

**PENGARUH WAKTU INKUBASI  
TERHADAP HASIL FERMENTASI SUSU KUDA  
OLEH *Lactobacillus sp.* ISOLAT ASI**

**DARNIYATI D.  
N111 04 375**



No. Tesis	10-12-08
Judul	Hubung. fermentasi
Penyusun	leles
Supervisor	Hakim
No. Buletin	339

**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2008**

**PENGARUH WAKTU INKUBASI  
TERHADAP HASIL FERMENTASI SUSU KUDA  
OLEH *Lactobacillus sp.* ISOLAT ASI**

**SKRIPSI**

**untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi  
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana**

**DARNIYATI D.  
N111 04 375**

**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2008**

**PENGARUH WAKTU INKUBASI  
TERHADAP HASIL FERMENTASI SUSU KUDA  
OLEH *Lactobacillus sp.* ISOLAT ASI**

**DARNIYATI D.**

**N111 04 375**

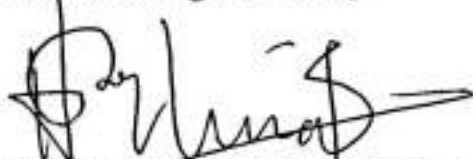
**Disetujui oleh :**

**Pembimbing Utama,**



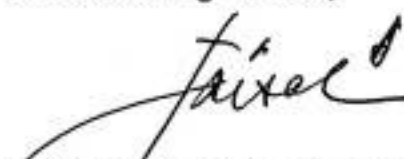
**Dra. Sartini, M.Si., Apt.  
NIP. 131 696 792**

**Pembimbing Pertama,**



**Herina Rante, S.Si., M.Si., Apt.  
NIP. 132 301 332**

**Pembimbing Kedua,**



**Dr. H. Faisal Attamimi, MS.  
NIP. 130 355 932**

**Pada tanggal, Desember 2008**

## UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, tiada kata yang lebih patut diucapkan oleh seorang hamba yang beriman selain ucapan puji syukur ke hadirat Allah swt, Tuhan Yang Maha Mengetahui, Pemilik segala ilmu, karena atas petunjuk-Nya maka skripsi ini dapat diselesaikan.

Sungguh banyak kendala yang penulis hadapi dalam rangka penyusunan skripsi ini. Namun berkat dukungan dan bantuan berbagai pihak, akhirnya penulis dapat melewati kendala-kendala tersebut. Oleh karena itu, penulis dengan tulus menghaturkan banyak terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Ibu Dra. Sartini, M.Si., Apt. selaku pembimbing utama, Ibu Herlina Rante, S.Si.,M.Si.,Apt. selaku pembimbing pertama dan Bapak Dr. H. Faisal Attamimi, M.Sc. selaku pembimbing kedua atas segala bimbingan, petunjuk dan saran-saran sejak dimulainya penelitian hingga pada penyusunan skripsi ini.

Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Ibu Dra. Hj. Naimah Ramli, Apt. selaku penasehat akademik yang telah memberikan bimbingan dan petunjuk selama mengikuti pendidikan strata satu.

Demikian pula penulis menyampaikan terima kasih kepada Dekan Fakultas Farmasi beserta seluruh staf atas segala fasilitas yang diberikan selama penulis menempuh studi hingga menyelesaikan penelitian ini.

Terkhusus lagi kepada sahabat-sahabatku, Arlindah. Andiny, Sulaiha, Ratnamayasari. Teman-teman seperjuangan, Nurmaswati, Rosdiana, Darmasuesti, Nielma, Catharina, Latifah, Sudarmin, Hasrida

dan seluruh angkatan 2004 serta pihak-pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Akhirnya semua ini tiada artinya tanpa dukungan moril dari kedua orang tua tercinta Muh. Dahri dan Hj. Tobba dan saudara-saudaraku Muh. Darwis dan Dinda Syureski.

Penulis menyadari bahwa dalam skripsi ini masih banyak terdapat kesalahan, namun penulis berharap semoga karya kecil ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan. Amin....

Makassar, Oktober 2008

Darniyati D.

## ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian mengenai pengaruh waktu inkubasi terhadap hasil fermentasi susu kuda oleh *Lactobacillus sp.* isolat Air Susu Ibu (ASI). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan waktu inkubasi yang optimum dalam pembuatan susu kuda fermentasi. Pada penelitian, susu kuda difermentasi oleh *Lactobacillus sp.* menggunakan 4 variasi waktu inkubasi, yaitu 6 jam, 12 jam, 24 jam dan 48 jam. Pengujian hasil fermentasi susu kuda meliputi total bakteri asam laktat dengan menggunakan metode SPC, total asam dengan metode alkalimetri, uji pH dengan menggunakan kertas pH universal dan uji organoleptis dengan metode hedonik. Hasil penelitian menunjukkan total bakteri asam laktat pada lama inkubasi 6 jam; 12 jam; 24 jam; 48 jam adalah  $1,3 \times 10^{11}$  koloni/ml;  $4,4 \times 10^{11}$  koloni/ml;  $2,9 \times 10^{11}$  koloni/ml;  $5,7 \times 10^{11}$  koloni/ml, total asam laktat pada lama inkubasi 6 jam; 12 jam; 24 jam; 48 jam adalah 0,59%; 0,64%; 0,65%; 0,71%, uji pH pada lama inkubasi 6 jam; 12 jam; 24 jam; 48 jam adalah 4,8; 4,5; 4,4; 4,0, dan uji organoleptis menggunakan 10 panelis pada lama inkubasi 6 jam; 12 jam; 24 jam; 48 jam adalah 14,6; 14,7; 13,6; 13,1. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa lama waktu inkubasi sangat berpengaruh terhadap nilai pH, uji organoleptik, jumlah bakteri asam laktat dan kadar total asam laktat pada fermentasi susu kuda. Waktu inkubasi yang optimum dalam fermentasi susu kuda adalah 12 jam.

Kata kunci : *Lactobacillus sp.*, waktu inkubasi, fermentasi susu kuda.

## ABSTRACT

The research about the influence of incubation time to product fermented horse milk by *Lactobacillus sp.* isolate from human milk has been done. This research purposed to determine the optimum incubation time in the making fermented horse milk. In this research, horse milk was fermentated by *Lactobacillus sp.* using 4 variations time of incubation, there were 6, 12, 24 and 48 hours. The test of fermented horse milk were total of lactic acid bacteria using SPC method, the total of lactic acid using alkalimetric method, pH value using universal pH paper (range 4.0 – 5.0) and organoleptic test using hedonic method. The result of research showed that total of lactic acid bacteria at incubation time 6 hours; 12 hours; 24 hours; 48 hours are  $1.3 \times 10^{11}$  cfu/ml;  $4.4 \times 10^{11}$  cfu/ml;  $2.9 \times 10^{11}$  cfu/ml;  $5.7 \times 10^{11}$  cfu/ml, the total of lactic acid at incubation time 6 hours; 12 hours; 24 hours; 48 hours are 0.59%; 0.64%; 0.65%; 0.71%, the pH value at incubation time 6 hours; 12 hours; 24 hours; 48 hours are 4.8; 4.5; 4.4; 4.0, and organoleptic test using 10 panelist at incubation time 6 hours; 12 hours; 24 hours; 48 hours are 14.6; 14.7; 13.6; 13.1. The result could be concluded that incubation time having an effect on pH value, organoleptic test, total number of lactic acid bacteria and total rate of lactic acid in fermented horse milk. The optimum incubation time in the fermented horse milk were 12 hours.

Keywords : *Lactobacillus sp.*, incubation time, fermented horse milk.

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
UCAPAN TERIMA KASIH .....	iv
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT .....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....	4
II.1 Susu Kuda .....	4
II.2 Air Susu Ibu (ASI).....	6
II.3 Bakteri Asam Laktat.....	7
II.4 Metabolisme Bakteri Asam Laktat .....	10
II.5 Teknologi Fermentasi .....	14
II.6 Susu Fermentasi.....	16
II.7 Probiotik.....	20
BAB III. PELAKSANAAN PENELITIAN .....	24
III.1 Alat dan Bahan .....	24
III.1.1 Alat yang digunakan .....	24
III.1.2 Bahan yang digunakan .....	24



III.2 Prosedur Kerja.....	24
III.2.1 Sterilisasi Alat.....	24
III.2.2 Pengambilan Sampel Penelitian.....	25
III.2.3 Pembuatan Medium.....	25
III.2.4 Pembuatan Kultur Starter.....	26
III.2.5 Pembuatan Susu Kuda Fermentasi.....	26
III.2.6 Pengujian Fermentasi Susu Kuda.....	27
III.2.7 Pengamatan dan Pengumpulan Data.....	28
III.2.8 Pembahasan Hasil Penelitian.....	28
III.2.9 Pengambilan Kesimpulan.....	28
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
IV.1 Hasil Penelitian.....	29
IV.2 Pembahasan.....	29
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	36
V.1 Kesimpulan.....	36
V.2 Saran.....	36
DAFTAR PUSTAKA.....	37
LAMPIRAN.....	45

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
1. Komposisi Kimia Susu dari Berbagai Jenis Mamalia.....	4
2. Nilai pH, Uji Organoleptik, Jumlah BAL dan Total Asam Susu Kuda Fermentasi .....	29
3. Hasil Uji Organoleptik dengan Menggunakan Panelis.....	39
4. Hasil Perhitungan Jumlah BAL dengan Metode SPC.....	40
5. Nilai ALT Bakteri Susu Kuda Fermentasi .....	41
6. Nilai pH Susu Kuda Fermentasi .....	41
7. Kadar Total Asam Laktat Susu Kuda Fermentasi.....	42

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Reaksi pembentukan asam laktat oleh BAL homofermentatif .....	12
2. Reaksi pembentukan asam laktat oleh BAL heterofermentatif .....	13
3. Produk susu kuda fermentasi .....	43
4. Koloni <i>Lactobacillus sp</i> pada medium GYPA + CaCO <sub>3</sub> .....	44

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja.....	45
2. Hasil Perhitungan Jumlah BAL (koloni/ml) secara Statistik dengan Metode RAL .....	46
3. Hasil Perhitungan Nilai pH secara Statistik dengan Metode RAL ...	48
4. Hasil Perhitungan Kadar Total Asam Laktat Secara Statistik dengan Metode RAL .....	51

## BAB I

### PENDAHULUAN

Susu fermentasi merupakan susu asam yang diperoleh melalui fermentasi susu oleh mikroorganisme tertentu. Saat ini, produk fermentasi dibuat secara pabikasi di banyak negara dengan menggunakan bakteri asam laktat (BAL) (1,2). Susu fermentasi dikonsumsi dalam bentuk berbagai jenis produk seperti mentega fermentasi, yoghurt, susu asidofilus, kefir, kaumiss, dan keju (3).

Pemanfaatan bakteri asam laktat dalam proses fermentasi makanan, selain memberikan rasa yang khas, memperpanjang masa simpan bahan pangan juga dapat mengurangi resiko timbulnya kanker atau tumor dalam saluran pencernaan atau organ tubuh yang lain. Bakteri asam laktat yang hidup dalam produk fermentasi susu menekan pertumbuhan bakteri lain di dalam saluran cerna. Bakteri asam laktat membentuk koloni dan menciptakan lingkungan dalam saluran pencernaan sedemikian rupa sehingga dapat mencegah pertumbuhan bakteri patogen yang masuk ke dalam tubuh. Hal ini menyebabkan bakteri asam laktat khususnya *Lactobacillus* dipilih sebagai probiotik (2,4).

Probiotik adalah suplemen dalam makanan yang mengandung bakteri yang menguntungkan. Keuntungan dari bakteri probiotik adalah meningkatkan aktivitas mikroflora dalam usus, memproduksi substansi antimikroba, mencegah konstipasi, membantu mengurangi resiko kanker kolon serta meningkatkan sistem kekebalan tubuh. Beberapa jenis

probiotik yang sering digunakan yaitu *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium biidus*, *Bifidobacterium ongum*, *Bifidobacterium brevis* (5,6).

Secara tradisional susu yang digunakan biasa berasal dari jenis binatang mamalia yang banyak ditemukan di daerah masing-masing, seperti susu kambing, susu unta, susu kerbau, dan yang paling umum adalah susu sapi (1). Namun, akhir-akhir ini susu kuda menjadi sangat populer penggunaannya dan diasumsikan sebagai obat karena mempunyai khasiat yang dapat menyembuhkan berbagai macam penyakit seperti kanker, leukemia, paru-paru basah, bronkhitis, dan tipus (7). Komponen kimia dari susu kuda yaitu lemak 1,5%, protein 2%, laktosa 6,14%, air 89,86% dan mineral 0,41%. Berdasarkan penelitian dari Balai Pengujian Mutu Produk Peternakan Bogor, susu kuda memiliki keistimewaan, secara fisik bila disimpan dalam suhu ruangan yang relatif lama tidak ada gumpalan dan tidak membusuk, serta memiliki spektrum luas dalam menghambat pertumbuhan berbagai bakteri. Sedangkan menurut peneliti utama pada Puslitbang Gizi Depkes RI Dr. Hermana, susu kuda lebih cocok dikonsumsi bayi karena komposisinya mendekati air susu ibu (ASI) serta kandungan kaseinnya lebih rendah dibandingkan susu sapi (7,8).

