

Fermentasi Mikroaerofilik *Lactobacillus acidophilus* untuk Produksi Probiotik

Ir. Unung Leoanggraini, MT dan Ir. Bintang Ihwan Muhadi, MSc
Jurusan Teknik Kimia, Politeknik Negeri Bandung
Jl Gegerkalong Hilir, Ds. Ciwaruga Kotak Pos 1234, Bandung 40012
Telp. 022-2016403
Email: ununglz@yahoo.com

Abstrak

Probiotik dikenal sebagai salah satu makanan fungsional yang bermanfaat bagi kesehatan dalam upaya pencegahan dan perawatan berbagai macam penyakit berbahaya seperti kanker, infeksi/gangguan saluran cerna, dan infeksi hati, serta berpotensi menurunkan kadar kolesterol darah dan menurunkan tekanan darah. *Lactobacillus acidophilus* termasuk salah satu jenis mikroba probiotik yang bersifat fakultatif anaerob, yaitu memerlukan oksigen dalam jumlah sedikit untuk proses pertumbuhannya. Pada penelitian ini dilakukan proses fermentasi *Lactobacillus acidophilus* secara mikroaerofilik sehingga dapat meningkatkan konsentrasi biomassa sel. Proses fermentasi menggunakan substrat kaldu MRS secara batch dengan variasi laju aerasi 0,4 L/menit; 0,79 L/menit serta tanpa aerasi. Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa proses aerasi dapat meningkatkan konsentrasi biomassa sel dengan hasil tertinggi sebesar 3,421g/L pada laju aerasi 0,79 L/menit, dibandingkan proses tanpa aerasi yang menghasilkan konsentrasi biomassa sel sebesar 3,005 g/L.

Kata Kunci : fermentasi, *Lactobacillus acidophilus*, mikroaerofilik, probiotik

Pendahuluan

Pada era globalisasi ini, pola hidup yang serba cepat menyebabkan manusia lebih menyukai segala sesuatu yang serba praktis dan cepat, termasuk dalam pola mengkonsumsi makanan. Pola hidup yang kurang baik serta konsumsi makanan yang tidak sehat, menyebabkan persentase bakteri merugikan dalam tubuh lebih besar dibandingkan bakteri menguntungkan, sehingga dapat memicu berbagai penyakit berbahaya. Salah satu cara untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan mengkonsumsi makanan yang tidak hanya mengenyangkan, tetapi juga mempunyai nilai gizi dan fungsi tambahan terhadap pemeliharaan kesehatan serta pencegahan penyakit. Konsumsi probiotik dapat menjaga keseimbangan mikroflora normal dalam saluran pencernaan manusia, meningkatkan system imun, membantu proses penyerapan mineral, dan meningkatkan pemanfaatan nutrisi. Selain itu probiotik juga dikenal sebagai salah satu makanan fungsional yang berguna untuk pencegahan berbagai macam penyakit berbahaya seperti kanker, infeksi/gangguan saluran cerna, dan infeksi hati, serta berpotensi menurunkan kadar kolesterol darah dan menurunkan tekanan darah [1].

Probiotik dapat berupa kultur tunggal atau campuran dari mikroorganisme hidup yang apabila diberikan kepada manusia atau hewan dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen/bakteri penyebab penyakit yang ada diusus

manusia/hewan. Persyaratan yang harus dipenuhi sebagai mikroba probiotik antara lain bahwa mikroba tersebut harus aman saat dikonsumsi, tidak menyebabkan penyakit, tidak memproduksi racun dan tidak resisten terhadap antibiotik, mampu bertahan hidup dalam saluran cerna, resisten terhadap kondisi asam dan cairan empedu, tetap hidup dan stabil dalam penyimpanan, serta memiliki konsentrasi minimal 10^8 cfu/g. [2,3].

