



SKRIPSI

PENGARUH PENAMBAHAN BAKTERI *Lactobacillus casei* dan BAKTERI *Zymomonas mobilis* TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA PADA YOGURT

**RARA FILDZAH LIBNA ABHARINA
NRP. 0121144000052**

**Dosen Pembimbing
Herdayanto Sulistyono Putro, S.Si., M.Si.**

**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS SAINS
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2019**



SCRIPT

**EFFECT OF *Lactobacillus casei* AND *Zymomonas mobilis*
ADDITION WITH ANTIOXIDANT AND
ANTIMICROBIAL ACTIVITIES IN YOGURT**

**RARA FILDZAH LIBNA ABHARINA
NRP. 0121144000052**

**Supervisor
Herdayanto Sulisty Putro, S.Si., M.Si.**

**DEPARTMENT OF CHEMISTRY
FACULTY OF SCIENCE
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2019**

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

HALAMAN JUDUL

**PENGARUH PENAMBAHAN BAKTERI *Lactobacillus casei*
dan BAKTERI *Zymomonas mobilis* TERHADAP AKTIVITAS
ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA PADA YOGURT**

SKRIPSI

Disusun Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh
Gelar Sarjana Program Studi S-1
Departemen Kimia
Fakultas Sains
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya

Disusun Oleh:

RARA FILDZAH LIBNA ABHARINA

NRP 0121144000052

**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS SAINS
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2019**

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

LEMBAR PENGESAHAN

**PENGARUH PENAMBAHAN BAKTERI *Lactobacillus casei*
dan BAKTERI *Zymomonas mobilis* TERHADAP AKTIVITAS
ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA PADA YOGURT**

SKRIPSI

Disusun oleh:

RARA FILDZAH LIBNA ABHARINA
NRP 0121144000052

Surabaya, 03 Juli 2019

Menyetujui,

Dosen Pembimbing



Herdayanto S. Putro, S.Si, M.Si.
NIP. 19810125 200812 1 001

Mengetahui,

Kepala Departemen Kimia



Prof. Dr. Didik Prasetyoko, S.Si., M.Sc.
NIP. 19710616 199703 1 002

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

**PENGARUH PENAMBAHAN BAKTERI *Lactobacillus casei*
dan BAKTERI *Zymomonas mobilis* TERHADAP AKTIVITAS
ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA PADA YOGURT**

Nama : Rara Fildzah Libna Abharina
NRP : 01211440000052
Departemen : Kimia FS - ITS
Dosen Pembimbing : Herdayanto S. Putro, S. Si, M.Si.

ABSTRAK

Yogurt merupakan produk fermentasi susu yang telah diteliti selama beberapa tahun dan produk fermentasi ini sudah terbukti dan populer. Pada penelitian ini, bakteri *Zymomonas mobilis* dan *Lactobacillus casei* ditambahkan ke dalam yogurt dengan tujuan mempelajari pengaruhnya pada aktivitas antioksidan dan antimikroba. Aktivitas antimikroba diukur menggunakan metode difusi agar dan diperoleh diameter zona hambat pada sampel yogurt murni sebesar 10 mm, yogurt dengan penambahan bakteri *Z. mobilis* sebesar 9 mm, dan yogurt dengan penambahan bakteri *L. casei* sebesar 12 mm. Aktivitas antioksidan dievaluasi menggunakan senyawa radikal DPPH pada yogurt murni, yogurt dengan penambahan bakteri *Z. mobilis*, dan yogurt dengan penambahan bakteri *L. casei* secara berturut-turut diperoleh nilai % inhibisi sebesar 88,87%, 91,64%, 98,70%. Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penambahan bakteri *Z. mobilis* dan *L. casei* dapat meningkatkan aktivitas antioksidan pada yogurt tetapi kurang baik dalam aktivitas antimikroba.

Kata kunci: *Yogurt, Zymomonas mobilis, Lactobacillus casei, Antioksidan, Antibiotik*

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

**EFFECT OF *Lactobacillus casei* AND *Zymomonas mobilis*
ADDITION WITH ANTIOXIDANT AND
ANTIMICROBIAL ACTIVITIES IN YOGURT**

Nama : Rara Fildzah Libna Abharina
NRP : 0121144000052
Department : Kimia FS - ITS
Supervisor : Herdayanto S. Putro, S. Si, M.Si.

ABSTRACT

Yogurt as milk fermentation product has been studied for several years and quite popular. In this study, *Zymomonas mobilis* and *Lactobacillus casei* bacteria were added to yogurt with the aim of studying their effects on antioxidant and antimicrobial activity. Antimicrobial activity was measured using the agar diffusion method and obtained the diameter of the inhibition zone in pure yogurt samples of 10 mm, yogurt with the addition of *Z. mobilis* by 9 mm, and yogurt with the addition of *L. casei* by 12 mm. Antioxidant activity was evaluated using DPPH radical compounds on pure yogurt, yogurt with the addition of *Z. mobilis* bacteria, and yogurt with the addition of *L. casei* bacteria in a row that obtained % inhibition values of 88.87%, 91.64%, 98.70%. Based on this study it can be concluded that the addition of *Z. mobilis* and *L. casei* bacteria can increase antioxidant activity in yogurt but it is not good in antimicrobial activity.

Keywords: *Yogurt, Zymomonas mobilis, Lactobacillus casei, Antioxidants, Antibiotics*

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmaanirrohim

Puji syukur penulis sampaikan kehadirat Allah SWT karena berkat rahmat yang berlimpah dari-Nya naskah skripsi yang berjudul **“PENGARUH PENAMBAHAN BAKTERI *Lactobacillus casei* dan BAKTERI *Zymomonas mobilis* TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA PADA YOGURT”** dapat terselesaikan.

Tulisan ini tidak akan terwujud tanpa bantuan, dukungan, doa serta dorongan semangat dari semua pihak. Untuk itu penulis sangat berterima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Didik Prasetyoko, M.Sc., selaku Kepala Departemen Kimia ITS atas fasilitas yang diberikan selama proses penelitian.
2. Refdinal Nawfa, S.Si., M.Si., selaku Kepala Laboratorium Kimia Mikroorganisme, yang telah memberikan izin penggunaan laboratorium.
3. Herdayanto S. Putro, S.Si, M.Si., selaku Dosen Pembimbing yang dengan penuh kesabaran memberikan bimbingan, dan ilmunya kepada penulis dari awal proses penelitian, hingga proses penyusunan naskah skripsi.
4. Dra. Ratna Ediati, M.Si, Ph.D. selaku Dosen Wali yang telah membimbing dalam hal akademik maupun non akademik selama penulis menempuh studi di Departemen Kimia ITS.

5. Dosen dan Staf Departemen Kimia Fakultas Sains ITS.
6. Kedua orang tua serta saudara yang tiada henti memberi dukungan, doa, dan semangat kepada penulis dan membimbing penulis hingga sampai pada tahap ini.
7. Maria, Wahyuning, Bimo, partner tugas akhir yang membantu dalam setiap proses pengerjaan TA, teman-teman mikronian yang telah banyak penulis repotkan
8. Teman-teman PMII 1011, UKM Penalaran, UKM Tiyang Alit dan keluarga UKM Rebana ITS, GALAXY dan HIMKA ITS yang selalu mendukung hingga terselesaikannya naskah TA ini.
9. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini yang tidak mungkin penulis sebutkan seluruhnya.

Semoga skripsi ini memberikan manfaat bagi penulis, pembaca, maupun mahasiswa-mahasiswa yang ingin melanjutkan penelitian lebih lanjut.

Wallahul muaffiq ilaa aqwaamittoriq

Surabaya, 10 Juli 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	iii
LEMBAR PENGESAHAN	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	ix
KATA PENGANTAR	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.5 Batasan Masalah.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Susu.....	5
2.1.1. Susu Pasteurisasi	5
2.1.2. Susu Skim.....	6
2.2 BAL (Bakteri Asam Laktat).....	7
2.3. Fermentasi.....	9
2.4. Yogurt	10
2.5. Mikroba Probiotik	14
2.6. Bakteri <i>Lactobacillus casei</i>	15
2.7. Bakteri <i>Zymomonas mobilis</i>	16
2.8. Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	17
2.9. pH Fermentasi Yogurt.....	19
2.10. Uji Aktivitas Antimikroba Yogurt	20
2.11. Metode Sumuran (<i>Well- Diffusion</i>).....	21
2.12. Aktivitas Antioksidan.....	21
2.13. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH....	22
2.14. Spektrofotometer Ultraviolet-Visible (UV-Vis)	24
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	26
3.1 Alat.....	27
3.2. Bahan	27
3.3. Prosedur	27
3.3.1. Regenerasi Bakteri	27

3.3.2. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri	28
3.3.3. Persiapan Kultur Starter Bakteri	28
3.3.4. Pembuatan Yogurt	28
3.3.5. Penambahan Mikroba Probiotik Pada Yogurt ..	29
3.3.6. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH	29
3.3.7 Uji Antimikroba dengan Metode Difusi Sumuran	29
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1. Regenerasi Bakteri	31
4.1.1 Regenerasi Bakteri <i>Lactobacillus casei</i>	32
4.1.2 Regenerasi Bakteri <i>Zymomonas mobilis</i>	32
4.2. Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	33
4.2.1 Kurva Pertumbuhan Bakteri <i>Lactobacillus casei</i>	33
4.2.2 Kurva Pertumbuhan Bakteri <i>Zymomonas</i> <i>mobilis</i>	33
4.3. Pembuatan Yogurt.....	34
4.4. Pembuatan Kultur Starter Bakteri <i>Lactobacillus casei</i> dan Bakteri <i>Zymomonas mobilis</i>	35
4.5. Penambahan Mikroba Probiotik Pada Yogurt	36
4.6. Pengukuran dan Analisa Yogurt	36
4.6.1 Pengukuran pH.....	36
4.6.2 Uji Aktivitas Antimikroba Yogurt.....	38
4.6.3 Uji Aktivitas Antioksidan Yogurt	40
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	43
5.1. Kesimpulan.....	43
5.2. Saran	43
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN.....	48
BIODATA PENULIS	53

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Foto Yogurt	11
Gambar 2.2. Foto Bakteri <i>Streptococcus thermophilus</i>	12
Gambar 2.3. Foto Bakteri <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	12
Gambar 4.1. Foto Hasil Regenerasi Bakteri <i>Lactobacillus casei</i>	32
Gambar 4.2. Foto Hasil Regenerasi Bakteri	32
Gambar 4.3. Kurva Pertumbuhan <i>Lactobacillus casei</i>	33
Gambar 4.4. Kurva Pertumbuhan <i>Zymomonas mobilis</i>	34
Gambar 4.5. Foto Hasil Yogurt	35
Gambar 4.6. Kultur Starter Bakteri (a) <i>Zymomonas mobilis</i> dan (b) <i>Lactobacillus casei</i>	35
Gambar 4.7. (a) Yogurt, (b) Yogurt + <i>Zymomonas mobilis</i> dan (c), Yogurt + <i>Lactobacillus casei</i>	36
Gambar 4.8. Grafik pH Yogurt.....	37
Gambar 4.9. Hasil Uji Antimikroba	38
Gambar 4.10. Foto Hasil Uji Antioksidan.	40
Gambar 4.11. Nilai Antioksidan Yogurt dalam % inhibisi.....	42

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Syarat Mutu Yogurt.....	13
Tabel 4.1. Hasil Pengukuran Zona Bening.....	39
Tabel 4.2. Tabel % Inhibisi Sampel Uji	41

Karya ini kupersembahkan untuk
Ayah, Ibu dan saudaraku tersayang
Dosen Pembimbing
Herdayanto S. Putro, S.Si, M.Si
Sahabat-sahabatku
Indonesian Islamic Student Movement 1011
UKM Penalaran
UKM Tiyang Alit dan keluarga
UKM Rebana ITS
Mikronian
Serta rekan-rekan seperjuangan, C32"
Spesial
M.R.K

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Yogurt merupakan produk yang diperoleh dari olahan susu yang telah dipasteurisasi kemudian difermentasi dengan bakteri tertentu sampai diperoleh keasaman bau dan rasa yang khas, dengan atau tanpa penambahan bahan yang diizinkan (BSN, 1992). Bentuknya mirip bubur atau es krim tetapi dengan rasa agak asam. Yogurt merupakan produk fermentasi susu yang diberi tambahan bakteri sebagai starter. Jenis bakteri yang digunakan adalah *Streptococcus thermophiles* dan *Lactobacillus bulgaricus*, bakteri-bakteri ini yang akan memicu proses fermentasi dari susu yaitu mengubah laktosa pada susu menjadi asam laktat (Vedamuthu, 2006).

