



## PERTUMBUHAN ISOLAT BAL ASAL BEKATUL DAN PROBIOTIK KOMERSIAL (*Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus casei*) PADA MEDIA BEKATUL DAN SUSU SKIM

**Growth of LAB Isolated from Rice Bran and Commercial Probiotic (*Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) on Rice Bran and Skimmed Milk Media**

Elok Zubaidah<sup>1\*</sup>, Erryana Martati<sup>1</sup>, Ampu M Resmanto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Staf Pengajar Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP, UNIBRAW Malang

<sup>2</sup>Alumni Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP, UNIBRAW Malang

\*E-mail: elzoeba@yahoo.com

### ABSTRACT

This research was aimed to study the influence of rice bran and skim milk fermentation media on the growth of lactic acid bacteria and their ability in fermenting complex carbohydrates into short chain fatty acids (SCFA). Indigenous lactic acid bacteria (LAB) were isolated from rice bran and commercial probiotic separately and used for fermenting rice bran and skim milk media. Randomized block design was used with 2 factors i.e. fermenting media type and LAB type. The results showed that fermenting rice bran gave significant effect on the LAB growth, indicated by total LAB cell count, total acid concentration, pH and antibacterial activity. The best treatment was J2-B with total LAB count  $1.01 \times 10^{10}$  cfu/mL, total acid 1.14%, pH 3.88 and clear zone diameters against *Staphylococcus aureus* 13.04 mm, *Listeria monocytogenes* 12.88 mm, *Escherichia coli* 12.83 mm and *Salmonella typhi* 12.53 mm. LAB fermenting rice bran for 48 hours produced lactic acid and SCFA. The highest concentrations of lactic acid (122.1313 mM), acetic acid (10.503 mM), and butyric acid (1.56 mM) were produced by fermentation using LAB J2, *L. acidophilus*, and *L. casei* isolate, respectively, whereas the highest propionic acid concentration (6,07 mM) was produced by control fermentation.

**Keywords:** Probiotic, indigenous isolate, rice bran, SCFA, skimmed milk

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dedak dan skim milk sebagai media fermentasi bakteri asam laktat, dan kemampuannya mengubah sumber karbon kompleks dedak menjadi asam lemak rantai pendek (*short chain fatty acids*, SCFA). Bakteri asam laktat lokal diisolasi dari dedak dan probiotik. Desain percobaan adalah acak kelompok dengan 2 faktor, yaitu jenis media fermentasi dan jenis bakteri asam laktat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa media fermentasi dengan menggunakan dedak menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan dari total sel bakteri asam laktat, total asam yang dihasilkan, pH dan aktivitas antibakteri. Fermentasi dengan menggunakan isolat J2-B menghasilkan total bakteri asam laktat  $1,01 \times 10^{10}$  cfu/mL, total asam 1,14%, pH 3,88 dan zona hambatan dengan bakteri uji *Staphylococcus aureus* 13,04 mm, *Listeria monocytogenes* 12,88 mm, *Escherichia coli* 12,83 mm dan *Salmonella typhi* 12,53 mm. Proses fermentasi bakteri asam laktat menggunakan media dedak selama 48 jam mampu menghasilkan asam laktat dan SCFA. Konsentrasi tertinggi asam laktat (122,13 mM), asam asetat (10,50 mM), dan asam butirat (1,56 mM) masing-masing dihasilkan oleh fermentasi menggunakan BAL J2, isolat *L. acidophilus*, dan isolat *L. casei*; sedangkan konsentrasi tertinggi asam propionat (6,07 mM) dihasilkan oleh fermentasi kontrol.

**Kata kunci:** Probiotik, isolat lokal, dedak, SCFA, susu skim

## PENDAHULUAN

Kemajuan pengetahuan tentang pangan dan kesadaran masyarakat terhadap kesehatan telah meningkatkan minat masyarakat terhadap pangan fungsional. Salah satu pangan fungsional yang berkembang pesat adalah pangan probiotik. Di Eropa, pasar produk probiotik pada tahun 1997 mencapai 65% dan susu probiotik mencapai 23% dari total pangan fungsional yang dipasarkan (Shah 2001).

