

PEMANFAATAN BAKTERI PROBIOTIK INDIGENUS DALAM PEMBUATAN KEJU LUNAK

[Utilization of Indigenous Probiotic Bacteria in the Production of Soft Cheese]

Fifi Afiati^{1)*}, Yopi¹⁾ dan Rarah R.A. Maheswari²⁾

¹⁾ Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Jl. Raya Bogor Km 46, Cibinong, Bogor

²⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor, Bogor

Diterima 12 April 2013 / Disetujui 15 Februari 2014

ABSTRACT

Probiotic soft cheese containing lactic acid bacteria is one of functional food products. Three lactic acid bacteria namely *Lactococcus lactis* DSB 42 (LL-DSB42), *Lactobacillus acidophilus* RRM-01 (LA-RRM01) and *Bifidobacterium longum* RRM-01 (BL-RRM01) were used in the production of probiotic soft cheeses. Single culture (BL, LA, and LL) and mixed culture (BL-LA, BL-LL, LA-LL and BL-LA-LL) were used to produce diversified functional products. The preparation of probiotic soft cheese consists of pasteurization, addition of lactic acid bacterial culture (5%, v/v), addition of rennet, cutting the curd, scalding, draining and packaging. Soft cheese characteristics were analyzed physically (yield), chemically (pH, water content, crude protein, crude fat and ash) and microbiologically (lactic acid bacteria). The results showed that addition of lactic acid bacteria cultures significantly decreased the pH value (pH 5.10 to 5.79). The yield of probiotic soft cheese produced was in the range of 17.86-22.51% with water content of more than 55%. The fat and carbohydrate content of both cheeses of single and mixed cultures were significantly different ($p < 0.05$) (fat content 5.1-7.4% for single culture and 4.0-9.3% for mix culture; carbohydrate content 11.6-17.7% for single culture and 4.6-12.2% for mix culture). The combination of all three starter cultures did not result in inhibition to each other, thus these combination were able to achieve the maximum number of $9.0 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ on a single culture soft cheese and $9.8 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ in mixed cultures soft cheese. In conclusion, soft cheeses with single culture (BL, LA, and LL) and mixed culture (BL-LA, BL-LL, LA-LL and BL-LA-LL) had excellent potential properties to be developed as probiotic foods.

Keywords: *B. longum*, lactic acid bacteria, *L. acidophilus*, *L. lactis*, soft cheese

ABSTRAK

Keju probiotik menggunakan bakteri asam laktat merupakan salah satu produk pangan fungsional. Bakteri asam laktat (BAL) yang digunakan dalam pembuatan keju lunak adalah *Lactococcus lactis* DSB 42 (LL-DSB42), *Lactobacillus acidophilus* RRM-01 (LA-RRM01) dan *Bifidobacterium longum* RRM-01 (BL-RRM01), baik secara tunggal (BL, LA, and LL) atau campuran (BL-LA, BL-LL, LA-LL dan BL-LA-LL) yang bertujuan meningkatkan diversifikasi produk menjadi pangan fungsional. Penelitian dimulai dari proses pasteurisasi, penambahan BAL (5%, v/v), penambahan *rennet*, pemotongan *curd*, *scalding*, penyaringan dan pengemasan. Keju lunak dianalisis secara fisik (rendemen), kimia (pH, kadar air, lemak kasar, abu dan karbohidrat *by difference*). Penambahan BAL menyebabkan penurunan pH (pH 5.10 sampai 5.79). Rendemen yang dihasilkan berkisar 17.86-22.51% dengan kadar air lebih dari 55%. Kandungan lemak dan karbohidrat berbeda nyata ($p < 0.05$) baik yang ditambah BAL secara tunggal atau campuran (kadar lemak 5.1-7.4% pada kultur tunggal dan 4.0-9.3% pada kultur campuran; kandungan karbohidrat 11.6-17.7% pada kultur tunggal dan 4.6-12.2% pada kultur campuran). Kombinasi ketiga kultur starter tidak menyebabkan penghambatan pada kultur lainnya, sehingga mampu tumbuh maksimum $9.0 \log_{10} \text{CFU/g}$ pada kultur tunggal dan $9.8 \log_{10} \text{CFU/g}$ pada kultur campuran. Disimpulkan bahwa keju lunak dengan kultur tunggal atau campuran berpotensi sebagai makanan probiotik.

Kata kunci: bakteri asam laktat, *B. longum*, keju lunak, *L. acidophilus*, *L. lactis*

PENDAHULUAN

Beragamnya jenis pangan di Indonesia memicu beberapa industri untuk mengembangkan produk berbasis susu. Keju merupakan produk susu yang memiliki karakteristik fisik dan kimia spesifik dibandingkan produk susu lainnya serta berpotensi sebagai probiotik (Karimi *et al.* 2011). Pembuatan keju merupakan proses dehidrasi susu dan dipengaruhi oleh faktor lain seperti kultur, pengasaman, pengasinan, kemasan dan pendinginan (Everett dan Auty, 2008).

Bakteri probiotik berfungsi efektif jika viabilitasnya dapat dipertahankan sampai usus halus dan usus besar. Bakteri probiotik bertanggung jawab melindungi tubuh manusia dari infeksi, terutama di sepanjang permukaan mukosa saluran pencernaan (Sanders, 2003). Bakteri asam laktat seperti *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp dan *L. casei* sering digunakan dalam pembuatan produk-produk yang terbuat dari susu dan juga sebagai bagian dari mikroflora gastrointestinal (Shah, 2007).

Bakteri asam laktat tergolong mikroorganisme *Generally Recognized as Safe* (GRAS), aman jika ditambahkan ke dalam bahan pangan dan bersifat non toksik, sehingga dapat dimanfaatkan dalam pembuatan produk pangan fermentasi (Kusmiati dan Malik, 2002). Strain bakteri yang tergolong dalam

*Penulis Korespondensi:
E-mail: fifi.afiati@lipi.go.id; afiati_btk@yahoo.com

bakteri probiotik adalah dari genus *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* (Madureira *et al.* 2005) saat ini bakteri probiotik banyak digunakan dalam yoghurt, es krim dan makanan penutup (Homayouni *et al.* 2008).