Telah dilakukan penelitian mengenai isolasi bakteri asam laktat dari air susu ibu dan bakteri asam laktat yang didapatkan adalah golongan

*Lactobacillus sp.* Telah dilakukan pula penelitian dan ternyata bakteri asam laktat isolat ASI ini dapat dimanfaatkan dalam memproduksi soygurt (9,10).

Adapun permasalahan yang timbul dari uraian di atas adalah dapatkah bakteri asam laktat isolat ASI memfermentasikan susu kuda dan lama inkubasi berapakah yang menghasilkan fermentasi susu kuda yang paling optimum, dengan kriteria pengujian meliputi organoleptik, pH, total BAL dan total asam laktat. Untuk itu, dilakukan penelitian pengaruh waktu inkubasi terhadap hasil fermentasi susu kuda oleh *Lactobacillus sp.* Isolat dari ASI. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan waktu inkubasi yang paling optimum terhadap fermentasi susu kuda.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### II.1 Susu Kuda

Bahan baku pembuatan yoghurt adalah susu dari beberapa jenis mamalia. Perbedaan asal susu akan mempengaruhi mutu yoghurt yang dihasilkan. Meskipun aroma yoghurt terutama dihasilkan oleh reaksi biokimia dari aktivitas mikroba, namun aroma bahan baku susu yang berbeda dari jenis hewan yang berbeda menjadi karakteristik produk akhir. Komponen utama dari susu adalah lemak, air, protein, laktosa dan mineral. Laktosa pada susu menyediakan energi bagi mikroorganisme kultur, tapi protein berperan penting dalam penggumpalan sehingga konsistensi atau viskositas produk berhubungan langsung dengan kandungan protein pada susu (2).

**Tabel 1.** Komposisi Kimia Susu (%) dari Berbagai Jenis Mamalia (8)

Jenis susu	Lemak	Protein	Laktosa	Mineral	Air
Kuda	1,54	2,00	6,14	0,41	89,86
Sapi	3,90	3,40	4,80	0,72	87,10
Manusia	3,80	1,20	7,00	0,21	87,60
Kerbau	7,40	4,74	4,64	0,78	82,44
Kambing	4,09	3,71	4,20	0,79	87,81



Komposisi kimia susu segar bervariasi dari hari kehari pada suatu keturunan yang tergantung pada tingkat laktasi dan umur hewan, musim dan suhu lingkungan, keturunan, efisiensi dan interval antara pemerahan, nutrisi, hormon dan penyakit (2).

Susu kuda akhir – akhir ini menjadi sangat populer penggunaannya dan diasumsikan sebagai obat karena dianggap mempunyai khasiat yang dapat menyembuhkan berbagai penyakit, seperti kanker, leukemia, paru-paru basah, bronkhitis dan tipus (7).

Susu kuda memiliki keistimewaan dibandingkan dengan susu sapi, yaitu bila disimpan dalam suhu ruangan yang relatif lama, susu ini tidak homogen, tidak ada gumpalan-gumpalan dan tidak membusuk, sedangkan pada susu sapi terlihat ada gumpalan dan berbau busuk. Susu kuda lebih cocok dikonsumsi bayi dibandingkan susu sapi karena komposisi kandungan gizinya sangat mendekati air susu ibu. Susu sapi memiliki kandungan kasein yang tinggi, dan akan menggumpal di dalam perut bayi sehingga sulit dicerna (7).

Susu kuda memiliki spektrum luas dalam menghambat pertumbuhan berbagai bakteri. Bakteri patogen dan perusak pangan seperti *Shigella boydii*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio Cholera*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Micrococcus luteus*, pertumbuhannya dapat dihambat (7).

## II.2 Air Susu Ibu (ASI)

Air susu ibu adalah suatu emulsi lemak dalam protein, laktosa dan garam-garam organik yang disekresikan oleh kedua kelenjar payudara ibu dan sebagai makanan utama bagi bayi (12).

Hadiah pertama kelahiran manusia adalah bakteri dari sang ibu, baik dari rahim, jalan lahir, maupun dari ASI. Komposisi bakteri usus bayi yang minum ASI didominasi oleh *Bifidobacterium* yang termasuk dalam kelompok bakteri baik bagi manusia dan umumnya memenuhi status GRAS (*Generally Recognized As Safe*), yaitu aman bagi manusia. Kelompok ini tidak membusukkan protein dan dapat memetabolisme berbagai jenis karbohidrat secara fermentatif menjadi asam laktat sehingga disebut bakteri asam laktat. *Bifidobacterium* menjadi penting karena merupakan salah satu probiotik yang dapat menekan pertumbuhan mikroba patogen dalam usus bayi dan merangsang kekebalan tubuh bayi (4).

ASI mengandung zat protektif, yaitu flora normal bakteri *Lactobacillus sp.* yang berfungsi mengubah laktosa menjadi asam laktat dan asam asetat. Keduanya bersifat asam pada pencernaan yang mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme, seperti *E. coli*, juga mengandung laktoferin yaitu protein yang berikatan dengan zat besi. Dengan mengikat zat besi, maka laktoferin bermanfaat untuk menghambat pertumbuhan kuman tertentu, seperti *Staphylococcus* dan *Eshcericia sp.* Selain itu, ASI juga mengandung enzim yang dapat

memecah dinding bakteri (lisosim), antistreptokokus yang melindungi bayi dari infeksi kuman tertentu serta memiliki antibodi yang dapat mencegah bakteri patogen dan enterovirus masuk ke dalam usus (13).

Kelebihan ASI dibandingkan dengan susu sapi dan susu formula, yaitu bayi yang diberi susu formula terancam obesitas. Kebanyakan susu formula berbasis susu sapi yang mengandung protein jauh lebih banyak dari protein manusia. Sebagian besar dari protein tersebut adalah kasein, dan sisanya berupa protein "whey" yang larut. Kandungan kasein yang tinggi tersebut akan membentuk gumpalan yang relatif keras dalam lambung bila bayi diberi susu sapi. Sedangkan ASI walaupun mengandung lebih sedikit total protein, namun bagian protei "whey"-nya lebih banyak, sehingga akan membentuk gumpalan yang lunak dan lebih mudah dicerna serta diserap oleh usus bayi (14).

### **II.3 Bakteri Asam Laktat**

Bakteri asam laktat termasuk baik pada manusia dan pada umumnya memenuhi status "GRAS", yaitu aman bagi manusia. Istilah bakteri asam laktat mulanya ditujukan hanya untuk sekelompok bakteri yang menyebabkan keasaman pada susu (milk souring organisms). Secara umum bakteri asam laktat didefinisikan sebagai suatu kelompok bakteri gram positif, tidak menghasilkan spora, katalase, negatif, berbentuk bulat atau batang, tidak mempunyai sitokrom, aerotoleran, anaerobik sampai mikroerobik, tidak bergerak, dan menghasilkan asam

laktat sebagai produk akhir metabolit utama selama fermentasi karbohidrat (15).

Bakteri asam laktat memerlukan nutrisi yang sangat kompleks, oleh sebab itu pada umumnya habitatnya ditemukan pada bahan yang kaya akan nutrisi seperti berbagai jenis makanan (susu, daging, minuman dan sayuran), namun beberapa genusnya merupakan penghuni dalam mulut, saluran usus, dan vagina dari mamalia (15).

Kondisi keasaman optimum bagi bakteri asam laktat adalah kisaran pH sekitar 4,0 – 5,0 sehingga bakteri asam laktat sangat kompetitif dibandingkan dengan mikroorganisme lain yang ada pada susu. Toleransi terhadap keasaman beragam pada setiap strain. *Lactobacillus sp.* dan *Pediococcus sp.* sangat toleran terhadap pH di bawah 4,6. Bakteri asam laktat juga mempunyai toleransi terhadap asam tidak terdisosiasi seperti asam asetat, dan *Lactobacillus sp.* lebih tahan terhadap asam dibanding dengan *Leuconostoc sp.*, *Streptococcus sp.*, dan *Lactococcus* (15).

Berdasarkan aktivitas metabolismenya bakteri asam laktat dibagi dalam 2 kelompok, yaitu (4):

- (1) Bakteri asam laktat homofermentatif melibatkan jalur Embden Meyerhof, yaitu glikolisis menghasilkan asam laktat, 2 mol ATP, 1 molekul glukosa/heksosa dalam kondisi normal, tidak menghasilkan CO<sub>2</sub> dan menghasilkan biomassa sel dua kali lebih banyak daripada bakteri asam laktat heterofermentatif. Secara umum Bakteri asam laktat homofermentatif digunakan dalam fermentasi susu menjadi

yoghurt dan juga menghasilkan asam laktat sebagai asidulan dalam industri makanan dan industri polilaktat suatu industri polimer atau palstik ramah lingkungan. Bakteri ini lebih dari 85% produk akhirnya adalah asam laktat.

- (2) Bakteri asam laktat heterofermentatif melalui jalur 6-fosfoglukonat/fosfoketolase, selain meghasilkan asam laktat juga menghasilkan etanol, CO<sub>2</sub>, asam asetat. Bakteri ini banyak dimanfaatkan dalam industri susu untuk menghasilkan keju dan senyawa flavor, senyawa citarasa maupun pengental, yaitu eksopolisakarida.

Fermentasi oleh bakteri asam laktat menghasilkan pengawetan serta transformasi susu dan proses ini tanpa disadari telah digunakan selama beberapa ribu tahun lalu. Bakteri asam laktat yang terlibat dalam proses fermentasi susu juga memberikan manfaat positif bagi kesehatan. Manfaat kesehatan yang berkaitan dengan bakteri asam laktat, diantaranya menjaga keseimbangan mikroflora dalam saluran pencernaan, memperbaiki daya cerna laktosa, mengendalikan bakteri patogen dalam saluran pencernaan, penurunan serum kolesterol, menghambat tumor, antimutagenik dan antikarsinogenik, menstimulir sistem imun, pencegahan sembelit, produksi vitamin B, produksi bakteriosin dan inaktivasi berbagai senyawa beracun (4).

Bakteri asam laktat menghasilkan berbagai senyawa metabolit lainnya disamping asam laktat, diantaranya adalah hidrogen peroksida,

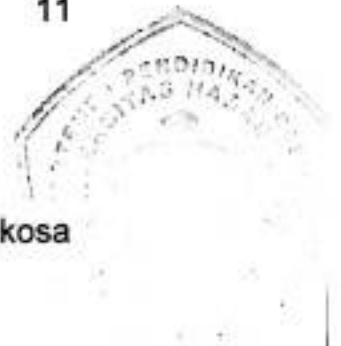
bakteriosin, enzim  $\beta$ -galaktosidase, eksopolisakarida, dan asam asetat (4).

#### II.4 Metabolisme Bakteri Asam Laktat

Dalam pertumbuhannya, mikroba membutuhkan zat-zat nutrisi untuk sintesa komponen sel. Karbohidrat merupakan substrat utama yang dipecah dalam proses fermentasi. Polisakarida terlebih dahulu akan dipecah menjadi gula sederhana sebelum difermentasi, misalnya hidrolisa pati menjadi unit-unit glukosa kemudian akan dipecah menjadi senyawa lain tergantung dari jenis fermentasinya (16).

- a. Fermentasi glukosa pada prinsipnya terdiri dari dua tahap, yaitu (16) :
  - (1) Pemecahan rantai karbon dari glukosa dan pelepasan paling sedikit dua pasang atom hidrogen, menghasilkan senyawa karbon lainnya yang lebih teroksidasi daripada glukosa.
  - (2) Senyawa yang teroksidasi tersebut direduksi kembali oleh atom hidrogen yang dilepaskan dalam tahap pertama, membentuk senyawa-senyawa lain sebagai hasil fermentasi. Reaksi oksidasi tidak dapat berlangsung tanpa reaksi reduksi yang seimbang. Oleh karena itu, jumlah atom hidrogen yang dilepaskan dalam tahap pertama fermentasi selalu seimbang dengan jumlah yang digunakan dalam tahap kedua. Dalam tahap pertama fermentasi glukosa selalu terbentuk asam piruvat.





b. Pada jasad renik dikenal paling sedikit empat jalur pemecahan glukosa menjadi asam piruvat (16) :

- (1) Jalur Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP atau glikolisis), ditemukan pada fungi dan kebanyakan bakteri, serta pada hewan dan manusia.
- (2) Jalur Entner-Doudoroff (ED), hanya ditemukan pada beberapa bakteri.
- (3) Jalur Heksosamonofosfat (HMP), ditemukan pada berbagai organisme.
- (4) Jalur Fosfoketolase (FK), hanya ditemukan pada bakteri yang tergolong Laktobasil heterofermentatif.