Pangan probiotik pada umumnya berbasis susu. Saat ini mulai banyak dikembangkan pangan fermentasi probiotik berbasis sereal di antaranya dikenal produk "Yosa", pangan probiotik *oat bran* yang difermentasi oleh *L. acidophilus* LA5 dan *Bifidobacterium* Bb 12. Selain itu dikenal juga produk "Fyos" (*Nutricia*) yang merupakan produk sinbiotik, kombinasi antara *L. casei* dengan oligosakarida dan inulin. Kombinasi antara probiotik dan prebiotik pada produk tersebut akan memberikan efek menguntungkan (sinbiotik).

Bekatul padi juga merupakan sumber bakteri asam laktat yang sangat potensial (Yamamoto *et al.* 2003). Zubaidah (2005, belum dipublikasikan) telah berhasil mengisolasi sebanyak 9 isolat bakteri asam laktat (BAL) asal bekatul yang diperoleh dari berbagai penggilingan padi di kota Malang, yang berpotensi sebagai probiotik. Pada penelitian ini hanya digunakan dua isolat BAL indigenus asal bekatul yang paling berpotensi sebagai probiotik yaitu isolat D3 dan J2.

*L. acidophilus* dan *L. casei* merupakan bakteri probiotik yang biasa terdapat pada produk susu fermentasi. Proses fermentasi oleh BAL umumnya menggunakan susu skim sebagai media fermentasi. Bekatul dengan kandungan gizi yang cukup tinggi juga berpotensi digunakan sebagai media fermentasi bagi pertumbuhan *L. acidophilus*, *L. casei* dan isolat BAL indigenus asal bekatul guna pengembangan pangan probiotik yang berbasis sereal.

Pangan probiotik yang memiliki efek sinbiotik dapat diperoleh dengan memfermentasikan bekatul dengan *L. acidophilus*, *L. casei* dan isolat BAL indigenus asal bekatul. Serat pangan yang tinggi pada bekatul diharapkan berfungsi sebagai prebiotik yang akan mendukung

pertumbuhan bagi BAL sehingga akan dihasilkan efek sinbiotik. Pembentukan asam lemak rantai pendek (asetat, propionat dan butirir) adalah salah satu efek sinbiotik yang diharapkan sebagai hasil fermentasi komponen prebiotik yang terdapat pada bekatul. Diketahui bahwa asam lemak rantai pendek memiliki efek kesehatan bagi tubuh khususnya butirir yang dilaporkan berpotensi mencegah kanker kolon (Tungland 2002).

Penelitian ini untuk mempelajari pengaruh media fermentasi bekatul dan susu skim terhadap pertumbuhan BAL indigenus asal bekatul, *L. acidophilus* dan *L. casei* serta mengetahui kemampuan BAL indigenus asal bekatul, *L. acidophilus*, dan *L. casei* dalam memfermentasi karbohidrat kompleks (serat pangan, oligosakarida, dan pati resisten), sebagai prebiotik yang terdapat pada bekatul menghasilkan asam lemak rantai pendek (asetat, propionat dan butirir).

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan dasar yang digunakan dalam penelitian adalah susu skim, bekatul padi varietas IR 64 diperoleh dari penggilingan padi di jalan Ikan Tombro Malang, Isolat bakteri asam laktat indigenus bekatul (D3 dan J2) yang diperoleh dari koleksi jurusan Teknologi Hasil Pertanian-Universitas Brawijaya, isolat probiotik komersial (*L. acidophilus* dan *L. casei*) yang diperoleh dari BPPT Serpong. Pada pengujian aktiitas antibakteri dibutuhkan bakteri uji *S. aureus* (ATCC 29213), *L. monocytogenes* (ATCC 1194), *E. coli* (ATCC 25922) dan *S. typhi* yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Bahan kimia yang digunakan adalah bahan kimia untuk analisa N-total, kadar N-amino, lemak, pati, total gula reduksi, total gula, serat kasar, asam lemak rantai pendek (SCFA) dan asam laktat. Bahan untuk analisa total BAL menggunakan MRS Agar (Merck).

### Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah oven, laminar air flow, vortex-mixer model VM-2000, inkubator merk Binder, pH meter, autoklaf merk Hirayama,

spektrofotometer, timbangan analitik merk Mettler, alat ekstraksi soxhlet, labu dan pemanas kjedhal, sentrifuse dingin Heitich mikro 22R, shaker waterbath Julabo SW 22, Gas Chromatography merk Dani, pengayak 60 mesh, buret, spatula serta alat-alat gelas.

### Metode

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dengan 2 faktor perlakuan sebanyak 3 kali ulangan.

Faktor I: Jenis isolat bakteri asam laktat:

*L. casei*

*L. acidophilus*

Isolat indigenus asal bekatul J2

Isolat indigenus asal bekatul D3

Faktor II: Jenis media fermentasi:

Bekatul 12% (b/v)

Susu skim 12% (b/v)

Dari kedua faktor tersebut akan diperoleh 8 kombinasi perlakuan.

### Analisis stabilisasi

Bekatul sebelum digunakan pada penelitian ini terlebih dahulu distabilisasi dengan pemanasan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 3 menit. Proses ini bertujuan menginaktifkan enzim lipase yang terdapat pada bekatul sehingga kerusakan bekatul dapat dicegah.

### Fermentasi larutan bekatul dan susu skim

Larutan bekatul dan susu skim dibuat sesuai perlakuan (12% b/v) kemudian dilakukan pemanasan pada suhu 85°C selama 10 menit sambil diaduk untuk menghomogenkan larutan. Selanjutnya larutan disterilisasi suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, larutan bekatul dan susu skim didinginkan sampai mencapai suhu 37°C. Larutan bekatul dan susu skim yang akan digunakan sebagai media fermentasi dilakukan analisa kadar lemak, pati, serat kasar, protein, N-amino, gula reduksi, total gula, total asam dan pengukuran pH larutan.

Isolat BAL yang telah ditumbuhkan pada media MRS cair sampai mencapai akhir fase log (*L. acidophilus* dan *L. casei* selama 14 jam, D3 dan J2 selama 16 jam) selanjutnya diinokulasikan sebanyak 2% (v/v) ke dalam larutan bekatul dan susu skim. Fermentasi

dilakukan pada suhu 37°C sampai waktu fermentasi yang memiliki jumlah total BAL tertinggi dan pH 4,5. Parameter yang diamati selama fermentasi meliputi total BAL (per 4 jam) selama 20 jam, total asam (per 3 jam) selama 24 jam, penurunan pH (per 3 jam) selama 24 jam dan pengujian aktivitas antibakteri yang diukur dengan metode sumuran pada akhir fermentasi (Schved *et al.* 1993). Pada akhir proses fermentasi (untuk perlakuan terbaik) dilakukan juga analisa kadar lemak, pati, serat kasar, protein, N-amino, gula reduksi, total gula untuk mengetahui aktivitas BAL selama fermentasi.

Untuk mengetahui kemampuan BAL dalam memfermentasi karbohidrat kompleks (serat pangan, oligosakarida dan pati resisten) maka fermentasi larutan bekatul dilanjutkan sampai 48 jam dan pada jam ke-48 dilakukan analisa asam lemak rantai pendek (asetat, propionat, butirrat) dan analisa asam laktat menggunakan Gas Chromatography.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Analisa kimia bekatul dan susu skim

Sebagai bahan yang akan digunakan untuk media fermentasi maka informasi mengenai kandungan kimia dan nutrisi bekatul dan susu skim merupakan hal yang penting. Hasil analisa kimia bekatul dan susu skim dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil analisa kimia bekatul dan susu skim

Komponen	Rerata (%)			
	Bekatul	Literatur (*)	Susu skim	Literatur (**)
Air	11,62	12,34	4,71	3
Protein	12,32	13,17	31,52	35,9
N-amino	0,35	-	0,75	-
Gula reduksi	1,32	-	17,21	-
Gula total	12,89	-	47,26	52,3
Pati	9,48	-	1,21	-
Lemak	20,71	20,36	5,47	0,8
Serat kasar	8,79	11,39	0,98	-
Abu	11,93	11,12	6,91	8

Keterangan: \* : Wanyo *et al.* (2009)  
 \*\* : Webb dan Whittier (1970) dalam Chandra (2001)  
 (-) : tidak ada literatur yang mendukung Faktor konversi protein bekatul padi 5,95 ; susu skim 6,35

Tabel 1 menunjukkan bahwa komposisi kimia bahan baku yang digunakan pada penelitian ini tidak berbeda jauh dengan literatur. Perbedaan antara hasil analisa bekatul dengan literatur dipengaruhi oleh perbedaan varietas, pengaruh lingkungan dan tingkat penyosohan (Houston dan Kohler 1970 dalam Amissah *et al.* 2002).

Nilai kadar lemak bekatul yang digunakan pada penelitian ini tidak berbeda jauh dengan literatur. Hal ini menunjukkan bekatul yang digunakan masih memiliki kualitas yang baik. Kandungan lemak yang tinggi pada bekatul akan meningkatkan resiko terjadinya kerusakan akibat proses hidrolisa maupun oksidasi yang dapat menyebabkan ketengikan pada bekatul.

Hasil analisa menunjukkan kadar air susu skim yang digunakan pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan kadar air susu skim pada literatur. Hal ini kemungkinan disebabkan proses pengeringan yang kurang sempurna pada proses pembuatannya. Berdasarkan hasil analisa kimia yang dilakukan diketahui susu skim yang digunakan pada penelitian ini memiliki kadar lemak yang lebih tinggi dibandingkan literatur.