Lactobacillus acidophilus merupakan bakteri yang tahan terhadap pH rendah dan cocok untuk digunakan dalam pembuatan produk olahan susu dengan keasaman tinggi (Vedamuthu, 2006). Dilaporkan juga *L. lactis* merupakan bakteri asam laktat yang dimanfaatkan dalam dunia industri untuk memproduksi produk susu fermentasi khususnya keju (Odamaki *et al.* 2011). Disisi lain bifidobacteria dilaporkan mampu memanfaatkan laktulosa dan oligosakarida yang merupakan karbohidrat kompleks dan dikenal dengan istilah 'faktor-faktor bifidus'. Interaksi positif antara beberapa strain bakteri asam laktat tersebut diatas telah banyak digunakan seperti *L. acidophilus* dan *Bifidobacterium* spp. (Tamime dan Robinson, 2000). *L. helveticus* R0052, *B. longum* R0175 dan *B. lactis* BB-12 merupakan strain yang dapat memberikan efek kesehatan (Rautava *et al.* 2009; Jandu *et al.* 2009; Wagar *et al.* 2009). Mikroorganisma genus laktokokus dianggap aman sehingga banyak digunakan dalam produk olahan susu, baik dalam skala kecil atau besar (Casalta dan Montel, 2008).

Penelitian menggunakan bakteri asam laktat *Lactobacillus acidophilus* RRM-01 (LA-RRM01), *Bifidobacterium longum* RRM-01 (BL-RRM01) dan *Lactococcus lactis* DSB 42 (LL-DSB42), karena menurut Maheswari *et al.* (2008) bakteri tersebut berpotensi sebagai probiotik yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen, khususnya *E. coli*. Ketiga bakteri yang digunakan merupakan bakteri asam laktat yang diisolasi dari produk lokal, yaitu dadih dari Sumatera Barat sehingga diharapkan mampu meningkatkan potensi plasma nutfah lokal. Tujuan pemanfaatan bakteri LA-RRM01, BL-RRM01 dan LL-DSB42 pada keju lunak adalah untuk meningkatkan diversifikasi produk menjadi pangan fungsional melalui proses fermentasi bakteri asam laktat secara tunggal atau campuran dalam pembuatan keju lunak terhadap karakteristik fisik, kimia dan mikrobiologi.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Susu segar diperoleh dari sapi Friesian Holland (FH) yang dipelihara di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong. Bahan lain yang digunakan adalah susu skim dari supermarket lokal, dan *rennet*, kultur *Lactobacillus acidophilus* RRM-01 (LA-RRM01; LA), *Bifidobacterium longum* RRM-01 (BL-RRM01; BL) serta *Lactococcus lactis* DSB 42 (LL-DSB42; LL) dari Laboratorium Hasil Ternak Perah, Fakultas Peternakan IPB.

Analisis kualitas susu segar

Analisis susu menggunakan pH meter (MV meter UB-7) dan milko *tester* (Master Pro) meliputi nilai pH, kadar lemak, protein, laktosa.

Persiapan kultur bakteri

Persiapan dimulai dengan mengaktifkan kultur BAL dalam media *de Mann Rogossa Sharpe Broth* (MRSB, Merck) steril

sebanyak 2-3 x 24 jam dalam 9 bagian media cair steril dan 1 bagian kultur. Perbanyak kultur dilakukan melalui tahap pembuatan kultur induk, kultur antara dan kultur kerja, dimana 1 bagian kultur BAL ditumbuhkan dalam 9 bagian larutan skim steril.

Pembuatan keju lunak

Masing-masing kultur kerja 5% (v/v) ditambahkan ke dalam susu yang telah dipasteurisasi dan dilakukan pengukuran pH hingga mencapai pH 6.3. Kultur kerja yang ditambahkan meliputi kultur tunggal (*Lactobacillus acidophilus* RRM-01/LA, *Bifidobacterium longum* RRM-01/BL dan *Lactococcus lactis* DSB 42/LL) atau kultur campuran (BL-LA 1:1, BL-LL 1:1, LA-LL 1:1 dan BL-LA-LL 1:1:1). Pada bahan tersebut kemudian ditambah *rennet* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam, selanjutnya dipotong-potong dan didiamkan selama 15 menit. *Scalding* dilakukan dengan cara pemanasan *curd* pada suhu 40°C selama 30 menit, dilanjutkan dengan penyaringan, pengemasan dan penyimpanan. Penambahan kultur kerja sampai pengemasan dapat dilihat pada Gambar 1, 2, 3, 4 dan 5.



Gambar 1. Kultur kerja



Gambar 2. Proses koagulasi



Gambar 3. Pengeluaran whey



Gambar 4. Penyaringan



Gambar 5. Pengemasan

Analisis produk

Keju lunak yang dihasilkan dianalisis secara fisik (rendemen), kimia (pH, kadar air, protein kasar, abu, lemak kasar dan mikrobiologi (BAL, bakteri asam laktat). Analisis pH dan populasi bakteri asam laktat dilakukan terhadap keju lunak yang disimpan selama 1, 7 dan 14 hari, sedangkan analisis kadar air, protein, lemak dan abu serta karbohidrat *by difference* (hasil pengurangan angka 100 dengan komponen air, protein, lemak dan abu) dilakukan terhadap keju segar (H1). Analisis dilakukan menurut AOAC (2005) dan BAM (2001).

Analisis data

Rancangan penelitian pengujian analisis nilai pH, analisis karbohidrat dan jumlah BAL menggunakan faktorial rancangan acak lengkap (faktorial RAL), analisis protein kasar, lemak kasar, kadar air dengan rancangan acak kelompok (RAK) dengan tiga kali ulangan dan dianalisis dengan sidik ragam (ANOVA). Jika terjadi perbedaan dilanjutkan dengan uji Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas susu sapi segar

Susu merupakan bahan dasar yang diperlukan dalam pembuatan keju. Komposisi yang terkandung di dalam susu berbeda tergantung jenis ternak, bangsa ternak, status nutrisi, periode laktasi, umur, interval pemerahan dan kesehatan (McSweeney, 2007). Penentuan kualitas susu harus mengikuti standar mutu yang telah ditetapkan oleh Badan Standardisasi Nasional tentang susu sapi segar (BSN, 2011). Pengujian susu diawal proses produksi dilakukan karena susu merupakan bahan utama dalam pembuatan keju, dimana komponen susu seperti protein berperan dalam pembentukan tekstur dan *flavor*, sedangkan laktosa merupakan substrat terpenting dalam proses fermentasi bakteri asam laktat. Standar kandungan protein susu untuk pembuatan keju adalah 3.7-4.5%. Kandungan yang standar dapat meningkatkan keseragaman, mengurangi casein dalam *whey* dan meningkatkan kadar protein dalam produk (McSweeney, 2007). Mutu susu sapi segar yang digunakan dalam penelitian seperti tercantum dalam Tabel 1.