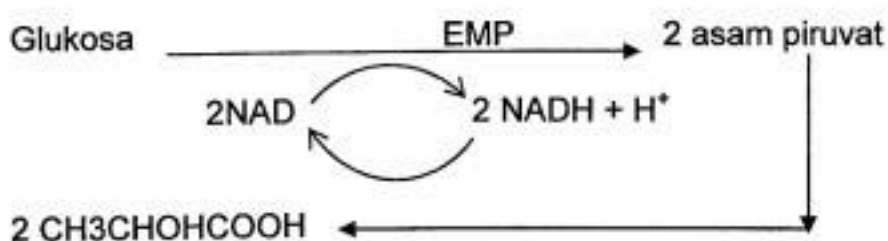
Jalur EMP terdiri dari beberapa tahap, masing-masing dikatalisis oleh enzim tertentu. Jalur ini ditandai dengan pembentukan fruktosa difosfat, dilanjutkan dengan pemecahan fruktosa difosfat menjadi dua molekul gliseraldehida fosfat. Reaksi II dikemas oleh enzim aldolase. Kemudian terjadi reaksi dehidrogenasi gliseradehida fosfat (fosfogliseraldehida) yang merupakan reaksi oksidasi yang menghasilkan energi dalam bentuk ATP. Reaksi ini dikatalis oleh enzim gliseraldehida fosfat dehidrogenase. Atom hidrogen yang terlepas akan ditangkap oleh nikotinamida-adenin-dinukleotida (NAD), membentuk  $\text{NADH}_2$ . Proses fermentasi dapat berlangsung terus jika  $\text{NADH}_2$  dapat dioksidasi kembali pada tahap kedua fermentasi sehingga melepaskan atom hidrogen

kembali. Jadi NAD berfungsi sebagai pembawa hidrogen dalam proses fermentasi (16).

Energi yang dilepaskan selama oksidasi gliseraldehida fosfat cukup untuk membentuk dua molekul ATP karena satu molekul glukosa menghasilkan dua molekul gliseroldehida fosfat, maka seluruhnya dibentuk empat molekul ATP. Tetapi karena dua molekul ATP dibutuhkan untuk mengubah glukosa menjadi fruktosa difosfat hanya tinggal dua molekul ATP yang dapat digunakan untuk pertumbuhan untuk setiap molekul glukosa yang dipecah. Reaksi keseluruhannya adalah sebagai berikut (16):



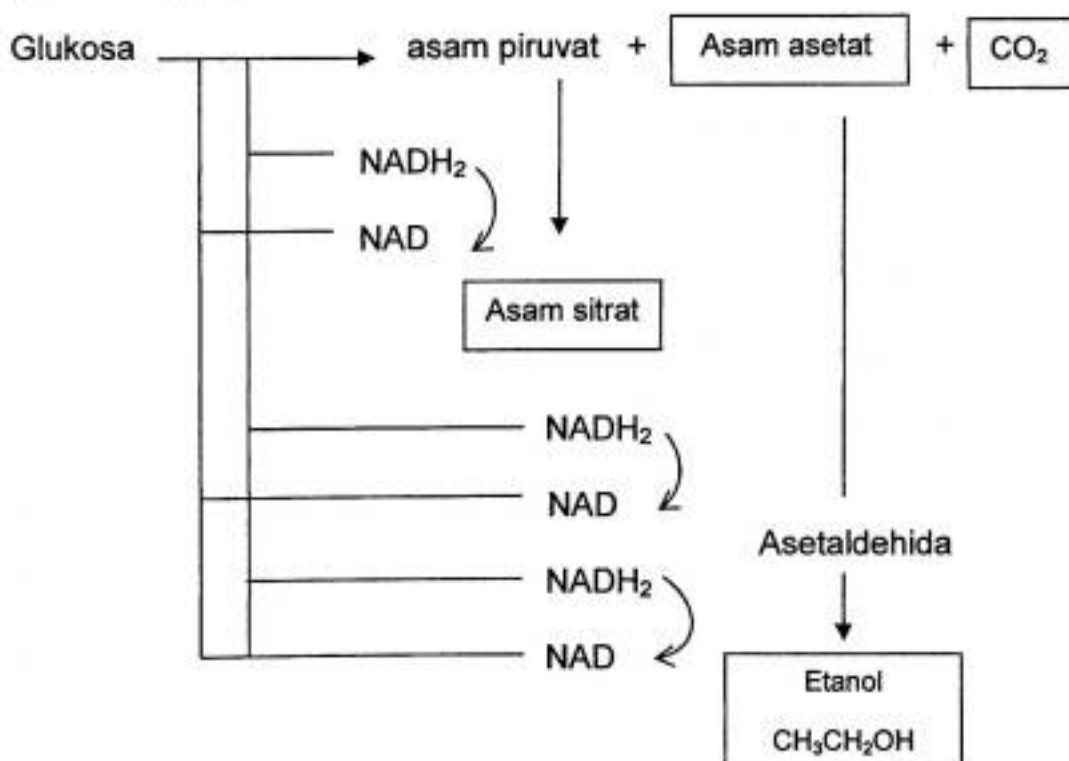
Pada tahap kedua fermentasi, asam piruvat akan diubah menjadi produk-produk akhir yang spesifik untuk berbagai proses fermentasi, menggunakan atom hidrogen yang diproduksi pada tahap pertama fermentasi. Produk-produk tersebut terbentuk oleh reaksi-reaksi yang dikatalisis oleh enzim-enzim tertentu. Pada bakteri asam laktat, asam piruvat yang terbentuk dari jalur glikolisis (EMP) bertindak sebagai penerima hidrogen, dimana reduksi asam piruvat oleh  $\text{NADH}_2$  menghasilkan asam laktat dengan reaksi sebagai berikut (gambar 1) (16) :





Fermentasi seperti tersebut di atas disebut fermentasi homolaktat karena satu-satunya produk fermentasi adalah asam laktat, dan bakteri yang melakukan fermentasi demikian disebut bakteri asam laktat homofermentatif. Bakteri tersebut sering digunakan dalam pengawetan makanan, karena produksi asam laktat dalam jumlah tinggi di dalam makanan dapat menghambat pertumbuhan bakteri lainnya yang menyebabkan kebusukan makanan. Bakteri asam laktat yang termasuk homofermentatif, misalnya *Streptococcus*, *Pediococcus*, dan beberapa spesies *Lactobacillus* (16).

Grup bakteri asam laktatnya adalah bakteri asam laktat heterofermentatif karena selain menghasilkan asam laktat juga memproduksi senyawa-senyawa lainnya. Rekasinya sebagai berikut (gambar 2) (16) :



Hasil reaksi keseluruhan adalah sebagai berikut (16):



## II.5 Teknologi Fermentasi

Teknologi fermentasi merupakan ilmu dan teknik terapan yang saat ini berkembang pesat. Teknologi fermentasi menerapkan secara terpadu cabang-cabang ilmu mikrobiologi, biokimia, kimia, biologi molekular dan genetika. Teknologi fermentasi adalah telah membuka lembaran baru dalam upaya manusia untuk memanfaatkan bahan-bahan yang murah harganya bahkan tidak berharga menjadi produk – produk yang bernilai tinggi dan berguna bagi kesejahteraan umat manusia. Lebih lanjut lagi kemajuan-kemajuan yang dicapai dibidang teknologi fermentasi telah memungkinkan manusia untuk memproduksi berbagai jenis produk yang tidak dapat atau sulit diproduksi melalui proses kimia (3).

Penelitian-penelitian di bidang teknologi fermentasi telah banyak dan terus dilakukan, dan banyak pula hasilnya yang telah diterapkan secara komersil. Penelitian-penelitian dibidang teknologi fermentasi mencakup antara lain sifat-sifat biokimia dan aktivitas metabolisme mikroba, mencari galur-galur baru yang mampu memproduksi produktivitas yang lebih tinggi, pembakuan inokulum, mencari kondisi yang optimum untuk pertumbuhan organisme tertentu dan produksi produk tertentu, mencari bahan-bahan mentah terutama yang banyak tersedia dan harganya murah untuk dimanfaatkan sebagai substrat atau untuk ditingkatkan mutu dan dayagunanya (3).

Hasil reaksi keseluruhan adalah sebagai berikut (16):



## II.5 Teknologi Fermentasi

Teknologi fermentasi merupakan ilmu dan teknik terapan yang saat ini berkembang pesat. Teknologi fermentasi menerapkan secara terpadu cabang-cabang ilmu mikrobiologi, biokimia, kimia, biologi molekular dan genetika. Teknologi fermentasi adalah telah membuka lembaran baru dalam upaya manusia untuk memanfaatkan bahan-bahan yang murah harganya bahkan tidak berharga menjadi produk – produk yang bernilai tinggi dan berguna bagi kesejahteraan umat manusia. Lebih lanjut lagi kemajuan-kemajuan yang dicapai dibidang teknologi fermentasi telah memungkinkan manusia untuk memproduksi berbagai jenis produk yang tidak dapat atau sulit diproduksi melalui proses kimia (3).

Penelitian-penelitian di bidang teknologi fermentasi telah banyak dan terus dilakukan, dan banyak pula hasilnya yang telah diterapkan secara komersil. Penelitian-penelitian dibidang teknologi fermentasi mencakup antara lain sifat-sifat biokimia dan aktivitas metabolisme mikroba, mencari galur-galur baru yang mampu memproduksi produktivitas yang lebih tinggi, pembakuan inokulum, mencari kondisi yang optimum untuk pertumbuhan organisme tertentu dan produksi produk tertentu, mencari bahan-bahan mentah terutama yang banyak tersedia dan harganya murah untuk dimanfaatkan sebagai substrat atau untuk ditingkatkan mutu dan dayagunanya (3).

Teknologi fermentasi mempunyai cakupan bidang yang luas, yaitu mulai dari teknik produksi biomassa (inokulum, protein sel tunggal), produksi asam-asam organik, asam-asam amino, enzim, vitamin, antibiotika dan pada teknik penanganan limbah (3).

a. Pada saat ini secara garis besarnya, industri fermentasi dibedakan menjadi empat kelompok sebagai berikut (17) :

(1) Industri fermentasi yang menghasilkan biomassa sel mikroorganisme seperti industri ragi roti dan produk sel tunggal (PST).

(2) Industri fermentasi yang menghasilkan enzim mikrobial seperti amilase, protease, katalase, lipase, selulose dan lain-lain.

(3) Industri fermentasi yang menghasilkan metabolit tertentu, misalnya alkohol, gliserol, asam cuka, glutamat, polisakarida, vitamin dan lain-lain.

(4) Industri fermentasi yang menghasilkan senyawa-senyawa kimia tertentu dengan proses transformasi seperti steroid, antibiotika, prostaglandin dan lain-lain.

b. Karakteristik dari suatu proses fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu (18):

(1) Jenis mikroorganismenya yang digunakan dalam fermentasi.

(2) Kondisi lingkungan yang optimum (pH, konsentrasi oksigen terlarut, kandungan nutrisi) untuk mencapai pertumbuhan dan pembentukan produk yang efektif.

- (3) Bentuk dari alat fermentasi dan kemampuannya dalam memberikan transfer massa (oksigen, nutrisi, produk metabolik) dan transfer panas.
- (4) Sistem fermentasi yang digunakan, yaitu sistem batch, fed-batch, semi batch atau fermentasi kontinyu.

Fermentasi bahan pangan adalah hasil kegiatan beberapa jenis mikroorganisme diantara beribu-ribu jenis bakteri, khamir dan kapang yang telah dikenal. Mikroorganisme yang memfermentasikan bahan pangan untuk menghasilkan perubahan yang diinginkan dapat dibedakan dari mikroorganisme yang menyebabkan kerusakan dan penyakit. Mikroorganisme yang paling penting dibutuhkan bahan pangan adalah bakteri pembentuk asam laktat, pembentuk asam asetat dan beberapa jenis khamir penghasil alkohol (8).

## **II.6 Fermentasi susu**

Air susu itu bukan saja makanan yang baik bagi manusia, akan tetapi juga baik bagi banyak spesies bakteri. Protein, lemak dan gula yang dikandungnya itu merupakan substrat bagi banyak bakteri. Bakteri yang hampir selalu ada dalam susu ialah bakteri penghasil asam susu (24).

Susu fermentasi merupakan salah satu produk olahan susu, diperoleh melalui proses fermentasi susu oleh mikroorganisme tertentu sehingga dihasilkan susu asam. Secara tradisional susu yang digunakan bisa berasal dari jenis binatang mamalia yang banyak ditemukan didaerah masing-masing (1) .

Proses fermentasi yang berlangsung dapat melibatkan mikroorganisme tunggal maupun campuran dari spesies bakteri ataupun khamir. Fermentasi yang terjadi mengubah laktosa dalam susu menjadi asam laktat. Namun, ada beberapa jenis susu fermentasi lain juga melibatkan fermentasi alkohol. Masing-masing mikroorganisme menghasilkan karakteristik fisik yang berbeda diakhir proses fermentasi, terutama dalam hal tekstur, falvor, dan aroma (1).

Kultur starter bakteri bakteri asam laktat (kultur starter laktat) dalam fermentasi susu dapat didefinisikan sebagai biakan mikroorganisme yang diinginkan dan akan menghasilkan perubahan-perubahan yang menguntungkan selama proses fermentasi (1).