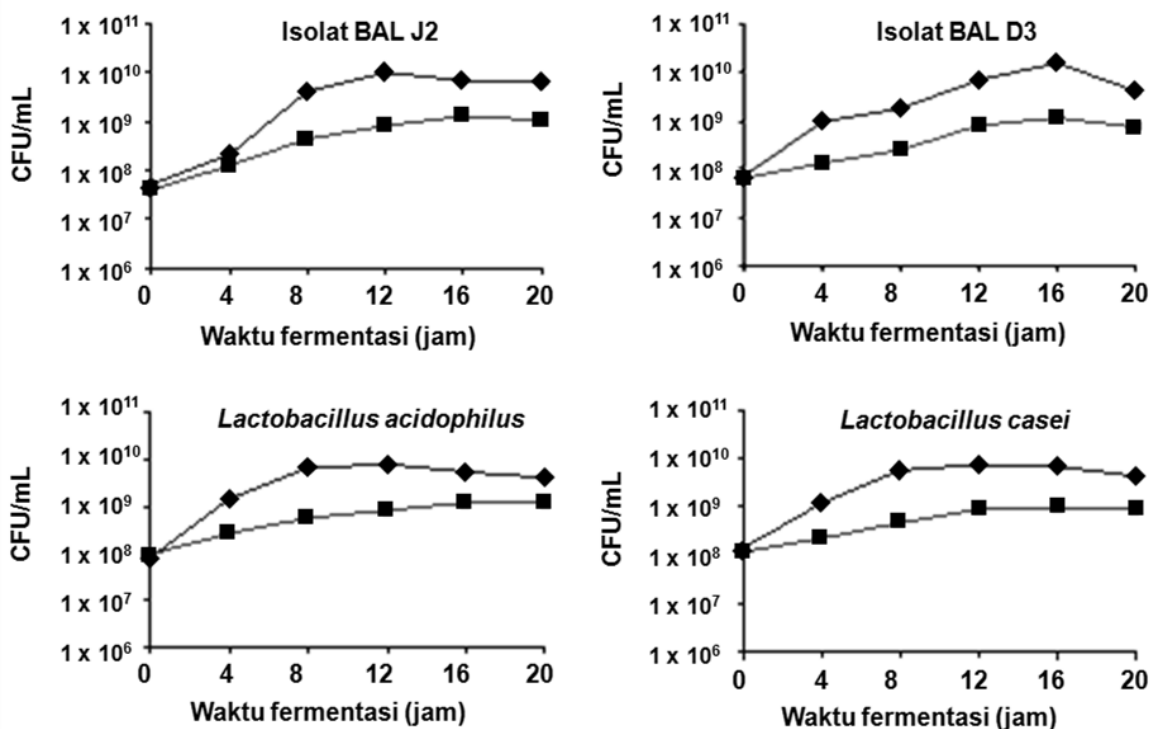
**Pengaruh jenis media fermentasi**

Kecepatan pertumbuhan BAL dalam proses fermentasi sangat ditentukan oleh

kesesuaian dan kandungan nutrisi yang terdapat pada media fermentasi. Isolat BAL yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat D3 dan J2 yang diisolasi dari bekatul (indigenus asal bekatul) yang bersifat gram positif, katalase negatif, berbentuk basil dan tergolong sebagai BAL homofermentatif. Isolat D3 dan J2 telah diidentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum* (Zubaidah dan Farida 2006 belum dipublikasikan), namun kedua isolat BAL ini memiliki strain yang berbeda. Selain itu digunakan juga isolat BAL komersial *L. casei* dan *L. acidophilus* sebagai pembandingan.

Bakteri asam laktat (isolat D3, J2, *L. acidophilus* dan *L. casei*) mencapai jumlah maksimum lebih cepat pada media fermentasi bekatul yaitu pada fermentasi jam ke-12 dibandingkan pada media fermentasi susu skim. Tercapainya total BAL tertinggi dalam waktu singkat digunakan dalam penentuan waktu fermentasi, sehingga dalam penelitian ini waktu fermentasi selama 12 jam digunakan sebagai akhir proses fermentasi.

Rerata total BAL pada medium fermentasi bekatul dan susu skim waktu fermentasi jam ke-12 berkisar antara  $7,95 \times 10^8 - 1,01 \times 10^{10}$ . Pertumbuhan isolat BAL J2, D3, *L. casei* dan *L. acidophilus* pada media fermentasi bekatul dan susu skim dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kurva peningkatan total BAL pada media fermentasi bekatul (◆) dan susu skim (■)

Gambar 1 menunjukkan bahwa jumlah total BAL baik isolat D3, J2, *L. casei* dan *L. acidophilus* lebih tinggi pada media fermentasi bekatul dibandingkan pada media susu skim. Hal ini diduga karena kelengkapan komponen nutrisi yang lebih baik pada bekatul dibandingkan susu skim. Menurut Fardiaz (1990), nutrisi bagi mikroba berfungsi sebagai sumber energi untuk pertumbuhan membentuk sel dan biosintesis produk-produk metabolit. Bakteri asam laktat menggunakan glukosa sebagai sumber karbon dalam proses metabolismenya menghasilkan energi, selain itu bakteri asam laktat (grup *Lactobacillus*) juga membutuhkan vitamin dan mineral untuk mendukung pertumbuhannya (Ray 1996).

Bekatul mengandung asam amino esensial yang lengkap, selain itu bekatul juga kaya akan vitamin B kompleks, vitamin A, vitamin C, vitamin D dan berbagai mineral seperti kalium, fosfat, dan besi. Telah diketahui bahwa beberapa dari vitamin B merupakan komponen utama koenzim yang dapat membantu mengaktifkan enzim-enzim yang terdapat pada sel mikroba sehingga mempercepat pertumbuhan mikroba. Selain vitamin B yang berfungsi sebagai koezim diketahui juga bahwa asam pantothenat sebagai faktor pendukung pertumbuhan bagi bakteri asam laktat (Fox 1990 dalam Machlin 1991).

Rendahnya pertumbuhan bakteri asam laktat pada media fermentasi susu skim dibandingkan pada media fermentasi bekatul disebabkan oleh kemungkinan tidak adanya atau rendahnya kandungan beberapa komponen mikronutrisi yang dibutuhkan BAL seperti asam amino, vitamin B ataupun mineral. Menurut Charamlampopoulos et al. (2002) sereal memiliki kandungan vitamin, serat pangan dan mineral kecuali phosphor yang lebih tinggi dibandingkan pada susu.