Yogurt juga lebih kaya gizi daripada susu sebagai bahan dasar dalam pembuatan yogurt, hal ini dikarenakan meningkatnya total padatan sehingga kandungan zat-zat gizi lainnya meningkat. Yogurt kaya akan protein, kalsium, riboflavin, vitamin B6 dan vitamin B12 (Ashraf & Shah, 2011). Selain itu yogurt dapat membantu proses pencernaan, meningkatkan kekebalan tubuh, mengurangi diare, diet dan melindungi dari kanker (Davoodi, Esmaeili, & Mortazavian, 2013; Hassan & Amjad, 2010)(Prasanna dkk, 2014; McFarland, 2015). Bahkan ada kelebihan yogurt yang tidak dimiliki oleh susu murni, salah satunya yaitu sangat cocok dikonsumsi oleh penderita yang tidak toleran terhadap laktosa (*Lactose Intolerance*) (Wahyudi, 2006).

Saat ini, produk yogurt dan susu fermentasi yang mengandung bakteri probiotik sudah umum ditemukan di pasar-pasar luar negeri seperti, Jelley Brown (Amerika Serikat) dan Zott (Jerman), yang telah menambahkan *Lactobacillus acidophilus*, atau Yili Changqing (Cina), yang telah menambahkan *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus rhamnosus*. Hal ini ditunjukkan

oleh penelitian sebelumnya manfaat kesehatan dari bakteri probiotik seperti *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* (Bao dkk, 2010)(Ashraf & Shah, 2011), sifat antioksidan (Zhang dkk, 2017) dan pengaruhnya dalam menurunkan tekanan darah (He dkk, 2017), mengurangi kadar kolesterol serum (Guan, Xu, Zheng, Qian, & Lin, 2017), serta merangsang sistem kekebalan tubuh (Ashraf & Shah, 2014).

Tidak hanya bakteri-bakteri tersebut, menurut Krisdianto (2019) penambahan bakteri *Lactobacillus casei* dan *Zymomonas mobilis* dapat meningkatkan kandungan glukosa, protein, dan lemak pada yogurt, sedangkan *L. casei* mampu mengurangi produksi senyawa galaktosa yang biasanya dihasilkan saat pembuatan yogurt. Galaktosa dalam jumlah besar dapat mengganggu kesehatan (Qinlong wu dkk, 2017). *Z. mobilis* diperoleh dari fermentasi ekstrak tanaman tropis dan sebagai salah satu agen fermentasi untuk pembuatan alkohol atau pada produksi bioetanol (Yanase, 2014). Ketika berinteraksi dengan sel di gastrointestinal, probiotik yang terkandung dalam susu fermentasi dapat meningkatkan beberapa aktivitasnya, antara lain aktivitas anti-inflamasi (Oliveira dkk, 2015), aktivitas antioksidan (Srivastava, Prasad, Ali, & Prasad, 2015), aktivitas antimikroba, dan aktivitas penghambatan inhibitor enzim angiotensin I (El-gawad dkk, 2014; Rai, Sanjukta, & Jeyaram, 2015).

Berdasarkan ulasan di atas, dalam penelitian ini akan dilakukan penambahan bakteri *L. casei* dan *Z. mobilis* kedalam yogurt untuk melihat aktivitas antioksidan dan antimikroba pada yogurt.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan penjelasan yang telah disampaikan dalam latar belakang, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah mengetahui apakah penambahan bakteri *Z. mobilis* dan bakteri

L. casei mampu meningkatkan aktivitas antioksidan dan aktivitas antimikroba pada yogurt.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui nilai aktivitas antioksidan dan antimikroba dari penambahan bakteri *L. casei* dan *Z. mobilis*

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah mendapatkan yogurt dengan kandungan antioksidan dan antimikroba tinggi melalui penambahan bakteri *L. casei* dan *Z. mobilis*.

1.5 Batasan Masalah

Pada penelitian ini menggunakan susu pasteurisasi merk “DIAMOND”, jenis starter yogurt yang digunakan berupa starter serbuk yang diinkubasi dalam susu pasteurisasi terlebih dahulu, jenis probiotik berupa bakteri *L. casei* dan *Z. mobilis* yang didapatkan dari NITE Biological Resource Center (NBRC 3301, Jepang).

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Susu

Susu segar merupakan cairan dari kelenjar susu (*mammary gland*) yang diperoleh dengan cara pemerahan sapi selama masa laktasi tanpa adanya penambahan atau pengurangan komponen apapun pada cairan tersebut (Hadiwiyoto, 1994). Secara kimiawi susu tersusun atas dua komponen utama, yaitu air yang berjumlah sekitar 87% dan bahan padat yang berjumlah sekitar 13%. Pada bahan padat susu terdapat berbagai senyawa kimia, baik yang tergolong senyawa zat gizi makro (makronutrien) seperti lemak, protein dan karbohidrat, maupun senyawa zat gizi mikro (mikro nutrien) seperti vitamin dan mineral serta beberapa senyawa lainnya (Mohamad, 2002).

Susu juga mengandung protein bermutu tinggi dengan kadar lemak 3,0 hingga 3,8%. Susu merupakan sumber kalsium dan fosfat yang baik, tinggi kandungan vitamin A, thiamin, niacin, dan riboflavin. Namun, susu kurang mengandung mineral terutama zat besi. (Ide, 2008). Sifat fisik dan kimiawi susu diantaranya: kerapatan, nilai pH, warna, rasa dan bau (Amalia, 2012).

2.1.1. Susu Pasteurisasi

Susu pada umumnya mudah mengalami kerusakan, maka dari itu harus ditangani secara cepat dan tepat. Salah satu cara penanganan susu adalah dengan cara pasteurisasi. Pasteurisasi merupakan suatu proses dengan meminimumkan kemungkinan resiko kesehatan yang timbul dari mikroorganisme patogenik dalam susu dengan perlakuan panas (Early, 1992). Pengolahan

susu memiliki 3 (tiga) tujuan utama, yaitu (1) membunuh bakteri patogen melalui pasteurisasi, (2) menjaga kualitas produk tanpa kehilangan atau penurunan nyata pada rasa, bentuk, kandungan fisik dan nutrisi, dan (3) mengendalikan secara selektif pertumbuhan organisme yang menghasilkan produk/materi/substansi tidak dikehendaki (Shearer dkk, 1992).

Badan Standarisasi Nasional (BSN) telah menetapkan SNI 01-3951-1995 tentang produk susu pasteurisasi, yakni produk susu yang dihasilkan dari susu segar, susu rekonstitusi, atau susu rekombinasi yang telah mengalami proses pemanasan pada temperatur 63-66°C selama minimum 30 menit atau pada pemanasan 72°C selama minimum 15 detik, kemudian segera didinginkan sampai 10°C, selanjutnya diperlakukan secara aseptis dan disimpan pada suhu maksimum 4,4°C (BSN, 1992).

2.1.2. Susu Skim

Susu skim adalah bagian susu yang tertinggal setelah krim diambil sebagian atau seluruhnya. Susu skim mengandung semua komponen gizi dari susu kecuali lemak dan vitamin yang larut dalam lemak (Buckle, Purnomo, Adiono., Tinggi, & Colleges, 1985). Karena lemaknya telah dipisahkan, susu skim hanya mengandung 0,5 – 2% lemak (Varnam & Jane P. Sutherland, 1994). Protein susu dapat digolongkan menjadi dua bagian, yaitu kasein dan whey. Kasein merupakan fraksi protein yang menggumpal ketika susu diasamkan pada pH 4,6 pada suhu sekitar 30°C, sedangkan fraksi yang tertinggal setelah pengendapan kasein disebut whey. Pada susu sapi dan kerbau, komposisi kasein dan whey yaitu berkisar 80 : 20 (Fox & McSweeney, 1998).

Susu skim mengandung semua zat makanan dari susu kecuali lemak dan vitamin-vitamin yang larut dalam lemak.

Krim mempunyai berat jenis yang rendah karena banyak mengandung lemak. Susu skim mempunyai berat jenis yang tinggi karena banyak mengandung protein. Susu skim adalah susu sapi yang telah diambil lemaknya dan diubah menjadi bentuk bubuk, mempunyai bentuk seperti granula kecil, dengan warna putih kekuningan. Susu ini banyak mengandung protein dengan kadar air 5% (Saleh, 2004).

2.2 BAL (Bakteri Asam Laktat)

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri gram positif yang berbentuk batang atau bulat, tidak membentuk spora, fermentasi fakultatif anaerob, tidak mempunyai sitokrom, tidak memiliki kemampuan untuk mereduksi nitrat dan memanfaatkan laktat, oksidasi negatif, katalase negatif, motilitas negatif dan kemampuan memfermentasi glukosa menjadi asam laktat (Carr dkk., 2002). Bakteri asam laktat merupakan kelompok mikroba komensal dan lingkungan yang sangat beragam. Klasifikasi Bakteri Asam Laktat

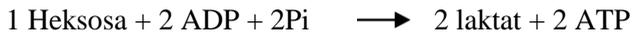
Kingdom	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Lactobacillales
Famili	: Lactobacillaceae
Genus	: Lactobacillus

(Holt dkk, 2000)

Reaksi fermentasi bakteri asam laktat terbagi 2 yaitu secara homofermentatif dan heterofermentatif. Reaksi homofermentatif menghasilkan asam laktat, 2 mol ATP dari 1 glukosa/heksosa dalam kondisi normal, tidak menghasilkan CO₂ dan menghasilkan biomassa sel dua kali lebih banyak dari pada bakteri asam laktat heterofermentatif. Sedangkan reaksi

heterofermentatif selain menghasilkan asam laktat juga menghasilkan etanol, CO₂, asam asetat serta 1 mol ATP dari heksosa dan tidak mempunyai enzim aldolase (Jay dkk, 2005). Untuk lebih jelasnya reaksi fermentasi bakteri asam laktat dapat dilihat di bawah ini:

Reaksi homofermentatif



Reaksi Heterofermentatif



Atau



(Axelsson, 1998)

Produk fermentasi BAL diantaranya asam organik yang berfungsi sebagai antibakteri (Lindgren dan Dobrogosz, 1990). Hidrogen peroksida sebagai prekursor untuk memproduksi bakteri radikal bebas antara lain O₂ dan OH⁻ yang dapat merusak DNA (Byczkowski dan Gessner, 1988). Karbondioksida dapat menghambat mikroba pembusuk makanan dan juga mampu menghasilkan bakteri gram negatif (Hotchkiss, 1999). Asetaldehid yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri spesifik dalam kadar tertentu (Piard dan Desmazeaud, 1992).

2.3. Fermentasi

Fermentasi berasal dari kata *fervere* (latin), yang berarti mendidih, menunjukkan aktivitas ragi pada ekstrak buah selama pembuatan minuman beralkohol. Perbedaan pengertian antara ahli mikrobiologi dan ahli biokimia, yaitu proses yang menghasilkan energi dengan perombakan senyawa organik merupakan pengertian fermentasi yang dikembangkan oleh ahli biokimia. Sedangkan ahli mikrobiologi mendefinisikan fermentasi menjadi segala proses untuk menghasilkan suatu produk dari kultur mikroorganisme (Walker & Gingold, 1983).

Fermentasi secara teknik dapat didefinisikan sebagai suatu proses oksidasi anaerobik atau parsial anaerobik karbohidrat yang menghasilkan alkohol serta beberapa asam, namun banyak proses fermentasi yang menggunakan substrat protein dan lemak (Muchtadi dan Ayustaningwarno 2010).