Tabel 1. Mutu susu segar sapi *Friesian Holland* (FH) yang dipelihara di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong

Komposisi	Nilai	Nilai Standar
Lemak (%)	4.9 ± 0.7	3.0 ¹
Protein (%)	3.8 ± 0.2	2.8 ¹
Laktosa (%)	4.0 ± 0.2	4.09 ²
pH	6.7 ± 0.1	6.3 - 6.8 ¹

¹SNI 3141.1:2011; ²Siddique *et al.* (2010)

Salah satu atribut yang dapat menentukan kualitas susu adalah kandungan laktosa dan abu (Siddique *et al.* 2010). Laktosa merupakan sumber energi utama bagi bakteri asam laktat yang memerlukan karbon organik sebagai sumber karbon dan energi dengan merubah menjadi asam laktat dan produk lainnya melalui dua rute metabolisme yang berbeda. Konsentrasi laktosa dan laktat berpengaruh terhadap proses pematangan keju (Riahi *et al.* 2007).

Mutu susu segar sapi FH memenuhi standar yang telah ditetapkan SNI 314.1:2011, sehingga susu yang dihasilkan dapat digunakan untuk produk olahan susu, khususnya pembuatan keju lunak.

Rendemen keju lunak

Rendemen dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu konsentrasi *rennet*, temperatur dan pH (Walstra *et al.* 2006). Persentase rendemen keju lunak dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rendemen keju lunak yang dihasilkan dari penambahan kultur bakteri asam laktat (BAL) secara tunggal atau campuran

Kultur Starter	Rendemen (%) ^{tn}
BL	17.9 ± 5.1
LA	20.6 ± 6.7
LL	19.6 ± 6.1
BL-LA	21.6 ± 8.4
BL-LL	21.4 ± 9.9
LA-LL	21.4 ± 6.6
BL-LA-LL	22.5 ± 7.3

BL = *Bifidobacterium longum*; LA = *Lactobacillus acidophilus*
 LL = *Lactococcus lactis*; tn = tidak berbeda nyata ($p > 0.05$)

Kasein berfungsi membentuk jaringan parakasein untuk menghasilkan struktur keju. Secara sederhana, rendemen merupakan berat keju yang dihasilkan dari berat susu yang digunakan. Penentuan rendemen sebenarnya dihasilkan dari pengukuran semua komponen *input* (susu, starter dan garam) serta *output* (keju dan *whey*). Keju yang dihasilkan dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti spesies, bangsa, masa laktasi, nutrisi, frekuensi pemerahan dan status kesehatan ternak (McSweeney, 2007).

Secara umum, rataan rendemen yang dihasilkan dalam penelitian tidak berbeda nyata ($p > 0.05$). Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan bakteri asam laktat LA, BL dan LL baik secara tunggal atau campuran memberikan pengaruh yang sama terhadap rendemen keju lunak, karena kultur yang ditambahkan mempunyai konsentrasi yang sama, seperti pendapat Jamilatun (2009) bahwa rendemen dipengaruhi oleh konsentrasi inokulum, suhu dan waktu fermentasi. Persentase rendemen yang dihasilkan pada penelitian ini sebesar 17.86-22.51%, berkaitan erat dengan kadar air yang dikandungnya, berpengaruh juga terhadap konsistensi dan teksturnya (Farke, 2004) (Tabel 5) sehingga keju yang dihasilkan dapat diklasifikasikan sebagai keju lunak, karena menurut Heller *et al.* (2008) keju yang mengandung kadar air >55% diklasifikasikan sebagai keju lunak.

McSweeney (2007) mengemukakan bahwa kadar protein dan lemak susu serta penanganan susu pada proses pembuatan keju dapat mempengaruhi perolehan rendemen. Rendemen dihasilkan dari penurunan berat keju disebabkan oleh kehilangan air akibat penguapan dan pelepasan CO₂ dari proses glikolisis dan proteolisis serta dipengaruhi kelembaban relatif dan suhu lingkungan (Riahi, 2007). Rendemen yang dihasilkan dalam penelitian ini hampir sama dengan penelitian yang telah dilakukan Huppertz *et al.* (2004) yaitu 10-25%, sementara keju segar Minas hasil penelitian Buriti *et al.* (2005) menghasilkan rendemen sebesar 4.3-9.6%.

Kualitas kimia keju lunak

Salah satu karakteristik penting dalam penilaian mutu susu pada pembuatan keju adalah pH karena pH medium sangat penting bagi stabilitas bakteri probiotik selama penyimpanan (Kailasapathy *et al.* 2008). Nilai pH yang tinggi merupakan kondisi yang kurang menguntungkan bagi proses penggumpalan keju yang membutuhkan pH optimum yaitu asam (McSweeney, 2007). Nilai pH keju lunak dengan penambahan

kultur BAL secara tunggal atau campuran dapat dilihat pada Tabel 3, sedangkan nilai pH selama penyimpanan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 3. Nilai pH keju lunak yang dihasilkan dari penambahan kultur bakteri asam laktat (BAL) secara tunggal atau campuran

Kultur BAL	Nilai pH Rataan ± SD
BL	5.79 ± 0.47 ^a
LA	5.15 ± 0.65 ^b
LL	5.48 ± 0.87 ^{ab}
BL-LA	5.11 ± 0.72 ^b
BL-LL	5.53 ± 0.82 ^{ab}
LA-LL	5.10 ± 0.65 ^b
BL-LA-LL	5.14 ± 0.75 ^b

BL = *Bifidobacterium longum*, LA = *Lactobacillus acidophilus*, LL = *Lactococcus lactis*; ^{a,b} huruf superskrip yang berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata ($p < 0.05$)

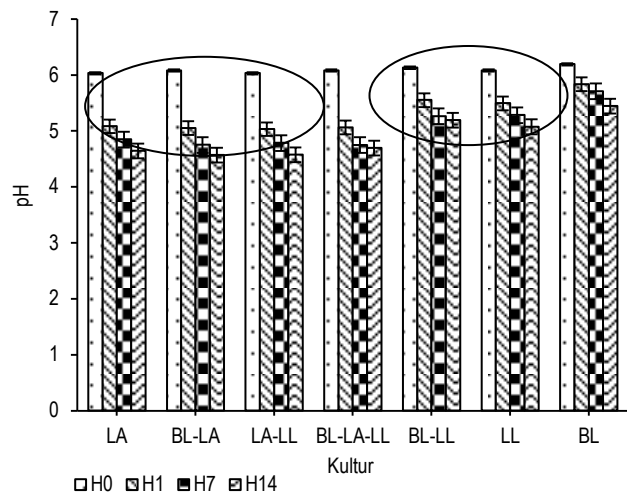
Tabel 4. Nilai pH keju lunak selama penyimpanan yang dihasilkan dari penambahan kultur bakteri asam laktat secara tunggal atau campuran