### Derajat keasaman (pH)

Sejalan dengan pertumbuhan sel bakteri maka akan terjadi penurunan pH media fermentasi yang disebabkan oleh asam organik yang dihasilkan akibat metabolisme mikroba, diantaranya asam laktat. Asam laktat yang dihasilkan oleh BAL akan terekskresikan keluar sel dan akan

terakumulasi dalam media fermentasi (substrat) sehingga akan meningkatkan keasaman (Widowati dan Misgiyarta 2002). Peningkatan akumulasi asam dalam media fermentasi ini dapat diketahui dengan penurunan pH.

Rerata nilai pH media fermentasi bekatul pada jam ke-12 adalah 4,22 dan susu skim 5,59. Hasil pengukuran pH menunjukkan terjadinya penurunan pH yang lebih cepat pada media fermentasi bekatul dibandingkan pada media susu skim. Hal ini sejalan dengan hasil analisa total BAL yang menunjukkan bahwa pertumbuhan BAL pada media fermentasi bekatul lebih tinggi dibandingkan pada susu skim sehingga dapat dikatakan bahwa aktivitas BAL dalam menghasilkan asam organik lebih tinggi pada media fermentasi bekatul yang nantinya akan menentukan nilai pH.

### Total asam

Pemecahan glukosa dalam sel BAL akan menghasilkan energi untuk aktivitas BAL, selain itu juga dihasilkan senyawa lain termasuk asam laktat sebagai metabolit primer. Proses fermentasi dengan bakteri asam laktat, 90% asam yang dihasilkan adalah asam laktat dan asam asetat, asam lain yang dihasilkan dalam jumlah kecil adalah sitrat, *hipuric*, *rotic* dan *uric* (Lankaputhra 1998 dalam Shah 2001).

Rerata total asam media fermentasi bekatul pada jam ke-12 adalah 1,08% dan pada susu skim 0,66%. Hasil analisa total asam menunjukkan adanya kenaikan total asam pada media susu skim dan bekatul seiring dengan berjalannya waktu fermentasi. Sejalan dengan tingkat pertumbuhan sel bakteri dan penurunan pH diketahui juga bahwa total asam pada media fermentasi bekatul lebih tinggi dibandingkan media fermentasi susu skim untuk masing-masing isolat BAL. Tingkat pertumbuhan BAL yang tinggi pada bekatul akan menghasilkan jumlah asam organik yang tinggi sebagai hasil fermentasi.

### Pengujian aktivitas antibakteri

Isolat D3, J2, *L. casei*, dan *L. acidophilus* yang telah diketahui sebagai BAL dapat menghasilkan berbagai metabolit seperti asam laktat, asam asetat, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, karbondioksida, dan bakteriosin yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen.

**Tabel 2.** Diameter zona penghambatan media bekatul dan susu skim terfermentasi pada jam ke-12

Perlakuan	Diameter zona bening (mm)			
	SA	LM	EC	ST
Bekatul				
D3	14,03	13,59	11,73	12,74
J2	13,04	12,88	12,83	12,53
<i>L. casei</i>	11,82	12,03	11,56	11,71
<i>L. acidophilus</i>	12,07	10,23	10,25	10,33
Susu skim				
D3	-	-	-	-
J2	-	-	-	-
<i>L. casei</i>	-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i>	-	-	-	-

Keterangan: SA : *S. aureus*  
 LM : *L. Monocytogenes*  
 EC : *E. coli*  
 ST : *S. typhi*  
 (-) : tidak memiliki aktivitas antibakteri

Penentuan aktivitas antimikroba pada pengujian ini didasarkan pada luasnya areal bening disekitar sumur yang telah diisi media bekatul dan susu skim terfermentasi oleh isolat BAL J2, D3, *L. casei* dan *L. acidophilus*. Media bekatul dan susu skim yang digunakan adalah media bekatul dan susu skim terfermentasi pada jam ke-12. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa isolat BAL yang ditumbuhkan pada media fermentasi bekatul memberikan efek penghambatan terhadap pertumbuhan masing-masing bakteri uji sedangkan isolat yang ditumbuhkan pada media fermentasi susu skim tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan terhadap bakteri uji. Hal ini diduga disebabkan oleh perbedaan kemampuan BAL untuk tumbuh pada media fermentasi susu skim dan bekatul. Seperti yang ditunjukkan hasil analisa total BAL, analisa total asam, dan pengukuran pH bahwa aktivitas isolat BAL lebih tinggi pada media bekatul dibandingkan susu skim. Aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri uji ini diduga disebabkan adanya asam-asam organik yang terbentuk selama fermentasi.

