh pada media MRS dengan pH rendah, kemudian di inkubasi pada 37°C selama 4 jam. Total bakteri dihitung setelah inkubasi dengan metode "pour plate". Sebagai kontrol digunakan bakteri probiotik *L. acidophilus*. Uji pH rendah pada isolat terpilih dilakukan sebanyak 3 kali ulangan dan setiap ulangan dalam bentuk duplo (2 ulangan).

4.5. Penelitian Tahap IV

Judul Penelitian : Kemampuan isolat BAL hasil isolasi dari susu kambing sebagai inokulum yoghurt.

4.5.1. Cakupan penelitian.

Tujuan penelitian Tahap IV, adalah untuk mengetahui pertumbuhan isolat terpilih pada media MRS dan analisis perubahan pH media tumbuh isolat bakteri selama pertumbuhannya. Selain itu juga untuk melihat kemampuan isolat dalam memfermentasi skim milk, serta mengetahui kemampuan isolat sebagai bakteri proteolitik untuk inokulum pada pembuatan minuman fungsional yoghurt susu kambing. Analisis inokulum dengan melihat viabilitas selama fermentasi skim milk dan perubahan pH media selama fermentasi berlangsung. Asam-asam organik pada akhir fermentasi di analisis untuk mengetahui peran metabolit sekunder yang dihasilkan.

4.5.2. Tempat penelitian.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi PSPG, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

4.5.3. Bahan penelitian



Materi untuk penelitian Tahap IV adalah isolat probiotik dari hasil penelitian Tahap III. Media MRS untuk pertumbuhan, media skim milk 8%, dan bahan kimia untuk analisis asam organik yang dihasilkan oleh isolat selama inkubasi 24 jam.

4.5.4. Alat penelitian.

Alat-alat penelitian antara lain: cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, vortex, mikro pipet (Gilson), gelas ukur 100 ml, autoclave (Express Hirayama dan Eastern), timbangan analitik (Satorius), dan inkubator (Fisher, Scientific), HPLC untuk analisis asam organik (Shimadzu LC 6AD) yang dilengkapi UV-Vis detektor (Shimadzu SPD-10 A. Shimadzu class-VP V6.13 SP2-Jepang), *sentrifuge* (Minifuge T Heraeus), alat gelas, pH meter (Toa HM 205), *magnetic stirrer*, penangas air (Hake SWB dan GFC), refrigerator (Nasional), dan alat-alat gelas lainnya.

4.5.5. Metode penelitian

Percobaan penelitian diikuti dengan pengumpulan data pada penelitian Tahap IV yang meliputi penentuan:

4.5.5.1. Pertumbuhan bakteri pada media MRS broth.

Isolat terpilih hasil penelitian Tahap III ditumbuhkan pada media MRS broth steril dengan inokulasi isolat terpilih sebanyak 1%, dan di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Viabilitas isolat bakteri dihitung selama pertumbuhan 24 jam dan juga dilakukan pengukuran pH. Penghitungan viabilitas isolat bakteri dengan teknik pour plate dan jumlah bakteri dihitung dengan metode TPC (Total Plate Count), dengan beberapa seri pengenceran menggunakan metode Dave dan Shah (1998).

4.5.5.2. Pertumbuhan bakteri pada media skim milk 8%.



Isolat bakteri sebanyak 1% ditumbuhkan pada media skim milk 8% dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam. Selama fermentasi viabilitas mikrobia yang hidup dihitung. Penghitungan viabilitas isolat bakteri dengan teknik pour plate dan dihitung TPCnya (*Total Plate Count*), dengan beberapa seri pengenceran menggunakan metode Dave dan Shah (1998).

4.5.5.3. Perubahan pH selama fermentasi

Perubahan pH selama fermentasi pada media skim milk 8% diukur selama 16 jam inkubasi dan diukur secara periodik setiap 3 jam. Pengukuran pH dengan pH meter digital (Anonymous, 2000).

4.5.5.4. Analisis asam organik

Asam-asam organik yang dianalisis antara lain asam laktat, asetat, butirat dan propionat. Analisis asam organik dengan mengikuti metode Bevilacqua dan Califano (1989) dengan HPLC, menggunakan kolom meta carb H Plus dengan eluen H₂SO₄ 0,005M dengan kecepatan aliran 0,5 ml/min dan menggunakan panjang gelombang 215 nm. Injeksi sampel ke kolom HPLC sebanyak 20 µl.

4.5.5.5. Analisis Statistik

Penelitian dilakukan dengan metode eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap pola Faktorial. Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis variasi (ANAVA) menggunakan SPSS, dan data yang berbeda nyata diuji lanjut menggunakan uji Duncan Multiple Range test (DMRT).



4.6. Penelitian Tahap V.

Judul: Karakteristik yoghurt susu kambing fungsional menggunakan isolat BAL probiotik hasil isolasi dari susu kambing yang difermentasi secara spontan.

4.6.1. Cakupan penelitian.

Tujuan penelitian Tahap V adalah untuk melihat karakteristik dan sifat fungsional yoghurt susu kambing yang dihasilkan. Karakteristik yoghurt susu kambing yang dianalisis antara lain kualitas mikrobiologis, karakteristik kimia, sifat sensoris dan sifat fungsional yoghurt susu kambing yang dihasilkan. Sifat fungsional yoghurt susu kambing yang dianalisis adalah kemampuan hidup bakteri yoghurt pada saluran pencernaan dengan cara melihat kemampuan hidup BAL probiotik yoghurt setelah dipapar dengan pH rendah dan larutan 0,5% "Bile salt"

4.6.2. Tempat penelitian.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi PSPG Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

4.6.3. Bahan penelitian

Bahan penelitian Tahap V terdiri atas susu kambing, skim milk, dan sukrosa, sebagai bahan utama pembuatan yoghurt, serta isolat BAL probiotik terpilih sebagai inokulum. Selain itu juga digunakan *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus* sebagai bakteri umum yang lazim digunakan untuk pembuatan yoghurt, diperoleh dari Food Nutrition Culture Collection (FNCC), PSPG-UGM. Inokulum probiotik untuk pembuatan yoghurt susu kambing adalah 3 jenis isolat bakteri terpilih. Pembuatan inokulum menggunakan skim milk 8%, baik inokulum umum maupun inokulum probiotik hasil isolasi dari susu kambing hasil fermentasi spontan.



Media dan bahan kimia yang digunakan antara lain: MRS agar, MRS broth, pepton water, PDA (Potato Dextrose Agar), buffer pH 4, buffer pH 7, kalsium karbonat (CaCO_3), larutan "Bile salt", HCl, NaOH, phenophtalein (pp), TCA, asam borak, K_2CO_3 , H_2SO_4 , Na_2SO_4 , HgO, $\text{Na}_2\text{S}_3\text{O}_3$, HCL, petroleum ether, kertas Whatmant No. 41, thiobarbituric acid (TBA), Pb-asetat, Na-oksalat, etanol, Heksan, KOH, mentanol, asam heptadekanoat (DPPH) 0,1 mM, reagen Follin-Ciocalteu, metanol 100% dan bahan-bahan kimia lainnya. Bahan-bahan untuk uji sensoris antara lain, kertas, pensil, air putih, tissue, serta bahan-bahan lain untuk keperluan analisis.

4.6.4. Alat penelitian

Alat penelitian antara lain: cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, vortex, mikro pipet (Gilson), gelas ukur 100 ml, autoclave (Express Hirayama dan Eastern), timbangan analitik (Sartorius), dan inkubator (Fisher, Scientific), spektrofotometer UV-Vis (Simadzu), labu Kjeldahl (Buchi Scrubber B- 414), alat destilasi shoklet, botol timbang, kertas saring (Whatman No. 41), *sentrifuge (Minifuge T-Heraeus)*, alat-alat gelas, pH meter digital (Toa HM 205), *magnetic stirrer*, penangas air, *refrigerator* (Nasional), dan alat gelas lainnya.

4.6.5. Metode penelitian

Penelitian Tahap V digunakan metode percobaan dan pengumpulan data hasil pembuatan yoghurt susu kambing menggunakan isolat BAL probiotik terpilih dan dilakukan analisis sesuai dengan variabel yang dirancang.

4.6.5.1. Pembuatan inokulum isolat.

Inokulum disiapkan dari isolat BAL probiotik terpilih dan inokulum kontrol adalah BAL *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus*. Sebagai inokulum probiotik digunakan *L. plantarum* isolat YN 1.1, *L. plantarum* isolat YN 1.3 dan *L. plantarum*



isolat YN 1.6. Pembuatan inokulum mengacu pada metode Nsofos *et al.*, (1992), yakni skim milk 8% ditambah sukrosa 1%, dan selanjutnya disterilkan pada suhu 115°C selama 10 menit, kemudian di dinginkan sampai suhu $\pm 45^{\circ}\text{C}$. Selanjutnya sampel diinokulasi dengan masing masing dengan isolat bakteri asam laktat yang terpilih dan isolat inokulum umum. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 18 jam untuk inokulum *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus* dan 16 jam untuk inokulum *L. plantarum* berturut-turut isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6.

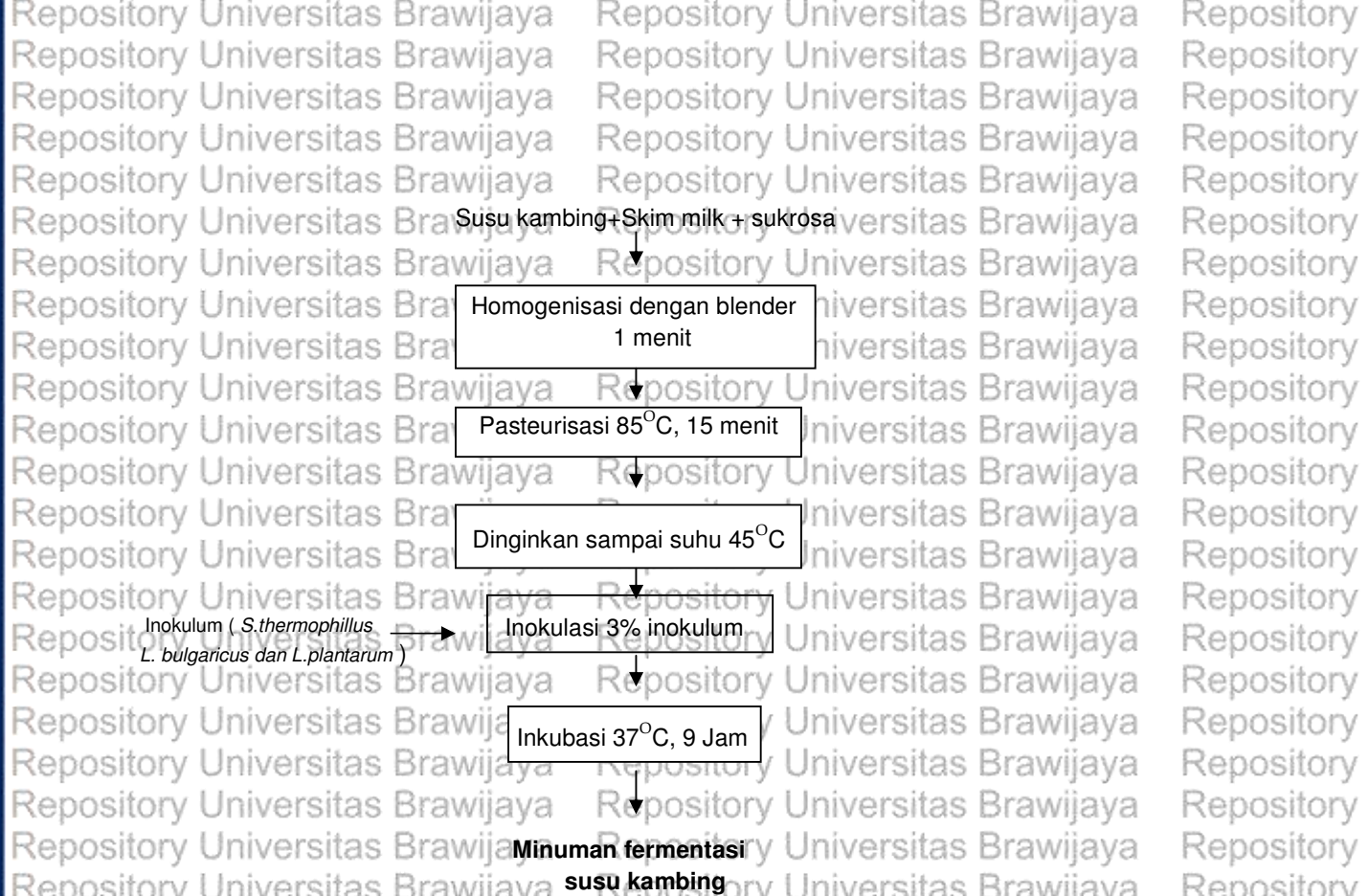
4.6.5.2. Pembuatan yoghurt susu kambing fungsional.

Pembuatan yoghurt susu kambing mengacu pada pembuatan yoghurt yang telah dilakukan sebelumnya (penelitian Tahap II). Susu kambing ditambah skim milk 2% dan sukrosa 1%, kemudian dihomogenisasi selama 1 menit. Susu kambing yang telah homogen kemudian dipasteurisasi pada suhu 80°C selama 15 menit. Sampel didinginkan sampai suhu mencapai 40°C. Selanjutnya diinokulasi dengan inokulum yang telah disiapkan sebanyak 3% dengan perbandingan antara bakteri *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* dan *L. plantarum* sebesar 1:1:1. Sampel diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 9 jam atau sampai terbentuk puding. Setelah fermentasi selesai, yoghurt disimpan dalam lemari pendingin sampai dilakukan analisis. Fermentasi susu kambing secara skematis dapat dilihat pada Gambar 4.1.

4.6.5.3. Analisis yoghurt fungsional

Perubahan pH selama fermentasi.

Perubahan pH yoghurt susu kambing selama fermentasi diukur secara langsung. Pengukuran pH dengan menggunakan pH meter digital, dan pengukuran dilakukan setiap 3 jam inkubasi pada 37°C (metode Anonymous, 2000). Perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali dengan 3 kali ulangan setiap percobaan.



Gambar 4.1. Diagram alir proses pembuatan minuman fungsional susu kambing fermentasi

Kadar asam laktat yoghurt selama fermentasi.

Analisis kadar asam laktat yoghurt dilakukan dengan metode titrasi NaOH 0,1 N dengan indicator pp untuk yoghurt hasil fermentasi. Perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali dengan ulangan sebanyak 3 kali.

Viabilitas BAL.

Penghitungan viabilitas Bakteri asam laktat hidup, dengan teknik "pour plate" dan penghitungannya dengan metode TPC (*Total Plate Count*), yang dilakukan beberapa seri pengenceran dengan Metode Dave dan Shah (1998).

Analisis proksimat dan uji sensoris.

Analisis proksimat meliputi penentuan kadar air, abu, protein total dan kadar lemak yoghurt susu kambing. Metode yang digunakan mengikuti metode yang



dilakukan oleh Anonymous (2000). Sedangkan uji sensoris berdasarkan uji kesukaan oleh panelis mengikuti metode Kartika (1995).

Sifat fungsional yoghurt.

Sifat fungsional yoghurt diuji dengan melihat kemampuan dari isolat yang digunakan sebagai inokulum dalam pembuatan yoghurt, untuk bertahan hidup pada larutan 0,5 % "Bile salt" dan pH rendah (3,0).

4.6.5.4. Analisis Statistik

Penelitian dilakukan dengan metode eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap pola Faktorial. Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis variasi (ANOVA) menggunakan SPSS, dan data yang berbeda nyata diuji lanjut menggunakan uji Duncan Multiple Range test (DMRT).



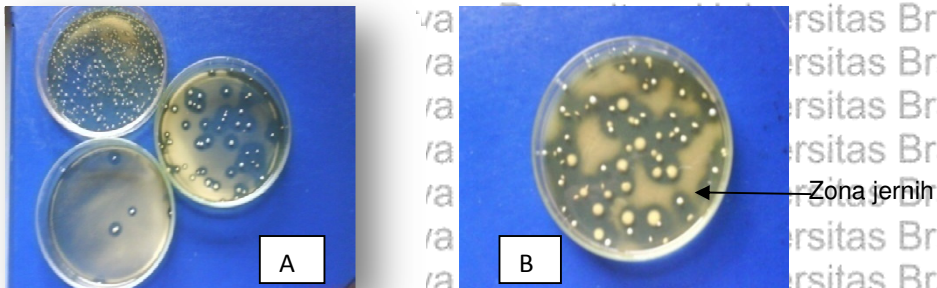
V. HASIL DAN PEMBAHASAN

1.1. Penelitian Tahap I.

Judul : Isolasi dan Identifikasi Isolat BAL probiotik susu kambing.

1.1.1. Isolasi BAL (Bakteri Asam Laktat)

Koloni yang menghasilkan zona jernih pada media agar menunjukkan bahwa isolat bakteri yang diperoleh menghasilkan asam yang merupakan hasil metabolisme dari BAL dari hasil pemecahan gula yang ada dalam media yang digunakan untuk fermentasi. Penggunaan dari CaCO_3 , telah menjadikan zona jernih pada permukaan koloni setelah pemanfaatan karbohidrat dalam media. Pembentukan zona jernih oleh koloni bakteri asam laktat pada media MRS yang ditambahkan CaCO_3 dapat dilihat pada Gambar 5.1.



Gambar 5. 1. Pembentukan koloni bakteri hasil isolasi susu kambing fermentasi pada media MRS, yang ditambah CaCO_3 1 %. A: Koloni dengan pengenceran 10^6 , 10^4 dan 10^3 , B: Koloni dengan pengenceran 10^5

Senyawa CaCO_3 merupakan indikator adanya koloni bakteri yang bersifat asam yang memicu pembentukan zona jernih pada media yang sebelumnya dalam kondisi keruh. Bakteri asam laktat tumbuh pada media MRS yang ditambah CaCO_3 dengan membentuk zona jernih di sekeliling koloni sebagaimana diamati oleh Hwanhlem *et al.* (2011).



Hasil isolasi awal bakteri asam laktat pada susu kambing yang difermentasi secara spontan sebanyak 60 koloni dengan ditandai terbentuknya zona jernih pada media di sekeliling koloni. Sebanyak 60 koloni hasil isolasi selanjutnya diseleksi berdasarkan warna, bentuk koloni dan ukuran koloni, maka didapat 26 koloni dengan bentuk dan ukuran koloni yang berbeda. Dua puluh enam (26) koloni yang diperoleh kemudian dilakukan lagi inokulasi dengan cara penggoresan pada media MRS agar untuk mendapatkan kemurnian koloni bakteri. Inokulasi dilakukan hingga 3 kali ulangan untuk meyakini bahwa koloni yang diperoleh berasal dari satu (1) sel bakteri. Isolat murni kemudian ditumbuhkan pada agar miring dan disimpan sampai dilakukan pengujian selanjutnya. Pertumbuhan koloni bakteri setelah inokulasi dengan penggoresan pada media agar dapat dilihat pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2. Hasil inokulasi isolat YN 1.3 dan YN 1.6 setelah tahap isolasi dan pemurnian dengan goresan.

Isolat BAL yang telah dinyatakan murni, yang terdiri atas isolat YN1.1, YN 1.2, YN 1.3, YN 1.4, YN 1.5, YN 1.6, YN 1.7, YN 1.8, YN 1.9, YN 1.10, YN 1.11, YN 1.12, YN 1.3, YN 1.14, YN 1.15, YN 1.16, YN 1.17, YN 1.18, YN 1.19, YN 2.20, YN 2.21, YN 2.22, YN 2.23, YN 2.24 dan isolat YN 2.25 diinokulasi pada skim milk 20% dan gliserol 10%, dan disimpan pada suhu -20°C , sebagai inokulum cadangan.



1.1.2. Identifikasi BAL.

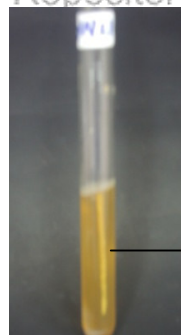
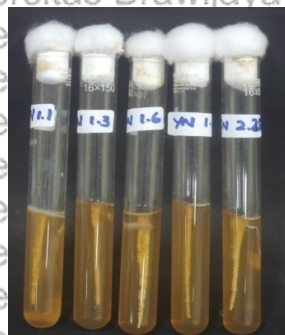
Identifikasi bertujuan untuk menentukan spesies isolat BAL yang diperoleh pada percobaan sebelumnya. Uji yang dilakukan meliputi:

1.1.2.1. Pengujian morfologis.

Morfologi bakteri asam laktat, meliputi bentuk sel isolat, dan dari hasil identifikasi dapat diketahui bahwa isolat yang berbentuk bulat sebanyak 5 isolat, bulat berantai sebanyak 4 isolat dan yang berbentuk batang sebanyak 17 isolat.

1.1.2.2. Pengujian motilitas.

Hasil sifat motilitas menunjukkan bahwa semua isolat tidak motil dengan ciri saat ditumbuhkan pada media *semisolid* menunjukkan pertumbuhan sejajar dengan arah goresan ose atau tidak menunjukkan pertumbuhan menyebar. Menurut Sneath (1987), dalam *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology* bahwa semua bakteri asam laktat mempunyai sifat tidak motil. Gambar non-motil dari beberapa isolat dapat dilihat pada Gambar 5.3.



Gambar 5.3. Sifat motilitas beberapa isolat BAL hasil pemurnian.

1.1.2.3. Pengecatan Gram.

Bakteri ditumbuhkan pada media *MRS broth* pada suhu 37°C selama 24 jam. Bakteri yang telah tumbuh kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dan selanjutnya dicuci dengan larutan *buffer fosfat salin*



sebanyak 2 kali. Setelah pencucian disentrifugasi lagi dan endapan (massa bakteri) yang diperoleh dilakukan pengecatan menggunakan cat Gram.

Bakteri Gram positif akan membentuk warna ungu, sedangkan bakteri Gram negatif membentuk warna merah saat diamati di bawah mikroskop. Hasil pengecatan menunjukkan bahwa 26 isolat yang diperoleh bersifat Gram positif, yang ditandai oleh terserapnya warna *metilen blue* oleh sel, sehingga saat pengamatan sel berwarna ungu kebiruan. Secara umum bakteri asam laktat merupakan bakteri Gram positif dan kalau dilihat dibawah mikroskop sel bakteri berwarna ungu kebiruan. Khalid (2011) juga melaporkan bahwa BAL mempunyai ciri-ciri spesifik antara lain; memiliki sifat Gram positif, tidak memiliki spora, katalase-negatif, tidak menghasilkan *sitokrom*, tahan terhadap asam dan mempunyai kemampuan memfermentasi, serta bersifat aerotoleran.

1.1.2.4. Uji Katalase.

Setelah uji sel bakteri terhadap sifat Gram pada isolat yang diperoleh maka dilanjutkan uji aktivitas katalase dengan meneteskan hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% pada kultur bakteri yang berumur 24 jam. Bakteri yang mempunyai katalase positif ditandai dengan keluarnya gelembung udara (oksigen) pada kultur yang diuji. Terbentuknya gelembung udara oleh isolat pada media yang ditetesi hidrogen peroksida (H_2O_2) merupakan hasil pemecahan enzim katalase yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. Secara umum bakteri asam laktat bersifat *katalase* negatif.

Hasil uji aktivitas katalase menunjukkan bahwa 26 isolat bakteri mempunyai *katalase* negatif dan tidak menunjukkan timbulnya gelembung udara pada waktu dilakukan pengujian. Berdasarkan *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology* maka kelompok bakteri asam laktat berbentuk batang dan bulat ditandai oleh katalase negatif dan hasil pengecatannya Gram positif adalah merupakan BAL. Genera yang masuk kedalam golongan bakteri asam laktat



adalah genus *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* atau *Pediococcus halophilus* (Sneath, 1987).

Hasil pengecatan dan uji aktivitas katalase isolat murni kemudian ditumbuhkan dalam campuran gliserol 20% dan susu skim 10% (1:1) dan disimpan pada suhu -40°C . Hasil isolasi, bentuk sel, hasil pengecatan serta sifat katalase dari isolat dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1. Pertumbuhan isolat hasil isolasi pada media MRS- CaCO_3 .