Fermentasi dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu fermentasi spontan dan tidak spontan (membutuhkan starter). Fermentasi spontan merupakan fermentasi yang dilakukan dengan menggunakan media penyeleksi, seperti garam, asam organik, asam mineral, nasi atau pati. Media penyeleksi tersebut akan menyeleksi bakteri patogen dan menjadi media yang baik bagi tumbuh kembang bakteri selektif yang membantu jalannya fermentasi. Fermentasi tidak spontan merupakan fermentasi yang dilakukan dengan penambahan kultur organisme bersama media penyeleksi sehingga proses fermentasi dapat berlangsung lebih cepat (Rahayu, Ma'Oen, & Suliantari, 1992).

Hasil fermentasi diperoleh dari metabolisme mikroba-mikroba pada suatu bahan pangan dalam keadaan anaerob. Mikroba yang melakukan fermentasi membutuhkan energi yang umumnya diperoleh dari glukosa. Dalam keadaan aerob, mikroba mengubah glukosa menjadi air, CO₂ dan energi (ATP).

Beberapa mikroba hanya dapat melangsungkan metabolisme dalam keadaan anaerob dan hasilnya adalah substrat yang setengah terurai. Hasil penguraiannya adalah air, CO₂, energi dan sejumlah asam organik lainnya, seperti asam laktat, asam asetat, etanol serta bahan-bahan organik yang mudah menguap. Perkembangan mikroba-mikroba dalam keadaan anaerob biasanya dicirikan sebagai proses fermentasi (Muchtadi dan Ayustaningwarno 2010).

2.4. Yogurt

Yogurt menurut SNI 01-2981-1992 adalah produk yang diperoleh dari susu yang telah dipasteurisasi, kemudian difermentasi dengan bakteri tertentu sampai diperoleh keasaman, bau dan rasa yang khas, dengan atau tanpa penambahan bahan lain yang diizinkan (BSN, 1992). Yogurt merupakan produk hasil fermentasi susu dengan menggunakan bakteri sebagai starternya. Jenis bakteri yang digunakan adalah *Streptococcus thermophiles*, dan *Lactobacillus bulgaricus* (Vedamuthu, 2006).

Di Indonesia Yogurt sudah banyak diketahui masyarakat dengan berbagai macam bentuk dan rasa. Mulai dari yang kental dan cair seperti pada gambar 2.1, dengan varian rasa buah yang beragam. Yogurt memiliki peranan penting dalam kesehatan. Di Amerika Yogurt non-lemak dan rendah lemak digunakan sebagai makanan untuk melengkapi nutrisi yang kurang dari makanan, seperti kalsium, vitamin D dan kalium. Yogurt juga dapat menjadi sumber protein berkualitas tinggi yang sangat baik, yang meningkatkan rasa kenyang, membantu menjaga berat badan yang sehat, dan membantu pertumbuhan otot dan tulang (Webb dkk, 2014)

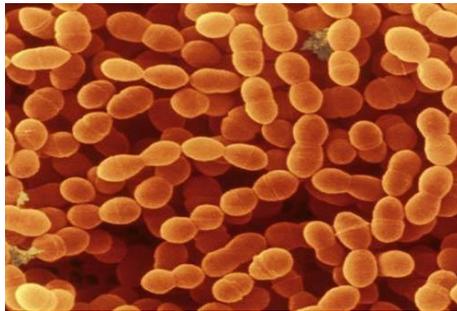


Gambar 2.1. Foto Yogurt
(www.google.com, diakses pada tanggal 15 Juli 2019)

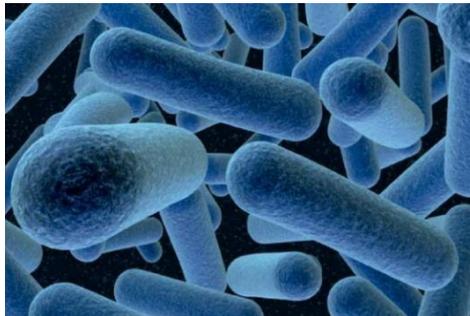
Selain itu, yogurt mengandung natrium rendah dan hanya menyumbang 1,0% atau kurang dari gula tambahan untuk diet kebanyakan individu di Amerika Serikat. Sebagaimana didefinisikan oleh Food and Drug Administration (FDA), yogurt atau makanan yang mengandung 10% dari asupan harian yang diperlukan (RDI) dari nutrisi tertentu (misalnya, kalsium) dianggap sebagai sumber nutrisi yang baik, sedangkan jika mengandung 20% atau lebih dari RDI dianggap sebagai sumber yang bagus. Komposisi nutrisi dari yogurt dan susu serupa, namun, yogurt adalah sumber riboflavin, vitamin B12, kalsium, magnesium, dan potasium yang lebih terkonsentrasi, serta nutrisi lain. (Wang dkk, 2014)

Proses fermentasi yogurt dilakukan sampai diperoleh pH akhir berkisar antara 4,4-4,5 diikuti dengan terbentuknya rasa yang khas karena terbentuknya asam laktat, asam asetat, asetaldehid, diasetil dan senyawa volatil lainnya (Widodo, 2002). Proses pembuatan yogurt dimulai dengan pemanasan susu yang akan difermentasi pada suhu 90°C selama 15-30

menit, kemudian didinginkan sampai suhu 43°C. Inokulasi dilakukan dengan penambahan 2% kultur campuran *S.thermophiles* dan *L.bulgaricus* kemudian diinkubasi pada suhu 43°C selama kurang lebih 3 jam hingga tercapai keasaman yang diinginkan yaitu 0,85%-0,9% asam laktat atau mencapai pH 4,0-4,5 (Buckle dkk, 1985). Bentuk bakteri *S.thermophiles* dan *L.bulgaricus* ditunjukkan pada gambar 2.2 dan gambar 2.3.



Gambar 2.2. Bakteri *Streptococcus thermophilus* (www.google.com, diakses pada tanggal 10 Juli 2019)



Gambar 2.3. Bakteri *Lactobacillus bulgaricus* (www.google.com, diakses pada tanggal 10 Juli 2019)

Manfaat dari mengonsumsi yogurt antara lain untuk penderita *lactose intolerant*, melawan pertumbuhan bakteri patogen yang sudah maupun yang baru masuk dan menginfeksi di dalam saluran pencernaan, mereduksi kanker atau tumor di saluran pencernaan, mereduksi jumlah kolesterol dalam darah dan stimulasi sistem syaraf, khusus untuk saluran pencernaan dan stimulasi pembuangan kotoran (Trisnaningtyas, Legowo, & Kusrahayu, 2013).

Yogurt yang baik mengandung kadar asam 0,5%-2,0% dan mengandung BAL minimal sebanyak 107 CFU/ml (BSN, 1992). Syarat mutu yogurt berdasarkan Standar Nasional Indonesia (BSN) 2981-2009 dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Syarat Mutu Yogurt

Kriteria Uji	Satuan	Spesifikasi
Keadaan		
- Penampakan	-	Cairan kental-semi padat
- Bau	-	Normal/khas
- Rasa	-	Asam/khas
- Konsentrasi	-	Homogen
Kadar lemak (b/b)	%	Min 3,0
Total padatan susu bukan Lemak	%	Min 8,2
Protein	%	Min 2,7
Kadar abu	%	Maks 1,0
Keasaman (dihitung sebagai asam laktat) (b/b)	%	0,5-2,0

Sumber: Badan Standarisasi Nasional, 2009.

2.5. Mikroba Probiotik

Probiotik didefinisikan sebagai "mikroorganisme hidup jika diberikan dalam jumlah yang cukup, akan memberikan manfaat kesehatan bagi inangnya" (FAO / WHO, 2002). Bakteri probiotik yang dicerna telah lama diterima untuk berperan dalam kesehatan seluruh saluran gastrointestinal (GI) dan mengatur proses sistemik lainnya termasuk infeksi, imunitas bawaan dan adaptif, metabolisme sekunder, dan sistem neurobehavioral oleh berbagai mekanisme yang dipostulatkan (Jones dkk, 2015). Sebagai contoh, bakteri probiotik telah dilaporkan secara langsung melawan patogen enterik melalui penghambatan kompetitif untuk mengikat sel inang (resistensi kolonisasi) dan produksi metabolit antimikroba (bacteriocins) (Jones dkk, 2013). Kebanyakan probiotik pertama kali diidentifikasi dalam produk makanan atau diisolasi dari lingkungan usus (Orla, 1919).

Beberapa jenis mikroba probiotik yang dapat dimanfaatkan yaitu *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* and *Enterococcus spp* (Tamime, 2005). Kriteria bakteri probiotik adalah sebagai berikut:

1. Bakteri probiotik berasal dari strain asal diisolasi dari spesies yang sama dan digunakan sesuai dengan tujuan penggunaan agar bakteri tersebut dapat hidup terus
2. Bakteri probiotik yang digunakan harus aman dengan berbagai kemungkinan adanya ketahanan terhadap transfer antibiotik
3. Bakteri probiotik dapat bertahan hidup di dalam makanan dan proses pencernaan. Bakteri probiotik ini harus tahan terhadap asam, sekresi empedu dan dapat melekat pada sel epitel

4. Bakteri probiotik dapat tumbuh dalam kultur starter tanpa terjadi variasi genetik.

(Menurut Gibson dan Fuller, 2000)

2.6. Bakteri *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei merupakan bakteri Gram-positif, anaerob, tidak memiliki alat gerak, tidak menghasilkan spora, berbentuk batang dan salah satu bakteri yang berperan penting dalam pencernaan. *Lactobacillus* adalah bakteri yang bisa memecah protein, karbohidrat, dan lemak dalam makanan, dan menolong penyerapan elemen penting dan nutrisi seperti mineral, asam amino, dan vitamin yang dibutuhkan manusia dan hewan untuk bertahan hidup (Evillya, 2010).

Klasifikasi ilmiah dari bakteri *L.casei* adalah sebagai berikut:

Domain	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Lactobacillales
Famili	: Lactobacillaceae
Genus	: <i>Lactobacillus</i>
Spesies	: <i>Lactobacillus casei</i>

Bakteri ini berukuran $0,7 - 1,1 \times 2,0 - 4,0 \mu\text{m}$ dan merupakan bakteri yang penting dalam pembentukan asam laktat. Seperti bakteri asam laktat lain, *L. casei* toleran terhadap asam, tidak bisa mensintesis perferin, dan melakukan fermentasi dengan asam laktat sebagai metabolit akhir yang utama. Bakteri ini membentuk gerombolan dan merupakan bagian dari spesies heterofermentatif fakultatif. Pertumbuhan *L. casei* pada suhu 15°C . Foto dari *L. casei* dapat dilihat pada Gambar 2.4



Gambar 2.4 Bakteri *Lactobacillus casei*
(www.google.com, diakses pada tanggal 14 Juli 2019)

2.6. Bakteri *Zymomonas mobilis*

Bakteri ini memiliki ciri-ciri : sel diplobasil, ukuran 4-5 μm dan 1,4 – 2,0 μm , motil dengan polar flagella, gram negatif, tidak membentuk endospore dalam beer wort; koloni bakteri berwarna putih, sirkuler konveks, mempunyai diameter 1 mm, suhu optimum 30°C. organisme ini bersifat anaerob fakultatif, tetapi kondisi anaerob diperlukan untuk memfermentasi gula (Swings & Genetics, 1977). Klasifikasi *Z. mobilis* adalah sebagai berikut :

Domain	: Bakteria
Phylum	: Proteobacteria
Classis	: Alpha Proteobacteria
Ordo	: Sphingomonadales
Familia	: Sphingomonadaceae
Genus	: <i>Zymomonas</i>
Spesies	: <i>Zymomonas mobilis</i>

Genus *Zymomonas* termasuk dalam bakteri gram negative yang bersifat anaerobik fakultatif. *Z. mobilis* mempunyai bentuk seperti tangkai dengan ukuran lebar 1,0 – 2,0 μm dan panjang 2,0 – 6,0 μm dan selalu berpasangan serta

termasuk bakteri yang tidak *mobil*. Bakteri ini dapat tumbuh baik dengan sumber nitrogen berbentuk ammonium (Buchanan & Gibbons, 1974; Ly, 2007). Karena bersifat anaerobik fakultatif maka bakteri ini dapat tumbuh dalam lingkungan aerob maupun anaerob (Levett, 1991; Mastroeni, 2003). Foto *Z. mobilis* dapat dilihat pada gambar 2.5



Gambar 2.5 Foto Bakteri *Zymomonas mobilis*
(www.google.com, diakses pada tanggal 14 Juli 2019)

2.8. Kurva Pertumbuhan Bakteri

Bakteri yang merupakan organisme prokariot, pertumbuhan adalah penambahan dari jumlah sel dan ukuran sel. Pertumbuhan pada sel bakteri secara umum, mengikuti suatu pola pertumbuhan tertentu berupa kurva pertumbuhan sigmoid.