Bakteri *Lactobacillus acidophilus* merupakan salah satu jenis bakteri asam laktat yang dapat digunakan sebagai mikroba probiotik. Bakteri asam laktat (*Lactic Acid Bacteria*/LAB) telah lama digunakan dalam industri makanan karena mampu mengkonversi gula termasuk laktosa dan karbohidrat lain menjadi asam laktat. Bakteri ini memberikan karakteristik rasa asam pada makanan olahan susu fermentasi seperti *yoghurt*, dan juga menghasilkan pH yang rendah, sehingga dapat mencegah pertumbuhan bagi mikroba yang lain, serta mampu bertahan hidup di lambung dalam jumlah ribuan bakteri [4]. Genus *Lactobacillus sp.* secara umum merupakan bakteri gram positif (mengandung banyak peptidoglikan), tidak membentuk spora, berbentuk batang, bersifat fakultatif anaerob (bakteri yang membutuhkan oksigen dalam jumlah kecil untuk pertumbuhannya), suhu optimum pertumbuhannya berkisar antara 30-40 °C, dengan pH pertumbuhan optimum pada 5,5 -5,8, tapi pada umumnya dapat tumbuh pada pH di bawah 5. Genus *Lactobacillus sp.*

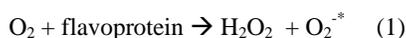
dapat dibedakan atas kelompok homofermentatif (bakteri yang mampu memecah gula menjadi asam laktat sebagai produk utama), dan kelompok heterofermentatif (bakteri yang mampu memecah gula menjadi asam laktat dan produk-produk lain seperti alkohol, asetat dan karbon dioksida.) [5].

Pada proses fermentasi menggunakan bakteri *Lactobacillus sp.* glukosa dikonversi untuk menghasilkan biomassa, asam laktat, dan produk-produk senyawa lain. Fermentasi glukosa pada prinsipnya terdiri dari dua tahap, yaitu :

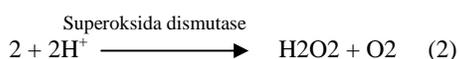
1. Pemecahan rantai karbon dari glukosa dan pelepasan paling sedikit dua pasang atom hidrogen, menghasilkan senyawa karbon lainnya yang lebih mudah teroksidasi daripada glukosa
2. Senyawa yang teroksidasi tersebut direduksi kembali oleh atom hidrogen yang dilepaskan dalam tahap pertama, membentuk senyawa-senyawa lain sebagai hasil fermentasi.

Reaksi oksidasi tidak berlangsung tanpa reaksi reduksi yang seimbang, oleh karena itu jumlah atom hidrogen yang dilepaskan pada tahap pertama fermentasi, seimbang dengan jumlah yang digunakan dalam tahap kedua. Pada tahap pertama fermentasi glukosa selalu terbentuk asam piruvat. Pada tahap kedua fermentasi, asam piruvat akan diubah menjadi produk-produk akhir yang spesifik untuk berbagai proses fermentasi, menggunakan atom hidrogen yang diproduksi pada tahap pertama fermentasi. Produk-produk tersebut terbentuk oleh reaksi-reaksi yang dikatalisis oleh enzim-enzim tertentu. Pada bakteri asam laktat, asam piruvat yang terbentuk dari jalur glikolisis (EMP) bertindak sebagai penerima hidrogen. Reduksi asam piruvat oleh NADH₂ ini menghasilkan asam laktat. Fermentasi tersebut disebut fermentasi heterolaktat karena selain dihasilkan asam laktat, dihasilkan pula asam sitrat. [6].

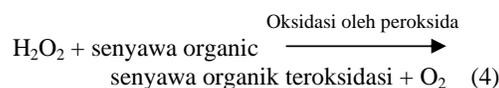
Berdasarkan kebutuhan oksigen untuk pertumbuhannya, bakteri dapat dikelompokkan menjadi bakteri aerobik, anaerobik dan anaerobik fakultatif. Suatu bakteri dapat bersifat aerobik atau anaerobik karena setiap bakteri mempunyai suatu enzim yang tergolong flavoprotein yang dapat bereaksi dengan oksigen membentuk senyawa-senyawa beracun yaitu H₂O₂ dan suatu radikal bebas yaitu O₂^{-*}, seperti ditunjukkan dalam persamaan reaksi 1:



Bakteri yang bersifat aerobik dan bersifat anaerobik tetapi tidak sensitive terhadap oksigen (aerotoleran) mempunyai enzim superoksida dismutase yang memecah radikal bebas tersebut, dan enzim katalase yang memecah H₂O₂ sehingga menghasilkan senyawa-senyawa akhir yang tidak beracun. Persamaan reaksi tersebut ditunjukkan dalam persamaan (2) dan (3).