Berdasarkan hasil pengukuran pH pada jam ke-12 diketahui bahwa nilai pH media bekatul terfermentasi bekatul berkisar antara 3,88-4,44 sedangkan

media susu skim terfermentasi berkisar 5,29-5,91. Nilai pH media bekatul terfermentasi yang rendah ini dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji, karena diketahui bahwa bakteri uji *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* dan *Salmonella* spp. secara berurut memiliki pH minimum untuk tumbuh 4,0; 4,6; 4,4; dan 4,5 (Ray 2000), sehingga di bawah nilai pH tersebut pertumbuhan bakteri uji akan terhambat. Diduga hal ini juga yang menyebabkan media susu skim terfermentasi pada jam ke-12 tidak memiliki sifat antimikroba, karena pada jam ke-12 nilai pH media susu skim terfermentasi lebih tinggi dari nilai pH minimum bakteri uji untuk tumbuh (berkisar antara 5,29-5,91).

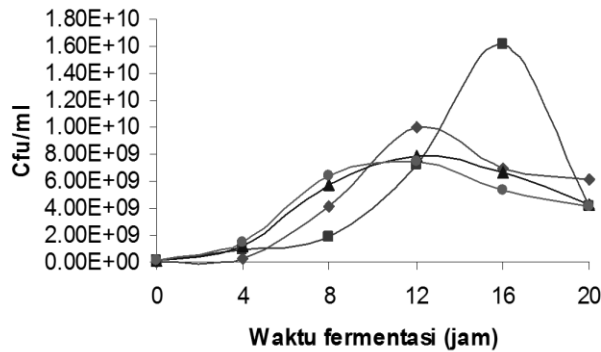
Menurut Kashket 1987 dalam Yang (2000) selain penurunan pH efek antimikroba dari asam organik dapat juga disebabkan oleh masuknya asam dalam bentuk tidak terdisosiasi ke dalam membran sel melalui difusi pasif. Di dalam sel asam organik akan mengalami disosiasi karena pH di dalam sel yang mendekati netral. Proton (H<sup>+</sup>) yang terlepas dari asam organik akan menyebabkan pengasaman pada sitoplasma sehingga harus dikeluarkan dari sel. Proses pengeluaran proton (H<sup>+</sup>) yang membutuhkan energi dan proses masuknya proton yang terus menerus akan menghabiskan energi dan akhirnya akan membunuh mikroorganisme (Doesburg 2006).

### Pengaruh jenis isolat terhadap pertumbuhan

#### Total BAL

Jenis dan sifat dari isolat BAL yang digunakan akan sangat menentukan aktivitas bakteri tersebut selama proses fermentasi. Pada penelitian ini diketahui bahwa masing-masing jenis BAL (D3, J2, *L. acidophilus* dan *L. casei*) yang digunakan memiliki kecepatan pertumbuhan yang berbeda baik pada media bekatul dan susu skim.

Rerata total BAL pada jam ke-12 dengan media fermentasi bekatul berkisar antara  $7,15 \times 10^9$ - $1,10 \times 10^{10}$  cfu/mL dan  $7,95 \times 10^8$ - $9,05 \times 10^8$  cfu/mL pada media fermentasi susu skim. Peningkatan total BAL pada media fermentasi bekatul dan susu skim dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3.