Penyimpanan (hari)	Nilai pH Rataan ± SD
H-0	6.09 ± 0.17 ^a
H-1	5.30 ± 0.52 ^b
H-7	5.05 ± 0.73 ^{bc}
H-14	4.88 ± 0.77 ^c

H-0 = hari ketika penambahan kultur starter, H1-H14 = hari penyimpanan ke-1, 7, dan 14

Berdasarkan analisis sidik ragam terdapat perbedaan ($p < 0.05$) pada kultur BAL, sehingga kultur BAL berpengaruh nyata terhadap nilai pH dan setelah uji Duncan kultur BAL dapat diketahui bahwa nilai pH keju lunak yang mengandung kultur BL tidak berbeda nyata dengan kultur LL dan BL-LL, sedangkan keju lunak yang mengandung kultur LA-LL berbeda tidak nyata dengan semua perlakuan, kecuali keju lunak yang mengandung kultur BL. Nilai pH susu merupakan faktor penting selama fase penggumpalan pada proses pembuatan keju. Nilai pH bervariasi karena adanya reaksi kultur starter, proses sebelum pematangan atau adanya penambahan asam. Nilai pH mempengaruhi aktivitas proteolitik karena terjadi pemecahan makropeptida kappa kasein oleh *rennet* (Ong *et al.* 2012). Selama fase pembuatan keju, laktosa dirubah menjadi asam laktat, sehingga meningkatkan pH, namun ketika nutrisi tidak tersedia, maka mikroflora memetabolisme asam amino yang dilepaskan dari kasein (McSweeney dan Sousa, 2000).

Bifidobacteria tumbuh optimum pada pH 6.5-7.0 dan akan terhambat di bawah pH 5.0 atau di atas pH 8.0 (Bolyston, 2004). *Bifidobacterium longum* dibedakan dari spesies *Bifidobacteria* lain, karena dapat memanfaatkan arabinosa, xilosa, ribosa, laktosa, melesitol, trehalosa dan tidak dapat memanfaatkan glukonat, maltosa dan salisin (Hadadji dan Bensoltane, 2006). *Bifidobacterium longum* tumbuh baik pada media TPY yang mengandung laktosa dengan laju pertumbuhan 0.37 per jam. Nilai pH kultur menurun secara bertahap dari 6.7 ke 4.1 setelah 23 jam inkubasi pada 37°C, namun pertumbuhan *B. longum* relatif tidak terpengaruh. Rataan nilai pH selama penyimpanan dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Diagram batang rata-rata nilai pH selama penyimpanan keju lunak yang dihasilkan dari penambahan kultur bakteri asam laktat (BAL) secara tunggal atau campuran

Gambar 6. terlihat bahwa keju lunak dengan pe-nambahan kultur LA, baik tunggal atau campuran menunjukkan nilai pH yang lebih rendah (6.08 menjadi 4.64) dibandingkan kultur lainnya (6.19 menjadi 5.07), hal ini menunjukkan bahwa penambahan kultur *L. acidophilus* ternyata mampu menurunkan tingkat keasaman keju lunak, karena menurut Vedamuthu (2006) walaupun *L. acidophilus* tumbuh lambat di dalam susu, namun memproduksi asam laktat dalam jumlah tinggi, sehingga dapat berperan sebagai faktor pengasam. Produk keju yang mengandung *L. acidophilus* mempunyai kandungan asam laktat yang tetap selama penyimpanan, karena banyak laktosa yang hilang bersama *whey* dan hanya sedikit yang tersisa dalam keju (Ong *et al.* 2006). Selama penyimpanan, dapat terjadi perubahan struktural karena hilangnya kelembaban dan perubahan biokimia, serta perubahan keju secara umum (Madadlou *et al.* 2007).

Berdasarkan analisis sidik ragam terdapat perbedaan ($p < 0.05$) pada penyimpanan, sehingga penyimpanan berpengaruh nyata terhadap nilai pH dan setelah uji Duncan penyimpanan diketahui bahwa rata-rata pH tertinggi dihasilkan pada penyimpanan H-0 (6.09), sedangkan terendah pada penyimpanan H-14 (4.88). Tidak terjadi interaksi antara kultur BAL dan lama penyimpanan, karena memiliki p -value 0.999 $> \alpha$ 5% ($p > 0.05$). Kadar pH pada awal penyimpanan lebih tinggi karena pada H0 merupakan saat penambahan kultur pada susu, dimana pH awal susu setelah pasteurisasi sebesar 6.4 turun menjadi 6.09 setelah penambahan kultur bakteri asam laktat. Penurunan terus terjadi selama masa penyimpanan, hal ini dimungkinkan karena proses metabolisme berlangsung secara ideal dan kondisi konstan, dimana tingkat produksi asam sebanding dengan jumlah bakteri, walaupun ketika pertumbuhan melambat atau bahkan berhenti karena terjadi akumulasi asam laktat, sistem enzim bakteri masih dapat terus melanjutkan perubahan dari laktosa menjadi asam. Kondisi pertumbuhan bakteri tidak persis sama seperti yang terjadi pada starter akibat perlakuan panas pada susu dan tekanan oksigen di

dalamnya, sehingga enzim bakteri yang ditambahkan harus menyesuaikan terlebih dahulu (Walstra *et al.* 2006).