Bakteri yang bersifat anaerobik fakultatif juga mempunyai enzim superoksida dismutase, tetapi tidak mempunyai enzim katalase, melainkan mempunyai enzim peroksida yang mengkatalisis reaksi antara H₂O₂ dengan senyawa organik, sehingga menghasilkan senyawa yang tidak beracun. Reaksinya adalah sebagai berikut :



Bakteri yang bersifat anaerobik tidak mempunyai enzim superoksida dismutase maupun katalase, oleh karena itu oksigen merupakan racun bagi bakteri tersebut, karena senyawa yang terbentuk dari reaksi flavoprotein dengan oksigen, yaitu H₂O₂ dan O₂^{-*} tidak dapat dipecah oleh bakteri tersebut [7].

Fermentasi asam laktat dapat berlangsung pada kondisi aerob dan fermentasi anaerob. Pada kondisi anaerob, proses fermentasi menghasilkan produk utama berupa asam laktat, sehingga pertumbuhan biomassa berlangsung lambat dan cenderung stasioner. Pada kondisi fermentasi aerob, produk utama yang dihasilkan berupa asam asetat, tetapi pertumbuhan biomassa sel berlangsung lebih cepat dibandingkan fermentasi anaerob. Pada fermentasi aerob ini, glukosa akan digunakan untuk respirasi. Pemecahan satu molekul glukosa menjadi dua molekul asam piruvat secara glikolisis akan menghasilkan dua molekul ATP. Pemecahan glukosa secara respirasi akan menghasilkan ATP dalam jumlah lebih tinggi dibandingkan dengan pemecahan glukosa secara fermentasi anaerob. [8].

Bakteri yang bersifat anaerob fakultatif pada umumnya pertumbuhannya akan lebih baik pada kondisi erobik daripada dalam keadaan anaerobik. Beberapa jenis bakteri yang bersifat aerobik membutuhkan oksigen dengan konsentrasi yang relatif rendah yaitu jauh di bawah konsentrasi oksigen di atmosfer. Bakteri jenis ini disebut bersifat mikroaerofilik, dan mempunyai enzim, diantaranya hidrogenase, yang menjadi tidak aktif jika konsentrasi oksigen di lingkungan sekitarnya terlalu tinggi. Beberapa faktor dapat mempengaruhi kebutuhan total oksigen mikroba, yang terpenting diantaranya jenis sel, fase pertumbuhan mikroba, nutrisi karbon, dan pH. Pemilihan sumber karbon merupakan hal utama yang mempengaruhi kebutuhan oksigen. Misalnya, glukosa umumnya dimetabolisasi dengan lebih cepat dibandingkan bahan karbohidrat lainnya. Kebutuhan oksigen tertinggi telah diamati pada jamur *Penicillium* dengan menggunakan laktosa, sukrosa dan glukosa berturut-turut adalah 4,9 mol/L.jam, 6,7 mol/L.jam dan 13,4 mol/L.jam. Kebutuhan oksigen bagi biomassa sel antara lain digunakan untuk pemeliharaan sel, oksidasi pada pernapasan untuk pertumbuhan lebih lanjut dan

oksidasi substrat yang berhubungan dengan metabolisme produk akhir. Penggunaan oksigen untuk pertumbuhan berkaitan dengan jumlah konsumsi sumber karbon yang berasal dari substrat.[7]

Proses fermentasi untuk produksi probiotik ditujukan untuk menghasilkan biomassa sebagai produk akhir. Proses produksi ini dapat dilakukan dalam proses *batch* dengan sel tersuspensi. Kemampuan mikroorganisme untuk tumbuh dan bertahan sangat bergantung pada kemampuan mikroba untuk beradaptasi terhadap lingkungan. Pada proses *batch*, konsentrasi pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh kondisi medium pertumbuhan. Selama proses fermentasi mikroorganisme mengkonsumsi substrat untuk dikonversi menjadi biomassa atau produk metabolit, sehingga konsentrasi substrat semakin lama semakin menurun. Penambahan substrat yang besar di awal dapat menyebabkan reaksi katalitik enzim berkurang seiring dengan konsentrasi substrat yang berlebih fenomena ini disebut dengan inhibisi substrat. Inhibisi substrat oleh konsentrasi substrat yang tinggi dapat menyebabkan penurunan konsentrasi asam laktat dan produktivitas bakteri [9]. Dalam proses *batch*, kandungan oksigen terlarut dan konsentrasi substrat semakin lama akan semakin menurun sehingga pertumbuhan bakteri kurang optimal. Selain itu, pada fermentasi *batch* anaerob, proses metabolisme yang dilakukan oleh mikroba cenderung menghasilkan produk utama asam laktat, sehingga konsentrasi sel yang dihasilkan lebih sedikit dibandingkan pada proses fermentasi aerob. [10].

