

DAYA HAMBAT KOMBINASI SUSU PROBIOTIK (*Lactobacillus acidophilus* + *Lactobacillus bulgaricus*) DAN PASTA TOMAT TERHADAP *ESCHERICHIA COLI* DAN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

²IZZA RAHMI HIDAYAH, NOOR ERMA, ^{*}ISNAENI

Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

²Mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

Jl. Dharmawangsa Dalam, Surabaya 60286 Indonesia

*E-mail: isnaeni_yudi@yahoo.com

ABSTRACT

*Lactic acid bacteria fermented in milk produces antibacterial compound such as bacteriocin, organic acid especially lactic acid (Klewicka, 2004). Tomato has antibacterial activity because of its phenolic compounds and lycopene (Krishna, 2013; Sung, 2007). This study evaluates the antibacterial activity of fermented milk of *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus-L. bulgaricus*, tomato paste and combination of fermented milk (*L. acidophilus-L. bulgaricus*) and tomato paste using agar diffusion methods. This study found that fermented milk of *L. acidophilus* and *L. bulgaricus* has antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The inhibition zone of 8:2 ratio v/v of fermented milk (*L. acidophilus-L. bulgaricus*) against *E. coli* and *S. aureus* are $10,91 \pm 0,03$ mm and $11,73 \pm 0,25$ mm. Tomato paste in saline solution 20% m/v is active against *E. coli* with inhibition zone $9,18 \pm 0,10$ mm. In 9:1 ratio v/v of fermented milk (*L. acidophilus-L. bulgaricus*) and tomato paste in saline solution 20% m/v has inhibition zone $10,35 \pm 0,22$ mm for *E. coli*.*

Keywords: fermented milk, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, tomato paste, antibacterial activity

PENDAHULUAN

Probiotik didefinisikan sebagai mikroba hidup dalam suplemen yang memberi manfaat kesehatan dengan memperbaiki keseimbangan mikroba dalam saluran pencernaan. Bakteri yang digunakan sebagai probiotik berasal dari golongan bakteri asam laktat diantaranya *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, dan *Streptococcus*. Bakteri asam laktat menghambat pertumbuhan bakteri patogen dengan memproduksi substansi antibakteri seperti asam organik, hidrogen peroksida dan bakteriosin (Klewicka, 2004). *Lactobacillus acidophilus* telah diuji secara *in vitro* dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen enterik diantaranya *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* dan *Clostridium difficile* (Rolfe, 2000).

Tomat mengandung likopen yang cukup tinggi yaitu 8,8-42,0 $\mu\text{g}/\text{gram}$ berat basah dan menunjukkan daya antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Rao,

2007; Sung, 2007). Adanya komponen fenolik dan sterol pada ekstrak kloroform dan eter tomat menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, dan *Klebsiella pneumoniae* (Naseer et al, 2012). Selain sebagai antibakteri, penambahan tomat pada susu probiotik mampu menstimulasi pertumbuhan *L. acidophilus* karena tomat menyediakan nutrisi seperti glukosa, fruktosa, magnesium dan mangan (Babu, 1992).

Penelitian ini bertujuan mengetahui aktivitas antibakteri susu probiotik *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus-L. bulgaricus*, pasta tomat dan kombinasi susu probiotik *L. acidophilus-L. bulgaricus* dan pasta tomat dengan perbandingan 1:9 sampai dengan 9:1 v/v. Adanya kombinasi susu probiotik dan pasta tomat yang masing-masing sudah terbukti daya antibakterinya dengan mekanisme berbeda diharapkan mampu memberikan daya antibakteri lebih tinggi daripada masing-masing susu probiotik dan pasta tomat.