No urut isolat	Kode isolat	Zona jernih	Bentuk sel	Gram	Katalase
1	YN.1.1	+	Batang	+	-
2	YN.1.2	+	Batang	+	-
3	YN.1.3	+	Batang	+	-
4	YN.1.4	+	Bulat berantai	+	-
5	YN.1.5	+	Batang	+	-
6	YN.1.6	+	Batang	+	-
7	YN.1.7	+	Batang	+	-
8	YN.1.8	+	Batang	+	-
9	YN.1.9	+	Bulat	+	-
10	YN.1.10	+	Bulat	+	-
11	YN.1.11	+	Batang	+	-
12	YN.1.12	+	Batang	+	-
13	YN.1.13	+	Batang	+	-
14	YN.1.14	+	Bulat	+	-
15	YN.1.15	+	Bulat	+	-
16	YN.1.16	+	Bulat berantai	+	-
17	YN.1.17	+	Bulat berantai	+	-



18	YN.1.18	+	Batang berantai	+	
19	YN.2.19	+	Batang berantai	+	
20	YN.2.20	+	Bulat berantai	+	
21	YN.2.21	+	Batang berantai	+	
22	YN.2.22	+	Bulat	+	
23	YN.2.23	+	Batang	+	
24	YN.2.24	+	Batang	+	
25	YN.2.25	+	Batang	+	
26	YN.2.26	+	Batang	+	

*) Hasil rata-rata dari 3 ulangan percobaan dengan 3 ulangan pengujian

Tabel 5.1. menunjukkan bahwa dari 26 isolat BAL yang diperoleh maka 17 isolat adalah BAL yang berbentuk batang, sedangkan sisanya atau 9 isolat merupakan BAL yang berbentuk bulat. Semua isolat yang berbentuk batang (17 isolat), diketahui 3 isolat merupakan bentuk batang berantai dan sisanya 14 isolat berbentuk batang (*diploid*). Demikian juga yang berbentuk bulat, 6 isolat yang berbentuk bulat berantai dan sisanya 3 isolat berbentuk bulat tunggal.

Hasil isolasi seperti tertera pada Tabel 5.1, menunjukkan bahwa 26 isolat yang diperoleh merupakan BAL dengan ciri-ciri berbentuk batang atau bulat, mempunyai katalase negatif, tidak motil, dan dapat tumbuh dengan sedikit oksigen (mikro aerotoleran) atau tanpa oksigen (anaerob).

Menurut Tserovska *et al.*, (2004) bahwa spesies bakteri asam laktat hasil diisolasi dari susu kambing yang difermentasi secara spontan adalah berbentuk batang dan juga berbentuk bulat baik dalam bentuk tunggal ataupun berkelompok dan bersifat Gram positif, katalase negatif, mikroaerofilik, tahan asam, tidak membentuk spora dan menghasilkan asam laktat sebagai produk fermentasi.

Sedangkan Moulay *et al.*, (2013) melakukan isolasi mikrobia dari susu kambing



dan didapat 13 isolat bakteri yang merupakan spesies bakteri asam laktat dari 138 isolat yang diisolasi. Sebanyak 13 isolat bakteri asam laktat yang diperoleh 8 isolat dengan sel bakteri berbentuk bulat dan 5 isolat lainnya merupakan BAL dengan sel bakteri berbentuk batang.

Khalid (2011) menyatakan bahwa bakteri asam laktat adalah bakteri Gram positif, tidak memiliki spora, mempunyai katalase negatif, bersifat mikroaerofilik, tahan terhadap asam dan dapat melakukan fermentasi. Demikian juga hal yang sama dikemukakan oleh Woods (1992); dan Holzapfel *et al.*, (2001) menyatakan bahwa bakteri asam laktat adalah bakteri yang berbentuk batang atau bulat mempunyai katalase negatif, tidak motil, bersifat homo-fermentatif maupun bersifat hetero-fermentatif, serta dapat tumbuh pada kondisi asam atau pH rendah.

Sedangkan Axelsson (2004) menyatakan bahwa bakteri asam laktat adalah bakteri yang mempunyai sifat morfologis, fisiologis serta metabolik termasuk dalam kelompok Gram positif, mempunyai aktivitas katalase negatif, berbentuk batang maupun bulat, tidak memiliki spora, tidak motil serta tidak melakukan respirasi dan dapat tumbuh pada kondisi aerob maupun mikro-aerotoleran, serta menghasilkan asam laktat sebagai produk metabolik utama dari hasil fermentasi karbohidrat.

1.1.3. Uji tipe fermentasi.

Isolat yang telah diketahui sifat morfologisnya, dilanjutkan dengan uji biokimiawi yang meliputi analisis pembentukan dekstran dan analisis pembentukan asam dari berbagai jenis gula. Beberapa bakteri asam laktat memiliki kemampuan menghasilkan dekstran, antara lain adalah *Leuconostoc mesentroides sub sp. mesentroides*, *L. lactis*, *L. carnosus* dan *L. mesentroides sub sp. dextransicum* (Ray, 1996).

Hasil uji 26 isolat yang diperoleh menunjukkan bahwa 6 isolat dari bakteri asam laktat menghasilkan dekstran dengan ciri-ciri kenampakan isolat yang berlendir, sedangkan yang berbentuk batang tidak menghasilkan dekstran



(Lampiran 1). Tipe fermentasi atau sifat pembentukan asam oleh BAL dilakukan dengan melihat ada tidaknya gas yang terbentuk selama pertumbuhan. Bakteri asam laktat secara umum mempunyai 2 tipe fermentasi yakni bakteri homo-fermentatif dan bakteri hetero-fermentatif. Bakteri yang bersifat homo-fermentatif yakni bakteri yang hanya menghasilkan asam laktat pada akhir fermentasi. Sedangkan bakteri hetero-fermentatif, produk akhir fermentasi bukan hanya asam laktat tetapi juga etanol, asam asetat, propionat, butirir dan senyawa lainnya. Hasil uji pada tahapan penelitian ini menunjukkan bahwa 9 isolat adalah positif menghasilkan gas, yang berarti bersifat hetero-fermentatif sedangkan 17 isolat bersifat homo-fermentatif.

5.1.4. Sifat proteolitik BAL

Sampel bakteri hasil uji sebelumnya dilanjutkan dengan uji sifat proteolitik, dengan cara menumbuhkan semua isolat pada media skim milk 2%. BAL yang bersifat proteolitik akan membentuk zona jernih disekeliling isolat yang ditumbuhkan pada media skim milk 2 % tersebut. Uji sifat proteolitik isolat bakteri asam laktat dimaksudkan untuk mendapatkan isolat yang mempunyai kemampuan dalam memfermentasi susu, dan agar isolat yang dihasilkan dapat digunakan sebagai inokulum atau starter untuk produksi yoghurt susu kambing dengan mutu yang baik. Hasil seleksi BAL proteolitik dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2: Zona jernih disekitar isolat pada media MRS CaCO_3 dan media skim milk 2%.

Kode isolat	Zona jernih MRS- CaCO_3	Zona jernih media Skim milk agar 2%
YN.1.1	+	+++
YN.1.2	+	-
YN.1.3	+	+++



YN.1.5	+	-	
YN.1.6	+	+++	
YN.1.8	+	++	
YN.1.10	+	-	
YN.1.11	+	-	
YN.1.12	+	-	
YN.1.13	+	-	
YN.1.18	+	-	
YN.1.19	+	-	
YN.2.21	+	-	
YN.2.23	+	-	
YN.2.24	+	-	
YN.2.25	+	++	
YN.2.26	+	-	

Klear zone pada skim milk: + : kecil, ++ : Sedang, +++ : Besar.

Hasil penentuan kemampuan proteolitik isolat pada media skim milk agar 2% (Tabel 5.2) menunjukkan bahwa terdapat 5 isolat berturut-turut YN 1.1, YN 1.3, YN 1.6, YN 1.8 dan YN 2.25 yang mempunyai kemampuan proteolitik lebih besar di bandingkan dengan isolat lainnya. Sedangkan isolat lainnya tidak terlalu kuat sifat proteoliknya, dengan ditandai oleh hasil tidak jelasnya zona jernih yang terbentuk disekeliling koloni yang tumbuh pada media skim milk agar 2%. Sifat proteolitik isolat yang ditumbuhkan pada media skim milk agar 2% dan diinkubasi selama 24 jam dapat dilihat pada Gambar 5.4.

Pengamatan zona jernih (Gambar 5.4.) yang dihasilkan pada media skim milk agar 2% dengan isolat terpilih dilakukan setelah inkubasi selama 24 jam dan 48 jam. Setiap isolat yang menghasilkan zona jernih pada media skim milk menandakan bahwa isolat yang digunakan mempunyai kemampuan dalam memecah protein atau mempunyai aktivitas enzim proteolitik.



Gambar 5.4. Aktivitas enzim proteolitik isolat YN 1.6 dan YN 1.3 dalam menghasilkan zona jernih pada media skim milk agar 2%.

Zona jernih yang terbentuk kemudian diukur diameternya menggunakan jangka sorong digital dan hasil yang diperoleh disajikan dalam bentuk Tabel. 5.3.

Tabulasi aktivitas enzim proteolitik isolat terpilih dapat dilihat pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3: Diameter zona jernih yang dibentuk oleh isolat terpilih pada media skim milk agar.

Kode Isolat	Diameter zona jernih selama fermentasi (mm)	
	24 jam	48 jam
YN 1.1	16 ± 0,00	19 ± 0,00
YN 1.3	16 ± 0,57	20 ± 0,00
YN 1.6	18 ± 0,57	23 ± 0,57
YN 1.8	12 ± 0,00	14 ± 0,57
YN 2.25	14 ± 0,57	17 ± 0,00

Tabel 5.3 menunjukkan bahwa setiap isolat mempunyai kemampuan proteolitik yang berbeda-beda, antara satu dan lainnya, dan isolat YN 1.6, YN 1.3 dan YN 1.1 mempunyai kemampuan proteolitik lebih besar dibandingkan dengan isolat YN 1.8 dan YN 2.25. Isolat YN 1.1 dan Isolat YN 1.3, mempunyai



kemampuan proteolitik yang hampir sama setelah inkubasi selama 24 dan 48 Jam.

Sedangkan isolat YN 1.8 mempunyai kemampuan proteolitik paling kecil dibandingkan dengan isolat lainnya setelah inkubasi 24 dan 48 jam. Sifat aktivitas enzim proteolitik dari semua isolat yang digunakan menyerupai hasil proteolitik pada isolat hasil fermentasi susu unta yang dilakukan oleh Yamina *et al.*, (2013) dimana aktivitas enzim proteolitik yang dihasilkan dari 10 isolat, diameter zona jernihnya adalah 20 mm yang dikategorikan sebagai kelompok pertama yaitu isolat 1,11,13,19,20,22 dan 25. Sedangkan isolat dengan diameter zona jernih yang berkisar antara 10-15 mm dimasukkan pada kelompok ke 2 diantaranya adalah isolat 3,4,5,6,8,10,12,16,18 dan 21. Kelompok dengan diameter zona jernih yang kecil dengan zona jernih dengan diameter kurang dari 10 mm, adalah terdiri atas 4 isolat diantaranya 7,9,14 dan 15.

Seifu *et al.*, (2002) mencatat bahwa BAL yang berasal dari susu fermentasi dan mempunyai sifat proteolitik diantaranya adalah *L. plantarum*, *L. delbrueckii sub-sp. bulgaricus*, *L. salivarius*, *L. lactis sub-sp cremoris* dan *E. faecalis*.

5.1.5. Uji fisiologis.

Isolat terpilih yang mempunyai kemampuan proteolitik tinggi dan terpilih adalah isolat YN 1.1; YN 1.3; YN 1.6; YN 1.8 dan YN 2.2. Isolat tersebut diatas selanjutnya diuji lanjut melalui uji fisiologis yang meliputi pengaruh suhu dan pH terhadap pertumbuhan isolat BAL proteolitik. Pengujian isolat dilakukan untuk mengetahui tipe bakteri hasil isolasi apakah termasuk kelompok psikrofilik, mesofilik atau termofilik. Mikrobial psikrofilik tumbuh pada suhu kurang dari 15°C dan optimal pada suhu 20°C. Kelompok mesofilik tumbuh pada suhu hangat yaitu pada kisaran suhu 20°C - 45°C, sedangkan kelompok termofilik hidup pada suhu tinggi yaitu pada kisaran 45°C - 80°C. Pertumbuhan sel bakteri ditandai dengan



terbentuknya kekeruhan setelah inkubasi 48 jam pada media MRS cair. Hasil uji secara morfologis dan fisiologis dari 5 isolat dapat dilihat pada Tabel 5.4.

Hasil identifikasi ketahanan atau adaptasi isolat terhadap suhu, menunjukkan bahwa BAL proteolitik isolat YN 1.1, YN 1.3, YN 1.6, YN 1.8 dan YN 2.25, mampu tumbuh pada kisaran suhu 20°C – 45°C yang berarti bersifat mesophilik. Sedangkan pengaruh pH terhadap pertumbuhan 5 isolat BAL menunjukkan bahwa semua isolat mempunyai kemampuan tumbuh pada pH rendah (3.0) dan juga dapat tumbuh pada pH diatas 7 yakni pada pH 8.5.

Tabel. 5.4. Karakteristik bakteri asam laktat proteolitik hasil isolasi dari susu kambing yang difermentasi spontan

Karakteristik isolat	Kode isolat				
	YN 1.1	YN 1.3	YN 1.6	YN 1.8	YN 2.25
Bentuk sel	B	B	B	B	B
Gram	+	+	+	+	+
Produksi gas	-	+	-	+	-
Katalase	-	-	-	-	-
Motilitas	-	-	-	-	-
Dekstran	-	-	-	-	-
Pertumbuhan pada 20°C	+	+	+	+	+
Pertumbuhan pada 45°C	+	+	+	+	+
Pertumbuhan pH 3,5-8,5	+	+	+	+	+
Pertumbuhan pH 9-9,6	-	-	-	-	-
Tipe DAP	-	-	-	-	-

*) B : batang, +: positif, -: negatif

Badis *et al.*, (2004) menyatakan bahwa 6 isolat hasil isolasi dari susu kambing yang merupakan genus *Lactobacillus*, dan yang bersifat mesofilik adalah



isolat SH10, SH12, dan isolat SH13 dan sementara isolat yang bersifat termofilik yakni isolat SH8, SH9 dan SH11.

Moulay *et al.*, (2013) menyatakan bahwa isolat yang diperoleh dari hasil isolasi susu kambing mempunyai kemampuan untuk tumbuh pada suhu 30°C, tetapi tidak semua isolat yang diperoleh mampu hidup pada suhu 45°C. BAL proteolitik pada umumnya mempunyai kemampuan hidup pada suhu 45°C dan juga mampu tumbuh pada pH rendah dan menghasilkan asam laktat.

Carr *et al.*, (2002) menyatakan bahwa BAL untuk pertama kalinya diisolasi dari susu, dan baru kemudian didapatkan pada produk lainnya seperti produk fermentasi susu, daging, sayuran, minuman dan produk fermentasi roti. Secara alamiah BAL dapat diperoleh dari produk-produk fermentasi (Caplice dan Fitzgerald, 1999). Selanjutnya Koort, (2006) menyatakan bahwa BAL hidup pada habitat yang kaya nutrisi seperti karbohidrat, protein dan vitamin, karena bakteri ini membutuhkan nutrisi yang sangat kompleks untuk pertumbuhannya.

Hasil uji sifat fisiologis dari 5 isolat yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk uji sifat biokimiawi dengan menggunakan kit API 50 CHL untuk mengetahui karakteristik atau kemampuan fermentasi karbohidrat.

5.1.6. Kemampuan fermentasi karbohidrat.

Kemampuan fermentasi karbohidrat oleh isolat terpilih diuji dengan kit API 50 HCL yang berisi 49 jenis karbohidrat. Isolat yang diuji sifat fermentasinya hanya isolat yang bersifat proteolitik yang telah diperoleh dari penelitian tahap sebelumnya. Isolat yang digunakan untuk keperluan uji fermentasi karbohidrat diantaranya isolat YN 1.1, YN 1.3, YN 1.6, YN 1.8 dan YN 2.25. Uji dilakukan dengan maksud untuk mengetahui sifat-sifat biokimia fermentasi dari isolat dalam memfermentasi karbohidrat. Kemampuan isolat dalam memfermentasi karbohidrat ditunjukkan terjadinya perubahan warna pada *media "basa"* yang digunakan. Pada



awalnya media basal mempunyai warna dasar ungu, isolat yang positif melakukan fermentasi akan mengubah warna ungu media basal menjadi warna kuning.

Kemampuan setiap isolat dalam memfermentasi berbagai macam jenis karbohidrat yang terdapat pada setiap vial pada kit, dapat dilihat setelah fermentasi berakhir.

Isolat yang tidak mempunyai kemampuan memfermentasi salah satu jenis karbohidrat yang tersedia maka warna media akan tetap. Hasil uji menggunakan kit API 50 CHL dapat dilihat pada Tabel 5.5.

Tabel. 5.5. Kemampuan fermentasi karbohidrat oleh isolat terpilih menggunakan kit API 50 CHL.

No	Isolat	YN	YN	YN	YN	YN
		1.1	1.3	1.6	1.8	2.25
0	Pembentukan Asam	-	-	-	-	-
1	Gliserol	✓	✓	-	-	-
2	Erythritol	-	-	-	-	-
3	D-arabinosa	-	-	-	-	-
4	L-arabinosa	-	+	+	+	+
5	D-ribosa	+	+	+	+	+
6	D-xilosa	-	+	-	-	-
7	L-xilosa	-	-	-	-	-
8	Adonitol	-	-	-	-	-
9	Methyl-Id xilopiranosida	-	-	-	-	-
10	D-galaktosa	+	+	+	+	+
11	D-glukosa	+	+	+	+	+
12	D-fruktosa	+	+	+	+	+
13	D-mannosa	+	+	+	+	+
14	L-Sorbose	+	+	+	+	+
15	L-rhamnosa	✓	-	-	✓	-
16	Dulkitol	-	-	-	-	-
17	Inositol	-	-	-	-	-
18	D-mannitol	✓	-	-	-	-



49	Ka-5 seloglukonat					
	Kelompok BAL	<i>Lactobacillus. plantarum</i>	<i>Lactobacillus. plantarum</i>	<i>Lactobacillus. Pentosus</i>	<i>Lactobacillus. plantarum</i>	<i>Lactobacillus. Plantarum</i>

Keterangan: + (positif) larutan basal difermentasi secara sempurna

- (negatif) larutan basal tidak difermentasi

✓ (tdk sempurna) larutan basal tidak difermentasi secara sempurna.

Hasil fermentasi karbohidrat oleh isolat BAL pada tahapan ini menunjukkan bahwa tidak semua karbohidrat pada kit dapat difermentasi oleh isolat BAL terpilih.

Beberapa isolat bakteri diketahui tidak mampu melakukan fermentasi dengan sempurna yang ditandai oleh tidak terbentuknya warna kuning pada media larutan basal. Perubahan warna terjadi hanya merubah larutan basal dari warna ungu menjadi warna hijau (tanda ✓) (Tabel 5.5). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh kurangnya kemampuan enzim yang dihasilkan oleh isolat BAL untuk merombak gula pada larutan basal. Isolat BAL yang mempunyai kemampuan dalam fermentasi dengan aktivitas enzim yang tinggi akan merubah larutan basal dari warna ungu menjadi kuning.

Data hasil uji kemampuan dalam fermentasi ragam karbohidrat (Tabel 5.5.)

menunjukkan bahwa isolat YN 1.1, YN 1.3, YN1.6, YN 1.8 dan YN 2.25 mempunyai kemampuan memfermentasi L-arabinosa, D-ribosa, D-glukosa, D-fruktosa, D-mannosa, L-sorbosa, D-galaktosa, amigdalin, arbutin, salisin, D-selobiosa, D-maltosa, D-melibiosa, D-sakarosa, D-tetralosa, D-melezitosa, D-rafinosa, gentibiosa, dan kalium glukonat. Tetapi tidak mempunyai kemampuan dalam fermentasi; eritritol, D-arabinosa, xilosa, adonitol, metil-β-d-xilopiranos, dulkitol, inositol, N-asetilglukosamin, L-lixosa, D,L-fukosa, D,L-arabitol dan kalium glukonat 2-5. Perbedaan kemampuan memfermentasi karbohidrat terdapat pada fermentasi gliserol, D-xilosa, L-ramnosa, metil-manopiranos, inulin, gentibiosa, tagadosa dan kalium glukonat.



Data sifat fenotip yang meliputi karakteristik morfologis, fisiologis dan biokimia yang diperoleh dan berdasarkan identifikasi probabilitas dengan perangkat lunak API web data base V-51, maka hasil uji yang dilakukan menunjukkan bahwa isolat pertama YN 1.1 adalah jenis *L. plantarum* dengan tingkat kemiripan 89%, isolat kedua YN 1.3 adalah *L. plantarum* dengan tingkat kemiripan 99,9%, isolat ketiga YN 1.6 adalah *L. pentosus* dengan tingkat kemiripan 95,3%, isolat keempat YN 1.8 adalah *L. plantarum* dengan tingkat kemiripan adalah 99,9%, isolat yang kelima YN.2.25 adalah *L. plantarum*, dengan tingkat kemiripan 69,9 %

Data hasil analisis menunjukkan bahwa 4 isolat yang diperoleh yaitu YN 1.1, YN 1.3, YN 1.8 dan YN 2.25, merupakan BAL dari spesies *L. plantarum* sedangkan 1 isolat lainnya yaitu YN 1.6 diduga dari spesies *L. pentosus*. Zanoni *et al.*, (1987) dan Curk *et al.*, (1996), menyatakan bahwa *L. plantarum* sangat sulit untuk dibedakan dengan *L. pentosus*, karena mempunyai kemiripan DNA dan kemiripan sifat fermentasinya.

Hames dan Vogel (1995) menyatakan bahwa *L. plantarum* merupakan BAL yang bersifat fakultatif hetero-fermentatif, mempunyai bentuk batang dengan ukuran 0,9 -1,2 μm hingga 3,0 - 8,0 μm dan bersifat tidak motil. BAL tersebut diatas bersifat fakultatif hetero-fermentatif yang berarti tidak hanya mampu memfermentasi heksosa tetapi juga mempunyai kemampuan memfermentasi pentosa. *L. plantarum* tidak membutuhkan riboflavin dan asam folat serta tiamin untuk pertumbuhannya, namun bakteri *L. plantarum* ini mempunyai kemampuan memfermentasi karbohidrat seperti sukrosa, galaktosa, rafinosa dan ribosa.

Bringel *et al.*, (2005) mencatat bahwa spesies *L. plantarum* dan *L. pentosus* mempunyai kemampuan dalam fermentasi galaktosa, D-glukosa, D-fruktosa, D-mannosa, mannitol, N-asetilglukosamin, amigdalin, aeskulin, salisin, sellobiosa, maltosa, sukrosa dan β -gentibiosa. Selanjutnya dikatakan bahwa *L. plantarum* dan



L. pentosus tidak mempunyai kemampuan dalam memfermentasi L-sorbitol, inulin, D-silosa, eritritol, D-arabinosa, L-xilosa, adonitol, metil β -xilosa, inositol, D-tagatosa, DL-fukosa, L-arabitol dan 2-5 ketoglukonat.

Hasil identifikasi menggunakan kt API 50 CHL dan sifat penotip menurut Sneath (1987) dalam Bergey's Manual of Systematic Bacteriology menunjukkan bahwa hampir semua isolat terpilih merupakan bakteri asam laktat spesies *L. plantarum* dan 1 isolat diperkirakan adalah *L. pentosus*. Penelitian yang dilakukan oleh Anas *et al.*, (2012), menyatakan bahwa isolasi BAL pada susu kambing mentah dari Algeria yang diidentifikasi merupakan spesies *L. plantarum* dan *L. rhamnosus*. Selanjutnya penelitian yang dilakukan Mathara *et al.*, (2008) menyatakan bahwa *L. plantarum* merupakan species yang paling dominan diantara spesies bakteri asam laktat yang diisolasi dari susu yang difermentasi secara tradisional di Kenya. Hasil pengujian juga menunjukkan bahwa *L. plantarum* yang diisolasi dari minuman fermentasi "Maasai" mempunyai kemampuan sebagai bakteri probiotik.