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0.05$) terhadap kandungan karbohidrat *by difference* dan lemak, namun kadar air, protein dan abu tidak menunjukkan perbedaan yang nyata pada semua kultur yang ditambahkan, baik secara tunggal atau campuran. Keju lunak yang mengandung kultur bakteri asam laktat BL-LL menghasilkan kadar lemak paling rendah, sehingga diharapkan keju ini dapat dijadikan sebagai alternatif pangan fungsional. Kombinasi BL-LA akan meningkatkan 45% produksi asam laktat, selain itu dapat memberikan dampak positif terhadap pengaruh bifidogenik dan mampu merangsang produksi asam laktat (Hadadji dan Bensoltane, 2006). Hasil analisis proksimat keju lunak probiotik yang dihasilkan dari penambahan kultur bakteri asam laktat secara tunggal atau campuran dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil analisis proksimat keju lunak yang dihasilkan dari penambahan kultur bakteri asam laktat secara tunggal atau campuran

Kultur Starter	Kadar Air (%) ^{tn}	Protein kasar (%) ^{tn}	Karbohidrat <i>by Difference</i> (%)	Lemak Kasar (%)	Abu (%) ^{tn}
BL	57.7±0.5	20.5±2.7	13.1±0.5 ^{ab}	7.0±3.3 ^{ab}	1.7±0.3
LA	55.0±0.4	20.9±0.6	17.7±3.6 ^a	5.1±2.5 ^{ab}	1.2±0.1
LL	58.6±0.8	20.7±1.8	11.6±5.6 ^{ab}	7.4±6.0 ^{ab}	1.7±0.5
BL-LA	64.1±5.2	21.6±1.8	8.8±3.9 ^{ab}	4.0±2.7 ^b	1.6±0.4
BL-LL	63.4±10.7	21.7±1.5	6.7±3.4 ^b	6.3±4.2 ^{ab}	2.0±1.7
LA-LL	61.0±4.7	20.2±2.6	12.2±3.0 ^{ab}	5.2±4.0 ^{ab}	1.4±0.4
BL-LA-LL	63.6±5.8	21.0±1.2	4.6±3.1 ^b	9.3±6.8 ^a	1.4±0.9

BL = *Bifidobacterium longum*, LA = *Lactobacillus acidophilus*, LL = *Lactococcus lactis*; ^{a,b} huruf superskrip yang berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata ($p < 0.05$). ^{tn} = tidak berbeda nyata

Sampai saat ini standar tentang keju masih mengacu pada SNI 01-2980-1992, yaitu tentang keju cedar olahan dengan 45% kadar air, 19.5% kadar protein kasar, 25% kadar lemak dan 5.5% kadar abu (BSN, 1992).

Berdasarkan kadar air yang dikandungnya (55-64.1%), keju yang dihasilkan termasuk kelompok keju lunak, seperti diuraikan Heller *et al.* (2008) bahwa klasifikasi produk keju berdasarkan kadar air terbagi atas keju keras (20-24%), keju semi keras atau semi lunak (45-55%) dan keju lunak (>55%), umumnya keju lunak dikonsumsi dalam keadaan segar dan mempunyai umur simpan yang terbatas. Kadar air yang tinggi dapat melemahkan jaringan kasein sehingga partikel keju mudah lepas (McSweeney, 2007). Protein susu merupakan zat penting dalam gizi dan fisiologi manusia. Protein dalam susu terbagi atas kasein dan *whey* protein. Kasein merupakan kelompok dominan protein dalam susu, mengandung ester fosfat, prolin dan sedikit residu sistein, terdiri dari molekul α_1 , α_2 , β dan κ , (Steijns, 2001). Keju lunak yang dihasilkan dari penambahan kultur bakteri probiotik mempunyai kandungan protein dan lemak masing-masing sebesar 13.50% dan 15.70% dan relatif

sama setelah disimpan selama 28 hari yaitu sebesar 13.58% protein dan 15.94% lemak (Fritzen-Freire *et al.* 2010). Mutu keju yang dihasilkan dalam penelitian memiliki kandungan protein 20.2–21.7%, hampir sama dengan keju cedar olahan 19.5% (BSN, 1992) namun lebih besar dari hasil penelitian Buriti *et al.* (2007) yaitu sebesar 11.86% pada keju segar Minash yang mengandung *L. acidophilus* dan 13.44% pada keju probiotik yang menggunakan kultur *Lactobacillus acidophilus* (Kasimoglu *et al.* 2004), sehingga keju lunak yang dihasilkan pada penelitian ini dapat dijadikan sumber protein melebihi kandungan protein pada bahan dasarnya (3.8%). Pembentukan asam amino dari protein juga penting dalam pematangan keju, dan merupakan senyawa prekursor dalam pembentukan flavor sebagai ciri khas pematangan keju (Walstra *et al.* 2006).

Kandungan karbohidrat *by difference* keju lunak yang mengandung bakteri tunggal LA berbeda nyata ($p < 0.05$) dengan keju lunak yang mengandung bakteri BL-LL dan BL-LA-LL, namun berbeda tidak nyata dengan yang ditambah bakteri BL, LL, BL-LA dan LA-LL, hal ini menunjukkan bahwa bakteri LA mampu bersinbiotik dengan bakteri BL dan LL untuk menghasilkan energi dalam proses metabolismenya. Metabolisme heksosa melalui jalur *Emden-Meyerhoff* mengarah ke produksi laktat dengan piruvat. Banyak jalur alternatif BAL untuk menghasilkan piruvat dan metabolit selain laktat, seperti metabolisme heksosa pada kondisi glukosa terbatas atau dengan adanya oksigen sebagai elektron akseptor (Axelson, 2004).

Lactococcus lactis mampu mengkonversi piruvat menjadi α -asetolaktat ketika terdapat elektron akseptor seperti sitrat dan terjadi kelebihan piruvat relatif terhadap kebutuhan NADH melalui reaksi laktat dehidrogenase, dimana α -asetolaktat secara enzimatik diurai menjadi acetoin atau dikonversi secara non enzimatik terhadap senyawa rasa (Hugenholtz *et al.* 2002.) yaitu diasetil (Hansen dan Schieberle, 2005). *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* dan *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* dalam fermentasi susu berperan sebagai pengasam, terutama dalam memproduksi asam laktat dan berkontribusi pada pengembangan tekstur dengan memproduksi eksopolisakarida atau senyawa aromatik sitrat, asam amino atau dalam metabolisme (Smit *et al.* 2005) sehingga membantu dalam menilai keamanan kultur yang digunakan (Kok *et al.* 2005).

Kadar lemak keju lunak yang mengandung bakteri BL-LA (4.0) berbeda lebih kecil dari keju lunak yang mengandung bakteri BL-LA-LL (9.3%). Klasifikasi keju berdasarkan kadar lemaknya menurut standar umum keju Codex terdiri atas tinggi lemak (>60%), lemak penuh (40-60%), lemak sedang (25-45%), lemak rendah (10-25%). Keju yang dihasilkan tergolong ke dalam keju lunak dengan kadar lemak yang rendah, kondisi ini terjadi karena keju lunak yang digunakan menggunakan bakteri asam laktat baik secara tunggal atau campuran. Populasi mikroba dalam *curd* berhubungan dengan kandungan lemak keju. Pembuatan keju rendah lemak tergantung dengan teknik pengolahan, kultur starter dan penggunaan zat tambahan seperti penstabil dan lemak pengganti. Pemberian kultur starter dalam pembuatan keju berkontribusi terhadap proteolisis yang menyebabkan perubahan karakteristik tekstur dan rasa yang khas karena terjadi perubahan lingkungan dalam proses metabolismenya, sehingga penambahan kultur starter tetap harus dibatasi agar aktivitas proteolitik dapat terkendali (Mistry, 2001).