Pada proses pembuatan susu fermentasi ada dua tahapan, yaitu tahap pertama pembuatan susu fermentasi dan tahap kedua pembuatan produk akhir (sebagai minuman susu fermentasi). Tahap pertama pada saat persiapan proses harus diyakini bahwa bahan baku telah sesuai spesifikasi (susu dan kultur bakterinya). Pada saat proses pembuatan susu fermentasi parameter yang paling penting adalah kontrol suhu dan waktu. Parameter mutu susu fermentasi adalah jumlah bakteri, total asam dan pH. Parameter mutu tahap kedua adalah penyesuaian spesifikasi produk akhir yang diinginkan dan parameter mutu prosesnya disesuaikan dengan teknologi pengemasan dan jenis kemasan yang digunakan (1).



a. Jenis-jenis susu fermentasi, antara lain (4,6):

(1) Yoghurt

Yoghurt mempunyai rasa asam yang sedang, melibatkan bakteri *Lactobacillus delbrueckii* dan *S. thermophilus*, yang secara alami terdapat dalam susu atau sengaja ditambahkan sebagai kultur starter sebanyak 2 – 5% dengan perbandingan 1:1. Suhu fermentasi optimum adalah 42 – 45°C selama 3 – 6 jam hingga mencapai pH 4,4 dan kadar asam tertitrasi mencapai 0,9 – 1,2%.

(2) Buttermilk Bulgarian

Jenis susu fermentasi ini sangat asam, melibatkan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* saja, yaitu 2 % kultur starter dinokulasikan pada susu full cream yang dipasteurisasi pada suhu 38 – 42°C selama 11 – 12 jam sampai terbentuk gumpalan dengan total asam tertitrasi sebesar 1,4% sehingga citarasa asamnya sangat tajam.

(3) Susu asam asidofilus

Susu fermentasi ini hanya melibatkan kultur starter tunggal *Lactobacillus acidophilus*. Pertumbuhan bakterinya sangat lambat, hanya meningkat 5 kali dalam 18 – 24 jam dengan keasaman dibawah 0,8%.

(4) Yakult

Susu ini difermentasi dengan *Lactobacillus casei shirota* strain, dimana waktu fermentasinya selama 7 hari pada suhu 37°C, dalam

a. Jenis-jenis susu fermentasi, antara lain (4,6):

(1) Yoghurt

Yoghurt mempunyai rasa asam yang sedang, melibatkan bakteri *Lactobacillus delbrueckii* dan *S. thermophilus*, yang secara alami terdapat dalam susu atau sengaja ditambahkan sebagai kultur starter sebanyak 2 – 5% dengan perbandingan 1:1. Suhu fermentasi optimum adalah 42 – 45°C selama 3 – 6 jam hingga mencapai pH 4,4 dan kadar asam tertitrasi mencapai 0,9 – 1,2%.

(2) Buttermilk Bulgarian

Jenis susu fermentasi ini sangat asam, melibatkan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* saja, yaitu 2 % kultur starter dinokulasikan pada susu full cream yang dipasteurisasi pada suhu 38 – 42°C selama 11 – 12 jam sampai terbentuk gumpalan dengan total asam tertitrasi sebesar 1,4% sehingga citarasa asamnya sangat tajam.

(3) Susu asam asidofilus

Susu fermentasi ini hanya melibatkan kultur starter tunggal *Lactobacillus acidophilus*. Pertumbuhan bakterinya sangat lambat, hanya meningkat 5 kali dalam 18 – 24 jam dengan keasaman dibawah 0,8%.

(4) Yakult

Susu ini difermentasi dengan *Lactobacillus casei shirota* strain, dimana waktu fermentasinya selama 7 hari pada suhu 37°C, dalam



a. Jenis-jenis susu fermentasi, antara lain (4,6):

(1) Yoghurt

Yoghurt mempunyai rasa asam yang sedang, melibatkan bakteri *Lactobacillus delbrueckii* dan *S. thermophilus*, yang secara alami terdapat dalam susu atau sengaja ditambahkan sebagai kultur starter sebanyak 2 – 5% dengan perbandingan 1:1. Suhu fermentasi optimum adalah 42 – 45°C selama 3 – 6 jam hingga mencapai pH 4,4 dan kadar asam tertitrasi mencapai 0,9 – 1,2%.

(2) Buttermilk Bulgarian

Jenis susu fermentasi ini sangat asam, melibatkan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* saja, yaitu 2 % kultur starter dinokulasikan pada susu full cream yang dipasteurisasi pada suhu 38 – 42°C selama 11 – 12 jam sampai terbentuk gumpalan dengan total asam tertitrasi sebesar 1,4% sehingga citarasa asamnya sangat tajam.

(3) Susu asam asidofilus

Susu fermentasi ini hanya melibatkan kultur starter tunggal *Lactobacillus acidophilus*. Pertumbuhan bakterinya sangat lambat, hanya meningkat 5 kali dalam 18 – 24 jam dengan keasaman dibawah 0,8%.

(4) Yakult

Susu ini difermentasi dengan *Lactobacillus casei shirota* strain, dimana waktu fermentasinya selama 7 hari pada suhu 37°C, dalam

kondisi yang sangat higienis. Yakult adalah minuman susu fermentasi berbentuk cair dengan penambahan 14% gula. Bakteri hidup yang terkandung pada produk akhir adalah  $10^8$  koloni/ml.

(5) Susu fermentasi probiotik

Susu fermentasi probiotik diproduksi dengan melibatkan bakteri probiotik, yaitu bakteri asam laktat maupun Bifidobakteria yang bersifat probiotik, diantaranya adalah *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* dan *Bifidobacterium sp.*

(6) Kefir

Kefir merupakan produk fermentasi susu dengan aroma rasa yang khas, yaitu campuran rasa asam, alkoholik, dan karbonat yang dihasilkan dari proses fermentasi bakteri dan khamir.

(7) Sour cream

Produk ini biasanya mempunyai kadar lemak antara 12-30% tergantung dari karakteristik produk yang dikehendaki.

b. Beberapa manfaat produk susu fermentasi terhadap kesehatan adalah sebagai berikut (6,19):

(1) Membantu penderita *lactose intolerance*.

Minum susu terfermentasi seperti yoghurt sangat dianjurkan bagi orang yang mengalami defisiensi enzim. Bakteri asam laktat dapat memfermentasi laktosa yang ada dalam susu menjadi glukosa dan galaktosa, serta merangsang sekresi enzim laktase di dalam saluran pencernaan.

(2) Antidiare

*Lactobacillus bulgaricus* ( salah satu bakteri yang berperan dalam pembentukan yoghurt) dapat memproduksi *Bulgarican*, yaitu antimikroba yang efektif untuk menghambat organisme patogen.

(3) Mengurangi resiko timbulnya kanker atau tumor saluran pencernaan. Bakteri-bakteri yang berperan dalam fermentasi susu dapat mengubah zat-zat prekarsinogenik yang ada dalam saluran pencernaan sehingga dapat menghambat terjadinya kanker.

(4) Menghambat pertumbuhan bakteri patogen.

Asam laktat dapat mengurangi atau membunuh bakteri patogen (bakteri penyebab penyakit) dan menekan produksi senyawa-senyawa berbahaya, seperti amin, fenol, skatol, dan  $H_2S$  yang diproduksi oleh bakteri patogen. Bakteri penghasil asam laktat juga memproduksi antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen.

(5) Mengatur saluran pencernaan.

Asam laktat dapat merangsang gerakan peristaltik hampir pada semua bagian dalam saluran pencernaan. Rangsangan gerakan peristaltik tersebut dapat memelihara kesehatan tubuh melalui peningkatan proses pencernaan, penyerapan, pembuangan feses, dan pembuangan bakteri patogen dari saluran pencernaan.

## II.7 Probiotik

Probiotik adalah suplemen dalam makanan yang mengandung bakteri yang sangat menguntungkan. Probiotik umumnya diketahui dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh. Banyak penelitian yang membuktikan bahwa probiotik akan membentuk koloni sementara yang dapat membantu aktivitas tubuh dengan fungsi yang sama dengan mikroflora alami dalam saluran pencernaan (5).

- a. Tidak semua bakteri dapat dimanfaatkan sebagai agen probiotik. Jenis yang dipilih harus memiliki karakteristik sebagai berikut (20):
  - (1) Memiliki aktivitas antimikroba. Dalam hal ini probiotik berperan sebagai antibiotik alami. Beberapa jenis bakteri asam laktat mampu membentuk asam-asam organik, hidrogen peroksida dan bakteriosin. Senyawa-senyawa ini terutama bakteriosin dapat menyebabkan kematian pada bakteri lain.
  - (2) Resisten terhadap seleksi sistem saluran pencernaan seperti asam lambung, cairan empedu dan getah pankreas. Apabila bakteri tidak memiliki karakteristik ini, maka bakteri tersebut akan mati sebelum mencapai usus.
  - (3) Memiliki aktivitas antikarsinogenik. Adanya senyawa karsinogenik seperti nitrosamine yang masuk ke saluran pencernaan, akan dapat dicegah penyerapannya oleh bakteri tersebut dengan membentuk selaput protein dan vitamin.

- (4) Mampu berkoloni dalam saluran pencernaan. Bakteri probiotik harus memiliki kemampuan untuk bersimbiosis dengan flora usus, sehingga dapat melakukan proses yang diinginkan dan tidak cepat terbuang oleh tinja.
  - (5) Mampu meningkatkan kemampuan penyerapan usus. Beberapa penyakit seperti diare pada anak-anak dapat terjadi karena kurangnya enzim laktase dalam tubuh sehingga saluran pencernaan tidak dapat mencerna susu.
- b. Hasil penelitian menunjukkan beberapa manfaat dari probiotik adalah (21):
- (1) Mencegah kanker yaitu dengan menghilangkan bahan prokarsinogen dari tubuh dan mengaktifkan sistem kekebalan tubuh.
  - (2) Dinding sel *Bifido infantis* mengandung bahan aktif anti tumor. Di dalam usus manusia *Bifido infantis* memproduksi berbagai vitamin yang mudah terserap oleh tubuh.
  - (3) Kemampuan memproduksi asam laktat dan asam asetat di usus akan menyebabkan usus menjadi asam dan akhirnya menekan pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *Clostridium prefringens* penyebab radang usus. Disamping itu juga menekan bakteri patogen lainnya. Asam-asam tersebut juga mengurangi penyerapan ammonia dan amina karena bila terserap dalam jumlah besar akan meningkatkan tekanan darah, kolesterol dan kanker yang disebabkan nitrosamino.

- (4) Mampu berkoloni dalam saluran pencernaan. Bakteri probiotik harus memiliki kemampuan untuk bersimbiosis dengan flora usus, sehingga dapat melakukan proses yang diinginkan dan tidak cepat terbuang oleh tinja.
  - (5) Mampu meningkatkan kemampuan penyerapan usus. Beberapa penyakit seperti diare pada anak-anak dapat terjadi karena kurangnya enzim laktase dalam tubuh sehingga saluran pencernaan tidak dapat mencerna susu.
- b. Hasil penelitian menunjukkan beberapa manfaat dari probiotik adalah (21):
- (1) Mencegah kanker yaitu dengan menghilangkan bahan prokarsinogen dari tubuh dan mengaktifkan sistem kekebalan tubuh.
  - (2) Dinding sel *Bifido infantis* mengandung bahan aktif anti tumor. Di dalam usus manusia *Bifido infantis* memproduksi berbagai vitamin yang mudah terserap oleh tubuh.
  - (3) Kemampuan memproduksi asam laktat dan asam asetat di usus akan menyebabkan usus menjadi asam dan akhirnya menekan pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *Clostridium prefringens* penyebab radang usus. Disamping itu juga menekan bakteri patogen lainnya. Asam-asam tersebut juga mengurangi penyerapan ammonia dan amina karena bila terserap dalam jumlah besar akan meningkatkan tekanan darah, kolesterol dan kanker yang disebabkan nitrosamino.

(4) *Streptococcus thermophilus* menunjukkan aktivitas antitumor dan menghasilkan superoxide dismutase yang berfungsi sebagai antioksidan.

Meskipun penggunaan formula probiotik dapat meningkatkan aktivitas mikroflora dalam usus, namun akan lebih efektif jika dibantu juga dengan prebiotik, seperti inulin dan gandum. Hal ini akan menyebabkan mekanismenya menjadi lebih baik karena tanpa sumber makanan yang tepat dalam pencernaan, maka mikroorganisme probiotik akan mati (5).



## **BAB III**

### **PELAKSANAAN PENELITIAN**

#### **III.1. Alat dan Bahan yang Digunakan**

Alat yang digunakan adalah autoklaf, batang pengaduk, botol fermentasi, botol pengencer, buret, cawan petri, gelas piala, gelas ukur, inkubator, kompor gas, labu erlenmeyer, laminar air flow (LAF), lampu spiritus, lemari pendingin, ose bulat, oven, rak tabung, sendok tanduk, spoit, statif + klem, tabung reaksi, termometer, timbangan analitik.

Bahan yang digunakan adalah air suling, alkohol 70%, aluminium foil, biakan murni bakteri asam laktat isolat ASI, susu kuda, kertas pH universal, kertas timbang, medium Glucose Yeast Pepton Agar (GYPA) +  $\text{CaCO}_3$ , medium MRSA, medium starter, glukosa, indikator fenolftalein 1%, NaOH 0,1N.

#### **III.2 Metode kerja**

##### **III.2.1 Sterilisasi Alat**

Alat-alat yang diperlukan dicuci dengan air sampai bersih. Selanjutnya, alat-alat gelas ditutup dengan kertas perkamen dan disterilkan pada oven pada suhu  $160^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam. Ose dan pinset disterilkan dengan cara pemijaran langsung pada nyala api spiritus sedangkan untuk alat-alat tidak tahan pada pemanasan tinggi disterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.



## **BAB III**

### **PELAKSANAAN PENELITIAN**

#### **III.1. Alat dan Bahan yang Digunakan**

Alat yang digunakan adalah autoklaf, batang pengaduk, botol fermentasi, botol pengencer, buret, cawan petri, gelas piala, gelas ukur, inkubator, kompor gas, labu erlenmeyer, laminar air flow (LAF), lampu spiritus, lemari pendingin, ose bulat, oven, rak tabung, sendok tanduk, spoit, statif + klem, tabung reaksi, termometer, timbangan analitik.

Bahan yang digunakan adalah air suling, alkohol 70%, aluminium foil, biakan murni bakteri asam laktat isolat ASI, susu kuda, kertas pH universal, kertas timbang, medium Glucose Yeast Pepton Agar (GYPA) +  $\text{CaCO}_3$ , medium MRSA, medium starter, glukosa, indikator fenolftalein 1%, NaOH 0,1N.

#### **III.2 Metode kerja**

##### **III.2.1 Sterilisasi Alat**

Alat-alat yang diperlukan dicuci dengan air sampai bersih. Selanjutnya, alat-alat gelas ditutup dengan kertas perkamen dan disterilkan pada oven pada suhu  $160^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam. Ose dan pinset disterilkan dengan cara pemijaran langsung pada nyala api spiritus sedangkan untuk alat-alat tidak tahan pada pemanasan tinggi disterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.

### III.2.2 Pengambilan Sampel Penelitian

Sampel penelitian berupa susu kuda diperoleh dari Desa Panrang Kec. Batang Kab. Jennepono. Mikroorganisme yang digunakan yaitu *Lactobacillus sp.* isolat ASI.

### III.2.3 Pembuatan Medium

#### a. Medium MRSA

Komposisi :

MRSA 52 g, Agar 15 g, Air suling 1000 ml.

Cara membuat :

Bahan-bahan ditimbang sesuai kebutuhan dan dimasukkan kedalam labu erlenmeyer. Lalu dilarutkan dengan air suling hingga 1000 ml kemudian dipanaskan hingga larut lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C tekanan 2 atm selama 15 menit.

#### b. Medium Glukosa Yeast Pepton Agar (GYPA)

Komposisi :

Glukosa 1%, Ekstrak khamir 1%, Pepton 1%, Mineral solution 1 ml per 200 ml medium, Agar 1,5%, CaCO<sub>3</sub> 1%, pH 6,7-7

Cara membuat

Semua bahan ditimbang sesuai perhitungan dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer. Lalu dilarutkan dengan air suling kemudian dipanaskan hingga larut lalu ditambahkan mineral solution kemudian dicek pH 6,7 – 7. Disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit.

### III.2.2 Pengambilan Sampel Penelitian

Sampel penelitian berupa susu kuda diperoleh dari Desa Panrang Kec. Batang Kab. Jennepono. Mikroorganisme yang digunakan yaitu *Lactobacillus sp.* isolat ASI.

### III.2.3 Pembuatan Medium

#### a. Medium MRSA

Komposisi :

MRSA 52 g, Agar 15 g, Air suling 1000 ml.

Cara membuat :

Bahan-bahan ditimbang sesuai kebutuhan dan dimasukkan kedalam labu erlenmeyer. Lalu dilarutkan dengan air suling hingga 1000 ml kemudian dipanaskan hingga larut lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C tekanan 2 atm selama 15 menit.

#### b. Medium Glukosa Yeast Pepton Agar (GYPA)

Komposisi :

Glukosa 1%, Ekstrak khamir 1%, Pepton 1%, Mineral solution 1 ml per 200 ml medium, Agar 1,5%, CaCO<sub>3</sub> 1%, pH 6,7-7

Cara membuat

Semua bahan ditimbang sesuai perhitungan dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer. Lalu dilarutkan dengan air suling kemudian dipanaskan hingga larut lalu ditambahkan mineral solution kemudian dicek pH 6,7 – 7. Disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit.

### c. Pembuatan Medium Starter

Komposisi :

Glukosa 5 g, Laktosa 5 g, Ekstrak ragi 5 g,  $\text{CaCO}_3$  0,2 g, Aquadest 1000 ml.

Cara membuat :

Bahan-bahan ditimbang sesuai kebutuhan dan dimasukkan kedalam labu erlenmeyer. Lalu dilarutkan dengan air suling hingga 1000 ml kemudian dipanaskan hingga larut. Selanjutnya disterilkan dengan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

#### III.2.4 Pembuatan Kultur Starter

Kultur starter dibuat dengan menginokulasikan 1 ose biakan bakteri *Lactobacillus sp.* isolat ASI yang telah diremajakan untuk tiap 2,5 ml medium starter kemudian diinkubasikan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam dalam inkubator.

#### III.2.5 Pembuatan Susu Kuda Fermentasi

Susu kuda yang telah dibuat sebanyak 40 ml ditambahkan glukosa 10% kemudian dipanaskan pada suhu  $80^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit lalu ditambahkan starter *Lactobacillus sp.* isolat ASI sebanyak 5% dari volume susu kuda. Dikocok hingga homogen, kemudian diinkubasikan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dengan variasi waktu 6 jam, 12 jam, 24 jam dan 48 jam.

### c. Pembuatan Medium Starter

Komposisi :

Glukosa 5 g, Laktosa 5 g, Ekstrak ragi 5 g,  $\text{CaCO}_3$  0,2 g, Aquadest 1000 ml.

Cara membuat :

Bahan-bahan ditimbang sesuai kebutuhan dan dimasukkan kedalam labu erlenmeyer. Lalu dilarutkan dengan air suling hingga 1000 ml kemudian dipanaskan hingga larut. Selanjutnya disterilkan dengan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

#### III.2.4 Pembuatan Kultur Starter

Kultur starter dibuat dengan menginokulasikan 1 ose biakan bakteri *Lactobacillus sp.* isolat ASI yang telah diremajakan untuk tiap 2,5 ml medium starter kemudian diinkubasikan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam dalam inkubator.

#### III.2.5 Pembuatan Susu Kuda Fermentasi

Susu kuda yang telah dibuat sebanyak 40 ml ditambahkan glukosa 10% kemudian dipanaskan pada suhu  $80^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit lalu ditambahkan starter *Lactobacillus sp.* isolat ASI sebanyak 5% dari volume susu kuda. Dikocok hingga homogen, kemudian diinkubasikan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dengan variasi waktu 6 jam, 12 jam, 24 jam dan 48 jam.

### III.2.6 Pengujian Fermentasi Susu Kuda

#### a. Uji organoleptis (11)

Uji organoleptis dilakukan dengan menggunakan 10 orang panelis meliputi pengamatan terhadap penampakan warna, tekstur, aroma dan rasa. Pengujian organoleptis ini dilakukan setelah susu kuda difermentasikan dengan variasi waktu inkubasi 6 jam, 12 jam, 24 jam dan 48 jam.

Penilaian diberikan dengan angka 1-5 yaitu :

1 = sangat tidak suka

2 = tidak suka

3 = cukup suka

4 = suka

5 = sangat suka

#### b. Uji pH (6)

pH susu kuda fermentasi diukur dengan menggunakan kertas pH universal. Susu kuda fermentasi yang telah jadi dikocok secara merata kemudian diukur pHnya menggunakan kertas pH universal.

#### c. Jumlah Bakteri (Angka Lempeng Total) (8)

Pengujian menggunakan medium GYPA (Glukosa Yeast Pepton Agar). Fermentasi susu kuda untuk masing-masing perlakuan dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan kebotol pengenceran yang berisi 9 ml air suling steril kemudian dibuat pengenceran bertingkat  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$  dan  $10^{-12}$ . Pengujian dilakukan pada

pengenceran  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ , dan  $10^{-12}$  dengan mengambil 1 ml dari tiap pengenceran dan 10 ml medium GYPA dimasukkan ke cawan lalu dihomogenkan. Setelah memadat lalu diinkubasi dalam posisi terbalik dalam inkubator anaerob selama 3 x 24 jam. Koloni yang terbentuk bulat, dikelilingi oleh zona bening dihitung dengan metode Standard Plate Count (SPC).

#### d. Total Asam (3)

Sebanyak 10 ml fermentasi susu kuda dalam Erlenmeyer ditambahkan indikator phenolphthalein 1% sebanyak 1 ml dan dititrasi dengan menggunakan NaOH 0,1 N sampai larutan berwarna merah muda/pink ( $\text{pH} \pm 8$ ) dan dihitung berapa ml NaOH yang digunakan.

Presentase asam laktat dapat dihitung dengan rumus :

$$\% \text{asam laktat} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH} \times \text{Berat Equivalen asam laktat}}{\text{Jumlah sampel}} \times 100\%$$

#### III.2.7. Pengamatan dan Pengumpulan Data

Pengamatan dan penghitungan jumlah koloni bakteri dilakukan setelah inkubasi 1 x 24 jam.

#### III.2.8. Pembahasan Hasil Penelitian

Pembahasan hasil penelitian dilakukan berdasarkan hasil pengamatan dan analisis data.

#### III.2.9. Pengambilan Kesimpulan

Kesimpulan diambil berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan.



## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### IV.1 Hasil Penelitian

Dari hasil fermentasi susu kuda dengan variasi waktu 6, 12, 24 dan 48 jam diperoleh diperoleh data sebagai berikut :

**Tabel 2. Nilai pH, Uji Organoleptis, Total Bakteri Asam Laktat, dan Total Asam Fermentasi Susu Kuda**

Pengujian	Lama inkubasi (jam)			
	6	12	24	48
Organoleptis	14,6	14,7	13,6	13,1
pH	4,8	4,5	4,4	4,0
Kadar total asam	0,59%	0,64%	0,65%	0,71%
Nilai ALT bakteri	$1,3 \times 10^{11}$	$4,4 \times 10^{11}$	$2,9 \times 10^{11}$	$5,7 \times 10^{11}$

#### IV.2 Pembahasan

##### 1. Pembuatan Susu Kuda Fermentasi

Susu kuda fermentasi merupakan susu asam yang diperoleh melalui fermentasi susu kuda oleh bakteri asam laktat. Susu fermentasi ini dibuat dengan penambahan glukosa 10%. Glukosa pada proses fermentasi dimanfaatkan oleh bakteri sebagai sumber energi. Kemudian susu dipanaskan pada suhu 80°C selama 15 menit. Pemanasan ini bertujuan untuk membunuh mikroba patogen yang terdapat pada susu. Adapun parameter pengujian untuk menentukan kualitas dari susu kuda

fermentasi, yaitu uji pH, organoleptis, total asam dan total bakteri asam laktat.

## **2. Uji organoleptis**

Uji organoleptis ini bertujuan untuk mengetahui penerimaan konsumen terhadap hasil fermentasi susu kuda. Dalam pengujian ini digunakan 10 panelis dengan parameter berupa bau, warna, tekstur dan rasa. Dari hasil pengujian diperoleh data yaitu lama inkubasi 6 jam diperoleh hasil rata-rata sebanyak 14,6, untuk 12 jam diperoleh hasil rata-rata 14,7, untuk 24 jam diperoleh hasil rata-rata 13,6, untuk 48 jam diperoleh hasil rata-rata 13,1 (tabel 3).

Dari data yang diperoleh, fermentasi susu kuda yang paling disukai oleh panelis adalah lama inkubasi 6 jam dan 12 jam. Hal ini mungkin disebabkan karena pada inkubasi ini, glukosa yang ditambahkan pada susu kuda fermentasi belum semuanya diuraikan sehingga masih memberikan rasa manis jika dibandingkan dengan lama inkubasi 24 jam dan 48 jam. Glukosa yang ditambahkan dalam fermentasi susu akan dimanfaatkan oleh bakteri asam laktat sebagai sumber nutrisi dalam memperoleh energi untuk pertumbuhannya (22).

## **3. Jumlah Bakteri Asam Laktat**

Bakteri asam laktat sangat berperan penting dalam fermentasi makanan. Selain itu, bakteri ini juga sangat penting bagi kesehatan manusia karena dapat memberikan efek probiotik, menjaga keseimbangan mikroflora saluran pencernaan, membantu penderita

fermentasi, yaitu uji pH, organoleptis, total asam dan total bakteri asam laktat.

## **2. Uji organoleptis**

Uji organoleptis ini bertujuan untuk mengetahui penerimaan konsumen terhadap hasil fermentasi susu kuda. Dalam pengujian ini digunakan 10 panelis dengan parameter berupa bau, warna, tekstur dan rasa. Dari hasil pengujian diperoleh data yaitu lama inkubasi 6 jam diperoleh hasil rata-rata sebanyak 14,6, untuk 12 jam diperoleh hasil rata-rata 14,7, untuk 24 jam diperoleh hasil rata-rata 13,6, untuk 48 jam diperoleh hasil rata-rata 13,1 (tabel 3).

Dari data yang diperoleh, fermentasi susu kuda yang paling disukai oleh panelis adalah lama inkubasi 6 jam dan 12 jam. Hal ini mungkin disebabkan karena pada inkubasi ini, glukosa yang ditambahkan pada susu kuda fermentasi belum semuanya diuraikan sehingga masih memberikan rasa manis jika dibandingkan dengan lama inkubasi 24 jam dan 48 jam. Glukosa yang ditambahkan dalam fermentasi susu akan dimanfaatkan oleh bakteri asam laktat sebagai sumber nutrisi dalam memperoleh energi untuk pertumbuhannya (22).

## **3. Jumlah Bakteri Asam Laktat**

Bakteri asam laktat sangat berperan penting dalam fermentasi makanan. Selain itu, bakteri ini juga sangat penting bagi kesehatan manusia karena dapat memberikan efek probiotik, menjaga keseimbangan mikroflora saluran pencernaan, membantu penderita

*lactose intolerance*, menurunkan kadar kolesterol serum darah, mengurangi resiko penyakit jantung koroner, merangsang terbentuknya sistem imun, meningkatkan gerakan perut, mencegah diare dan mencegah berbagai penyakit degeneratif seperti kanker atau tumor saluran pencernaan (4,6). Dalam pemanfaatannya, jumlah bakteri asam laktat sangat berpengaruh terhadap ada tidaknya manfaat dari susu fermentasi sebagai minuman kesehatan.

Syarat minimal jumlah bakteri yang terkandung dalam minuman susu fermentasi adalah  $10^8 - 10^{11}$  koloni/ml (Jawetz, 1980). Jika jumlah BAL lebih sedikit maka bakteri yang sampai di usus sangat sedikit atau kemungkinan tidak ada sehingga tidak berkhasiat bagi tubuh. Sedangkan jika terlalu banyak atau melebihi jumlah dari syarat yang telah ditentukan dapat menyebabkan susu menjadi asam dan rusak sehingga berbahaya bagi kesehatan (4). Total bakteri asam laktat dihitung dengan metode Standar Plate Count dengan menggunakan medium GYPA +  $\text{CaCO}_3$  yang merupakan medium spesifik untuk menghitung jumlah bakteri asam laktat. Pada umumnya bakteri asam laktat dapat diamati dengan terbentuknya koloni putih yang dikelilingi zona bening. Zona bening ini terbentuk karena asam laktat yang dihasilkan bereaksi dengan  $\text{CaCO}_3$  yang tidak larut dalam medium membentuk kalsium laktat yang dapat larut dalam air.

Pada pengujian ini dilakukan pengenceran sampel  $10^{-11} - 10^{-12}$  dan pada pengujian susu asam yang diambil adalah pengenceran  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$  dan  $10^{-12}$ . Dari hasil pengujian diperoleh rata-rata koloni bakteri asam

laktat pada lama inkubasi yaitu  $1,3 \times 10^{11}$ , untuk 12 jam sebanyak  $4,4 \times 10^{11}$ , untuk 24 jam sebanyak  $2,9 \times 10^{11}$  dan untuk 48 jam sebanyak  $5,7 \times 10^{11}$  (tabel 5).

Dari hasil analisis statistik dengan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap) (lampiran 2), diperoleh hasil yang sangat berbeda nyata. Hal ini menunjukkan bahwa lama inkubasi sangat berpengaruh terhadap total bakteri asam laktat pada fermentasi susu kuda. Jumlah bakteri asam laktat yang dihasilkan pada tiap variasi lama inkubasi masih memenuhi persyaratan jumlah koloni untuk susu fermentasi.

Dari hasil analisis lanjutan dengan menggunakan uji Duncan diperoleh hasil yang sangat berbeda nyata pada lama inkubasi 6 – 12 jam. Hal ini mungkin disebabkan karena pada lama inkubasi ini, *Lactobacillus* sp. isolat ASI berada pada fase pertumbuhan logaritma. Pada fase ini, kecepatan pertumbuhan mikroorganisme paling cepat, waktu generasinya pendek dan konstan (25). Sedangkan pada lama inkubasi 12 – 24 jam diperoleh hasil yang tidak berbeda nyata. Hal ini mungkin disebabkan karena *Lactobacillus* sp. isolat ASI berada pada fase pertumbuhan mulai terhambat. Pada fase ini, pertumbuhan mulai terhambat yang disebabkan adanya pengurangan nutrisi dan terjadinya perubahan lingkungan seperti pH, suhu dan lain-lain (25). Pada lama inkubasi 24 – 48 jam, diperoleh hasil yang berbeda nyata. Hal ini mungkin disebabkan karena *Lactobacillus* sp. isolat ASI berada pada fase stasioner, dimana pada fase ini terjadi kehilangan sel secara perlahan-lahan melalui kematian yang

laktat pada lama inkubasi yaitu  $1,3 \times 10^{11}$ , untuk 12 jam sebanyak  $4,4 \times 10^{11}$ , untuk 24 jam sebanyak  $2,9 \times 10^{11}$  dan untuk 48 jam sebanyak  $5,7 \times 10^{11}$  (tabel 5).

Dari hasil analisis statistik dengan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap) (lampiran 2), diperoleh hasil yang sangat berbeda nyata. Hal ini menunjukkan bahwa lama inkubasi sangat berpengaruh terhadap total bakteri asam laktat pada fermentasi susu kuda. Jumlah bakteri asam laktat yang dihasilkan pada tiap variasi lama inkubasi masih memenuhi persyaratan jumlah koloni untuk susu fermentasi.

Dari hasil analisis lanjutan dengan menggunakan uji Duncan diperoleh hasil yang sangat berbeda nyata pada lama inkubasi 6 – 12 jam. Hal ini mungkin disebabkan karena pada lama inkubasi ini, *Lactobacillus* sp. isolat ASI berada pada fase pertumbuhan logaritma. Pada fase ini, kecepatan pertumbuhan mikroorganisme paling cepat, waktu generasinya pendek dan konstan (25). Sedangkan pada lama inkubasi 12 – 24 jam diperoleh hasil yang tidak berbeda nyata. Hal ini mungkin disebabkan karena *Lactobacillus* sp. isolat ASI berada pada fase pertumbuhan mulai terhambat. Pada fase ini, pertumbuhan mulai terhambat yang disebabkan adanya pengurangan nutrisi dan terjadinya perubahan lingkungan seperti pH, suhu dan lain-lain (25). Pada lama inkubasi 24 – 48 jam, diperoleh hasil yang berbeda nyata. Hal ini mungkin disebabkan karena *Lactobacillus* sp. isolat ASI berada pada fase stasioner, dimana pada fase ini terjadi kehilangan sel secara perlahan-lahan melalui kematian yang



diimbangi oleh pembentukan sel baru melalui pertumbuhan dan pembelahan. Pada saat hal ini terjadi, jumlah sel total secara perlahan meningkat walaupun jumlah sel yang dapat hidup tetap konstan (26).

#### 4. Pengujian pH

Salah satu parameter pengujian produk hasil fermentasi adalah pengujian pH dengan menggunakan kertas pH universal. Hasil yang diperoleh, yaitu pada lama inkubasi 6 jam diperoleh pH 4,8, untuk 12 jam diperoleh pH 4,5, untuk 24 jam diperoleh pH 4,4, untuk 48 jam diperoleh pH 4,0.

Kriteria selesainya suatu proses fermentasi adalah jika pH susu sudah mencapai 4,0-4,5 (2). Berdasarkan hasil perhitungan pH susu kuda fermentasi secara statistik dengan metode RAL (Lampiran 3), diperoleh data yang sangat berbeda nyata artinya lama inkubasi sangat berpengaruh terhadap nilai pH susu kuda fermentasi.

Dari hasil analisis lanjutan dengan menggunakan uji BNJ, diperoleh data pH yang sangat berbeda nyata pada lama inkubasi 6 – 12 jam. Hal ini mungkin disebabkan karena *Lactobacillus sp.* isolat ASI berada dalam fase pertumbuhan logaritma. Pada fase ini, kecepatan pertumbuhan bakteri dan metabolisme paling cepat dan pesat (26). Bertambahnya jumlah bakteri asam laktat akan menyebabkan meningkatnya produksi asam laktat sehingga mengakibatkan terjadinya perubahan nilai pH yang sangat berbeda nyata. Menurut Surono, Si (2004), terakumulasinya asam – asam organik terutama asam laktat yang



dihasilkan pada proses fermentasi akan menyebabkan penurunan nilai pH. Perubahan nilai pH yang tidak berbeda nyata terjadi pada lama inkubasi 12 – 24 jam. Hal mungkin disebabkan karena *Lactobacillus sp.* isolat ASI berada pada fase pertumbuhan mulai terhambat. Pada fase ini, jumlah sel total secara perlahan menurun sehingga akan menyebabkan jumlah asam laktat yang terbentuk juga semakin berkurang. Hal ini menyebabkan perubahan nilai pH produk hasil fermentasi tidak berbeda nyata.

Reaksi yang menjadi dasar fermentasi asam adalah perubahan laktosa (gula susu) menjadi asam laktat yang menyebabkan penurunan pH. Semakin rendah pH suatu bahan atau makanan tersebut, maka semakin tahan bahan atau makanan tersebut terhadap serangan mikroorganisme pembusuk maupun penyebab penyakit (3, 24).

## 5. Total Asam

Pada prinsipnya, asam laktat terbentuk pada proses fermentasi melalui hidrolisis enzimatik laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Selanjutnya glukosa akan diuraikan melalui beberapa tahap dekomposisi sehingga menghasilkan asam laktat (6).

Dari hasil pengujian diperoleh nilai total asam laktat untuk lama inkubasi 6 jam yaitu 0,59%, untuk 12 jam yaitu 0,64%, untuk 24 jam yaitu 0,65%, untuk 48 jam yaitu 0,71%. Persyaratan kadar total asam laktat untuk susu fermentasi yang baik, yaitu tidak kurang dari 0,5% (Sardjoko,



1991). Jadi dapat disimpulkan bahwa susu kuda fermentasi yang dihasilkan memenuhi persyaratan jumlah total asam laktat.

Berdasarkan hasil perhitungan kadar total asam laktat secara statistik dengan metode RAL (Lampiran 4), diperoleh data yang berbeda nyata artinya lama inkubasi sangat pengaruh terhadap produksi asam laktat pada fermentasi susu kuda.

Dari hasil uji BNJ, diperoleh hasil yang berbeda nyata pada lama inkubasi 6 – 12 jam, 24 – 48 jam dan tidak berbeda nyata pada lama inkubasi 12 – 24 jam.

Dari hasil pengujian susu kuda fermentasi yang meliputi uji organoleptik, jumlah bakteri asam laktat, nilai pH dan total asam laktat serta analisis data secara statistik dapat disimpulkan bahwa lama inkubasi yang paling optimum adalah 12 jam. Hal ini disebabkan karena pada setiap perlakuan, lama inkubasi 12 jam memberikan hasil yang baik atau memenuhi persyaratan dalam pembuatan susu fermentasi dan waktunya lebih efisien dibandingkan lama inkubasi 24 dan 48 jam.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **V.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis statistika maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Waktu inkubasi sangat berpengaruh terhadap nilai pH, hasil uji organoleptik, jumlah bakteri asam laktat, dan kadar total asam pada fermentasi susu kuda.
2. Waktu inkubasi yang optimum dalam fermentasi susu kuda adalah 12 jam.

#### **V.2 Saran**

1. Sebaiknya dilakukan penelitian lebih lanjut untuk pengujian efek antibakteri dari susu kuda fermentasi.
2. Sebaiknya dilakukan penelitian mengenai analisis kandungan gizi dari susu kuda fermentasi.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Sari, N.K. 2007. *Tren dan Potensi Susu Fermentasi*. <http://www.calpico.co.id/info.php>, diakses 24 Mei 2007.
2. Abu, T.B. 2005. Teknologi Pembuatan Yogurt. Makalah Kursus Singkat Pemanfaatan BAL dalam Bidang Pangan Kesehatan bagi STAF Akademik PTN Kawasan Indonesia Timur. Pusat Penelitian Unhas. Makassar, 14-24 November.
3. Rahman, A. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Penerbit Arcan. Jakarta. 2, 11, 43
4. Surono, S.I. 2004. *Probiotik: Susu Fermentasi dan Kesehatan*. YAPMMI, Tri Cipta Karya. Jakarta. 24-43
5. Milna. 2006. *Prebiotik dan Probiotik*. [www.infosehat.com](http://www.infosehat.com). Diakses 2 Januari 2008
6. Hidayat, N. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Penerbit Andi. Yogyakarta. Hal.175
7. Andi, S. 2001. *Susu Kuda Berkhasiat Obat*. [www.gizinet/cgi-bin/berita/fullnews.cgi](http://www.gizinet/cgi-bin/berita/fullnews.cgi). diakses 3 Januari 2008
8. Buckle, K.A., Edwards, R.A., Fleet, G.H., & Wotton, M. 1987. *Ilmu pangan*. Terjemahan oleh hari Purnomo & Adiono. Universitas Indonesia Press. Jakarta. 270
9. Muliani, L. 2007. Isolasi dan Karakteristik BAL dari Kolostrum Air Susu Ibu sebagai Probiotik. *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Makassar. 37
10. Uleng, A.A. 2007. Efek Waktu Inkubasi terhadap Produksi Soygurt dari *Lactobacillus sp.* Isolat ASI. *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Makassar. 3.
11. Tamime, A.Y., dan Robinson, R.K. 1985. *Yogurt Science and Technology*. Pergamon Press. NewYork. 265
12. Soetjiningsih. 1997. *ASI Petunjuk untuk Tenaga Kesehatan*. Buku Kedokteran. Jakarta. 23

