

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Teknobiologi-Pangan, Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta pada bulan Mei - Desember 2013.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah autoklaf, oven, inkubator, *laminar air flow cabinet*, *Quebec colony counter*, neraca analitik, tabung reaksi, ose, pipet ukur, flow pipet, tip, mikropipet, trigalski, lampu spiritus, Erlenmeyer, gelas beker, waterbath, soxhiet, gelas pengaduk, vortex, kertas sampul, kapas, eksikator, lemari pendingin, buret, cawan porselen, refluks, alat destilasi, botol.

Bahan yang digunakan adalah medium MRS agar, MRS Broth, Nutrient Agar, akuades, alkohol, bakteri patogen enterik yakni: *E. coli*, *Salmonella typhii* dan *S. aureus* yang diperoleh dari Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM. Minuman susu fermentasi yang terdiri dari yogurt, susu asam & kefir dari berbagai merk. Minuman susu fermentasi diamati labelnya untuk mengetahui jenis bakteri yang digunakan sehingga dapat diketahui apakah minuman tersebut tergolong minuman probiotik atau tidak. Baik minuman probiotik maupun bukan probiotik diuji semuanya dan dibandingkan.

C. Teknik Sampling

Teknik sampling yang digunakan adalah purposive sampling. Pengambilan sample dilakukan dengan membeli di toko atau supermarket yang menjual minuman susu fermentasi. Berdasarkan survey yang telah dilakukan, jenis minuman susu fermentasi yang banyak dijual adalah susu asam dan yogurt. Selain itu juga dijumpai kefir. Susu asam dan yogurt terdiri dari berbagai merk dengan berbagai rasa. Semua jenis minuman susu fermentasi dari berbagai merk yang dijumpai di pasaran akan diuji daya antibakterinya terhadap tiga jenis bakteri patogen yang sering menyebabkan diare.

Pengujian juga dilakukan terhadap viabilitas bakteri asam laktat karena salah satu syarat minuman fermentasi yang baik dan dapat berguna bagi kesehatan apabila dikonsumsi mengandung bakteri asam laktat dalam keadaan hidup dengan jumlah $10^6 - 10^8$ cfu/ ml/ Parameter lain yang diamati yakni derajat keasaman susu fermentasi (pH).

D. Cara Kerja

1. Persiapan bakteri uji

Bakteri uji yang digunakan yaitu bakteri gram positif (*Staphylococcus aureus*) dan bakteri Gram negatif (*Salmonella thypii* dan *Escherichia coli*). Kultur bakteri uji diperbanyak dengan cara diambil dari kultur biakan agar miring dengan ose steril dan diinokulasikan dengan media *nutrient agar* (NA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur bakteri uji harus berumur 24 jam setiap akan digunakan. Kultur ini dibuat dengan cara mengambil 1 ose masing-masing bakteri uji dari kultur stock, kemudian

diinokulasikan ke dalam media NA pada cawan petri dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.

2. Uji antimikroba metode difusi sumuran (*disk diffusion assay*)

Uji antimikroba dilakukan terhadap bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*) dan bakteri Gram negatif (*Eschericia coli* dan *Salmonella typhii*). Sebanyak 30 µl minuman susu fermentasi yang akan diuji diteteskan pada sumuran media Nutrient Agar yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Inokulum diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengamatan terhadap aktivitas penghambatan bakteri dilakukan dengan mengukur luas daerah hambat yang terbentuk di sekitar sumuran (Pambayun dkk., 2007)

3. Pengujian viabilitas bakteri asam laktat pada sampel minum

Tiap produk minuman susu fermentasi diencerkan dengan akuades steril hingga diperoleh konsentrasi larutan 10^{-1} , sampai 10^{-6} . Sebanyak 10 ml sampel diencerkan dalam 90 ml larutan pengencer (10^{-1}), selanjutnya dari pengenceran 10^{-1} diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam larutan pengencer sebanyak 9 ml sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} dan seterusnya sampai 10^{-6} . Selanjutnya dari setiap pengenceran diambil 1 ml larutan dan dituang ke dalam petri steril, kemudian dituang medium MRS agar yang masih cair sebanyak 15 ml. Larutan dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam, Lalu diamati dan dilakukan perhitungan terhadap koloni yang terbentuk (Dave & Shah, 1997).

4. Pengukuran kadar pH

Sepuluh ml sampel ditempatkan dalam gelas beker dan diukur pH nya dengan pH meter yang telah dikalibrasi. Pengukuran dilakukan dengan

mencelupkan PH ke dalam minuman susu fermentasi sampai angka pada layar PH meter konstan (AOAC, 1990).

D. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif, meliputi jumlah total BAL yang menggambarkan viabilitas BAL, pH dan luas zona bening yang menggambarkan penghambatan pertumbuhan bakteri uji. Untuk mengetahui apakah ada hubungan antara viabilitas BAL, pH dan luas zona hambat dilakukan uji korelasi.