Produk yang dihasilkan dari kultur campuran mempunyai spektrum luas dan komposisi yang kompleks dengan kandungan antibiotik, namun belum ditemukan metode yang dapat menghitung populasi *L. acidophilus*, *L. casei* dan *Bifidobacterium* secara bersamaan (Talwalkar dan Kailasapathy, 2004^a) sehingga harus dipilih metode selektif, dikhususkan pada jenis makanan, spesies dan strain (Sartory, 2005).

Kualitas mikrobiologi keju lunak

Pembuatan keju yang menggunakan kultur bakteri, hal yang harus diperhatikan adalah kelangsungan hidup bakteri tersebut dalam matriks keju selama proses produksi dalam jumlah yang cukup dengan menghitung unit koloni (CFU) (Reid, 2008), namun Ong *et al.* (2006) mengemukakan bahwa penambahan mikroorganisme probiotik tidak berpengaruh langsung terhadap komposisi keju cedar yang disimpan pada suhu 4°C (garam, lemak, protein dan pH). Produk susu fermentasi merupakan cara yang umum dilakukan dalam memanfaatkan bakteri probiotik komersial dalam makanan, seperti *L. acidophilus*, *L. casei* dan *Bifidobacterium* (Temmerman *et al.* 2003). Kultur *L. acidophilus* dapat juga digunakan dalam pembuatan keju probiotik Turkish dengan populasi 10⁷ CFU/g (Kasimoğlu *et al.* 2004). Jumlah minimum bakteri probiotik yang dibutuhkan untuk memperoleh efek kesehatan belum ditetapkan (Roy, 2005). Namun, menurut Chen dan Walker (2005), cara terbaik untuk mendapatkan manfaat probiotik adalah dengan mengonsumsinya secara rutin, sehingga mampu mempertahankan atau meningkatkan keseimbangan mikroba usus. Populasi *Bifidobacterium* Bb-12 dalam keju Cheddar yang disimpan selama 32 minggu mengandung sebesar 8 log CFU/g sel probiotik (Phillips *et al.* 2006) namun demikian *B. longum* 15708 sangat sensitif terhadap kondisi asam (Kheadr *et al.* 2007). Jumlah BAL yang ditambahkan baik secara tunggal atau campuran dan selama penyimpanan dapat dilihat pada Tabel 6 dan Tabel 7.

Penggunaan media selektif memungkinkan pertumbuhan bakteri yang diharapkan dan menghambat bakteri lainnya (Darukaradhy *et al.* 2006). Jumlah mikroba merupakan indikator aktivitas bakteri. Jumlah BAL keju lunak yang menggunakan bakteri campuran BL-LA-LL (9.38 CFU/g) berbeda nyata ($p < 0.05$) dibanding jumlah BAL yang menggunakan bakteri BL dan BL-LA (9.09 CFU/g). Tingginya jumlah BAL pada keju lunak yang ditambahkan secara tunggal atau campuran memberi indikasi bahwa pemberian bakteri campuran tidak menyebabkan penghambatan terhadap bakteri lainnya dan mampu bersinbiotik, sehingga mampu mencapai jumlah maksimal 9.38 CFU/g. Pertumbuhan *B. bifidum* dan *B. longum* meningkatkan populasi 1-2 log₁₀, sementara populasi *B. infantis* menurun 1 log₁₀ selama 14 hari periode pematangan (Boylston, 2004).

Agar dapat dikategorikan sebagai produk makanan sehat dan tetap layak selama penyimpanan, hal pertama yang harus dikontrol adalah jumlah mikroorganisme probiotik dalam produk keju yang dihasilkan karena bakteri probiotik menekankan pada perlunya bakteri yang hidup ketika dikonsumsi (Farnworth dan Champagne, 2010). Salah satu metode yang dikenal untuk meningkatkan keamanan mikrobiologi dalam produk makanan adalah dengan cara pemasakan, aktivitas air, penyesuaian pH

atau menggunakan pengawet, namun metode ini umumnya dapat mengurangi sifat organoleptik produk (Zheng dan Kennett, 2008) dan menurunkan populasi *B. longum* 15708 dengan cepat sehingga penggunaannya membutuhkan pendekatan lain yang dapat mempertahankan daya hidupnya selama produksi dan penyimpanan (Ding dan Shah, 2007; Talwalkar dan Kailasapathy, 2004^b).

Tabel 6. Jumlah bakteri asam laktat (BAL) keju lunak yang dihasilkan dari penambahan kultur BAL secara tunggal atau campuran

Kultur Starter	Populasi BAL (Log ₁₀ CFU/g)
BL	9.09 ± 0.29 ^b
LA	9.28 ± 0.23 ^{ab}
LL	9.33 ± 0.11 ^{ab}
BL-LA	9.09 ± 0.21 ^b
BL-LL	9.17 ± 0.17 ^{ab}
LA-LL	9.32 ± 0.40 ^{ab}
BL-LA-LL	9.38 ± 0.42 ^a

BL = *Bifidobacterium longum*, LA = *Lactobacillus acidophilus*, LL = *Lactococcus lactis*; ^{a,b} huruf superskrip yang berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata ($p < 0.05$)

Tabel 7. Jumlah bakteri asam laktat (BAL) selama penyimpanan

Kultur Starter	Populasi BAL (Log ₁₀ CFU/g)
H-1	9.34 ± 0.32 ^a
H-7	9.15 ± 0.27 ^b
H-14	9.19 ± 0.23 ^b

BL = *Bifidobacterium longum*, LA = *Lactobacillus acidophilus*, LL = *Lactococcus lactis*; ^{a,b} huruf superskrip yang berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata ($p < 0.05$)