13. Ma'ruf, F. 2007. *Air Susu Ibu*. [Baitijannati.wordpress.com](http://Baitijannati.wordpress.com). Diakses 20 Mei 2008
14. Muchtadi, D. 1994. *Gizi untuk Bayi; ASI, Susu Formula dan Makanan Tambahan*. Pustaka Sinar Harapan. 33
15. Djide, M.N. 2005. *Uraian Umum Tentang Bakteri Asam Laktat*. Makalah Kursus Singkat Pemanfaatan Bakteri Asam Laktat pada Produk Pangan dan Kesehatan. Laboratorium Mikrobiologi Farmasi UNHAS. Makassar. 2-7
16. Fardiaz, S. 1989. *Fisiologi Fermentasi*. Pusat Antar Universitas IPB-Lembaga Sumber Daya Informasi. Bogor. 57-64
17. Djide, M.N, Sartini, & Syahrudin, K. 2007. *Bioteknologi Farmasi*. Laboratorium Mikrobiologi Farmasi UNHAS. Makassar. 303
18. Rogers, P, & Fleet, G. 1988. *Biotechnology and the Food Industry*. University of New South Wales. Sydney. 227
19. Edwin. 2003. *Khasiat Yoghurt untuk Pengobatan*. [www.mail-archive.com](http://www.mail-archive.com). Diakses 24 Mei 2007
20. Winarno. 2007. *Antara Antibiotik, Probiotik dan Prebiotik*. [www.surabayapost.info](http://www.surabayapost.info). Diakses 20 Mei 2008
21. Rahayuningsih, M. 2006. *Probiotik*. [www.halalguide.info](http://www.halalguide.info). Diakses 20 Mei 2008
22. Fardiaz, S. 1992. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 295
23. Djide, M.N, Sartini, & Syahrudin, K. 2006. *Analisis Mikrobiologi Farmasi*. Laboratorium Mikrobiologi Farmasi UNHAS. Makassar. 26
24. Dwidjoseputro. 1998. *Dasar – Dasar Mikrobiologi*. Penerbit Djambatan. Malang. 167
25. Djide, M.N, dan Sartini,. 2006 . *Mikrobiologi Farmasi Dasar*. Laboratorium Mikrobiologi Farmasi UNHAS. Makassar. 200-202
26. Jawetz, Melnich, dan Adelberg's. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Terjemahan oleh Bagian mikrobiologi Fak. Kedokteran Universitas Airlangga. Salemba Medika. Jakarta. 74

Tabel 3. Hasil Uji Organoleptis dengan Menggunakan Panelis

Panelis	Lama fermentasi															
	6 jam				12 jam				24 jam				48 jam			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
X1	3	4	4	4	4	4	4	3	3	4	4	3	3	4	4	3
X2	4	3	3	3	3	4	4	4	3	4	3	4	3	4	3	3
X3	3	4	4	4	4	3	4	4	4	3	4	3	3	3	3	3
X4	3	4	4	4	3	3	4	4	3	4	3	4	3	4	4	3
X5	3	4	3	4	4	3	3	3	3	3	4	3	3	3	3	3
X6	3	3	4	3	4	4	4	4	3	4	4	3	3	4	3	3
X7	3	4	4	4	3	4	4	4	3	2	4	3	3	3	3	2
X8	4	4	3	4	3	4	4	4	3	3	4	4	3	4	3	3
X9	3	4	4	3	4	3	4	4	4	3	4	3	4	3	4	3
X10	3	4	4	4	4	4	3	3	3	3	4	3	3	4	4	3
Total	146				147				136				131			
Rata-rata	14,6				14,7				13,6				13,1			

Keterangan :

A = Bau, B = Warna, C = Tekstur, D = Rasa

1 = Sangat tidak suka, 2 = Tidak suka, 3 = Cukup, 4 = Suka, 5 = Sangat

suka

**Tabel 4. Hasil Perhitungan Jumlah Bakteri Asam Laktat dengan Metode SPC**

Kelompok	$10^{-9}$	$10^{-10}$	$10^{-11}$	$10^{-12}$
A	23	27	11	9
	40	30	9	25
	55	36	21	34
B	96	47	29	30
	105	50	27	23
	112	60	30	27
C	84	44	23	13
	85	40	20	7
	73	39	25	16
D	132	133	17	4
	87	87	15	2
	95	90	27	10

Keterangan :

A = Lama inkubasi 6 jam

B = Lama inkubasi 12 jam

C = Lama inkubasi 24 jam

D = Lama inkubasi 48 jam

Perhitungan ALT bakteri, syarat koloni 30-300

Misalnya :

Kelompok A replikasi pertama, jumlah koloni :

$10^{-9}$	$10^{-10}$	$10^{-11}$	$10^{-12}$
23	27	11	9

Dari data di atas tidak ada yang masuk dalam range, maka yang diambil adalah pengenceran terendah.

Jadi hasil pelaporannya =  $23 \times 1/10^{-9} = 23 \times 10^9 = 2,3 \times 10^{10}$  koloni/ml



**Tabel 5. Nilai ALT Masing-Masing Susu Kuda Fermentasi**

Nilai ALT	A	B	C	D
I	$2,3 \times 10^{10}$	$4,7 \times 10^{11}$	$2,6 \times 10^{11}$	$7,3 \times 10^{11}$
II	$1,7 \times 10^{11}$	$5,0 \times 10^{11}$	$2,3 \times 10^{11}$	$4,8 \times 10^{11}$
III	$2,1 \times 10^{11}$	$3,6 \times 10^{11}$	$4,0 \times 10^{11}$	$4,9 \times 10^{11}$
Rata-rata	$1,3 \times 10^{11}$	$4,4 \times 10^{11}$	$2,9 \times 10^{11}$	$5,7 \times 10^{11}$

Keterangan :

A = Lama inkubasi 6 jam

B = Lama inkubasi 12 jam

C = Lama inkubasi 24 jam

D = Lama inkubasi 48 jam

**Tabelg 6. Nilai pH Masing-Masing Susu Kuda Fermentasi**

Perlakuan	Replikasi			Jumlah	Rata-rata
	I	II	III		
A	4,8	4,7	4,9	14,4	4,8
B	4,5	4,4	4,6	13,5	4,5
C	4,4	4,4	4,4	13,2	4,4
D	4,0	4,0	4,0	12	4,0
Jumlah	17,7	17,5	17,9	53,1	17,7

Keterangan :

A = Lama inkubasi 6 jam

B = Lama inkubasi 12 jam

C = Lama inkubasi 24 jam

D = Lama inkubasi 48 jam

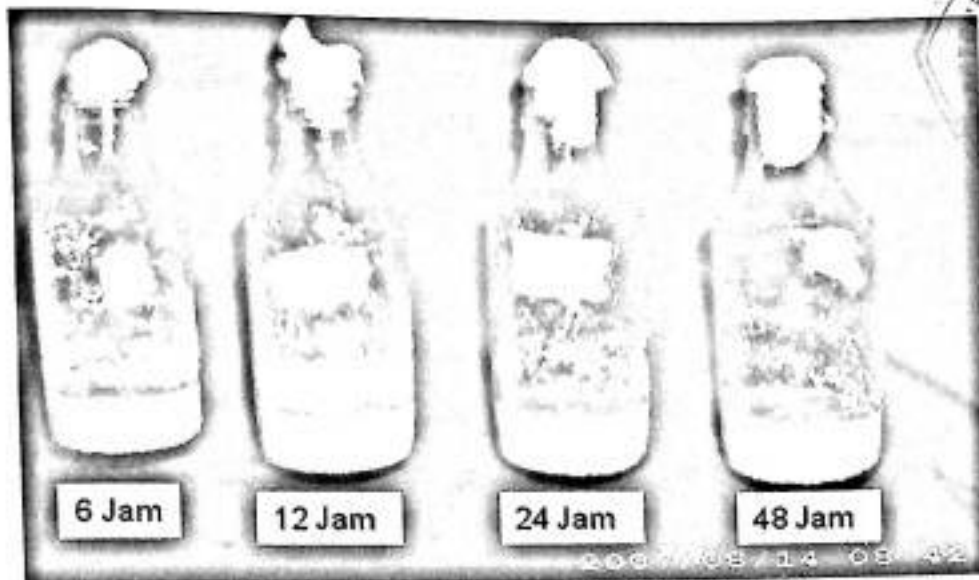
**Tabel 7. Hasil Perhitungan Kadar Total Asam Laktat dengan Menggunakan Metode Titrasi Asam Basa dengan Larutan Baku Natrium Hidroksida 0,1 N**

Lama inkubasi (jam)	Volume sampel (ml)	Volume titran (ml)	Kadar (%)	Rata-rata (%)
6	10	6,5	0,585	0,59
	10	6,7	0,603	
	10	6,4	0,576	
12	10	7,0	0,693	0,64
	10	7,4	0,666	
	10	7,2	0,648	
24	10	7,2	0,648	0,65
	10	7,0	0,630	
	10	7,5	0,675	
48	10	8	0,72	0,71
	10	7,9	0,711	
	10	7,9	0,711	

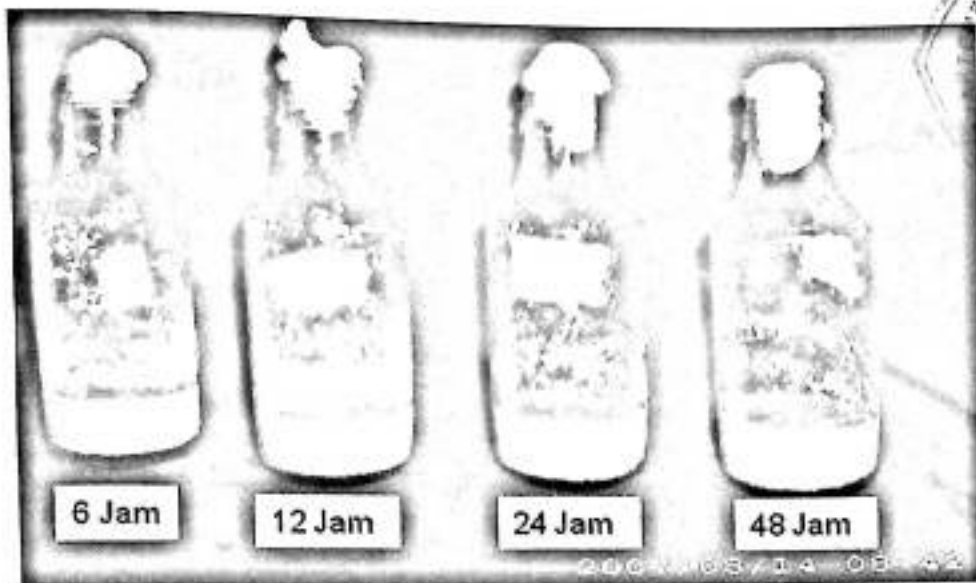
$$\text{Perhitungan \% kadar total asam} = \frac{\text{Volume titran} \times \text{N titran} \times 0,09}{\text{Jumlah sampel}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kadar total asam} = \frac{6,5 \times 0,1 \text{ N} \times 0,09}{10} \times 100\%$$

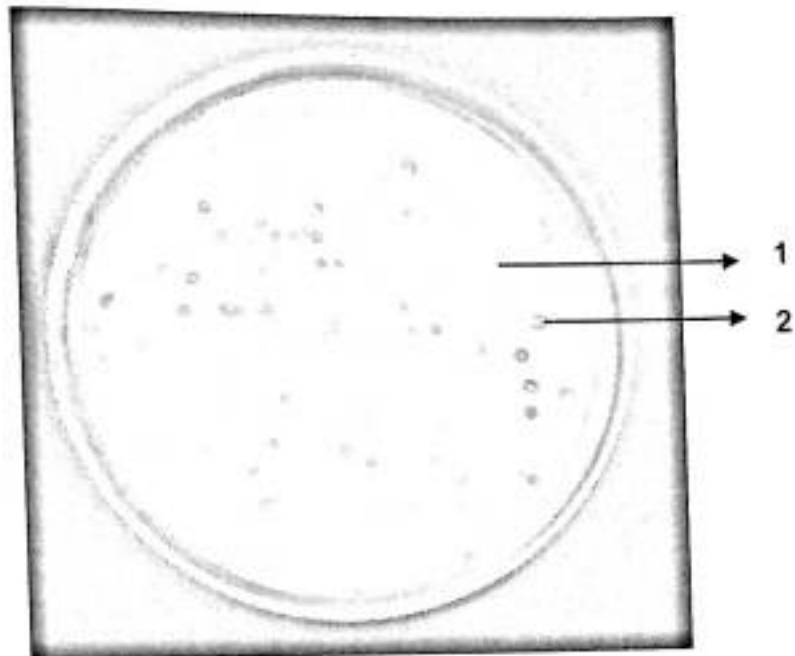
$$\% \text{ kadar total asam} = 0,585 \%$$