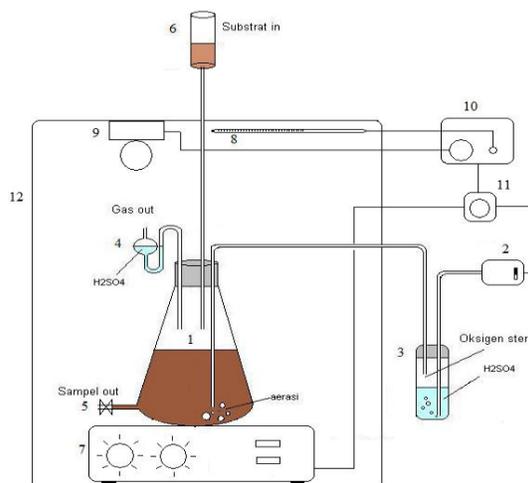
Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji pengaruh laju aerasi pada proses fermentasi mikroaerofilik *Lactobacillus acidophilus* untuk menghasilkan biomassa sel sebagai probiotik.

Metodologi Penelitian

Penelitian ini menggunakan mikroorganisma *Lactobacillus acidophilus* yang diperoleh dari Laboratorium Farmasi ITB, sedangkan media produksi yang digunakan adalah media sintesis berupa kaldu MRS. Media yang digunakan untuk peremajaan kultur induk dan kultur kerja adalah MRS-agar, sedangkan untuk pembuatan inokulum digunakan media kaldu MRS dan diinkubasi pada temperature 37°C.

Skema peralatan yang digunakan dalam proses fermentasi ditunjukkan dalam gambar 1. Volume kerja yang digunakan adalah 700 ml dengan volume inokulum 10% dan temperature dijaga konstan pada 37°C. Variabel proses yang divariasikan adalah laju aerasi dengan laju 0,4 dan 0,79 L/menit, serta tanpa aerasi.

Analisis konsentrasi produk biomassa dilakukan dengan metoda spektrofotometri. Pengukuran absorbansi sampel pada metoda spektrofotometri diukur pada nilai panjang gelombang yang menghasilkan nilai absorbansi maksimum yaitu pada 450 nm.



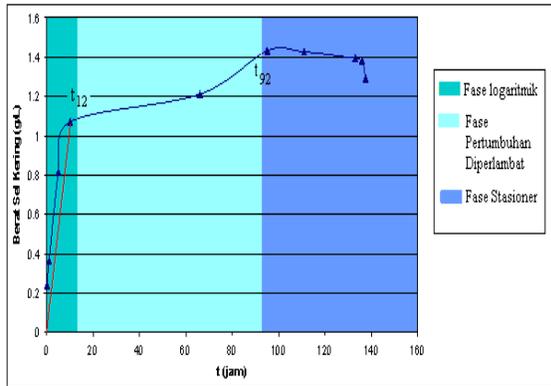
Gambar 1. Skema fermentor

Keterangan gambar:

1. Labu erlenmeyer 1 liter
2. Aerator
3. Tabung sterilisasi gas
4. Leher angsa
5. Selang keluaran sampel
6. Tabung penyimpan substrat
7. Shaker
8. Termometer
9. Lampu pijar
10. Temperature regulator
11. sumber listrik
12. Inkubator

Hasil dan Pembahasan

Pertumbuhan bakteri *Lactobacillus acidophilus* diamati sebagai perubahan konsentrasi sel selama proses fermentasi, seperti ditunjukkan pada Gambar 2. Pada awal proses fermentasi *batch* ini tidak terlihat adanya fase lag atau fase ini berlangsung dengan sangat singkat. Hal ini diakibatkan karena proses pemindahan inokulum ke dalam media pertumbuhan dilakukan pada saat aktivitas bakteri berada pada kondisi optimum sehingga dapat mempersingkat atau bahkan menghilangkan fase lag pada proses fermentasi. Fase lag merupakan fase ketika bakteri mengalami proses adaptasi terhadap lingkungan serta merupakan fase yang tidak dikehendaki pada proses fermentasi.



Gambar 2 Kurva pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* pada proses *batch* tanpa aerasi

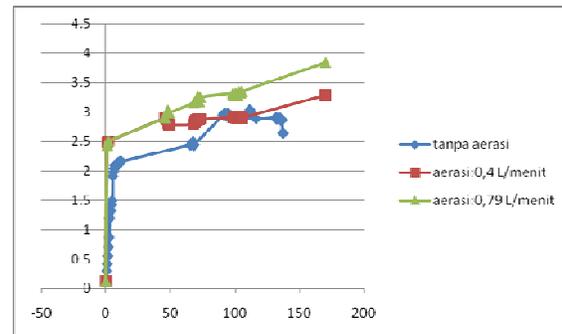
Fase logaritmik untuk bakteri *Lactobacillus acidophilus* berlangsung selama 12 jam setelah proses fermentasi berlangsung. Pada fase ini sel bakteri membelah dengan cepat dan konstan dengan aktivitas metabolisme yang tinggi sehingga menghasilkan laju pertumbuhan yang paling tinggi dibandingkan dengan fase-fase lainnya. Fase logaritmik ini merupakan fase yang tepat untuk pemindahan bakteri ke media fermentasi dengan volume yang lebih besar.

Fase pertumbuhan diperlambat dari pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* ini cukup panjang, mulai dari jam ke -12 (t_{12}) sampai dengan jam ke-92 (t_{92}) proses fermentasi, selain itu terlihat pula bahwa slope pertumbuhan bakteri ini tidak terlalu besar. Pada fase ini ketersediaan substrat, nutrisi, dan kondisi media fermentasi kurang mendukung pertumbuhan mikroba. Hal ini dapat diakibatkan karena konsentrasi substrat, konsentrasi oksigen terlarut yang semakin menurundan juga akumulasi produk metabolit hasil metabolisme yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, tekanan osmosis yang tinggi dari sel, serta berkurangnya aktifitas air bergabung dengan plasmolisis menyebabkan penurunan laju fermentasi dan pemanfaatan gula. [10]. Selain itu kondisi fermentasi anaerobik akan cenderung kepada proses pembentukan asam laktat sebagai produk akhir, sehingga akan turut menghambat laju pertumbuhan biomassa sel. Produk metabolit yang dihasilkan selama proses fermentasi dilepas ke dalam media. Produk tersebut bersifat asam, sehingga dapat menurunkan pH media selama proses fermentasi berlangsung dari pH awal 5,78 hingga menjadi 3,6 pada akhir proses. Fase pertumbuhan diperlambat ini berlangsung cukup panjang, yaitu selama 80 jam.

Setelah proses fermentasi memasuki jam ke-92 (t_{92}), bakteri memasuki fase stasioner hingga proses fermentasi berakhir pada jam ke -137 (t_{137}). Pada fase ini laju pertumbuhan bakteri mengalami penurunan akibat konsentrasi substrat sudah tidak mencukupi untuk pertumbuhan mikroba sehingga jumlah sel bakteri yang

hidup hampir sama dengan jumlah sel yang mati. Perubahan konsentrasi sel pada fase ini hampir tidak ada selama 45 jam terakhir pada proses fermentasi.

Pada proses fermentasi *Lactobacillus acidophilus* ini selanjutnya dilakukan proses aerasi. Hal ini dilakukan untuk menggeser proses metabolisme yang semula pada kondisi anaerob, menghasilkan asam laktat sebagai produk utama menjadi proses aerob dan menghasilkan biomassa sebagai produk utama. Hasil percobaan pengaruh laju aerasi terhadap pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* ditunjukkan pada gambar 3.



Gambar 3. Kurva Pengaruh laju aerasi terhadap konsentrasi biomassa sel *Lactobacillus acidophilus* selama 170 jam proses fermentasi.

Pada percobaan ini, kondisi fermentasi dengan aerasi menghasilkan biomassa sel yang lebih banyak dibandingkan dengan proses fermentasi tanpa aerasi. Pada proses fermentasi *batch* tanpa aerasi diperoleh konsentrasi sel (berat sel kering) tertinggi sebesar 3,005 g/L, selama waktu fermentasi 112 jam. Konsentrasi ini lebih rendah dibandingkan pada fermentasi *batch* dengan aerasi yang mencapai konsentrasi tertinggi sebesar 3,006 dan 3,421 untuk laju aerasi 0,4 L/menit dan 0,79 L/menit.