Jumlah kultur starter probiotik tergantung pada matriks keju dan target yang akan dicapai, seperti mengetahui latar belakang taksonomi dan fungsi bakteri yang digunakan, sehingga penggunaan media yang selektif sangat disarankan (Karimi *et al.* 2012). Keju segar memiliki umur simpan yang sangat terbatas dan mudah terkena mikroba patogen psikotropika sehingga perlu diupayakan untuk meningkatkan keamanan mikrobiologis produk. Populasi mikroba yang terdapat dalam dadih keju dipengaruhi oleh retensi pada saat renneting, kehilangan selama proses pengeluaran whey, proses *cheddaring* atau penggaraman dan turunnya viabilitas (daya tumbuh) pada saat proses selama 3-5 jam (Fortin *et al.* 2011). Berdasarkan uji Duncan terhadap penyimpanan, dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0.05$) terhadap jumlah BAL yang disimpan selama 1 hari (9.34 CFU/g) dibanding jumlah BAL setelah disimpan selama 7 dan 14 hari. Perubahan yang terjadi pada jumlah BAL disebabkan adanya kompetisi nutrisi pada proses penyimpanan, dimana bakteri yang satu menghambat pertumbuhan bakteri lainnya. Walau lama penyimpanan menyebabkan perbedaan terhadap jumlah BAL, namun jumlah BAL dalam keju lunak masih menunjukkan populasi yang tinggi (9.15-9.38 CFU/g), sehingga dapat dikategorikan sebagai probiotik dan menunjukkan BAL yang ditambahkan mampu beradaptasi terhadap matriks keju sehingga mampu bertahan selama 14 hari penyimpanan pada suhu 5°C. Komponen-komponen yang membentuk matriks keju berperan melindungi bakteri probiotik selama melewati saluran pencernaan dan selama penyimpanan, karena keju mempunyai konsistensi

padat, kadar lemak dan pH yang lebih tinggi dibanding produk fermentasi lainnya (Boylston, 2004).

KESIMPULAN

Penambahan kultur bakteri asam laktat menurunkan pH selama 14 hari penyimpanan dengan karakteristik keju lunak. Penambahan bakteri LA secara tunggal menghasilkan karbohidrat lebih tinggi dibandingkan penambahan LA secara campuran dengan kadar lemak yang rendah. Kombinasi ketiga kultur starter yang ditambahkan secara tunggal atau campuran tidak menyebabkan penghambatan pada kultur yang lain, sehingga mencapai jumlah di atas $9.0 \log_{10}$ CFU/g dan tetap bertahan selama penyimpanan 14 hari sehingga berpotensi sebagai kandidat makanan probiotik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Kementerian Riset dan Teknologi RI, Jakarta dan Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Cibinong.

DAFTAR PUSTAKA

- Axelsson L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen S, von Wright AT, Ouwehand A. 2004. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. 3rd ed. NY: Marcell Dekker Inc. Hal 629.
- Boylston TD, Vinderola CG, Ghodussi HB, Reinheimer JA. 2004. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *Int Dairy J* 14: 375-387. DOI: 10.1016/j.idairyj.2003.08.008.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2011. SNI No. 3141.1:2011. Susu Segar. Badan Standardisasi Nasional Jakarta.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 1992. SNI No. 01-2980-1992. Keju Cedar olahan. Badan Standardisasi Nasional Jakarta.
- Buriti FCA, da Rocha JS, Saad SMI. 2005. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *Int Dairy J* 15: 1279-1288. DOI: 10.1016/j.idairyj.2004.12.011.
- Buriti FCA, Okazaki TY, Alegro JH, Alergo, Saad SM. 2007. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh cheese in comparison with the traditional products. *Archv Lat Am Nutr* 57: 179-185.
- Casalta E, Montel MC. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactococcus* genus. *Int J Food Microbiol* 126: 271-273. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.013.
- Chen CC, Walker WA. 2005. Probiotics and prebiotics: role in clinical disease states. *Adv Padiatr* 52: 77-113. DOI: 10.1016/j.yapd.2005.03.001.
- Darukaradhy J, Phillips M, Kailasapathy K. 2006. Selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp, starter lactic acid bacteria and non starter lactic acid bacteria from cheddar cheese. *Int Dairy J* 16: 439-445. DOI: 10.1016/j.idairyj.2005.06.009.
- Ding WK, Shah NP. 2007. Acid, bile and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *J Food Sci* 72: M446-M450. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2007.00565.x.
- Everett DW, Auty MAE. 2008. Cheese structure and current methods of analysis. *Int Dairy J*: 759-773. DOI: 10.1016/j.idairyj.2008.03.012.
- Farke NY. 2004. Cheese technology. *Int Dairy J Tech* 57: 91-98.
- Farnworth ER, Champagne C. 2010. Bioactive Foods in Promoting Health. Probiotics and Prebiotics. Elsevier Inc.
- Fritzen-Freire CB, Müller CMO, Laurindo JB, Prudencio. 2010. The influence of *Bifidobacterium* Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. *J Food Eng* 96: 621-627. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2009.09.010.
- Fortin MH, Champagne CP, St-Gelais D, Britten M. 2011. Effect of time of inoculation, starter addition, oxygen level and salting on the viability of probiotic cultures during cheddar cheese production. *Int Dairy J* 21: 75-82. DOI: 10.1016/j.idairyj.2010.09.007.
- Hansen A, Schieberle P. 2005. Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends Food Sci Technol* 16: 85-94. DOI: 10.1016/j.tifs.2004.03.007.
- Hadadji M, Bensoltane A. 2006. Growth and lactic acid production by *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* in goat's milk. *Afr J Biotechnol* 5: 505-509.
- Heller KJ, Bockelmann W, Schrezenmeir J, de Verse M. 2008. Cheese and Its Potential as a Probiotic Food. In: Farnworth ER. (Ed). Handbook of Fermented Functional Foods. 2nd ed. US: CRC Pr.
- Homayouni A, Azizi A, Ehsani MR, Yarmand MS, Razavi SH. 2008. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chem* 111: 50-55. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.03.036.
- Huppertz T, Patrick FF, Kelly AL. 2004. Effects of high pressure treatment on the yield of cheese curd from bovine milk. *Innov Food Sci Emer* 5: 1-8. DOI: 10.1016/j.ifset.2003.09.001.
- Jamilatun M. 2009. Optimalisasi Fermentasi *Rhizopus oryzae* dalam Pembentukan *curd* dan Analisis Kualitas Keju Mentah yang Terbentuk. [Tesis]. Program Pascasarjana. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Jandu N, Zeng ZJ, Johnson-Henry KC, Sherman PM. 2009. Probiotics prevent enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-mediated inhibition of interferon-gamma-induced

