

Viabilitas Bakteri Asam Laktat dan Aktivitas Antimikrobia Susu Fermentasi Terhadap *Streptococcus pyogenes*, *Vibrio cholerae* dan *Candida albicans*

Viability of Lactic Acid Bacteria and Antimicrobial Activity of Fermented Milk against *Streptococcus pyogenes*, *Vibrio cholerae* and *Candida albicans*

Rusma Yulita¹, Ekawati Purwijantiningih², Boy Rahardjo Sidharta³
 Program Studi Teknobiologi Pangan, Fakultas Teknobiologi
 Universitas Atma Jaya Yogyakarta
 lovelita21@yahoo.co.id

Abstrak

Produk susu fermentasi sudah beredar di pasaran, khususnya di Kota Yogyakarta. Susu fermentasi tersebut berpotensi sebagai pangan fungsional karena memiliki manfaat kesehatan bagi tubuh manusia dan berperan sebagai antimikrobia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui viabilitas bakteri asam laktat (BAL) dan daya antimikrobia susu fermentasi terhadap mikrobia uji. Pengujian dilakukan pada 20 sampel susu fermentasi pada 7 supermarket di Kota Yogyakarta. Berdasarkan uji viabilitas BAL, 11 sampel memenuhi konsentrasi sebagai bakteri probiotik dengan jumlah bakteri hidup minimal 10^6 CFU/ml. Pada uji antimikrobia, susu fermentasi dapat menghambat lebih tinggi pada *Vibrio cholerae* zona hambat terbesar 16,45 mm², memiliki kemampuan hambat rendah hingga tinggi pada *Streptococcus pyogenes* dengan zona hambat terbesar 8,67 mm², dan kemampuan hambat rendah pada *Candida albicans* memiliki zona hambat terbesar 1,64 mm². Semua sampel yang diuji memenuhi standar total asam laktat, tetapi hanya 4 sampel memenuhi nilai pH yang disarankan. Analisis regresi berganda berdasarkan besarnya pengaruh viabilitas BAL dan total asam laktat terhadap kemampuan menghambat mikrobia uji memberikan hasil berpengaruh besar pada *V. cholerae* (70,1%), berpengaruh sedang terhadap *S. pyogenes* (41,3%), dan berpengaruh rendah pada *C. albicans* (25,8%).

Kata kunci : Susu fermentasi, bakteri asam laktat, aktif, mikrobia patogen

Abstract

Fermented milk products have been marketed, especially in Yogyakarta city. Fermented milk potents as a functional food because it has health benefits for human body and acts as antimicrobial. This study aims to determine the viability of lactic acid bacteria (LAB) and antimicrobial effects to three pathogenic microbia. Tests were carried out on 20 samples of fermented milk of 7 supermarkets in Yogyakarta. Based on BAL viability test, 11 samples fulfilled the concentration of probiotic bacteria, number of viable bacteria at least 10^6 CFU/ml. On the antimicrobial test, commercial fermented milk showed high inhibition to *Vibrio cholerae* with inhibition zone was 16.45 mm², low to high inhibition to *Streptococcus pyogenes* with inhibition zone was 8.67 mm², and low inhibition to *Candida albicans* with inhibition zone was 1.64 mm². All samples that were tested meet the standards of total lactic acid, but there were only 4 samples that meet the recommended pH values. Multiple regression analysis was based on the level of

influence the viability of LAB and total lactic acid to inhibit pathogenic microbial, has great impact to *V. cholerae* (70.1%), moderate effect against to *S. pyogenes* (41.3%), and low impact to *C. albicans* (25.8%).

Keywords: Fermented milk, lactic acid bacteria, viable, pathogenic microbial

PENDAHULUAN

Kini, produk susu fermentasi dalam kemasan sudah banyak beredar di pasaran dengan berbagai merek dan jenis dan mudah dijumpai di pasar modern, khususnya di *supermarket* di Kota Yogyakarta. Beberapa produk susu fermentasi telah dikenal oleh masyarakat antara lain *yoghurt*, susu fermentasi berperisa, kefir, yakult, dan susu asidofilus. Mikrobial yang umum diketahui sebagai mikrobial yang aman digunakan dalam pengolahan pangan diantaranya *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum*, dan *Bifidobacterium bifidum*. Mikrobial di dalam susu fermentasi tersebut berperan aktif sebagai antimikrobial. Bakteri probiotik *Lactobacillus paracasei* dan *B. longum* memberikan efek positif dalam menghambat *Streptococcus mutans* (Parameswari dkk., 2011), dan *L. acidophilus* menghambat pertumbuhan *Salmonella thypimurium* (Antono dkk, 2012).

Manusia termasuk salah satu makhluk yang paling rentan terinfeksi mikrobial patogen seperti bakteri Gram positif *S. pyogenes* terutama menginfeksi saluran nafas dan kerongkongan sehingga menyebabkan nyeri menelan (Erywiyatno dkk., 2012). Bakteri Gram negatif *V. cholerae* yang dapat menginfeksi saluran usus dengan cara memproduksi toksin yang terikat pada mukosa usus halus (Erawati dkk., 2005), serta khamir *C. albicans* yang menyebabkan sariawan (Soemiati dan Elya, 2002). Menurut Shah (2000) untuk memberikan manfaat kesehatan, konsentrasi yang disarankan untuk bakteri probiotik adalah 10^6 CFU/ml produk atau jumlah strain probiotik yang harus dikonsumsi setiap hari sekitar 10^8 CFU/ml dengan tujuan untuk mengimbangi kemungkinan penurunan jumlah bakteri probiotik pada saat berada dalam jalur pencernaan. Akan tetapi penelitian telah menunjukkan viabilitas rendah probiotik dalam pasaran (Shah, 2000; Lourens-Hattingh dan Viljoen, 2001; Ramasenderan, 2011).