Lebih lanjut Mathara *et al.*, (2004) menyatakan bahwa *L. plantarum* merupakan spesies yang penting di beberapa produk fermentasi dari tanaman maupun dari produk susu, dan beberapa spesies diketahui menghasilkan senyawa yang bersifat anti-mikrobia. Sedangkan Kaktcham *et al.*, (2011), menyatakan bahwa hasil isolasi dari minuman fermentasi tradisional di Cameron diperoleh sebanyak 62% dari hasil isolasi BAL adalah spesies *L. plantarum* dan 24% adalah *L. rhamnosus* selanjutnya diikuti oleh *L. fermentum* sebanyak 10%.

Han *et al.*, (2010) menyatakan bahwa *L. pentosus* merupakan bakteri yang sering terdapat pada produk susu dan berpengaruh pada pemeraman keju dan biasanya dijumpai sebagai bakteri yang tidak ditambahkan (non-starter), pada keju dan mempengaruhi pembentukan flavor dan tekstur keju. Lebih lanjut dikatakan



bahwa *L. pentosus* umumnya sering terdapat pada produk-produk yang difermentasi secara spontan. Bakteri ini juga mempunyai kemampuan dalam mengkoagulasi susu membentuk dadih dan juga mempunyai kemampuan dalam menghambat bakteri patogen dan *L. pentosus* merupakan bakteri yang dapat mendegradasi asam format menjadi asam laktat.

Meskipun demikian identifikasi menggunakan kit API 50 CHL masih perlu diteliti lagi keakuratannya, dan untuk memperkuat hasil pengujian dengan kit API 50 CHL perlu didukung oleh data genotip. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa identifikasi menggunakan kit API 50 CHL ketika dikonfirmasi dengan genotip menghasilkan data berbeda, diantaranya penelitian yang dilakukan oleh Kulwichit *et al.*, (2007) yang menunjukkan ada beberapa strain dari kelompok *Streptococci* dan *Enterococci* yang diidentifikasi sebagai genus *Leuconostoc*, oleh sebab itu analisis genotip sangat diperlukan untuk mendapatkan data yang akurat guna memastikan hasil identifikasi.

5.1.7. Kesimpulan Penelitian Tahap I.

Berdasarkan hasil analisis dari isolasi dan identifikasi isolat yang diperoleh dari susu kambing hasil fermentasi spontan melalui uji isolat bakteri dengan melihat bentuk sel, pengecatan Gram, warna koloni, aktivitas katalase serta dilanjutkan dengan uji kemampuan proteolitik isolat serta karakteristik fisiologis dan biokimiawi isolat maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Berdasarkan hasil isolasi dan karakterisasi sifat Gram, aktivitas katalase, motilitas dan bentuk koloni sel maka diperoleh 26 isolat bakteri yang diduga sebagai bakteri asam laktat.
2. Isolat bakteri asam laktat dengan kode YN 1.1, YN 1.3, YN 1.6, YN 1.8 dan YN 2.25, merupakan isolat yang mempunyai kemampuan proteolitik dibandingkan



dengan isolat terpilih lainnya dengan ditandai oleh kemampuan setiap isolat dalam memfermentasi media yang mengandung skim milk agar 2%.

3. Hasil fenotip dan dilanjutkan dengan hasil identifikasi secara konvensional dan identifikasi berdasarkan probabilitas dengan menggunakan software API web data base V-51, maka isolat bakteri asam laktat yang bersifat proteolitik adalah merupakan bakteri asam laktat dari spesies *L. plantarum* YN 1.1, YN 1.3, YN 1.8 dan YN 2.25, sedangkan YN 1.6 diduga merupakan bakteri asam laktat dari spesies *L. pentosus*.

1.2. Penelitian Tahap II

Judul : Identifikasi BAL menggunakan 16S rRNA.

5.2.1. Isolasi dan pemurnian DNA.

Isolasi DNA dimaksudkan untuk melepaskan DNA dari sel melalui pemecahan dinding sel menggunakan bahan kimia. Proses isolasi menggunakan enzim dan dilanjutkan dengan pemanasan adalah cara untuk mendapatkan sel DNA. Proses isolasi DNA dapat dilihat pada Gambar 5.5.



Gambar 5.5. Hasil isolasi DNA dan supernatan sel DNA Bakteri setelah dilakukan proses sentrifugasi.

Enzim lisozim digunakan pada awal isolasi DNA untuk mempercepat reaksi pemisahan DNA dari sel bakteri dan dilanjutkan dengan pemanasan dalam

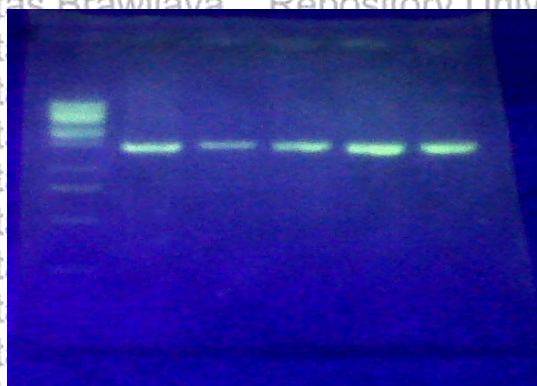


inkubator pada suhu 37°C selama 60 menit. Setelah inkubasi pada suhu 37°C pada tahap awal, maka pemisahan DNA kembali dilanjutkan dengan penambahan enzim proteinase yang dikombinasikan dengan pemanasan pada suhu 65°C, selama 60 menit. Pemanasan dan penambahan enzim dilakukan dalam beberapa tahapan untuk mendapatkan DNA murni.

Hasil akhir isolasi berupa supernatan yang berisi DNA sel selanjutnya disentrifugasi untuk mendapatkan endapan DNA. Endapan yang diperoleh pada tahap awal isolasi dimurnikan menggunakan metode pelarut campuran fenol kloroform. Penentuan endapan yang dihasilkan adalah merupakan DNA murni maka dilakukan pengecekan menggunakan metode elektroforesis.

5.2.2. Elektroforesis DNA.

DNA hasil isolasi yang diyakini murni selanjutnya dilakukan pengecekan menggunakan elektroforesis. Agarosa yang digunakan pada konsentrasi 2%. Hasil elektroforesis kemudian dilihat menggunakan sinar UV. DNA yang dihasilkan dari proses elektroforesis dari setiap isolat yang digunakan, akan membentuk pita yang jelas atau garis lurus ketika disinari dengan sinar ultra violet. Hasil dari elektroforesis yang tidak bisa dilihat ketika disinari dengan sinar UV, menandakan isolasi DNA yang dihasilkan kurang berhasil. DNA hasil pemaparan sinar UV guna melihat ekspresi DNA yang dihasilkan dari semua isolat *L. plantarum* yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 5.6.



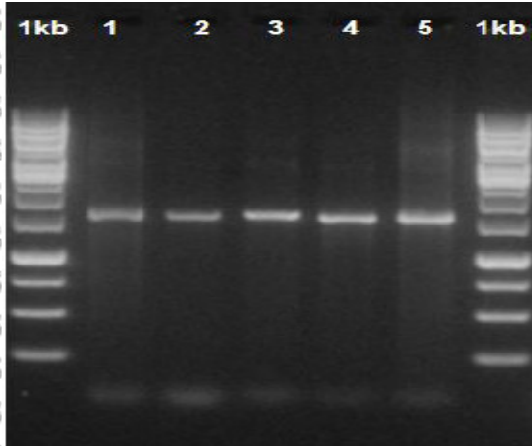


Gambar 5.6. Penentuan DNA dengan elektroforesis, dan ekspresi hasil menggunakan sinar UV.

Gambar 5.6 menunjukkan hasil isolasi DNA yang berhasil dilakukan dengan terlihatnya garis lurus sewaktu dipapar dengan sinar UV setelah dilakukan elektroforesis. Urutan garis pada Gambar 5.6 berurut adalah nomor 1. Marker yang digunakan nomor 2. isolat YN 1.1, nomor 3. isolat YN 1.3, nomor 4. isolat YN 1.6, Nomor 5 isolat YN 1.8, dan nomor 6 adalah isolat YN 2.25. Setelah isolasi DNA dan pengujian menggunakan elektroforesis selanjutnya dilakukan uji PCR guna amplifikasi atau penggandaan DNA, untuk semua isolat yang digunakan.

5.2.3. Uji PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Hasil ekstraksi DNA yang sudah didapatkan digunakan untuk *template* guna amplifikasi dengan PCR. Penggandaan DNA dilakukan menggunakan mesin PCR yang sudah di program untuk PCR 16S rRNA. Suhu dan waktu yang digunakan pada mesin PCR guna amplifikasi dengan denaturasi awal adalah pada suhu 96°C selama 4 menit dan dilanjutkan dengan 30 siklus untuk denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit dan annealing 51,5°C selama 30 menit serta ekstensi pada suhu 68°C selama 8 menit. Reaksi PCR selanjutnya untuk ekstensi akhir menggunakan suhu 68°C selama 10 menit. Selesai amplifikasi dilakukan, hasil amplifikasi yang diperoleh kembali di cek kemurniaannya menggunakan gel agarose 2%, sebelum dilakukan sequencing. Hasil PCR yang menandakan adanya DNA dengan pita yang jelas dan terang seperti terlihat pada Gambar 5.7.



Gambar 5.7. Amplifikasi 16S rRNA isolat 1. YN 1.1; 2. YN 1.3; 3. YN 1.6; 4. YN 1.8 dan 5. YN 2.25. Menggunakan 1 kb Marker DNA (Ladder Gen Ruler).

Gambar 5.7. menunjukkan bahwa hasil yang didapatkan adalah pita tunggal dan sejajar dengan DNA marker pada 500 bp. Pita tunggal yang dihasilkan menandakan kemurnian isolat DNA yang diperoleh, setelah amplifikasi 16S rRNA. Pita tunggal yang dihasilkan setelah amplifikasi PCR juga menandakan ketelitian isolasi DNA pada isolat yang digunakan dapat dipertanggung jawabkan.

Identifikasi secara molekular sejalan dengan pendapat Drancourt *et al.*, (2000) yang menyatakan bahwa metode molekular sangat penting untuk identifikasi bakteri dan hasil yang diperoleh jauh lebih akurat dibandingkan dengan identifikasi menggunakan metode penotipik konvensional. Metode dengan 16S rRNA dalam penelitian ini menggunakan 750 - 1500 bp segment dari gen bakteri asam laktat dalam bentuk sequen DNA. Sequen DNA dari isolat kemudian dibandingkan dengan sequen dari spesies bakteri asam laktat pembanding yang diperoleh dari National Center for Biotechnology Information (NCBI), di Amerika Serikat.

5.2.4. Siquencing 16S rRNA

Hasil sequensing 16S rRNA yang dilakukan dengan menggunakan 2 primer yaitu primer forward 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') dan reverse



primer 1492 R (5'-TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-3'). Hasil sequencing 16S rRNA akan menghasilkan panjang rantai amplifikasi dengan panjang 1500 bp. Hasil sequencing yang dihasilkan sebelum dilakukan penentuan spesies perlu dilakukan proses perbaikan terhadap sequeen yang dihasilkan, sequeen yang diperoleh perlu dilakukan triming sehingga urutan basa yang dihasilkan dapat dibaca.

Hasil sequencing DNA masing-masing isolat kemudian dilakukan proses triming (perbaikan) menggunakan MEGA software dan hasil triming yang diperoleh bervariasi antara satu isolat dengan isolat lainnya. Dari proses triming sequeen basa yang dihasilkan dari isolat YN 1.1 dihasilkan 752 basa; isolat YN 1.3 dihasilkan 1279 basa; isolat YN 1.6 dihasilkan 1205 basa dan isolat YN 1.8 dihasilkan 1662 basa; sedangkan isolat YN 2.25 menghasilkan 1400 basa. Panjang basa dan urutan basa yang berbeda dapat menggambarkan perbedaan antar bakteri, urutan basa yang sama dapat dijadikan sebagai acuan untuk melihat tingkat kekerabatan antara spesies dari bakteri. (Liu *et al.*, (1997). Sequencing DNA merupakan suatu cara yang dilakukan secara molekuler yang merupakan sistematis molekuler yang dapat melihat sifat filogenetik sampai pada tingkat spesies (Petti *et al.*, 2005). Sequencing dari DNA masing-masing isolat dapat dilihat pada Gambar 5.8.

>YN1.1

AGCATTGAGT GTGTGNAGAG GATGAGGGGG ACCTGGGGTA ATAGTAAAGT
CGGATGGTTT

GTGCTAAGCC CGTTTGAGA GCCTTCAAGC GGTCACCCA GAACAGCCCG
GCCTTTTGGC

CCACTGGGTG GTTCTTCCCA TATATTCTAC GCAATTTAC CGGCTACACC
ATGGGAGGTT

CCAAGTGTCC TTTTGGCAC TTCAAGTTTC CCCAGTTTC GATGCCACTT
CTTCCGGTTG



AGCCCGAAAG GCTTTCCACA TCAGGACTTA AAAAAACCGC CTGCGCCTCG
CTTTACGGCC

CAATAAATCC GGGACAACGC NTTGCCACCT ACGTATTACC GCGGGCTGCT
GGCACGTAGT

TAGCCGTGGC TTTCTGGTTA AATACCGTCA ATACCTACAG TFACTCTCAA
CAACAGAGTA

CTTTCGTCCG ATTCCCTACT

>YN1.3

AGTGGCGAAC TGGTGAGTAA CACGTGGGAA ACCTAAGCGG GGGATAACAC
CTGGAAACAG

ATGCTAATAC CGCTTGGACC GCATGGTCCG AGCTTGATCA CTTTTGGATG
GTCCCGCGGC

GTATTAGCTA GATGGTGGGG TAACGGCTCA CCATGGCAAT GATACGTAGC
ACCTGAGAGG

GTAATCGGCC ACATTGGGAC TGAGACACGG CCCAACTCT ACGGGAGGCA
GCAGTAGGGA

ATCTTCCACA ATGGACGAAA GTCTGATGGA GCAACGCCGC GTGAGTGAAG
GGTTTCGGCT

CGTAAACTC TGGTTAAAGA AGAACATATC TGAGAGTACT GTTCAGGTAT
TGACGGTATT

TAACCAGAAA GCCACGGCTA ACTACTGCCA GCAGCCCGCG TAATACGTAT
TTATTTGGGG

GCTCAACCGC ATCGGAACT

>YN1.6

AGTGGCGAAC TGGTGAGTAA CACGTGGGAA ACCTAAGCGG GGGATAACAC
CTGGAAACAG

ATGCTAATAC CGCTTGGACC GCATGGTCCG AGCTTGATCA CTTTTGGATG
GTCCCGCGGC

GTATTAGCTA GATGGTGGGG TAACGGCTCA CCATGGCAAT GATACGTAGC
ACCTGAGAGG

GTAATCGGCC ACATTGGGAC TGAGACACGG CCCAACTCT ACGGGAGGCA
GCAGTAGGGA



ATCTTCCACA ATGGACGAAA GTCTGATGGA GCAACGCCGC GTGAGTGAAG
GGTTTCGGCT

CGTAAAACTC TGGTTAAAGA AGAACATATC TGAGAGTACT GTTCAGGTAT
TGACGGTATT

TAACCAGAAA GCCACGGCTA ACTACTGCCA GCAGCCGCGG TAATACGTAT
TTATTGGGCG

GCTCAACCGC ATCGGAAACT

>YN1.8

AGTGGCGAAC TGGTGAGTAA CACGTGGGAA ACCTAAGCGG GGGATAACAC
CTGGAACAG

ATGCTAATAC CGCTTGGACC GCATGGTCCG AGCTTGATCA CTTTGGATG
GTCCC GCGGC

GTATTAGCTA GATGGTGGGG TAACGGCTCA CCATGGCAAT GATACGTAGC
ACCTGAGAGG

GTAATCGGCC ACATTGGGAC TGAGACACGG CCCAACTCT ACGGGAGGCA
GCAGTAGGGA

ATCTTCCACA ATGGACGAAA GTCTGATGGA GCAACGCCGC GTGAGTGAAG
GGTTTCGGCT

CGTAAAACTC TGGTTAAAGA AGAACATATC TGAGAGTACT GTTCAGGTAT
TGACGGTATT

TAACCAGAAA GCCACGGCTA ACTACTGCCA GCAGCCGCGG TAATACGTAT
TTATTGGGCG

CTCCAACCGC ATTCGGAAC

>YN2.25

AGTGGCGAAC TGGTGAGTAA CACGTGGGAA ACCTAAGCGG GGGATAACAC
CTGGAACAG

ATGCTAATAC CGCTTGGACC GCATGGTCCG AGCTTGATCA CTTTGGATG
GTCCC GCGGC

GTATTAGCTA GATGGTGGGG TAACGGCTCA CCATGGCAAT GATACGTAGC
ACCTGAGAGG

GTAATCGGCC ACATTGGGAC TGAGACACGG CCCAACTCT ACGGGAGGCA
GCAGTAGGGA



ATCTTCCACA ATGGACGAAA GTCTGATGGA GCAACGCCGC GTGAGTGAAG
GGTTCCGGCT

CGTAAACTC TGGTTAAAGA AGAACATATC TGAGAGTACT GTTCAGGTAT
TGACGGTATT

TAACCAGAAA GCCACGGCTA ACTACTGCCA GCAGCCGCGG TAATACGTAT
TTATTGGGCG

GCTCAACCGC ATCCGGAAC

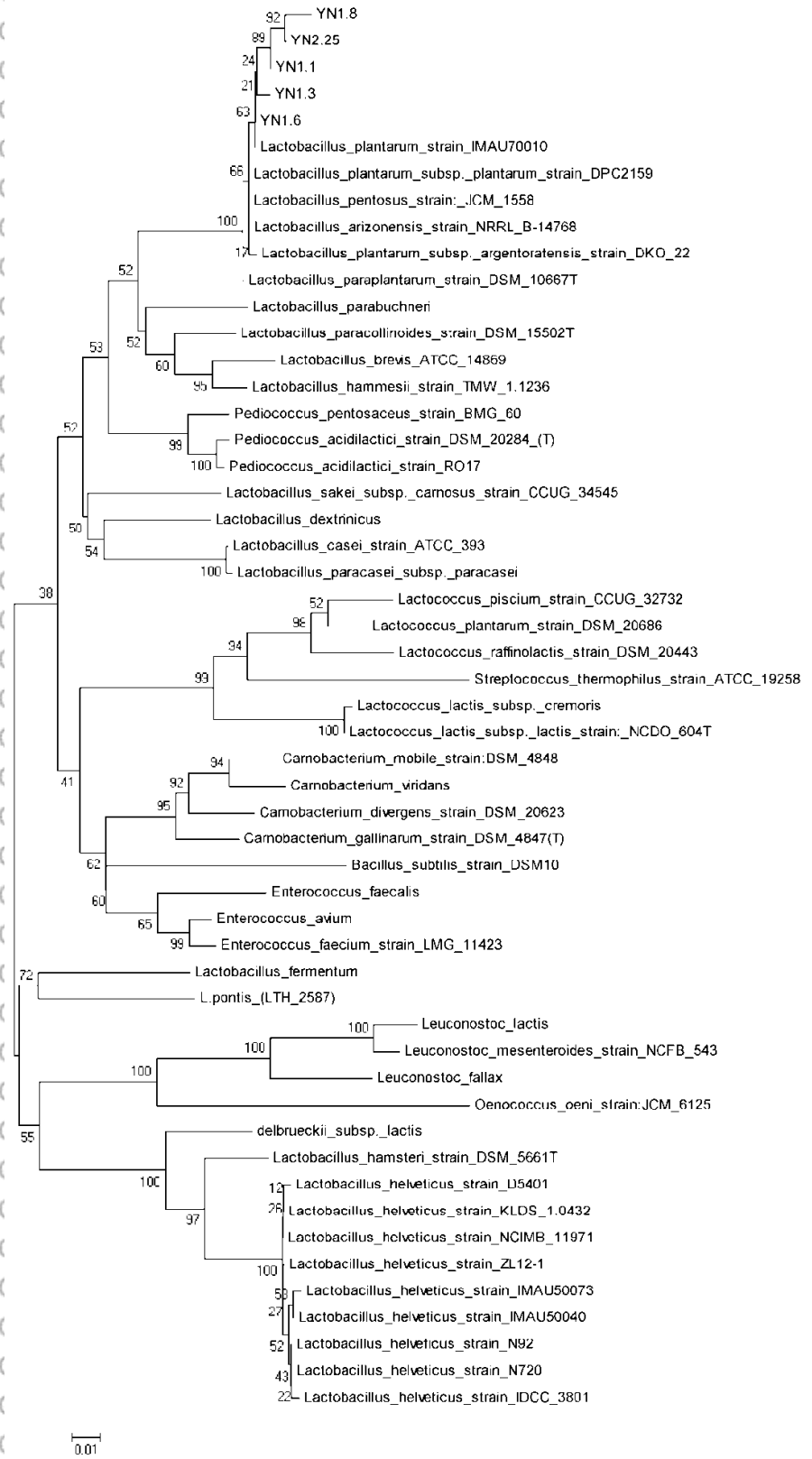
Gambar 5.8. Hasil sequencing DNA isolat YN 1.1, YN 1.3, YN 1.6
YN 1.8 dan YN 2.25.

Hasil Sequensing menggunakan 16S rRNA seperti pada Gambar 5.8 selanjutnya dilakukan pengujian dari spesies berdasarkan urutan DNA dari masing-masing isolat.

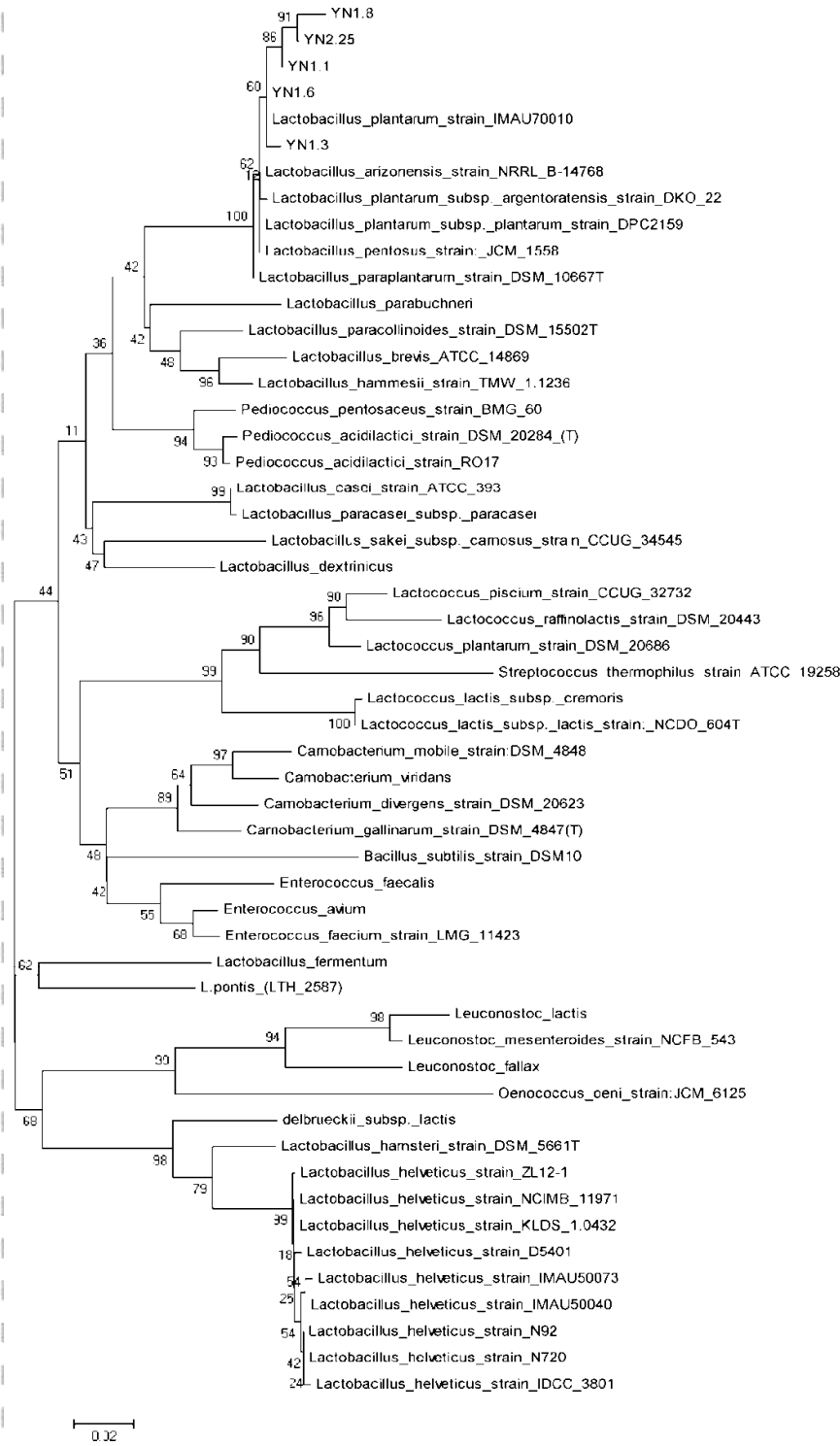
5.2.5. Re-konstruksi *silsilah filogeni*

Re-konstruksi *silsilah filogeni* dilakukan dengan merekonstruksi hasil sequencing DNA yang diperoleh dari isolat BAL terpilih dengan sequencing DNA bakteri pembanding dari "NCBI". Hasil rekunstruksi tersebut dapat untuk mengetahui identitas isolat dan juga kekerabatan antar spesies yang dihasilkan, dapat diketahui dengan melihat tingkat kemiripan dari kedua spesies yang berkerabat.