Perubahan gradien pada kurva berarti perubahan fase pada perkembangan bakteri. Mengacu pada kurva, pertumbuhan bakteri dapat dibagi menjadi empat fase utama, yaitu fase lag (fase pertumbuhan secara lambat), fase pertumbuhan eksponensial (fase pertumbuhan dengan cepat/jumlah pertumbuhan lebih besar dari pada jumlah

kematian individu bakteri), fase stasioner (fase tetap/jumlah pertumbuhan sama dengan jumlah kematian individu bakteri) dan fase penurunan/kematian (fase pengurangan jumlah bakteri/jumlah pertumbuhan lebih kecil dari pada jumlah kematian individu bakteri). Fase-fase diatas menunjukkan kondisi kultur bakteri pada saat-saat tertentu. Pada tiap fase terdapat periode peralihan dimana terdapat rentang waktu sebelum semua sel memasuki fase yang baru. (Kusnadi, 2012). Kurva pertumbuhan bakteri dapat dibuat dengan satu cuplikan koloni bakteri yang diinokulasikan dari stok bakteri hasil regenerasi menggunakan jarum ose ke dalam media cair steril *nutrient broth* (NB) yang telah dimasukkan dalam tabung steril, yang kemudian diinkubasi dalam *shacker* pada suhu sesuai suhu optimum bakteri. Perhitungan jumlah bakteri dilakukan dengan metode turbidimetri. Metode ini mendasar pada peningkatan kekeruhan / *optical density* (OD) dalam kultur bakteri karena disebabkan oleh peningkatan jumlah bakteri atau dapat juga terjadi karena ukuran bakteri dalam kultur semakin besar.

Prinsip dasar dari metode ini adalah saat cahaya mengenai sel, maka sebagian cahaya akan dihamburkan dan sebagian cahaya yang lain akan diteruskan. Jumlah absorbansi (cahaya yang dihamburkan atau diserap) berbanding lurus dengan jumlah sel bakteri, atau jumlah sel berbanding terbalik dengan jumlah cahaya yang diteruskan. Karenanya, semakin sedikit cahaya yang diteruskan, hal itu berarti semakin banyak jumlah sel bakteri. Metode turbidimetri ini dilakukan dengan mengukur absorbansi dari kultur cair bakteri dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm. Panjang gelombang yang digunakan tergantung pada warna kultur bakteri, panjang gelombang 420

nm digunakan pada kultur tak berwarna, panjang gelombang 540 nm digunakan pada kultur dengan warna kuning terang, dan panjang gelombang antara 600-625 digunakan pada kultur berwarna kuning sampai kecoklatan. Nilai absorbansi dapat menunjukkan jumlah bakteri berdasarkan perbandingan absorbansi pada OD dengan panjang gelombang 600 nm (OD_{600}) dimana:

$$\begin{aligned} \text{Absorbansi 1} &\approx 1 \times 10^9 \text{ sel/mL kultur} \\ &\approx 1 \text{ mg/mL atau } 1 \text{ g/liter berat} \\ &\quad \text{basah sel} \\ &\approx 0,25 \text{ g/liter berat kering sel} \end{aligned}$$

2.9. pH Fermentasi Yogurt

Derajat keasaman suatu larutan dinyatakan dengan pH, dimana larutan dinyatakan netral jika memiliki $\text{pH} = 7$, asam jika $\text{pH} < 7$, dan basa jika $\text{pH} > 7$.

Proses fermentasi yogurt menurut Widodo (Widodo, 2002), dilakukan sampai diperoleh pH akhir berkisar antara 4,4-4,5 diikuti dengan terbentuknya rasa yang khas karena terbentuknya asam laktat, asam asetat, asetaldehid, diasetil dan senyawa volatil lainnya. Proses pembuatan yogurt dimulai dengan pemanasan susu yang akan difermentasi pada suhu 90°C selama 15-30 menit, kemudian didinginkan sampai suhu 43°C . Inokulasi dilakukan dengan penambahan 2% kultur campuran *S. thermophilus* dan *L.bulgaricus* dan diinkubasi pada suhu 43°C selama kurang lebih tiga jam hingga tercapai keasaman yang dikehendaki yaitu 0,85%-0,9% asam laktat atau mencapai pH 4,0-4,5.

Komposisi produk fermentasi bergantung pada kondisi susu awal dan metabolisme spesifik dari pertumbuhan kultur

mikroorganisme. Aktivitas dari starter yogurt memungkinkan terjadi degradasi laktosa dan produksi asam laktat yang berakibat pada penurunan pH, sehingga kadar asam yogurt relatif tinggi dan terbentuknya gumpalan yogurt. Proses fermentasi yogurt mengubah laktosa yang terdapat dalam susu menjadi asam laktat.

2.10. Uji Aktivitas Antimikroba Yogurt

Metode pengujian daya antimikroba bertujuan untuk menentukan konsentrasi suatu zat antimikroba sehingga memperoleh suatu sistem pengobatan yang efektif dan efisien. Terdapat dua metode untuk menguji daya antimikroba, yaitu metode dilusi dan metode difusi. Prinsip uji dari metode dilusi adalah melarutkan senyawa antibakteri pada media agar atau kaldu yang kemudian ditanami bakteri uji untuk selanjutnya ditentukan konsentrasi terendah dari senyawa antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (konsentrasi hambat minimum) setelah dilakukan inkubasi semalam.

Sedangkan prinsip uji dari metode difusi adalah menempatkan cakram kertas yang telah diberikan perlakuan senyawa antimikroba dengan konsentrasi tertentu pada media yang telah ditanami organisme yang akan diuji secara merata. Penentuan kepekaan atau aktivitas antimikroba dengan metode difusi dilakukan dengan mengukur diameter zona bening yang terbentuk disekitar cakram. Zona bening ini disebut sebagai zona hambat. Semakin besar diameter zona hambat, maka semakin kecil nilai konsentrasi hambat minimum dari suatu senyawa (Soleha, 2015).

2.11. Metode Sumuran (*Well-Diffusion*)

Uji antimikroba yang sering dilakukan yaitu metode difusi karena mudah dan cepat. Pengujian dengan metode ini dapat dilakukan dengan dua cara yaitu metode disk dan sumuran, dimana kedua metode tersebut memiliki kelebihan dan kekurangan. Metode sumuran lebih mudah dalam mengukur luas zona hambat yang terbentuk karena isolat beraktivitas tidak hanya di permukaan atas nutrien agar akan tetapi juga sampai ke bawah, dan kelebihan metode disk yaitu dapat dilakukan pengujian secara lebih banyak dalam satu kali kegiatan dan tidak terlalu memerlukan tenaga yang banyak. Kekurangan dari kedua metode tersebut tidak diketahui secara pasti penghambatan bakterisid ataupun bakteriostatik, karena banyak faktor yang mempengaruhi, diantaranya ketebalan media, macam media, inokulum dan laju difusi bahan antimikroba (Listari, 2009).

2.12. Aktivitas Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat memperlambat, menghambat, atau mencegah oksidasi lemak atau molekul lain. Berdasarkan asalnya, terdapat dua macam antioksidan, yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Dalam tubuh manusia antioksidan sangat dibutuhkan untuk melindungi tubuh dari serangan radikal bebas. Adanya kekhawatiran akan kemungkinan efek samping yang belum diketahui dari antioksidan sintetik menyebabkan antioksidan alami menjadi alternative yang sangat dibutuhkan (Javanmardi dkk, 2003).

Radikal bebas merupakan suatu molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan yang menempati molekul orbitalnya sendiri. Suatu atom atau

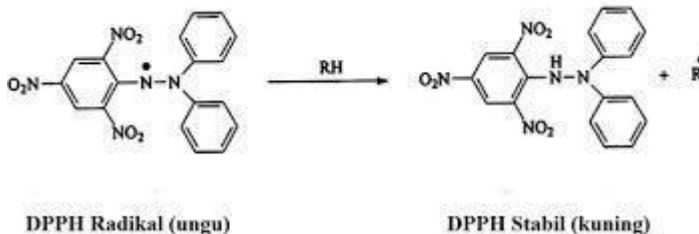
molekul akan tetap stabil bila elektronnya berpasangan. Untuk mencapai kondisi stabil tersebut, radikal bebas dapat menyerang bagian tubuh seperti sel, sehingga dapat menyebabkan kerusakan sel tersebut dan mempengaruhi kinerja sel dan jaringan, sehingga pada proses metabolisme tubuh juga terganggu. Radikal bebas dapat berasal dari tubuh makhluk hidup itu sendiri sebagai akibat aktivitas tubuh seperti aktivitas antioksidan, oksidan enzimatik, organel subseluler, aktivitas ion logam transisi dan berbagai sistem enzim lainnya (Beksono, 2014).

Menurut Packer (1995) penentuan aktivitas antioksidan suatu senyawa dapat diukur dari kemampuannya menangkap radikal bebas. Pengukuran aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan beberapa metode diantaranya DPPH (2,2- difenil 1 pikrilhidrazil), FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*) dan CUPRAC (*Cupric ion reducing antioxidant capacity*). Radikal bebas yang biasa digunakan sebagai model dalam pengukuran daya penangkapan radikal bebas adalah DPPH.

2.13. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan yang sering digunakan yaitu menggunakan metode DPPH. Hal ini karena pengujiannya yang sederhana, cepat dan akurat (Prakash, dkk., 2001). Senyawa 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) ini telah digunakan secara luas untuk mengevaluasi efektivitas penangkapan radikal bebas dari beberapa senyawa antioksidan. Dalam *assay* DPPH, antioksidan mampu untuk mendonasikan hidrogen untuk mereduksi radikal stabil DPPH berwarna ungu menjadi non radikal berwarna kuning yaitu difenil pikrilhidrazin (DPPH-H).

DPPH biasanya digunakan sebagai reagen untuk mengevaluasi aktivitas penangkalan radikal bebas oleh antioksidan berdasarkan perubahan serapan DPPH pada 517 nm diukur dengan spektrofotometer. Cara kerja metode ini sederhana, dimana cukup dengan menggunakan instrumen Spektrofotometer UV- Vis, membuat metode ini banyak digunakan untuk mengukur aktifitas antioksidan (Karadag dkk, 2009). Reaksi DPPH dengan senyawa antioksidan dapat dilihat pada gambar 2.6



Gambar 2.6 Reaksi DPPH dengan Antioksidan (www.google.com, diakses pada tanggal 15 Juli 2019)

Nilai konsentrasi efektif merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak (mikrogram/mililiter) yang mampu menghambat 50% oksidasi. Perhitungan nilai konsentrasi efektif atau IC₅₀ menggunakan rumus % inhibisi sebagai berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = 1 - \left(\frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \right) \times 100\%$$

Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC₅₀ kurang dari 50, kuat (50-100), sedang (100- 150),

dan lemah (151-200). Semakin kecil nilai IC_{50} semakin tinggi aktivitas antioksidan (Badarinath, 2010).

