

**SELEKSI DAN UJI POTENSI BAKTERI ASAM LAKTAT
ASAL SUSU KUDA SUMBAWA TERFERMENTASI
SEBAGAI KULTUR *STARTER***

SKRIPSI

oleh

ILMIYATUS SAFITRI DEVI

155090107111005



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2019

**SELEKSI DAN UJI POTENSI BAKTERI ASAM LAKTAT
ASAL SUSU KUDA SUMBAWA TERFERMENTASI
SEBAGAI KULTUR STARTER**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk
memperoleh gelar Sarjana Sains dalam
Bidang Biologi**

**oleh
Ilmiyatus Safitri Devi
155090107111005**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2019

**HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI
SELEKSI DAN UJI POTENSI BAKTERI ASAM LAKTAT
ASAL SUSU KUDA SUMBAWA TERFERMENTASI
SEBAGAI KULTUR *STARTER***

**ILMIYATUS SAFITRI DEVI
155090107111005**

Telah dipertahankan di Majelis Pengujian
pada tanggal 10 Juli 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui
Pembimbing

Yoga Dwi Jatmiko, S.Si., M.App.Sc., Ph.D
NIP. 19810510 200501 1 002

Mengetahui
Ketua Program Studi S-1 Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodiyati Azrianingsih, S.Si., M.Sc., Ph.D
NIP. 19700128 199412 2 001

HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ilmiyatus Safitri Devi

NIM : 155090107111005

Jurusan : Biologi

Penulis Skripsi berjudul: Seleksi dan Uji Potensi Bakteri Asam Laktat Asal Susu Kuda Sumbawa Terfermentasi Sebagai Kultur *Starter*

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka Skripsi ini semata-mata digunakan sebagai acuan atau referensi.
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi Skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 22 Juli 2019

Ilmiyatus Safitri Devi
155090107111005

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan dengan ijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

Seleksi dan Uji Potensi Bakteri Asam Laktat asal Susu Kuda Sumbawa Terfermentasi sebagai Kultur *Starter*

Ilmiyatus Safitri Devi, Yoga Dwi Jatmiko
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan
Alam, Universitas Brawijaya
2019

ABSTRAK

Diversifikasi produk dan proses susu kuda masih terbatas berupa produk fermentasi alami (tanpa penambahan kultur *starter*). Kultur *starter* yang dapat meningkatkan keanekaragaman dan kualitas produk fermentasi susu kuda Sumbawa. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat BAL dari susu kuda Sumbawa terfermentasi yang memenuhi persyaratan sebagai kultur *starter* dan mengetahui pengaruh kultur *starter* terpilih dalam meningkatkan kualitas organoleptik susu kuda fermentasi. Sebanyak 13 isolat BAL asal susu kuda Sumbawa terfermentasi diseleksi melalui uji asidifikasi, kemudian diuji karakteristik teknologi (uji proteolitik, uji lipolitik, produksi eksopolisakarida), *protective properties* (uji aktivitas antimikroba), uji keamanan pangan (uji hemolisis, dan uji sensitivitas antibiotik) dan fermentasi susu kuda menggunakan kultur *starter* isolat terpilih (SKB), kultur *starter* yoghurt (SKK), dan campuran keduanya (SKC). Berdasarkan hasil *screening* diperoleh enam isolat yaitu DB7, BC10, DC4, BC9, DC10, dan BC7. Isolat BC10 terpilih sebagai isolat yang potensial sebagai kultur *starter* karena memiliki kemampuan terbaik dalam hal aktivitas asidifikasi dan proteolitik, tidak menghasilkan enzim lipolitik, dan tidak berpotensi sebagai patogen, serta mampu menghambat *Escherichia coli* ATCC 25922. Namun, isolat ini tergolong resisten terhadap antibiotik Kanamycin, Trimethoprim, dan Cinoxacin. Kultur *starter* isolat BC10 (SKB) dapat meningkatkan kualitas organoleptik susu kuda terfermentasi terutama dalam hal aroma. Oleh karena itu, isolat BC10 merupakan isolat yang potensial digunakan sebagai kultur *starter* produk susu fermentasi.

Kata kunci: bakteri asam laktat, kultur *starter*, karakteristisasi teknologi, organoleptik, susu kuda Sumbawa

Selection and Potential Test of Lactic Acid Bacteria from Fermented Sumbawa Mare's Milk as Starter Cultures

Ilmiyatus Safitri Devi, Yoga Dwi Jatmiko

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Brawijaya

2019

ABSTRACT

Diversification of mare's milk products and processes was still limited to traditional or naturally fermented products (without addition of starter cultures). Therefore, it is necessary to make starter cultures that can increase the diversity and quality of fermented Sumbawa mare's milk. The Objectives of this study were to screen lactic acid bacteria (LAB) isolates from fermented Sumbawa mare's milk that meet the requirements as starter cultures, and to find out the effect of the selected starter culture in improving the organoleptic quality of mare's milk fermentation. The LAB isolates (13 isolates) derived from naturally fermented Sumbawa mare's milk were screened, then the selected isolates were tested for the technological properties (proteolytic test, lipolytic test, and exopolysaccharide production), food safety test (hemolytic test and antibiotic sensitivity test), protective properties (antimicrobial activity test), and fermentation of mare's milk using the selected starter culture (SKK), yoghurt starter cultures (SKK), and a mixture of both (SKC). Six LAB isolates (DB7, BC10, DC4, BC9, DC10, and BC7) were obtained from acidification screening. Isolate of BC10 was the most potential isolate as starter culture because it showed the best ability in terms of acidification and proteolytic activity, lack of lipolytic activity, no indication of pathogenic potency, as well as able to inhibit *Escherichia coli* ATCC 25922. However, this isolate was resistant to Kanamycin, Trimetoprim, and Cinoxacin antibiotic. The selected starter culture BC10 (SKB) was able to improve the organoleptic quality of fermented mare's milk especially flavour compared to the other starter cultures. Therefore, BC10 isolate is a potential isolate to be used as starter cultures for fermented milk products.

Keywords: lactic acid bacteria, starter cultures, technological characterization, organoleptic, Sumbawa mare's milk

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Robbil 'Aalamin, dengan ungkapan rasa syukur pada Allah Yang Maha Kuasa akhirnya skripsi ini dapat diselesaikan sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam Bidang Biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

Ucapan terima kasih disampaikan kepada:

1. PT Indofood Sukses Makmur Tbk. atas bantuan dana penelitian melalui program Indofood Riset Nugraha 2018-2019.
2. Bapak Yoga Dwi Jatmiko S.Si., M.App.Sc. Ph.D selaku Dosen Pembimbing yang telah memberi bimbingan dalam perencanaan, pelaksanaan, hingga penyelesaian skripsi ini.
3. Ibu Dra. Tri Ardiyati M.Agr.Sc., Ph.D. dan Bapak Dr. Suharjono, MS. selaku Dosen Penguji yang telah memberi saran yang bermanfaat demi perbaikan penyusunan skripsi.
4. Orang tua, Ibu Masmukah S.Pd dan Ayah Abdul Rozaq, dan adik Rozkananda R.A atas segala doa, dukungan, dan motivasi yang tidak terkira.
5. Teman-teman *Working Group Mikrobiologi*, Keluarga Mikro 2015, Tika F., Aditya R.S., Ananti W.W., Aghnia N.F., Maurizka D. S., Chasan M.W., Yogi A., dan Dhani, Ibu Dra. Nanik Dwi Rahayu selaku staf Laboratorium Mikrobiologi atas bantuan, semangat, serta kesediaan berdiskusi seputar penelitian.
6. Romi R.A.W., Lathifatuzzahro, Astutiningsih S., Aizzatur R., Luluk S.M., Intan W.C, dan rekan-rekan Biologi angkatan 2015 "*Limfosit*" dan seluruh civitas akademik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

Skripsi ini merupakan upaya optimal dan sarana terbaik dalam pengembangan ilmu pengetahuan. Saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan untuk menjadikan karya ini semakin bermanfaat.

Malang, Juli 2019

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	Error! Bookmark not defined.
1.1 Latar Belakang	Error! Bookmark not defined.
1.2 Rumusan Masalah	Error! Bookmark not defined.
1.3 Tujuan Penelitian	Error! Bookmark not defined.
1.4 Manfaat Penelitian	Error! Bookmark not defined.
defined.	
BAB II TINJAUAN PUSTAKA ...	Error! Bookmark not defined.
2.1 Susu Kuda Sumbawa.....	Error! Bookmark not defined.
2.2 Bakteri Asam Laktat.....	Error! Bookmark not defined.
2.3 Fermentasi Susu Kuda.....	Error! Bookmark not defined.
2.4 Kultur <i>Starter</i>	Error! Bookmark not defined.
2.5 Kriteria Kultur <i>Starter</i>	Error! Bookmark not defined.
defined.	
BAB III METODE PENELITIAN	Error! Bookmark not defined.
defined.	
3.1 Waktu dan Tempat	Error! Bookmark not defined.
3.2 Kultur Bakteri	Error! Bookmark not defined.
3.3 Skrining BAL sebagai Kultur <i>Starter</i>	Error! Bookmark not defined.
Bookmark not defined.	
3.4 Pengujian Karakteristik Teknologi BAL.....	Error! Bookmark not defined.
Bookmark not defined.	
3.4.1 Aktivitas proteolitik	Error! Bookmark not defined.
defined.	
3.4.2 Aktivitas lipolitik	Error! Bookmark not defined.
defined.	

3.4.3 Produksi eksopolisakarida .. **Error! Bookmark not defined.**

3.5 Aktivitas Antimikroba **Error! Bookmark not defined.**

3.6 Uji Kepekaan Antibiotik **Error! Bookmark not defined.**

3.7 Uji Hemolisis **Error! Bookmark not defined.**

3.8 Fermentasi Susu Kuda **Error! Bookmark not defined.**

3.8.1 Persiapan kultur *starter*. **Error! Bookmark not defined.**

3.8.2 Pelaksanaan fermentasi. **Error! Bookmark not defined.**

3.8.3 Uji organoleptik **Error! Bookmark not defined.**

3.9 Rancangan Penelitian dan Analisis Data **Error! Bookmark not defined.**

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN..... Error! Bookmark not defined.

4.1 Isolat BAL sebagai Kultur *Starter* **Error! Bookmark not defined.**

4.2 Karakteristik Teknologi BAL .. **Error! Bookmark not defined.**

4.2.1 Aktivitas proteolitik **Error! Bookmark not defined.**

4.2.2 Aktivitas lipolitik **Error! Bookmark not defined.**

4.2.3 Produksi eksopolisakarida .. **Error! Bookmark not defined.**

4.2.4 Sensitivitas antibiotik **Error! Bookmark not defined.**

4.2.5 Aktivitas antimikroba ... **Error! Bookmark not defined.**

4.2.6 Aktivitas hemolisis **Error! Bookmark not defined.**

4.3 Uji Organoleptik Fermentasi Susu Kuda **Error! Bookmark not defined.**

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....Error! Bookmark not defined.

5.1 Kesimpulan**Error! Bookmark not defined.**

5.2 Saran.....**Error! Bookmark not defined.**

DAFTAR PUSTAKAError! Bookmark not defined.

LAMPIRANError! Bookmark not defined.

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1	Perbandingan kandungan nutrisi susu kuda, sapi, dan ASI.....	4
2	Distribusi protein <i>whey</i> dari susu kuda, sapi, dan ASI.....	5
3	Komposisi kimia dan kapasitas antioksidan dari susu kuda segar, fermentasi, dan Susu kuda terfermentasi probiotik berserat tinggi.....	8
4	Komposisi kultur <i>starter</i> mesofilik.....	10
5	Kriteria uji sensitivitas antibiotik.....	17
6	Karakteristik teknologi isolat terpilih.....	23
7	Sensitivitas antibiotik BAL terpilih yang diisolasi dari produk fermentasi susu kuda Sumbawa.....	27
8	Karakter fenotip bakteri <i>indigenous</i>	45
9	Hasil ANOVA skrining kuantitatif.....	46
10	Hasil uji lanjutan Tukey skrining kuantitatif.....	46
11	Hasil uji ANOVA uji proteolitik.....	47
12	Hasil uji lanjutan Tukey uji proteolitik.....	47
13	Hasil uji ANOVA sensitivitas antibiotik.....	49
14	Uji lanjutan Tukey sensitivitas antibiotik.....	50
15	Hasil uji ANOVA aktivitas antibakteri.....	50
16	Uji lanjutan Tukey aktivitas antimikroba.....	52
17	Hasil uji normalitas data organoleptik.....	53
18	Uji Kruskal Wallis organoleptik.....	53
19	Uji lanjutan Tukey organoleptik.....	54
20	Data panelis uji organoleptik.....	64
21	Skoring organoleptik (hedonik) susu kuda fermentasi.....	65
22	Sensitivitas bakteri asam laktat terpilih terhadap beberapa jenis antibiotik.....	66

DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1	Asidifikasi isolat BAL yang diisolasi dari produk fermentasi susu kuda Sumbawa.....	21
2	Aktivitas antibakteri oleh isolat BAL yang diisolasi dari produk fermentasi susu kuda Sumbawa.....	29
3	Skor evaluasi organoleptik produk fermentasi susu kuda.....	31
4	Densitas sel BAL dan tingkat asidifikasi kultur starter pada produk fermentasi susu kuda.....	34
5	Susu skim hasil uji asidifikasi pada jam ke-24.....	55
6	Aktivitas proteolitik bakteri asam laktat terpilih.....	56
7	Aktivitas lipolitik bakteri asam laktat terpilih.....	57
8	Produksi eksopolisakarida secara kualitatif oleh bakteri asam laktat terpilih.....	58
9	Sensitivitas antibiotik bakteri asam laktat terpilih.....	59
10	Aktivitas antibakteri bakteri asam laktat terpilih.....	60
11	Aktivitas hemolisis bakteri asam laktat terpilih.....	61
12	Fermentasi susu kuda.....	62
13	Pewarnaan Gram isolat terpilih.....	63

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Karakteristik bakteri <i>indigenus</i>	45
2	Hasil ANOVA skrining kuantitatif (uji asidifikasi).....	46
3	Hasil uji statistik uji proteolitik.....	47
4	Hasil statistik uji sensitivitas antibiotik.....	49
5	Hasil uji statistik aktivitas antibakteri.....	50
6	Hasil uji statistik organoleptik.....	53
7	Aktivitas asidifikasi.....	56
8	Aktivitas proteolitik.....	57
9	Aktivitas lipolitik.....	58
10	Produksi eksopolisakarida.....	59
11	Sensitivitas antibiotik.....	60
12	Aktivitas antibakteri.....	61
13	Aktivitas hemolisis.....	62
14	Fermentasi susu kuda.....	63
15	Pewarnaan Gram isolat terpilih.....	64
16	Panelis uji organoleptik.....	65
17	Sensitivitas bakteri asam laktat terhadap beberapa jenis antibiotik.....	66

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Singkatan/Lambang

ASI

ANOVA

ATCC

ATP

BAL

CFU

D.M

EPS

igG

MRS

NA

OD

SD

TBC

TPC

%

Kcal/kg

g/kg

Mol

°C

A

B

γ

Nm

μ L

mL

μ m

Δ

°F

Keterangan

Air Susu Ibu

Analysis of Variance

*American Type Culture
Collection*

Adenosine Triphosphate

Bakteri Asam Laktat

Colony Forming Unit

Dry Matter

Eksopolisakarida

Imunoglobulin

Man Rogosa Sharpe

Nutrient Agar

Optical Density

Standard Deviation

Tuberkulosis

Total Plate Count

Persen

Kilokalori per kilogram

Gram per kilogram

Satuan massa molar

Derajat Celsius

Alfa

Beta

Gama

Nanometer

Mikroliter

Mililiter

Mikrometer

Delta

Derajat Fahrenheit

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Susu kuda memiliki kelebihan dibandingkan susu sapi, dan memiliki kemiripan dengan air susu ibu (ASI) dalam hal kandungan nutrisi. Susu kuda memiliki kandungan laktosa dan immunoglobulin (igG) yang setara dengan ASI sehingga disarankan untuk menjadi pengganti ASI bagi balita yang alergi terhadap susu sapi. Kandungan lemaknya pun lebih rendah daripada ASI sehingga bersifat rendah kalori. Selain nutrisi yang tinggi, susu kuda juga mengandung senyawa aktif laktoferin, asam oleat, dan lisozim. Laktoferin memiliki aktivitas antiinflamasi, imunomodulator, antibakteri, antijamur, antivirus. Kandungan kalsium dan fosfor susu kuda (1,6-1,8) lebih sesuai untuk pertumbuhan tulang daripada susu sapi (1,4 : 1), dan mendekati ASI (1,9 : 1). Susu kuda juga memiliki kandungan vitamin A, D₃, dan E (terlarut dalam minyak) yang mirip dengan ASI, dan memiliki kandungan vitamin C yang cukup tinggi (Ewa dkk., 2017).

Meskipun nutrisi dan khasiat susu kuda tergolong tinggi, keanekaragaman pangan berbasis susu kuda masih terbatas pada produk fermentasi tradisional atau alami/spontan (tanpa penambahan kultur *starter*). Produk fermentasi susu kuda melalui fermentasi spontan akan membutuhkan waktu yang lama pada proses produksi, kemungkinan kontaminasi mikroba patogen lebih tinggi, dan konsistensi kualitas produk kurang akibat tidak adanya pengontrolan terhadap mikroba yang terlibat dalam fermentasi. Meskipun begitu, fermentasi spontan memungkinkan variasi rasa dan aroma yang tinggi karena keberagaman mikroba yang turut berperan dalam proses fermentasi. Kultur *starter* adalah strain mikroba yang terseleksi dengan ciri yang stabil untuk produksi karakter makanan yang diinginkan dalam kondisi terkontrol (Ravindra, 2015). Ciri yang stabil yang diharapkan pada produk hasil fermentasi yang dimaksud adalah adanya konsistensi kualitas, baik dalam rasa, aroma, atau parameter organoleptik lainnya. Pembuatan kultur *starter* untuk susu kuda Sumbawa tidak hanya mampu meningkatkan keanekaragaman pangan, melainkan juga meningkatkan nilai tambah produk

karena kandungan bakteri asam laktat (BAL) pada kultur *starter* juga dapat meminimalisir kontaminasi oleh mikroba yang tidak diharapkan.

Bakteri asam laktat dapat meningkatkan nilai tambah produk melalui peningkatan karakteristik teknologi (aktivitas asidifikasi, dan diasetil, EPS, dan enzim yang dimiliki) (Souza and Francesca, 2017). Isolasi BAL yang berpotensi sebagai kultur *starter* dari susu kuda Sumbawa masih belum melibatkan karakterisasi sesuai kriteria kultur starter (karakterisasi teknologi). Dewi dkk. (2010) mengisolasi BAL dari susu kuda Sumbawa dan dilanjutkan karakterisasi fenotip seperti uji produksi gas dari metabolisme glukosa, uji katalase, uji pewarnaan Gram dan bentuk morfologi sel. Oleh karena itu, seleksi dan uji potensi BAL asal susu kuda Sumbawa terfermentasi sebagai kultur *starter* penting dilakukan untuk mengembangkan produk fermentasi susu kuda yang berkualitas.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah bakteri asam laktat yang diisolasi dari susu kuda Sumbawa terfermentasi memenuhi kriteria sebagai kultur *starter*?
2. Bagaimana pengaruh kultur *starter* terpilih dalam meningkatkan kualitas organoleptik fermentasi susu kuda?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Mendapatkan isolat BAL dari produk susu kuda Sumbawa terfermentasi yang memenuhi persyaratan sebagai kultur *starter*.
2. Mengetahui pengaruh kultur *starter* terpilih dalam meningkatkan kualitas organoleptik fermentasi susu kuda.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah mendapatkan kultur *starter* yang potensial untuk menciptakan produk fermentasi susu baik kuda maupun sapi yang berkualitas baik. Selain itu, kultur *starter* tersebut dapat dikembangkan menjadi probiotik sehingga menjadikan nilai tambah bagi produk fermentasi yang dihasilkan untuk peningkatan kesehatan masyarakat.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Susu Kuda Sumbawa

Susu kuda memiliki karakteristik yang berbeda dengan susu sapi atau susu dari ruminansia lain. Susu kuda berwarna lebih putih, lebih jernih, lebih manis, dan memiliki sisa rasa (*aftertaste*) kelapa, dan beraroma seperti jerami. Dilihat dari kandungan nutrisinya, susu kuda memiliki kandungan lemak dan protein yang lebih rendah, namun memiliki kandungan laktosa tinggi (Tabel 1) (Ewa dkk., 2017).

Tabel 1. Perbandingan kandungan nutrisi susu kuda, sapi, dan ASI

Komponen	Susu Kuda	Susu sapi	ASI
Lemak (%)	1,21	3,61	3,64
Protein (%)	2,14	3,25	1,42
Laktosa (%)	6,37	3,25	6,71
Abu (%)	0,42	0,76	0,22
Energi (kcal/kg)	480	674	677

Susu kuda mengandung lemak yang lebih rendah daripada ASI, sehingga kandungan kalorinya juga lebih rendah. Dilihat dari asam lemaknya, asam lemak tidak terlarut pada susu kuda lebih tinggi (61,3 %) daripada susu sapi (32 %) ataupun ASI (45,2 %) (Csapo dkk. 1995; Malacarne dkk. 2002). Rasio asam lemak terlarut dan tidak terlarut pada susu kuda adalah 1:3, yang mendekati dengan ASI yaitu 1 : 2, namun jauh berbeda dengan sapi (2:1). Susu kuda juga merupakan sumber asam linoleat yang tinggi, berperan penting dalam perkembangan dan pertumbuhan sistem saraf (Csapo dkk., 1995; Di Cagno dkk., 2004; Salamon dkk., 2009).

Protein yang ada dalam susu kuda terdiri dari 50-55% kasein dan 45 % globulin dan albumin, berbeda dengan kasein pada ruminansia yang memiliki kandungan kasein sebesar 80% dan 60% globulin dan albumin (Malacarne dkk. 2002). Susu kuda memiliki protein *whey* dan asam amino eksogen yang tinggi (Tabel 2) sehingga susu kuda lebih baik digunakan sebagai

sumber nutrisi daripada susu sapi (Csapo-Kiss dkk. 1995; Martuzzi dkk. 2000; Csapo dkk. 2009).

Tabel 2. Distribusi protein *whey* dari susu kuda, sapi, dan ASI

Komponen	Susu kuda	Susu sapi	ASI
Protein <i>whey</i> (g/kg)	8,30	5,70	7,60
β-Lactoglobulin (%)	30,75	20,10	kurang
α-Lactoalbumin (%)	28,55	53,59	42,37
Imunoglobulin (%)	19,77	11,73	18,25
Serum albumin	4,45	6,20	7,56
Laktoferin (%)	9,89	8,38	30,26
Lisozim	6,59	kurang	1,66

Susu kuda mengandung lebih sedikit mineral (0,5 %) dibandingkan susu sapi (0,8 %) dan susu hewan ternak lain. Meskipun begitu, kandungan kalsium dan fosfor susu kuda (1,6-1,8) lebih sesuai untuk pertumbuhan skeleton daripada susu sapi (1,4 :1), dan mendekati ASI (1,9 : 1) (Sheng and Fang 2009). Susu kuda memiliki kandungan vitamin A, D₃, dan E (terlarut dalam minyak) yang mirip dengan ASI, dan memiliki kandungan vitamin C yang tinggi meskipun tidak setinggi pada ASI (Csapo dkk., 1995). Susu kuda memiliki status higienitas dan sanitasi yang sangat baik, yang ditunjukkan kandungan sel somatik dan mikroba yang sangat rendah. Namun, meskipun kandungan vitamin dan imunoglobulin dalam susu kuda mirip dengan ASI, susu ini tidak begitu populer karena memang ketersediaannya juga rendah (Pietrzak- Fiecko dkk., 2009).

Selain nutrisi yang tinggi, susu kuda juga mengandung senyawa aktif laktoferin, asam oleat, dan lisozim. Laktoferin memiliki aktivitas antiinflamasi, imunomodulator, antibakteri, antijamur, antivirus. Asam orotic (vitamin B₁₃) berfungsi mencegah penuaan kulit, dan sirosis hati. Sedangkan lisozim berperan dalam mekanisme respon imun dan antibakteri. Susu kuda dapat dimanfaatkan dalam berbagai hal, seperti obat, kosmetik, dan sebagainya. Susu kuda dapat dimanfaatkan untuk penyakit gastrontestinal, kardiovaskular, antiviral, antiinflamasi, bakterisidal, detoksifikasi dalam tubuh, anemia, terapi kanker, faringitis, inflamasi pada saluran pernapasan, mendukung

pertumbuhan otak sistem saraf, dan alzeimer (Dankow dkk., 2012).

2.2 Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat (BAL) biasa digunakan dalam proses fermentasi. Dalam dunia industri makanan dan minuman, BAL umumnya digunakan sebagai kultur *starter* karena dapat meningkatkan nutrisi, organoleptik, dan daya simpan dari berbagai makanan dan minuman fermentasi (Wouters dkk., 2002; Capozzi dkk., 2012; Patel dkk., 2013). Bakteri Asam Laktat (BAL) biasanya dicirikan sebagai Gram positif yang berbentuk kokus atau basil.

Terdapat dua jalur metabolisme BAL yaitu jalur metabolisme heterofermentatif dan homofermentatif. Genus *Lactobacillus* dan *Leuconstoc* memiliki jalur metabolisme heterofermentatif (Mahmoudi dkk., 2013). Bakteri asam laktat dengan jalur metabolisme heterofermentatif tidak hanya menghasilkan asam laktat, melainkan etanol dan karbondioksida. Bakteri dalam kelompok ini menghasilkan hanya 50 % asam laktat. Bakteri asam laktat ini memfermentasi 1 mol glukosa menjadi 1 mol asam laktat, 1 mol etanol dan 1 mol CO₂. Satu mol glukosa menghasilkan 1 mol ATP (Trinanda, 2015).

Jalur metabolisme homofermentatif dilakukan oleh BAL dari genus *Lactococcus* dan *Streptococcus* (Mahmoudi dkk., 2013). Bakteri kelompok homofermentatif menghasilkan lebih dari 85 % asam laktat dari glukosa. Satu mol glukosa yang dimetabolisme diubah menjadi 2 mol asam laktat, dan dari setiap molekul glukosa akan dihasilkan 2 mol ATP. Asam laktat adalah produk utama fermentasi ini (Trinanda, 2015).

Bakteri asam laktat cocok digunakan untuk kultur *starter* dalam susu karena dapat memanfaatkan komponen susu terutama laktosa dan kasein sebagai sumber karbon. Proses fermentasi *Lactobacillus* sp. akan mengubah laktosa dan kasein menjadi asam laktat sebagai produk utama. Terdapat hubungan antara pertumbuhan yang cepat, tingkat produksi asam dan degradasi kasein susu yang efisien (Courtin dkk., 2002).

Bakteri Asam Laktat adalah Gram positif yang biasanya nonmotil, berbentuk batang non-spora atau kokus, menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir utama. Secara umum, kelompok

inti BAL terdiri dari empat genus yaitu *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* dan *Streptococcus*. Revisi taksonomi baru-baru ini telah mengusulkan beberapa genera baru yaitu *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Vagococcus*, *Vagococcus*, dan *Weissella* (Jin dkk., 2009).

Bakteri Asam Laktat hanya dapat memperoleh ATP melalui fermentasi, biasanya gula. Bakteri asam laktat tidak menggunakan oksigen dalam produksi energi mereka, oleh karena itu BAL mampu tumbuh pada kondisi anaerob, tetapi mereka juga dapat tumbuh pada kondisi aerob. Bakteri Asam Laktat terlindungi dari produk sampingan oksigen seperti H_2O_2 karena menghasilkan enzim peroksidase. Bakteri ini bersifat aerotoleran dan anaerob (Khalid, 2011).

Taksonomi BAL didasarkan pada reaksi Gram dan produksi asam laktat dari berbagai karbohidrat yang dapat difermentasi. Klasifikasi bakteri asam laktat menjadi genus yang berbeda didasarkan pada morfologi, jalur metabolisme glukosa, pertumbuhan pada suhu yang berbeda, dan konfigurasi asam laktat yang dihasilkan, kemampuan tumbuh pada konsentrasi garam tinggi, dan toleransi pada kondisi asam atau alkali (Khalid, 2011). Karakteristik tambahan seperti komposisi asam lemak dan motilitas digunakan juga dalam klasifikasi untuk beberapa genus (Pilar dkk., 2008).

2.3 Fermentasi Susu Kuda

Susu kuda perlu difermentasi terlebih dahulu jika akan dikonsumsi. Hal ini disebabkan susu kuda yang masih mentah/segar memiliki efek laksatif yang tinggi. Fermentasi susu kuda dapat dilakukan secara alami atau dengan penambahan strain BAL untuk mempercepat fermentasi. Laktosa dalam susu kemudian dikonversi menjadi asam laktat, menghasilkan etanol, dan karbondioksida. Laktosa yang sudah terkonversi ini memungkinkan untuk mengatasi alergi terhadap laktosa (Nurtazin dkk., 2015).

Produk fermentasi alami kuda yang sudah umum adalah *koumiss*. *Koumiss* adalah makanan tradisional Asia Tengah yang diproduksi dari susu kuda. Fermentasi berlangsung 3-8 jam

dengan bantuan khamir dan bakteri asam laktat *indigenous*. *Koumiss* umumnya diproduksi dengan metode tradisional dalam skala kecil. Minuman ini mengandung 2 % alkohol, 0,5-1,5 % asam laktat, 2-4 % gula, dan 2 % lemak, dan berasa seperti asam aryan. *Koumiss* berkhasiat untuk penyembuhan penyakit TBC, asma, pneumonia, kardiovaskular, dan penyakit reproduksi. (Yaygin, 1992; Kinik dkk., 2000; Karagozlu & Kavas, 2000; Ozden, 2008; Ustun, 2009).

Tabel 3. Komposisi kimia dan kapasitas antioksidan dari susu kuda segar, fermentasi, dan Susu kuda terfermentasi probiotik berserat tinggi

Parameter	Susu kuda segar	Susu kuda terfermentasi	Susu kuda terfermentasi probiotik berserat tinggi
	Rerata±SD	Rerata±SD	Rerata±SD
Ph	7,08±0,11	5,21±0,30	5,33±0,35
Dry matter (%)	9,88±0,11	10,3±0,40	13±1,1
Protein (%)	1,87±0,28	2,03±0,10	2,2±0,20
Ash (%)	0,30±0,15	0,29±0,10	0,33±0,05
Kelembaban	90,12±0,11	89,7±1,50	87±1,50
Kapasitas antioksidan	14,97±1,10	16,93±1,20	28,43±0,9

2.4 Kultur Starter

Starter kultur dapat didefinisikan sebagai strain mikroba yang terseleksi dengan ciri yang stabil untuk produksi karakter makanan yang diinginkan dalam kondisi terkontrol. Mikroba fermentasi pada kultur *starter* berperan dalam preservasi makanan, peningkatan rasa, aroma, stabilitas, dan sebagainya. Kultur *starter* dapat diisolasi dari alam yang kemudian diujikan untuk karakterisitik yang diinginkan. Kultur *starter* biasa dikembangkan dari bakteri asam laktat. Namun tidak hanya asam

laktat, mikroba kultur *starter* dapat berupa bakteri, khamir, ataupun kapang (Ravindra, 2015).

Bakteri asam laktat yang digunakan dalam kultur *starter* berasal dari kelompok *Lactobacillus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Propionbacterium*, *Streptococcus*, dan *Staphylococcus*. Terdapat dua tipe spesies *Lactobacillus* yaitu homofermenter yang menghasilkan asam laktat saja, contohnya *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. thermophilus*, *L. plantarum* dan heterofermenter yang menghasilkan asam laktat, alkohol dan karbondioksida, contohnya *L. fermentum*, *L. brevis*. *Lactobacillus* merupakan kultur *starter* untuk produksi keju dan yogurt, *Propionbacterium* untuk peningkatan rasa, *Streptococcus* untuk keju dan *butter milk* dan yogurt. Kapang yang banyak digunakan dalam kultur *starter* industri makanan adalah *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*. Dua spesies *Penicillium* yaitu *P. camemberti* dan *P. requefortii* adalah kultur *starter* untuk produksi keju, *Aspergillus* untuk produksi kecap tradisional, *soy pastes*, dan sake, *Rhizopus* untuk produksi tempe. Khamir digunakan sebagai kultur *starter* bir, alkohol, wine, roti, dan kefir. *Saccharomyces* adalah khamir yang paling sering digunakan sebagai kultur *starter* (Ravindra, 2015).

Berdasarkan jumlah mikroba yang terlibat, terdapat tiga jenis kultur *starter* yaitu kultur *starter* strain tunggal, *multi*-strain, dan strain campuran. Kultur strain tunggal adalah tipe kultur *starter* yang hanya terdiri dari satu spesies atau strain. Kultur *starter multi*-strain mengandung campuran dari tiga atau lebih strain tunggal atau spesies tunggal. Kultur *starter* strain campuran terdiri dari beberapa strain yang tidak diketahui proporsinya (Ravindra, 2015).

Sedangkan berdasarkan kondisi suhu untuk pertumbuhan optimalnya, kultur *starter* dibagi atas mesofilik dan termofilik. Kultur *starter* mesofilik tumbuh pada suhu 10–40 °C dengan suhu optimum 30 °C. Kultur *starter* mesofilik terdiri atas genus *Lactococcus*, dan *Leuconostoc*. Mikroba mesofilik ini berperan sebagai kultur *starter* untuk produksi beberapa variasi keju, dengan kemampuan mikroba tersebut diantaranya memiliki aktivitas asidifikasi, pembentukan gas, dan produksi enzim untuk pematangan keju. Kultur *starter* mesofilik dibagi mejadi beberapa tipe tergantung pada komposisi spesies dan strain (Tabel 4) (Kotze, 2003).

Tabel 4. Komposisi starter kultur mesofilik

Tipe	Spesies	Karakteristik dan Metode yang Digunakan
<i>Single-strain Starter</i>	<i>Lactococcus lactis</i> <i>L. cremoris</i> <i>L. diacetylactis</i>	Tunggal atau berpasangan
<i>Multiple-strain</i>	<i>L. lactis</i> <i>L. cremoris</i> <i>L. diacetylactis</i> <i>Leuconostoc</i>	Campuran dari dua atau lebih strain (dapat digunakan berpasangan)
<i>Mixed-strain</i>	<i>L. lactis</i> <i>L. cremoris</i> <i>L. diacetylactis</i> <i>Leuconostoc</i>	Proporsi dari beberapa strain tidak diketahui sehingga dapat bervariasi pada setiap subkultur (dapat dipakai berpasangan)

Kultur *starter* termofilik memiliki kemampuan tumbuh pada suhu yang lebih tinggi dibandingkan dengan kultur *starter* mesofilik. Pertumbuhan optimum kultur termofilik adalah pada suhu 40–50 °C. Genus *Streptococcus*, *Lactobacillus*, dan *Pediococcus* adalah contoh kelompok bakteri yang dapat tumbuh pada suhu 45 °C. Kultur *starter* termofilik umumnya terdiri dari dua genus yang berbeda yang bersimbiosis atau berkompetisi selama pertumbuhan, contohnya kultur *starter* termofilik yang terdiri dari genus *Streptococcus* dan *Lactobaecillus*. Rasio produksi asam dan aktivitas proteolitik pada kultur campuran lebih baik daripada jumlah produksi asam dan aktivitas proteolitik yang dihasilkan dari dua kultur tunggal (Kotze, 2003).

2.5 Kriteria Kultur *Starter*

Karakteristik kultur *starter* yang utama adalah hanya mengandung satu mikroba sehingga kualitas produk seragam, strain yang digunakan dapat mengembangkan tekstur dan cita rasa yang diinginkan, peningkatan volume kultur *starter* dapat menurunkan waktu fermentasi, kualitas dan stabilitas fermentasi dapat dijaga, kontaminasi dapat dihindari dengan pengaturan parameter seperti pH, oksigen, komposisi substrat, dan sebagainya, serta mikroba tersebut dapat memanfaatkan substrat

secara maksimum sehingga menurunkan biaya produksi (Ravindra, 2015).

Salah satu produk makanan yang memanfaatkan kultur *starter* adalah yoghurt. Karakteristik yang dibutuhkan bagi kultur starter yogurt diantaranya adalah mengandung mikroba yang diinginkan, yaitu memiliki kemampuan untuk memproduksi asam, aroma, dan cita rasa, resisten terhadap *phage*, multiplikasi cepat dibawah kondisi kultur yang diinginkan (Ravindra, 2015). Kultur starter yogurt yang umum digunakan adalah *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* (Ravindra, 2015). *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* adalah bakteri termofilik, yang tumbuh optimum pada suhu 45°C sehingga dinamakan kultur *starter* termofilik (Kotze, 2003).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada Oktober 2018 hingga Mei 2019. Seleksi dan pengujian BAL yang berpotensi sebagai kultur *starter* dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Kultur Bakteri

Isolat BAL yang digunakan merupakan koleksi kultur Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Jumlah isolatnya adalah 16 isolat yang dibagi dalam dua kelompok berdasarkan asal media isolasi yang digunakan. Isolat yang diisolasi dari media MRS antara lain isolat DB4, DB9, DB2, DB6, DB3, DB7, dan DB11; adapun isolat hasil isolasi media M17 yaitu isolat BC8, DC13, BC10, BC7, DC10, BC5, BC9, BC11, dan DC4. Namun demikian, tidak semua isolat menunjukkan karakter sebagai BAL karena memiliki endospora, yaitu isolat BC5, BC8, dan BC11 (Lampiran 1). Oleh karena itu, isolat BAL dengan karakter Gram positif, tidak menghasilkan enzim katalase, dan tidak memiliki endospora dilanjutkan skrining BAL sebagai kultur *starter* melalui uji asidifikasi.

3.3 Skrining BAL sebagai Kultur *Starter*

Tujuan dilakukannya uji asidifikasi (penurunan pH dari waktu ke waktu) adalah untuk mendapatkan isolat BAL yang memiliki kemampuan asidifikasi cepat (terbaik) sebagai kandidat yang ideal untuk menjadi kultur *starter* primer pada proses fermentasi susu (Ayad dkk., 2004). Asidifikasi cepat juga berperan penting dalam mencegah pertumbuhan mikroba yang tidak diinginkan seperti *Salmonella* spp. (Park & Marth, 1972).

Isolat BAL ditumbuhkan dalam media MRS *broth* (MRSB) yang mengandung laktosa 2% (DB4, DB9, DB2, DB6, DB3, DB7, dan DB11) atau M17 *broth* (BC8, DC13, BC10, BC7, DC10, BC5, BC9, BC11, dan DC4) yang mengandung laktosa 2

% pada suhu 37° C selama 24 jam. Setelah itu nilai *optical density* (OD) kultur bakteri pada panjang gelombang 600 nm disetarakan. Kemudian, 3 mL kultur dipindahkan ke dalam 27 mL media susu skim yang mengandung 0,3 % ekstrak khamir sebagai sumber N dan 0,2 % glukosa sebagai sumber C yang siap digunakan, dan diinkubasi pada suhu 30° C selama 24 jam (Ozkaya dkk., 2001). Sebagai kontrol, dibuat media susu skim yang mengandung 0,3 % ekstrak khamir dan 0,2 % glukosa tanpa inokulum yang juga diinkubasi pada suhu 30° C selama 24 jam. Sampel diambil pada jam ke-0, 2, 4, 6, dan 24 untuk diukur pH-nya sehingga diketahui perubahan pH ($\Delta\text{pH}=\text{pH awal}-\text{pH akhir}$) dari jam ke-0.

Kategori asidifikasi setiap isolat ditentukan. Asidifikasi dibagi menjadi tiga kategori, yaitu cepat, sedang, dan lambat. Perubahan pH dikatakan cepat, sedang, dan lambat saat penurunan pH sebesar 0,4 dicapai masing-masing setelah 3, 3,5 dan 5 jam. Isolat bakteri yang dipilih pada tahap skrining adalah isolat bakteri yang memiliki kemampuan asidifikasi tercepat. Beberapa isolat yang lolos skrining diseleksi lebih lanjut berdasarkan uji karakteristik teknologi (Fortune dkk., 2014).

3.4 Pengujian Karakteristik Teknologi BAL

Terdapat tiga uji karakteristik teknologi BAL yaitu uji proteolitik, uji lipolitik, dan uji produksi EPS (eksopolisakarida). Hasil seleksi pada uji karakteristik teknologi merupakan isolat yang paling banyak memenuhi karakteristik teknologi yang diujikan yaitu aktivitas proteolitik tinggi, aktivitas lipolitik rendah, dan kemampuan produksi eksopolisakarida. Selain itu juga dipilih isolat yang memiliki aktivitas antimikroba yang merupakan *protective properties*, sensitif terhadap antibiotik, dan tidak memiliki aktivitas hemolisis (α hemolisis) yang merupakan aspek keamanan pangan. Namun dari keseluruhan karakteristik teknologi tersebut akan dipilih isolat yang paling banyak memenuhi karakteristik teknologi. Isolat terpilih dari hasil pengujian karakteristik teknologi akan menjadi kandidat isolat yang akan dipakai dalam fermentasi susu.

3.4.1 Aktivitas proteolitik

Uji aktivitas proteolitik bertujuan untuk mendapatkan isolat yang mampu dengan baik memanfaatkan protein dan peptida untuk pertumbuhan bakteri dan pematangan fermentasi susu (Liu dkk., 2010; Savijoki dkk., 2006). Satu ose isolat diinokulasikan ke dalam media MRSB yang mengandung laktosa 2 % atau M17 *broth* yang mengandung laktosa 2 % kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam untuk mendapatkan kultur cair isolat BAL. Kultur cair tersebut diukur nilai OD pada panjang gelombang 600 nm dan disetarakan nilai OD-nya.

Media yang digunakan pada uji aktivitas proteolitik adalah 1% susu skim yang mengandung 0,05 % NaCl, 0,1 % ekstrak khamir, 0,2 % tripton, 0,01 % CaCl₂, dan 1,5 % bacto agar. Sumuran dibuat dengan diameter 8 mm pada media agar susu skim. Kemudian 50 µL kultur cair dimasukkan pada masing-masing sumuran, dengan ulangan sebanyak tiga kali. Cawan Petri dimasukkan ke dalam kulkas selama 30 menit agar kultur cair berdifusi ke dalam agar susu skim susu skim. Setelah itu, agar susu skim tersebut diinkubasi pada suhu pada suhu 37° C selama 24 jam. Sebagai kontrol, sumuran pada media susu skim diisi dengan akuades steril tanpa inokulum. Zona bening di sekitar sumuran diukur pada jam ke-24. Pembentukan zona bening mengindikasikan keberadaan aktivitas proteolitik yang diukur berdasarkan rumus (1) (Vijayaraghavan dkk., 2013). Kultur starter yang diharapkan merupakan isolat yang memiliki aktivitas proteolitik yang tinggi.

Diameter zona bening (mm) = Diameter total - diameter sumuran.....(1)

3.4.2 Aktivitas lipolitik

Kultur cair isolat BAL dibuat dalam media MRS cair dengan menambahkan laktosa 2 % atau M17 cair dengan menambahkan laktosa 2 % kemudian nilai OD pada panjang gelombang 600 nm disetarakan. Media yang digunakan adalah media agar *Sierra* yang terdiri dari 1 % pepton, 0,5 % NaCl, 0,01 % CaCl₂·2H₂O, 1,5 % bacto agar, dan 1 % Tween 80 (Sierra, 1957). Sumuran dibuat pada media agar dengan diameter 8 mm dengan empat kali ulangan. Sebanyak 50 µL kultur diinokulasikan ke dalam masing-masing sumuran. Cawan Petri dimasukkan ke dalam kulkas

selama 30 menit untuk memungkinkan terjadinya difusi ke agar. Cawan Petri diinkubasi pada suhu 37° C selama 96 jam dan diukur diameter zona beningnya (rumus 1) (Fortune dkk., 2014).

Aktivitas lipolitik lemak susu dengan enzim lipase bakteri menyebabkan kemunculan bau tengik karena dihasilkan asam lemak rantai pendek seperti butirat. Biasanya aktivitas lipase dikurangi dengan pemanasan (Rahmati F., 2017). Kultur *starter* yang diharapkan merupakan isolat yang memiliki aktivitas lipolitik yang rendah.

3.4.3 Produksi eksopolisakarida

Produksi eksopolisakarida (EPS) oleh BAL dapat dideteksi dengan keberadaan lendir yang terbentuk di permukaan media MRSA dengan penambahan sukrosa 5 % atau M17 dengan penambahan sukrosa 5 %. Satu ose isolat digoreskan pada media agar tersebut dengan tiga kali ulangan. Cawan Petri diinkubasi pada suhu 37° C selama 24-48 jam. Satu ose isolat diambil dari media agar tersebut kemudian diamati tipe tekstur koloninya. Bakteri asam laktat yang memproduksi EPS secara kualitatif dapat diamati melalui tipe tekstur koloninya yang seperti benang lengket (karakter *ropy*). Isolat yang akan dipilih sebagai kultur *starter* adalah isolat yang mampu memproduksi EPS.

3.5 Aktivitas Antimikroba

Setelah pengujian karakteristik teknologi, pengujian potensi isolat BAL yang berpotensi sebagai kultur *starter* dilanjutkan pada uji aktivitas antimikroba. Tujuannya adalah untuk mendapatkan isolat BAL yang mampu menghambat aktivitas bakteri patogen dalam produk fermentasi (Racciah dkk., 1979; Smith dan Palumbo 1983; dan Cintas dkk., 1998). Skrining aktivitas antimikroba menggunakan metode *disk-diffusion agar*. Satu ose isolat BAL diinokulasikan ke dalam dalam 15 mL MRS *broth* dengan penambahan laktosa 2% dan M17 *broth* dengan penambahan laktosa 2% kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Densitas sel kultur cair disetarakan pada 10⁷ CFU/mL menggunakan haemocytometer. Kultur cair disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 x g, suhu 4°C, selama 10 menit. *Cell free supernatant* (CFS) dipisahkan dari pelet, kemudian pH-nya diatur menjadi 6,5-6,8. Setelah itu, supernatan

disaring menggunakan membran filter dengan ukuran pori 0,2 μm . Supernatan yang telah steril diteteskan sebanyak 25 μL ke *blank-disk*, kemudian ditunggu sampai meresap kurang lebih selama 15 menit.

Strain bakteri indikator yang terdiri dari *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus*, dan *Salmonella typhi* ATCC 14028 yang ditumbuhkan pada media *nutrient broth*, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu, densitas sel disetarakan pada 10⁶ CFU/mL menggunakan haemocytometer. Kultur cair sebanyak 100 μL diinokulasikan dengan teknik cawan sebar pada media NA. *Disk* yang telah kering diletakkan pada empat sisi agar yang telah berisi bakteri indikator. Setelah itu, cawan Petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian pembentukan zona hambat diamati di sekitar sumuran. Aktivitas antimikroba ditentukan dengan mengukur diameter zona bening sekitar sumur menggunakan caliper dalam satuan mm (rumus 1).

3.6 Uji Kepekaan BAL terhadap Antibiotik

Kepekaan antibiotik adalah salah satu profil keamanan dari bakteri asam laktat (Halder dkk., 2017). Satu ose isolat BAL diinokulasikan ke dalam media MRSB atau M17 cair yang telah ditambahkan dengan 2 % laktosa, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Densitas sel disetarakan menggunakan spektrofotometer berdasarkan nilai OD-nya pada panjang gelombang. Setelah nilai OD setara, kultur cair sebanyak 0,1 mL diinokulasikan dengan teknik cawan sebar pada media MRS agar atau M17 agar. Satu cawan dibagi menjadi empat kuadran. Kemudian pada keempat sisi cawan diletakkan cakram antibiotik Kanamycin 30 μg , Erythromycin 15 μg , Cinoxacin 100 μg , Trimethoprim 5 μg dengan tiga kali ulangan cawan. Inkubasi dilakukan selama 48 jam pada suhu 37° C. Diameter zona hambat yang dibentuk diukur pada jam ke-48 dengan tiga kali ulangan, kemudian hasilnya dirata-rata. Sedangkan diameter zona bening diukur menggunakan rumus (1) kemudian ditentukan kepekaannya (Tabel 5). Isolat yang dipilih adalah isolat yang sensitif terhadap semua antibiotik yang diujikan.

Tabel 5. Kriteria uji sensitivitas BAL terhadap antibiotik

Antibiotik	Diameter zona hambat (mm)		
	Resisten (\leq)	Intermediet	Sensitif (\geq)
Kanamycin (30 μ g)	13	14-17	18
Erythromycin (15 μ g)	13	14-22	23
Trimethoprim (5 μ g)	10	11-15.	16
Cinoxacin (100 μ g)	15	16-20	21

(James, 2015)

3.7 Uji Hemolisis

Hemolisis adalah salah satu profil keamanan dari bakteri asam laktat (Halder dkk., 2017). Tujuan uji hemolisis pada BAL adalah untuk mendapatkan isolat yang aman digunakan untuk konsumsi manusia (Rasha, 2012). Hemolisis dikenal sebagai faktor virulensi pada bakteri patogen (Padmavathi dkk., 2018). Uji ini dilakukan untuk memastikan bahwa isolat BAL yang diisolasi tidak memiliki aktivitas hemolisis sehingga aman untuk manusia. Isolat BAL diambil satu ose kemudian digoreskan secara kontinu pada media agar darah domba. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, reaksi hemolisis yang terjadi diamati, yang berupa hidrolisis parsial dari sel darah merah sehingga membentuk zona kehijauan pada koloni dan tepian koloninya (α -hemolisis), berupa zona bening di sekitar koloni bakteri yang tumbuh (β -hemolisis), atau tidak adanya perubahan warna pada agar darah (γ -hemolisis). Isolat BAL yang tidak bereaksi dengan agar darah domba (γ -hemolisis) adalah isolat yang dipilih sebagai kandidat kultur *starter* (Monika dkk., 2017).

3.8 Fermentasi Susu Kuda

Isolat terpilih dari hasil pengujian kriteria kultur *starter* (karakterisasi teknologi) digunakan sebagai kultur *starter* dalam percobaan fermentasi susu. Susu yang digunakan dalam percobaan adalah susu kuda. Tiga jenis kultur *starter* yang dipakai adalah kultur *starter* isolat terpilih (SKB), kultur *starter* yogurt (SKK), dan campuran kedua kultur *starter* (SKC).

3.8.1 Persiapan kultur starter

Isolat terpilih diambil satu ose dan diinokulasikan ke dalam 20 mL MRSB, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Sebanyak 10 mL kultur cair dimasukkan ke dalam 90 mL susu sapi untuk membuat kultur *starter* dari isolat terpilih (SKB), kemudian diinkubasi pada suhu 30° C selama 12 jam.

Kultur *starter* yoghurt (SKK) adalah starter kultur starter yang diperoleh dari Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Malang. Kultur starter yoghurt ini berupa susu sapi yang telah diinokulasikan isolat *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*. Kultur *starter* yoghurt diambil sebanyak 10 mL kemudian diinokulasikan ke 90 mL susu sapi yang telah di pasteurisasi, kemudian diinkubasi pada suhu 30° C selama 12 jam. Sedangkan kultur starter campuran (SKC) dibuat dengan mencampurkan kedua kultur starter tersebut dengan presentase 50 % - 50 %.

Densitas sel yang terkandung pada kultur *starter* untuk masing-masing *batch* adalah sekitar 10^7 CFU /g. Oleh karena itu, dilakukan perhitungan sel dari ketiga kultur starter dengan metode *Total Plate Count* (TPC). Menurut Reyhan & Ufuk (2008) *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* viabel untuk produksi yoghurt dengan menggunakan kultur starter adalah sebesar 1×10^7 sampai 1×10^8 CFU/g. Densitas ini dicapai dengan inkubasi pada suhu 45° C selama 48 jam dengan menggunakan media MRS agar untuk *L. bulgaricus* dan M17 agar untuk *S. thermophilus* dalam kondisi mikroaerofilik.

3.8.2 Pelaksanaan fermentasi

Susu kuda sebanyak 900 mL dipasteurisasi pada suhu 65° C selama 30 menit. Kemudian susu kuda tersebut dimasukkan ke dalam sembilan wadah steril yang masing-masing sebanyak 100 mL. Masing-masing kultur *starter* (SKB, SKK, SKC) diinokulasikan sebanyak 3 % (3 mL) pada masing-masing wadah. Setelah kultur *starter* dimasukkan ke dalam susu, pH awal diukur terlebih dahulu. Fermentasi dilakukan pada suhu ruang selama 24 jam. Nilai pH diukur kembali pada jam ke-24 untuk mengetahui kemampuan asidifikasi dari masing-masing kultur *starter*. Densitas sel susu hasil fermentasi juga dihitung menggunakan

teknik TPC. Susu hasil fermentasi kemudian disimpan di dalam kulkas (4° C) selama 48 jam (Civardi dkk, 2003).

3.8.3 Uji organoleptik

Uji organoleptik merupakan salah satu pengujian makanan atau minuman dengan menggunakan indra manusia sebagai alat pengukur daya penerimaan terhadap produk. Uji hedonik sebagai salah satu metode untuk organoleptik menguji tingkat kesukaan atau ketidaksukaan panelis dalam bentuk skala hedonik. Produk hasil fermentasi diujicobakan terhadap 30 panelis yang terdiri dari 12 panelis laki-laki dan 19 panelis perempuan dengan rentan usia 18-22 tahun. Indikator penilaian terhadap produk hasil fermentasi susu termasuk rasa, warna, aroma, *mouthfeel*, dan penilaian secara keseluruhan (*overall*) dinilai menggunakan skala 1-7. Nilai 1 menyatakan sangat tidak suka, 2 = tidak suka, 3 = agak tidak suka, 4 = biasa saja, 5 = agak suka, 6 = suka, dan 7 = sangat suka (Granato dkk., 2010). Setiap panelis diberikan tiga jenis susu kuda fermentasi menggunakan tiga jenis kultur *starter* yang berbeda sebanyak 10 mL kemudian panelis diminta untuk menyatakan tingkat kesukaannya terhadap enam indikator penilaian dalam skala hedonik. Setiap pergantian penilaian satu susu kuda fermentasi maka panelis diminta untuk meminum air mineral sebagai penetral rasa. Selain uji organoleptik, densitas BAL dan tingkat asidifikasi (rumus 2) produk susu kuda juga dihitung. Densitas BAL dihitung dengan metode *Total Plate Count* (TPC) menggunakan media MRSA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.

Tingkat asidifikasi = $(\text{pH awal} - \text{pH akhir}) / \text{pH awal} \times 100\% \dots\dots 2$

3.9 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

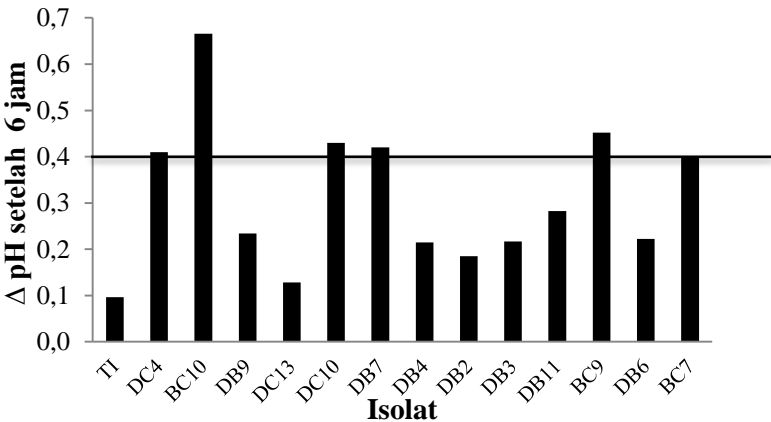
Rancangan penelitian yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap dengan ulangan sebanyak tiga kali. Analisis data uji asidifikasi, uji proteolitik, uji aktivitas antimikroba, dan uji sensitivitas antibiotik menggunakan *One-Way Analysis of Varians* (ANOVA) dengan tingkat kepercayaan 95 % dengan menggunakan *software* SPSS v.20. Data dianggap signifikan bila nilai signifikansi di bawah 0,05. Jika terdapat perbedaan antar perlakuan pada jenis isolat maka dilanjutkan dengan uji Tukey. Data uji organoleptik diuji normalitasnya terlebih dahulu. Data

tidak terdistribusi normal sehingga digunakan uji statistik nonparametrik Kruskal Wallis dengan tingkat kepercayaan 95 % menggunakan *software* SPSS v.20. Perbedaan keenam parameter penilaian (warna, rasa, aroma, *mouthfeel*, dan *overall*) dari ketiga kultur *starter* tersebut ditentukan dari nilai *Asymp.Sig*<0,05. Jika terdapat perbedaan parameter organoleptik antarkultur *starter* maka dilanjutkan dengan uji Tukey.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolat BAL sebagai Kultur *Starter*

Hasil skrining isolat BAL melalui uji asidifikasi diketahui bahwa tidak ada isolat BAL yang diujikan yang memiliki kemampuan asidifikasi kategori cepat (ΔpH sebesar 0,4 dicapai setelah 3 jam). Asidifikasi yang cepat adalah karakteristik utama kultur *starter* yang dibutuhkan untuk pengembangan produk susu fermentasi (Fortune dkk., 2014). Meskipun demikian, terdapat enam isolat yang mencapai ΔpH sebesar 0,4 setelah 6 jam (Gambar 1) sehingga isolat tersebut termasuk dalam kategori asidifikasi lambat (> 5 jam), yaitu DC4, BC10, BC9, DC10, DB7 dan BC7. Oleh karena itu, enam isolat tersebut yang diuji lebih lanjut untuk memenuhi persyaratan sebagai kultur *starter* (karakteristik teknologi).



Gambar 1. Aktivitas asidifikasi isolat BAL terpilih yang diisolasi dari produk susu kuda Sumbawa terfermentasi

Penurunan pH cukup drastis setelah 6 jam, berkisar 0,06-0,67. Isolat BC10 memiliki kemampuan asidifikasi tercepat dengan perubahan pH (ΔpH) sebesar 0,67, kemudian isolat BC9 dengan ΔpH sebesar 0,45, dan isolat DC10 dengan ΔpH sebesar 0,43. Begitu juga dengan pH susu setelah 24 jam, mengalami penurunan tajam. Penurunan pH berkisar antara 1,63-2,99, dengan pH berkisar 4,73-5,13 pada susu skim yang diinokulasi

enam belas isolat BAL. Berbeda dengan pH pada susu tanpa inokulum yang masih bernilai 5,72. Susu skim yang diinokulasi enam isolat terpilih memiliki perubahan pH yang bervariasi setelah 24 jam, berkisar 2,45-2,81. Susu skim yang mengalami perubahan pH tertinggi setelah 24 jam adalah susu skim yang diinokulasi isolat BC9 ($\Delta\text{pH}= 2,81$), isolat BC10 ($\Delta\text{pH}= 2,69$) dan isolat DC10 ($\Delta\text{pH}= 2,60$). Berbeda dengan ΔpH setelah 6 jam, isolat BC10 bukan merupakan isolat yang mengalami perubahan pH tercepat. Nilai pH susu yang ditambahkan inokulum menjadi turun dikarenakan aktivitas BAL yang mampu memfermentasikan laktosa menjadi asam laktat (Courtin dkk., 2002).

Strain dengan asidifikasi yang cepat adalah kandidat yang ideal untuk menjadi kultur starter primer pada proses fermentasi susu. Namun, strain dengan asidifikasi lambat juga dapat digunakan sebagai *adjunt culture* bergantung pada karakteristik lainnya (Ayad dkk., 2004). Secara umum, karakteristik BAL yang diinginkan dalam industri susu fermentasi adalah kemampuannya untuk mengubah komponen susu menjadi asam laktat secara cepat dan sempurna dengan kebutuhan nutrisi yang minimal. Asidifikasi cepat juga berperan penting dalam mencegah pertumbuhan mikroba yang tidak diinginkan seperti *Salmonella* spp. (Fortune, 2014).

Setiap bakteri asam memiliki perbedaan kemampuan untuk menghasilkan asam laktat, bergantung pada genus bakteri tersebut. Hal ini menyebabkan adanya perbedaan kemampuan asidifikasi isolat BAL. Bakteri asam laktat memiliki dua macam jalur metabolisme yaitu jalur metabolisme heterofermentatif dan homofermentatif. Bakteri asam laktat dengan jalur metabolisme heterofermentatif menghasilkan hanya 50% asam laktat, 1 mol glukosa difermentasi menjadi 1 mol asam laktat, 1 mol etanol dan 1 mol CO_2 . Bakteri kelompok homofermentatif menghasilkan lebih dari 85% asam laktat dari glukosa. Satu mol glukosa yang dimetabolisme diubah menjadi 2 mol asam laktat, dan dari setiap molekul glukosa akan dihasilkan 2 mol ATP (Trinanda, 2015). Genus *Lactobacillus* dan *Leuconostoc* memiliki jalur metabolisme heterofermentatif, sedangkan jalur metabolisme pada genus *Lactococcus* dan *Streptococcus* adalah berupa homofermentatif (Mahmoudi dkk., 2013).

Tidak hanya penurunan pH, aktivitas fermentasi BAL juga ditandai dengan terbentuknya *curd*. *Curd* dapat terbentuk

disebabkan protein susu skim mengalami koagulasi (penggumpalan). Koagulasi ini dapat terjadi karena senyawa asam yang dihasilkan BAL bereaksi dengan protein susu sehingga susu tampak menggumpal. Proses koagulasi protein dapat terjadi karena penambahan asam. Bakteri asam laktat yang dapat mengkoagulasi protein susu merupakan kriteria penting untuk dijadikan kultur *starter* atau kultur tambahan atau kultur pendamping (*adjunt culture*) (Shangpliang dkk., 2017).

4.2 Karakteristik Teknologi BAL

4.2.1 Aktivitas proteolitik

Aktivitas proteolitik isolat bakteri asam laktat yang diisolasi dari produk fermentasi susu kuda Sumbawa dapat diamati melalui terbentuknya zona bening di sekitar sumuran pada media susu skim agar. Dari enam isolat terpilih, isolat BC9 merupakan isolat yang memiliki aktivitas proteolitik tertinggi dengan indeks zona bening sebesar BC9 (2,38 mm), kemudian BC10 (2,29 mm), dan DC10 (2,16 mm) (Tabel 6). Terdapat beda nyata aktivitas proteolitik kontrol dan keenam isolat. Namun perbedaan signifikan aktivitas proteolitik antar isolat hanya terlihat pada DC4 dan BC9.

Tabel 6. Karakteristik teknologi isolat BAL terpilih

Isolat	Tingkat Asidifikasi jam ke-6	Aktivitas proteolitik (mm)	Aktivitas lipolitik (mm)	Produksi Ekspolisakarida*
Kontrol	0,1±0,00 ^a	0±0,00 ^a	0	(-)
DB7	0,42±0,03 ^b	2,13±0,10 ^{bc}	0	(-)
BC10	0,67±0,02 ^c	2,29±0,27 ^{bc}	0	(-)
DC4	0,41±0,03 ^b	1,97±0,15 ^b	0	(-)
BC9	0,45±0,01 ^b	2,38±0,27 ^c	0	(-)
DC10	0,43±0,03 ^b	2,16±0,16 ^{bc}	0	(-)
BC7	0,40±0,04 ^b	2,07±0,08 ^{bc}	0	(+)

*Keterangan :

(-) tekstur koloni *soft* (tidak menghasilkan EPS)

(+) tekstur koloni *ropy* (menghasilkan EPS)

Bakteri asam laktat sebagai kultur *starter* diharapkan memiliki aktivitas proteolitik yang tinggi. Aktivitas proteolitik dari bakteri asam susu laktat penting untuk pertumbuhan bakteri tersebut dalam susu dan pada akhirnya memengaruhi karakter organoleptik produk susu fermentasi (Axelsson, 1998; Christensen dkk., 1999). Kualitas produk susu fermentasi yang baik bergantung pada kemampuan proteolitik kultur *starter*, karena kandungan peptidase dan asam amino berpengaruh terhadap rasa atau berfungsi sebagai prekursor rasa. Bakteri asam laktat yang dihasilkan dari makanan asal Malaysia mampu menghasilkan beberapa asam amino seperti isoleucine, proline, glutamate, dan glisin. Asam glutamat adalah asam amino multifungsional yang terlibat dalam persepsi rasa, rangsangan neurotransmisi, dan metabolisme perantara. Bakteri asam laktat yang menghasilkan asam glutamat dapat menciptakan makanan fungsional yang kaya akan senyawa bioaktif GABA (Gama Amino Butyric Acid) (Zareian dkk., 2012).

Oleh karena itu, kultur *starter* dengan aktivitas proteolitik yang tinggi sebagaimana ditunjukkan isolat BC9 merupakan isolat sebagai kandidat kultur *starter* terbaik, kemudian disusul oleh isolat BC10, dan DC10. Molekul protein susu dihidrolisis menjadi peptida dan asam amino dalam aktivitas proteolitik. Aktivitas proteolitik BAL ini memiliki peranan yang penting dalam pemanfaatan protein dan peptida untuk pertumbuhan bakteri dan pematangan fermentasi susu (Liu dkk., 2010; Savijoki dkk., 2006). Selain dipengaruhi oleh pH, aktivitas proteolitik juga dipengaruhi oleh substrat dan jenis bakteri (Gobbetti dkk., 1999). Tiga isolat yang memiliki kemampuan asidifikasi yang tercepat (BC10, BC9 dan DC10) juga memiliki aktivitas proteolitik yang tinggi. Penelitian serupa dilakukan oleh Ozkaya dkk. (2001), dimana aktivitas proteolitik BAL yang diisolasi dari keju Beyaz tidak ada hubungan antara aktivitas proteolitik dan asidifikasi dari strain *Lactobacillus*. Strain dengan aktivitas asidifikasi tercepat (strain lactobacilli LC1, LP12 and LP13 dan strain enterococci DR36, FC9, FC10 and FC24) tidak memiliki aktivitas protolitik tertinggi dan ada strain yang dengan aktivitas asidifikasi rendah tetapi memiliki aktivitas proteolitik yang tinggi (contoh *E. faecium* strain FC17), dan ada juga strain dengan aktivitas asidifikasi tinggi sekaligus yang memiliki aktivitas proteolitik yang tinggi (contohnya *L. lactis* subsp. *lactis* strain SL1). Sesuai

pernyataan Ozkaya dkk. (2001) maka isolat BAL yang diisolasi dari produk susu kuda terfermentasi asal Sumbawa termasuk isolat BAL yang memiliki asidifikasi cepat dan aktivitas proteolitik yang tinggi.

4.2.2 Aktivitas lipolitik

Aktivitas lipolitik BAL ditandai dengan adanya zona bening yang terbentuk pada media *Sierra*. Aktivitas lipolitik dari keenamenam isolat terpilih menunjukkan hasil negatif (Tabel 6) yang ditandai dengan tidak terbentuknya zona bening hidrolisis di sekitar sumuran (Nawaz, 2016). Aktivitas lipolitik lemak susu oleh enzim lipase bakteri menyebabkan ketengikan saat asam lemak rantai pendek seperti butirat dilepaskan. Oleh karena itu, aktivitas lipase perlu dikurangi melalui pemanasan. Masih aktivitas enzim lipase diduga masih aktif meskipun dipanaskan dengan suhu yang sangat tinggi (*ultra high temperature*). Bakteri asam laktat yang dipilih untuk menjadi kandidat kultur *starter* sebaiknya memiliki aktivitas lipolitik yang rendah untuk mencegah munculnya aroma tengik pada produk fermentasi susu (Rahmati F., 2017). Aktivitas lipolitik pada BAL termasuk rendah. Namun, meskipun bakteri asam laktat memiliki aktivitas yang rendah, strain *Enterococcus* menunjukkan aktivitas lipolitik yang lebih tinggi daripada kebanyakan bakteri asam laktat lain (Tsakalidou dkk., 1994).

Aktivitas lipolitik BAL yang tinggi diperlukan dalam pembuatan keju dari susu mentah (Khalid dkk., 1990). Enzim lipase dari kultur *starter* digunakan untuk menghidrolisis lemak susu proses pematangan keju dapat dipercepat (Aravindan dkk., 2007). Aktivitas lipolitik oleh BAL juga berperan positif dalam menurunkan kadar kolesterol jika digunakan sebagai starter kultur atau kultur tambahan (Ramakrishnan dkk., 2012).

4.2.3 Produksi eksopolisakarida

Bakteri asam laktat yang memproduksi EPS secara kualitatif dapat diamati melalui tipe tekstur koloninya. Karakter koloni BAL penghasil eksopolisakarida adalah *ropy* yaitu tekstur koloni yang membentuk untaian menyerupai benang lengket. Enam isolat BAL hasil isolasi dari produk fermentasi susu kuda Sumbawa diketahui hanya ada satu isolat (BC7) yang mampu

menghasilkan EPS yang ditunjukkan oleh tekstur koloni *ropy* (Tabel 6). Lima isolat lainnya tergolong isolat dengan tekstur koloni tipe *soft*.

Namun, isolat yang tidak menunjukkan karakter koloni *ropy* bukan berarti tidak menghasilkan eksopolisakarida. Isolat dengan tekstur koloni yang *soft/* tidak membentuk benang lengket tetapi menghasilkan rendemen EPS yang cukup tinggi (Dinoto dkk., 2011). Oleh karena itu, pengujian produksi eksopolisakarida secara kuantitatif masih perlu dilakukan.

Produksi EPS merupakan karakter yang diinginkan pada kultur *starter* untuk produk susu dikarenakan EPS berfungsi sebagai pengental alami yang akan meningkatkan konsistensi dan viskositas produk (Madiedo dkk., 2005). Eksopolisakarida yang dihasilkan mikroba memiliki karakter reologi yang unik karena kemampuannya untuk membentuk larutan yang sangat kental pada konsentrasi rendah (Becker dkk., 1998). Sebagian besar BAL yang memproduksi EPS adalah genus *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, dan *Pediococcus* (Patel dkk., 2013). Selain itu, BAL yang memproduksi EPS memiliki kemampuan yang lebih besar dalam menghadapi keadaan stres dan memiliki kemampuan *survival* yang tinggi pada saluran pencernaan dibandingkan yang tidak menghasilkan EPS. Eksopolisakarida juga dapat mengurangi pembentukan *biofilm* oleh patogen (Kim dkk., 2009) dan modulasi pelekatannya ke sel epitel (Madiedo dkk., 2005). Oleh karena itu, pemilihan starter kultur penghasil EPS memberikan beberapa keunggulan dibandingkan yang tidak menghasilkan EPS.

4.2.4 Sensitivitas BAL terhadap antibiotik

Setiap isolat BAL terpilih memiliki sensitivitas yang berbeda terhadap keempat antibiotik yang diujikan (Tabel 7). Hanya isolat DC4 yang sensitif terhadap kanamycin (30 µg). Tidak ada isolat yang sensitif terhadap erythromycin (15 µg), namun semua isolat yang diujikan tergolong intermediet terhadap antibiotik ini. Berbeda dengan Erythromycin, sebagian besar isolat sensitif terhadap trimethoprim (5 µg), yaitu isolat DB7, BC9, DC10, dan BC7. Keenam isolat bersifat resisten terhadap cinoxacin (100 µg), hanya ada satu isolat yang intermediet terhadap cinoxacin yaitu isolat BC7.

Sensitivitas bakteri asam laktat terhadap antibiotik merupakan kriteria penting untuk kultur *starter* sekaligus kandidat probiotik. Dari enam isolat BAL yang diujikan, lima isolat BAL (DB7, DC4, BC9, DC10, dan BC7) memiliki sensitivitas terhadap antibiotik yang berbeda-beda. Sedangkan isolat BC10 menunjukkan karakter yang resisten terhadap ketiga antibiotik yang diujikan, tetapi isolat ini masih bersifat intermediet terhadap erythromycin. Oleh karena itu, enam isolat tersebut (DB7, BC9, DC10, BC7, dan DC4) adalah isolat yang paling memenuhi syarat sebagai kultur *starter* berdasarkan tingkat kepekaannya terhadap antibiotik.

Tabel 7. Sensitivitas bakteri asam laktat terpilih yang diisolasi dari produk fermentasi susu kuda Sumbawa terhadap antibiotik

Isolat	Jenis Antibiotik			
	Kanamycin (30 µg)	Erythromycin (15 µg)	Trimethoprim (5 µg)	Cinoxacin (100 µg)
DB7	R	I	S	R
BC10	R	I	R	R
DC4	S	I	R	R
BC9	R	I	S	R
DC10	R	I	S	R
BC7	I	I	S	I

Keterangan: R = resisten, I = intermediet, S = sensitif

Hal yang dikhawatirkan pada bakteri resisten terhadap antibiotik adalah adanya transfer gen resisten antibiotik. Gen resisten antibiotik umumnya terdapat di dalam plasmid. Gen tersebut dapat ditransfer ke bakteri lain melalui mekanisme konjugasi. Adanya resistensi ini dikarenakan adanya D-Ala-D-Laktat di peptidoglikan dengan jumlah yang lebih banyak daripada D-Ala-D-Ala dipeptida yang merupakan target antibiotik (Danielsen dan Wind 2003). Risiko dari resistensi antibiotik ini adalah kemampuan strain yang resisten terhadap antibiotik untuk memindahkan gen resisten ke bakteri patogen (Mathur dan Singh 2005).

Lactobacillus sp. memiliki resistensi alami/intrinsik terhadap kelas aminoglycosida (antibiotik kanamycin), trimethoprim, dan

quinolones (antibiotik cinoxacin). Resistensi bakteri asam laktat dan probiotik terhadap antibiotik kelas aminoglikosida (antibiotik kanamycin) telah dilaporkan. Terdapat beberapa mekanisme resistensi antibiotik isolat *Lactobacillus* dari makanan fermentasi terhadap trimethoprim, yaitu impermeabilitas dinding sel, jalur metabolik alternatif, dihydrofolate reductase (DHFR), yang insensitif terhadap trimethoprim. Namun mekanisme resistensi *Lactobacillus* belum diketahui, resistensi intrinsik ini dihasilkan dari karakteristik intrinsik seperti struktur dinding sel atau mekanisme *efflux* (Sharma dkk., 2018).

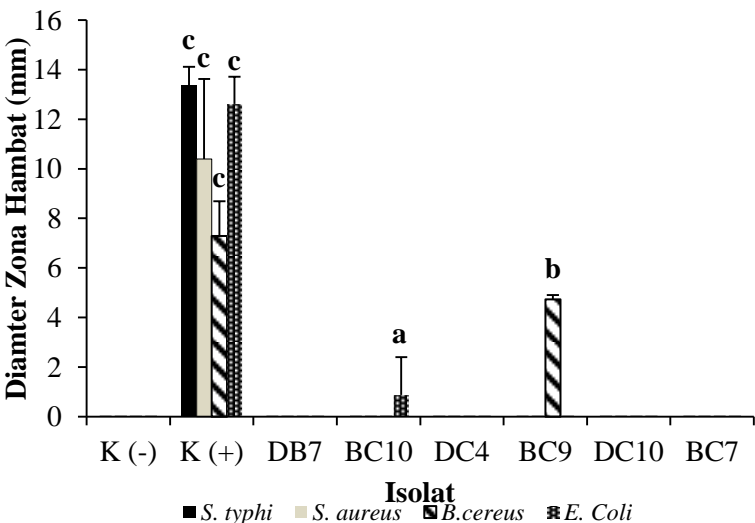
Umumnya letak gen resisten tersebut adalah dalam plasmid, namun deteksi letak gen resisten antibiotik pada isolat BC10 tetap perlu dilakukan untuk memastikan apakah gen resisten antibiotik isolat ini dapat ditransfer ke bakteri pada saluran pencernaan terutama yang bersifat patogen. Apabila letaknya memang pada plasmid maka produk fermentasi susu kuda perlu dialihkan pada produk non-konsumsi.

4.2.5 Aktivitas antimikroba

Aktivitas antimikroba diamati dari enam isolat BAL yang terpilih dengan metode *disc diffusion agar*. Terdapat dua dari enam isolat yang menunjukkan aktivitas antimikroba yaitu isolat BC10, dan BC9 (Gambar 2). Masing-masing isolat menunjukkan penghambatan pada bakteri indikator yang berbeda-beda. Isolat BC10 mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* (0,88 mm), sedangkan isolat BC9 dapat menghambat pertumbuhan *Bacillus cereus* (4,74 mm). Berdasarkan hasil analisis statistik diketahui bahwa terdapat beda nyata antara kontrol (menggunakan antibiotik streptomycin) dan aktivitas antimikroba yang dimiliki oleh isolat BC9. Namun tidak ada beda nyata antara kontrol (menggunakan antibiotik streptomycin) dengan isolat BC10. Apabila BAL yang dipilih sebagai starter kultur produk fermentasi memiliki aktivitas antimikroba maka dapat mengurangi populasi mikroba kontaminan sehingga dapat meningkatkan keamanan pangan. Oleh karena itu, isolat BC9, dan BC10 merupakan kandidat yang paling potensial untuk dijadikan kultur starter.

Senyawa antimikroba seperti asam laktat, bakteriosin, hidrogen peroksida, dan diasetil yang diproduksi oleh BAL dapat

menghambat pertumbuhan bakteri patogen dalam produk fermentasi. Namun, senyawa antimikroba yang berperan dalam aktivitas antimikroba BAL pada penelitian ini bukan merupakan asam laktat dikarenakan pH *Cell Free Supernatant* (CFS) telah dinetralkan. Senyawa antimikroba bakteriosin yang merupakan protein bersifat stabil ketika nilai pH mendekati netral (Apolonio dkk., 2007). Senyawa antimikroba ini juga menguntungkan BAL untuk berkompetisi dengan mikroba lain dalam suatu kultur *starter* terutama selama fermentasi sehingga memungkinkan dominasi BAL selama proses fermentasi (Racah dkk., 1979; Smith dan Palumbo 1983; dan Cintas dkk., 1998).



Gambar 2. Aktivitas antibakteri oleh isolat BAL yang diisolasi dari produk fermentasi susu kuda Sumbawa

Bakteri asam laktat menghasilkan asam laktat, sehingga mengurangi pH media fermentasi sehingga menjadikan kondisi medium yang tidak kondusif untuk kelangsungan hidup bakteri pembusuk/ patogen selama fermentasi secara alami/ spontan (Daeschel, 1993). Asam laktat adalah senyawa yang menghambat bakteri pembusuk sehingga meningkatkan keamanan makanan. Senyawa antimikroba yang berupa hidrogen peroksida dapat menambah aktivitas antimikroba dari BAL dan merupakan prekursor untuk produksi senyawa antimikroba lainnya yang kuat

seperti super oksida (O_2^-) dan radikal hidroksil (OH^-) (Condon, 1983).

4.2.6 Aktivitas hemolisis

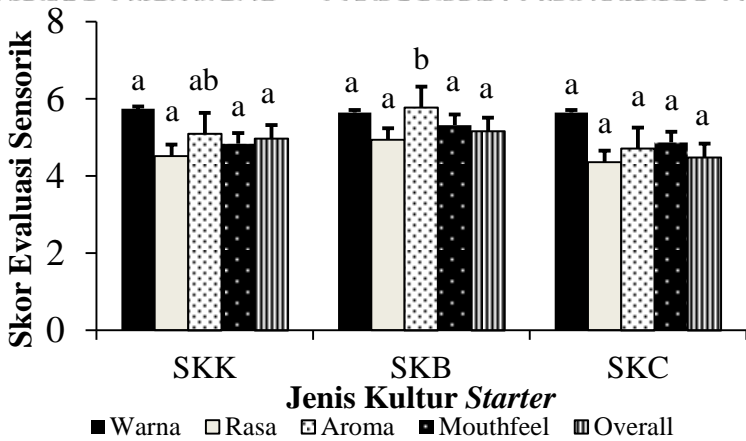
Isolat DC10 dan BC7 dapat melisis sel darah merah secara penuh/ sempurna yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri sehingga dikategorikan memiliki aktivitas hemolisis beta (β), sedangkan isolat BC10, DC10, DB7 dan DC4 dilaporkan sebagai hemolisis tipe gama (γ) yang ditandai dengan tidak adanya zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri (Lampiran 13).

Sebagian besar BAL yang diisolasi dari makanan telah dilaporkan sebagai hemolisis tipe gama (γ) (Kumar dan Murugalatha 2012). Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Maragkuodakis dkk. (2006). Hemolisis dikenal sebagai indikasi adanya faktor virulensi pada mikroba patogen (Padmavathi dkk., 2018). Bakteri yang dengan hemolisis tipe gama merupakan prasyarat utama untuk pemilihan strain yang aman digunakan untuk konsumsi manusia (Rasha dkk., 2012).

4.3 Evaluasi Organoleptik Fermentasi Susu Kuda

Isolat BC10 dipilih sebagai isolat yang digunakan sebagai kultur *starter* dengan pertimbangan isolat tersebut memiliki kemampuan asidifikasi tercepat, memiliki aktivitas proteolitik yang tinggi, memiliki aktivitas antimikroba, dan tidak memiliki aktivitas hemolisis. Terdapat tiga jenis susu kuda fermentasi yang diuji organoleptik yaitu SKK (menggunakan kultur *starter* yogurt), SKB (isolat BC10), dan SKC (campuran kultur *starter* yoghurt dan isolat BC10). Hasil skoring evaluasi organoleptik tiga jenis susu kuda fermentasi menunjukkan bahwa susu kuda yang difermentasi menggunakan isolat bakteri terpilih (BC10) memiliki skor tertinggi hampir pada semua parameter yang diujikan kecuali warna (Gambar 3). Namun, tidak ada beda nyata yang ditemukan pada skoring indikator warna, rasa, *mouthfeel*, dan penilaian secara keseluruhan (*overall*). Berdasarkan hasil statistik dengan uji Kruskal-Wallis maka diketahui bahwa hanya aroma dari ketiga sampel yang menunjukkan perbedaan. Bila diuji lanjutan dengan menggunakan Tukey maka dapat diketahui bahwa perbedaan nyata dapat dilihat pada aroma sampel SKB da

SKC. Namun tidak ada perbedaan nyata antara aroma sampel SKK dan SKC serta SKK dan SKB.



Gambar 3. Skor evaluasi organoleptik produk fermentasi susu kuda

Hasil evaluasi organoleptik parameter warna, ketiga susu fermentasi diketahui bahwa kultur *starter* SKK menduduki peringkat tertinggi yaitu sebesar 5,74 yang menunjukkan bahwa panelis menyukai susu kuda hasil fermentasi kultur *starter* yoghurt SKK. Namun tidak ada beda nyata skoring parameter warna pada ketiga susu fermentasi. Hal ini dikarenakan warna dari ketiga susu fermentasi tersebut cenderung sama yaitu terlihat berwarna putih jernih. Susu kuda memiliki karakteristik yang berbeda dengan susu sapi atau susu dari ruminansia lain. Susu kuda berwarna lebih putih, dan lebih jernih dari susu sapi (Solaroli dkk. 1993; Curadi dkk. 2000; Potocnik dkk. 2011). Jika dibandingkan warna susu kuda sebelum dan sesudah fermentasi maka warna ketiga susu kuda setelah difermentasi tetap putih jernih.

Skoring parameter rasa pada ketiga susu kuda fermentasi juga menunjukkan hal yang sama. Susu kuda dengan kultur starter BC10 (SKB) memiliki rata-rata skoring tertinggi yaitu sebesar 4,94. Hal ini menunjukkan bahwa meskipun SKB merupakan susu yang rasanya paling disukai namun hanya pada tingkatan agak suka. Rasa ketiga susu tersebut asam, namun berbeda tingkat keasamannya (asidifikasi). Secara berurutan, tingkat asidifikasi tertinggi dimiliki oleh susu kuda fermentasi SKK, diikuti SKC,

dan SKB (Gambar 4). Terdapat beda nyata tingkat asidifikasi ketiga susu fermentasi tersebut yang ditunjukkan dari notasi. Beda nyata tersebut tampak pada susu fermentasi SKB dengan SKK dan SKC dimana SKB memiliki tingkat asidifikasi terendah. Susu kuda yang belum difermentasi memiliki rasa yang lebih manis daripada susu sapi (Solaroli dkk. 1993; Curadi dkk. 2000; Potocnik dkk. 2011). Selama proses fermentasi, susu kuda mengalami perubahan rasa menjadi asam. Rasa asam ini akibat dari kandungan asam laktat dihasilkan dari fermentasi laktosa oleh bakteri asam laktat dalam kultur *starter*.

Tingkat asidifikasi dipengaruhi oleh kultur *starter* yang digunakan. Kultur *starter* yoghurt yang digunakan pada SKK terdiri atas bakteri *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* dan *L. acidophilus*. Kultur *starter* yang digunakan pada SKB terdiri atas isolat bakteri BC10, sedangkan *starter* kultur yang digunakan pada SKC terdiri atas bakteri *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* dan *L. acidophilus* dan isolat BC10. Kultur *starter* yoghurt memiliki tingkat asidifikasi tertinggi karena terdapat tiga jenis BAL yang bersifat homofermentatif sehingga mampu menghasilkan asam laktat lebih dari 85% dari glukosa. Kultur *starter* SKB memiliki tingkat asidifikasi terendah dikarenakan hanya terdapat satu isolat BAL yang menghasilkan asam laktat. Hasil ini sesuai dengan Oktavia dkk. (2016) dalam penelitiannya yang membandingkan hasil asidifikasi pada yoghurt oleh kultur *starter* strain tunggal (*L. bulgaricus* atau *S. thermophilus*), kultur *starter* campuran (*L. bulgaricus* dan *S. thermophilus*), dan kultur *starter* campuran (*L. bulgaricus*, *S. thermophilus* dan *Bifidobacterium*) diketahui bahwa fermentasi laktosa menjadi asam laktat oleh lebih dari satu strain bakteri lebih cepat menghasilkan asam dan menurunkan pH. Bakteri *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* bekerja dalam simbiosis mutualisme dimana *L. bulgaricus* tumbuh optimal pada pH 5 dapat membantu aktivitas *S. thermophilus* untuk memecah laktosa menjadi asam laktat sehingga dapat menurunkan pH secara optimal daripada saat digunakan sebagai kultur *starter* tunggal.

Sedangkan tingkat asidifikasi kultur *starter* SKC yang terdiri dari empat isolat BAL (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus* dan *L. acidophilus* dan isolat BC10) tidak setinggi tingkat asidifikasi SKK yang hanya terdiri dari tiga isolat BAL dikarenakan bentuk simbiosis antar isolat BAL *starter* yoghurt dan isolat BC10 belum

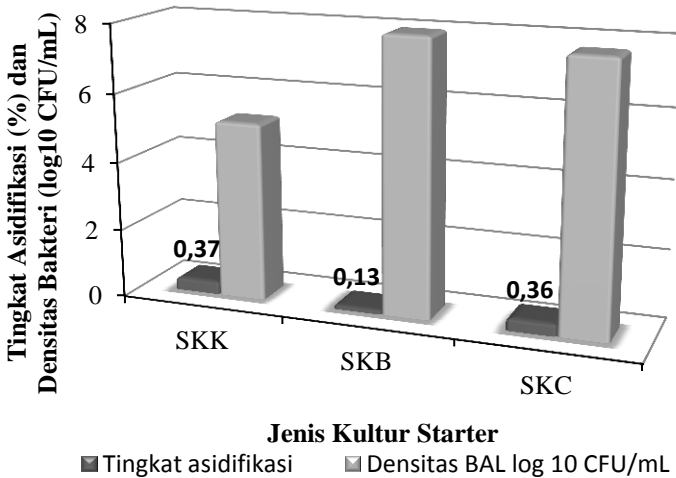
diketahui. Bakteri *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* pada yoghurt bekerja dalam simbiosis mutualisme sehingga asam laktat yang dihasilkan lebih banyak (Oktavia dkk., 2016).