Peningkatan laju aerasi tersebut dapat meningkatkan konsentrasi biomassa sel, karena kondisi lingkungan fermentasi dengan suplai oksigen selama proses dapat mempertahankan konsentrasi oksigen terlarut di dalam media. Apabila laju aerasi terlalu rendah, maka perolehan konsentrasi sel tidak akan terlalu berpengaruh terhadap proses pertumbuhan biomassa, sedangkan apabila laju aerasi yang diberikan terlalu besar akan membunuh bakteri tersebut karena oksigen berlebih tersebut akan bersifat *toxic* terhadap bakteri yang difermentasikan. Oksigen yang berlebih akan mengganggu metabolisme bakteri sehingga pembentukan bio massa sel tidak akan optimal.

Pengukuran pH pada awal dan akhir proses dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan bakteri *Lactobacillus acidophilus*. pH pertumbuhan optimum untuk bakteri *Lactobacillus acidophilus* adalah 5,5 – 5,8. Nilai pH pada proses fermentasi, ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1. Perubahan nilai pH awal dan akhir proses fermentasi pada variasi nilai laju aerasi

Laju Aerasi (L/menit)	pH	
	awal	akhir
0	5,78	3,6
0,4	5,80	3,42
0,79	5,80	3,53

Tabel 1 menunjukkan bahwa selama proses fermentasi berlangsung baik untuk proses dengan aerasi ataupun tanpa aerasi secara umum terjadi penurunan nilai pH dari awal hingga akhir proses. Penurunan pH pada proses tanpa aerasi diikuti dengan penurunan pertumbuhan biomassa, sebaliknya pada proses dengan aerasi penurunan pH diikuti dengan peningkatan konsentrasi biomassa. Hal ini diakibatkan karena pada proses tanpa aerasi, seiring dengan berlangsungnya proses fermentasi kondisi media fermentasi cenderung menjadi anaerobic, sehingga proses konversi substrat akan menghasilkan asam laktat dan pertumbuhan terhenti. Sebaliknya pada proses dengan aerasi konsentrasi oksigen terlarut dalam media dapat dipertahankan dan kondisi aerobic ini mengakibatkan proses pertumbuhan tetap dapat dipertahankan.

Kesimpulan

Proses aerasi pada fermentasi *Lactobacillus acidophilus* secara *batch* dapat meningkatkan konsentrasi biomassa sel pada akhir proses dan tetap mempertahankan laju pertumbuhan biomassa. Hasil konsentrasi biomassa tertinggi sebesar 3,421g/L diperoleh pada laju aerasi 0,79 L/menit, dibandingkan proses tanpa aerasi yang menghasilkan konsentrasi biomassa sel sebesar 3,005 g/L.

Daftar Pustaka

- [1] Sullivan, G. C., (2001). *Probiotic*, British Journal of Surgery, 88, Blackwell Science Ltd.
- [2] Goh, J. & O'Morain, C. A. (2003). *Review article: Nutrition and Adult Inflammatory Bowel Disease*. *Aliment Pharmacol Ther* 17.
- [3] Hamilton-Miller, J.M. (2003). *The role of probiotics in the treatment and prevention of Helicobacter pylori infection*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Volume 22
- [4] Miller, Craig W.(2002). *The influence of Packaging Materials on the Dissolved Oxygen Content of Probiotic Yoghurt*. *Packaging Technology and Science* ,15: 133-138
- [5] Charteris, William P., et al. 2001. *Quality Control Lactobacillus acidophilus For Use With API 50 CH and API ZYM Systems at 37 °C*. *J. Basic microbiol*, 41(5): 241-251.
- [6] Fardiaz, Srikandi. 1989. *Mikrobiologi Pangan* (Edisi ke-1). Bogor : Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi IPB.
- [7] Fu, W. and A.P. Mathews. 1999. *Lactic Acid Production From Lactose by Lactobacillus plantarum: Kinetic Model and Effects of pH, Substrate, and Oxygen*. *Biochemical Engineering Journal*, 3: 163-170.
- [8] Bailey, J.E., and D.F. Ollis. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals* .Singapore : Mc Graw-Hill.
- [9] Ding, S. and Tianwei Tan. 2006. *L-Lactic Acid Production by Lactobacillus casei Fermentation Using Different Fed -Batch Feeding Strategies*. *Process Biochemistry*, 41: 1451-1454.
- [10] Zannini, Emanuele. (2005). *Effect Of Process Parameters on the Production of Lactic Acid Bacteria in Batch Fermentation*. Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche 60131 Ancona, Italy. *Annals of Microbiology*, 55 (4)