Hasil identifikasi menggunakan rekonstruksi silsilah filogeni BAL yang mempunyai kemampuan proteolitik berdasarkan *silsilah filogeni* yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 5.9, 5.10a dan 5.10b. Berdasarkan silsilah filogeni yang dihasilkan menunjukkan bahwa BAL isolat YN1.1, YN 1.3, YN 1.6, YN 1.8 dan YN 2.25 merupakan BAL yang mempunyai kekerabatan dekat dengan bakteri *L. plantarum* IMAU 70010 dan *L. arizonensis strain* NRRL B-14768.



Gambar 5.10a. Hasil analisis silsilah filogeni menggunakan kemungkinan kesamaan



Gambar 5.10b. Hasil analisis silsilah filogeni menggunakan kekerabatan.



dibandingkan dengan spesies lainnya, yang termasuk kedalam spesies *L. plantarum*. Kedekatan antar spesies *L. plantarum* dengan bakteri acuan adalah sebagai berikut.

1. Isolat YN1.1 mempunyai nilai jarak genetik sebesar 0,004 dan nilai kemiripan sebesar 99,29% dengan sampel *L. arizonensis strain* NRRL B-14768 dan *L. plantarum sub sp. plantarum strain* DPC2159.
2. Isolat YN1.3 mempunyai nilai jarak genetik sebesar 0,003 dan nilai kemiripan sebesar 99,52% dengan *L. plantarum strain* IMAU70010
3. Isolat YN1.6 tidak mempunyai jarak genetik dan nilai kemiripan sebesar 100 % dengan *L. plantarum strain* IMAU70010
4. Isolat YN 1.8 mempunyai nilai jarak genetik sebesar 0,005 dan nilai similaritas sebesar 99,05 % dengan isolat YN 2.25
5. Isolat YN2.25 mempunyai nilai jarak genetik sebesar 0,005 dan similaritas sebesar 99,05% dengan *L. plantarum strain* IMAU70010

Menurut Goodfellow dan O'Donnel (1993) bahwa strain yang tergolong dalam satu spesies apabila strain tersebut memiliki indek similaritas $\geq 70\%$. Berdasarkan analisis silsilah filogenetik maka isolat yang diperoleh dan diuji pada penelitian ini menunjukkan ciri spesies yang sama dengan spesies *L. plantarum*.

Berdasarkan jarak genetik yang dihasilkan oleh isolat yang diuji menunjukkan bahwa isolat YN 1.1, YN 1.3, YN 1.8 dan YN 2.25 mempunyai jarak genetik yang berbeda sebesar $\pm 1\%$. Oleh sebab itu strain bakteri tersebut bisa dikatakan memiliki basa atau untai nukleotida DNA yang berbeda dengan untai basa pada bakteri acuan. Hal ini menunjukkan kemungkinan bahwa spesies isolat yang dihasilkan adalah spesies *L. plantarum* baru dengan sifat-sifat genetik yang berbeda dengan *L. plantarum* yang ada sebelumnya.



5.2.6. Kajian perbedaan hasil spesies Tahap I dan Tahap II.

Perbedaan spesies isolat yang dihasilkan pada Tahap 1 dan Tahap 2 terhadap isolat YN 1.6 dapat disebabkan perbedaan metode uji yang sangat jauh berbeda. Pada penelitian Tahap I bahwa penentuan isolat dilakukan dengan melihat sifat fisiologis dan biokimia isolat dalam memfermentasi berbagai ragam karbohidrat. Hasil yang diperoleh kemudian diuji probabilitasnya menggunakan perangkat lunak dari kit API 50 CHL. Sedangkan pengujian spesies pada Tahap II dilakukan melalui pengujian 16S rRNA dengan melihat untaian nukleotida yang dihasilkan oleh setiap isolat.

Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa spesies *L. plantarum* dan *L. pentosus* mempunyai kemampuan yang sama dalam memfermentasi beberapa jenis karbohidrat, sehingga akan sangat sulit untuk membedakan berdasarkan sifat biokimia yang dilakukan, selain itu beberapa *Lactobacillus* diketahui tidak menghasilkan zat warna sehingga waktu fermentasi tidak terlihat perbedaan perubahan warna yang dihasilkan saat di uji menggunakan kit API 50 CHL. Penentuan spesies pada penelitian Tahap 2 adalah dengan melihat perbedaan untaian basa yang dihasilkan oleh isolat yang digunakan. Menurut beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa satu isolat masuk kedalam satu spesies bila mempunyai indeks similaritas \geq dari 70 % dengan acuan dari NCBI (pusat data DNA mikrobia). Kesamaan DNA pada satu spesies kurang pasti jika hanya dibandingkan dengan melihat kemampuan sifat fermentasi dari isolat. Namun untuk kejelasan yang lebih akurat perlu dilakukan analisis lanjut untuk melihat berapa besar perbedaan antara nukleotida isolat YN 1.6 dengan isolat lainnya.

Menurut Fox et al., (1992) menyatakan bahwa pengujian untuk bakteri yang sangat dekat atau mempunyai kesamaan DNA maka pengujian dengan menggunakan 16 S rRNA atau 23 S rRNA perlu dilanjutkan lagi dengan pengujian



yang lebih akurat yakni dengan melihat untaian DNA yang mana yang berbeda antara spesies yang berdekatan tersebut.

Untuk pemecahan DNA digunakan prosedur yang disebut dengan metode hibridisasi. Penentuan spesies menggunakan metode 16S rRNA menghambat penentuan perbedaan variasi antar sekuen yang ada. Penentuan spesies lebih berdasarkan panjangnya sekuen yang ada, sedangkan perbedaan antar sekuen yang pendek tidak dapat dilakukan dengan baik.

Metode hibridisasi dilakukan dengan memotong sekuen yang ada dan setiap sekuen dibandingkan antara satu spesies dengan spesies lainnya, sehingga dapat diketahui sekuen mana yang tidak mempunyai perbedaan.

Kesimpulan Penelitian Tahap II

Berdasarkan hasil analisis dari identifikasi isolat yang diperoleh dari susu kambing yang difermentasi secara spontan yang meliputi pengujian identifikasi menggunakan metode 16S rRNA maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Hasil sekuensing DNA, pada isolat yang terpilih diperoleh basa yang bervariasi antara satu isolat dengan isolat lainnya. Dari sekuensing yang dilakukan isolat YN 1.1 memiliki 752 basa, YN 1.3, memiliki 1279 basa, YN 1.6 memiliki 1205 basa dan YN 1.8 memiliki 1662 basa.
2. Hasil identifikasi menggunakan metode 16S rRNA dan pengujian menggunakan silsilah filogeni maka diketahui bahwa isolat yang di peroleh sebagai bakteri proteolitik termasuk kedalam spesies dari *L. plantarum*.
3. Silsilah filogeni yang dihasilkan menunjukkan bahwa BAL dari isolat YN 1.3, YN 1.6, YN 1.8 dan YN 2.25 merupakan BAL yang mempunyai kekerabatan yang dekat dengan bakteri *L. plantarum* strain IMAU 70010. Sedangkan *L. plantarum* YN 1.1, berkerabat dekat dengan *L. plantarum arizonensis* strain NRRL B-14768 dan *L. plantarum* sub-sp. *plantarum* strain DPC2159.



5.3. Penelitian Tahap III.

Judul : Kemampuan isolat terpilih sebagai BAL probiotik

Isolat proteolitik yang telah diketahui spesiesnya berdasarkan analisis molekuler maupun dengan metode konvensional maka dilanjutkan uji untuk mengetahui kemampuan probiotik isolat terpilih. Isolat yang digunakan hanya yang mempunyai kemampuan proteolitik terbesar diantaranya isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6. Kualitas probiotik dari isolat BAL yang diperoleh penting untuk diketahui dalam rangka menghasilkan produk fermentasi yang mempunyai nilai positif bagi kesehatan. Kemampuan probiotik isolat ditetapkan melalui uji kemampuan ketahanan isolat terhadap anti-biotik, aktivitas anti-bakteri terhadap patogen enterik dan kemampuan isolat untuk dapat tumbuh pada media "Bile salt" dan pH rendah (3,0).

5.3.1. Uji ketahanan isolat BAL terhadap antibiotik.

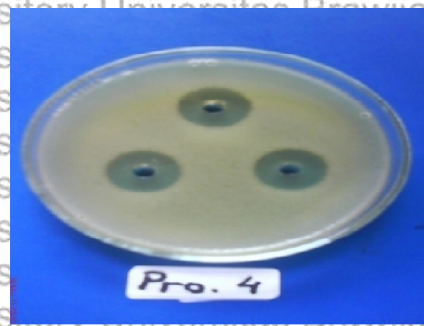
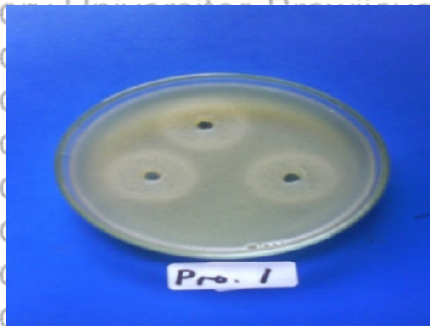
Kemampuan isolat sebagai probiotik dilakukan dengan melihat ketahanan isolat terhadap anti-biotik. Anti-biotik yang digunakan sebagai indikator pada tahap penelitian ini antara lain anti-biotik ampisilin, kloramfenikol, dan rifampisin. Rifampisin diketahui merupakan antibiotik yang mempunyai aktivitas menghambat terhadap pembentukan dinding sel. Sedangkan kloramphenikol menghambat sintesis protein pada sub-unit 50S ribosom. Franklin dan Snow, 1981; Kucers dan Bennett, 1987, menyatakan bahwa tetrasiklin mempunyai aktivitas menghambat sintesis protein pada sub-unit 30S pada ribosom. Rifampin aktif menghambat sintesis DNA, dan elkosin termasuk golongan sulfanamid yang mampu menghambat metabolisme asam folat pada membran sitoplasma

Uji ketahanan terhadap anti-biotik menggunakan metode difusi agar dengan teknik sumuran. Penghambatan terhadap pertumbuhan isolat yang diuji dinyatakan sebagai penghambatan minimum yang ditandai oleh terbentuknya zona jernih



disekitar sumuran yang diberi antibiotik pada konsentrasi tertentu. Bakteri yang diuji diinokulasikan pada media agar adalah sebanyak 10^5 cfu/ml, sedangkan jumlah antibiotik yang dimasukkan dalam sumuran dengan konsentrasi 50 ppm dan 20 ppm.

Konsentrasi antibiotik untuk menghambat pertumbuhan isolat dapat dilihat pada Gambar 5.11.



Gambar 5.11. Penghambatan kloramfenikol terhadap *L. plantarum* isolat YN 1.1 pada konsentrasi 50 ppm (A) dan *L. plantarum* isolat YN 1.3 pada konsentrasi 50 ppm (B).

Berdasarkan hasil analisis dapat diketahui bahwa bakteri *L. plantarum* isolat YN 1.1 merupakan BAL yang tahan terhadap anti-biotik kloramfenikol pada konsentrasi 50 ppm, dengan ditandai tidak terbentuknya zona jernih pada koloni isolat yang diberi antibiotik kloramfenikol. Selanjutnya uji terhadap bakteri *L. plantarum* isolat YN 1.3, yang diberi kloramfenikol berbeda dengan isolat *L. plantarum* YN 1.1 yang dapat dihambat oleh anti-biotik kloramfenikol, yang ditandai oleh timbulnya zona jernih disekitar koloni yang sumurannya diisi kloramfenikol. Berdasarkan data yang diperoleh dapat diketahui bahwa tidak semua bakteri asam laktat dapat dihambat oleh anti-biotik. Kemampuan penghambatan antibiotik terhadap bakteri asam laktat dapat dilihat pada Tabel 5.6.



Tabel.5.6. Penghambatan isolat bakteri asam laktat oleh beberapa jenis anti-biotik pada kosentrasi 50 ppm

BAL	Zona penghambatan (mm)		
	Rifampisin	klorampenikol	Ampisilin
<i>L. plantarum</i> isolat YN 1.1	22 ± 1,15	- *	23 ± 0,57
<i>L. plantarum</i> isolat YN 1.3	19 ± 0,00	-	23 ± 0,0
<i>L. plantarum</i> isolat YN 1.6	17 ± 0,57	-	17 ± 0,0

*) Tidak Aktif

Tabel 5.6. menunjukkan bahwa ketiga anti-biotik yang digunakan mempunyai kemampuan berbeda-beda dalam menghambat pertumbuhan isolat BAL hasil isolasi dari fermentasi spontan susu kambing. Rimpafisin dan ampisilin mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan BAL *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6. Secara keseluruhan dapat diketahui bahwa klorampenikol tidak dapat mengambat pertumbuhan semua isolat yang uji pada konsentrasi 20 ppm tetapi mempunyai kemampuan penghambatan pada kosentrasi yang lebih tinggi yaitu 50 ppm.

5.3.2. Uji BAL terhadap bakteri patogen dan pembusuk.

5.3.2.1. Uji aktivitas anti-bakteri oleh supernatan asam.

Uji BAL terpilih terhadap bakteri patogen dan pembusuk dilakukan dengan dua cara yakni uji aktivitas anti-bakteri oleh supernatan asam dari isolat terpilih dan aktivitas anti-bakteri oleh supernatan netral dari isolat. Aktivitas anti-bakteri supernatan asam dilakukan tanpa penetralan cairan kultur yang dihasilkan setelah fermentasi selama 24 jam. Kultur sel hasil fermetasi, disentrifugasi dengan kecepatan 30.000 rpm selama 15 menit dan supernatan disaring menggunakan kertas saring ukuran pori 0,45 µm, selanjutnya filtrat yang dihasilkan digunakan untuk pengujian aktivitas anti-bakteri. Bakteri indikator yang digunakan sebagai bakteri uji antara lain *S. thypimurium* strain FNCC 0050, *E. coli* strain FNCC 0091, *S. aureus* strain FNCC 0047, *L. monocytogenes* strain FNCC 0156 dan *B. cereus*



strain FNCC 0057. Hasil pengujian yang dilakukan diukur dalam bentuk diameter zona jernih pada media TSA (*Trypticase Soy Agar*) dan hasil uji aktivitas anti-bakteri supernatan asam dapat dilihat pada Tabel 5.7.

Data Tabel 5.7 memperlihatkan bahwa hampir semua isolat *L. plantarum* baik YN 1.1, YN 1.3 maupun YN 1.6 yang digunakan mempunyai kemampuan penghambatan terhadap bakteri indikator yang digunakan, kecuali isolat *L. plantarum* YN 1.1 tidak mempunyai kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *L. monocytogenes* FNCC 0156. Isolat *L. acidophilus* strain FNCC 050, yang digunakan sebagai bakteri kontrol, juga tidak mempunyai sifat antagonistik terhadap bakteri *L. monocytogenes* FNCC 0156.

Table 5.7. Diameter zona penghambatan (mm) *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN.1.3 dan YN1.6 terhadap *E. coli*, *S. thyphimurium*, *B. cereus*, *S. aureus* dan *L. monocytogenes*.

BAL	Diameter zona penghambatan (mm)				
	<i>E. coli</i>	<i>S. thyphimurium</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
<i>L. acidophilus</i> *)	5,0 ± 0,57	10,0 ± 0,57	7,67 ± 0,50	TA**	17,33 ± 0,28
<i>L. plantarum</i> isolat YN1.1	4,70 ± 0,0	14,30 ± 0,57	14,00 ± 0,57	TA**	16,00 ± 0,28
<i>L. plantarum</i> isolat YN 1.3	5,30 ± 0,57	1,30 ± 0,57	15,67 ± 0,57	6,00 ± 0,57	22,70 ± 0,50
<i>L. plantarum</i> isolat YN 1.6	5,30 ± 0,57	13,00 ± 0,57	15,33 ± 0,57	5,00 ± 0,57	17,33 ± 0,28

*) *L. acidophilus* (kontrol)

**) TA : tidak aktif

Zona penghambatan *L. plantarum* isolat YN.1.3 terhadap *S. aureus* dan *B. cereus* lebih besar dibandingkan dengan kemampuan penghambatan terhadap *E. coli* dan *S. typhimurium*. Demikian juga halnya aktivitas anti-mikrobia dari *L. plantarum* isolat YN 1.6, terhadap bakteri indikator *S. aureus* juga memperlihatkan penghambatan yang lebih besar dibandingkan dengan penghambatan terhadap *S. typhimurium*, *E. coli* dan *L. monocytogenes*.

Selanjutnya kemampuan penghambatan *L. plantarum* isolat YN 1.1 lebih rendah



dibandingkan dengan *L. plantarum* isolat YN 1.3 dan YN 1.6 terhadap *E. coli*, *S. thypimurium*, *B. cereus*, *S. aureus* dan *L. monocytogenes*.

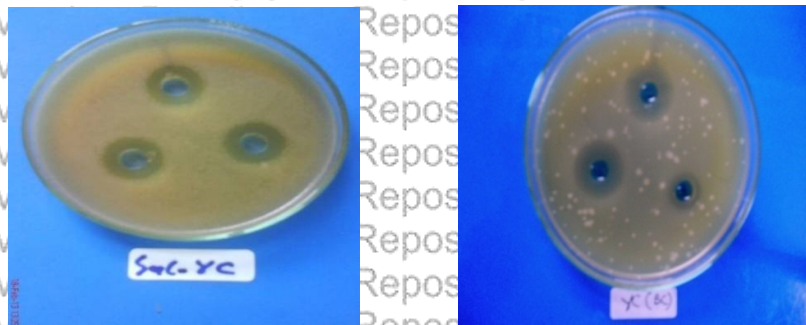
Kemampuan aktivitas antimikrobia dari kultur asam isolat *L. plantarum* terhadap bakteri indikator pada Tabel 5.7 diketahui bahwa *L. plantarum* isolat YN 1.1, *L. plantarum* isolat YN.1.3 dan *L. plantarum* isolat YN 1.6, merupakan BAL dengan spesies yang sama namun aktivitas anti-bakteri yang di hasilkan berbeda antara satu isolat bakteri dengan isolat bakteri lainnya. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan asam organik yang dihasilkannya, seperti konsentrasi asam asetat, asam laktat, asam suksinat dan butirrat, serta kemungkinan juga berbeda kandungan hidrogen peroxida yang dihasilkan. Konsentrasi asam-asam organik yang berbeda yang dihasilkan masing-masing isolat yang digunakan kemungkinan dapat mempengaruhi kemampuan daya hambat spesies *L. plantarum* yang di uji terhadap bakteri indikator yang digunakan.

Menurut Noordiana, *et al.* (2013) bahwa bakteri asam laktat mempunyai kemampuan penghambatan yang besar terhadap banyak spesies mikrobia, termasuk bakteri patogen dan bakteri pembusuk. Hal ini disebabkan oleh keberadaan asam organik, hidrogen peroksida, diasetil, dan enzim penghambat serta *bacteriocin* yang dihasilkan. Ray *et al.*, (1992) mencatat kemampuan aktivitas anti-bakteri dari bakteri asam laktat didasari pada kemampuan penghambatan oleh asam laktat terhadap bakteri lainnya. Asam laktat menghambat mikrobia dalam skala yang luas dan masuk kedalam sel dalam bentuk belum terdisosiasi dan setelah masuk kedalam sel maka asam akan terdisosiasi di dalam sel, akibatnya adalah sitoplasma bersifat sangat asam, sehingga mengakibatkan proton akan tertekan dan keluar dari dalam sel, mengakibatkan terganggunya transport nutrisi kedalam sel, dan sel akan mengalami kematian. Selanjutnya Servin (2004) mencatat bahwa aktivitas anti-bakteri dari BAL memiliki bermacam-macam mekanisme seperti melalui mekanisme dihasilkannya H_2O_2 terbentuknya metabolit



seperti dihasilkannya senyawa anti-mikrobia antara lain, asam laktat, asam asetat, propionat dan senyawa anti-mikrobia lainnya seperti halnya bakteriosin dan non-molekul bakteriosin.

Berdasarkan karakterisasi sifat Gram isolat bakteri asam laktat yang digunakan sebagai bakteri uji dapat dimaklumi bahwa *L. plantarum* isolat YN.1.3, *L. plantarum* isolat YN 1.6 dan *L. plantarum* isolat YN 1.1. mempunyai kemampuan penghambatan yang lebih besar pada bakteri yang bersifat Gram positif seperti halnya *S. aureus* dan *B. cereus* dibandingkan dengan bakteri yang bersifat Gram Negatif seperti halnya *S. typhimurium* dan *E. coli*. Penghambatan dari *L. plantarum* terhadap bakteri uji dapat dilihat pada Gambar 5.12.



(a)

(b)

Gambar 5.12. Penghambatan *L. plantarum* isolat YN 1.3, terhadap *S. typhimurium* (a) dan penghambatan *L. plantarum* isolat YN1.1 terhadap *B. cereus* (b).

Ogunbanwo *et al.*, (2003) mencatat bahwa *L. plantarum* F1 mempunyai kemampuan penghambatan terhadap bakteri Gram positif seperti *B. cereus* strain ATCC 9634 dengan diameter zona jernih ± 10 mm *S. aureus* strain ATCC 14458 dengan diameter zona jernih ± 8 mm dan terhadap bakteri Gram negatif seperti bakteri *S. typhimurium* dengan diameter zona jernih ± 6 mm tetapi tidak mempunyai daya hambat terhadap *L. monocytogenes* strain CHRL 587.

Selanjutnya Liasi *et al.*, (2009) mencatat bahwa *L. plantarum* strain LA 22 yang diisolasi dari ikan budu fermentasi memperlihatkan aktivitas anti-bakteri terhadap



bakteri patogen *S. enteritica* dan *S. aureus* dengan besar diameter zona hambatan antara 15 -18 mm dan terhadap bakteri *E. coli* besar diameter penghambatannya antara 10-14 mm tetapi sedikit lebih rendah kemampuan penghambatannya pada bakteri *L.monocytogenes* dengan diameter zona jernih sebesar 6-9 mm.

Tambekar *et al.*, (2010) juga mencatat bahwa *L. plantarum* strain G.7 yang diisolasi dari susu kambing mempunyai kemampuan penghambatan terhadap *S.typhimurium* dengan zona hambat sebesar \pm 25 mm dan terhadap *E. coli* diameter zona hambatnya sebesar \pm 19 mm. Hasil penelitian Tambekar *et al.*, (2009) menunjukkan sedikit lebih besar dibandingkan dengan *L. plantarum* hasil fermentasi spontan susu kambing pada penelitian yang saat ini dilakukan. Sedangkan Buntin *et al.*, (2008) mencatat bahwa *L. pentaceus* mempunyai kemampuan penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri patogen *S. aureus*, *Salmonella sp* dan *E. coli*.