Viabilitas dan aktivitas fungsional organisme probiotik menjadi sangat penting bagi industri susu fermentasi dan akan memengaruhi mutu produknya. Dari sekian banyak produk minuman susu fermentasi yang beredar di pasaran belum diketahui pasti mengenai viabilitas bakteri asam laktatnya. Dari uraian tersebut, pengujian susu fermentasi bertujuan untuk mengetahui viabilitas BAL susu fermentasi komersial yang dipasarkan di Kota Yogyakarta dan mengetahui kemampuan susu fermentasi dalam menghambat pertumbuhan mikrobial patogen. Hasil penelitian ini diharapkan menambah informasi mengenai viabilitas BAL susu fermentasi dari berbagai merek yang dipasarkan di Kota Yogyakarta dan memberikan informasi ilmiah mengenai kemampuan antimikrobial susu fermentasi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. pyogenes*, *V. cholerae* dan *C. albicans*.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain erlenmeyer, tabung reaksi, autoklaf “My Life MA631”, petridish, ose, *laminair flow*SV 1200 SG”, mikroskop, *microwave*“Electrolux”, perforator berdiameter 6 mm, inkubator “Mommert”, vortex “Phoenix Instrument RS-VA 10”, dan pH Testr2. Bahan yang digunakan adalah susu fermentasi, kultur mikrobia murni *S. pyogenes*, *V. cholerae* dan *C. albicans* yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta, medium pertumbuhan mikrobia, larutan kimiaseperti H₂O₂ 3%, nitrat cair, kasein, dekstrosa, *phenol red*, amonium nitrat 1%, pottasium nitrat, asam sulfanilat, *Naphyl Ethylen Diamin*, reagen *Ehrlich*, cat Gram, cat nigrosin, larutan iodium, larutan NaOH 0,1 N, indikator fenolftalein, dan larutan buffer pH 7,0.

Teknik Sampling

Pengumpulan sampel dalam penelitian ini menggunakan metode *purposive sampling*(Sangadji dan Sopiah, 2010). Pemilihan sampel didasari atas pertimbangan (1) sampel susu fermentasi dijual di *supermarket* yang memiliki tempat penyimpanan produk pangan menggunakan *refrigeration cabinet*, (2) macam produk susu fermentasi berbeda satu sama lain, (3) merek susu fermentasi dengan aneka rasa dipilih sebanyak ≤ 2 sampel susu fermentasi dengan rasa yang berbeda, (4) sampel susu fermentasi yang dipilih memiliki periode waktu paling lama 1 minggu sebelum tanggal kadaluarsa, (5) lokasi *supermarket* yang strategis mudah dijangkau oleh para konsumen dan berada di Kota Yogyakarta.

Tahapan Cara Kerja

Uji Pendahuluan Kemurnian Mikrobia Uji

Uji kemurnian mikrobia uji meliputi pengamatan terhadap morfologi koloni, morfologi sel meliputi pengamatan bentuk sel, pewarnaan Gram, dan uji motilitas serta uji sifat biokimia meliputi uji fermentasi karbohidrat, uji hidrolisis pati, uji pembentukan indol dan uji katalase.

Uji Viabilitas Bakteri Asam Laktat

Susu fermentasi diencerkan dengan tingkat pengenceran 10⁻¹ hingga 10⁻⁷, untuk mengurangi jumlah mikrobia yang tersuspensi dalam cairan. Sampel susu fermentasi dari pengenceran masing-masing diambil sebanyak 1 ml (1000 μ l) lalu dituang medium MRSA sebanyak 20 ml (metode inokulasi *pour plate method*).Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam Perhitungan koloni yang tumbuh dilakukan setelah 48 jam, dihitung sesuai rumus (Anonim, 2009a):

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1n_2) \times d}$$

Keterangan :

N = jumlah mikrobia (CFU/ml)

$\sum c$ = jumlah koloni dari semua cawan yang memiliki koloni antara 25—250

n₁ = jumlah cawan pada pengenceran pertama

n₂ = jumlah cawan pada pengenceran kedua

d = pengenceran pertama yang dapat dihitung

Uji Antimikrobia Berdasarkan Zona Hambat

Uji aktivitas antimikrobia menggunakan metode difusi agar dengan sumuran terhadap mikrobia uji. Kultur mikrobia uji dari *starter* diambil sebanyak 1000 µl lalu diinokulasikan pada medium NA untuk bakteri dan medium PCA untuk khamir masing-masing sebanyak 20 ml dalam petridish yang diinokulasi secara *pour plate*. Medium yang sudah padat dilubangi menggunakan perforator berdiameter 6 mm lalu sampel susu fermentasi diambil sebanyak 50 µl dan dimasukkan pada lubang sumuran. Petridish yang telah diinokulasikan dengan mikrobia uji diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu, dilihat dan diukur zona hambat yang dihasilkan berdasarkan diameter area antimikrobia (Rostinawati, 2009).

Parameter Kimia

Parameter kimia yang diukur pada penelitian ini adalah total bakteri asam laktat yang dinyatakan sebagai persen total asam tertitrasi (%TAT) dan pH (Andrianto, 2008 ; Usmiati dkk., 2011).

Analisis Data

Data hasil pengamatan dan perhitungan di analisis secara deskriptif dan menggunakan regresi linear berganda guna mengetahui pengaruh dua variabel independen yaitu viabilitas BAL dan % TAT dengan satu variabel dependen yaitu antimikrobia (Santosa dan Ashari, 2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kemurnian Mikrobia Uji

Uji kemurnian mikrobia merupakan uji yang dilakukan pada tahap awal penelitian bertujuan untuk meyakinkan bahwa kultur mikrobia yang digunakan adalah kultur mikrobia murni. Tahapan ini meliputi pengamatan sifat morfologi dan fisiologi mikrobia uji. Hasil pengamatan dibandingkan dengan literatur mengenai identifikasi mikrobia baik bakteri maupun khamir. Hasil kemurnian mikrobia uji terhadap *S. pyogenes*, *V. cholerae* dan *C. albicans* disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Kemurnian *S. pyogenes*, *V. cholerae* dan *C. albicans*