Meskipun hasil asidifikasi terendah adalah pada susu fermentasi yang menggunakan kultur starter SKB (isolat BC10), tetapi densitas sel bakteri tertinggi juga didapatkan pada susu kuda yang difermentasi kultur starter SKB (isolat BC10) sebesar $7,98 \log_{10}$ CFU/mL, sedangkan densitas BAL terendah ditemukan pada susu kuda fermentasi yang difermentasi menggunakan kultur starter SKK (starter kultur yoghurt) yaitu sebesar $5,2 \log_{10}$ CFU/mL (Gambar 4).

Kemampuan BAL dalam menghasilkan asam tidak bergantung pada densitas sel melainkan strain BAL yang terlibat dalam fermentasi (Gambar 4). Suhu inkubasi yang dibutuhkan oleh setiap bakteri dalam kultur starter berbeda. Genus *Streptococcus*, *Lactobacillus*, dan *Pediococcus* termasuk dalam kultur starter termofilik yang memiliki kemampuan tumbuh pada suhu yang lebih tinggi dibandingkan dengan kultur starter mesofilik. Pertumbuhan optimum kultur termofilik adalah pada suhu 40–50° C (Kotze, 2003). Suhu inkubasi yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri asam laktat pada media MRSA dari tiga produk susu fermentasi tersebut adalah 37° C. Bakteri dalam kultur starter yoghurt terdiri atas genus *Streptococcus* dan *Lactobacillus* sehingga pertumbuhan kedua genus bakteri ini kurang optimum pada suhu 37° C yang ditunjukkan dengan densitas sel yang rendah. Berbeda dengan bakteri dalam kultur starter SKB yang memang dari awal proses isolasi telah ditumbuhkan pada suhu 37° C, maka dapat tumbuh optimum pada suhu tersebut.

Penilaian terhadap parameter aroma menunjukkan bahwa SKB memiliki skoring tertinggi yaitu sebesar 5,77. Skor ini menunjukkan bahwa panelis suka pada aroma susu kuda fermentasi SKB. Susu kuda fermentasi SKB memiliki aroma khas seperti kelapa muda. Sedangkan SKK dan SKC beraroma sangat masam. Hal ini didukung oleh hasil pengukuran pH terhadap SKK yang memiliki pH berkisar antara 3,90-3,98 dan SKC yang memiliki pH berkisar antara 4,00-4,13. Sedangkan pH SKB hanya mencapai 5,74-5,78 sehingga bau masamnya tidak tercium kuat. Aroma susu kuda segar seperti jerami dan memiliki *after taste* seperti kelapa (Solaroli dkk. 1993; Curadi dkk. 2000;

Potocnik dkk., 2011). Susu kuda fermentasi yang dihasilkan memiliki aroma seperti kelapa muda. Oleh karena itu, aroma kelapa ini diperkirakan berhubungan dengan *after taste* yang dimiliki susu kuda yang masih segar. Meskipun telah difermentasi, aroma yang seperti kelapa muda masih bertahan paling kuat pada SKB yang memiliki asidifikasi terendah, sehingga susu fermentasi SKB paling diminati dari segi aroma.



Gambar 4. Densitas sel BAL dan tingkat asidifikasi kultur starter pada produk fermentasi susu kuda

Berdasarkan skoring parameter *mouthfeel* dari ketiga susu kuda fermentasi tersebut, SKB mendapatkan rata-rata skoring tertinggi yaitu sebesar 5,32 (agak suka). Meskipun SKB memiliki skoring *mouthfeel* tertinggi, tidak ada beda nyata antar susu kuda fermentasi. Susu kuda fermentasi SKB memiliki tekstur yang lebih kental daripada kedua susu kuda fermentasi yang lain. Tekstur ini merupakan tekstur yang disukai panelis karena mirip dengan tekstur yoghurt. *Mouthfeel* adalah sensasi makanan atau minuman saat di mulut (*chalky, silky, viscous, creamy*). Indikator ini berhubungan erat dengan produksi eksopolisakarida karena isolat yang menghasilkan eksopolisakarida cenderung dapat menjadi pengental alami yang akan meningkatkan konsistensi dan viskositas produk (Madiedo dkk., 2005).

Berdasarkan penilaian panelis secara keseluruhan (*overall*), susu kuda fermentasi yang mendapatkan rata-rata skoring tertinggi adalah SKB yaitu sebesar 5,16. Hal ini juga didukung oleh hasil skoring keempat parameter yaitu SKB unggul dalam semua parameter kecuali warna sehingga isolat BC10 sebagai kultur starter SKB dapat meningkatkan kualitas organoleptik (rasa, aroma, dan *mouthfeel*) susu kuda fermentasi. Oleh karena itu, isolat BC10 merupakan kandidat yang potensial untuk digunakan sebagai kultur starter produk fermentasi susu kuda. Selain itu, keunggulan BC10 sebagai kultur *starter* adalah memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah:

1. Enam isolat BAL telah diisolasi dari susu kuda Sumbawa terfermentasi memiliki aktivitas asidifikasi tercepat setelah 6 jam. Isolat BC10 terpilih sebagai kandidat kultur *starter* karena memiliki kemampuan terbaik dalam aktivitas asidifikasi dan proteolitik, tidak menghasilkan enzim lipolitik, dan tidak memiliki aktivitas hemolisis, serta mampu menghambat *Eschericia coli* ATCC 25922.
2. Kultur *starter* dari isolat BC10 (SKB) dapat meningkatkan kualitas organoleptik susu kuda terfermentasi khususnya parameter aroma.

5.2 Saran

Hal-hal yang dapat disarankan untuk penelitian selanjutnya adalah:

1. Optimasi kondisi, media, dan adaptasi isolat pada uji asidifikasi perlu dilakukan untuk mempercepat asidifikasi.
2. Uji kuantitatif produksi EPS dan optimasi media yang digunakan pada uji kualitatif produksi EPS perlu dilakukan untuk menginduksi produksi EPS.
3. Persentase kultur starter isolat BC10 saat diaplikasikan ke susu kuda fermentasi sebaiknya ditambah sehingga tingkat asidifikasi dapat dipercepat.
4. Identifikasi isolat BC10 berdasarkan sekuen 16S rDNA perlu dilakukan untuk mengetahui nama spesiesnya.
5. Uji kepekaan terhadap jenis-jenis antibiotik lainnya perlu dilakukan untuk memastikan tingkat keamanannya.
6. Analisis kualitas nutrisi susu fermentasi untuk mengetahui pengaruh fermentasi susu kuda terhadap nutrisi yang dikandungnya.
7. Analisis konsorsium beberapa isolat bakteri yang berpotensi sebagai kultur starter perlu dilakukan.
8. Konsentrasi CFS untuk uji antibakteri perlu dipekatkan, dan durasi inkubasinya juga perlu ditambah untuk optimalisasi produksi senyawa antibakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Apolonio, C.M.A.R., Bemquerer M.P., Santoro M.M., Pinto S.Q., Oliveira J.S., Santos K.V. and Farias L.M.. 2007. Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by *Eikenella corrodens* A.C.M. *Journal of Applied Microbiology*. 104: 508–514.
- Aravindan, R., Anbumathi P., and Viruthagiri T. 2007. Lipase applications in food industry. *Indian Journal of Biotechnology*. 6(2):141–158.
- Axelsson, L. 1998. **Lactic acid bacteria: Classification and physiology**. In **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**, 3rd ed. In: Salminen, S., Wright, A.V., Ouwehand, A., Eds. Marcel Dekker, New York.
- Ayad, S.N., El-Sadek N., Metwaly H., and El-Soda M., 2004. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiology*. 21(6):715–725.
- Becker, A., Katzen F., Puhler A., and Lelpi L. 1998. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50(2):145–152.
- Capozzi, V., Russo P., Dueñas M.T., López P., Spano G, 2012. Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2(966): 1383-1394.
- Christensen, J.E., Dudley E.G., Pederson J.A., Steelz L.J. 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76: 217-246.
- Cintas, P., Casaus, Holo H., Hernandez P. E., Nes I. F., and Avarstein L. S. H. 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *Journal of Bacteriology*. 180(8): 1988–1994.
- Civardi, G., Cattaneo T.M.P., Orlandi M., Curadi M.C. & Giangiacomo R. 2003. Yoghurt fermentation trials utilizing mare milk: comparison with cow milk. *Italian Journal of Animal Science*. 2(1): 598-600.
- Condon. 1983. Aerobic metabolism of lactic acid bacteria. *Irish Journal of Food Science and Technology*. 7(9): 5–25.

- Courtin, C.M., Delcour J.A.L., 2002. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *Journal of Cereal Science*. 35(3): 225-243.
- Csapo, J., Csapo-Kiss Z.S., Salamon S.Z., Loki K. 2009. Composition of Mare's Colostrum and Milk ii. Protein content, Amino Acid Composition and Contents of Macro- and Micro-elements. *Acta Universitatis Sapientiae Alimentaria*. 2(6): 133-148.
- Csapo, J., Stefler J., Martin T.G., Makray S., Csapo-Kiss Z.S., 1995. Composition of mares' colostrum and milk. Fat content, fatty acid composition and vitamin content. *International Dairy Journal*. 2(5): 393-402.
- Csapo-Kiss, Z.S., Stefler J., Martin T.G., Makray S., Csapo J. 1995. Composition of mares' colostrum and milk. Protein content, amino acid composition and contents of macro- and micro-elements. *International Dairy Journal*. 2(5): 403-415.
- Curadi, M.C., Orlandi M., Lucenti P., Giampietro P.G. 2000. Use of mare milk in pediatric allergology. *Recent Progress in Animal Production Science*. 2: 647-649.
- Daeschel. Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. in *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, pp. 63-91, Academic Press, New York, NY, USA, 1993.
- Danielsen, M., and Wind A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*. 82 (1) :1-11.
- Dankow, R., Pikul J., Osten S.N., Treichert J. 2012. Characteristics and salubrious properties of mare milk. *Nauka Przyroda Technologie*. 3(6): 1-12.
- Dewi, I.G.A.K., Putra I.G.N.A.D., Sujaya I.N. 2010. **Pengembangan Starter dari *Lactobacillus* spp. Isolat Susu Kuda Sumbawa untuk Pembuatan Susu Terfermentasi.** Skripsi Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana. Bali
- Di Cagno, R., Tamborrino A., Gallo G., Leone C., De Angelis M., Faccia M., Amirante P., Gobbetti M. 2004. Uses of mares' milk in manufacture of fermented milks. *International Dairy Journal*. 1(14): 767-775.
- Dinoto, A., Sugiyono S, Agustinus J.N., and Rita D.R., 2014. Keanekaragaman bakteri penghasil eksopolisakarida asal

saluran cerna manusia
(<https://www.researchgate.net/publication/265068484>).

Diakses 23 Mei 2019.

Ewa, J., Ewa W., Tomasz D., Renata P.F. 2017. Nutritional Value and Health-Promoting Properties of Mare's Milk – a Review. *Journal Animal Science*. 62(12): 511-518.

Fortune, A., Kwaku T.D., Charles P., Lene J.. 2014. The use of lactic acid bacteria starter culture in the production of nunu, a spontaneously fermented milk product in Ghana. *International Journal of Food Science*. 4(6):1-11.

Gobbetti, M., Lanciotti, R., De Angelis, M., Corbo, M.R., Massini, R., Fox, P.F. 1999. Study of the effects of temperature, pH and NaCl on the peptidase activities of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) by quadratic response surface methodology. *International Dairy Journal* 9:865–875.

Granato, D. dkk. 2010. Sensory evaluation and physicochemical optimisation of soy-based desserts using response surface methodology. *Food Chemistry*. 6(121): 899-906.

Halder, D., Manisha M., Shiv S.C., Nishith K.P. and Shyamapada M. 2017. Indigenous Probiotic *Lactobacillus* isolates presenting antibiotic like activity against human pathogenic bacteria. *Biomedicine*. 5 (31): 1-1.

James, W. 2015. The antibiotic sensitivity discs. **Atlas Medical**. Cambridge.

Jin, Y.L., Ai H.L., Cheng J., Wu M.Y. 2009. First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China. *Veterinary Microbiology*. 136 (3-4): 314-320.

Karagozlu, C., and Kavas, G. 2000. Alkollü fermente süt içecekleri: kefir ve kimizin özellikleri ile insan beslenmesindeki önemi. *Dunya Food*. 6(7): 86-93.

Khalid, N.M., Marth E.H. 1990. Lactobacilli—their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: a review. *Journal Dairy Science*. 5 (73): 2669–2684.

Khalid. 2011. An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Bioscience*. 1 (3): 1-13.

Kim, Y., Oh S., and Kim S. H. 2009. Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.

Biochemical and Biophysical Research Communications.
379(2): 324–329.

- Kinik, O., Akalin, S., & Gonce, S. 2000. A research on Koumiss production and its properties. *Journal of Food*. 25(5): 379-384.
- Kotze, A. D. 2003. *The Survival of Yeasts and Probiotics as Adjunct Starters in Cheese*. Fakultas Ilmu Alam dan Pertanian. University of the Free State, Bloemfontein.
- Kumar, M.A. and Murugalatha N. 2012. Isolation of *Lactobacillus plantarum* from cow milk and screening for the presence of sugar alcohol producing gene. *Journal Microbiology*. 4(6): 16–22.
- Liu, M., Bayjanov, Renckens J., Nauta B., Roland A. J. 2010. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: A genomic comparison. *BMC Genome*. 11(36):1–15.
- Madiedo, R.P., Reyes de los, Gavilan C.G. 2005. Methods for the screening, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal Dairy Science*. 2 (88) :843–856.
- Mahmoudi, F., Hadadji M., Guessas B., Kihal M. 2013. Identification and physiological properties of *bifidobacterium* strains isolated from different origin. *Journal of food Science and Engineering*. 3(3): 196-206.
- Malacarne, M., Martuzzi F., Summer A., Mariani P. 2002. Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. *International Dairy Journal*. 4(12): 869–877.
- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miarisa, C., Kalantzopoulou, G., Potb, B. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*. 16: 189–199.
- Martuzzi, F., Tirelli A., Sunimer A., Catalano A.L., Mariani P. 2000. Distribution of the serum seroproteins of the first two months of lactation in the Italian Sella mares. *Rivista Societa Italiana di Ippologia*. 2(6): 21–27.
- Mathur, S., Singh R. 2005. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria. *Internatinal Journal Food Microbiology* 105:281–295.
- Monika, S., Vijay K., Anila K., Kunzes A., Bhalla T.C. 2017. Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria From

- Traditional Pickles of Himachal Pradesh, India. *Journal Food Science Technology*. 54(7): 1945–1952.
- Nawaz, F., Sadia M., Shakira G., Tahir S.S., Naseem R., Imran M. 2016. Isolation, characterization and application of indigenous lactic acid bacteria in milk fermentation. *International Journal of Biosciences*. 9(6): 415-430.
- Nurtazin, S., Ishii S., Hoshino B.. 2015. Mare's Milk and kumys. *KazNU Bulletin Ecology series* 1(1): 123-131.
- Oktavia, H., Lilik E.R, Djalal R. 2016. Evaluation of physicochemical properties and exopolysaccharides production of single culture and mixed culture in set yoghurt. *Jurnal Pembangunan Alam Lestari*. 7(1): 52-59.
- Ozden, A. 2008. Other fermented dairy products: bioyogurt-probiotic yogurt. *Guncel Gastroenteroloji*. 12(3): 169-181.
- Ozkaya, F. D., Xanthopoulos V. , Tunail N. and Tzanetaki E.L. 2001. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 861-870.
- Padmavathi, T., Bhargavi R., Priyanka P., Rao N.N, Ranganath P., Pogakul V. 2018. Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 16(2): 357-362.
- Park and Marth E. H., 1972. Behaviour of *Salmonella typhimurium* in susu skim during fermentation by lactic acid bacteria. *Journal of Milk and Food Technology*. 35: 482-488.
- Patel and Prajapati J. B. 2013. "Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria." *Advances in Dairy Research*. 1: 107-115.
- Pietrzak, F.R., Tomczynski R., Swistowska A., Borej-szo Z., Kokoszko E., Smoczynska K. 2009. The effect of mare's breed on the fatty acid composition of milk fat. *Czech Journal of Animal Science*. 5(54): 403-407.
- Pilar, C.M., Samuel A., Karola B., Trinidad M., Ananias P., Jorge B.V. 2008. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food and Bioprocess Technology*. 1(1): 43-63.

- Potocnik, K., Gantner V., Kuterovac K., Cividini A. 2011. Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species. *Mljekarstvo*. 61: 107–113.
- Racah, R. C., Baker, J. M., Degenstein & Mulnix E. J. 1979. Potential application of microbial antagonism to extend storage ability of a flesh type food. *Journal of Food Science*. 44: 43–46.
- Rahmati, F. 2017. Characterization of *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Saccharomyces* isolated from Iranian traditional dairy products for potential sources of starter cultures. *American Institute of Mathematical Science Microbiology*. 3(4): 815–825.
- Ramakrishnan, B., Balakrishnan A. K., Rai B., Narayan & Halami P.M. 2012. Concomitant production of lipase, protease and enterocin by *Enterococcus faecium* NCIM5363 and *Enterococcus durans* NCIM5427 isolated from fish processing waste. *International Aquatic Research*. 4(14): 157–165.
- Rasha, H., Bassyouni W.S., Abdel-all , Mostafa G., Fadl S.A. & Zeinat K. 2012. Characterization of lactic acid bacteria isolated from dairy products in egypt as a probiotic. *Life Science Journal*. 9(4): 2924–2933.
- Ravindra, P. 2015. **Advances in Bioprocess Technology**. Springer. Kotakinabalu
- Reyhan, I., & Ufuk V.E. 2008. A Research about viable *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* numbers in the market yoghurts. *World Journal of Dairy & Food Sciences*. 3(1): 25–28.
- Salamon, R., Salamon S.Z., Csapo-Kiss Z.S. and Csapo J. 2009. Composition of mare's colostrum and milk I. Fat content, fatty acid composition and vitamin content. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*. 8(2): 119–131.
- Savijoki, K., Ingmer H., Varmanen P. 2006. Proteolytic system of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71: 394–406.
- Shangpliang, S. S., Ranjita R. and Jyoti P., Tamang. 2017. Some technological properties of lactic acid bacteria isolated from

- dahi and datshi, naturally fermented milk products of Bhutan. *Frontiers in Microbiology*. 8(116): 1-6.
- Sharma, P., Santosh A., Sudhir K.T., Pawas G. 2018. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* sp. isolated from commercial probiotic product by e-test strip method. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*. 7(4): 3499-3517
- Sheng, Q. and Fang X. 2009. Bioactive Components in Mare Milk. In: Park Y.W. (ed.): **Bioactive Components in Milk and Dairy Products**. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Sierra, G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*. 23(1): 15-22.
- Smith & Palumbo S. A. 1983. Use of starter cultures in meat. *Journal of Food Protection*. 46: 997-1006.
- Solaroli, G., Pagliarini E., Peri C. 1993. Compositional and nutritional quality of mare's milk. *Italian Journal of Food Science*. 5: 3-10.
- Souza, J.V., & Francesca S.D. 2017. Protective, technological, and functional properties of select autochthonous lactic acid bacteria from goat dairy products. *Current Opinion in Food Science*. 13: 1-9
- Trinanda, M. 2015. **Studi aktivitas bakteri asam laktat (*L. plantarum* dan *L. fermentum*) terhadap kadar protein Melalui penambahan tepung kedelai pada bubur instan terfermentasi**. Skripsi Jurusan Pendidikan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Yogyakarta. Yogyakarta
- Tsakalidou, M. E., Kabarakı E. 1994. The combined use of whole-cell protein extracts for the identification (SDS-PAGE) and enzyme activity screening of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek dairy products. *Systematic and Applied Microbiology*. 17 (3):444-458.
- Ustun, C. 2009. An ancient turkish beverage: Kimiz (Koumiss). *Türklük Bilimi Araştırmaları*. 6 (26): 247-255.
- Vijayaraghavan, P., Samuel G.P., Gnana P.V. 2013. A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresol green dye. *Journal Biochemical Technology*. 4(3): 628-630.

Wouters, J.T.M., Ayad E.H.E., Hugenholtz J., and Smit G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*. 12(2-3): 91-109.

Yaygin, H. 1992. **Koumiss and its properties**. Antalya: Yeni Press.

Zareian, M., Afshin E., Fatimah A.B., Abdul K.S.M., Bitu F Safuan M., Nazamid S. 2012. A glutamic acid-producing lactic acid bacteria isolated from malaysian fermented foods. *International Journal of Molecular Science*. 13 :5482-5497

LAMPIRAN

Lampiran 1. Karakteristik bakteri *indigenous*

LT1. Karakter fenotip bakteri *indigenous*

Karakter	Isolat bakteri <i>indigenous</i>							
	BC5	BC7	BC8	BC9	BC10	BC11	DB2	DB3
Bentuk Sel	+	+	+	+	+	+	+	+
Batang								
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+
positif								
Endospora								
Positif	+	-	+	+	+	+	-	-
Uji katalase								
Negatif	+	+	+	+	+	+	+	+
Uji KOH								
Negatif	+	+	+	+	+	+	+	+
Uji Oksidase								
Positif	+	+	+	+	+	+	+	+
Negatif								
Lanjutan (LT 1):								
Karakter	DB4	DB6	DB7	DB9	DB11	DC4	DC10	DC13
Bentuk Sel	+	+	+	+	+	+	+	+
Batang								
Cat Gram								
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+
positif								
Endospora								
Positif	-	-	-	-	-	-	-	-
Uji katalase								
Negatif	+	+	+	+	+	+	+	+
Uji KOH								
Negatif	+	+	+	+	+	+	+	+
Uji Oksidase								
Positif	-	-	-	-	-	-	-	-
Negatif								

Keterangan : + : iya
 - : tidak

Lampiran 2. Hasil ANOVA Skrining kuantitatif (Uji asidifikasi)

LT 2. Hasil ANOVA skrining kuantitatif

Descriptives

Delta pH jam ke-6

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
TI	3	.1000	.00000	.00000	.1000	.1000	.10	.10
DB7	3	.4133	.02517	.01453	.3508	.4758	.39	.44
BC10	3	.6600	.01732	.01000	.6170	.7030	.65	.68
DC4	3	.4200	.03000	.01732	.3455	.4945	.39	.45
BC9	3	.3967	.00577	.00333	.3823	.4110	.39	.40
DC10	3	.4233	.02887	.01667	.3516	.4950	.39	.44
BC7	3	.4500	.04359	.02517	.3417	.5583	.42	.50
BC8	3	.4000	.00000	.00000	.4000	.4000	.40	.40
Total	24	.4079	.14617	.02984	.3462	.4696	.10	.68

Test of Homogeneity of Variances

Delta pH jam ke-6

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.067	7	16	.010

ANOVA

Delta pH jam ke-6

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.482	7	.069	119.800	.000
Within Groups	.009	16	.001		
Total	.491	23			

Keputusan: ($p < 0,05$) terdapat pengaruh nyata perbedaan isolat terhadap konsentrasi tingkat asidifikasi

LT 3. Hasil uji lanjutan Tukey skrining kuantitatif

Delta pH jam ke-6

Tukey HSD

Isolat	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
TI	3	.1000		
BC9	3		.3967	
BC8	3		.4000	
DB7	3		.4133	
DC4	3		.4200	
DC10	3		.4233	
BC7	3		.4500	
BC10	3			.6600
Sig.		1.000	.185	1.000

Lampiran 3. Hasil Uji Statistik Uji Proteolitik
LT 4. Hasil Uji ANOVA uji proteolitik

Descriptives

Zona proteolitik	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Tanpa Inokulum	4		
DB7	4	2.1275	.10210	.05105	1.9650	2.2900	2.00	2.25
BC10	4	2.2850	.27887	.13943	1.8413	2.7287	2.00	2.63
DC4	4	1.9700	.15895	.07948	1.7171	2.2229	1.75	2.13
BC9	4	2.3775	.26850	.13425	1.9503	2.8047	2.13	2.75
DC10	4	2.1600	.15895	.07948	1.9071	2.4129	2.00	2.38
BC7	4	2.0650	.07506	.03753	1.9456	2.1844	2.00	2.13
BC8	4	2.0350	.12014	.06007	1.8438	2.2262	1.88	2.13
Total	32	1.8775	.74704	.13206	1.6082	2.1468	.00	2.75

Test of Homogeneity of Variances

Zona proteolitik				
Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
2.459	7	24	.047	

ANOVA

Zona proteolitik					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16.608	7	2.373	82.206	.000
Within Groups	.693	24	.029		
Total	17.300	31			

Keputusan. ($p < 0,05$) terdapat pengaruh nyata perbedaan isolat terhadap konsentrasi tingkat asidifikasi

ET 5. Hasil uji lanjutan Tukey uji proteolitik

Zona proteolitik

Tukey HSD ^a				
Isolat	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Tanpa Inokulum	4	.0000		
DC4	4		1.9700	
BC8	4		2.0350	2.0350
BC7	4		2.0650	2.0650
DB7	4		2.1275	2.1275
DC10	4		2.1600	2.1600
BC10	4		2.2850	2.2850
BC9	4			2.3775
Sig.		1.000	.196	.129

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

Lampiran 4. Hasil Statistik Uji Sensitivitas Antibiotik

LT 6. Hasil uji ANOVA sensitivitas antibiotik

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Zona Hambat Antibiotik Kanamycin	Between Groups	1885,107	7	269,301	364,185	,000
	Within Groups	11,092	15	,739		
	Total	1896,198	22			
Zona Hambat Antibiotik Erythromycin	Between Groups	894,244	7	127,749	177,519	,000
	Within Groups	10,795	15	,720		
	Total	905,039	22			
Zona Hambat Antibiotik Trimethoprim	Between Groups	2052,028	7	293,147	3149,999	,000
	Within Groups	1,489	16	,093		
	Total	2053,517	23			
Zona Hambat Antibiotik Cinoxacin	Between Groups	1391,191	7	198,742	342,965	,000
	Within Groups	8,692	15	,579		
	Total	1399,883	22			

Keputusan: ($p < 0,05$) terdapat perbedaan nyata semua antibiotik dalam menghambat isolat bakteri BAL

LT 7. Uji lanjutan Tukey sensitivitas antibiotik

Zona Hambat Antibiotik Kanamycin					
Tukey HSD ^{a,b}					
Isolat	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Kontrol negatif	3	,0000			
DB7	3	,0000			
BC9	3	,0000			
DC10	3	,0000			
BC10	3		4,5533		
BC7	3			17,9000	
BC8	3			19,2733	
DC4	2				22,4000
Sig.		1,000	1,000	,572	1,000

Zona Hambat Antibiotik Erythromycin

Tukey HSD^{a,b}

Isolat	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Kontrol negatif	3	,0000		
DB7	3		16,4933	
DC10	3		17,9067	17,9067
BC10	3		18,2733	18,2733
BC7	3		18,4367	18,4367
BC8	3		18,5167	18,5167
BC9	3			19,0800
DC4	2			20,1200
Sig.		1,000	,158	,101

Zona Hambat Antibiotik Trimethoprim

Tukey HSD^a

Isolat	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Kontrol negatif	3	,0000			
BC10	3	,0000			
DC4	3	,0000			
DC10	3		18,3067		
DB7	3		18,3667	18,3667	
BC7	3		18,7200	18,7200	
BC8	3			19,1967	
BC9	3				20,6500
Sig.		1,000	,711	,064	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Zona Hambat Antibiotik Cinoxacin

Tukey HSD^{a,b}

Isolat	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Kontrol negatif	3	,0000			
BC10	3	,0000			
DC10	3	,0000			
DB7	3		2,4833		
DC4	2			5,4000	
BC9	3			5,4567	
BC7	3				18,7100
BC8	3				19,5333
Sig.		1,000	1,000	1,000	,891

Lampiran 5. Hasil Uji Statistik Aktivitas Antibakteri
 LT 8. Hasil Uji ANOVA aktivitas antibakteri

		Descriptives							
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
S. typhi	Kontrol Negatif	3	.0000	.00000	.0000	.0000	.0000	.00	.00
	Kontrol Positif	3	13,3833	.74043	.4274	11,5440	15,2227	12,70	14,17
	DB7	3	.0000	.00000	.0000	.0000	.0000	.00	.00
	BC10	3	.0000	.00000	.0000	.0000	.0000	.00	.00
	DC4	3	.0000	.00000	.0000	.0000	.0000	.00	.00
	BC9	3	.0000	.00000	.0000	.0000	.0000	.00	.00
	DC10	3	.0000	.00000	.0000	.0000	.0000	.00	.00
	BC7	3	.0000	.00000	.0000	.0000	.0000	.00	.00
	BC8	3	9,8767	3,44137	1,98688	1,3278	18,4235	7,28	13,78
	Total	27	2,5844	5,09308	.98016	.5697	4,5992	.00	14,17
S. aureus	Kontrol Negatif	3	.0000	.00000	.0000	.0000	.0000	.00	.00
	Kontrol Positif	3	10,3967	3,21684	1,85724	2,4056	18,3877	8,46	14,11
	DB7	3	.0000	.00000	.0000	.0000	.0000	.00	.00
	BC10	3	.0000	.00000	.0000	.0000	.0000	.00	.00
	DC4	3	.0000	.00000	.0000	.0000	.0000	.00	.00
	BC9	3	.0000	.00000	.0000	.0000	.0000	.00	.00
	DC10	3	.0000	.00000	.0000	.0000	.0000	.00	.00
	BC7	3	.0000	.00000	.0000	.0000	.0000	.00	.00
	BC8	3	7,1400	.84161	.48590	5,0493	9,2307	6,27	7,95
	Total	27	1,9485	3,90666	.75184	.4031	3,4939	.00	14,11

B. cereus	Kontrol Negatif	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	Kontrol Positif	3	7,3033	1,39105	,80313	3,8478	10,7589	6,13	8,84
	DB7	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	BC10	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	DC4	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	BC9	3	4,7467	,17388	,10039	4,3147	5,1786	4,55	4,88
	DC10	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	BC7	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	BC8	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	Total	27	1,3389	2,65401	,51076	,2890	2,3888	,00	8,84
E. coli	Kontrol Negatif	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	Kontrol Positif	3	12,6267	1,09929	,63467	9,8959	15,3574	11,75	13,86
	DB7	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	BC10	3	,8800	1,52420	,88000	-2,9063	4,6663	,00	2,64
	DC4	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	BC9	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	DC10	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	BC7	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	BC8	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	Total	27	1,5007	4,05194	,77980	-,1022	3,1036	,00	13,86

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
S. typhi	Between Groups	649,644	8	81,205	58,981	,000
	Within Groups	24,783	18	1,377		
	Total	674,426	26			
S. aureus	Between Groups	374,699	8	46,837	38,126	,000
	Within Groups	22,113	18	1,228		
	Total	396,812	26			
B. cereus	Between Groups	179,208	8	22,401	102,586	,000
	Within Groups	3,931	18	,218		
	Total	183,138	26			
E. coli	Between Groups	419,811	8	52,476	133,731	,000
	Within Groups	7,063	18	,392		
	Total	426,875	26			

Keputusan: ($p < 0,05$) terdapat perbedaan nyata semua isolat bakteri BAL dalam menghambat bakteri indikator

LT 9. Uji lanjutan Tukey aktivitas antimikroba

S. typhi

Tukey HSD*

Isolat	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Kontrol Negatif	3	,0000		
DB7	3	,0000		
BC10	3	,0000		
DC4	3	,0000		
BC9	3	,0000		
DC10	3	,0000		
BC7	3	,0000		
BC8	3		9,8767	
Kontrol Positif	3			13,3833
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

S. aureus

Tukey HSD*

Isolat	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Kontrol Negatif	3	,0000		
DB7	3	,0000		
BC10	3	,0000		
DC4	3	,0000		
BC9	3	,0000		
DC10	3	,0000		
BC7	3	,0000		
BC8	3		7,1400	
Kontrol Positif	3			10,3967
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

B. cereus

Tukey HSD*

Isolat	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Kontrol Negatif	3	,0000		
DB7	3	,0000		
BC10	3	,0000		
DC4	3	,0000		
DC10	3	,0000		
BC7	3	,0000		
BC8	3	,0000		
BC9	3		4,7467	
Kontrol Positif	3			7,3033
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

E.coli

Tukey HSD*

Isolat	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Kontrol Negatif	3	,0000	
DB7	3	,0000	
DC4	3	,0000	
BC9	3	,0000	
DC10	3	,0000	
BC7	3	,0000	
BC8	3	,0000	
BC10	3	,8800	
Kontrol Positif	3		12,6267
Sig.		,728	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Lampiran 6. Hasil Uji Statistik Organoleptik
LT 10. Hasil uji normalitas data organoleptik

		Tests of Normality					
Starter kultur		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Warna	SKK	,376	31	,000	,776	31	,000
	SKB	,374	31	,000	,772	31	,000
	SKC	,350	31	,000	,813	31	,000
Rasa	SKK	,265	31	,000	,864	31	,001
	SKB	,226	31	,000	,910	31	,013
	SKC	,176	31	,016	,927	31	,037
Aroma	SKK	,236	31	,000	,895	31	,006
	SKB	,288	31	,000	,828	31	,000
	SKC	,176	31	,015	,939	31	,077
Mouthfeel	SKK	,263	31	,000	,883	31	,003
	SKB	,276	31	,000	,883	31	,003
	SKC	,235	31	,000	,891	31	,004
Overall	SKK	,230	31	,000	,876	31	,002
	SKB	,230	31	,000	,888	31	,004
	SKC	,194	31	,004	,871	31	,001

($p < 0,05$) data tidak terdistribusi normal

($p > 0,05$) data berdistribusi normal

Keputusan:

Terdapat data yang nilai signifikansinya kurang dari 0,05 sehingga tidak bisa diuji anova karena ada data penelitian yang tidak berdistribusi normal, tapi diuji kruskal wallis

LT 11. Uji Kruskal Wallis organoleptik

Ranks			
	Starter kultur	N	Mean Rank
Warna	SKK	31	48,87
	SKB	31	46,47
	SKC	31	45,66
	Total	93	
Rasa	SKK	31	47,19
	SKB	31	51,73
	SKC	31	42,08
	Total	93	
Aroma	SKK	31	45,39
	SKB	31	59,61
	SKC	31	36,00
	Total	93	
Mouthfeel	SKK	31	44,40
	SKB	31	53,05
	SKC	31	43,55
	Total	93	
Overall	SKK	31	49,61
	SKB	31	52,18
	SKC	31	39,21
	Total	93	

Test Statistics ^{a,b}					
	Warna	Rasa	Aroma	Mouthfeel	Overall
Chi-Square	,306	2,058	12,817	2,556	4,257
df	2	2	2	2	2
Asymp. Sig.	,858	,357	,002	,279	,119

Keputusan:

(Asymp.Sig>0,05) tidak ada perbedaan warna, rasa, mouthfeel, dan overlall dari ketiga kultur starter