5.3.2.2. Aktivitas anti-mikrobia isolat pada kultur supernatan netral

Kemampuan antibakteri dari *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN.1.3 dan YN 1.6 menggunakan supernatan netral yang bebas sel masing-masing isolat juga diukur. Kultur sel setiap isolat yang sudah ditumbuhkan selama 24 jam, disentrifugasi dan disaring selanjutnya dinetralkan menggunakan NaOH 0,1 N, sampai mencapai pH 7. Hasil uji yang dilakukan memperlihatkan bahwa kemampuan penghambatan dari supernatan netral yang bebas sel pada setiap isolat memperlihatkan kemampuan yang berbeda dalam menghambat bakteri uji yang digunakan. Kemampuan supernatan netral yang digunakan daya hambatnya terhadap bakteri indikator sangat berbeda dengan kemampuan kultur asam dari isolat yang tidak dinetralkan.

Hasil uji pada bakteri indikator memperlihatkan, bahwa supernatan netral yang bebas sel untuk setiap *L. plantarum* yang digunakan hanya mempunyai



daya hambat pada bakteri uji *S. thiphymurium* dan *S. aureus*, sedangkan bakteri *E. coli*, *L. monocytogenes* dan *B. cereus* tidak dihambat. Kemampuan penghambatan dari kultur supernatan netral bebas sel dapat dilihat pada Tabel 5.8.

Table 5.8. Diameter zona penghambatan (mm) supernatant netral isolat *L. plantarum* terhadap bakteri indikator.

Isolat BAL	Diameter zona penghambatan (mm)				
	<i>E.Coli</i>	<i>S. thiphymurium</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
<i>L. acidophilus</i> *	TA **)	5,0 ± 0,57	TA	TA	18,0 ± 0,57
<i>L. plantarum</i> isolat YN1.1	TA	TA	TA	TA	11,0 ± 0,00
<i>L. plantarum</i> isolat YN 1.3	TA	8,6 ± 0,57	TA	TA	6,0 ± 0,57
<i>L. plantarum</i> isolat YN 1.6	TA	6,0 ± 0,57	TA	TA	18,3 ± 0,28

*) *L. acidophilus* (kontrol), **) TA : Tidak aktif

Tabel 5.8 menunjukkan bahwa kemampuan penghambatan supernatan netral untuk setiap isolat bakteri asam laktat ternyata berbeda satu sama lainnya.

Kemampuan penghambatan supernatan netral *L. plantarum* isolat YN 1.3 lebih besar terhadap bakteri *S. aureus* dan *S. thiphymurium*, tetapi tidak punya kemampuan penghambatan terhadap *B. cereus* dan *L. monocitogenes*.

L. plantarum isolat YN 1.1 mempunyai penghambatan yang baik terhadap *S. aureus* tetapi tidak mempunyai kemampuan penghambatan terhadap *S. thiphymurium*, *B. cereus* dan *L. monocytogenes*. Kemampuan penghambatan

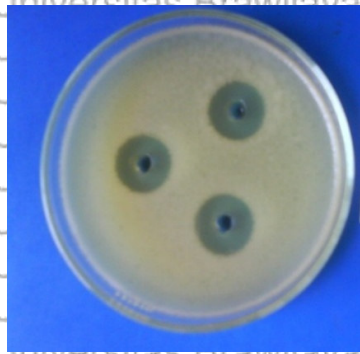
L. plantarum isolat YN 1.6 lebih besar terhadap bakteri *S. aureus*, dibandingkan penghambatan terhadap *S. thiphymurium*, tetapi tidak mempunyai kemampuan penghambatan terhadap *B. cereus* dan *L. monocytogenes*.

Kemampuan penghambatan supernatan netral dari isolat *L. plantarum* yang digunakan menandakan bahwa kultur dari isolat *L. plantarum* pada penelitian ini tidak hanya menghasilkan asam organik untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen ataupun pembusuk, tetapi juga mampu menghasilkan bakteriosin yang

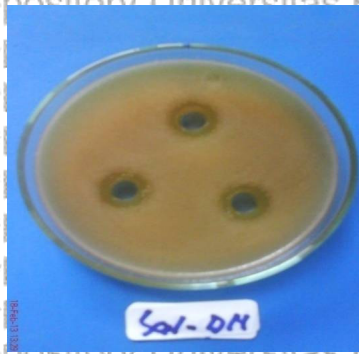


berfungsi sebagai anti-mikrobia yang dapat menghambat ataupun membunuh bakteri indikator yang digunakan. Bakteriosin dari bakteri asam laktat *L. plantarum* dikenal dengan nama *plantarisin*.

Zona penghambatan supernatant netral bebas sel dari kultur *L. plantarum* isolat YN.1.3 dapat dilihat pada Gambar 5.13



(a)



(b)

Gambar 5.13 : Zona penghambatan *L. plantarum* isolat YN.1.1 terhadap *S. aureus* (a), Zona penghambatan *L. plantarum* isolat YN.1.3 terhadap *S. thymipurium* (b)

Hasil uji sifat penghambatan atau sifat anti-bakteri hasil penelitian ini sama dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Francois *et al.*, (2013) bahwa kultur supernatant netral bebas sel dari isolat *L. plantarum* dapat menghambat beberapa spesies bakteri pembusuk yang terdapat pada makanan dan juga dapat menghambat beberapa spesies bakteri patogen. Hernandez *et al.*, (2005) juga melaporkan bahwa *L. plantarum* strain TF 711 mempunyai kemampuan penghambatan lebih besar terhadap bakteri Gram positif seperti *B. cereus*, *C. sporogenes* dan *S. aureus*, dan juga mempunyai kemampuan penghambatan terhadap bakteri Gram negatif lainnya seperti bakteri *Shigella sonnei* dan *Klebsiella pneumoniae*. Yamato *et al.*, (2003) mencatat bahwa spektrum penghambatan bakteriosin dihasilkan oleh spesies *Lactobacilli* dengan variasi sangat beragam, dan sebagian besar mempunyai kemampuan penghambatan



yang besar pada bakteri yang mempunyai sifat kekerabatannya yang lebih dekat atau yang sama-sama mempunyai sifat Gram positif. Selanjutnya Zago *et al.*, (2011) juga menyatakan bahwa isolat *Lactobacillus* memperlihatkan kemampuannya dalam menghambat bakteri *Listeria* dan juga mempunyai kemampuan dalam menghambat bakteri Gram negatif. Surono (2004) menyatakan bahwa BAL selain menghasilkan asam laktat juga senyawa anti-mikrobia, yaitu suatu peptida yang disintesis dalam ribosom yang toksik bagi mikrobia lainnya dan juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri sejenis.

5.3.3. Kemampuan pertumbuhan isolat bakteri dalam “Bile salt” dan pH rendah.

Bakteri probiotik disyaratkan dapat bertahan dan membentuk koloni dalam saluran pencernaan. Untuk itu BAL probiotik yang dihasilkan pada penelitian ini diuji kemampuannya secara invitro apakah dapat hidup pada kondisi yang asam (pH rendah) dan juga dalam larutan garam empedu (“Bile salt”).

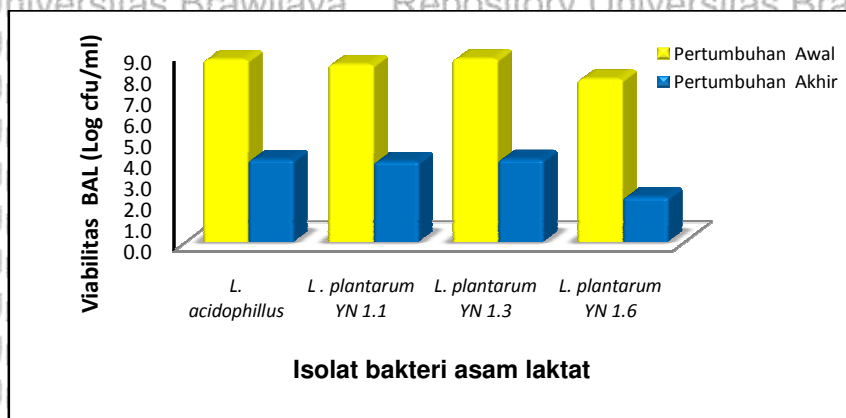
5.3.3.1. Ketahanan isolat Bakteri *L. plantarum* dalam larutan “Bile salt”

Ketahanan *L. plantarum* pada larutan “Bile salt” didasari pada kemampuan bakteri untuk dapat bertahan hidup setelah dipapar dengan larutan “Bile salt” 0,5 % selama 4 jam. Penghitungan jumlah bakteri yang hidup setelah dipapar dengan larutan “Bile” salt dengan mengurangi jumlah bakteri awal pemaparan dengan jumlah bakteri yang masih hidup setelah dipapar dengan larutan “Bile salt” selama 4 jam.

Hasil yang diperoleh memperlihatkan bahwa jumlah *L. plantarum* isolat YN 1.1. setelah pemaparan, turun sebanyak 5,01 log cfu/ml, sedangkan bakteri *L. plantarum* isolat YN.1.3 turun 4,72 log cfu/ml dan *L. plantarum* isolat YN 1.6. turun sebanyak 5,60 log cfu/ml. Berdasarkan hasil yang diperoleh memperlihatkan bahwa bakteri *L. plantarum* isolat YN 1.3, merupakan bakteri yang mempunyai



kemampuan bertahan yang lebih baik dibandingkan dengan bakteri lainnya setelah dilakukan pemaparan pada "Bile salt" 0,5% selama 4 jam. *L. plantarum* isolat YN 1.3, merupakan bakteri yang paling rendah penurunan jumlah total bakterinya setelah pemaparan pada "Bile salt" berlangsung. Kondisi demikian sama halnya dengan bakteri kontrol atau acuan *L. acidophilus* strain FNCC 0051, dimana setelah pemaparan dengan larutan "Bile salt" 0,5% maka bakteri mempunyai ketahanan cukup baik, dengan penurunan jumlah total bakteri sebesar 4,76 log cfu/ml. Jumlah total *L. plantarum* yang digunakan sebelum dan sesudah pemaparan dengan "Bile salt" dapat dilihat pada Gambar 5.14.



Gambar 5.14. Jumlah sel hidup BAL sebelum dan setelah pemaparan dalam larutan "Bile salt" 0,5%, selama 4 jam

Terjadinya penurunan total bakteri setelah pemaparan dengan 0,5% larutan "Bile salt" disebabkan oleh terjadinya lisis sel yang mengalami pemaparan. Sel bakteri secara umum tidak tahan dengan larutan "Bile salt", hal demikian mengakibatkan sel mengalami lisis dan selanjutnya terjadi kerusakan sel dan dampaknya adalah cairan sel keluar dan akhirnya sel mati. Menurut Moser dan Savage (2001) bahwa konsentrasi dari larutan "Bile salt" sebesar 0,5% adalah sama halnya dengan konsentrasi larutan biologis dalam saluran usus halus. Beberapa penelitian memperlihatkan, bahwa seluruh bakteri asam laktat yang bersifat



probiotik mempunyai kemampuan untuk bertahan hidup pada larutan "*Bile salt*" 0,5 %.

Gambar 5.14 memperlihatkan terjadi penurunan total bakteri setelah pemaparan dengan larutan "*Bile salt*" 0,5% selama 4 jam. Namun demikian isolat BAL yang digunakan pada percobaan ini meskipun terjadi penurunan total bakteri, masih ada sel bakteri *L. plantarum* yang digunakan tetap bertahan hidup setelah pemaparan dengan larutan "*Bile salt*" 0,5 %. Kemampuan bertahan hidup ataupun penurunan total bakteri yang terjadi pada setiap isolat bakteri *L. plantarum* yang digunakan setelah proses pemaparan dengan larutan "*Bile salt*" 0,5%, kondisinya tidaklah sama antara satu isolat bakteri dengan isolat bakteri lainnya. Hal ini disebabkan setiap isolat bakteri mempunyai kemampuan bertahan hidup yang berbeda-beda, tergantung kondisi dari masing-masing sel.

Kemampuan isolat bakteri probiotik dalam bertahan hidup pada saluran cerna juga merupakan satu keuntungan dalam menyeimbangkan mikrobia yang ada dalam saluran pencernaan. Belicova *et al.*, (2013) mencatat bahwa *L. plantarum* yang merupakan isolat dari *Bryndsa Cheese* (B 07, K10, K 21 dan ZS 07) mempunyai kemampuan untuk dapat tumbuh dalam larutan "*Bile salt*" 0,3%. Dari penelitian yang dilakukan untuk beberapa isolat, K10, K21 dan ZS07 memperlihatkan ketahanan yang baik terhadap pemaparan dengan larutan "*Bile salt*".

5.3.3.2. Ketahanan isolat bakteri asam laktat terhadap pH rendah.

Kemampuan untuk dapat hidup pada lingkungan pH rendah pada bakteri probiotik merupakan salah satu syarat yang harus dipenuhi. Untuk mengetahui kemampuan ketahanan isolat BAL terhadap pH rendah dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri pada media dengan konsentrasi asam tinggi atau pH rendah. Pada penelitian ini digunakan asam klorida (HCl) untuk menurunkan pH



sampai pH media mencapai 3. Kemampuan setiap isolat untuk dapat bertahan hidup dihitung dengan mengurangkan total bakteri hidup pada awal pemaparan dengan total bakteri hidup setelah pemaparan dengan pH rendah selama 4 jam.

Hasil uji pemaparan jumlah bakteri hidup pada pH rendah selama 4 jam menunjukkan bahwa total bakteri *L. plantarum* isolat YN 1.1 pada awal pertumbuhannya sebesar 8,46 log cfu/ml mengalami penurunan dan pada akhir pemaparan dengan total bakteri yang hidup adalah 1,47 log cfu/ml atau mengalami penurunan sebesar 6,99 cfu/ml. Selanjutnya kemampuan hidup *L. plantarum* isolat YN.1.3. pada awal pemaparan total bakteri hidup sebesar 8,86 log cfu/ml, tetapi setelah pemaparan pada media dengan pH rendah selama 4 jam maka total bakteri yang hidup turun menjadi 2,65 log cfu/ml atau mengalami penurunan total bakteri sebesar 6,21 log cfu/ml. bakteri yang paling besar penurunannya selama pemaparan pada pH rendah adalah *L. plantarum* isolat YN 1.6 dimana total bakteri sebelum pemaparan sebesar 8,46 log cfu/g dan setelah pemaparan dengan media pH rendah selama 4 jam tidak lagi terdeteksi bakteri yang hidup atau semua bakteri mengalami kematian. Pertumbuhan bakteri *L. acidophilus* strain FNCC 0050 yang digunakan sebagai kontrol juga mengalami penurunan sebanyak 6,21 log cfu/ml, selama proses pemaparan dengan media dengan pH yang rendah.

Ketahanan BAL terhadap pH rendah merupakan kriteria yang penting sebagai bakteri probiotik. Hal ini disebabkan karena bakteri probiotik yang dikonsumsi dan masuk dalam saluran pencernaan yang mempunyai pH sangat rendah, dimana bakteri yang tidak tahan akan pH rendah akan mengalami kematian ketika melewati saluran pencernaan. Wang *et al.*, (2010) mencatat bahwa pemaparan spesies *Lactobacillus* pada pH rendah 2,5 - 4,0 tidak mempengaruhi rata-rata pertumbuhannya, tetapi mengalami penurunan sangat besar pada pH dibawah 2,5. Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa *L. plantarum* isolat YN 1.1, dan *L. plantarum* isolat YN.1.3 merupakan bakteri yang



paling tahan terhadap pemaparan pada pH rendah dimana *L. plantarum* isolat YN 1.3 paling sedikit mengalami penurunan total bakteri setelah pemaparan dengan media pH rendah ($\pm 2,65 \log \text{ cfu/ml}$).

McDonald *et al.*, (1990) mencatat bahwa *L. plantarum* mempunyai kemampuan untuk tumbuh media dengan kadar asam yang cukup tinggi dan merupakan bakteri yang toleran terhadap media dengan kandungan asam tinggi.

Menurut Girgis *et al.*, (2003) ketahanan BAL kemungkinan disebabkan fungsi dari enzim ATP-ase yang melindungi dinding sel bagian luar dan melindungi sel bakteri selama terjadinya pemaparan dalam media dengan pH rendah. Dengan demikian

terjadi transfer proton untuk keluar dari membran sel. Selanjutnya Srinu *et al.*, (2013) mencatat bahwa *L. plantarum* strain 20 mempunyai kemampuan hidup yang baik bila ditumbuhkan pada pH rendah yakni pada pH 1,5 – 3,5. Pertumbuhan

BAL dari *L. plantarum* selama pemaparan dalam media dengan pH rendah dapat dilihat pada Gambar 5.15.

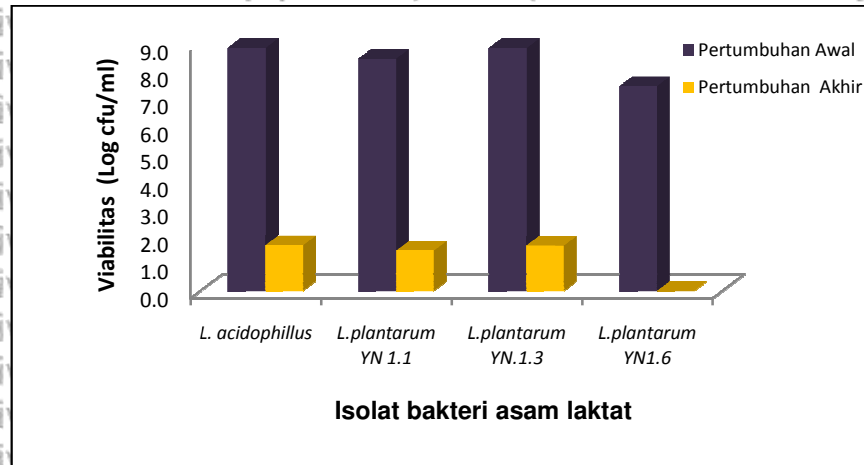
Hasil penelitian yang disajikan pada Gambar 5.15 memperlihatkan penurunan total BAL pada semua isolat *L. plantarum* yang diuji setelah pemaparan dalam media dengan pH rendah. Penurunan total BAL yang dipapar pada media

dengan pH rendah, untuk setiap isolat yang diuji memperlihatkan penurunan yang jauh lebih besar jika dibandingkan dengan isolat bakteri asam laktat yang dipapar dengan media yang mengandung larutan "Bile salt" 0,5 %.

Penurunan total BAL untuk setiap isolat *L. plantarum* yang digunakan pada uji pemaparan pada media dengan pH rendah tidak sama antara satu isolat dengan isolat lainnya

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa *L. plantarum* isolat YN 1.3 merupakan BAL yang paling tahan terhadap media dengan pH yang rendah, sedangkan *L. plantarum* isolat YN 1.6 merupakan BAL yang paling tidak tahan dan

tidak dapat bertahan hidup setelah dilakukan pemaparan dalam media dengan pH rendah.



Gambar. 5.15. Total BAL sebelum dan sesudah perlakuan pada media dengan pH rendah pH (3,0)

Mathara *et al.*, (2008) menyatakan bahwa beberapa bakteri asam laktat seperti halnya *L. plantarum* mempunyai kemampuan dan mengkolonisasi pada saluran pencernaan baik pada manusia maupun hewan. Nanasombat *et al.*, (2013) melaporkan bahwa hasil isolasi BAL sebesar 46,20%, isolat yang diperoleh mempunyai kemampuan untuk bertahan hidup pada pH rendah (pH 1,5) dalam media MRS broth dan untuk penurunan pH pada media digunakan asam klorida (HCl), agar sampai pH 1,5.

Jumlah penurunan total BAL dalam penelitian ini, setelah setiap isolat bakteri asam laktat *L. plantarum* yang digunakan dipapar dengan pH rendah, antara satu isolat dengan isolat lainnya mempunyai kemampuan bertahan hidup yang berbeda-beda. Hal ini menunjukkan bahwa resistensi setiap isolat yang digunakan berbeda antara satu dan lainnya, meskipun berasal dari satu spesies yang sama. Isolat *L. plantarum* yang tidak tahan terhadap paparan pH rendah akan mengakibatkan sel mengalami lisis dan mati. Beberapa hasil penelitian menyatakan bahwa asam yang kuat merupakan racun bagi mikroorganisme dan juga asam kuat mengganggu transportasi nutrisi dalam sel. Claire *et al.*, (2006)



menyatakan bahwa BAL yang di papar dengan pH rendah (2,0) akan mengakibatkan sel mengalami kematian, tetapi BAL yang dipapar dengan pH 3,0 dan 4,0 ternyata masih mampu hidup dan bertahan dengan kondisi tersebut. Guna mempertahankan sel dalam saluran pencernaan yang melewati cairan sel dengan pH yang rendah maka perlu suatu cara untuk dapat melindungi sel dari kematian. Salah satu cara yang dapat dilakukan yakni dengan melapisi sel BAL agar dapat terlindungi dari pengaruh pH rendah. Yoghurt misalnya adalah salah satu substrat yang dapat melapisi sel bakteri, sehingga sel dapat terlindungi dan mampu mengkolonisasi dalam saluran pencernaan.

1.3.4. Kesimpulan penelitian Tahap III.

Berdasarkan hasil analisis kemampuan isolat bakteri probiotik terpilih, yang meliputi uji ketahanan isolat terhadap anti-biotik, ketahanan isolat terhadap bakteri patogen, serta kemampuan isolat bertahan hidup pada pemaparan dengan larutan "Bile salt" dan pH rendah, maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6 tahan terhadap antibiotik klorampenikol pada konsentrasi 50 ppm, dan semua isolat yang di uji tidak tahan terhadap antibiotik rifampisin dan ampisilin.
2. *L. plantarum* isolat YN 1.1. tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *L. monocytogenes* tetapi mampu menghambat bakteri indikator lainnya, sedangkan isolat *L. plantarum* YN 1.3 dan YN 1.6 dapat menghambat *Listeria monocytogenes* dan bakteri indikator lainnya.
3. *L. plantarum* isolat YN1.1 dan YN 1.3 merupakan isolat yang mempunyai kemampuan bertahan hidup terhadap pemaparan larutan "Bile salt" dan pH rendah (3,0), sedangkan isolat *L. plantarum* isolat YN 1.6 hanya bisa bertahan terhadap pemaparan larutan "Bile salt" dan tidak bisa bertahan hidup pada pH rendah.



4. Dari keseluruhan hasil pengujian yang dilakukan disimpulkan bahwa BAL isolat *L. plantarum* YN 1.1 dan YN 1.3, bersifat probiotik dan dapat digunakan sebagai probiotik pada pangan fungsional.

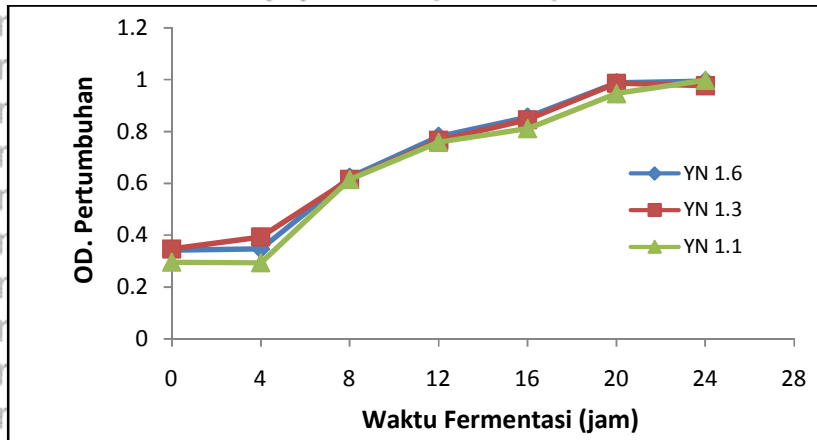
1.4. Penelitian Tahap IV

Judul Penelitian : Kemampuan isolat BAL hasil isolasi susu kambing sebagai inokulum yoghurt.