2.14. Spektrofotometer Ultraviolet-Visible (UV-Vis)

Spektrofotometri UV-Vis merupakan salah satu metode instrumen untuk mempelajari serapan atau emisi radiasi gelombang elektromagnetik sebagai fungsi panjang gelombang tertentu dengan molekul senyawa atau atom dari suatu zat kimia. Metode spektrofotometri dapat digunakan untuk analisis secara kualitatif dan kuantitatif. Larutan sampel diabsorpsi oleh sumber radiasi elektromagnetik dan jumlah yang diabsorpsi sebanding dengan konsentrasi larutan sampel (Mulja & Syahrani, 1990).

Spektrofotometri UV-Vis memiliki dua daerah pengukuran dan panjang gelombang yang berbeda yaitu daerah radiasi ultraviolet pada panjang gelombang 220-380 nm dan daerah radiasi sinar tampak (*visible*) pada panjang gelombang 380-780 nm. Informasi yang dapat diperoleh dari spektra UV-Vis adalah adanya gugus berikatan rangkap atau terkonjugasi yang mengadsorpsi radiasi elektromagnetik di daerah UV-Vis. Prinsip dari spektrofotometer UV-Vis adalah mengukur jumlah cahaya yang diabsorpsi atau ditransmisikan oleh molekul-molekul di dalam larutan. Besarnya kemampuan molekul-molekul zat terlarut untuk mengabsorpsi cahaya pada panjang gelombang tertentu dikenal dengan istilah absorbansi (A). Absorbansi setara dengan nilai konsentrasi larutan dan panjang berkas cahaya yang dilalui ke suatu poin dimana presentase jumlah cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi akan diukur *phototube* (Harmita, 2006).

Pada spektrofotometri, cahaya yang masuk mengenai permukaan zat dan cahaya setelah melewati zat tidak dapat

diukur secara langsung. Pengukuran hanya dapat dilakukan dengan menggunakan perbandingan I_t/I_0 dimana I_0 merupakan intensitas cahaya datang dan I_t adalah intensitas cahaya setelah melewati sampel.

Cahaya yang diserap diukur sebagai absorbansi (A) sedangkan cahaya yang dihamburkan diukur sebagai transmitansi (T). Berdasarkan hukum Lambert-Beer yang menyatakan “*Jumlah radiasi cahaya tampak yang diserap atau ditransmisikan oleh suatu larutan merupakan suatu fungsi eksponen dari konsentrasi zat dan tebal wadah larutan*”, maka persamaan untuk menghitung banyaknya cahaya yang dihamburkan yaitu:

$$\log \frac{I_0}{I} = \log \frac{100}{T(\%)} = A \dots \dots \dots (2.1)$$

Sehingga hubungan absorbansi dengan transmitan dapat dinyatakan dengan persamaan:

$$A = \log \frac{I_0}{I} \dots \dots \dots (2.2)$$

$$T = \frac{I_0}{I} \cdot 100\% \dots \dots \dots (2.3)$$

Dari persamaan diatas, dapat dikatakan bahwa konsentrasi dari suatu larutan berwarna harus sebanding dengan intensitas warna larutan (Underwood & Jr, 1986).

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca digital OHAUS analitik, kaca arloji, spatula besi, pengaduk kaca, autoclave, cawan petri, jarum ose, laminary flow, parafilm, inkubator, plastik wrap, aluminium foil, pH meter digital Senz pH Trans Instruments, botol semprot, corong, pipet tetes, kuvet plastik, kuvet kaca, tabung reaksi dan rak, pipet ukur 1; 2; 10 mL, propipet, labu ukur 250 mL, botol cokelat, oven, lemari pendingin, pipet mikro 1000 μ L. Instrumen yang digunakan adalah spektrofotometer Genesys IOS UV-Vis.

3.2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah bibit yogurt yang mengandung strain bakteri *Lactobacillus bulgaricus*, strain bakteri *Streptococcus thermophilus*, dan strain bakteri *Lactobacillus acidophilus*, susu sapi murni, strain bakteri *Lactobacillus casei*, strain bakteri *Zymomonas mobilis*, medium *Nutrient Broth* (NB), Agar Powder, etanol 70%, aquades, aqua DM, methanol, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), antibiotik ampisilin.

3.3. Prosedur

3.3.1 Regenerasi Bakteri

Masing-masing bakteri (strain bakteri *Lactobacillus casei*, strain bakteri *Zymomonas mobilis*) diinokulasikan pada cawan petri berbeda yang berisi Nutrient Agar yang telah disterilkan dalam autoclave dan diinkubasi selama kurang lebih 24 jam pada suhu masing-masing 37°C dan 30°C.

3.3.2 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri

Bakteri *L. casei* dan bakteri *Z. mobilis* dari hasil regenerasi sebanyak 1 mata ose masing-masing diinokulasikan ke dalam 600 mL *Nutrient Broth* medium dalam erlenmeyer 1000 mL yang berbeda, kemudian erlenmeyer berisi bakteri *L. casei* diinkubasi pada suhu 37°C dan erlenmeyer berisi bakteri *Z. mobilis* diinkubasi pada suhu 30°C. Kedua erlenmeyer diinkubasi didalam *autoshacker* dengan kecepatan 180 rpm. *Optical density* diukur pada panjang gelombang 600 nm (OD₆₀₀, Absorbansi $1 \approx 1 \times 10^9$ sel/ml kultur) dengan spektrofotometri UV-Vis setiap jamnya. Dibuat kurva dengan absorbansi sebagai fungsi waktu untuk mengetahui titik stasioner dari bakteri *L. casei* dan *Z. mobilis*

3.3.3 Persiapan Kultur Starter Bakteri

Sebanyak dua labu erlenmeyer 100 mL yang telah disterilkan disiapkan dan kedalamnya dimasukkan 10 mL susu sapi yang telah dipasteurisasi pada suhu 85°C selama 10 menit dan didiamkan sampai suhu 40°C. Kemudian ke dalam masing-masing labu erlenmeyer dimasukkan satu mata ose bakteri *L.casei* dan bakteri *Z. mobilis* lalu dikocok perlahan. Kultur starter bakteri *L.casei* diinkubasi pada suhu 37°C dan kultur starter bakteri *Z.mobilis* diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam.

3.3.4 Pembuatan Yogurt

Bibit yogurt berupa serbuk yang berisi *L. bulgaricus*, *S.thermophilus*, dan *L. acidophilus* sebanyak 20 g dicampurkan ke dalam 150 mL air mineral, dikocok hingga bibit yogurt terlarut dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam sampai starter yogurt menjadi kental. Setelah itu bibit yogurt dipindahkan ke dalam susu. 50 mL bibit dapat dicampurkan ke dalam 1 liter susu pasteurisasi, sehingga 150 mL bibit yogurt dapat digunakan untuk 3 liter susu pasteurisasi. Diinkubasi selama 12 jam pada suhu 30°C. Hasil produksi berupa yogurt yang dapat digunakan.

3.3.5 Penambahan Mikroba Probiotik Pada Yogurt

Yogurt yang telah dibuat masing-masing dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 mL yang telah diberi label A, B, dan C sebanyak 50 ml. Erlenmeyer A sebagai kontrol. Pada erlenmeyer B ditambahkan 2,5 mL kultur starter bakteri *L. casei*, dan pada erlenmeyer C ditambahkan 2,5 mL kultur starter bakteri *Z. mobilis*. Kemudian, erlenmeyer A (kontrol) dan erlenmeyer B diinkubasi pada suhu 37°C sedangkan erlenmeyer C diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam.

3.3.6 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Pengukuran aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) sebagaimana yang telah dilakukan oleh deng dkk (2014). Satu mililiter sampel dan kontrol yogurt masing-masing ditambah dengan 9 mL larutan DPPH 60 μ M. Campuran yang dihasilkan kemudian dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 517 nm. Pengukuran absorbansi diulangi sebanyak tiga kali. Hasil analisa aktivitas antioksidan dinyatakan dalam bentuk persentase (%) inhibisi, yang juga melambangkan % aktivitas penghambatan radikal bebas. Persentase penghambatan dapat dihitung dengan persamaan 3.1.

$$\% \text{ Inhibisi} = 1 - \left(\frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \right) \times 100\%$$

(3.1)

3.3.7 Uji Antimikroba dengan Metode Difusi Sumuran

Pengujian antibiotik dilakukan seperti yang telah dilakukan Saadah dkk, 2016. Dimasukkan 0.1 mL kultur *Escherichia coli*

kedalam cawan petri steril dan ditambahkan 20 mL media NA yang tidak terlalu panas. Dilakukan pengadukan dengan menggoyang petridish. Pada agar yang telah mengeras dibuat lubang sumuran dengan diameter 6 mm menggunakan tip sebanyak tiga lubang. Pada masing-masing lubang dimasukkan 20 μ L sampel dan kontrol. Lubang A berisi Ampisilin dengan konsentrasi 10 μ g/L, lubang B berisi sampel yogurt kontrol, dan lubang C berisi sampel yogurt probiotik. Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Adanya aktivitas antibakteri ditandai dengan terbentuknya daerah bening (zona bening) yang terbentuk disekitar lubang yang menunjukkan terhambatnya pertumbuhan bakteri gram negatif

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Regenerasi Bakteri

Pada penelitian ini bakteri yang digunakan adalah *L. casei* dan *Z. mobilis* yang didapatkan dari NITE Biological Resource Center (NBRC, Jepang). Bakteri tersebut diinokulasi menggunakan jarum ose dengan metode goresan kuadran pada cawan petri yang berisi media agar steril *nutrient agar* (NA). Pemilihan NA sebagai media inokulasi karena kandungan nutrisi NA yang lengkap serta sesuai dengan kebutuhan nutrisi bakteri dalam proses perkembang biakannya. Komposisi NA terdiri dari pepton, ekstrak daging, NaCl, dan agar. Pepton merupakan sumber nitrogen yang kaya akan senyawa nitrogen bebas yang sederhana. Nitrogen memiliki fungsi sebagai prekursor untuk mensintesis asam amino, protein, dan enzim serta membentuk sel baru oleh bakteri. Ekstrak daging merupakan sumber karbohidrat, protein, vitamin B kompleks, dan mineral (kalsium, sulfur, fosfat, kalium, dll) bagi bakteri. Vitamin B kompleks berfungsi sebagai senyawa katalitik dalam sel dan sebagai faktor koenzim atau grup prostetik enzim. Karbohidrat berfungsi sebagai sumber karbon dalam pembentukan energi yang dibutuhkan pada metabolisme dan pertumbuhan bakteri. NaCl selain menjadi faktor yang dapat menaikkan tekanan osmosis juga berfungsi sebagai penyedia unsur mikro (natrium) dan keseimbangan psikokimia pada sel bakteri. Kemudian agar berfungsi sebagai medium pengeras ketika dilarutkan dalam air dan disterilisasi untuk memastikan mikroorganisme lain tidak hidup dalam media tersebut (Sutarna, 2000).

4.1.1 Regenerasi Bakteri *Lactobacillus casei*

Bakteri *L. casei* diinkubasi pada suhu 37°C, dimana suhu ini merupakan suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri *L. casei* (Todar, 2006). Setelah diinkubasi selama 24 jam, diperoleh bakteri hasil kulturasi yang membentuk koloni seperti ditunjukkan pada Gambar 4.1, hal ini menunjukkan bakteri hasil kulturasi telah siap untuk diberi perlakuan selanjutnya.



Gambar 4.1. Foto Hasil Regenerasi Bakteri *Lactobacillus casei*

4.1.2 Regenerasi Bakteri *Zymomonas mobilis*

Bakteri *Z. mobilis* diinkubasi pada suhu 30°C, dimana suhu ini merupakan suhu optimum untuk pertumbuhan *Z. mobilis* (Titus dan Pereira, 2007). Setelah diinkubasi selama 24 jam, diperoleh bakteri hasil kulturasi yang membentuk koloni seperti ditunjukkan pada Gambar 4.2, hal ini menunjukkan bakteri hasil kulturasi telah siap untuk diberi perlakuan selanjutnya.