Gambar 4. Produk susu kuda fermentasi oleh *Lactobacillus* sp. isolat ASI



Gambar 4. Produk susu kuda fermentasi oleh *Lactobacillus sp.* isolat ASI



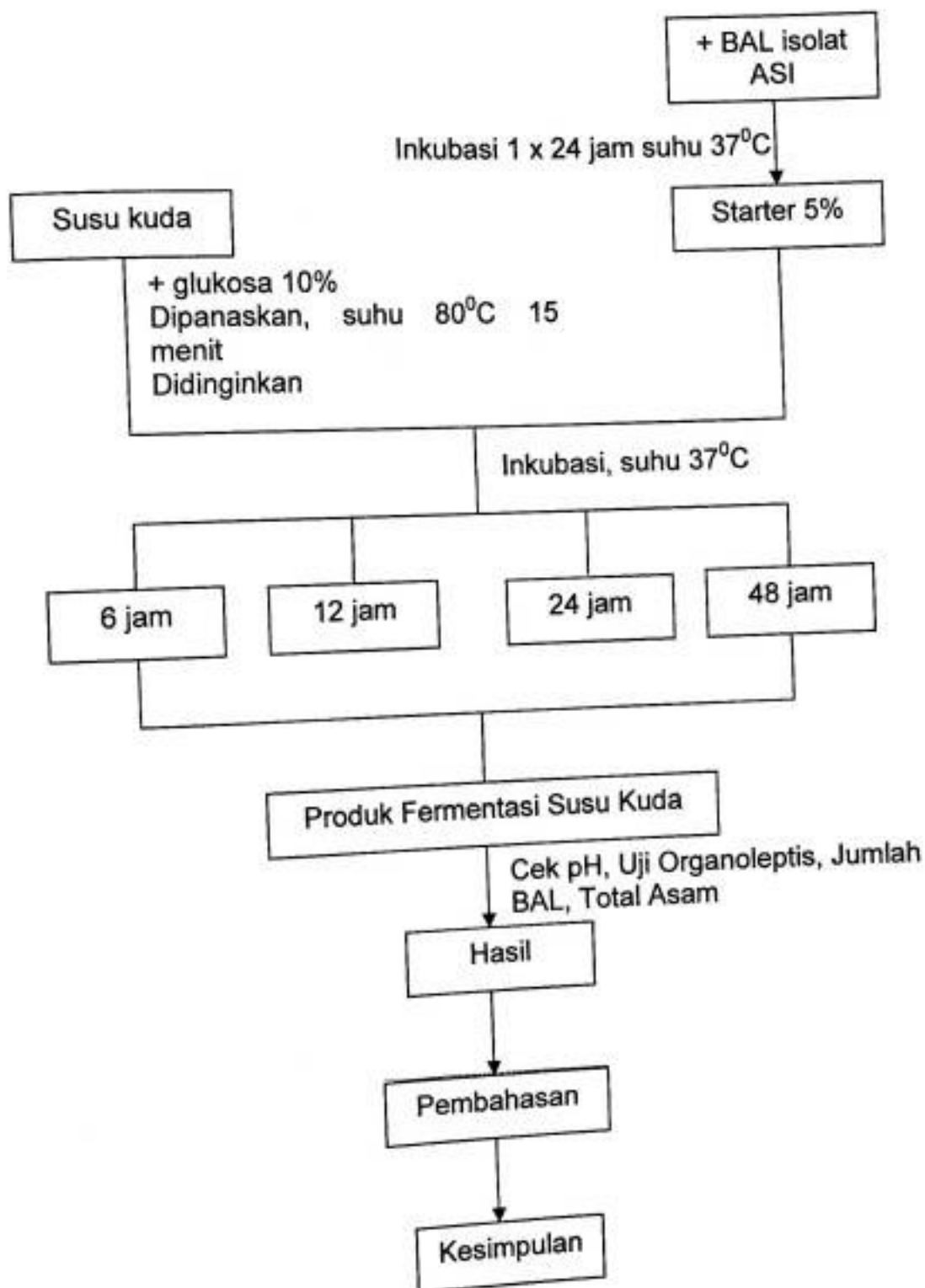
Gambar 5. Koloni bakteri asam laktat (*Lactobacillus sp.*) dalam susu kuda fermentasi dengan menggunakan medium GYP + CaCO<sub>3</sub>

Keterangan :

1. Medium GYP + CaCO<sub>3</sub>
2. Koloni bakteri asam laktat (*Lactobacillus sp.*)

Lampiran 1

SKEMA KERJA



**Lampiran 2. Hasil Perhitungan Jumlah Bakteri Asam Laktat (koloni/ml) Berdasarkan Analisis Statistik dengan Metode RAL**

Perlakuan	Replikasi ( x 10 <sup>11</sup> )			Jumlah( x 10 <sup>11</sup> )	Rata-rata( x 10 <sup>11</sup> )
	I	II	III		
A	0,2	1,7	2,1	4,0	1,3
B	4,7	5,0	3,6	13,3	4,4
C	2,6	2,3	4,0	8,9	2,9
D	7,3	4,8	4,9	17,0	5,7
Jumlah	14,83	13,8	14,6	43,2	14,4

Keterangan :

A = Lama inkubasi 6 jam

B = Lama inkubasi 12 jam

C = Lama inkubasi 24 jam

D = Lama inkubasi 48 jam

$$\text{Faktor koreksi (FK)} = \frac{(43,2)^2}{12} = 155,52$$

$$\begin{aligned} \text{JKT} &= \{(0,2)^2 + (4,7)^2 + \dots + (4,9)^2\} - \text{FK} \\ &= 195,78 - 155,52 \\ &= 40,26 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKP} &= \frac{\{(4,0)^2 + (13,3)^2 + (8,9)^2 + (17,0)^2\}}{3} - 155,52 \\ &= 31,51 \end{aligned}$$



$$JKG = JKT - JKP$$

$$= 40,26 - 31,51$$

$$= 8,75$$

### Table Anova

Sumber keragaman	DB	JK	KT	Fh	Ft	
					5%	1%
Perlakuan	3	31,51	10,5	9,5	4,07	7,59
Galat	8	8,75	1,1			
Total	11	40,26				

Karena  $F_h > F_t$  maka diantara perlakuan sangat berbeda nyata (sangat signifikan). Jadi lama inkubasi sangat berpengaruh terhadap total jumlah bakteri asam laktat pada fermentasi susu kuda.

### Koefisien keseragaman (KK)

$$KK = \frac{\sqrt{KTG}}{y} \times 100\%$$

$$= \frac{\sqrt{1,1}}{3,6} \times 100\%$$

$$= 29\%$$

Analisa lanjutan dengan menggunakan Uji Beda Jarak Nyata Duncan

### (BJND)

$$S_y = \sqrt{\frac{KTG}{r}}$$

$$S_y = \sqrt{\frac{1,1}{3}}$$

$$S_y = 0,6$$

Tabel hasil uji BJND

Waktu inkubasi	Rata-rata	6	12	24	48
6	1,3	-	-	-	-
12	4,4	3,1 <sup>ss</sup>	-	-	-
24	2,9	1,6 <sup>ns</sup>	1,5 <sup>ns</sup>	-	-
48	5,7	4,4 <sup>ss</sup>	1,3 <sup>ns</sup>	2,8 <sup>s</sup>	-
P 5%		3,26	3,39	3,47	
BJND 5%		1,956	2,034	2,082	
P 1%		4,24	5,00	5,14	
BJND 1%		2,544	3,00	3,084	

Keterangan :

SS = sangat signifikan

S = signifikan

NS = tidak signifikan

### Lampiran 3. Hasil Perhitungan pH Berdasarkan Analisis Statistik dengan Metode RAL

Perlakuan	Replikasi			Jumlah	Rata-rata
	I	II	III		
A	4,8	4,7	4,9	14,4	4,8
B	4,5	4,4	4,6	13,5	4,5
C	4,4	4,4	4,4	13,2	4,4
D	4,0	4,0	4,0	12	4,0
Jumlah	17,7	17,5	17,9	53,1	17,7

Keterangan :

A = Lama inkubasi 6 jam

B = Lama inkubasi 12 jam

C = Lama inkubasi 24 jam

D = Lama inkubasi 48 jam

$$\text{Faktor koreksi (FK)} = \frac{(53,1)^2}{12} = 234,9675$$

$$\text{JKT} = \{(4,8)^2 + (4,7)^2 + \dots + (4,0)^2\} - \text{FK}$$

$$= 235,99 - 234,9675$$

$$= 1,0225$$

$$\text{JKP} = \frac{\{(14,4)^2 + (13,5)^2 + (13,2)^2 + (12)^2\}}{3} - 234,9675$$

$$= 235,95 - 234,9675$$

$$= 0,9825$$

$$\text{JKG} = \text{JKT} - \text{JKP}$$

$$= 1,0225 - 0,9825$$

$$= 0,04$$

**Table Anova**

Sumber keragaman	DB	JK	KT	Fh	Ft	
					5%	1%
Perlakuan	3	0,9825	0,3275	65,5	4,07	7,59
Galat	8	0,04	0,005			
Total	11	1,0225				

Karena  $F_h > F_t$  maka diantara perlakuan sangat berbeda nyata (sangat signifikan). Jadi lama inkubasi sangat berpengaruh terhadap pH susu kuda fermentasi.

**Koefisien keseragaman (KK)**

$$\begin{aligned}
 KK &= \frac{\sqrt{KTG}}{y} \times 100\% \\
 &= \frac{\sqrt{0,005}}{34,425} \times 100\% \\
 &= 1,6\%
 \end{aligned}$$

**Analisa lanjutan dengan menggunakan Uji BNJ**

$$S_y = \sqrt{\frac{KTG}{r}}$$

$$S_y = \sqrt{\frac{0,005}{3}}$$

$$S_y = 0,04$$

Diketahui :

$$\alpha_{0,05} = 4,04$$

$$\alpha_{0,01} = 5,63$$

$$\text{BNJ } 5\% = 4,04 \times 0,04$$

$$= 0,1616$$

$$\text{BNJ } 1\% = 5,63 \times 0,04$$

$$= 0,2252$$

Perbandingan antar perlakuan

NO.	Perbandingan	Selisih	BNJ hitung		Keterangan
			1%	5%	
1.	A – B	0,3	0,2252	0,1616	SS
2.	A – C	0,4	0,2252	0,1616	SS
3.	A – D	0,8	0,2252	0,1616	SS
4.	B – C	0,1	0,2252	0,1616	NS
5.	B – D	0,5	0,2252	0,1616	SS
6.	C – D	0,4	0,2252	0,1616	SS

**Lampiran 4 . Hasil Perhitungan Total Asam Berdasarkan Analisis Statistik dengan Metode RAL**

Perlakuan	Replikasi			Jumlah	Rata-rata
	I	II	III		
A	0,585	0,603	0,576	1,764	0,588
B	0,657	0,657	0,630	1,944	0,648
C	0,648	0,630	0,675	1,953	0,651
D	0,72	0,711	0,711	2,142	0,714
Jumlah	2,61	2,601	2,592	7,803	2,601

Keterangan :

A = Lama inkubasi 6 jam

B = Lama inkubasi 12 jam

C = Lama inkubasi 24 jam

D = Lama inkubasi 48 jam

$$\text{Faktor koreksi (FK)} = \frac{(7,803)^2}{12} = 5,0739$$

$$\begin{aligned} \text{JKT} &= \{(0,585)^2 + (0,603)^2 + \dots + (0,639)^2\} - \text{FK} \\ &= 5,0997 - 5,0739 \\ &= 0,0258 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKP} &= \frac{\{(1,764)^2 + (1,944)^2 + (1,953)^2 + (2,142)^2\}}{3} - 5,0739 \\ &= 5,0977 - 5,0739 \\ &= 0,0238 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKG} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\ &= 0,0258 - 0,0238 \\ &= 0,002 \end{aligned}$$

### Table Anova

Sumber keragaman	DB	JK	KT	Fh	Ft	
					5%	1%
Perlakuan	3	0,0238	0,0079	31,6	4,07	7,59
Galat	8	0,002	0,00025			
Total	11	0,0218				

Karena  $F_h < F_t$  maka diantara perlakuan sangat berbeda nyata (sangat signifikan). Jadi lama inkubasi sangat berpengaruh terhadap total asam fermentasi susu kuda.

**Koefisien keseragaman (KK)**

$$\begin{aligned}
 KK &= \frac{\sqrt{KTG}}{y} \times 100\% \\
 &= \frac{\sqrt{0,00025}}{0,650} \times 100\% \\
 &= 2,4\%
 \end{aligned}$$

**Analisa lanjutan dengan menggunakan Uji BNJ**

$$S_y = \sqrt{\frac{KTG}{r}}$$

$$S_y = \sqrt{\frac{0,00025}{3}}$$

$$S_y = 0,009$$

Diketahui :

$$\alpha_{0,05} = 4,04$$

$$\alpha_{0,01} = 5,63$$

$$\text{BNJ } 5\% = 4,04 \times 0,009$$

$$= 0,0364$$

$$\text{BNJ } 1\% = 5,63 \times 0,009$$

$$= 0,0507$$





Perbandingan antar perlakuan

NO.	Perbandingan	Selisih	BNJ hitung		Keterangan
			1%	5%	
1.	A - B	0,06	0,0507	0,0364	SS
2.	A - C	0,063	0,0507	0,0364	SS
3.	A - D	0,069	0,0507	0,0364	SS
4.	B - C	0,003	0,0507	0,0364	NS
5.	B - D	0,066	0,0507	0,0364	SS
6.	C - D	0,063	0,0507	0,0364	SS