5.4.1. Kinetika pertumbuhan isolat BAL pada media MRS

Kinetika pertumbuhan isolat BAL pada penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui pola pertumbuhan isolat *L. plantarum* pada media MRS broth. Pola pertumbuhan dari isolat sangat penting untuk diketahui guna menentukan proses pertumbuhan inokulum yang akan digunakan untuk produksi inokulum sebagai starter dalam pembuatan yoghurt. Pertumbuhan biakan bakteri diukur untuk setiap isolat *L. plantarum* yang diuji pada setiap 2 jam sekali selama 24 jam. Pengukuran dilakukan dengan spektrofotometer, pada panjang gelombang 640 nm. Isolat BAL *L. plantarum* sebanyak 1% ditumbuhkan pada media MRS broth steril kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Viabilitas sel selama inkubasi dari isolat yang diuji diamati dan hasilnya, dapat dilihat pada Gambar 5.16.

Gambar 5.16 menunjukkan bahwa pada awal inkubasi sampai 4 jam terlihat bahwa semua isolat *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan *L. plantarum* isolat YN 1.6, tidak memperlihatkan peningkatan aktivitas pertumbuhan yang berarti. Semua isolat diyakini masih dalam masa adaptasi dengan lingkungan media baru. Setelah 6 jam inkubasi pertumbuhan sel bakteri mulai terjadi dan viabilitas sel mulai naik yang ditandai oleh kenaikan OD (densitas optik). Fase logaritmik atau fase pertumbuhan cepat terjadi setelah inkubasi 4 jam sampai 20 jam pada fase



Gambar 5.16. Pertumbuhan *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6 selama inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam media MRS broth.

Dan pada fase logaritmik tersebut viabilitas sel meningkat dengan sangat cepat. Setelah fase pertumbuhan cepat berakhir diikuti oleh fase tetap (*stasioner*) atau disebut juga dengan fase pertumbuhan diperlambat. Fase tetap terjadi setelah 20 jam inkubasi, dimana pada fase ini peningkatan jumlah sel tidak sebesar pada fase logaritmik. Setelah 24 jam inkubasi merupakan fase *stasioner*, dimana pertumbuhan tidak lagi mengalami peningkatan terlihat pada grafik garis mendatar.

Grafik pada Gambar 5.16 diketahui bahwa fase tetap terjadi setelah 20 jam inkubasi dilakukan. Pemanenan sel isolat untuk pembuatan inokulum sebaiknya dilakukan sebelum 20 jam inkubasi dilakukan. Analisis total bakteri asam laktat pada akhir pertumbuhan isolat *L. plantarum* dilakukan guna mengetahui pertumbuhan maksimum sel bakteri setiap isolat yang digunakan. Hasil analisis total bakteri asam laktat melalui metode TPC maka hasil perhitungan *L. plantarum* isolat YN 1.1 sebesar $1,05 \times 10^9$ cfu/ml dan pada isolat YN 1.3 sebesar $2,01 \times 10^9$ cfu/ml, sedangkan isolat YN 1.6 sebesar $1,56 \times 10^9$ cfu/ml. Total bakteri asam laktat yang dihasilkan ketiga isolat yang digunakan memperlihatkan bahwa pertumbuhan yang hampir bersamaan antara satu isolat dengan isolat lainnya,



tetapi dapat dilihat bahwa *L. plantarum* isolat YN 1.3, menghasilkan total bakteri lebih besar dibandingkan dengan *L. plantarum* isolat YN 1.1 dan *L. plantarum* isolat YN 1.6.

Pola pertumbuhan selama inkubasi 24 jam untuk semua isolat yang diuji dengan media MRS broth dapat diketahui bahwa *L. plantarum* isolat YN 1.6 mempunyai pertumbuhan optimal pada masa inkubasi 20 jam, kemudian turun pada fase berikutnya. Sedangkan pola pertumbuhan *L. plantarum* isolat YN 1.3 dan *L. plantarum* isolat YN 1.1, fase tetap terjadi setelah 24 jam inkubasi dilakukan, dan setelah fase tetap dilampui maka jumlah total bakteri mengalami penurunan.

Dilihat dari total bakteri asam laktat pada akhir pertumbuhan dapat diketahui bahwa hampir tidak ada perbedaan total BAL yang dihasilkan karena semua isolat menghasilkan total bakteri asam laktat pada jumlah $\pm 10^9$ cfu/ml, masih dalam angka log yang sama.

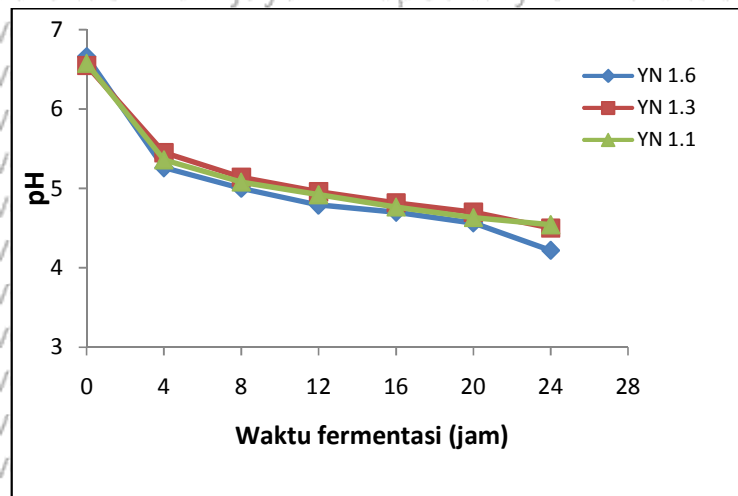
5.4.2. Perubahan pH media MRS broth selama pertumbuhan *L. plantarum*.

Hasil perubahan pH pada media yang digunakan selama proses pertumbuhan *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6 dapat dilihat pada Gambar 5.17. Selama proses pertumbuhan bakteri asam laktat, terjadi perubahan pH pada media MRS yang digunakan. pH media mengalami penurunan selama inkubasi berlangsung.

Pola penurunan pH untuk setiap isolat yang diuji memperlihatkan kecenderungan yang hampir sama, sejalan dengan bertambahnya waktu inkubasi dan pertumbuhan sel. Dengan demikian pH media semakin turun yang pada awal inkubasi $\pm 6,6$ menjadi $\pm 4,5$ pada akhir inkubasi. Dilihat dari penurunan pH yang terjadi pada setiap isolat *L. plantarum* yang digunakan, hampir tidak terjadi perbedaan yang signifikan dimana terlihat *L. plantarum* isolat YN 1.1 dan isolat



L. plantarum YN 1.6 penurunan pH yang terjadi hampir sama (garis grafik saling berhimpitan).



Gambar 5.17. Perubahan pH pada media selama pertumbuhan *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6.

Penurunan pH pada media MRS yang digunakan selama pertumbuhan isolat *L. plantarum* dengan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, lebih disebabkan oleh terjadinya peningkatan pertumbuhan BAL yang diikuti oleh pembentukan asam organik seperti asam laktat sebagai hasil metabolitnya. Pertumbuhan BAL isolat *L. plantarum* dalam media menggunakan karbohidrat diikuti oleh pemecahan karbohidrat menjadi gula sederhana, selanjutnya gula tersebut dimanfaatkan sel sebagai sumber energi bagi pertumbuhan sel bakteri. Asam laktat yang terbentuk serta asam-asam organik lain seperti asam asetat, piruvat dan butirir merupakan hasil akhir proses fermentasi dari karbohidrat yang menyebabkan terjadinya penurunan pH media.

Zamfir *et al.*, (2006) menyatakan bahwa BAL adalah bakteri penghasil asam laktat yang dominan dibandingkan asam organik lainnya yang menyebabkan pH lingkungan media pertumbuhan turun. Lebih jauh dikatakan bahwa peningkatan total asam dan penurunan pH selama fermentasi terdapat korelasi dengan



kenaikan populasi bakteri asam laktat. Sejalan dengan hal tersebut maka dapat diketahui bahwa bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri yang sangat unik dan potensial untuk fermentasi karbohidrat menjadi asam laktat yang berdampak pada peningkatan daya tahan produk fermentasi yang dihasilkan (Hassaine *et al.*, 2007).

5.4.3. Asam organik yang dihasilkan.

Pada akhir fermentasi, telah dilakukan analisis asam organik yang dihasilkan oleh setiap BAL isolat *L. plantarum* yang diuji. Asam organik merupakan hasil metabolisme bakteri asam laktat selama berlangsungnya fermentasi. Asam organik yang dihasilkan oleh bakteri *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6, dianalisis dengan menggunakan High Performance liquid Chromatography (HPLC). Analisis yang dilakukan meliputi penentuan jumlah asam laktat, asam asetat, propionat dan butirrat dalam media fermentasi.

Hasil dari analisis menunjukkan bahwa asam organik khususnya asam laktat merupakan asam organik yang terbesar yang dihasilkan dibandingkan dengan asam-asam organik lainnya baik pada fermentasi menggunakan *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 maupun YN 1.6. Asam organik lain yang jumlahnya cukup besar adalah asam asetat, dan selanjutnya diikuti oleh asam propionat. Asam organik yang paling sedikit dihasilkan oleh isolat *L. plantarum* selama proses fermentasi adalah asam butirrat. Jumlah asam organik yang dihasilkan setiap bakteri dapat dilihat pada Tabel 5.9.



Tabel. 5.9 Asam organik (laktat, asetat, propionat dan butirat) yang diproduksi *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6 selama fermentasi 24 jam.

Jenis isolat bakteri	Asam organik (ug/ml)			
	Laktat	Asetat	Propionat	Butirat
<i>L. plantarum</i> isolat YN 1.1	9.828,48	3.369,70	3.210,56	23,58
<i>L. plantarum</i> isolat YN 1.3	12.221,14	3.946,04	2.979,42	110,64
<i>L. plantarum</i> isolat YN 1.6	14.059,28	4.348,30	3.346,68	343,18

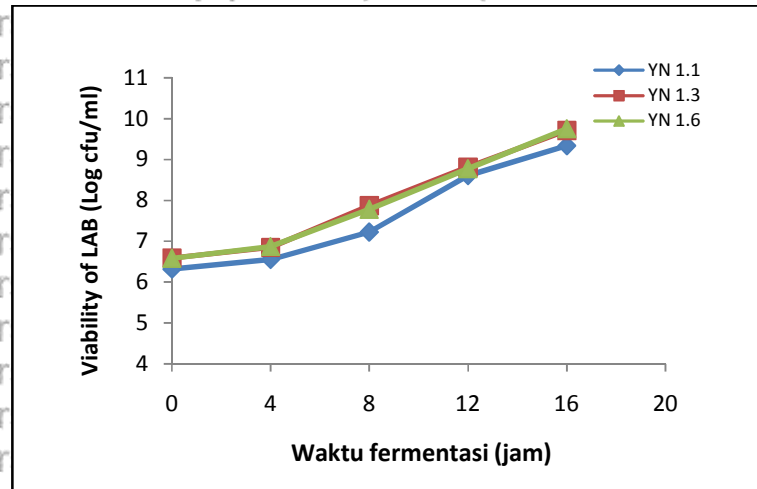
Asam organik merupakan salah satu hasil metabolisme BAL selama fermentasi berlangsung. Asam-asam organik tersebut mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen atau pembusuk, sebagai mana telah dibuktikan pada penelitian Tahap III penelitian ini.

5.4.4. Kemampuan isolat sebagai inokulum.

5.4.4.1. Viabilitas isolat probiotik pada media skim milk.

Untuk mengetahui kemampuan dari setiap isolat terpilih sebagai inokulum dalam fermentasi susu kambing maka dilakukan uji dengan cara menumbuhkan isolat pada media skim milk 8%. Media skim milk steril masing-masing diinokulasi dengan *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 16 jam. Selama fermentasi berlangsung dilakukan penghitungan viabilitas BAL untuk masing-masing isolat yang diuji. Pola viabilitas BAL yang diuji dapat dilihat pada Gambar 5.18.

Viabilitas BAL naik secara nyata setelah 4 jam fermentasi berlangsung dan pada awal fermentasi pertumbuhan BAL yang diuji (*L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6) sebesar 10^6 cfu/ml, dan naik secara nyata selama fermentasi berlangsung dan pada akhir fermentasi maka total populasi BAL untuk masing-masing isolat sebesar 10^9 cfu/ml.



Gambar 5.18. Pertumbuhan BAL selama fermentasi dengan Inokulum *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6.

Gambar 5.18. menunjukkan bahwa populasi sel BAL, tampak naik sejalan dengan bertambahnya waktu fermentasi. Akhir fermentasi dinyatakan selesai pada jam ke 16 jam, ditandai dengan terbentuknya “dadih” atau gumpalan pada media susu skim yang di fermentasi.

Total BAL dari masing-masing isolat yang diuji pada akhir fermentasi sedikit berbeda dimana viabilitas *L. plantarum* isolat YN 1.6. sebesar $7,6 \times 10^9$ cfu/ml, isolat YN 1.1. sebesar $3,4 \times 10^9$ cfu/ml sedangkan *L. plantarum* isolat YN 1.3 sebesar $7,3 \times 10^9$ cfu/ml.

Analisis statistik (Anava) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan secara signifikan ($p \leq 0,05$) terhadap viabilitas isolat BAL antara isolat yang satu dengan isolat lainnya. Kemampuan setiap isolat BAL yang diuji untuk fermentasi media susu skim secara keseluruhan, baik oleh *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6 mempunyai kemampuan dalam memfermentasi susu skim, dan total BAL yang diuji selama proses fermentasi menunjukkan terjadi kenaikan yang signifikan.

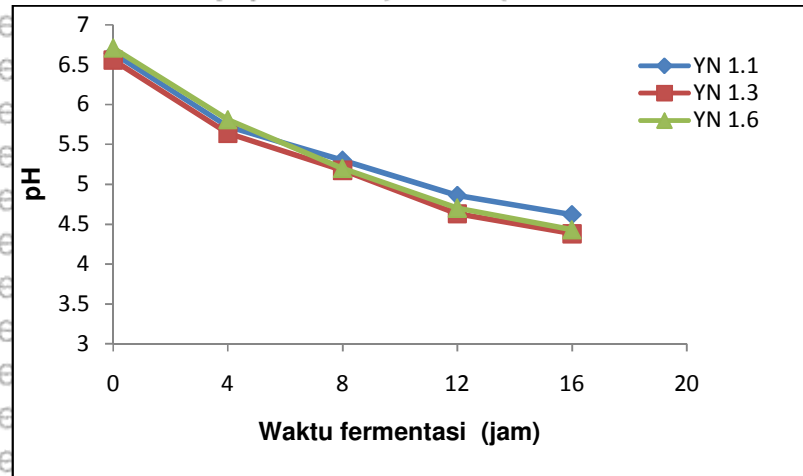


Antara *et al.*, (2002) melaporkan bahwa beberapa bakteri asam laktat selama fermentasi mengalami kenaikan secara cepat dari $1,72 \times 10^5$ menjadi $8,4 \times 10^8$ cfu/g. Parente *et al.*, (1997) mencatat bahwa BAL lazim digunakan untuk fermentasi makanan dan juga sebagai inokulum pada pengolahan susu. Selanjutnya Kok (1990) menyatakan bahwa bakteri asam laktat proteolitik sangat diperlukan untuk pertumbuhan pada media kaya protein. Kandungan asam-asam amino dalam media fermentasi sangat berpengaruh terhadap kepadatan populasi sel bakteri asam laktat. Selanjutnya Martin dan Chou (1992), mencatat bahwa inokulum BAL untuk produksi pangan fungsional harus memberikan efek atau pengaruh positif bagi kesehatan dan BAL yang hidup harus berada pada populasi antara konsentrasi 10^8 - 10^9 cfu/ml.

5.4.4.2. Perubahan pH selama fermentasi.

Kemampuan setiap isolat bakteri asam laktat dalam penurunan pH susu skim selama fermentasi dimulai sejak awal fermentasi sampai akhir fermentasi. Penurunan pH oleh setiap isolat *L. plantarum* yang diuji diukur dengan pH meter digital. Penurunan pH selama fermentasi dapat dilihat pada Gambar 5.19

Pada awal proses fermentasi nilai pH untuk setiap isolat yang diuji bervariasi antara isolat *L. plantarum* yang satu dengan isolat yang lainnya yakni antara pH 6,64 - 6,70, dan penurunan pH selama fermentasi berlangsung juga bervariasi antara 4,72 - 4,42 pada akhir fermentasi. pH media fermentasi yang menggunakan inokulum *L. plantarum* isolat YN 1.6 menunjukkan perubahan yang signifikan yakni dari 6,72 menjadi 4,42 dan pH media fermentasi dengan starter *L. plantarum* isolat YN 1.3 turun dari 6,56 menjadi 4,48 sedangkan pH media fermentasi dengan inokulum *L. plantarum* isolat YN 1.1 dari 6,65 pada awal fermentasi berubah menjadi 4,72, pada akhir fermentasi.



Gambar 5.19. Perubahan pH selama fermentasi menggunakan inokulum *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6

Analisis statistik memperlihatkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara satu isolat bakteri asam laktat *L. plantarum* yang digunakan dengan isolat bakteri asam laktat *L. plantarum* lainnya. ($p \leq 0,05$) terhadap pH media fermentasi pada akhir inkubasi dilakukan. Perubahan pH yang diperoleh beberapa penelitian menunjukkan bahwa penurunan pH terjadi selama fermentasi disebabkan oleh pemecahan glukosa dalam media fermentasi menjadi berbagai jenis asam organik seperti asam laktat, asetat, propionat dan butirat.

Seelee *et al.*, (2009) melaporkan bahwa selama fermentasi susu maka terjadi penurunan pH dan perubahan pH tersebut selalu terjadi selama fermentasi berlangsung. Piano *et al.*, (2006) juga mencatat bahwa perubahan pH berkaitan erat dengan kenaikan total populasi sel BAL selama fermentasi berlangsung.

5.4.5. Kesimpulan Penelitian Tahap IV.

Berdasarkan hasil analisis kemampuan isolat terpilih sebagai stater atau inokulum untuk fermentasi susu skim dan selanjutnya dilakukan uji viabilitas isolat, dan perubahan pH media fermentasi baik selama fermentasi dengan media MRS broth maupun media skim milk 0,8%, maka dapat disimpulkan sebagai berikut:



1. *L. plantarum* isolat YN 1.1 , YN 1.3 dan YN 1.6 secara keseluruhan mempunyai kemampuan memfermentasi susu skim 8%, atau dapat dijadikan sebagai inokulum untuk pembuatan minuman fermentasi, khususnya yoghurt susu kambing.

2. Asam organik khususnya asam laktat adalah asam organik yang paling banyak dihasilkan selama fermentasi jika dibandingkan dengan asam organik lainnya seperti asam asetat, propionat dan butirat.

3. *L. plantarum* isolat YN 1.3 dan YN 1.6 merupakan isolat *L. plantarum* yang menghasilkan asam laktat terbesar jika dibandingkan dengan *L. plantarum* isolat YN 1.1.

5.5. Penelitian Tahap V.

Judul : Karakteristik yoghurt susu kambing fungsional menggunakan Isolat *L. plantarum* .

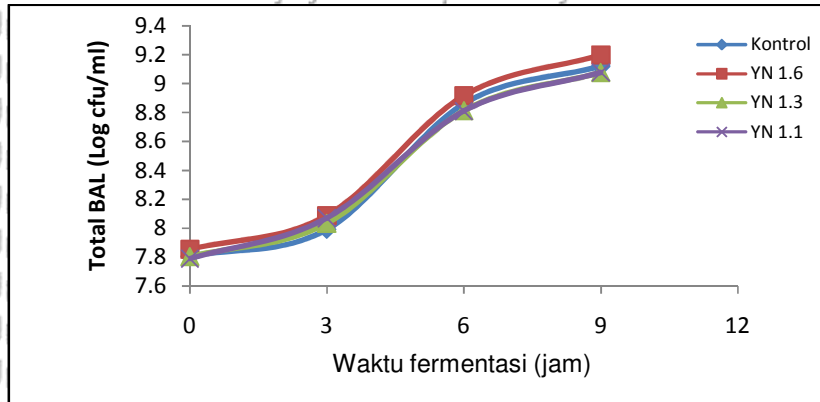
1.5.1. Viabilitas BAL selama fermentasi yoghurt susu kambing.

Pembuatan yoghurt susu kambing fungsional pada penelitian Tahap V digunakan BAL probiotik hasil isolasi dari susu kambing yang difermentasi secara spontan, dan isolat yang diperoleh digunakan sebagai inokulum probiotik. Selain inokulum probiotik, pembuatan yoghurt fungsional susu kambing juga menggunakan BAL yang lazim digunakan untuk pembuatan yoghurt, yakni spesies *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus* sebagai inokulum. Isolat probiotik yang digunakan pada penelitian Tahap V adalah isolat BAL hasil penelitian pada Tahap sebelumnya yang mempunyai kemampuan proteolitik terbaik yakni *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6.

Selama fermentasi yoghurt susu kambing, dilakukan analisis viabilitas sel BAL, dengan cara menghitung total BAL untuk setiap 3 jam fermentasi. Penentuan viabilitas sel BAL dimaksudkan untuk mengetahui bagaimana pertumbuhan sel BAL



yang digunakan dalam memfermentasi susu kambing yang diinkubasi pada suhu 37°C, selama 9 jam. Viabilitas sel BAL selama fermentasi yoghurt susu kambing dapat dilihat pada Gambar 5.20.



Gambar 5.20. Viabilitas sel BAL selama fermentasi yoghurt susu kambing pada suhu 37°C selama 9 jam.

Viabilitas sel BAL selama fermentasi yoghurt susu kambing ditentukan pada awal fermentasi dan setiap 3 jam sampai fermentasi berakhir. Hasil analisis viabilitas sel BAL menunjukkan bahwa masing-masing isolat yang diuji tidak memperlihatkan perbedaan pertumbuhan yang berarti antara isolat yang satu dengan isolat lainnya, dan pertumbuhan sel BAL relatif rendah. Setelah 3 jam fermentasi, terlihat bahwa terjadi peningkatan pertumbuhan BAL pada masing-masing isolat yang diuji. Total sel BAL kontrol yang menggunakan *L. acidophilus* berkisar $1,77 \times 10^7$ cfu/ml, sedangkan *L. plantarum* isolat YN 1.1 sebesar $1,07 \times 10^8$ cfu/ml. Total sel BAL *L. plantarum* isolat YN 1.3 dan YN 1.6 berturut-turut $1,07 \times 10^8$ cfu/ml dan $1,17 \times 10^8$ cfu/ml. Pada akhir fermentasi yoghurt susu kambing dengan bakteri probiotik *L. plantarum* isolat YN 1.6, memiliki total sel BAL sebesar $1,58 \times 10^9$ cfu/ml, dan yoghurt susu kambing dengan *L. plantarum* isolat YN 1.3 memiliki sel total BAL sekitar $1,20 \times 10^9$ cfu/ml sedangkan, yoghurt susu kambing



dengan inokulum bakteri probiotik *L. plantarum* isolat YN1.1 memiliki total sel BAL sebesar $1,29 \times 10^9$ cfu/ml, dan yoghurt kontrol dengan inokulum *L. acidophilus* sebagai bakteri probiotik memiliki total sel BAL sebesar $1,31 \times 10^9$ cfu/ml. Dengan demikian Total sel BAL yang dihasilkan oleh inokulum berbeda secara keseluruhan hampir sama, namun total sel BAL yang dihasilkan inokulum isolat *L. plantarum* YN 1.6 menghasilkan total sel BAL yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat lainnya, bahkan dengan inokulum kontrol (BAL acuan).

Dilihat dari total sel BAL pada akhir fermentasi maka secara umum yoghurt yang dihasilkan termasuk minuman fermentasi yang sangat baik dan bermutu, dimana pertumbuhan total sel BAL pada yoghurt yang dihasilkan diatas 10^6 cfu/ml, atau berkisar pada 10^9 cfu/ml, untuk setiap isolat yang diuji. Menurut Yuchuci *et al.*, (1992) bahwa minuman fermentasi dikategorikan bermutu apabila mempunyai total sel bakteri asam laktat lebih besar dari 10^6 cfu/ml, yang berarti makin banyak keberadaan bakteri asam laktat pada yoghurt yang dihasilkan maka makin baik mutu yoghurt tersebut. Vanderhoof dan Young (1998) menyatakan bahwa yoghurt yang mempunyai pengaruh terhadap kesehatan harus memiliki total sel bakteri asam laktat lebih dari 10^6 cfu/ml, terutama saat dikonsumsi.