METODE PENELITIAN

Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: timbangan analitik (Sartorius), mixer (Maspion), pH meter SCHOTT glass mainz tipe CG 842, viskosimeter VT-04, piknometer, penyaring, incubator (Memmert), jangka sorong, Öse, pipet mikro (Socorex), vortex (*Type 37600 Mixer*), Spektrofotometer UV-Vis (*Thermoscientific Genesys 20*), otoklaf (*Huxley HL-340 Speedy Autoclave*), alat-alat gelas.

Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: tomat buah yang didapatkan dari perkebunan warga di dusun Gesingan desa Pandesari kecamatan Pujon kabupaten Malang, umur 15 minggu dengan diameter 52,55-57,75 mm dan berat 108,1-130,8 gram; Susu skim TS produksi PT Nutrifood Indonesia; media pertumbuhan mikroba yaitu media *Nutrient Agar Toxoid*, MRS *Broth* Himedia; isolat bakteri asam laktat yaitu *Lactobacillus acidophilus* FNCC-0051 diperoleh dari Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada dan *Lactobacillus bulgaricus* dari Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga; isolat bakteri uji *Escherichia coli* FNCC-0091 dan *Staphylococcus aureus* FNCC-0047 diperoleh dari Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada.

Pembuatan Starter Probiotik

Satu Öse *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* diambil dari kultur persediaan, masing-masing diinokulasi dalam agar MRS miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, ditambah 10 mL MRS *broth* dan dikocok menggunakan vortex sampai seluruh koloni di permukaan agar terlepas. Diukur kerapatan inokulum starter pada panjang gelombang 580 nm hingga diperoleh transmittan 25%.

Pembuatan Susu Probiotik

Satu liter susu skim dipasteurisasi pada suhu 80-85°C selama 30 menit. Kemudian didinginkan hingga suhu 45°C. Diinokulasikan 1 mL inokulum BAL dalam MRS ke dalam 10 mL susu dan diaduk sampai homogen kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Selanjutnya 10 mL starter

BAL dalam susu dimasukkan ke dalam 200 mL susu. Kemudian diinkubasi sampai didapatkan jumlah bakteri asam laktat $\geq 10^7$ CFU/mL dan pH 4,0-4,5. Selanjutnya dilakukan karakterisasi terhadap susu probiotik.

Pembuatan Pasta Tomat

Tomat dicuci dengan air mengalir, permukaannya disterilkan dengan alkohol 70% dan dibilas dengan aquades steril. Setelah ditiriskan, tomat dikukus selama 5 menit. Setelah itu dihilangkan biji dan kulitnya. Kemudian buah tomat tersebut dihancurkan dengan menggunakan blender sampai halus, ±2 menit. Bubur tomat halus tersebut kemudian dievaporasi dengan menggunakan wajan sambil diaduk. Suhu selama proses berlangsung diusahakan konstan pada 70 °C hingga total padatan terlarut >24% (Sunarmani, 2011).

Pembuatan Kombinasi Susu Probiotik dan Pasta Tomat

Dibuat kombinasi susu probiotik dan jus tomat dengan perbandingan 1:9; 2:8; 3:7; 4:6; 5:5; 6:4; 7:3; 8:2; 9:1 v/v. Selanjutnya divortex sampai homogen.

Pembuatan Inokulum Bakteri Uji

Satu Öse bakteri uji dari stok persediaan digesekkan pada agar nutrien miring. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Sebanyak 5 mL larutan salin ditambahkan ke dalam tabung, dikocok menggunakan vortex hingga seluruh koloni di permukaan agar terlepas. Kerapatan inokulum bakteri diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm sampai diperoleh transmittan 25%. Stok bakteri dapat langsung digunakan untuk uji.

