

PEMBUATAN DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI YOGURT HASIL FERMENTASI TIGA BAKTERI (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*)

Dian S. Kamara¹, Saadah D. Rachman², Rina Widya Pasisca¹, Sadiyah Djajasoepeana¹, O. Suprijana¹, Idar Idar², dan Safri Ishmayana¹
¹Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran
²Sekolah Tinggi Farmasi Bandung
E-mail: ishmayana@unpad.ac.id

Abstract: *Exploitation of synthetic antibiotics compounds not only have positive effect for human, but also have side effect that can be unfavorable, therefore many researches are being conducted to find natural antibiotics compounds that are safer. Lactic acid bacteria has the ability to produce antibacterial compound when used in fermentation process. For example, *Lactobacillus acidophilus* produces acidophilin and acidolin. The main purpose of the present study is to investigate antibacterial activity of yogurt fermented with mixed bacterial culture of *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* and *L. acidophilus* against *Escherichia coli* (representing Gram negative bacteria) and *Bacillus subtilis* (representing Gram positive bacteria). The antibacterial activity of the yogurt at three different time points (5, 7 and 9 hours) were examined. We also investigate the fermentation parameters of the yogurt production. The results of the present study indicate that the crude yogurt extract has antibacterial activity, where the highest activity was observed at 7 hour of incubation, resulting 0.35 and 0.30 cm of clear zone against *E. coli* and *B. subtilis*, respectively. It is most likely that the compound is non protein compound.*

Keywords: *antibacterial compound, yogurt, lactic acid bacteria*

1. PENDAHULUAN

Yogurt merupakan minuman susu terfermentasi yang diketahui memiliki banyak manfaat bagi kesehatan karena adanya aktivitas antimikrobal sehingga dapat mengurangi infeksi gastrointestinal. Selain itu, yoghurt juga memiliki efek antikanker, dapat menurunkan kadar kolesterol dan menstimulasi sistem imun (Shah 2006; Ishmayana dkk. 2015). Karena berbagai efek positif ini, banyak penelitian telah dilakukan baik untuk memperbaiki kualitas produk ataupun mempelajari efek positif yogurt terhadap kesehatan (Allgeyer *et al.*, 2010; Tsoukoulis & Tzia, 2008; Meyer *et al.*, 2006; Jeon *et al.*, 2007).

Yogurt dibuat dari bahan dasar susu yang diinokulasi dengan bakteri asam laktat. Definisi yogurt pada awalnya adalah suatu produk yang dihasilkan dari susu melalui proses fermentasi dengan kultur starter campuran yang terdiri atas *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus* (Shah, 2006). Namun dalam perkembangannya bakteri asam laktat lain yang sesuai juga dapat ditambahkan ke dalam kultur starter, seperti *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium lactis* dan *Bifidobacterium bifidum* (Aryana & McGrew 2007; Ejtahed *et al.*, 2011; Panesar & Shinje 2012; Rachman *et al.*, 2015). Penambahan bakteri selain *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus* terutama dilakukan karena sifat probiotik kedua bakteri ini kurang baik, sehingga perlu ditambahkan bakteri lain yang memiliki sifat probiotik yang lebih baik, sehingga dapat meningkatkan fungsionalitas dari produk yogurt yang dihasilkan (Gomez & Malcata 1999).

Kelompok penelitian kami telah menguji aktivitas antibakteri dari produk yogurt yang dibuat dengan menggunakan kultur starter yang mengandung *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus* (Rachman dkk., 2016). Hasilnya menunjukkan bahwa produk yogurt tersebut berpotensi memiliki aktivitas antibakteri. Penelitian yang juga telah kami lakukan menggunakan tambahan bakteri *L. acidophilus* pada kultur starter yang menghasilkan kualitas yogurt yang tidak jauh berbeda dengan yogurt yang dibuat dengan kultur starter dua bakteri (Rachman dkk., 2015). Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan penentuan aktivitas antibakteri dari produk yogurt yang dibuat menggunakan kultur tiga bakteri.

2. METODE PENELITIAN

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah termometer, inkubator (Incubig), laminar air flow (Forma Scientific), pH meter (Mettler Toledo MP-220), Sentrifugasi (Beckman TJ-6 Centrifuge), *autoclave* dan alat-alat gelas lain yang umum digunakan di laboratorium

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya adalah agar bakto, bacteriological pepton, yeast extract, glukosa, akuades, asam klorida, biakan *E. coli* dan *B. subtilis* (diperoleh dari laboratorium mikrobiologi, Departemen Biologi, FMIPA, Unpad), biakan murni *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, dan *L. acidophilus* (diperoleh dari Laboratorium

Mikrobiologi, Institut Teknologi Bandung), susu skim, dan susu sapi murni yang diperoleh dari Fakultas Peternakan, Unpad.