Hasil analisis statistik tentang pengaruh penggunaan isolat probiotik dari susu kambing yang difermentasi secara spontan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata ($p \leq 0,05$) terhadap viabilitas BAL selama fermentasi dan pada akhir fermentasi yoghurt.

Hasil uji lanjut Duncan Multiple Range Test (DMRT) menunjukkan bahwa nilai rata-rata total sel BAL minuman fermentasi susu kambing dengan inokulum *L. acidophilus* (kontrol) berbeda nyata ($p \leq 0,05$) dengan inokulum *L. plantarum* isolat YN 1.6 tetapi tidak berbedanya ($p \geq 0,05$) dengan total BAL pada yoghurt susu kambing dengan inokulum *L. plantarum* isolat YN 1.1, dan YN 1.3. Data yang diperoleh menunjukkan bahwa isolat *L. plantarum* isolat YN 1.6 mempunyai



kemampuan tumbuh lebih baik pada yoghurt susu kambing dibandingkan dengan isolat lainnya. Data diatas menunjukkan bahwa isolat probiotik *L. plantarum* yang berbeda pada fermentasi susu kambing maka secara statistik menghasilkan viabilitas yang berbeda-beda pula, meskipun isolat yang digunakan sebagai inokulum masih dalam satu spesies yang sama yaitu spesies *L. plantarum*.

Secara keseluruhan dari hasil total sel BAL *L. plantarum* yang digunakan pada akhir fermentasi untuk setiap isolat, memperlihatkan bahwa semua isolat yang diuji menghasilkan total sel BAL yang memenuhi kriteria digunakan sebagai minuman fungsional dengan mutu baik. Terbukti total sel BAL yang dihasilkan lebih dari 10^6 cfu/ml seperti yang disyaratkan untuk produk fermentasi susu. Syarat yoghurt susu kambing menurut Yukuchi *et al.*, (1992) memiliki total BAL lebih besar 10^6 cfu/ml.

Sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Husain (2009) yang menyatakan bahwa total sel BAL dalam dalam yoghurt probiotik yang hidup adalah $4,04 \times 10^8$ cfu/ml dengan standar deviasi $\pm 0,93$, demikian juga menurut Diana *et al.*, (2003) bahwa viabilitas bakteri probiotik yang tinggi adalah dengan total $\pm 10^7$ cfu/ml pada produk fermentasi dan perlu diperhatikan proses produksinya termasuk pemasarannya, agar dapat dinyatakan sebagai yoghurt fungsional yang baik bagi kesehatan konsumen.

Selanjutnya Vanderhoof dan Young (1998) menyatakan bahwa secara umum yoghurt yang dapat memberikan efek positif bagi peningkatan dan pemeliharaan kesehatan jika total sel BAL probiotik yang dihasilkan lebih besar dari 10^6 cfu/ml. Hal ini mengindikasikan bahwa yoghurt susu kambing yang dihasilkan sangat menguntungkan bagi kesehatan atau merupakan pangan fungsional yang berpotensi memberikan efek positif pada kesehatan konsumen.

Peningkatan total sel BAL selama fermentasi di sebabkan oleh viabilitas BAL pada susu fermentasi, meningkat melalui perombakan laktosa menjadi asam



laktat dan juga perombakan protein menjadi asam-asam amino yang siap untuk digunakan oleh BAL sebagai sumber energi dan nutrisi untuk pertumbuhan.

Peningkatan pertumbuhan BAL oleh isolat *L. plantarum* yang digunakan selama fermentasi kemungkinan juga disebabkan oleh sifat simbiosis antar BAL yang digunakan. Kemungkinan selama fermentasi berlangsung antar strain yang ada saling membantu dalam menyediakan kebutuhan sumber energi, sehingga terjadi peningkatan total BAL pada masing-masing isolat yang digunakan sebagai inokulum.

Hasil beberapa penelitian menunjukkan bahwa *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus* saling mendukung atau bersimbiosis dalam pertumbuhannya. Hickey *et al.*, (1993) menyatakan bahwa *S. thermophilus* menghasilkan asam piruvat, format, folat dan CO₂ yang dapat menstimulir pertumbuhan *L. bulgaricus*.

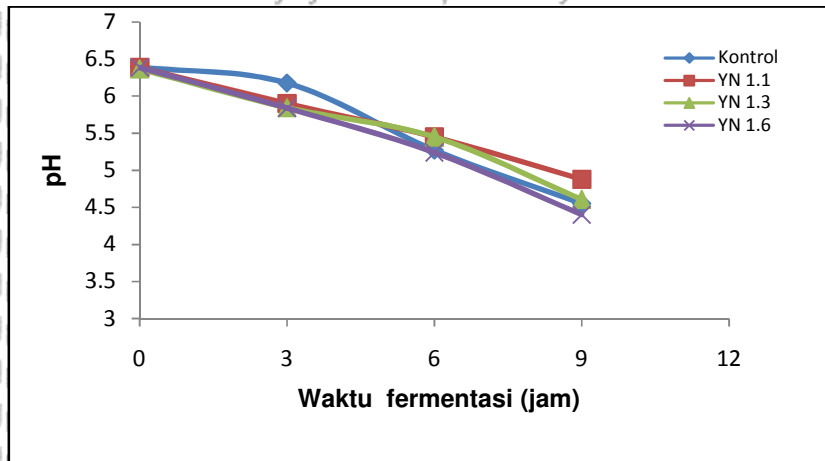
Sedangkan *L. bulgaricus* menghasilkan asam amino seperti valin dan leusin yang bermanfaat bagi pertumbuhan *S. thermophilus*. Selanjutnya Savijoki *et al.*, (2006) menyatakan bahwa pertumbuhan BAL pada produk fermentasi sangat tergantung pada sistem proteolitik yang menghidrolisis kasein susu menjadi peptida dan asam-asam amino yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri. Proteinase dinding sel dari BAL berperan penting dalam proses hidrolisis protein, yang secara bertahap memecah kasein susu.

1.5.2. Perubahan pH yoghurt susu kambing selama fermentasi.

Selama fermentasi susu kambing menggunakan inokulum *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus* serta bakteri probiotik dari isolat *L. plantarum* hasil isolasi susu kambing, menunjukkan pH media selama proses fermentasi berlangsung turun secara nyata. Penggunaan isolat *L. plantarum* yang berbeda sebagai bakteri probiotik menghasilkan pH yoghurt susu kambing berbeda-beda pula yaitu antara 6,37 - 6,39 pada awal fermentasi dan menjadi 4,55 - 4,40 pada akhir fermentasi.



Pengaruh penggunaan isolat probiotik *L. plantarum* dengan isolat yang berbeda untuk fermentasi yoghurt susu kambing terhadap perubahan pH selama fermentasi dapat dilihat pada Gambar 5.21.



Gambar 5,21. Perubahan pH selama fermentasi yoghurt susu Kambing pada suhu 37°C selama 9 jam

Perubahan pH yang terjadi, baik selama fermentasi maupun pada akhir fermentasi menunjukkan bahwa yoghurt susu kambing yang diinokulasi dengan isolat bakteri probiotik dari susu kambing bersama *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus*, menunjukkan yoghurt yang dihasilkan masuk dalam kriteria minuman fermentasi yang baik. Vedamuthu (1982) menyatakan bahwa pH minuman fermentasi dapat mencapai 4,92 - 4,41. Nilai pH terendah dari yoghurt susu kambing yang dihasilkan pada penelitian ini, dijumpai pada penggunaan probiotik *L. plantarum* isolat YN 1.6. dan YN 1.3. Sedangkan pH tertinggi dijumpai pada yoghurt susu kambing hasil fermentasi dengan inokulum *L. plantarum* isolat YN 1.1 yakni sebesar 4.58.

Berdasarkan hasil analisis statistik menunjukkan bahwa penggunaan isolat *L. plantarum* yang berbeda pada pembuatan yoghurt susu kambing memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata ($p < 0,05$) terhadap pH minuman fermentasi



yoghurt susu kambing yang dihasilkan. Hasil uji Anava juga menunjukkan adanya interaksi antara waktu fermentasi dengan ragam inokulum isolat probiotik yang digunakan. Dengan pengertian bahwa jenis inokulum dan waktu fermentasi memberikan pengaruh terhadap pH yoghurt.

Hasil uji lanjut dengan Duncan Multiple Range Test (DMRT) menunjukkan bahwa pH yoghurt susu kambing kontrol yaitu menggunakan probiotik *L. acidophilus* sebagai inokulum memberikan hasil yang berbeda nyata ($p \leq 0.05$), yaitu sedikit lebih tinggi pHnya dari yoghurt yang dihasilkan dengan menggunakan bakteri probiotik *L. plantarum* isolat YN 1.6 dan YN 1.3, dan berbeda nyata ($p \leq 0.05$) lebih rendah dari pH yoghurt yang diinokulasi dengan bakteri probiotik isolat *L. plantarum* isolat YN 1.1.

Perbedaan pH minuman yoghurt susu kambing menggunakan BAL probiotik isolat *L. plantarum* yang berbeda, menunjukkan kemampuan masing-masing isolat yang berbeda pula dalam menghasilkan asam-asam organik, baik jenis asam yang dihasilkan maupun jumlah asam yang dihasilkan. Berdasarkan hasil analisis Tahap IV pada penelitian, menunjukkan bahwa *L. plantarum* isolat YN 1.6 dan YN 1.3 mampu menghasilkan asam-asam organik (asam laktat, asam asetat, asam propionat, dan asam butirat) lebih besar dibandingkan dengan isolat *L. plantarum* isolat YN 1.1. Asam-asam organik yang dihasilkan selama fermentasi menyebabkan pH yoghurt susu kambing turun secara signifikan, baik selama fermentasi berlangsung maupun pada akhir fermentasi. Asam-asam organik yang dihasilkan selama fermentasi merupakan hasil perombakan senyawa karbohidrat sebagai media fermentasi menjadi asam-asam organik, yang selanjutnya digunakan sebagai sumber energi bagi pertumbuhan bakteri asam laktat yang digunakan.

Menurut hasil penelitian Kroger *et al.*, (1976) dan Aswal *et al.*, (2012) bahwa aktifitas BAL mampu memecah laktosa menjadi asam laktat sehingga kadar asam



laktat minuman fermentasi naik dan konsekwensinya pH yoghurt turun. Jumlah asam yang terbentuk selama inkubasi pada suhu dan waktu tertentu sangat dipengaruhi total bakteri asam laktat yang ada. BAL akan mengalami peningkatan selama fermentasi berlangsung dan mengakibatkan total asam laktat yang dihasilkan juga mengalami peningkatan. Selanjutnya menurut Rahayu *dkk* (1993), bahwa aktifitas bakteri asam laktat dalam memproduksi asam organik tidaklah sama sehingga menyebabkan kenaikan keasaman susu fermentasi dan penurunan pH media fermentasi pun juga berbeda.

Hasil penelitian yang dilakukan Tonguc *et al.*, (2013) tentang fermentasi susu kambing bahwa selama fermentasi susu kambing dengan inokulum bakteri probiotik *L. acidophilus* serta *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus* dihasilkan yoghurt dengan pH 4,2. Sebaliknya Kailapsanthy (2006) mencatat bahwa fermentasi susu kambing dengan inokulum bakteri probiotik menghasilkan yoghurt dengan pH lebih tinggi yakni 4,52. Sedangkan penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan inokulum bakteri probiotik hasil isolasi susu kambing lokal yang difermentasi secara spontan menghasilkan yoghurt dengan pH 4,55 – 4,40, dan hal ini dikategorikan sebagai yoghurt yang baik.

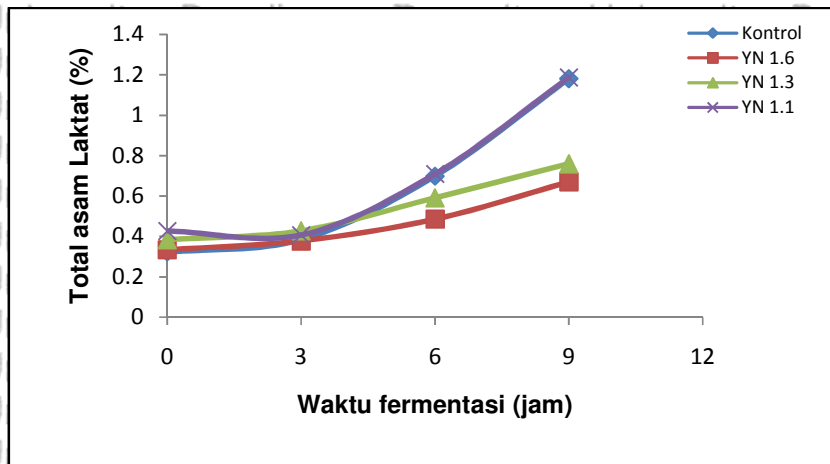
1.5.3. Total asam laktat yoghurt susu kambing

Penggunaan inokulum BAL probiotik hasil isolasi dari susu kambing lokal yang difermentasi secara spontan yakni *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6, terbukti berpengaruh nyata terhadap kandungan total asam laktat yoghurt susu kambing yang dihasilkan. (Gambar 5.22).

Data hasil analisis total asam laktat selama fermentasi yoghurt susu kambing dengan inokulum BAL probiotik *L. plantarum* yang berbeda pada suhu 37°C selama 9 jam, menunjukkan kenaikan total asam laktat selama fermentasi berlangsung. Pada awal fermentasi yoghurt susu kambing, total asam laktat



berkisar antara 0,34% - 0,37%, sedangkan pada akhir fermentasi total asam laktat yoghurt naik menjadi 0,65% - 1,18%. Yoghurt kontrol dengan inokulum BAL probiotik *L. acidophilus*, menghasilkan yoghurt dengan total asam laktat berkisar antara 0,32% - 1,18%.



Gambar 5.22. Total asam laktat selama fermentasi yoghurt susu kambing dengan inokulum isolat *L. plantarum* terpilih

Yoghurt susu kambing dengan inokulum BAL probiotik *L. plantarum* isolat YN 1.6 dihasilkan yoghurt dengan kadar asam laktat sebesar 0,32% - 1,19% dan merupakan kandungan total asam laktat yang paling tinggi. Total asam laktat yoghurt yang difermentasi dengan inokulum BAL probiotik *L. plantarum* isolat YN 1.3 dan YN 1.1 berturut-turut sebesar 0,38% - 0,76% dan 0,33% - 0,67%.

Berdasarkan hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pengaruh penggunaan inokulum BAL probiotik isolat *L. plantarum* berpengaruh nyata ($p \leq 0,05$) terhadap total asam laktat minuman fermentasi yoghurt susu kambing yang dihasilkan. Hasil uji statistik memperlihatkan hasil yang beragam antara satu perlakuan dengan perlakuan lainnya. Perbedaan kandungan total asam laktat yoghurt susu kambing lebih disebabkan oleh penggunaan isolat dengan kemampuan yang berbeda dalam memproduksi asam laktat.



Hasil Uji Lanjut Duncan Multiple Range Test (DMRT) menunjukkan bahwa total asam laktat yoghurt susu kambing kontrol dengan inokulum BAL probiotik *L. acidophilus* berbeda nyata ($p \leq 0,05$) dengan yoghurt susu kambing dengan inokulum BAL probiotik isolat *L. plantarum* isolat YN 1.3, YN 1.1, khususnya pada akhir fermentasi, tetapi tidak berbeda nyata dengan inokulum BAL probiotik *L. plantarum* isolat YN 1.6.

Total sel BAL yang dihasilkan selama fermentasi berlangsung terdapat korelasi positif dengan total asam laktat yoghurt yang dihasilkan. Tingginya viabilitas BAL selama fermentasi berlangsung menyebabkan total asam laktat yang dihasilkan cenderung naik. Kenaikan total sel BAL dapat menyebabkan peningkatan kenaikan pemecahan senyawa karbohidrat sebagai media fermentasi menjadi asam laktat dan konsekwensinya adalah total asam laktat dalam produk fermentasi naik.

Woods dan Holzapfel, (1995) menyatakan bahwa asam laktat yang dihasilkan selama fermentasi menyebabkan terjadinya penurunan pH dan menyebabkan total asam yoghurt susu kambing naik, baik selama fermentasi berlangsung maupun pada akhir fermentasi. Asam laktat merupakan hasil perombakan glukosa menjadi asam laktat melalui berbagai jalur baik jalur piruvat ataupun melalui jalur suksinat.

Selanjutnya Christensen *et al.*, (1999) menyatakan bahwa BAL proteolitik melakukan fermentasi dan membentuk senyawa citarasa khas serta mempengaruhi tekstur produk hasil fermentasinya. Peningkatan kandungan asam laktat susu fermentasi, terbukti menjadikan pH produk fermentasi turun dan mengakibatkan destabilisasi casein menjadi casein misel dan akhirnya terbentuk dadih atau penyendalan susu fermentasi (Attia *et al.*, 2001; McCann *et al.*, 2011).

Menurut Gasseem dan Tarboush (2000) bahwa aktivitas bakteri asam laktat mampu memecah laktosa menjadi asam laktat dan dengan demikian kadar asam



laktat minuman fermentasi naik dan pH dengan sendirinya turun. Oleh sebab itu keasaman minuman fermentasi sangat dipengaruhi oleh suhu dan waktu fermentasinya. Hasil penelitian Hussain *et al.*, (2009) menunjukkan bahwa total asam laktat yoghurt probiotik selama fermentasi naik dan total asam laktat yang dihasilkan setelah fermentasi pada susu kambing sebesar $\pm 1,41\%$.

Total asam laktat yoghurt susu kambing pada penelitian ini dengan menggunakan bakteri probiotik *L. plantarum* serta *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus* berkisar antara 0,67% - 1,19% setelah fermentasi, atau sedikit lebih rendah jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Hussein *et al.*, (2009). Menurut SNI No 2981 persyaratan jumlah asam laktat yoghurt berkisar antara 0,5 – 2,0 %. Pada hasil penelitian ini kadar asam laktat dari yoghurt yang dihasilkan memenuhi ketentuan SNI No 2981.

5.5.4. Kualitas kimia yoghurt susu kambing.

Kualitas kimia yoghurt susu kambing dengan inokulum BAL probiotik spesies *L. plantarum*, *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus* maka setelah fermentasi dilakukan analisis untuk mengetahui pengaruh dari masing-masing inokulum terhadap kualitas kimia, yoghurt susu kambing yang dihasilkan. Pengaruh penggunaan inokulum BAL terhadap komponen "proksimat" yoghurt susu kambing dapat dilihat pada Tabel 5.10.

Tabel. 5. 10. Kualitas kimia yoghurt susu kambing *)

Inokulum	Komponen proksimat (%)			
	Air	Abu	Lemak	Protein
<i>L. acidophilus</i>	84,42 \pm 0,416 ^{a **}	0,84 \pm 0,006	5,64 \pm 0,04	3,77 \pm 0,067 ^b
<i>L. plantarum</i> isolat YN 1.1.	83,28 \pm 0,152 ^b	0,85 \pm 0,012	5,76 \pm 0,118	3,42 \pm 0,092 ^a
<i>L. plantarum</i> isolat YN 1.3.	84,53 \pm 0,172 ^c	0,86 \pm 0,015	5,63 \pm 0,139	3,76 \pm 0,091 ^b



<i>L. plantarum</i> YN 1.6	80,85 ± 0,792 ^a	0,85 ± 0,01	5,82 ± 0,064	3,68 ± 0,026 ^b
----------------------------	----------------------------	-------------	--------------	---------------------------

Keterangan : **)Huruf yang sama dibelakang angka pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($p \leq 0,05$)

*) Hasil rata-rata dari 3 ulangan percobaan dengan 3 ulangan analisis.

5.5.4.1. Kadar Air.

Inokulum BAL probiotik *L. plantarum* YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6 serta *L. acidophilus* sebagai kontrol, pada pembuatan yoghurt susu kambing dan pengaruhnya terhadap sifat kimiawi yoghurt yang dihasilkan disajikan pada Tabel 5.10. Komposisi kimiawi yoghurt yang disajikan seperti kadar air, abu lemak dan kadar protein. Kadar air yoghurt susu kambing yang dihasilkan berkisar antara 80,85 – 84,42 % dan kadar air yang terendah dijumpai pada yoghurt yang menggunakan inokulum *L. plantarum* isolat YN 1.6 yakni 80,85 %, sedangkan kadar air yoghurt susu kambing tertinggi dihasilkan oleh yoghurt yang dibuat menggunakan inokulum *L. plantarum* isolat YN 1.3, sebesar 84,43%, sedangkan Yoghurt susu kambing menggunakan inokulum dari *L. plantarum* YN 1.1. menghasilkan kadar air sebesar 83,28%.

Hasil analisis statistik memperlihatkan bahwa penggunaan inokulum BAL probiotik yang berbeda memberikan pengaruh nyata ($p \leq 0,05$) terhadap total kadar air yoghurt susu kambing yang dihasilkan. Perbedaan kadar air yoghurt susu kambing disebabkan oleh perbedaan penggunaan inokulum dengan kemampuan yang berbeda dalam menghasilkan viabilitas, pH dan kandungan metabolit lainnya. Selain itu kecepatan fermentasi setiap inokulum dalam fermentasi juga berbeda. Oleh sebab itu inokulum yang cepat memfermentasi media cenderung menghasilkan yoghurt yang lebih berair dibandingkan inokulum yang lambat untuk fermentasi.

Tamime dan Robinson (2001) menyatakan bahwa kemampuan inokulum dalam fermentasi ternyata mempengaruhi penampilan produk fermentasi yang dihasilkan.



Hasil penelitian Ehirim dan Onyeneke (2013) mengatakah bahwa kadar air yoghurt dalam susu kambing berkisar antara 83,78 – 85,14 %, sedangkan Ahmad (1994) menyatakan bahwa kandungan air pada yoghurt berkisar antara 82 - 84%, yang berarti sedikit lebih rendah dengan yang disampaikan oleh Ehirim dan Onyeneke (2013).

5.5.4.2. Kadar abu.

Kadar abu yoghurt susu kambing berkisar antara 0,84 – 0,86 %. Kadar abu yang paling rendah dijumpai pada yoghurt kontrol yang menggunakan inokulum probiotik *L. acidophilus* yaitu sebesar 0,84%, sedangkan kadar abu tertinggi dijumpai pada yoghurt susu kambing dengan inokulum BAL probiotik *L. plantarum* isolat YN 1.3. Hasil analisis statistik memperlihatkan bahwa penggunaan inokulum BAL probiotik yang berbeda ternyata tidak berpengaruh nyata ($P \geq 0,05$) terhadap total kadar abu yoghurt susu kambing yang dihasilkan. Kandungan abu erat kaitannya dengan kandungan mineral kalsium (Ca), fosfor (P), kalium (K), magnesium (Mg), mangan (Mn) dan besi (Fe) yoghurt.

5.5.4.3. Kadar lemak.

Kadar lemak minuman fermentasi susu kambing yang dibuat dengan inokulum BAL probiotik isolat *L. plantarum* berkisar antara 5,64 – 5,82%. Kadar lemak terendah yoghurt susu kambing dijumpai pada penggunaan inokulum *L. plantarum* isolat YN 1.6 yakni sebesar 5,82 %, dan kadar lemak tertinggi dijumpai pada yoghurt susu kambing yang difermentasi dengan inokulum probiotik *L. plantarum* isolat YN 1.1, yaitu sebesar 5,76%.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa penggunaan inokulum BAL probiotik *L. plantarum* yang berbeda ternyata tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata ($p \geq 0,05$) terhadap kadar lemak yoghurt susu kambing yang dihasilkan. Kadar lemak yoghurt susu kambing sangat dipengaruhi oleh kadar



lemak susu kambing segar yang digunakan, yaitu berkisar antara 5,6 - 5,8%.

Kadar lemak susu kambing segar secara umum dipengaruhi oleh komposisi makanan yang diberikan, umur kambing, jenis dan masa laktasinya.

5.5.4.4. Protein.

Kadar protein minuman fermentasi susu kambing dengan inokulum BAL probiotik *L. plantarum* yang berbeda berkisar antara 3,68 - 3,77% dan kadar protein terendah dijumpai pada penggunaan inokulum *L. plantarum* isolat YN.1.1 yakni sebesar 3,42%. Sedangkan kadar protein tertinggi dijumpai pada yoghurt susu kambing kontrol yang menggunakan isolat *L. acidophilus* sebesar 3,77 %.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa penggunaan inokulum BAL probiotik dari *L. plantarum* yang berbeda ternyata berpengaruh nyata ($p \leq 0,05$) terhadap kadar protein yoghurt susu kambing.