Uji Aktivitas Antibakteri

Media NA steril 35 mL diletakkan pada cawan petri steril dan diratakan serta ditunggu hingga keras. Setelah itu sebanyak 2 µL inokula bakteri uji dengan transmittan 25% pada panjang gelombang 580 nm, dicampur pada media NA steril 15 mL dan divortex hingga homogen selanjutnya dituang pada lapisan atas media NA 35 mL. Setelah media NA 15 mL rata dan keras, media NA dilubangi dengan pelubang agar steril, sesuai dengan jumlah varietas

tomat dan bentuk olahannya, lalu dicongkel dengan pencongkel agar. Kemudian sebanyak 90 μL diambil dari masing-masing sampel dan dimasukkan pada lubang yang telah dibuat sumuran (*well*). Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk dapat diamati zona hambatnya. Sebagai kontrol positif digunakan larutan ciprofloxacin dan kontrol negatif digunakan susu yang telah dipasteurisasi. Uji

aktivitas antibakteri dilakukan dengan tiga kali replikasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini digunakan pasta tomat dengan konsentrasi 20% dalam larutan NaCl 0,9% steril. Karakterisasi pasta tomat tersaji pada Tabel 1. Pasta tomat kadar 20% dalam larutan NaCl 0,9% steril menghasilkan pH yang asam.

Tabel 1. Hasil karakterisasi pasta tomat

Parameter	Hasil
pH pasta tomat kadar 20% dalam larutan NaCl 0,9% steril	5,43
Total padatan terlarut	30%
Viskositas pasta tomat kadar 20% dalam larutan NaCl 0,9% steril (dPas)	1,38
Bentuk	Semi padat, berwarna merah
Bau	Khas tomat
Rasa	Asam

Karakterisasi susu probiotik *L. acidophilus* dan *L. bulgaricus* tersaji pada Tabel 2. Dibandingkan dengan literatur, susu probiotik yang dibuat memenuhi persyaratan bentuk, bau, rasa dan jumlah bakteri starter. Pada susu probiotik *L. acidophilus*

dan *L. bulgaricus* terjadi perubahan pH yang lebih asam dibandingkan susu skim. Proses fermentasi susu skim oleh bakteri asam laktat menghasilkan asam-asam organik terutama asam laktat sehingga menurunkan pH susu probiotik.

Tabel 2. Hasil karakterisasi susu skim dan susu probiotik

	Parameter Uji	Hasil	Persyaratan
Susu Skim	pH	6,5	6,3 - 6,8*
	Viskositas	$0,27 \pm 0,03$ dPas	Tidak tercantum
	Densitas	$1,04 \pm 0,00$ g/ml	Minimal 1,027*
Susu Probiotik LA	pH	5,48	4,0 - 4,5**
	Viskositas (dPas)	0,45	Tidak tercantum
	Jumlah bakteri starter (cfu/ml)	$1,65 \times 10^8$	$\geq 10^7$ *
Susu Probiotik LB	Bentuk	Cairan kental berwarna putih	Cairan kental padat*
	Bau	Khas	Khas*
	Rasa	Khas	Khas*
	pH	4,91	4,0 - 4,5**
	Viskositas (dPas)	0,65	Tidak tercantum
	Jumlah bakteri starter (cfu/ml)	$2,61 \times 10^8$	$\geq 10^7$ *
	Bentuk	Cairan kental berwarna putih	Cairan kental padat*
	Bau	Khas	Khas*
	Rasa	Khas	Khas*

* SNI 2981-2009

**Tamime dan Robinson, 1999

Tabel 4. Hasil pengamatan diameter zona hambat kombinasi susu probiotik terhadap *E. coli* dan *S. aureus*