Nama Uji	<i>S. pyogenes</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>C. albicans</i>
Morfologi koloni	Bentuk <i>mucoïd</i> , permukaan mengkilat, warna putih kekuningan	<i>Circular</i> , halus, permukaan mengkilap, berwarna keputih-putihan, tepian <i>entire</i> , elevasi <i>raised</i> , dan jernih	<i>Circular</i> , berwarna putih kekuningan
Uji motilitas	Non-motil	Motil	Non-motil
Morfologi sel	Membentuk bulat berantai	Batang sedikit melengkung	Pembentukan pseudo-miselium
Pengecatan Gram	Gram positif	Gram negatif	-
Uji katalase	Negatif	Positif	-
Fermentasi glukosa	Positif (asam)	Positif (asam)	Positif (asam dan gas)

Lanjutan Tabel 1. Hasil Uji Kemurnian *S. pyogenes*, *V. cholerae* dan *C. albicans*

Fermentasi sukrosa	Positif (asam)	Positif (asam)	Positif (asam dan gas)
Fermentasi laktosa	Positif (asam)	Positif (asam)	-
Fermentasi maltosa	-	-	Positif (asam dan gas)
Uji hidrolisis pati	Negatif (warna biru)	Positif (berwarna bening/transparan)	-
Uji pembentukan indol	Negatif	Positif	-

Keterangan : tanda - menunjukkan uji tidak dilakukan

Berdasarkan hasil uji kemurnian bakteri *S. pyogenes* dan *V. cholerae* menunjukkan bahwa bakteri yang digunakan sebagai bakteri uji terbukti murni dan memiliki sifat sesuai dengan pernyataan Breed dkk. (2005) dan uji kemurnian khamir *C. albicans* memiliki sifat yang sama dengan pernyataan Windi (2010).

Viabilitas Bakteri Asam Laktat Susu Fermentasi Komersial

Susu fermentasi yang diuji antara lain *yoghurt*, kefir, *drink yoghurt* dan susu fermentasi berperisa. Berdasarkan hasil uji viabilitas BAL sebanyak 11 sampel memenuhi konsentrasi sebagai bakteri probiotik yaitu sampel B, F, K, L, M, O, P, Q, R, S dan T. Masing-masing sampel susu fermentasi yang diuji berdasarkan kandungan BAL pada produk dan jumlah BAL yang terhitung tertera pada Tabel 2.

Tabel 2. Kultur BAL dan Viabilitas BAL Susu Fermentasi Komersial

Sampel	Kultur BAL (tertera pada kemasan)	Viabilitas BAL (CFU/ml)
A	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	$2,47 \times 10^5$
B	<i>Bacillus caucasus</i>	$1,06 \times 10^6$
C	<i>Streptococcus thermophilus</i> dan <i>L. bulgaricus</i>	$6,87 \times 10^5$
D	<i>Lactobacillus helveticus</i>	0
E	<i>L. helveticus</i>	0
F	<i>L. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , dan <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	$7,80 \times 10^6$
G	<i>L. bulgaricus</i> dan <i>L. acidophilus</i>	$4,88 \times 10^5$
H	<i>L. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium BB-12</i> , dan <i>L. acidophilus LA-5</i>	$3,53 \times 10^5$
I	<i>S. thermophilus</i> dan <i>L. bulgaricus</i>	$7,63 \times 10^3$
J	Tidak dicantumkan kultur bakteri pada kemasan	2×10
K	<i>L. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. acidophilus</i> , dan <i>Bifidobacterium lactis</i>	$3,29 \times 10^6$
L	<i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i> , dan <i>Lactobacillus casei</i>	$2,41 \times 10^7$

Lanjutan Tabel 2. Kultur BAL dan Viabilitas BAL Susu Fermentasi Komersial

M	<i>S. thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , dan <i>L. acidophilus</i>	$2,10 \times 10^7$
N	<i>L. bulgaricus</i> dan <i>L. acidophilus</i>	$1,19 \times 10^4$
O	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. acidophilus</i> , dan <i>Bifidobacterium lactis</i>	$1,01 \times 10^7$
P	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. animalis</i> , dan <i>Lactobacillus casei</i>	$6,63 \times 10^7$
Q	<i>S. thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium BB-12</i> dan <i>L. acidophilus LA-5</i>	$1,43 \times 10^6$
R	<i>S. thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , dan <i>L. acidophilus</i>	$4,37 \times 10^7$
S	<i>Lactobacillus casei shirota</i>	$9,00 \times 10^7$
T	<i>S. thermophilus</i> dan <i>L. bulgaricus</i>	$1,31 \times 10^6$

Sampel A memiliki jumlah BAL sebesar $2,74 \times 10^5$ CFU/ml menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri *L. bulgaricus* rendah. Dengan kata lain pertumbuhan BAL pada sampel A kurang optimal sebagai kultur tunggal. Kondisi medium yang kurang ideal misalnya karena keterbatasan nutrisi pada kultur tunggal selama masa inkubasi *starter yoghurt* menjadi salah satu penyebab pertumbuhan BAL rendah. Sampel F, K, dan T menggunakan bakteri *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus* memiliki sel hidup dalam susu fermentasi lebih dari 10^6 CFU/ml. Masing-masing sampel memiliki jumlah BAL sebesar $7,80 \times 10^6$ CFU/ml; $3,29 \times 10^6$ CFU/ml; dan $1,31 \times 10^6$ CFU/ml. Terdapat kemungkinan bahwa pada ketiga sampel tersebut terbentuk kondisi medium pertumbuhan yang ideal dengan terpenuhinya nutrisi yang dibutuhkan oleh bakteri tersebut (Ernawati, 2010).

Namun, sampel C dan I menggunakan kultur campuran *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus* justru memiliki jumlah sel hidup di bawah standar minimal yaitu sampel C sebesar $6,87 \times 10^5$ CFU/ml dan sampel I sebesar $7,63 \times 10^3$ CFU/ml. Sama halnya pada Sampel H meskipun menggunakan *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* dan bakteri tambahan yaitu *Bifidobacterium BB-12* dan *L. acidophilus* juga memiliki jumlah BAL di bawah standar yaitu hanya sebesar $3,53 \times 10^5$ CFU/ml. Rendahnya viabilitas BAL pada sampel tersebut kemungkinan disebabkan pertumbuhan inhibitor yakni kandungan glukosa yang tinggi pada produk (Hidayat dkk., 2013 ; Gianti dan Evanuraini, 2011). Sampel C dan I sama-sama mengandung sari buah atau perisa buah pada produknya. Kondisi substrat dengan kandungan glukosa yang berlebihan (>12%) menjadikan lingkungan terlalu pekat sehingga menyebabkan mikroorganisme mengalami plasmolisis sel yang akhirnya berakibat terhambatnya perkembangbiakan BAL (Hidayat dkk., 2013 ; Gianti dan Evanuraini, 2011).