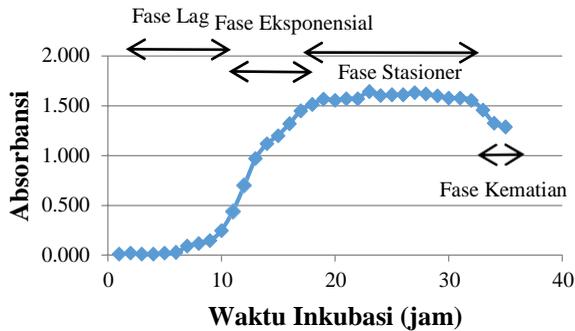


Gambar 4.2. Foto Hasil Regenerasi Bakteri *Zymomonas mobilis*.

4.2. Kurva Pertumbuhan Bakteri

4.2.1 Kurva Pertumbuhan Bakteri *Lactobacillus casei*

Dari kurva pertumbuhan bakteri *L. casei* pada Gambar 4.3, diketahui *L. casei* mengalami empat fase dalam perkembangannya.



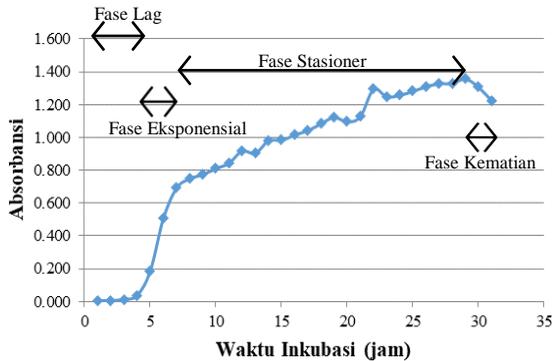
Gambar 4.3. Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus casei*

Empat fase tersebut yaitu fase lag pada 0-9 jam inkubasi, fase eksponensial pada 9-17 jam inkubasi, fase stasioner pada 17-31 jam inkubasi, dan mulai pada fase kematian sekitar 31-35 jam inkubasi.

Sehingga dapat ditentukan bahwa waktu yang tepat untuk memanen bakteri *L. casei* dilakukan ketika peralihan antara fase eksponensial dengan fase stasioner, yaitu setelah 17 jam masa inkubasi.

4.2.2 Kurva Pertumbuhan Bakteri *Zymomonas mobilis*

Dari kurva pertumbuhan bakteri *Z. mobilis* pada Gambar 4.4, diketahui *Z. mobilis* mengalami empat fase dalam perkembangannya



Gambar 4.4. Kurva Pertumbuhan *Zymomonas mobilis*

Empat fase tersebut yaitu fase lag pada 0-4 jam inkubasi, fase eksponensial pada 4-7 jam inkubasi, fase stasioner pada 7-29 jam inkubasi, dan mulai pada fase kematian sekitar 29-31 jam inkubasi.

Sehingga dapat ditentukan bahwa waktu yang tepat untuk memanen bakteri *Z. mobilis* dilakukan ketika peralihan antara fase eksponensial dengan fase stasioner, yaitu setelah 7 jam masa inkubasi.

34

4.3. Pembuatan Yogurt

Pada proses pembuatan yogurt, biakan yogurt berupa serbuk yang berisi *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, dan *L. acidophilus* dicampurkan ke dalam 150 mL air mineral, kemudian dikocok hingga bibit yogurt terlarut dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Setelah inkubasi selama 24 jam, starter yogurt menjadi kental dan berwarna putih. Kemudian starter yogurt dipindah kedalam susu pasteurisasi, 50 mL starter dicampurkan kedalam 1 liter susu pasteurisasi sehingga 150 mL starter yogurt dapat digunakan untuk 3 liter susu pasteurisasi. Susu pasteurisasi yang telah ditambahkan starter yogurt diinkubasi selama 12 jam pada suhu 30°C. Setelah inkubasi selama 12 jam, susu sudah mengental

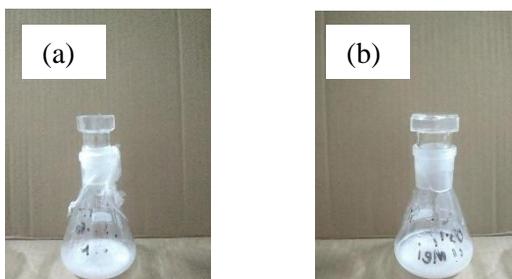
dan menjadi yogurt yang berwarna putih yang dapat dilihat pada Gambar 4.5. Yogurt memiliki aroma asam yang khas.



Gambar 4.5. Foto Hasil Yogurt.

4.4. Pembuatan Kultur Starter Bakteri *Lactobacillus casei* dan Bakteri *Zymomonas mobilis*

Hasil kultur starter bakteri dapat dilihat pada Gambar 4.6. Erlenmeyer dengan tanda (a) merupakan kultur starter bakteri *Z. mobilis* dan erlenmeyer dengan tanda (b) merupakan kultur starter bakteri *L. casei*. Kultur starter bakteri berupa susu yang diberi tambahan bakteri. Susu yang sudah diberi tambahan bakteri tetap berwarna putih, namun teksturnya lebih kental dibanding susu pasteurisasi.

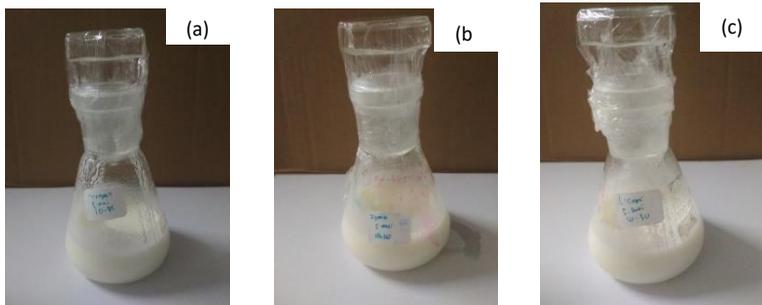


Gambar 4.6. Kultur Starter Bakteri (a) *Z. mobilis* dan (b) *L. casei*.

4.5. Penambahan Mikroba Probiotik Pada Yogurt

Mengacu pada penelitian yang dilakukan **Krisdianto (2019)** dilakukan penambahan kultur starter bakteri *L. casei* dan bakteri *Z.mobilis* masing-masing ditambahkan kedalam yogurt sebanyak 50 mL yogurt. Seperti ditunjukkan pada gambar 4.7 a, b dan c. Erlenmeyer (a) merupakan yogurt, pada erlenmeyer (b) ditambahkan kultur starter bakteri *L. casei* dan pada erlenmeyer (c) ditambahkan bakteri *Z. mobilis*.

Setelah dinkubasi selama 24 jam, yogurt pada Erlenmeyer a, b, dan c berwarna putih dan memiliki tekstur berupa cairan kental, memiliki bau khas yogurt yang normal, dan homogen. Hal ini sesuai dengan baku mutu Badan Standarisasi Nasional (2009) yang menerangkan bahwa yogurt memiliki tekstur berupa cairan kental-semi padat, memiliki bau khas yogurt/normal, dan homogen.



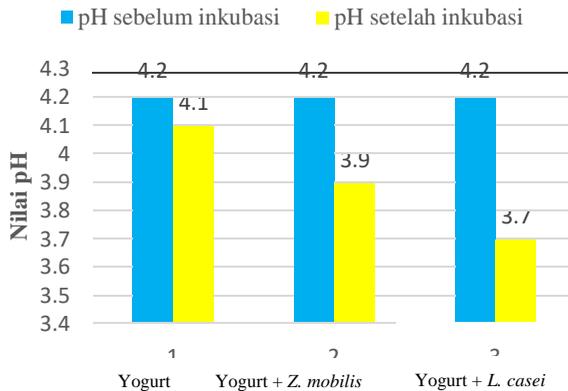
Gambar 4.7. (a) Yogurt, (b) Yogurt + *Z. mobilis* dan (c) Yogurt + *L. casei*.

4.6. Pengukuran dan Analisa Yogurt

4.6.1 Pengukuran pH

Penambahan bakteri *L. casei* dan bakteri *Z. mobilis* ke dalam yogurt adalah untuk meningkatkan nilai gizi dan fungsi dari yogurt. Dalam penelitian ini dilakukan pengukuran derajat

keasaman (pH) yogurt. Derajat keasaman (pH) yogurt dipengaruhi oleh jumlah asam laktat yang terbentuk selama proses inokulasi. Grafik hasil pengukuran pH yogurt sebelum dan setelah inkubasi selama 24 jam ditunjukkan pada Gambar 4.8.



Tipe Yogurt

Gambar 4.8. Grafik pH Yogurt

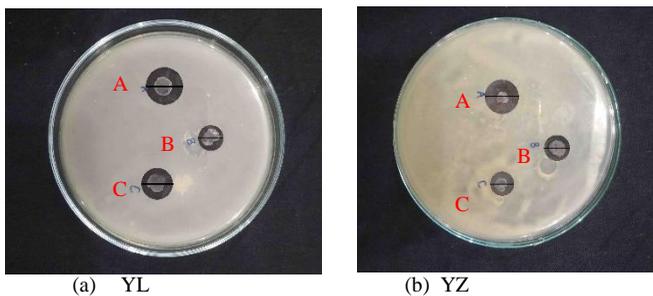
Pada grafik pH yogurt menunjukkan nilai pH yogurt sebelum dan sesudah diinkubasi serta setelah ditambahkan bakteri *L. casei* dan *Z. mobilis*. Sebelum diinkubasi dan ditambahkan bakteri probiotik, pH yogurt sebesar 4.2. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Allgeyer (2010) yang menyebutkan bahwa yogurt yang baik memiliki pH diantara 3,8-4,6. Yogurt yang ditambahkan bakteri *Z. mobilis* mengalami penurunan pH menjadi 3,9 dan yogurt yang ditambahkan bakteri *L. casei* mengalami penurunan pH menjadi 3,7. Selama proses fermentasi, bakteri akan memfermentasi karbohidrat yang ada sehingga terbentuk menjadi asam laktat. Pembentukan asam laktat ini menyebabkan peningkatan keasaman dan penurunan pH (Frazier & Westhoff, 1988).

Bakteri yang terkandung dalam starter yogurt yaitu *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* dan *S. thermophilus*, menurut Herferic dan Westhoff (1983) *L. bulgaricus* mampu menurunkan

pH atau menaikkan keasaman begitu juga dalam mensintesa asam piruvat yang dapat merangsang pertumbuhan bakteri *S.thermophilus* sehingga nilai keasaman juga akan meningkat lebih cepat. Menurut Safari (2016) Pada penelitiannya yang berjudul Perbandingan Kualitas Yogurt yang dibuat dengan Kultur Dua dan Tiga Bakteri menjelaskan bahwa pada waktu inkubasi 10 jam, *L. acidophilus* meningkatkan kadar asam laktat sehingga semakin rendah nilai pH.