No	Susu probiotik <i>L. acidophilus</i> : Susu probiotik <i>L. bulgaricus</i>	Rata-rata diameter daya hambat (mm)	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
1.	1:9	10,26 ± 0,06	10,37 ± 0,24
2.	2:8	10,38 ± 0,76	10,32 ± 0,25
3.	3:7	10,41 ± 0,08	10,48 ± 0,16
4.	4:6	10,40 ± 0,10	10,65 ± 0,22
5.	5:5	10,48 ± 0,07	10,47 ± 0,31
6.	6:4	10,67 ± 0,15	10,78 ± 0,69
7.	7:3	10,70 ± 0,26	11,13 ± 0,12
8.	8:2	10,91 ± 0,03	11,73 ± 0,25
9.	9:1	10,57 ± 0,06	11,23 ± 0,49
10.	Susu probiotik <i>L. acidophilus</i>	10,90 ± 0,18	11,58 ± 0,46
11.	Susu probiotik <i>L. bulgaricus</i>	10,42 ± 0,14	9,72 ± 0,23
12.	Ciprofloxacin 10 ppm	22,87 ± 0,47	22,25 ± 0,41
13.	Susu skim	7,73 ± 0,06	7,67 ± 0,06

Susu probiotik *L. acidophilus* dikombinasikan dengan susu probiotik *L. bulgaricus* dengan perbandingan 1:9 sampai 9:1 (v/v) dan diuji daya hambatnya terhadap *E. coli* dan *S. aureus*. Uji aktivitas pada perbandingan tersebut untuk memilih perbandingan susu probiotik *L. acidophilus-L. bulgaricus* yang akan dikombinasikan dengan pasta tomat. Kombinasi susu probiotik yang memberikan zona hambat terbesar yaitu pada perbandingan 8:2 dengan zona hambat sebesar $10,91 \pm 0,03$ mm terhadap *E. coli* dan $11,73 \pm 0,25$ mm terhadap *S. aureus*. Data hasil uji tersebut dianalisa dengan One Way ANOVA dengan Post Hoc Games Howell. Hasil analisa menunjukkan bahwa susu probiotik *L. acidophilus-L. bulgaricus* perbandingan 8:2 menghasilkan zona hambat yang tidak berbeda bermakna dibandingkan zona hambat susu probiotik tunggal.

Pada suatu penelitian, *L. acidophilus* diketahui menghasilkan bakteriosin bernama acidocin pada pH 4 sedangkan *L. bulgaricus* menghasilkan bakteriosin bulgaricin pada pH 4 (Jumaily, 2012;

Hasan, 2012). Tiap spesies menghasilkan bakteriosin yang berbeda. Pencampuran bakteri *L. acidophilus* dan *L. bulgaricus* didasari bahwa kedua bakteri asam laktat tersebut memiliki macam bakteriosin dan metabolit yang berbeda yang berbeda, sehingga diharapkan memiliki daya antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan susu probiotik dengan bakteri asam laktat tunggal. Namun hasil penelitian menunjukkan adanya kombinasi susu probiotik pada perbandingan 8:2 tidak berpengaruh terhadap bentuk tunggalnya. Hal tersebut menunjukkan adanya metabolit-metabolit yang berbeda dari kedua susu probiotik tersebut tidak meningkatkan aktivitas antibakteri jika dikombinasikan.

Kombinasi susu probiotik *L. acidophilus-L. bulgaricus* dengan perbandingan 8:2 tetap dipilih karena jumlah total bakteri asam laktat kombinasi tersebut $1,87 \times 10^9$ CFU/mL, lebih tinggi daripada jumlah total bakteri asam laktat susu probiotik tunggal.

Tabel 5. Hasil pengamatan diameter zona hambat kombinasi susu probiotik dan pasta tomat terhadap *E. coli*

No	Susu probiotik <i>L. acidophilus</i> - <i>L. bulgaricus</i> : pasta tomat	Rata-rata diameter zona hambat terhadap <i>E. coli</i>
1.	1:9	9,28 ± 0,28
2.	2:8	9,50 ± 0,13
3.	3:7	9,55 ± 0,05
4.	4:6	9,57 ± 0,15
5.	5:5	9,48 ± 0,08
6.	6:4	9,95 ± 0,73
7.	7:3	9,52 ± 0,08
8.	8:2	9,45 ± 0,13
9.	9:1	10,35 ± 0,22
10.	Susu probiotik (LA:LB = 8:2)	10,67 ± 0,08
11.	Pasta tomat	9,18 ± 0,10
12.	Ciprofloxacin 10 ppm	23,08 ± 0,28
13.	Larutan NaCl 0,9% steril	7,73 ± 0,03