- tyrosine phosphorylation of STAT-1. *Microbiol* 155: 531-540. DOI: 10.1099/mic.0.021931-0.
- Kailasapathy K, Harmstorf I, Phillips M. 2008. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* in stirred fruit yogurts. *LWT-Food Sci Technol* 41: 1317-1322. DOI: 10.1016/j.lwt.2007.08.009.
- Karimi R, Mortazavian AM, Da Cruz AG. 2011. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage [Review]. *Dairy Sci Technol* 91: 283-308. DOI: 10.1007/s13594-011-0005-x.
- Karimi R, Mortazavian AM, Amiri-Rigi A. 2012. Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese. *Food Microbiol* 29: 1-9. DOI: 10.1016/j.fm.2011.08.008.
- Kasimoğlu A, Göncüoğlu M, Akgü A. 2004. Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. *Int Dairy J* 14: 1067-1073. DOI: 10.1016/j.idairyj.2004.04.006.
- Kheadr E, Dabour N, Le Lay C, Lacroix C, Fliss J. 2007. Antibiotic susceptibility profile of bifidobacteria as affected by oxgall, acid and hydrogen peroxide stress. *Antimicrobiol Agent Chemo* 51: 169-174. DOI: 10.1128/AAC.00261-06.
- Kok J, Buist G, Zomer AL, van Hijum SAFT, Kuipers OP. 2005. Comparative and functional genomics of lactococci [Review]. *FEMS Microbiol Rev* 29: 411-433.
- Kusmiati, Malik A. 2002. Aktivitas bakteriosin dari bakteri *Leuconostoc mesenteroides* pada berbagai media. *Makara Kesehatan* 6: 1-7.
- Madureira A, Pereira CI, Truszkowska K, Gomes AM, Pintado ME, Malcata FX. 2005. Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. *Int Dairy J* 15: 921-927. DOI: 10.1016/j.idairyj.2004.08.025.
- Maheswari RRA, Wiryawan IKG, Maduningsih GL. 2008. Stability of two probiotics bacteria of goat milk yoghurt in rat digestive tract. *Microbiol* 2: 124-130.
- McSweeney PLH. 2007. *Cheese Problems Solved*. England: CRS Pr.
- McSweeney PLH, Sousa MJ. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening [Review]. *Le Lait Dairy Sci Technol* 80: 293-324. DOI: 10.1051/lait:2000127.
- Mistry VV. 2001. Low fat cheese technology. *Int Dairy J* 11: 413-422. DOI: 10.1016/S0958-6946(01)00077-2.
- Odamaki T, Yonezawa S, Sugahara H, Xiao JZ, Yaeshima T, Iwatsuki K. 2011. A one step genotypic identification of *Lactococcus lactis* subspecies at the species/strain levels. *Syst Appl Microbiol* 34: 429-434. DOI: 10.1016/j.syapm.2011.01.011.
- Ong L, Henrikson A, Shah NP. 2006. Development of probiotic cheddar cheese containing *Lb. acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *Int Dairy J* 16: 446-456. DOI: 10.1016/j.idairyj.2005.05.008.
- Ong L, Dagastine RR, Kentish SE, Gras SL. 2012. The effect of pH at renneting on the microstructure, composition and texture of cheddar cheese. *Food Res Int* 48: 119-130. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.02.020.
- Phillips M, Kailasapathy K, Tran L. 2006. Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. *Int J Food Microbiol* 108: 276-280. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.009.
- Rautava S, Salminen S, Isolauri E. 2009. Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy—a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *British J Nutr* 101: 1722-1726. DOI: 10.1017/S0007114508116282.
- Reid G. 2008. Probiotics and prebiotics—progress and challenges. *Int Dairy J* 18: 969-975. DOI: 10.1016/j.idairyj.2007.11.025.
- Riahi MH, Trelea IC, Leclercq MN, Picque D, Corrieu G. 2007. Model for changes in weight and dry matter during the ripening of a smear soft cheese under controlled temperature and relative humidity. *Int Dairy J* 17: 946-953. DOI: 10.1016/j.idairyj.2006.11.002.
- Roy D. 2005. Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Le Lait Dairy Sci Technol* 85: 39-56. DOI: 10.1051/lait:2004026.
- Sanders ME. 2003. Probiotics: considerations for human health. [Reviews]. *Nutr Rev* 61: 91-99.
- Sartory DP. 2005. Validation, verification and comparison: adopting new methods in water microbiology. *SA Water Res Comm* 31: 393-396.
- Shah NP. 2007. Functional cultures and health benefits. *Int Dairy J* 17: 1262-1277. DOI: 10.1016/j.idairyj.2007.01.014.
- Siddique F, Anjum FM, Huma N, Jamil A. 2010. Effect of different UHT processing temperatures on ash and lactose content of milk during storage at different temperatures. *Int J Agr Biol* 12: 439-442.
- Steijns JM. 2001. Milk ingredients as nutraceuticals. *Int J Dairy Technol* 54: 81-88. DOI: 10.1046/j.1364-727x.2001.00019.x.
- Talwalkar A, Kailasapathy K. 2004^a. Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts. *Int Dairy J* 14: 143-149. DOI: 10.1016/S0958-6946(03)00172-9.
- Talwalkar A, Kailasapathy K. 2004^b. A review of oxygen toxicity on probiotic yoghurts: influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. *Comp Rev Food Sci Food S* 3: 117-124. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2004.tb00061.x.
- Tamime AY, Robinson RK. 2000. *Yoghurt: Science and Technology*. 2nd Edition. Boston: CRC Pr.

- Temmerman R, Scheirlinck I, Huys G, Swings J. 2003. Culture independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 69: 220-226. DOI: 10.1128/AEM.69.1.220-226.2003.
- Vedamuthu ER. 2006. Starter Cultures for Yogurt and Fermented Milks. In: Chandan RC. (ed). *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*. US: Blackwell Pub Prof.
- Wagar LE, Champagne CP, Buckley ND, Raymond Y, Green-Johnson JM. 2009. Immunomodulatory properties of fermented soy and dairy milks prepared with lactic acid bacteria. *J Food Sci* 74: M423-M430. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01308.x.
- Walstra P, Wouters JTM, Geurts. 2006. *Dairy Science and Technology*. 2nd. NY:CRC.
- Zheng Z, Kennett C. 2008. *Methods of Making Fresh Cheese with Enhanced Microbiological Safety*. US:Patent Appl Pub No. US2008/0152757 A1.