4.6.2 Uji Aktivitas Antimikroba Yogurt

Aktivitas antimikroba ditentukan dengan metode sumuran yang menunjukkan pengaruh penambahan bakteri *Z. mobilis* dan *L.casei* pada fermentasi yogurt. Aktivitas penghambatan ditunjukkan dengan tidak tumbuhnya bakteri uji di sekitar sumuran sehingga terbentuk zona bening. Sumuran yang dibuat untuk masing-masing bakteri adalah 3 sumuran, pengukuran diameter zona hambat dilakukan pada inkubasi 24 jam. Ketiga sumuran ini diisi dengan kontrol positif berupa Ampisilin pada lubang A, lubang B berisi yogurt murni dan lubang C berisi yogurt dengan penambahan mikroba probiotik. Hasil uji dapat dilihat pada gambar 4.9



Gambar 4.9. Hasil Uji Antimikroba (a) Yogurt + *L. casei* dan (b) Yogurt + *Z. mobilis*

Berdasarkan kriteria yang dilakukan oleh Indu dkk (2006), kriteria yang memiliki daya hambat tinggi (> 16 mm), sedang (12-16 mm), sedangkan kriteria rendah atau tidak terdapat aktivitas antibakteri (< 12 mm). Daya hambat bakteri gram negatif diduga disebabkan oleh senyawa antibakteri yang berupa asam-asam organik. Dari tiga kali pengujian yang dilakukan dapat dilihat pada Tabel 4.1

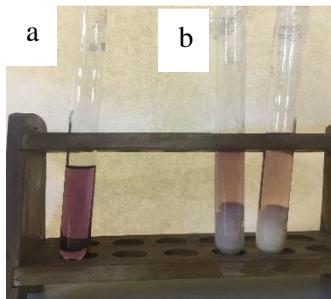
Tabel 4.1. Hasil Pengukuran Zona Bening

Sampel	Diameter Ampisilin	Diameter Yogurt	Diameter Sampel
YZ1	14	11	9
YZ2	14	10	9
YZ3	14	10	9
YL1	14	10	10
YL2	14	11	13
YL3	14	9	12

Sampel dengan kode YZ merupakan sampel dimana pada lubang C dimasukkan yogurt yang diberi penambahan *Z. mobilis*. Sampel dengan kode YL merupakan lubang C dimasukkan yogurt yang diberi penambahan *L. casei*. Dari tabel 4.1 didapatkan nilai rata-rata dari zona hambat ampisilin terhadap *E. coli* 14 mm, zona hambat yogurt murni terhadap *E. coli* sebesar 14 ± 4 mm, zona hambat yogurt + *Z. mobilis* terhadap *E. coli* sebesar 14 ± 5 mm dan zona hambat yogurt + *L. casei* terhadap *E. coli* sebesar 14 ± 2 mm. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga sampel uji memiliki daya hambat bakteri yang rendah (< 12 mm). Hal ini diduga karna volume yogurt dan yogurt yang diberi penambahan mikroba probiotik yang digunakan sangat kecil yaitu 20 μ l.

4.6.3 Uji Aktivitas Antioksidan Yogurt

Pengujian aktivitas antioksidan pada penelitian ini menggunakan metode DPPH. Metode ini digunakan karena sederhana, cepat, sensitif dan produktif dibandingkan dengan metode lain. Prinsip pengujian metode ini didasarkan pada reduksi larutan DPPH dengan adanya antioksidan yang mendonorkan hidrogen, yang mengarah pada formasi bentuk non-radikal (DPPH – H). Antioksidan mampu mengurangi radikal stabil DPPH dengan adanya perubahan warna, dari yang semula radikal stabil berwarna ungu menjadi non radikal berwarna kuning yaitu *diphenylpicrylhydrazine*. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.10 tampak pada tabung reaksi (a) DPPH berwarna ungu sedangkan setelah ditambahkan yogurt pada tabung reaksi (b) warna ungu sedikit memudar dan berubah menjadi sedikit berwarna kuning. Hal ini menunjukkan adanya aktivitas antioksidan (Ivekovic & Grabaric, 2006).



Gambar 4.10. Foto Hasil Uji Antioksidan.

Pada penelitian ini, pengujian aktivitas antioksidan dilakukan pada panjang gelombang 517 nm, sebagaimana yang dilakukan oleh Campos (2014). Pengukuran persentase inhibisi dilakukan pada konsentrasi 100%, karena merupakan kondisi

optimum untuk mengukur persentase inhibisi. Grafik hubungan % inhibisi dengan hari inkubasi dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Tabel % Inhibisi Sampel Uji

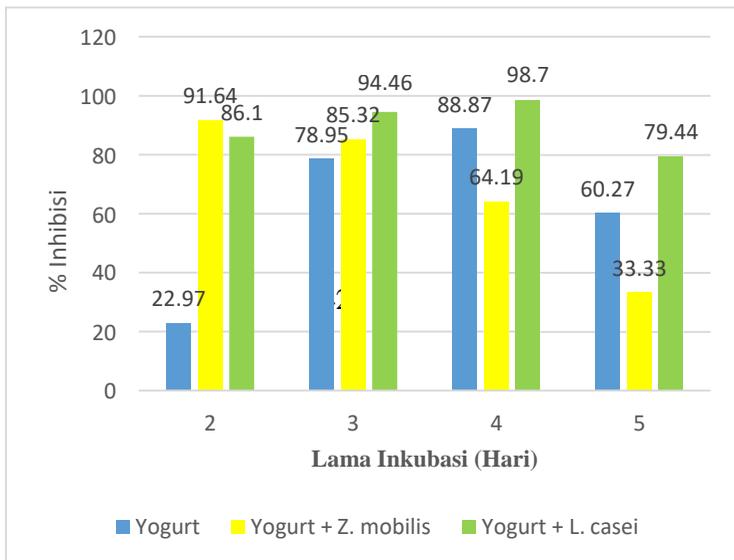
Sampel	% Inhibisi Hari Ke-			
	2	3	4	5
Yogurt	22.97	78.95	88.87	60.27
Yogurt + <i>Z. mobilis</i>	91.64	85.32	64.19	33.33
Yogurt + <i>L. casei</i>	86.10	94.46	98.70	79.44

Pada gambar grafik 4.11 menunjukkan aktivitas antioksidan yogurt, yogurt dengan penambahan bakteri *Z. mobilis* dan yogurt dengan penambahan bakteri *L. casei* dari hari ke 2 hingga hari ke 5. Pada grafik tersebut menunjukkan aktivitas antioksidan yogurt murni meningkat dari hari ke 2 hingga hari ke 4 dimana peningkatan tersebut berbanding lurus dengan lama waktu fermentasi. Sedangkan pada hari ke 5 aktivitas antioksidan yogurt mengalami penurunan, yang diperkirakan terjadi kerusakan pada yogurt. Hal ini dikarenakan meningkatnya kadar asam pada yogurt yang diakibatkan oleh bakteri probiotik yang terkandung dalam starter yogurt yaitu *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* yang merupakan bakteri asam laktat (BAL) (Herferic dan Westhoff 1983).

Aktivitas antioksidan yogurt dengan penambahan bakteri *Z. mobilis* sebesar 91,64 % pada hari ke-2 sedangkan pada hari berikutnya mengalami penurunan secara berurutan, yang berbanding terbalik dengan lama waktu fermentasi. Hal ini dikarenakan kemampuan bakteri *Z. mobilis* yang mampu memproduksi etanol dengan memanfaatkan glukosa sebagai sumber energi dalam siklus glikolisis yang menghasilkan asam piruvat. Kemudian katabolisme asam piruvat akan menghasilkan etanol dan CO₂. Semakin lama waktu fermentasi maka nutrisi dalam yogurt akan semakin berkurang dengan adanya jumlah sel

yang semakin bertambah dan dapat mengakibatkan kompetisi yang akhirnya akan memasuki fase kematian (Yudoamijoyo, Darwis, & Sa'id, 1992).

Selanjutnya, aktivitas antioksidan yogurt dengan penambahan bakteri *L. casei* menunjukkan hasil yang sangat baik pada hari ke 3 hingga hari ke 4 yang mengalami peningkatan hingga 98.70 % dan mengalami penurunan pada hari ke 5. Hal ini dikarenakan kemampuan *L. casei* untuk memproduksi asam-asam organik terutama asam laktat yang akan menurunkan pH yogurt sehingga menyebabkan aktivitas antioksidan semakin rendah (Virtanen, Pihlanto, Akkanen, & Korhonen, 2007).



Gambar 4.11. Nilai Antioksidan Yogurt dalam % inhibisi

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Pada penelitian ini telah dilakukan penambahan bakteri *Z. mobilis* dan bakteri *L. casei* pada fermentasi yogurt. Penambahan tersebut dapat meningkatkan aktivitas antioksidan yang ditunjukkan dengan % inhibisi. Nilai % inhibisi optimum pada yogurt dan yogurt dengan penambahan bakteri *L. casei* diperoleh pada hari ke-empat inkubasi dan nilai % inhibisi optimum pada yogurt dengan penambahan bakteri *Z. mobilis* diperoleh pada hari ke-dua. Dimana nilai % inhibisi yogurt, yogurt yang diberi tambahan bakteri *Z. mobilis* dan yogurt yang diberi tambahan bakteri *L. casei* berturut-turut sebesar 88,87%, 91,64%, 98,70%.

Aktivitas antimikroba diukur pada saat bakteri mencapai fase eksponensialnya menggunakan metode difusi sumuran yang ditunjukkan dengan adanya zona hambat terhadap bakteri *E. coli* yang merupakan bakteri patogen. Nilai diameter zona hambat sampel yogurt, yogurt yang diberi tambahan bakteri *Z. mobilis*, dan yogurt yang diberi tambahan bakteri *L. casei* secara berturut-turut sebesar 10 mm, 9 mm, dan 12 mm. Dalam hal ini hasil tersebut menunjukkan aktivitas antibiotik ketiga sampel cukup lemah dalam menghambat bakteri patogen. Berdasarkan penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa penambahan bakteri *Z. mobilis* dan *L. casei* dapat aktivitas antioksidan pada yogurt tetapi kurang baik dalam aktivitas antimikroba.

5.2. Saran

Penelitian terhadap yogurt dengan penambahan bakteri *Z. mobilis* dan bakteri *L. casei* masih belum sempurna. Perlu dilakukan uji organoleptik yogurt dan karakterisasi lebih lanjut terhadap komposisi senyawa-senyawa metabolit sekunder dalam yogurt yang ditambahkan bakteri *Z. mobilis* dan bakteri *L. casei*

yang menyebabkan terjadinya peningkatan aktivitas antioksidan tetapi kurang baik dalam aktivitas antibakterinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashraf, R., & Shah, N. P. (2011). International Journal of Food Microbiology Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp . *bulgaricus* , *Streptococcus thermophilus* , *Lactobacillus acidophilus* , *Lactobacillus casei* and *Bi fi dobacterium* spp . in yoghurt — A review. *International Journal of Food Microbiology*, 149(3), 194–208. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.008>
- Ashraf, R., & Shah, N. P. (2014). Immune System Stimulation by Probiotic Microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, (February), 37–41. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.619671>
- BSN, B. S. N. (1992). *Yogurt*.
- Buchanan, R. E., & Gibbons, N. E. (1974). *Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th Edition*. Baltimore, USA: Williams & Wilkins Company.
- Buckle, K. A. (Kenneth A. ., Purnomo, H., Adiono., Tinggi, I. D. J. P., & Colleges, I. D. P. of A. U. and. (1985). *Ilmu pangan*. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.
- Davoodi, H., Esmaeili, S., & Mortazavian, A. M. (2013). Effects of Milk and Milk Products Consumption on Cancer : A Review, 12, 249–264. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12011>
- El-gawad, A., Sci, J. N. F., Ia, A. E., Em, E., Hm, E.-Z., Sa, H., & Fa, S. (2014). Journal of Nutrition & Food Sciences Antibacterial Activity of Probiotic Yoghurt and Soy-Yoghurt against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, 4(5). <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000303>
- Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer Science & Business Media.
- Frazier, W. C., & Westhoff, P. C. (1988). *Food Microbiology*. New Delhi: Tata McGraw-Hill Company Limited.
- Guan, X., Xu, Q., Zheng, Y., Qian, L., & Lin, B. (2017). Screening and characterization of lactic acid bacterial strains that produce fermented milk and reduce cholesterol levels.

- Brazilian Journal of Microbiology*, 48(4), 730–739.
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.011>
- Hadiwiyoto, S. (1994). *Teori dan Prosedur Pengujian Mutu Susu dan Hasil Olahannya*. Jogjakarta: Liberty.
- Harmita. (2006). *Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Hassan, A., & Amjad, I. (2010). Nutritional evaluation of yoghurt prepared by different starter cultures and their physiochemical analysis during storage, 9(20), 2913–2917.
- Ivekovic, D., & Grabaric, B. S. (2006). A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical, 68, 175–180.
<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2005.06.005>
- Levett, P. N. (1991). *Anaerobic Bacteria: A Functional Biology*. Wiley.
- Ly, D. (2007). *Zymomonas mobilis*.
- Mastroeni, M. F. (2003). The influence of oxygen supply on the production of acetaldehyde by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Journal of Engineering*, 20(January), 87–93.
<https://doi.org/10.1590/S0104-66322003000200001>
- Oliveira, P., Assis, A. De, Coelho, G., Guerra, B., Fernandes, D., Araújo, D. S., ... Queiroga, E. (2015). Intestinal anti-inflammatory activity of goat milk and goat yoghurt in the acetic acid model of rat colitis. *International Dairy Journal*, (2016). <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.11.002>
- Rahayu, W. P., Ma'Oen, S., & Suliantari, F. S. (1992). *Teknologi Fermentasi Produk Perikanan*. Bogor: Pusat Antar Universitas Pangan Dan Gizi. IPB.
- Rai, A. K., Sanjukta, S., & Jeyaram, K. (2015). Production of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory (ACE-I) Peptides during Milk Fermentation and Their Role in Reducing Hypertension, 8398(October).
<https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1068736>
- Srivastava, P., Prasad, S. G. M., Ali, M. N., & Prasad, M. (2015). Analysis of antioxidant activity of herbal yoghurt prepared from different milk, (January 2016).
- Swings, J., & Genetics, M. (1977). *The Biology of Zymomonas*,

41(1), 1–46.

- Trisnangtyas, R. Y., Legowo, A. M., & Kusrahayu. (2013). Pengaruh Penambahan Susu Skim Pada Pembuatan Frozen Yogurt Dengan Bahan Dasar Whey Terhadap Total Bahan Padat , Waktu Pelelehan Dan Tekstur. *Animal Agriculture Journal*, 2(1), 217–224.
- Underwood, A. ., & Jr, R. . D. (1986). *Quantitative Analysis 5th Edition*. New Jersey: Prentice Hall.
- Varnam, A., & Jane P. Sutherland. (1994). *Milk and Milk Products*. US: Springer US.
- Vedamuthu, E. R. (2006). Other Fermented and Culture-Containing Milks, 295–308.
- Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., & Korhonen, H. (2007). Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria, *102*, 106–115. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03072.x>
- Wahyudi, M. (2006). Proses Pembuatan dan Analisis Mutu Yoghurt. *Jurnal Buletin Teknik Pertanian*, 11.
- Walker, J. M., & Gingold, E. . (1983). *Molecular Biology and Biotechnology third edition*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Widodo, W. (2002). *Bioteknologi fermentasi susu*. Malang, Universitas Muhammadiyah.
- Yudoamijoyo, M., Darwis, A. A., & Sa'id, E. G. (1992). *Teknologi Fermentasi*. Jakarta: Rajawali Press.

LAMPIRAN
DATA DAN PERHITUNGAN

1. Data Absorbansi Kurva Pertumbuhan *L. casei*

Waktu (jam ke)	Absorbansi ke			Absorbansi Rata-rata
	1	2	3	
0	0.011	0.013	0.01	0.011
1	0.014	0.023	0.024	0.020
2	0.012	0.013	0.013	0.013
3	0.012	0.009	0.011	0.011
4	0.02	0.024	0.02	0.021
5	0.031	0.028	0.029	0.029
6	0.093	0.09	0.09	0.091
7	0.121	0.121	0.12	0.121
8	0.146	0.147	0.147	0.147
9	0.249	0.249	0.256	0.251
10	0.435	0.439	0.446	0.440
11	0.695	0.699	0.698	0.697
12	0.963	0.963	0.985	0.970
13	1.121	1.116	1.121	1.119
14	1.206	1.186	1.219	1.204
15	1.318	1.324	1.32	1.321
16	1.441	1.449	1.468	1.453
17	1.507	1.517	1.519	1.514
18	1.552	1.57	1.581	1.568
19	1.545	1.555	1.559	1.553
20	1.567	1.564	1.586	1.572
21	1.574	1.575	1.577	1.575
22	1.646	1.643	1.65	1.646

23	1.607	1.603	1.607	1.606
24	1.607	1.619	1.607	1.611
25	1.605	1.613	1.623	1.614

I. Data Absorbansi Kurva Pertumbuhan *Z. mobilis*

Waktu (jam ke)	Absorbansi ke			Rata-rata
	1	2	3	
0	0.005	0.006	0.006	0.006
1	0.006	0.006	0.007	0.006
2	0.013	0.013	0.014	0.013
3	0.036	0.037	0.039	0.037
4	0.188	0.182	0.192	0.187
5	0.497	0.508	0.52	0.508
6	0.678	0.688	0.712	0.693
7	0.744	0.745	0.759	0.749
8	0.777	0.772	0.778	0.776
9	0.803	0.826	0.806	0.812
10	0.84	0.841	0.855	0.845
11	0.909	0.919	0.931	0.920
12	0.91	0.9	0.905	0.905
13	0.979	0.98	0.987	0.982
14	0.981	0.984	0.99	0.985
15	1.009	1.016	1.026	1.017
16	1.025	1.047	1.06	1.044
17	1.076	1.076	1.104	1.085
18	1.119	1.116	1.14	1.125
19	1.094	1.098	1.098	1.097
20	1.14	1.129	1.122	1.130
21	1.32	1.311	1.258	1.296

22	1.247	1.256	1.246	1.250
23	1.258	1.262	1.259	1.260
24	1.28	1.285	1.286	1.284
25	1.315	1.309	1.311	1.312
26	1.333	1.313	1.344	1.330
27	1.331	1.319	1.345	1.332
28	1.359	1.342	1.376	1.359
29	1.34	1.303	1.28	1.308
30	1.235	1.228	1.215	1.226

2. Uji Aktivitas Antioksidan

• Data Uji Aktivitas Antioksidan

Hari ke-	Absorbansi Kontrol	Sampel	Absorbansi		
2	0.431	Yogurt	0.307	0.332	0.344
	0.431	Yogurt + Z.mobilis	0.058	0.036	0.037
	0.431	Yogurt + L. casei	0.052	0.056	0.060
3	0.361	Yogurt	0.076	0.065	0.060
	0.361	Yogurt + Z. mobilis	0.055	0.054	0.053
	0.361	Yogurt + L. casei	0.020	0.022	0.021
4	0.539	Yogurt	0.060	0.077	0.083
	0.539	Yogurt + Z. mobilis	0.157	0.193	0.204
	0.539	Yogurt + L. casei	0.014	0.070	0.012
5	0.360	Yogurt	0.151	0.146	0.143
	0.360	Yogurt + Z. mobilis	0.240	0.237	0.238
	0.360	Yogurt + L. casei	0.070	0.072	0.074

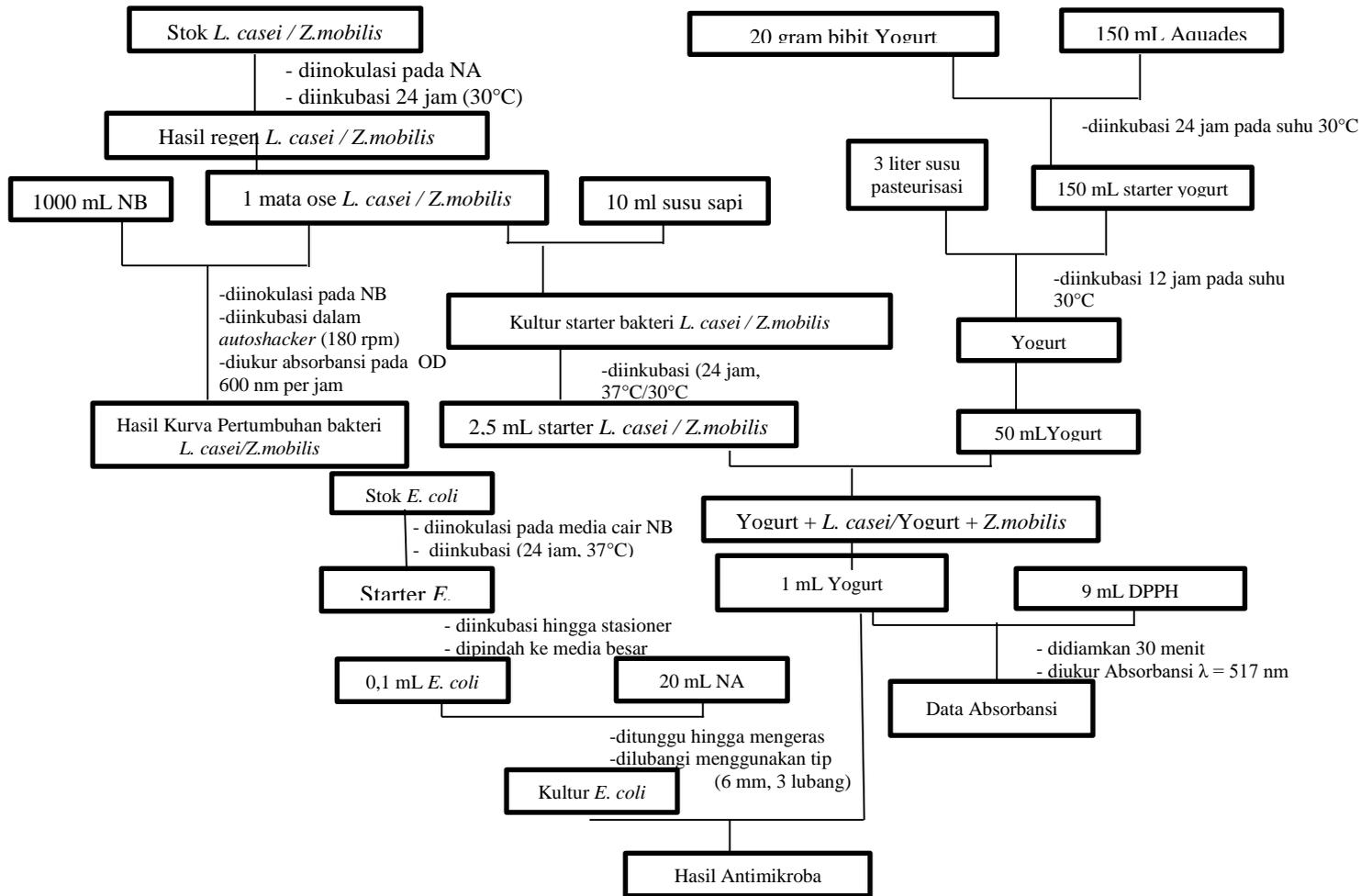
- Pembuatan larutan DPPH 60 μM

$$60 \mu\text{M} = 6 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$m = n \times \text{Mr}$$

$$m = M \times V \times \text{Mr}$$

$$m = 6 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 0,1 \text{ L} \times 394,3 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$



BIODATA PENULIS



Penulis bernama Rara Fildzah Libna Abharina. Penulis yang dilahirkan di Jombang, 29 September 1996 ini, merupakan anak pertama dari tiga bersaudara pasangan Mochamad Achiyar dan Masruroh. Penulis telah menempuh pendidikan formalnya di RA Muslimat Semelo (2000-2002), MI UMAR ZAHID Semelo (2002-2008), MTsN Denanyar Jombang (2008-2011), dan SMA Negeri 3 Jombang (2011-2014). Penulis melanjutkan jenjang pendidikan S1 di Departemen Kimia FMIPA ITS melalui jalur SNMPTN dan terdaftar dengan Nomor Registrasi Pokok (NRP) 01211440000052. Pada tahun kedua penulis aktif sebagai staf PSDA UKM Rebana ITS. Pada tahun ketiga penulis aktif sebagai sekretaris departemen bidang KOMINFO UKM Rebana ITS dan Bendahara Umum UKM Penalaran ITS. Pada tahun keempat penulis aktif sebagai Ketua BSO Sekolah Rakjat PMII Sepuluh Nopember Surabaya. Penulis pernah menjalani kerja praktik di Pabrik Gula Djombang Baru dan ditempatkan di bagian produksi. Penulis menyelesaikan prog Sarjana dengan mengambil tugas akhir di bidang Kimia Mikroorganisme dibawah bimbingan Herdayanto Sulistyoyo Putro, S.Si., M.Si. Penulis dapat dihubungi melalui email: rara.fildzah.libna.abharina@gmail.com