Selain itu, suhu lingkungan juga dimungkinkan menjadi faktor penghambat pertumbuhan BAL. Menurut Surnalim dan Misgiyarta (2008) pada kondisi suhu penyimpanan rendah yang lama, kerja enzim menjadi terhambat sehingga dapat menekan laju metabolisme bakteri. Selain itu, salah satu kelemahan menggunakan kultur campuran adalah terjadinya kompetisi antarbakteri untuk memperoleh nutrisi dan adanya senyawa berbeda yang dihasilkan akan menghambat bakteri jenis lainnya yang ditumbuhkan secara bersamaan misalnya kultur genus *Lactobacillus* menghasilkan bakteriosin dan hidrogen peroksida yang dapat menurunkan sejumlah bakteri yang peka terhadap senyawa tersebut. Rybaka dan Kailasapathy (1995) juga

melaporkan bahwa keberadaan *L. bulgaricus* diketahui sebagai faktor utama yang merugikan atas angka kematian bakteri lain seperti *Bifidobacterium* sp.

Pada sampel D dan E dari hasil pengujian tidak terdapat pertumbuhan BAL. Ada kemungkinan tidak tumbuhnya BAL pada kedua sampel tersebut karena aras inokulasi *starter* yang diberikan ke dalam susu fermentasi saat proses produksi rendah (< 3% dari volume susu) sehingga pada produk akhir tidak tumbuh BAL. Sependapat dengan Prasetyo (2010) penggunaan *starter* BAL pada level 3% lebih dianjurkan karena memberikan pengaruh lebih baik terhadap karakteristik susu fermentasi. Peningkatan aras *starter* akan berpengaruh pada peningkatan jumlah bakteri asam laktat susu fermentasi. Inokulasi *starter* BAL yang sedikit akan memengaruhi jumlah BAL yang tumbuh pada produk akhir (Rattray dan O'Connell, 2011; Aritama, 2013). Sampel D dan E menggunakan kultur *starter* bakteri *L. helveticus* yang merupakan merupakan bakteri termofilik. Pada saat pembelian, kedua produk tersebut ditempatkan pada tempat penyimpanan produk pangan menggunakan *refrigeration cabinet*. Menurut Cascio (2005), bakteri *L. helveticus* tidak dapat disimpan pada suhu lebih rendah dari 20°C karena hal ini dapat menyebabkan kerusakan dan produksi bakteri kontaminan.

Faktor lain yang menyebabkan viabilitas BAL susu fermentasi rendah adalah jenis bakteri probiotik yang digunakan. Sampel G memiliki jumlah BAL $4,88 \times 10^5$ CFU/ml dan sampel N sebesar $1,19 \times 10^4$ CFU/ml. Sampel tersebut menggunakan *starter* *L. bulgaricus* dan *L. acidophilus*. Kombinasi kedua *starter* ini ternyata dapat menurunkan viabilitas BAL susu fermentasi (Siswanti, 2002). Total BAL dengan penggunaan kultur *starter* *L. acidophilus* secara tunggal memiliki total bakteri yang lebih banyak dibandingkan dengan produk yang dihasilkan dari kombinasi *L. bulgaricus* dan *L. acidophilus* karena pada kultur *L. bulgaricus* dan *L. acidophilus* sama-sama menghasilkan metabolit sekunder sehingga interaksi antarkedua BAL akan saling menekan pertumbuhan masing-masing kultur *starter* sehingga pertumbuhannya menjadi kurang optimal (Siswanti, 2002).

Pada sampel J tidak terdapat keterangan yang mendukung pada kemasan mengenai jenis kultur *starter* yang digunakan. Adapun rerata total BAL pada sampel tersebut diketahui sebesar 20 CFU/ml. Sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Kusumawati (2008) kultur *starter* campuran yang digunakannya dalam minuman probiotik cenderung mengalami penurunan selama 2 minggu penyimpanan. Maka dari itu, penurunan jumlah BAL dapat disebabkan oleh banyak faktor diantaranya faktor pembatas seperti berkurangnya nutrisi di dalam substrat atau medium, terbentuknya asam, metabolit atau senyawa yang dihasilkan oleh BAL itu sendiri, penggunaan jenis bakteri probiotik, aras inokulasi *starter*, suhu inkubasi, masa penyimpanan, keberadaan inhibitor, dan lamanya proses fermentasi.

Total Asam Laktat dan pH Susu Fermentasi Komersial

Berdasarkan hasil uji % TAT maka semua sampel susu fermentasi yang di uji memenuhi standar yang ditetapkan oleh SNI baik produk *yoghurt* maupun susu fermentasi berperisa. Total asam laktat susu fermentasi tertinggi terdapat pada sampel C sebesar 1,95% dan terendah pada sampel D sebesar 0,28%. Sedangkan berdasarkan pengukuran pH hanya 4 sampel susu fermentasi yang memenuhi nilai pH yang disarankan oleh Setiawati dan Rahayu (1992) yaitu sampel H, I, J, dan T dengan pH berkisar diantara 3,8—4,6. Sedangkan 16 sampel lainnya memiliki

nilai pH di bawah 3,8. Nilai pH tertinggi yakni pada sampel H sebesar 3,83 dan terendah pada sampel L sebesar 2,50. Rerata total asam laktat dan pH dari masing-masing sampel susu fermentasi komersial disajikan Tabel 3.

Tabel 3. Nilai TAT dan pH pada Susu Fermentasi Komersial

Sampel	% TAT	pH	Sampel	% TAT	pH
A	1,57	2,87	K	0,63	3,20
B	1,29	2,83	L	0,58	2,50
C	1,95	3,20	M	1,24	3,53
D	0,28	3,10	N	1,21	2,80
E	0,31	3,13	O	0,58	3,07
F	0,81	3,00	P	0,58	2,77
G	1,26	3,13	Q	0,71	3,27
H	0,84	3,83	R	1,39	3,33
I	0,37	3,97	S	0,59	3,10
J	0,55	3,80	T	0,65	3,87

Antara % TAT dan pH pada pengujian ini memiliki nilai yang tidak berbanding terbalik, dilihat dari peningkatan nilai TAT yang tidak diikuti dengan penurunan pH (Tabel 3), begitu juga sebaliknya. Menurut Hartono (2003), nilai pH tidak selalu berbanding terbalik dengan total asam tertitiasi (kadar asam laktat). Hal tersebut diperjelas kembali oleh Sadler dan Murphy (2003) terdapat perbedaan asam yang terukur menggunakan pH meter dan metode titrasi.

Asam yang terukur dari pH meter adalah konsentrasi ion-ion H^+ yang menunjukkan jumlah asam terdisosiasi, sehingga tidak mewakili asam yang terdapat pada produk sesungguhnya, sedangkan asam yang terukur dengan titrasi adalah semua komponen asam. (Hartono, 2003). Mendukung teori tersebut, susu fermentasi yang diuji pada penelitian ini mengandung BAL dengan golongan homofermentatif dan heterofermentatif, baik dalam bentuk kultur tunggal maupun campuran. Kedua golongan fermentasi tersebut dan keberadaan BAL sebagai kultur tunggal atau campuran akan memengaruhi besar kecilnya asam laktat yang dihasilkan. Semakin banyak bakteri homofermentatif yang berperan, maka semakin tinggi total asam laktat yang terukur.

Sampel C menggunakan bakteri *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* dengan sifat metabolisme homofermentatif. Menurut Surono (2004) bakteri homofermentatif memproduksi asam laktat dalam jumlah besar yaitu 85—90%. Maka dari itu % TAT yang diperoleh pada sampel C tinggi yaitu 1,95%. Sedangkan rendahnya % TAT pada sampel D kemungkinan disebabkan sedikitnya aras *starter* yang diberikan pada pembuatan susu fermentasi dan lingkungan pertumbuhan yang kurang mendukung aktivitas metabolisme *BAL. helveticus*. Nilai pH yang rendah pada susu fermentasi dapat terjadi karena terakumulasinya asam laktat yang dihasilkan oleh aktivitas metabolisme BAL selama penyimpanan terutama susu fermentasi dengan sifat BAL homofermentatif. Kondisi lingkungan yang sangat asam dengan konsentrasi asam laktat lebih dari 88% (Manfaati, 2010) kurang mendukung pertumbuhan BAL *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, dan *L. acidophilus* sehingga berpengaruh pada viabilitas BAL produk menjadi di bawah standar.

Apabila dihubungkan antara total asam dan viabilitas BAL, maka dari hasil yang diperoleh viabilitas BAL tidak memengaruhi nilai total asam pada susu fermentasi karena kemampuan BAL untuk menghasilkan asam organik terutama asam laktat pada setiap BAL berbeda. Disamping itu, ketahanan hidup setiap jenis BAL dalam menghadapi kondisi lingkungan asam juga berbeda. Hal inilah yang menjadi salah satu faktor viabilitas BAL tidak memengaruhi nilai total asam.

Daya Hambat Susu Fermentasi Komersial Terhadap Mikrobial Uji

Dari hasil uji aktivitas antimikrobia BAL susu fermentasi, sebanyak 16 sampel susu fermentasi mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif *S. pyogenes*, 18 sampel mampu menghambat bakteri Gram negatif *V. cholerae* dan 3 sampel mampu menghambat pertumbuhan khamir *C. albicans*. Hasil pengukuran zona hambat menunjukkan bahwa BAL memiliki daya hambat lemah terhadap khamir *C. albicans*, dan daya hambat sedang hingga tinggi terhadap bakteri *S. pyogenes* dan *V. cholerae*. Zona penghambatan pada bakteri Gram negatif cenderung lebih besar daripada bakteri Gram positif, dan sangat rendah pada khamir *C. albicans*. Aktivitas antimikrobia dinyatakan sebagai kemampuan menghambat mikrobial uji disajikan pada Tabel 4.

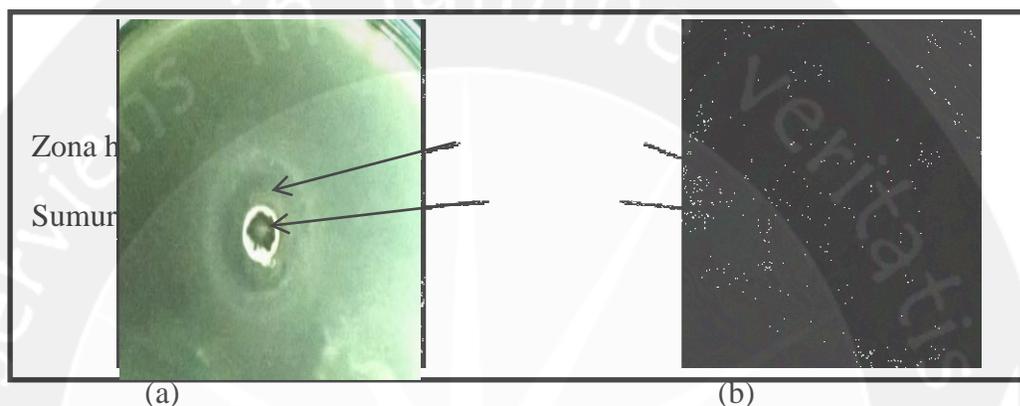
Tabel 4. Daya Antimikrobia Susu Fermentasi terhadap Mikrobial Uji

Sampel	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Candida albicans</i>
A	3,22 mm ²	16,45 mm ²	0 mm ²
B	5,40 mm ²	16,28 mm ²	0 mm ²
C	3,35 mm ²	11,64 mm ²	0 mm ²
D	0 mm ²	0 mm ²	0 mm ²
E	0 mm ²	0 mm ²	0 mm ²
F	1,34 mm ²	2,83 mm ²	0 mm ²
G	8,67 mm ²	15,44 mm ²	0 mm ²
H	0 mm ²	4,21 mm ²	0 mm ²
I	0 mm ²	0,77 mm ²	0 mm ²
J	1,42 mm ²	1,83 mm ²	0 mm ²
K	1,96 mm ²	5,18 mm ²	0,97 mm ²
L	5,81 mm ²	5,19 mm ²	0 mm ²
M	2,65 mm ²	3,80 mm ²	0 mm ²
N	3,41 mm ²	8,86 mm ²	0 mm ²
O	2,75 mm ²	7,23 mm ²	0 mm ²
P	4,15 mm ²	3,12 mm ²	0 mm ²
Q	2,56 mm ²	5,46 mm ²	0,97 mm ²
R	4,43 mm ²	5,99 mm ²	0 mm ²
S	3,80 mm ²	8,02 mm ²	1,64 mm ²
T	0,79 mm ²	2,36 mm ²	0 mm ²

Keterangan :  : zona hambat terbesar

Berdasarkan kategori penghambatan antimikrobia menurut Pan dkk. (2009) maka penghambatan rendah memiliki zona hambat di bawah 3 mm²,

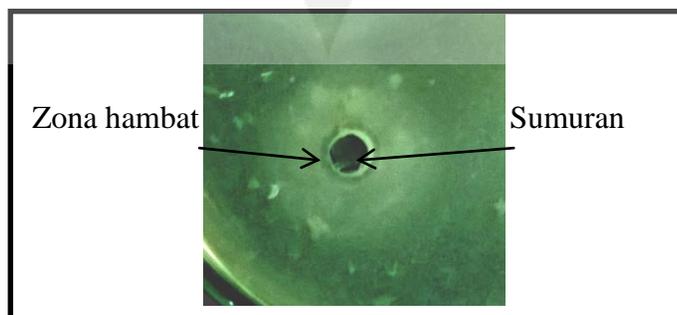
penghambatan sedang memiliki rentang zona hambat 3 hingga 6 mm², sedangkan penghambatan berkategori tinggi memiliki zona hambat lebih dari 6 mm². Kemampuan menghambat terhadap bakteri *S. pyogenes* termasuk dalam kategori rendah hingga sedang. Sampel G memiliki zona hambat terbesar 8,67 mm² terhadap *S. pyogenes* (Gambar 1.a). Sampel dengan kategori penghambatan sedang terhadap *S. pyogenes* yakni sampel A, B, C, L, N, P, R, dan S, sedangkan kategori lemah dengan zona hambat yaitu pada sampel D, E, F, H, I, J, K, M, O, Q, dan T.



Gambar 1. Zona Hambat Sampel G terhadap *S. pyogenes* (a) dan Sampel A terhadap *V. cholerae* (b)

Zona hambat BAL terhadap *V. cholerae* bervariasi pada ke-20 sampel susu fermentasi. Kemampuan hambat berkategori tinggi terdapat pada 8 sampel yaitu A, B, C, G, N, O, R, dan S dengan kemampuan hambat terbesar pada sampel A sebesar 16,45 mm² (Gambar 1.b). Kategori penghambatan antimikrobia sedang terdapat pada 5 sampel yaitu K, L, M, P, dan Q, sedangkan kategori lemah terdapat pada 7 sampel yaitu pada sampel D, E, F, H, I, J, dan T. Pada uji antimikrobia susu fermentasi terhadap khamir *C. albicans*, sampel S memberikan daya hambat terbesar dengan luas 1,64 mm² (Gambar 2) dan terendah paada sampel K dan Q.

Perbedaan aktivitas antimikrobia BAL terhadap beberapa mikrobia uji didasarkan pada perbedaan struktur penyusun dinding sel mikrobia. Hasil uji antimikrobia pada penelitian ini menunjukkan susu fermentasi yang mengandung BAL kurang sensitif terhadap bakteri Gram positif *S. pyogenes*. Hal ini dikarenakan dinding selnya terdiri dari lapisan mukokompleks yang tebal Menurut Fitriyani (2010), mukokompleks tersusun oleh peptidoglikan dan pada dinding selnya terdapat asam teikoat yang berfungsi sebagai reseptor permukaan sel sensitif.



Gambar 2. Zona Hambat Antimikrobia Sampel S terhadap *C. albicans*

Khamir *C. albicans* paling resisten terhadap susu fermentasi yang mengandung BAL disebabkan pembentukan klamidospora berupa spora aseksual yang membentuk dinding tebal pada *C. albicans* (Jawetz dkk., 2005) sehingga menjadi sulit ditembus oleh senyawa antimikrobia dari BAL. Selain jenis mikrobia uji yang digunakan, perbedaan zona hambat mikrobia uji salah satunya disebabkan perbedaan jenis BAL. Jenis BAL yang berbeda menghasilkan penghambatan dan aktivitas yang berbeda pula karena dipengaruhi oleh komponen metabolit yang dihasilkan.

Berdasarkan uji zona hambat, penghambatan lebih besar terjadi pada bakteri Gram negatif karena pertumbuhan BAL yang menghasikan senyawa atau metabolit seperti asam laktat yang meningkatkan keasaman lingkungan pertumbuhan dan terbentuknya bakteriosin (Yulinery dkk., 2009). *V. cholerae* merupakan bakteri yang cepat mati oleh asam karena protein berupa eksotoksin yang dihasilkan *V. cholerae* diubah secara kimia sehingga *V. cholerae* menjadi kehilangan toksisitasnya (Amelia, 2005). Asam laktat yang tinggi menyebabkan lapisan lipopolisakarida pada bakteri Gram negatif lisis dan memacu terjadinya lubang pada dinding sel. Antimikrobia bisa masuk ke dalam sel dan kontak dengan membran sitoplasma sehingga memengaruhi sintesis energi dan permeabilitas dinding sel sehingga menyebabkan kematian pada bakteri (Lunggani, 2007). Sebanyak 17 dari 20 sampel mengandung BAL dari genus *Lactobacillus* sehingga pada penelitian ini daya penghambatan terhadap *V. cholerae* lebih besar jika dibandingkan dengan penghambatan pada *S. pyogenes* dan *C. albicans*.

Berdasarkan analisis regresi, nilai R sebesar 0,508 menunjukkan korelasi ganda (TAT dan viabilitas BAL) dengan kemampuan hambat terhadap *C. albicans*. Angka R^2 sebesar 0,258 berarti 25,8% kemampuan menghambat pada *C. albicans* bisa dijelaskan oleh TAT dan viabilitas BAL. Pada *S. pyogenes* menunjukkan nilai R sebesar 0,643 yang berarti terdapat korelasi ganda (TAT dan viabilitas BAL) dengan kemampuan susu fermentasi dalam menghambat bakteri Gram positif *S. pyogenes*. Angka R^2 diperoleh sebesar 0,413 menunjukkan bahwa 41,3% penghambatan terhadap *S. pyogenes* bisa dijelaskan oleh TAT dan viabilitas BAL. Pada *V. cholerae* juga menunjukkan korelasi ganda (TAT dan viabilitas BAL) dengan kemampuan hambat terhadap *V. cholerae* dengan nilai R sebesar 0,837. Nilai R^2 diperoleh sebesar 0,701 berarti sebanyak 70,1% kemampuan menghambat susu fermentasi pada bakteri Gram negatif *V. cholerae* bisa dijelaskan oleh viabilitas BAL dan TAT. Adapun nilai R^2 terletak antara 0 dan 1, maka semakin mendekati 1 berarti semakin kuat hubungannya (Anonim, 2009b).

Kemampuan menghambat BAL terhadap pertumbuhan *V. cholerae* banyak dipengaruhi oleh viabilitas BAL dan total asam laktat yang terkandung di dalam susu fermentasi tersebut, sedangkan kemampuan menghambat dari BAL pada susu fermentasi terhadap *S. pyogenes* dan *C. albicans* sedikitnya dipengaruhi oleh viabilitas BAL dan TAT. Terdapat faktor lain yang kemungkinan memengaruhi kemampuan menghambat terhadap kedua jenis mikrobia patogen tersebut selain viabilitas BAL dan total asam laktat antara lain isolat BAL yang digunakan, substansi antimikrobia yang dihasilkan oleh BAL dan susunan dinding sel mikrobia patogen (Fitriyani, 2010). zona hambat tidak selalu sebanding dengan naiknya konsentrasi antibakteri. Pada penelitian ini dianalogikan sebagai viabilitas BAL. Hal ini dapat terjadi karena perbedaan kecepatan difusi senyawa antimikrobia pada

medium agar dan jenis serta konsentrasi senyawa antimikrobia yang berbeda juga memberikan zona hambat yang berbeda pada lama waktu tertentu (Dewi, 2010).

Simpulan

Dari 20 merek susu fermentasi yang diteliti, terdapat 18 merek minuman susu fermentasi mengandung kultur BAL hidup. Sebanyak 11 merek memenuhi standar viabilitas BAL yakni minimal 10^6 CFU/ml. Susu fermentasi komersial dapat menghambat pertumbuhan *V. cholera* dan *S. pyogenes* dengan kemampuan hambat kategori tinggi hingga sedang, masing-masing memiliki zona hambat terbesar 16,45 mm² dan 8,67 mm². Sedangkan *C. albicans* memiliki kemampuan hambat kategori rendah dengan zona hambat terbesar yaitu 1,64 mm².

DAFTAR PUSTAKA

- Amelia, S. 2005. *Vibrio Cholerae*. <http://www.repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/3576/1/05010682.pdf>. Diunduh pada tanggal 16 Oktober 2013.
- Andrianto, S. 2008. Pembuatan Es Krim Probiotik dengan Substitusi Susu Fermentasi *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus* dan *Lactobacillus* F1 terhadap Susu Skim. *Naskah Skripsi S-1*. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Anonim. 2009a. SNI 2981. *Yoghurt*. <http://www.sisni.bsn.ac.id>. Diunduh pada tanggal 09 September 2013.
- Anonim. 2009b. *Pengolahan Data Statistik dengan SPSS 16.0*. Penerbit Salemba Infotek, Jakarta.
- Antono, A., Pamuji, D.B., Sugiyartono, dan Isnaeni. 2012. Daya Hambat Susu Hasil Fermentasi *Lactobacillus acidophilus* Terhadap *Salmonella thypimurium*. *PharmaScientia. J.* 1 (2) : 1—9.
- Aritama, R. D. 2013. Viabilitas Kandidat Probiotik pada Berbagai Konsentrasi Awal dan Mutu Yoghurt Tepung Pisang Uli Modifikasi Sinbiotik Selama Penyimpanan. *Naskah Skripsi S-1*. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Breed, R.J., Murray, E.G.D. dan Nathan, R.S. 2005. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Edisi Ketujuh. The Williams and Wilkins Company, USA.
- Cascio, A. 2005. *Lactobacillus helveticus*. http://web.mst.edu/~microbio/bio221_2005/L_helveticus.htm. Diunduh pada tanggal 24 April 2014.
- Dewi, F.K. 2010. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn.) terhadap Bakteri Pembusuk Daging Segar. *Naskah Skripsi S-1*. Fakultas MIPA. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Erawati, T.M., Rosita, N., Moegiharjo dan Sulistyowati, B. 2005. Daya Adsorpsi Zeolit terhadap Mikrobial Penyebab Diare. *Majalah Farmasi Airlangga.* 5 (1) : 7—10.
- Ernawati. 2010. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat pada Susu Kambing Segar. *Naskah Skripsi S-1*. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.

- Erywiyatno, L., Djoko, S. dan Kriharyani, D. 2012. Pengaruh Madu Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus pyogenes*. *Analisis Kesehatan Sains. J. 1* (1) : 30—37.
- Fitriyani, I. 2010. Isolasi, Karakterisasi, dan Identifikasi bakteri Asam Laktat (BAL) dari Buah Matang yang Berpotensi Menghasilkan Antimikrobia. *Naskah Skripsi S-1*. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga, Yogyakarta.
- Gianti, I. dan Evanuraini, H. 2011. Pengaruh Penambahan Gula dan Lama Penyimpanan Terhadap Kualitas Susu Fermentasi. *Ilmu dan Teknologi Hasil Ternak. J. 6* (1) : 28—33.
- Hartono, M. 2003. Pembuatan Yoghurt Sinbiotik dengan Menggunakan Kultur Campuran *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, dan *Lactobacillus casei* galur Shirota. *Naskah Skripsi S.1*. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Hidayat, I. R., Kusrahayu dan Mulyani, S. 2013. Total Bakteri Asam Laktat, Nilai pH dan Sifat Organoleptik *Drink Yoghurt* dari Susu Sapi yang Diperkaya dengan Ekstrak Buah Mangga. *Animal Agriculture Journal. 2* (1) : 160—167.
- Jawetz, E., Melnick, J.L. dan Adelberg, E. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 23. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Kusumawati, E. 2008. Kajian Formulasi Sari Mentimun (*Cucumis sativus* L.) sebagai Minuman Probiotik Menggunakan Campuran Kultur *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* subsp. *salivarius*, dan *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Naskah Skripsi S-1*. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Lourens-Hattingh, A. dan Viljoen, B.C. 2001. Review : Yoghurt Asprobiotic Carrier Food. *Int. J. Dairy. 11* : 1—7.
- Lunggani, A.T. 2007. Kemampuan Bakteri Asam Laktat dalam Menghadapi Pertumbuhan dan Produksi Aflatoksin B₂ *Aspergillus flavus*. *Bioma. J. 9* (2) : 45—51.
- Manfaati, R. 2010. Kinetika dan Variabel Optimum Fermentasi Asam Laktat dengan Media Campuran Tepung Tapioka dan Limbah Cair Tahu oleh *Rhizopus oryzae*. *Naskah Tesis S-2*. Program Magister Teknik Kimia. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Pan, X., Chen, F., Wu, T., Tang, H. dan Zhao, Z. 2009. The Acid Bile Tolerance and Antimicrobial Property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control. J. 20* : 598—602.
- Parameswari, A., Kuntari, S. dan Herawati. 2011. *Daya Hambat Probiotik terhadap Pertumbuhan Streptococcus mutans*. http://journal.unair.ac.id/filerPDF/AMANDITA%20PARAMESWARI%20_E-JOURNAL.pdf. 30 September 2013.
- Prasetyo, H. 2010. Pengaruh Penggunaan Starter Yoghurt pada Level Tertentu Terhadap Karakteristik Yoghurt yang Dihasilkan. *Naskah Skripsi S-1*. Fakultas Pertanian. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Ramasenderan, N. 2011. Gambaran Kualitatif Bakteri Probiotik (*Lactobacillus* sp.) dalam Susu Fermentasi. *Laporan Hasil Penelitian*. Fakultas Kedokteran. Universitas Sumatera Utara, Medan.

- Rattray, F.P. dan O'Connell, M.J. 2011. Fermented Milks Kefir. Di dalam ; Fukay, J.W. (editor). *Encyclopedia of Dairy Science*. Edisi Kedua. Academic Press, USA.
- Rostinawati, T. 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap *Escherichia coli*, *Salmonella thypi*, dan *Staphylococcus aureus* dengan metode Difusi Agar. *Naskah Penelitian Mandiri*. Universitas Padjadjaran, Jatinangor.
- Rybaka, S. dan Kailasapthy, K. 1995. The Survival of Culture Bacteria in Fresh and Freeze Dried Yoghurt. *Austr. J. Dairy Tech.* 50 (2) : 51—57.
- Sadler, G.D. dan Murphy, P.A. 2003. pH and Titratable Acidity. Di dalam: Suzane Nielsen (Editor). *Food Analysis*. Edisi Ketiga. Purdue University, Indiana.
- Sangadji, E.M. dan Sopiah. 2010. *Metodologi Penelitian. Pendekatan Praktis dalam Penelitian*. Penerbit Andi, Yogyakarta.
- Santosa, R.B. dan Ashari. 2005. *Analisis Statistik dengan Microsoft Excel dan SPSS*. Penerbit Andi, Yogyakarta.
- Setiawati dan Rahayu, S. 1992. Buku Teknik dan Pengembangan Peternakan Seri : Penanganan Susu. Dirjen Peternakan. Direktorat Bina Produksi Peternakan, Jakarta.
- Shah, N.P. 2000. Probiotic Bacteria : Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *Dairy Science. J.* 5 : 515—521.
- Siswanti, S.W. 2002. Karakteristik Fisik, Kimia, dan Mikrobiologis *Acidophilus Milk^{plus}*: Susu Fermentasi dengan *Lactobacillus acidophilus* dan Kombinasinya dengan *Lactobacillus bulgaricus* atau *Streptococcus thermophilus*. *Naskah Skripsi-S1*. Fakultas Peternakan. Insitut Pertanian Bogor, Bogor.
- Soemiati, A. dan Elya, B. 2002. Uji Pendahuluan Efek Kombinasi Antijamur Infus Daun Sirih (*Piper betle* L.), Kulit Buah Delima (*Punica granatum* L.), dan Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica* Val.) terhadap Jamur *Candida albicans*. *Makara.* 6 (3) : 149—154.
- Surono, I. S. 2004. *Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan*. YAPMMI, Jakarta.
- Usmiati, S., Broto, W. dan Setiyanto, H. 2011. Karakteristik Dadih Susu Sapi yang Menggunakan Starter Bakteri Probiotik. *JITV.* 16(2) : 140—152.
- Windi, A.N., 2010. Efek Kombinasi *Tea Tree Oil* (*Melaleuca alternifolia*) dengan Ekstrak Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa*) terhadap *Candida albican In Vitro*. *Naskah Skripsi-S1*. Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Yulinery T., Petria, I.Y. dan Nurhidayat, N. 2009. Penggunaan Antimikrobia dari Isolat *Lactobacillus* Terseleksi sebagai Bahan Pengawet Alami untuk Menghambat Pertumbuhan *Vibrio* sp. dan *Staphylococcus aureus* pada Fillet Ikan Kakap. *Berk. Penel. Hayati. J.* 15 : 85—92.