Prosedur Kerja

Pembuatan Media Cair Susu Skim

Media cair susu skim 10% b/v dibuat dengan cara sebanyak 5 gram susu skim ditimbang dan dilarutkan dalam 50 mL akuades kemudian dipanaskan dan diaduk sampai larut sampai mencapai 85°C selama 10 menit

Pembuatan Media Agar Pepton-Yeast-Glukosa (PYG)

Sebanyak 0,25 g pepton, 0,05 g glukosa, 0,125 g yeast extract dan 0,9 g agar bakto ditimbang dan dilarutkan dalam 50 mL akuades. Larutan kemudian dididihkan dan diaduk sampai benar-benar larut kemudian diautoclave.

Pembuatan Kultur Starter Tunggal

Sebanyak tiga labu Erlenmeyer yang telah disterilkan disiapkan dan ke dalamnya dimasukkan 10 mL media cair susu skim 10% b/v yang telah dipasteurisasi pada suhu 85°C selama 10 menit dan didiamkan sampai dengan suhu 40°C. Kemudian ke dalam masing-masing labu Erlenmeyer dimasukkan satu mata ose *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, dan *L. acidophilus* lalu dikocok perlahan. Kultur tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 40°C dan selanjutnya disimpan di lemari es.

Pembuatan Kultur Starter Campuran

Pada tahap ini dibuat kultur starter campuran *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* dan *L. acidophilus* = 1:1:1 = v:v:v. Sebanyak 150 mL susu skim yang akan difermentasi dipasteurisasi pada suhu 85°C selama 10 menit, kemudian dimasukkan sebanyak 5 mL kultur starter *L. bulgaricus*, 5 mL kultur starter *S. thermophilus* dan 5 mL kultur starter *L. acidophilus* lalu dikocok perlahan. Kultur tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 40°C dan selanjutnya disimpan di lemari es.

Pembuatan Kurva Baku Pertumbuhan Kultur Tunggal

Ke dalam 3 buah labu Erlenmeyer yang sudah diisi dengan 100 mL media cair susu skim masing-masing diinokulasi dengan 10 mL kultur starter tunggal. Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 40°C dan setiap 2 jam diukur densitas optiknya pada panjang gelombang 600 nm.

Pembuatan Kurva Pertumbuhan Gabungan Tiga Bakteri

Ke dalam sebuah labu Erlenmeyer yang sudah diisi dengan 100 mL media cair susu skim ditambahkan kultur starter campuran sebanyak 10 mL. Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 40°C dan setiap 2 jam diukur densitas optiknya pada panjang gelombang 600 nm.

Pembuatan Yogurt

Susu murni yang akan difermentasi dipasteurisasi terlebih dahulu dengan pemanasan pada suhu 85°C selama 10 menit. Kemudian ditambahkan kultur starter campuran lalu dikocok dan diinkubasi pada suhu 40°C selama 5, 7 dan 9 jam.

Ekstraksi Senyawa Antibakteri dari Yogurt

Yogurt disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk diberi etanol dingin (10°C) dengan perbandingan 1:1 dan disimpan pada suhu 10°C selama 24 jam. Selanjutnya disentrifugasi kembali dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk dipekatkan dengan rotary vacuum evaporator dengan pemanasan 55°C sampai pekat. Ekstrak yang diperoleh diencerkan dengan air sampai volumenya mencapai 1/5 volume awal. Larutan ini siap untuk diuji aktivitas antibakterinya.

Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri

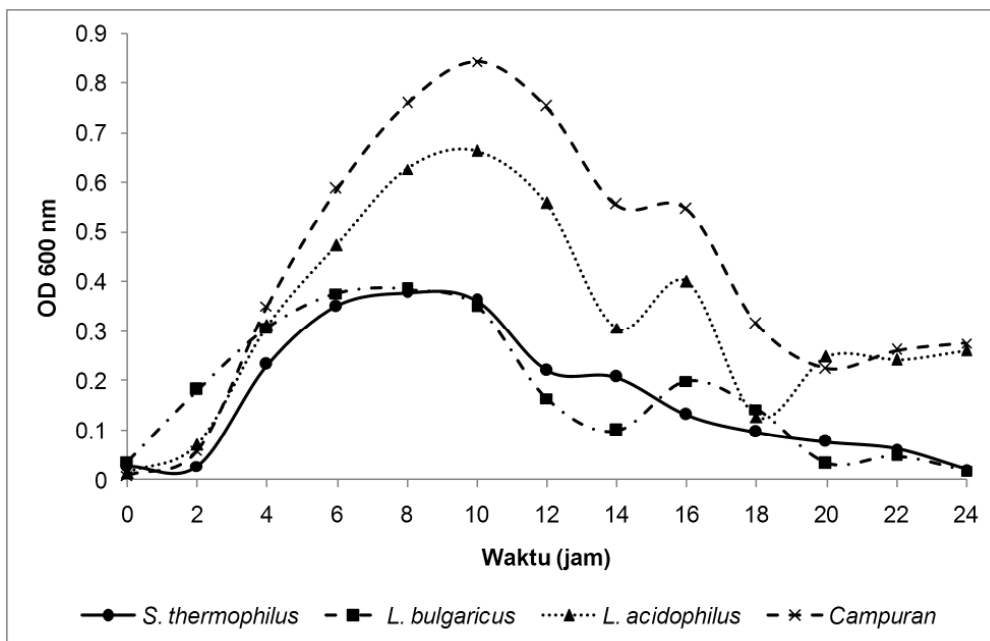
Sebanyak dua cawan petri berdiameter 10 cm disterilkan dan ke dalamnya masing-masing ditambahkan dengan 20 mL media agar PYG yang belum memadat dan masing-masing telah ditambahkan dengan 0,1 mL inokulum *B. subtilis* dan *E. coli* kemudian dituangkan ke dalam cawan petri. Kemudian dikocok dan dibiarkan sampai memadat. Pada media agar yang telah memadat, diberi lubang dengan diameter 6 mm. Sebanyak 20 µL ekstrak yang akan diuji ditetaskan ke dalam lubang, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi selesai, diamati daerah bening yang menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan bakteri kemudian diukur diameternya.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Kurva Pertumbuhan

Kurva pertumbuhan dibuat untuk menentukan fase yang terjadi selama proses fermentasi. Hasil pengukuran kurva pertumbuhan ditunjukkan pada Gambar 1. Hasil pada Gambar 1 menunjukkan bahwa terjadi fase adaptasi atau

lag pada jam ke-0 sampai ke-2 baik untuk kultur bakteri tunggal ataupun campuran. Fase eksponensial atau log untuk *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus* terjadi pada jam ke-2 sampai dengan jam ke-6, sedangkan untuk *L. acidophilus* dan kultur campuran tiga bakteri terjadi pada jam ke-2 sampai ke-8. Fase eksponensial kemudian diikuti oleh fase stasioner yang berakhir pada jam ke-10, kecuali untuk kultur campuran yang berakhir pada jam ke-12. Setelah itu, diikuti oleh fase kematian.



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan Bakteri *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* dan Campuran Ketiga Bakteri dengan Perbandingan 1:1:1 = v:v:v pada Media Susu Skim 10% b/v. Kultur Diinkubasi selama 24 Jam pada Suhu 40°C

Fase stasioner untuk *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus* terlihat lebih jelas dibandingkan dengan fase stasioner *L. acidophilus* dan kultur campuran. Bakteri *L. acidophilus* tampaknya memiliki daya tumbuh yang lebih baik dibandingkan dengan bakteri lainnya. Pada kultur campuran pun terlihat terjadi pertumbuhan yang lebih tinggi dibandingkan kultur tunggal, yang kemungkinan besar dipengaruhi oleh adanya bakteri *L. acidophilus* yang ada dalam kultur campuran. Temuan ini sejalan dengan Chick *et al.* (2001), yang melaporkan bahwa pada media yang sama, *L. acidophilus* mencapai jumlah sel yang lebih

banyak dibandingkan *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* dan *Bifidobacterium bifidum*.

Kultur Starter Tunggal dan Campuran

Pembuatan kultur starter bertujuan untuk membantu proses adaptasi bakteri, sehingga ketika proses fermentasi dimulai fase adaptasi dalam media fermentasi menjadi lebih cepat. Media yang digunakan untuk membuat kultur starter adalah susu skim, karena kandungan susu skim lebih stabil dibandingkan susu murni sehingga akan lebih terjaga konsistensi hasil serta lebih mudah bagi bakteri untuk beradaptasi.

Dengan mengamati penurunan nilai pH media susu skim 10% b/v yang telah diinokulasi dengan bakteri asam laktat, maka dapat diketahui bahwa bakteri tersebut aktif, yang ditandai dengan kemampuannya untuk mengubah laktosa menjadi asam laktat sehingga menyebabkan turunnya nilai pH. Hasil pengukuran pH susu skim 10% b/v dan produk hasil inkubasi ditunjukkan pada Tabel 1. Nilai pH susu skim 10% b/v adalah sebesar 6,92. Setelah diinkubasi selama 24 jam, pH turun menjadi 4,37; 4,37; 4,41 dan 4,34 masing-masing untuk susu skim yang difermentasi dengan *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus* dan campuran ketiga bakteri dengan perbandingan 1:1:1 = v:v:v. Berdasarkan nilai pH yang diukur, maka kesemua kultur starter memenuhi criteria kultur starter yang baik, dimana menurut Marshall (1987) kultur starter yang baik memiliki nilai pH pada rentang 3,8-4,6.

Tabel 1. Nilai pH Media Cair Susu Skim 10% b/v dan Kultur Starter Hasil Inkubasi Selama 24 Jam

Sampel	pH
Susu skim 10% b/v	6,92
Kultur starter dengan <i>L. bulgaricus</i>	4,37
Kultur starter dengan <i>S. thermophiles</i>	4,37
Kultur starter dengan <i>L. acidophilus</i>	4,41
Kultur starter dengan campuran bakteri	4,34

Pembuatan Yogurt

Pada penelitian ini, yogurt dibuat dengan menggunakan kultur starter campuran tiga bakteri. Salah satu faktor yang mempengaruhi kualitas yogurt adalah lama waktu inkubasi. Semakin lama waktu inkubasi, maka akan semakin banyak asam laktat yang diproduksi, sehingga nilai pH pun menjadi

semakin rendah. Hasil pengukuran pH pada berbagai waktu inkubasi ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai pH Yogurt dengan Variasi Waktu Inkubasi. Yogurt dibuat dengan Menggunakan Kultur Starter Campuran Tiga Bakteri (*L. bulgaricus*, *S. thermophilus* dan *L. acidophilus* dengan Perbandingan 1:1:1 = v:v:v) dan Diinkubasi pada Suhu 40°C

Waktu inkubasi (jam)	Ph
5	5,00
7	4,70
9	4,50

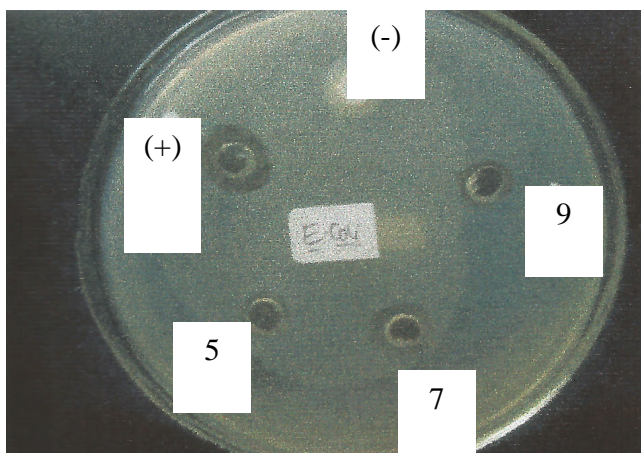
Hasil pengukuran pH menunjukkan bahwa yogurt yang baik diperoleh pada jam ke-9, karena menurut Food Standards Australia New Zealand (2014) yogurt yang baik memiliki nilai pH maksimum 4,5. Waktu inkubasi yang digunakan didasarkan pada kurva pertumbuhan yang telah ditentukan sebelumnya, dimana fase eksponensial kultur bakteri campuran terjadi pada jam ke-2 sampai ke-8. Sehingga pada penelitian ini inkubasi dihentikan setelah inkubasi selama 9 jam agar proses fermentasi dihentikan masih pada fase eksponensial, pada akhir fase eksponensial atau mulai memasuki fase stasioner.

Uji Aktivitas Antibakteri

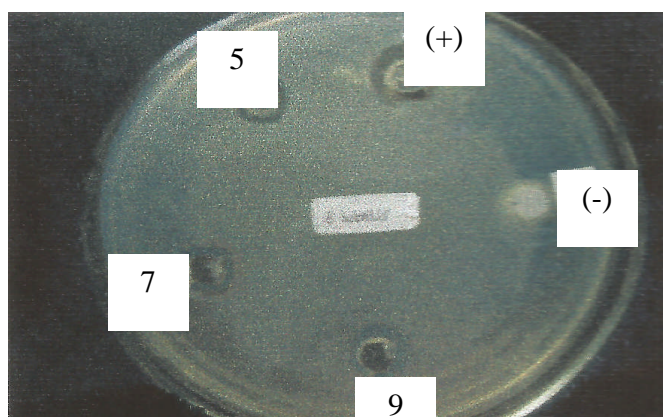
Ekstrak kasar yang diperoleh diuji terhadap dua bakteri, yaitu *E. coli* yang mewakili bakteri gram negatif dan *B. subtilis* yang mewakili bakteri gram positif. Metode yang digunakan adalah metode perforasi. Hasil uji bakteri ditunjukkan pada Gambar 3 dan Gambar 4, sedangkan hasil pengukuran zona bening ditunjukkan pada Tabel 3.

Seperti yang ditunjukkan pada Tabel 3 dan Gambar 2, diameter zona bening yang dihasilkan oleh senyawa antibakteri yang diperoleh dari ekstrak yogurt terhadap *E. coli* relatif lebih besar dibandingkan diameter zona bening terhadap *B. subtilis*. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa yang diekstrak dari yogurt memiliki daya hambat yang lebih baik terhadap bakteri gram negatif. Beberapa penelitian kelompok lain melaporkan adanya aktivitas antibakteri dari produk yogurt yang kemungkinan besar disebabkan adanya kemampuan bakteri asam laktat untuk menghasilkan protein kecil yang disebut sebagai bacteriosin (Chuayana *et al.*, 2003; Goraya *et al.*, 2013). Selain itu ada juga senyawa antibakteri lainnya yang juga dihasilkan oleh kelompok bakteri asam laktat, yaitu reuterin (Arqués *et al.*, 2004). Karena proses isolasi pada penelitian ini

yang menggunakan etanol dan pemanasan, maka kemungkinan besar senyawa yang telah diisolasi adalah senyawa antibakteri seperti kelompok reuterin.



Gambar 3. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Yogurt terhadap *E. coli*. (+) Kontrol Positif (Amoksisilin 1 mg/mL); (-) Kontrol Negatif (Susu Murni); 5, 7 dan 9 masing-masing adalah Ekstrak Yogurt yang Diinkubasi selama 5, 7 dan 9 Jam



Gambar 4. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Yogurt terhadap *B. subtilis*. (+) Kontrol Positif (Amoksisilin 1 mg/mL); (-) Kontrol Negatif (Susu Murni); 5, 7 dan 9 masing-masing adalah Ekstrak Yogurt Yang Diinkubasi selama 5, 7 dan 9 Jam

Tabel 3. Data Diameter Zona Bening (dalam Satuan cm) Hasil Uji Bakteri Ekstrak Kasar Senyawa yang Diisolasi dari Yogurt terhadap *E. coli* dan *B. subtilis*

Sampel	Bakteri Uji	
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
Kontrol negatif	-	-
Kontrol positif (amoksisilin 10 mg/mL)	0,50	0,50
Yogurt waktu inkubasi 5 jam	0,10	0,10
Yogurt waktu inkubasi 7 jam	0,35	0,30
Yogurt waktu inkubasi 9 jam	0,30	0,20

Keterangan: - = tidak ada zona hambat

Selain itu, waktu inkubasi juga mempengaruhi aktivitas antibakteri. Seperti ditunjukkan pada Tabel 3, yogurt yang diinkubasi selama 7 jam memiliki aktivitas paling tinggi. Pada jam ke-9, aktivitas antibakteri menurun. Hal ini dimungkinkan terjadi karena adanya proses degradasi senyawa antibakteri oleh aktivitas dari bakteri itu sendiri, sehingga daya hambat pada jam ke-9 menjadi menurun.

4. PENUTUP

Kesimpulan

Yogurt yang dibuat dengan menggunakan kultur campuran tiga bakteri memiliki aktivitas antibakteri. Hasil uji antibakteri yogurt tiga bakteri menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri tertinggi dicapai pada jam ke-7 dengan diameter zona hambat sebesar 0,35 dan 0,3 masing-masing untuk *E. coli* dan *B. subtilis*. Dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa senyawa pada yogurt memiliki daya hambat yang lebih besar terhadap bakteri gram negatif.

Saran

Untuk penelitian lebih lanjut disarankan untuk melakukan pemurnian terhadap senyawa antibakteri yang terdapat dalam ekstrak yogurt tersebut dan melakukan penentuan struktur dari senyawa aktifnya sehingga mekanisme inhibisinya dapat lebih dipahami.

DAFTAR PUSTAKA

- Allgeyer, L.C., Miller, M.J., and Lee, S.Y., 2010, Sensory and microbiological quality of yogurt drinks with prebiotics and probiotics, *Journal of Dairy Science*, 93(10): 4471-4479.
- Arqués, J.L., Fernández, J., Gaya, P., Nuñez, M., Rodríguez, E., and Medina, M., 2004, Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against food-borne pathogens, *International Journal of Food Microbiology*, 95(2): 225-229.
- Chick, H., Shin, H.S., and Ustunol, Z., 2001, Growth and Acid Production by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Grown in Skim Milk Containing Honey, *Journal of Food Science*, 66(3): 478-481.
- Chuayana Jr., E.L., Ponce, C.V., Rivera, M.R.B., and Cabrera, E.C., 2003, Antimicrobial Activity of Probiotics from Milk Products, *Philippine Journal of Microbiology and Infectious Diseases*, 32(2): 71-74.
- Food Standards Australia New Zealand, 2014, Standard 2.5.3 Fermented milk products.
- Gomes, A.M.P., Malcata, F.X., 1999, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics, *Trends in Food Science & Technology*, 10(4): 139-157.
- Goraya, M., Ashraf, U.M., Ur-Rahman, S., Raza, A., and Habib, A., 2013, Determination of antibacterial activity of bacteriocins of lactic acid producing bacteria, *Journal of Infection and Molecular Biology*, 1: 1-7.
- Ishmayana, S., Juanda, A., Suprijana, O., Djajasoepeana, S., Idar, I., dan Rachman, S.D., 2015, Pengaruh Konsumsi Yogurt Yang Dibuat Dengan Kultur Dua Bakteri (*Sterptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus*) dan Tiga Bakteri (*Sterptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* dan *Lactobacillus acidophilus*) Terhadap Kadar Kolesterol Seru, *Chimica et Natura Acta*, 3(3): 94-99.
- Jeon, J.-R., Kim, J.-Y., and Choi, J.-H., 2007, Effect of Yam Yogurt on Colon Mucosal Tissue of Rats with Loperamide-induced Constipation, *Food Science and Biotechnology*, 16(4): 605-609.
- Meyer, A.L., Micksche, M., Herbacek, I., and Elmadfa, I., 2006, Daily Intake of Probiotic as well as Conventional Yogurt Has a Stimulating Effect on Cellular Immunity in Young Healthy Women, *Annals of Nutrition and Metabolism*, 50(3): 282-289.
- Rachman, S.D., Djajasoepeana, S., Indrawati, I., Bangun, L., Kamara, D.S. dan Ishmayana, S., 2016, Penentuan Kadar Riboflavin dan Uji Pendahuluan Aktivitas Antibakteri Yogurt yang Difermentasi dengan Bakteri yang

Diisolasi dari Yogurt Komersial, *Seminar Nasional Kimia dan Pembelajaran Kimia*, Departemen Kimia, Universitas Padjadjaran, Jatinangor. 12 Mei 2016

- Rachman, S.D., Djajasoepeana, S., Kamara, D.S., Idar, I., Sutrisna, R., Safari, A., Suprijana, O., dan Ishmayana, S., 2015, Kualitas Yoghurt yang Dibuat Dengan Kultur Dua (*Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*) dan Tiga Bakteri (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus acidophilus*), *Chimica et Natura Acta*, 3(2): 76-79.
- Shah, N.P., 2006, Health Benefit of Yogurt and Fermented Milks, in R.C. Chandan, C.H. White, A. Kilara, Y.H. Hui (eds.), *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*, Oxford: Blackwell Publishing.
- Soukoulis, C., Tzia, C., 2008, Impact of the acidification process, hydrocolloids and protein fortifiers on the physical and sensory properties of frozen yogurt, *International Journal of Dairy Technology*, 61(2): 170-177.