(Asymp.Sig<0,05) ada perbedaan aroma antara SKK, SKB, dan SKC

LT 12. Uji lanjutan Tukey organoleptik

Warna				
Tukey HSD ^a				
Perlakuan Fermentasi	Susu	Kuda	N	Subset for alpha = 0.05
				1
SKB			31	5,6452
SKC			31	5,6452
SKK			31	5,7419
Sig.				,925

Rasa				
Tukey HSD ^a				
Perlakuan Fermentasi	Susu	Kuda	N	Subset for alpha = 0.05
				1
SKC			31	4,3548
SKK			31	4,5161
SKB			31	4,9355
Sig.				,355

Aroma					
Tukey HSD ^a					
Perlakuan Fermentasi	Susu	Kuda	N	Subset for alpha = 0.05	
				1	2
SKC			31	4,7097	
SKK			31	5,0968	5,0968
SKB			31		5,7742
Sig.				,429	,080

Mouthfeel				
Tukey HSD ^a				
Perlakuan Fermentasi	Susu	Kuda	N	Subset for alpha = 0.05
				1
SKK			31	4,8387
SKC			31	4,8710
SKB			31	5,3226
Sig.				,349

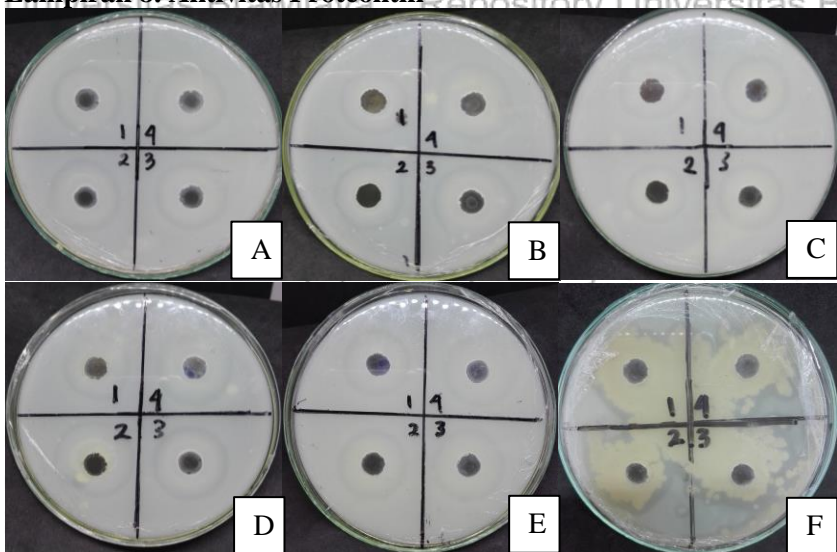
Overall				
Tukey HSD ^a				
Perlakuan Fermentasi	Susu	Kuda	N	Subset for alpha = 0.05
				1
SKC			31	4,4839
SKK			31	4,9677
SKB			31	5,1613
Sig.				,165

Lampiran 7. Aktivitas Asidifikasi Susu Skim



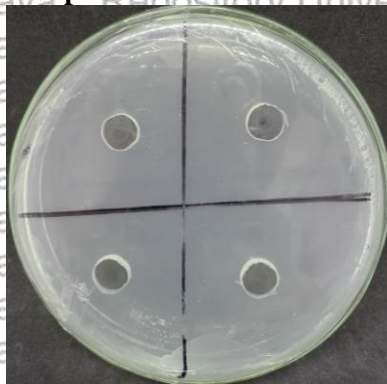
LG 1. Aktivitas asidifikasi susu skim setelah 24 jam

Lampiran 8. Aktivitas Proteolitik



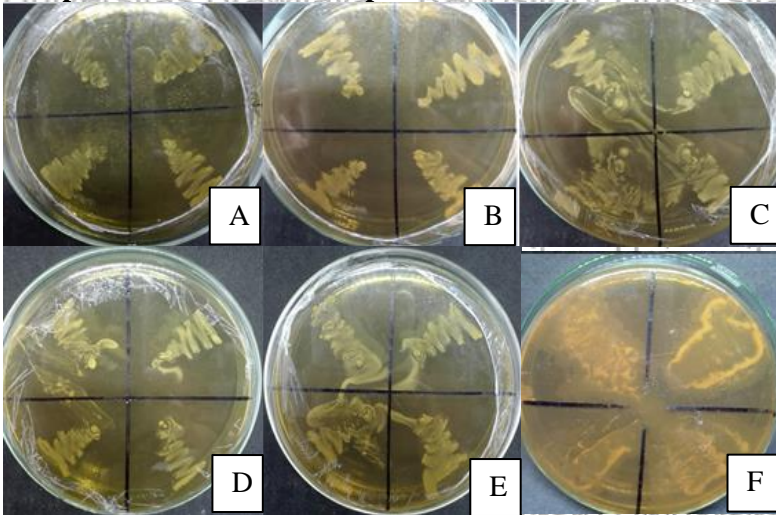
LG 2. Aktivitas proteolitik bakteri asam laktat terpilih. (A) DB7 (B) BC10 (C) DC4 (D) BC9 (E) DC10 (F) BC7

Lampiran 9. Aktivitas lipolitik



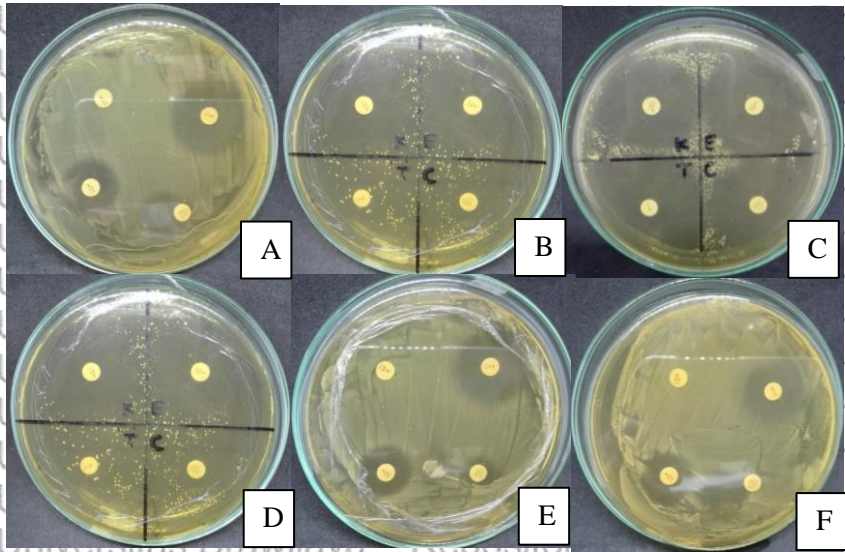
LG 3. Aktivitas lipolitik bakteri asam laktat terpilih

Lampiran 10. Produksi Ekspolisakarida



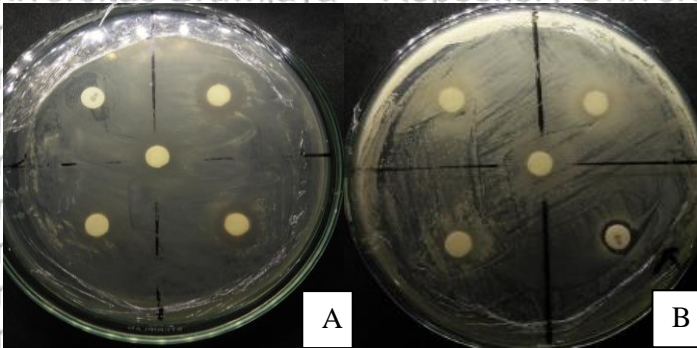
LG 4. Produksi ekspolisakarida (kualitatif) oleh bakteri asam laktat terpilih (A) DB7 (B) BC10 (C) DC4 (D) BC9 (E) DC10 (F) BC7

Lampiran 11. Sensitivitas antibiotik



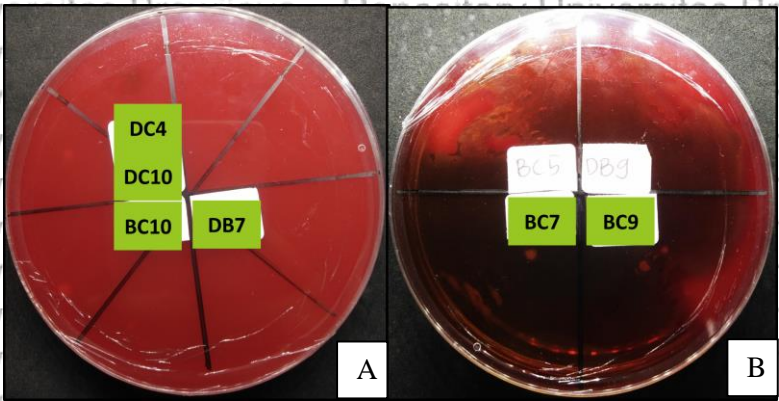
LG 5. Sensitivitas antibiotik bakteri asam laktat terpilih (A) DB7 (B) BC10 (C) DC4 (D) BC9 (E) DC10 (F) BC7

Lampiran 12. Aktivitas antibakteri



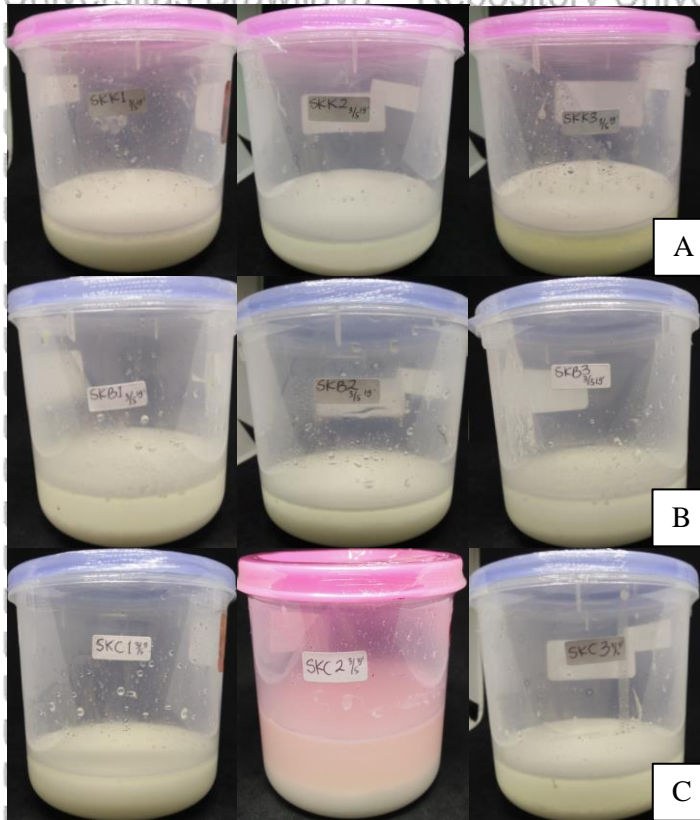
LG 6. Aktivitas antibakteri bakteri asam laktat terpilih (A) BC9
(B) BC10

Lampiran 13. Aktivitas Hemolisis



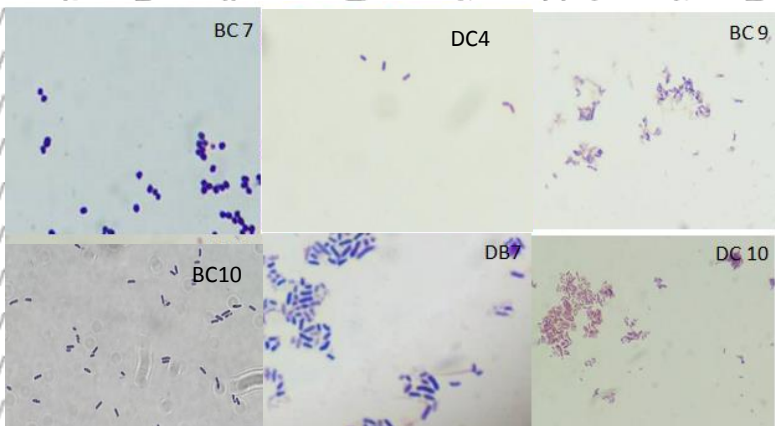
LG 7. Aktivitas hemolisis bakteri asam laktat terpilih (A) Gama hemolisis (B) Beta hemolisis

Lampiran 14. Fermentasi Susu Kuda



LG 8. Fermentasi susu kuda (A) SKK (Starter Kultur Yoghurt)
(B) SKB (Starter Kultur BC10) (C) SKC (Starter Kultur Campuran)

Lampiran 15. Pewarnaan Gram Isolat terpilih



LG 9. Pewarnaan Gram isolat terpilih

Lampiran 16. Uji Organoleptik (Hedonik)

LT 13. Data panelis uji organoleptik

No.	Nama Panelis	Jenis Kelamin (L/P)	Umur
1	I Dewa Gede Kaniskha	L	19
2	Setyo Dwi	L	20
3	Aulia Aibaqis	L	18
4	Rekka D.A	L	19
5	Satria Cahya F.	L	21
6	Mas Adam L.C.	L	20
7	M. Athoillah	L	20
8	Gihesel	L	20
9	Ghora Eka M.S	L	19
10	Yogi Adhi N.	L	20
11	Chasan Mirza W.	L	21
12	Aditya Ragil S.	L	22
13	Niky Verlinsia	P	18
14	Farih Nadya Salsabila	P	18
15	Alif Annisa R.	P	18
16	Aulia N.A	P	21
17	LathifatuZZahro	P	21
18	Naurah Awnez Qonitah	P	22
19	Ananti Wulan Wardhani	P	23
20	Tika Faradina	P	22
21	Aghnia Nuri F.	P	22
22	Maurizka Diva S.	P	19
23	Sri Astutiningsih	P	22
24	Diah Lilis	P	21
25	Rahayu Kurniawati	P	21
26	Luluk Sa'diyatul M.	P	21
27	Qathrunnada Salsabila	P	21
28	Yuyun Indriani K.S.	P	18
29	Winni Zuraida	P	19
30	Mar'atus Sholicha	P	20
31	Nirma Ulifa Janata	P	22

LT 14. Skoring organoleptik (hedonik) susu kuda fermentasi

Panelis	Parameter penilaian														
	Warna			Rasa			Aroma			Mouthfeel			Overall		
	SKK	SKB	SKC	SKK	SKB	SKC	SKK	SKB	SKC	SKK	SKB	SKC	SKK	SKB	SKC
1	7	7	7	7	5	6	7	6	5	7	6	5	7	6	6
2	6	6	6	3	5	2	5	5	4	3	3	3	3	5	3
3	6	6	6	6	6	3	6	7	4	4	4	4	5	6	3
4	6	6	6	6	5	6	4	6	4	4	6	4	6	5	5
5	6	6	6	6	4	2	6	4	5	6	4	3	6	4	3
6	6	6	6	6	7	6	6	7	6	7	7	7	6	7	6
7	4	4	4	5	3	4	4	5	5	4	4	4	5	3	4
8	6	6	6	7	6	7	6	5	6	6	6	6	6	5	6
9	6	3	5	3	4	3	6	6	5	4	5	5	4	5	3
10	6	6	6	7	5	5	7	7	7	7	5	5	7	6	6
11	6	6	6	6	7	6	7	6	7	6	6	6	6	7	6
12	5	6	5	2	6	3	5	6	5	1	6	2	1	5	2
13	6	6	6	4	4	5	3	6	3	4	4	5	4	5	5
14	7	6	5	6	5	3	6	6	4	3	5	3	6	5	3
15	6	5	6	6	5	6	5	6	5	6	6	6	6	5	6
16	4	4	4	6	7	7	3	6	6	6	7	6	6	7	6
17	6	6	6	3	4	5	3	4	4	4	4	4	5	5	5
18	7	7	7	3	6	3	6	7	6	6	7	6	4	6	4
19	6	6	6	6	3	4	5	6	4	5	6	4	7	2	4
20	6	6	6	6	7	3	6	7	5	6	7	4	6	7	4
21	4	5	4	2	5	3	2	6	3	3	5	3	3	4	2
22	6	5	5	1	2	2	4	5	4	6	6	6	2	4	3
23	5	4	6	2	6	5	6	7	4	3	6	6	3	6	5
24	6	6	6	5	1	5	5	2	2	4	2	5	5	1	5
25	6	6	6	5	5	4	4	6	3	6	6	6	6	6	4
26	6	6	6	6	6	6	5	6	5	6	6	6	6	5	6
27	6	6	6	1	5	4	6	5	4	4	4	4	2	6	3
28	4	6	4	3	7	5	6	7	6	4	7	6	5	7	6
29	7	7	7	3	7	5	6	7	6	4	7	6	5	7	6
30	7	7	7	3	5	3	5	7	5	6	6	6	5	6	5
31	3	3	3	6	2	4	6	4	4	6	3	5	6	3	4
32	6	6	6	2	5	5	3	6	6	3	6	6	5	6	6

Lampiran 17. Diameter Zona Hambat Antibiotik

LT 15. Sensitivitas bakteri asam laktat terpilih terhadap beberapa jenis antibiotik

Isolat	Diameter Zona Hambat (mm)			
	Kanamycin (30µg)	Erythromycin (15 µg)	Trimethoprim (5 µg)	Cinoxacin (100 µg)
DB7	0,00 (R)	16,49 (I)	18,37 (S)	2,48 (R)
BC10	4,55 (R)	18,27 (I)	0,00 (R)	0,00 (R)
DC4	22,4 (S)	20,12 (I)	0,00 (R)	5,40 (R)
BC9	0,00 (R)	19,08 (I)	20,65 (S)	5,46 (R)
DC10	0,00 (R)	17,9 (I)	18,31 (S)	0,00 (R)
BC7	17,9 (I)	18,44 (I)	18,72 (S)	18,71 (I)