Susu probiotik dan pasta tomat masing-masing mempunyai sifat antibakteri dengan mekanisme yang berbeda. Susu probiotik menghasilkan bakteriosin dan asam-asam organik sebagai antibakteri (Shah, 2006) sedangkan pasta tomat mengandung asam-asam organik dan senyawa fenolik yang juga bersifat sebagai antibakteri (Naseer *et al.*, 2012). Dibuat kombinasi susu probiotik dan pasta tomat yang bertujuan untuk meningkatkan aktivitas antibakteri dibandingkan masing-masing susu probiotik dan pasta tomat.

Pada penelitian selanjutnya susu probiotik *L. acidophilus-L. bulgaricus* yang terpilih ditambah pasta tomat dengan perbandingan 1:9 sampai 9:1 v/v. Kemudian dilakukan uji aktivitas antibakteri kombinasi tersebut terhadap bakteri uji. Kombinasi terpilih yaitu kombinasi dengan perbandingan yang memberikan diameter zona hambat terbesar. Hasil uji aktivitas antibakteri tersebut ditunjukkan pada tabel V.10. Kombinasi susu probiotik *L. acidophilus-L. bulgaricus* dan pasta tomat pada perbandingan 9:1 memberikan zona hambat terbesar terhadap bakteri uji. Kombinasi tersebut memberikan zona hambat sebesar $10,35 \pm 0,22$ mm terhadap *E. coli*. Zona hambat kombinasi susu probiotik *L. acidophilus-L. bulgaricus* dan pasta tomat pada perbandingan 9:1 lebih besar dibandingkan zona hambat masing-masing susu probiotik *L. acidophilus-L. bulgaricus* dan pasta tomat. Hal tersebut menunjukkan bahwa aktivitas

antibakteri yang dominan pada kombinasi tersebut adalah susu probiotik *L. acidophilus-L. bulgaricus*. Setelah dianalisa dengan One Way ANOVA Post Hoc Games Howell diketahui zona hambat kombinasi susu probiotik *L. acidophilus-L. bulgaricus* dan pasta tomat perbandingan 9:1 tidak berbeda bermakna dengan susu probiotik namun berbeda bermakna dengan pasta tomat.

DAFTAR PUSTAKA

- Klewicka, E., Libudzisz, Z. 2004. Antagonistic Activity of *Lactobacillus acidophilus* Bacteria Towards Selected Food-Contaminating Bacteria. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, Vol 13/54 No. 2, hal. 169-74.
- Krishna, J.M. 2013. Phytochemical Analysis and Antimicrobial Studies of Various Extracts of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Sch. Acad. J. Biosci.*, Vol. 1 No. 2, hal. 34-38.
- Sung WS, Lee IS, Lee DG. 2007. Damage to the cytoplasmic membrane and cell death caused by lycopene in *Candida albicans*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 17 No. 11, hal. 1797-1804.
- Rolfe, RD. 2000. The Role of Probiotic Cultures In the Control of Gastrointestinal Health. *J. Nutr.*, Vol. 130, hal. 396S-402S.
- Rao, A. dan Rao, G. 2007. Carotenoids and Human Health. *Pharmacological Research*, Vol 55, hal 207-16.
- Naseer, U. 2012. Evaluation of antibacterial activity

- of five selected fruits on bacterial wound isolates. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* Vol. 3 No. 4, hal. 531-46.
- Babu, V. 1992. Effect of Tomato Juice Addition on the Growth and Activity of *Lactobacillus acidophilus*. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 17, hal. 67-70.
- Sunarmani, Agustinisari, I., Hartuti, N., Yulianingsih. 2011. Studi Pembuatan Pasta Tomat dari Beberapa Varietas. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian.