

KINETIKA PERTUMBUHAN BAKTERI ASAM LAKTAT ISOLAT T5 YANG BERASAL DARI TEMPOYAK

[Growth Kinetic of Lactic Acid Bacteria, Isolate T5 Originated from Tempoyak]

Neti Yuliana¹⁾

¹⁾ Staf Pengajar Jurusan Teknologi Industri Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung
Telp. 0721-781823; email : yuliana_thp@unila.ac.id

ABSTRACT

The objective of this research was to study the growth kinetic of Lactic Acid Bacteria (isolate T5) originated from tempoyak. The results revealed that isolate T5 yielded a maximum OD value of 1,434 g/l, and biomass concentration of 2,553 g/g, while optimal growth kinetic of isolate T5 were 9 hours.

Keywords: Growth kinetic, lactic acid bacteria, tempoyak

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan salah satu organisme yang memfermentasi bahan pangan melalui fermentasi karbohidrat dan umumnya menghasilkan sejumlah besar asam laktat. Bakteri ini memberikan kontribusi yang cukup besar terhadap perbaikan flavour, tekstur, dan masa simpan produk fermentasi. BAL mempunyai distribusi yang luas dan kemampuan tumbuh pada berbagai substrat organik dan kondisi seperti kondisi asam, basa, suhu rendah, suhu tinggi, kadar garam tinggi, anaerob, sehingga menjadikan bakteri asam laktat sebagai kompetitor yang tangguh di semua sektor pengolahan pangan (Daulay, 1991). Pada berbagai jenis makanan fermentasi, keterlibatan BAL memberikan efek yang menguntungkan karena asam yang dihasilkan dapat mencegah pertumbuhan mikroba lain yang tidak dikehendaki selama proses fermentasi berlangsung (Rahayu *et al.*, 1999).

Keberhasilan proses fermentasi sangat dipengaruhi oleh keberhasilan dalam mengoptimalkan faktor-faktor dari

pertumbuhan mikroba yang diinginkan. Faktor-faktor tersebut akan memberikan kondisi yang berbeda untuk setiap mikroba sesuai dengan lingkungan hidupnya masing-masing sehingga mempengaruhi kinetika fermentasinya. Selain itu setiap bakteri akan menunjukkan perbedaan pola pertumbuhan, periode waktu yang dibutuhkan untuk tumbuh maupun beradaptasi, dan metabolit yang dihasilkan.

Studi mengenai kinetika pertumbuhan kultur mikroba dapat digunakan untuk menduga efisiensi biaya produksi dalam skala besar. Pentingnya mengetahui kinetika fermentasi tampak pada beberapa hasil penelitian misalnya pada kinetika pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* khamir pada produksi anggur apel (Wang *et al.*, 2004), model kinetika pertumbuhan sel *Aspergillus fumigatus* UB260 (Pazouki *et al.*, 2008), kinetika fermentasi yeast di bawah kondisi oksigen terbatas (Winkelhausen *et al.*, 2003), kinetika bakteri asam laktat asal keju putih (Haddadin, 2005), kinetika produksi biosurfaktan oleh *Bacillus subtilis* (Yuliana, 1997) dan oleh

Lactobacillus (Rodrigues *et al.*, 2006) dan lain-lain.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari kinetika pertumbuhan bakteri asam laktat (isolat T5) yang diisolasi dari tempoyak. Isolat T5 dipilih karena mempunyai daya adaptasi pertumbuhan yang baik dan telah berhasil diisolasi pada penelitian sebelumnya (Yuliana dan Rizal, 2006).

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan terdiri dari kultur bakteri asam laktat (isolat T5) yang telah diisolasi dari tempoyak. Bahan kimia untuk analisa, NaOH 0,01 N, indikator fenoltalein, air destilat, glukosa. Media yang digunakan adalah MRS Agar dan MRS Broth. Alat-alat yang digunakan adalah neraca analitik (Ohaus, USA), oven (Toyo Seisakusho Co, Jepang), centrifuge (Hitachi, Jepang), spektrofotometer (Shimadzu, Jepang), inkubator (Yamato, Jepang), refrigerator, vortex, buret, pH meter elektrik (Horiba, Jepang), autoclave model HA-30 (Tokyo Haramaya, Jepang), pemanas listrik, dan alat-alat gelas.

Metode Penelitian

Penelitian diawali dengan proses penyegaran kultur bakteri, inokulasi, dan fermentasi kultivasi isolat T5 dengan ulangan sebanyak tiga kali. Rata-rata data seluruh pengamatan diplotkan ke dalam bentuk kurva, dan dinyatakan sebagai kurva pertumbuhan dan dihitung untuk mendapatkan nilai laju pertumbuhan spesifik (μ) dan parameter kinetika lainnya. Nilai μ dihitung dengan menggunakan rumus $\ln x = \ln x_0 + \mu t$. Parameter total gula reduksi diukur dan digunakan untuk menghitung laju konsumsi substrat ($Y_{x/s}$).

Penyegaran Kultur

Penyegaran kultur dilakukan dengan mengambil kultur stok isolat T5 sebanyak 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam 24 ml media MRS Broth dan divortex sampai homogen ± 1 menit lalu diinkubasikan selama ± 20 jam pada suhu 37° C.

Inokulasi, dan Pengukuran terhadap Parameter Pengamatan

Sebanyak 1% dari kultur bakteri yang telah disegarkan diinokulasikan ke dalam erlenmeyer berisi 35 ml MRS broth steril yang semuanya berjumlah 10 erlenmeyer (1 erlenmeyer untuk setiap 3 jam pengamatan) dan dilakukan fermentasi selama 30 jam. Pengamatan terhadap nilai *optical density* (OD), pH, kadar biomassa dan gula reduksi dilakukan setiap 3 jam pengamatan yaitu dari jam ke-0 sampai jam ke-30.

Pengukuran Optical Density (OD)

Pengukuran OD dilakukan dengan metode langsung berdasarkan turbiditas dengan cara sebanyak 1 ml sampel diencerkan hingga 10 kali (1 ml sampel dimasukkan dalam 9 ml aquades) kemudian diamati nilai ODnya pada spektrofotometer pada panjang gelombang 441 nm.

Analisa Kadar Biomassa

Biomassa diukur berdasarkan berat sel kering menggunakan metode Scragg (1991). Sebanyak 10 ml cairan kultivasi disentrifius selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm dalam tabung yang telah dikeringkan dalam oven dan ditimbang sebelumnya. Setelah supernatan dibuang, secara hati-hati ditambahkan 5 ml NaCl 0,9% ke pelet sel untuk membersihkan sel dari media lalu disentrifius ulang pada kondisi yang sama dengan sebelumnya. Endapan sel kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 90°C selama 20 jam atau sampai beratnya

konstan. Kemudian tabung berisikan sel kering dimasukkan segera ke dalam desikator, setelah dingin tabung berisi sel

kering ditimbang. Berat kering sel (x) dapat dihitung sebagai berikut.

$$X \text{ (g/l)} = \frac{\text{Berat tabung berisi sel kering (g)} - \text{berat tabung kosong (g)}}{\text{Volume sampel (ml)}} \times 10^3$$

Total Gula Reduksi

Analisa total gula reduksi dilakukan menggunakan metode Modified Somogy's (Sudarmadji *et al.*, 1984). Sebanyak 10 sampel yang telah diencerkan hingga 50 kali dimasukkan ke dalam erlenmeyer, ditambah 10 ml aquades dan 10 ml Larutan Sol A. larutan kemudian dididihkan selama 3 menit di atas api dan didinginkan di atas air mengalir, ditambah 10 ml Larutan Sol B dan 10 ml Larutan Sol C. Larutan kemudian

dititrasi dengan Sodium Thiosulfat 0,05 N hingga terbentuk warna biru muda. Ditetesi dengan indikator amilum, apabila masih terbentuk warna hitam maka titrasi perlu ditambahkan hingga benar-benar terbentuk warna biru muda. Blanko dibuat dengan cara yang sama tetapi sampel diganti dengan aquades sebanyak 10 ml. Nilai total gula reduksi dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Total Gula reduksi (\%)} = \frac{(\text{ml titrasi blanko} - \text{ml titrasi sample}) \times 1,449 \times \text{FP}}{10}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Laju Pertumbuhan

Kurva pertumbuhan (Gambar 1), menunjukkan bahwa BAL isolat T5 mempunyai fase adaptasi relatif singkat sehingga tidak tampak pada kurva tersebut. Fase ini diduga terjadi pada waktu pertumbuhan ke-0 hingga ke-3 jam pertama, karena bakteri tersebut tumbuh pada media yang sama dengan media pada penyegaran maka penyesuaian diri dengan lingkungan yang baru berlangsung cepat.

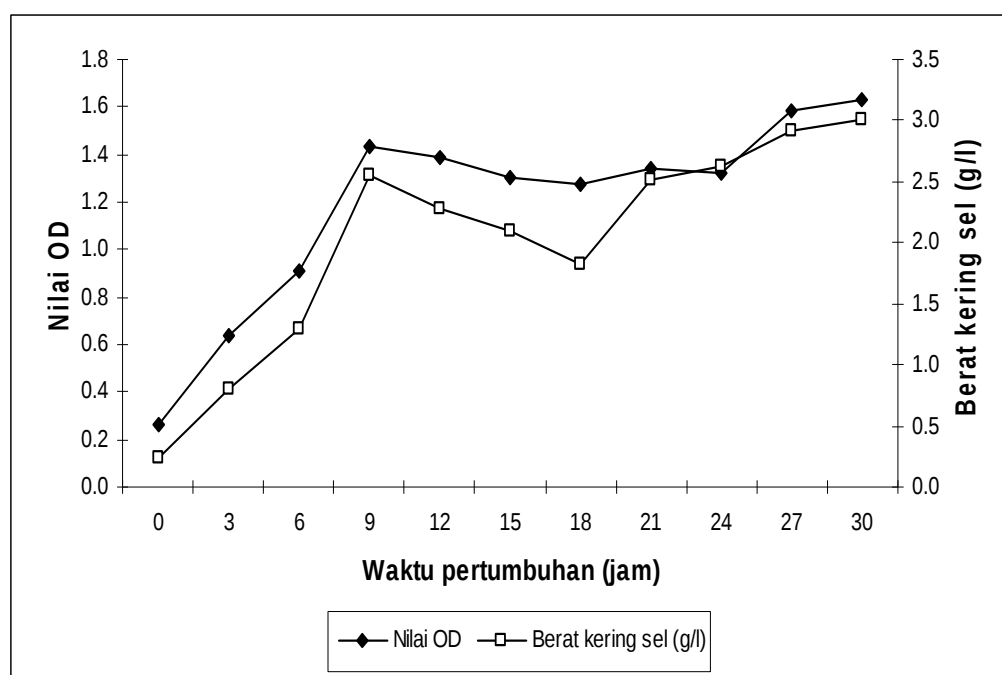
Jika mikroba dipindahkan ke dalam suatu media, mula-mula akan mengalami fase adaptasi untuk menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan di sekitarnya (Middelbeek *et al.*, 1992; Mangunwidjaja dan Suryani, 1994). Panjang atau pendeknya

fase adaptasi sangat ditentukan oleh jumlah sel yang diinokulasikan, kondisi fisiologis dan morfologis yang sesuai serta media kultivasi yang dibutuhkan (Scragg, 1991; Middelbeek *et al.*, 1992; Fardiaz, 1987). Apabila penyegaran inokulum telah sering dilakukan maka fase adaptasi dapat saja tidak diperlukan bakteri untuk menyesuaikan diri dengan lingkungannya. Middelbeek *et al.* (1992); Fardiaz (1987); menyatakan bahwa jika media dan lingkungan pertumbuhan sama seperti media dan lingkungan sebelumnya, mungkin tidak diperlukan waktu adaptasi.

Kurva pertumbuhan juga menunjukkan bahwa pada jam ke-9, isolat T5 telah memasuki fase logaritmik yang dicirikan dengan adanya pertumbuhan yang signifikan dari sel-selnya. Namun demikian fase logaritmik isolat T5 tersebut

berlangsung singkat yaitu dari jam ke-0 sampai jam ke-9. Pada waktu pertumbuhan ke-9 diperoleh nilai OD sebesar 1,434 dengan berat kering sel sebesar 2,553 g/l. Berdasarkan pola pertumbuhan logaritmiknya bakteri isolat T5 mempunyai nilai laju pertumbuhan spesifik (μ) sebesar 0,0598 jam^{-1} . Nilai ini sangat rendah jika dibandingkan dengan beberapa penelitian laju pertumbuhan bakteri asam laktat yang mencapai nilai 0,14 jam^{-1} misalnya pada fermentasi keju (Ghaly *et al.*, 2003). Hal ini mengindikasikan bahwa beberapa faktor

pertumbuhan isolat T5 perlu diperbaiki untuk meningkatkan laju pertumbuhannya. Beberapa penelitian menunjukkan pentingnya desain media untuk memperbaiki proses pertumbuhan bakteri asam laktat (Karim *et al.*, 2006; Ghaly *et al.*, 2003). Menurut Wenge dan Methews (1999), pertumbuhan dan penggunaan metabolisme dalam fermentasi dan proses jalur metabolik bakteri asam laktat sangat dipengaruhi oleh parameter fermentasi seperti suhu, pH, kecepatan agitasi dan tingkat oksigen terlarut.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan Isolat T5

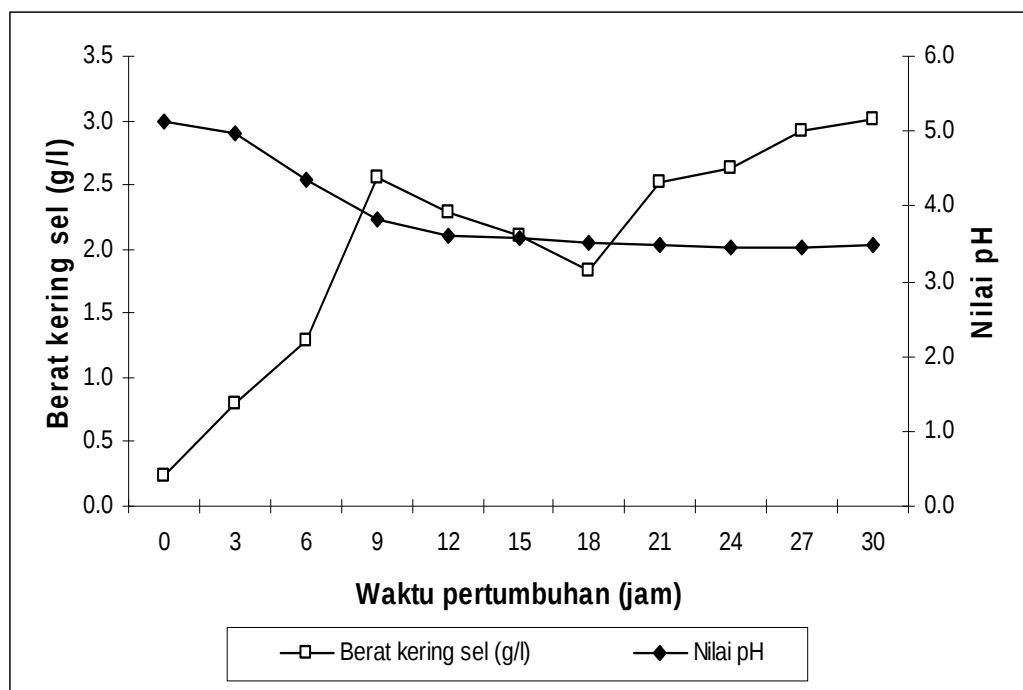
Pada fase logaritmik mikroba membelah dengan cepat dan konstan dan pada fase ini kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh media tempat tumbuhnya seperti pH dan kandungan nutrisi, juga kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembaban udara (Middelbeek *et al.*, 1992). Periode ini adalah keadaan

pertumbuhan yang seimbang atau mantap dengan laju pertumbuhan spesifik (μ) konstan, komposisi seluler tetap, sedangkan komposisi kimiawi media biakan berubah akibat terjadinya sintesis produk dan penggunaan substrat (Sa'id, 1987; Judoamidjojo, 1990; Mangunwidjaja dan Suryani, 1994).

Selanjutnya waktu pertumbuhan ke-18 hingga akhir waktu pertumbuhan jam ke-30, sel isolat T5 mengalami fase pertumbuhan yang relatif tetap atau memasuki fase stasioner. Pada fase ini jumlah populasi sel tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Sa'id, 1987; Judoamidjojo, 1990; Middelbeek *et al.*, 1992; Mangunwidjaja dan Suryani, 1994) menyatakan bahwa ukuran sel pada fase stasioner menjadi lebih kecil-kecil karena sel tetap membelah meskipun zat-zat nutrisi sudah habis. Pada fase ini laju pertumbuhan akhirnya menurun yang biasanya disebabkan karena kekurangan faktor pertumbuhan seperti vitamin dan unsur mineral (Gaman dan Sherrington, 1994). Berhentinya pertumbuhan juga dapat disebabkan oleh berkurangnya beberapa

nutrien esensial dalam media atau karena terjadinya akumulasi autotoksin dalam media atau kombinasi dari keduanya.

Setelah fase logaritmik pertama dapat saja terjadi akumulasi produk yang tidak diharapkan yang keberadaanya dapat menghambat pertumbuhan sel. Asam organik yang dihasilkan oleh BAL seperti asam laktat, asam asetat, atau asam piruvat (Sa'id, 1987; Judoamidjojo *et al.*, 1990) mengakibatkan akumulasi produk akhir asam dan turunnya pH yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan. Produk-produk yang mungkin dapat menghambat pertumbuhan selain asam laktat, dapat pula berupa karbondioksida, dan komponen-komponen netral lainnya (Daulay, 1991). Penurunan pH pada pertumbuhan isolat T5 dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Perbandingan berat kering sel (g/l) dan nilai pH terhadap waktu pertumbuhan (jam) pada isolat T5

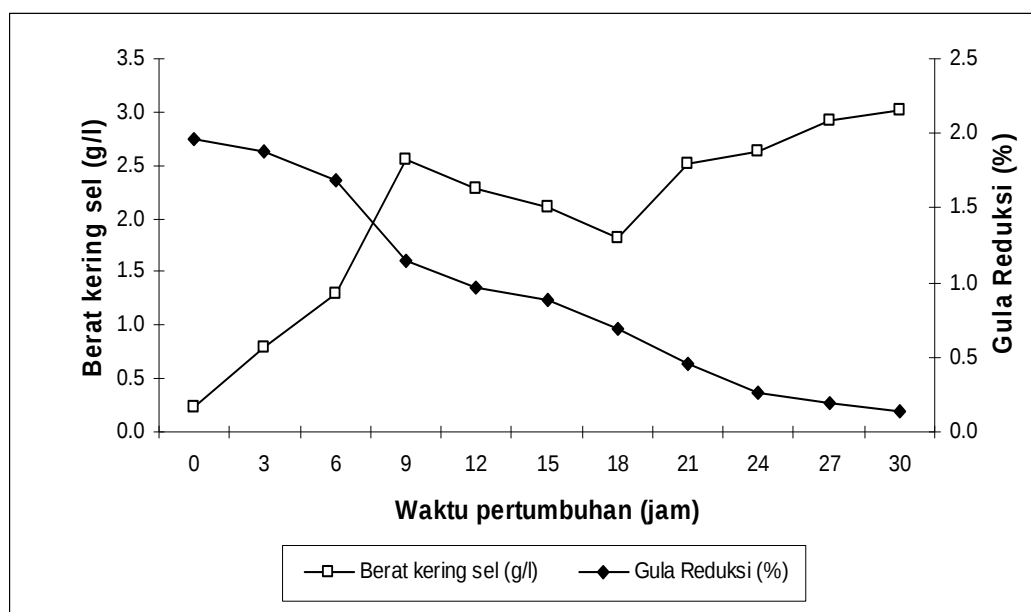
Gambar 2 menunjukkan bahwa setelah jam ke-9 tidak ada lagi penambahan sel isolat T5 atau telah memasuki pada fase stasioner). Akumulasi asam organik pada saat fase logaritmik yang mengakibatkan turunnya pH medium. Menurut Frazier dan Westhoff (1988), lingkungan sel yang asam berakibat proton-proton akan masuk kedalam sitoplasma dan menurunkan pH internal sel sehingga dapat mendenaturasi komponen-komponen sel berprotein termasuk enzim-enzim dan selanjutnya pertumbuhan mikroba terhambat. Sebagian mikroba dapat mengeluarkan sejumlah proton-proton yang masuk ke dalam sitoplasma dengan menggunakan energi, tetapi lama-kelamaan energi yang tersedia sangat berkurang dan tidak cukup untuk aktivitas dan sintesis komponen-komponen sel sehingga pertumbuhan sel mikrob dapat terhambat bahkan berhenti (Fardiaz, 1992).

Pengukuran terhadap pH merupakan parameter yang menunjukkan pengaruh pertumbuhan dan pembentukan produk

(Judoamidjojo *et al.*, 1990). Gambar 2 menunjukkan bahwa semakin tinggi berat kering sel maka nilai pH cenderung menurun terutama pada saat fase logaritmik dan pada akhirnya relatif konstan setelah melewati fase tersebut. Tampak bahwa proses pembentukan produk dengan isolat T5 juga sangat singkat terkait dengan fase pertumbuhan logaritmiknya yang cepat dan singkat. Hal ini menunjukkan bahwa produksi asam organik menggunakan isolat T5 masih perlu ditingkatkan atau diperbaiki terutama jika isolat T5 akan dijadikan kultur untuk produksi skala lebih besar.

Laju Konsumsi Substrat (Y_x/s)

Konsumsi substrat pada bakteri isolat T5 dapat dilihat dari penurunan gula reduksi (Gambar 3) dengan laju konsumsi substrat (Y_x/s) sebesar 1,2236 g/g. Semakin tinggi berat kering sel yang merupakan laju pertumbuhan dari bakteri isolat T5 maka semakin rendah gula reduksi yang tersisa, begitu pula sebaliknya.



Gambar 3. Perbandingan berat kering sel (g/l) dan gula reduksi (%) terhadap waktu pertumbuhan (jam) pada isolat T5

Secara umum substrat dimanfaatkan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhan biomassa, pemeliharaan sel dan menghasilkan produk. Hal yang sama juga ditunjukkan oleh pertumbuhan *Bacillus subtilis* ATCC 21332 pada media sistem kultivasi dua fasa (Yuliana, 1997), pertumbuhan *Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus sp.B.04* pada media limbah cair industri tapioka yang diperkaya dengan dedak (Hartati, 1999), dan, pertumbuhan mikroorganisme pada media hidrolisat ubi kayu (Hasanudin, *et al.*, 1994).

Pada penelitian ini laju konsumsi substrat bakteri isolat T5 menunjukkan penurunan yang relatif tajam yang berarti glukosa di dalam media dapat digunakan secara maksimal. Tinggi rendahnya kandungan glukosa sisa dalam media dipengaruhi oleh kemampuan mikroorganisme untuk mengkonversi sumber karbon yang terdapat dalam substrat menjadi biomassa dan produk. Namun glukosa yang berfungsi sebagai substrat dapat juga menjadi salah satu faktor penghambat pertumbuhan bila keberadaannya berlebih atau lebih besar dari nilai kritisnya (Pirt, 1975; Young, 1985).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Fase logaritmik pertumbuhan bakteri isolat T5 terjadi pada waktu pertumbuhan jam ke 3 sampai dengan jam ke 9. Nilai OD maksimum mencapai nilai 1,434 dengan berat kering sel 2,553 g/l. Nilai laju pertumbuhan spesifik (μ) isolat T5 adalah 0,0598 (jam^{-1}) sementara laju konsumsi substrat ($Y_{x/s}$) sebesar 1,2236 g/g, yang mengindikasikan masih

diperlukan perlakuan-perlakuan khusus untuk meningkatkan kemampuan tumbuh isolat T5 ini.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui karakteristik spesifik dari bakteri asam laktat Isolat T5 selain ditinjau dari segi kinetika pertumbuhannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Daulay, D. 1991. Fermentasi Asam Laktat Dalam Pengolahan Pangan. PAU Pangan dan Gizi. IPB. Bogor.
- Fardiaz, S. 1987. Fisiologi Fermentasi. Pusat Antar Universitas IPB. Bogor. 186 hlm.
- Fardiaz, S. 1992. Mikrobiologi Pangan 1. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Frazier, W.C. and D.C. Westhoff. 1988. Food Microbiology. McGraw-Hill book Company, New York.
- Gaman, P.M. dan K.B. Sherrington. 1994. Pengantar Ilmu Pangan Nutrisi dan Mikrobiologi. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 317 hlm.
- Ghaly, A.E., M.S.A. Tango, and M.A. Adams. "Enhanced Lactic Acid Production from Cheese Whey with Nutrient Supplement Addition". Agricultural Engineering International: the CIGR Journal of Scientific Research and Development. Manuscript FP 02 009. May, 2003.
- Hartati, Y. 1999. Kinetika pertumbuhan *Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus sp.B.04* dalam kultur terendam pada media limbah cair industri tapioka

- yang diperkaya dengan dedak.
Skripsi Unila. Bandar Lampung.
- Hasanudin, U., Medikasari, dan T.P. Utomo. 1994. Kinetika pertumbuhan mikroorganisme dan produksi alkohol pada media hidrolisat ubi kayu. Laporan Penelitian. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Judoamidjojo, M., A.A. Darwis, dan E.G. Sa'id. 1990. Teknologi Fermentasi. Rajawali Pers. Jakarta. 333 hlm.
- Karim, A., M. Mel, P. Jamal, M.R. M. Salleh, and N. Alamin. 2006. Media screening of lactic acid fermentation using *Lactobacillus rhamnosus*. *J. Agric. Technol.* 2(2): 203-210.
- Mangunwidjaja, D. dan A. Suryani. 1994. Teknologi Bioproses. Penerbit Swadaya. Jakarta.. 394 hlm.
- Middlebeek, E.J., R.O. Jenkins and J.S. Drijver-de Haas. 1992. Growth in batch culture. In *Vitro Cultivation of Micro-organisms*. Biotechnology by Open Learning.
- Pirt, S.J. 1975. Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell Scientific Publication. London.
- Rahayu, E.S., F.D. Titiek, D. Mahyu, dan S. Edi. 1999. Bakteri Asam Laktat pada Makanan Fermentasi Tradisional (abstrak). Di dalam : Panduan Seminar Nasional Makanan Tradisional. Yogyakarta 16 Maret 1999.
- Sa'id, E.G. 1987. Bioindustri Penerapan Teknologi Fermentasi. PT. Melton Putra. Jakarta. 317 hlm.
- Scragg, A.H. 1991. Bioreactors in Biotechnology, A Practical Approach. Ellis Horword, New York.
- Sudarmadji, S., Haryono, dan Suhardi. 1984. Prosedur Analisis Untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Edisi ketiga. Liberty. Yogyakarta. 138 hlm.
- Wang, D., Y. Xu, J. Hu1 and G. Zhao. 2004. Fermentation Kinetics of Different Sugars by Apple Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.* 110(4): 340-346.
- Wenge, F. and A.F. Methews. 1999. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum* kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochemical Engineering Journal.* 3: 163-170.
- Young, M.M. 1985. The Principles, Application and Regulation of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine. *Comprehensive Biotechnology.* 1: 189-213.
- Yuliana, N. 1997. Kinetika produksi biosurfaktan oleh *Bacillus subtilis* ATCC 23132 pada system kultivasi dua fasa. Tesis. IPB. Bogor.
- Yuliana, N. dan S. Rizal. 2006. Optimasi Pengolahan Durian Fermentasi (Tempoyak). Laporan Hibah Bersaing XIII. Lembaga Penelitian Universitas Lampung.
- Pazoukil, M., G. Najafpour, and M.R. Hosseini. 2008. Kinetic models of cell growth, substrate utilization and bio-decolorization of distillery wastewater by *Aspergillus fumigatus*

UB260. African J. of Biotechnol. 7
(9): 1369-1376.

Winkelhausen, E., S.A. Amartey, and K.S.
Kuzmanova. 2003. Kinetics and
carbon balance of polyhydroxy
alcohol biosynthesis in xylose
fermenting yeast under oxygen
limited conditions. Bull. of the
Chemists and Technologists of
Macedonia. 22(1): 47–54.

Haddadin, J.S.Y. 2005. Kinetic studies
and sensorial analysis of lactic acid
bacteria isolated from white cheese
made from sheep raw milk. Pakistan
J. of Nutrition. 4(2): 78-84.

Rodrigues, L., A. Moldes, Jos'e Teixeira,
and R. Oliveira. 2006. Kinetic
study of fermentative biosurfactant
production by *Lactobacillus* strains.
Biochemical Engineering Journal.
28: 109–116.