Perbedaan kadar protein yoghurt yang dihasilkan, kemungkinan disebabkan perbedaan aktivitas isolat BAL yang digunakan. Viabilitas masing-masing isolat selama fermentasi sedikit mempunyai perbedaan meskipun, semua isolat menghasilkan total sel BAL yang hampir sama yaitu 10^9 cfu/ml. Namun demikian masih ada sedikit perbedaan dari total sel keseluruhan BAL yang diuji. BAL yang mempunyai biomasa sel besar tentu akan mempengaruhi total protein yang dihasilkan karena diketahui bahwa sebagian besar penyusun sel bakteri adalah senyawa protein. Dengan terjadinya kenaikan total sel BAL tentu dengan sendirinya meningkatkan jumlah atau kandungan protein dalam bahan.

5.5.5. Kualitas sensoris yoghurt susus kambing lokal

5.5.5.1. Cita- rasa yoghurt susu kambing.

Tingkat kesukaan panelis terhadap cita - rasa yoghurt susu kambing lokal yang dihasilkan dengan skor berkisar antara 2,70 - 3,13 atau agak suka sampai sangat suka. Penggunaan inokulum BAL probiotik *L. acidophilus* sebagai kontrol



memberikan skor untuk cita rasa sebesar 2,70 atau agak suka, sama dengan yoghurt yang menggunakan inokulum probiotik *L. plantarum* isolat YN 1.1. dengan skor 2,70. Penggunaan inokulum BAL probiotik *L. plantarum* isolat YN 1.3 dan YN 1.6 dihasilkan skor cita rasa sebesar 3,07 - 3,13 atau dengan cita-rasa sangat suka (Lampiran 2). Terdapatnya perbedaan skor sensoris terhadap cita-rasa yoghurt susu kambing dengan BAL isolat *L. plantarum* kemungkinan disebabkan inokulum probiotik *L. plantarum* isolat YN 1.6 dan YN 1.3 mempunyai kemampuan berbeda dalam memproduksi asam organik, baik asam laktat, asetat, propionat maupun butirir. Total asam laktat yoghurt juga berbeda-beda, dari isolat yang digunakan seperti ditunjukkan pada Tabel 5.10. *L. plantarum* isolat YN1.3 dan YN 1.6 menghasilkan asam-asam organik yang lebih besar dibandingkan dengan isolat YN 1.1. Sedangkan pada Gambar 5.22 juga dapat dilihat bahwa total asam laktat yang dihasilkan oleh inokulum *L. plantarum* juga berbeda pada setiap isolatnya.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perlakuan penggunaan inokulum probiotik *L. plantarum* dengan isolat berbeda, maka memberikan pengaruh berbeda nyata ($p \leq 0.05$) terhadap cita-rasa yoghurt yang susu kambing. Penggunaan isolat probiotik yang berbeda menghasilkan cit-rasa yoghurt yang berbeda juga. Hal ini mungkin disebabkan karena makin tinggi kadar asam laktat yang dihasilkan maka makin besar pengaruhnya terhadap pembentukan "flavor" yoghurt. Sesuai pendapat Christensen, *et al.*, (1999) menyatakan bahwa BAL proteolitik akan melakukan fermentasi dan memproduksi asam laktat dan senyawa flavor khas lainnya yang berpengaruh pada tekstur dan cita-rasa produk fermentasi. Sesuai dengan pernyataan Hussaine *et al.*, (2007) bahwa aktivitas proteolitik BAL mempengaruhi pembentukan senyawa pembentuk flavor susu fermentasi. Selanjutnya Axelsson (1998) menyatakan bahwa BAL pada produk fermentasi disebabkan oleh kemampuan hidup BAL pada kondisi keasaman tinggi atau pH rendah, dan mampu memproduksi asam laktat dalam jumlah yang relatif banyak



serta sebagai hasil utama dari metabolisme karbohidrat. Asam laktat dalam produksi fermentasi memiliki peran untuk memperpanjang masa simpan produk dan pembentukan cita-rasa khas produk fermentasi.

5.5.5.2. Aroma yoghurt susu kambing.

Tingkat kesukaan panelis terhadap aroma yoghurt susu kambing yang dihasilkan berkisar antara 2,77 - 3,10 atau dengan tingkat kesukaan agak suka – suka. Penggunaan inokulum BAL probiotik *L. plantarum* isolat YN 1.6. memberikan skor sensoris untuk aroma sebesar 3,10 sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan yoghurt kontrol dengan inokulum *L. acidophilus* dengan skor sensoris 2,83. Yoghurt susu kambing dengan inokulum probiotik *L. plantarum* isolat YN 1.3 menghasilkan skor sensoris aroma hampir sama dengan yoghurt kontrol yaitu sebesar 2,8 atau agak suka. Sedangkan yoghurt susu kambing dengan inokulum *L. plantarum* isolat YN 1.1 juga menghasilkan skor sensoris aroma yang sama dengan kontrol, yaitu sebesar 2,80 atau agak suka (Lampiran 2).

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa variasi penggunaan inokulum Probiotik *L. plantarum* yang berbeda tidak berpengaruh nyata ($p \geq 0.05$) terhadap aroma yoghurt susu kambing.

Aroma yoghurt susu kambing yang dihasilkan sangat berpengaruh terhadap kesukaan panelis dan beberapa panelis menyatakan tidak menyukai aroma yoghurt terutama yang menggunakan inokulum *L. plantarum* isolat YN 1.1. Analisis panelis menunjukkan pada yoghurt bau susu kambing masih kuat atau "goaty flavor" pasca fermentasi masih dapat dirasakan. Tamime dan Robinson (2001), menyatakan bahwa senyawa pembentuk flavor memberikan andil besar pada mutu yoghurt. Selanjutnya aroma pada yoghurt dibagi dalam empat kategori, yakni asam non-volatil (laktat dan piruvat), asam folatil (butirat dan asetat), senyawa karbonil (asetaldehid atau diasetal) dan senyawa lainnya (asam amino



atau senyawa yang terbentuk akibat pemanasan). Senyawa pembentuk flavor yang dihasilkan juga dipengaruhi oleh senyawa penyusun yoghurt. Berdasarkan pernyataan diatas jelas bahwa makin besar asam non-volatil dan asam volatil yang dihasilkan dari masing-masing inokulum maka makin berpengaruh terhadap panelis. Hasil penelitian tahap IV memperlihatkan bahwa inokulum *L. plantarum* menghasilkan asam laktat, piruvat dan asetat dan asam laktat merupakan asam organik yang paling banyak perannya dibandingkan dengan inokulum lainnya.

5.5.5.3. Warna yoghurt susu kambing.

Skor sensoris warna yoghurt susu kambing yang dihasilkan dengan inokulum *L. plantarum* yang berbeda-beda berkisar 2,97 - 3,07, atau agak suka. Tingkat kesukaan panelis terhadap warna yoghurt susu kambing menunjukkan bahwa semua panelis memberikan skor sensoris hampir sama terhadap warna yoghurt susu kambing yang dihasilkan. Data (Lampiran 2) menunjukkan bahwa yoghurt kontrol memiliki skor sensoris warna sebesar 2,97, sedangkan yoghurt susu kambing dengan inokulum *L. plantarum* isolat YN 1.6 memiliki skor sensoris warna sebesar 3,3 dan *L. plantarum* isolat YN 1.3, mempunyai skor sensoris warna sebesar 2,97 sedangkan skor sensoris warna yoghurt dengan inokulum *L. plantarum* isolat YN 1.1 sebesar 2,97, sama dengan isolat YN 1.3.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa variasi penggunaan inokulum probiotik *L. plantarum* yang berbeda ternyata tidak berpengaruh secara nyata ($p \geq 0.05$) terhadap warna yoghurt susu kambing. Warna yoghurt susu kambing secara keseluruhan adalah putih susu, dan tidak banyak mengalami perubahan jika dibandingkan dengan warna susu kambing sebelum fermentasi.

5.5.5.4. Tekstur yoghurt susu kambing.

Skor sensoris tekstur yoghurt susu kambing dengan inokulum *L. plantarum* berbeda berkisar antara 2,67 - 2,93. Tingkat kesukaan panelis terhadap tekstur



berada diantara agak suka dan suka. Semua panelis juga memberikan skor hampir sama terhadap tekstur yoghurt susu kambing yang dihasilkan. Data menunjukkan bahwa yoghurt kontrol skor sensoris tekstur adalah 2,67 sedangkan yoghurt susu kambing dengan inokulum *L. plantarum* isolat YN 1.1 dan YN 1.3, mempunyai skor sensoris tekstur sebesar berturut-turut 2,83 dan 2,93. Skor sensoris tekstur yoghurt dengan inokulum *L. plantarum* isolat YN 1.6 sebesar 2,93 atau masuk kategori suka (Lampiran 2).

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa variasi penggunaan inokulum probiotik *L. plantarum* yang berbeda, tidak berpengaruh secara nyata ($p > 0.05$) terhadap tekstur yoghurt susu kambing. Tekstur yoghurt susu kambing secara keseluruhan memang tidak begitu besar nilai sensorisnya, hal ini kemungkinan disebabkan tidak dilakukan penambahan bahan pengental maupun stabiliser pada waktu pembuatan yoghurt susu kambing, sehingga teksturnya kurang kompak.

5.5.6 Kemampuan pertumbuhan BAL probiotik yoghurt pada pH rendah dan larutan "Bile salt".

5.5.6.1 Ketahanan BAL probiotik yoghurt terhadap pH rendah.

Bakteri Probiotik yang hidup dalam yoghurt perlu diketahui kemampuannya bertahan hidup pada pH rendah, hal ini dimaksudkan untuk melihat bagaimana kemampuan isolat BAL terpilih yang digunakan dijadikan inokulum pada pembuatan yoghurt susu kambing. Hasil beberapa penelitian menunjukkan bahwa BAL probiotik *L. plantarum* mempunyai kemampuan untuk bertahan hidup pada pH rendah. Pada penelitian ini salah satu isolat *L. plantarum* yang digunakan (*L. plantarum* YN 1.6) sebelum dibuat yoghurt sel *L. plantarum* YN 1.6 tidak mampu bertahan hidup setelah dipapar dengan media dengan pH rendah (3,0). Setelah dijadikan inokulum pada pembuatan yoghurt susu kambing akan dilihat apakah semua isolat *L. plantarum* yang digunakan setelah dibuat yoghurt masih mampu



bertahan setelah dipapar pH rendah. Ketahanan dari BAL *L. plantarum* dalam yoghurt pada pH rendah (3,0) ditentukan dengan menghitung total BAL sebelum diinkubasi dan setelah diinkubasi selama 4 jam. Inokulasi yoghurt dilakukan dengan menumbuhkan bakteri yoghurt pada media MRS broth yang telah diatur pHnya sampai pH media mencapai 3,0.

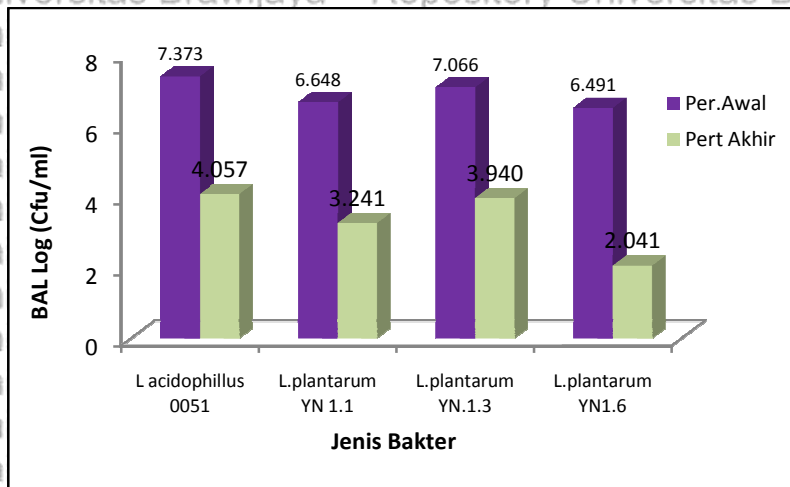
Hasil pemaparan pada media pH rendah menunjukkan bahwa yoghurt kontrol yang menggunakan isolat *L. acidophilus* pada awal pemaparan maka total BAL sebesar $2,36 \times 10^7$ cfu/ml dan setelah dipapar dengan pH rendah selama 4 Jam total sel BAL yang hidup sebesar $1,14 \times 10^4$ cfu/ml, atau mengalami penurunan 3 log siklus (Log cycle). Yoghurt yang menggunakan isolat *L. plantarum* isolat YN 1.1 awal pemaparan pada media dengan pH rendah menghasilkan total BAL sebanyak $4,45 \times 10^6$ cfu/ml dan pada akhir pemaparan turun menjadi $8,30 \times 10^2$ cfu/ml atau mengalami penurunan 4 log siklus (Log cycle). Yoghurt dengan isolat *L. plantarum* isolat YN 1.3 pada awal pemaparan menghasilkan total BAL sebanyak $8,7 \times 10^7$ cfu/ml dan pada akhir pemaparan pada media dengan pH rendah total BAL turun menjadi $3,3 \times 10^3$ cfu/ml atau mengalami penurunan 4 log siklus (Log cycle), sedangkan yoghurt yang menggunakan isolat *L. plantarum* isolat YN 1.6. awal pemaparan total BAL yang diperoleh pada media dengan pH rendah sebesar $3,0 \times 10^6$ cfu/ml dan pada akhir pemaparan turun menjadi $1,10 \times 10^2$ cfu/ml atau mengalami penurunan 4 log siklus (Log cycle).

Dilihat dari total sel BAL yang ada setelah pemaparan dalam media dengan pH rendah selama 4 jam, maka dapat diketahui bahwa isolat *L. plantarum* yang digunakan pada pembuatan yoghurt semuanya dapat bertahan hidup meskipun dalam jumlah yang relatif kecil. Hal ini menandakan bahwa yoghurt dengan bakteri probiotik *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6 mampu bertahan setelah dipapar menggunakan pH yang rendah. Ketahanan bakteri asam laktat terhadap pH rendah merupakan kriteria yang penting sebagai bakteri probiotik, hal ini



disebabkan bakteri probiotik yang dikonsumsi dan masuk ke dalam saluran pencernaan mempunyai kandungan pH yang sangat rendah, dan bakteri yang tidak tahan terhadap pH yang rendah secara umum akan mengalami kematian ketika melewati saluran pencernaan. Wang *et.al.*, (2010) mencatat bahwa paparan strain *Lactobacillus* pada pH rendah antara 2,5 – 4,0 tidak mempengaruhi rata-rata pertumbuhannya, tetapi mengalami penurunan yang sangat besar pada pH dibawah itu. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6 merupakan bakteri yang dapat bertahan hidup setelah dibuat yoghurt. Hal ini berbeda pada isolat *L. plantarum* YN 1.6 sebelum dibuat yoghurt, semua sel yang hidup tidak mampu tumbuh setelah paparan pada pH rendah, namun setelah dibuat yoghurt sel masih mampu hidup setelah paparan dengan pH yang rendah, meskipun dalam jumlah yang relatif kecil. Hasil Total BAL sebelum dan setelah paparan dapat dilihat pada Gambar 5.23.

Gambar 5.23 memperlihatkan bahwa penurunan total Bakteri Asam laktat setelah paparan tidaklah sama satu dan lainnya. Yoghurt yang menggunakan *L. plantarum* isolat YN 1.3 merupakan yoghurt yang mampu mempertahankan jumlah BAL yang ada, dan lebih tinggi jumlahnya dibandingkan dengan yoghurt menggunakan isolat yang lainnya. Sedangkan yoghurt yang menggunakan isolat *L. plantarum* isolat YN 1.6 yang sebelumnya tidak mampu bertahan terhadap paparan pH rendah setelah dibuat yoghurt maka sel bakteri masih bisa bertahan hidup. Hal ini menandakan dengan dilapisinya sel bakteri dengan pelapis seperti halnya yoghurt dapat mempengaruhi kemampuan hidup sel bakteri dalam yoghurt terhadap pengaruh pH rendah. Yoghurt yang merupakan hasil destabilisasi dari casein membentuk curd (dadih) dapat melindungi sel dari pH yang ekstrim, karena sel tidak mengalami kontak langsung dengan larutan pH.



Gambar. 5.23. Total BAL yoghurt menggunakan inokulum berbeda sebelum dan setelah terpapar pada media pH rendah (3.0).

Hasil beberapa penelitian menyebutkan bahwa dibutuhkan pengujian baik secara *invitro* maupun *invivo*, terhadap konsumsi makanan. Hal ini disebabkan karena makanan yang masuk kedalam tubuh akan sangat mempengaruhi kemampuan dari bakteri Probiotik untuk dapat hidup setelah melalui saluran pencernaan (Charteris *et al.*, 1998; Petel *et al.*, 2004). Selanjutnya Morelli (2000) menyatakan bahwa makanan yang masuk kedalam tubuh dapat melindungi bakteri Probiotik selama melewati saluran pencernaan. Sedangkan Huang dan Annan (2004) melaporkan terjadinya peningkatan yang signifikan terhadap kemampuan hidup dari bakteri probiotik pada pH 2 setelah dibuat minuman "soymilk".

5.5.6.2. Ketahanan isolat dalam larutan "Bile salt"

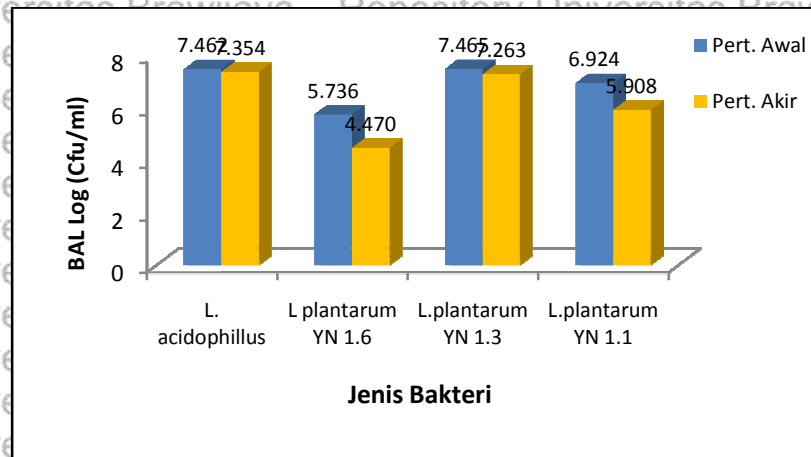


Ketahanan isolat *L. plantarum* yang digunakan sebagai bakteri probiotik terhadap larutan "Bile salt", juga ditentukan dengan menumbuhkan isolat pada media yang mengandung 0,5% "Bile salt" dan diinkubasi selama 4 jam. Hasil perhitungan dilakukan dengan mengurangi jumlah sel bakteri hidup pada awal pemaparan dengan jumlah sel bakteri hidup setelah pemaparan selama 4 jam inkubasi. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa *L. plantarum* isolat YN 1.1. pada awal pemaparan dengan larutan Bile salt 0,5%, total BAL yang hidup adalah sebesar $8,40 \times 10^6$ cfu/ml dan setelah pemaparan dengan larutan Bile salt 0,5% total BAL mengalami penurunan menjadi $6,90 \times 10^5$ cfu/ml atau mengalami penurunan 1 log siklus. *L. plantarum* isolat YN.1.3 mengalami sedikit penurunan dimana pada awal pemaparan total BAL sebesar $2,92 \times 10^7$ cfu/ml dan setelah dipapar dengan larutan "Bile salt" 0,5% total BAL berkurang menjadi $1,83 \times 10^7$ cfu/ml. Kondisi ini sama halnya dengan bakteri kontrol *L. acidophilus* FNCC 0051 dimana setelah dilakukan pemaparan dengan larutan "Bile salt" 0,5% bakteri ini mengalami sedikit turun, dimana awal pemaparan total BAL sebesar $2,90 \times 10^7$ cfu/ml dan setelah pemaparan menurun menjadi $2,26 \times 10^7$ cfu/ml. Yoghurt yang menggunakan inokulum *L. plantarum* isolat YN 1.6, juga mengalami penurunan yang tidak begitu besar jika dibandingkan dengan setelah dipapar dengan media dengan pH rendah (3,0). Pada awal pemaparan dengan larutan "Bile salt" 0,5% total BAL adalah sekitar $5,44 \times 10^5$ cfu/ml dan setelah pemaparan selama 4 jam dengan media "Bile salt" 0,5%, maka terjadi sedikit penurunan total BAL yakni menjadi $5,46 \times 10^4$ cfu/ml. Total BAL atau jumlah sel yang hidup pada yoghurt menggunakan isolat yang berbeda awal pemaparan dan sesudah pemaparan dapat dilihat pada Gambar 5.24.

Penurunan total BAL akibat pengaruh larutan 0,5 % "Bile salt", setelah dibuat yoghurt sangat berbeda sekali dibandingkan penurunan total BAL sebelum dibuat yoghurt. Tingginya kemampuan hidup dari sel pada setiap isolat yang



digunakan. Setelah dibuat yoghurt, karena sel menjadi lebih terlindungi dan tidak langsung terpapar dengan larutan "Bile salt", sehingga lebih mampu bertahan pada larutan "Bile salt".



Gambar 5.24. Jumlah total BAL yoghurt susu kambing dengan inokulum berbeda sebelum dan setelah pemaparan 0,5% "Bile salt" selama 4 jam inkubasi.

Menurut Moser and Savege (2001) konsentrasi dari larutan "Bile salt" 0,5% yang digunakan sama halnya dengan konsentrasi larutan biologis dalam saluran usus. Beberapa penelitian memperlihatkan bahwa seluruh Bakteri asam laktat yang bersifat probiotik mempunyai kemampuan untuk dapat bertahan hidup pada larutan "Bile salt", atau dalam saluran pencernaan.

Gambar 5.24 memperlihatkan bahwa meskipun terjadi penurunan total BAL setelah pemaparan menggunakan larutan "Bile salt" 0,5%, namun sel yang hidup masih cukup banyak. Dengan kondisi demikian ini diharapkan isolat yang digunakan untuk pembuatan yoghurt susu kambing dapat bertahan hidup dan mampu mengkolonisasi dalam saluran pencernaan. Kemampuan dari bakteri Probiotik dalam bertahan hidup pada saluran cerna juga merupakan satu keuntungan dalam menyeimbangkan mikroorganisme yang ada dalam saluran pencernaan. Karim-pour (2013), menyatakan bahwa BAL yang diisolasi dari produk



susu dari Iran, mempunyai kemampuan bertahan hidup pada larutan "Bile salt" dan pH yang rendah. Selanjutnya Jacobsen dan Lei (2004) dan Kalui et al (2009) melaporkan bahwa isolat hasil isolasi dari sereal yang difermentasi secara spontan, mempunyai kemampuan hidup setelah dipapar pada pH rendah dan potensial digunakan sebagai bakteri probiotik

5.5.6. Kesimpulan penelitian Tahap V

Karakterisasi yoghurt susu kambing isolat *L. plantarum* dengan uji, viabilitas BAL, pH, total asam laktat, kualitas proksimat dan sensoris dan juga sifat fungsional yoghurt maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6 secara keseluruhan mampu memfermentasi susu kambing lokal, untuk menghasilkan yoghurt, susu kambing yang baik.
2. Komponen proksimat yoghurt susu kambing dicirikan oleh kadar air, abu lemak dan protein pada kisaran nilai proksimat yang disyaratkan oleh SNI no .2981.
3. Hasil uji sensoris yoghurt susu kambing yang meliputi cita-rasa, aroma, warna dan tekstur dapat diterima oleh panelis. Namun lagi segi cita -rasa panelis lebih menyukai yoghurt yang difermentasi dengan *L. plantarum* isolat YN 1.3 dan YN 1.6.
4. Yoghurt yang menggunakan inokulum *L. plantarum* isolat YN 1.1, YN 1.3 dan YN 1.6, sebagai inokulum mempunyai kemampuan hidup setelah dipapar dengan larutan 0,5 % "Bile salt" dan pH rendah.