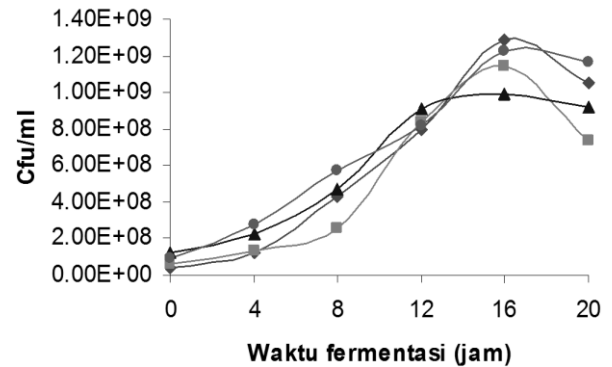


**Gambar 2.** Kurva peningkatan total BAL (D3 (■), J2 (◆), *L. acidophilus* (●) dan *L. casei* (▲)) pada media fermentasi bekatul

Gambar 2 menunjukkan bahwa pada media fermentasi bekatul jam ke-12 isolat J2 memiliki nilai total BAL tertinggi dibandingkan isolat D3, *L. casei* dan *L. acidophilus*. Nilai total BAL isolat J2 merupakan yang tertinggi mencapai  $1,01 \times 10^{10}$  cfu/mL atau mengalami kenaikan sebesar  $2,31 \times 10^{10}$  cfu/mL (jika dibandingkan antara nilai total BAL jam ke-0 dengan jam ke-12) dan yang terendah adalah isolat D3 sebesar  $7,15 \times 10^9$  cfu/mL atau mengalami kenaikan populasi sebesar  $2,02 \times 10^{10}$  cfu/mL. Berdasarkan hasil ini dapat dikatakan bahwa isolat J2 memiliki aktivitas yang lebih cepat dalam memetabolisme ketersediaan nutrisi yang tersedia dalam bekatul.

Nilai total BAL isolat J2 ( $1,01 \times 10^{10}$  cfu/mL) yang paling tinggi pada media bekatul diduga dikarenakan isolat J2 merupakan isolat indigenus asal bekatul sehingga diduga ada kecocokan dan kesesuaian nutrisi pada substrat sebagai sumber energi dengan sifat isolat yang digunakan. Selain itu juga diduga isolat J2 sebagai isolat indigenus bekatul memiliki enzim yang lebih lengkap dan lebih spesifik untuk memecah nutrisi yang ada pada bekatul. Sedangkan perbedaan nilai total BAL isolat D3 dan J2 yang merupakan isolat indigenus bekatul diduga disebabkan oleh perbedaan strain keduanya yang menentukan sifat dan karakteristik isolat selama fermentasi.

Berdasarkan kenaikan total BAL dari jam ke-0 sampai jam ke-12 diketahui bahwa isolat indigenus asal bekatul D3 dan J2 memiliki kenaikan total BAL yang lebih tinggi yaitu  $2,02 \times 10^{10}$  dan  $2,31 \times 10^{10}$  cfu/mL dibanding *L. acidophilus* dan *L. casei* yang



**Gambar 3.** Kurva Peningkatan Total BAL (D3 (■), J2 (◆), *L. acidophilus* (●) dan *L. casei* (▲)) pada media fermentasi susu skim

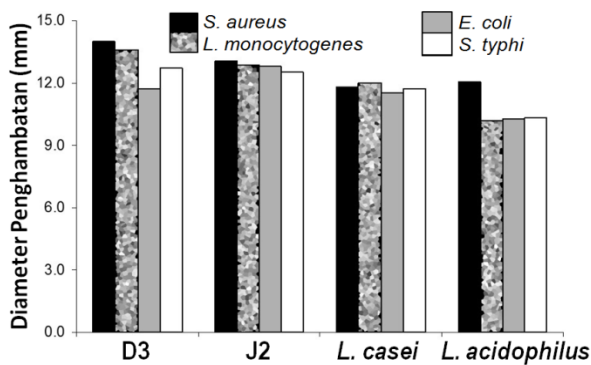
mengalami kenaikan sebesar  $1,98 \times 10^{10}$  dan  $1,73 \times 10^{10}$  cfu/mL. Hasil ini menunjukkan bahwa isolat indigenus asal bekatul lebih cepat mengalami kenaikan total BAL dibandingkan *L. acidophilus* dan *L. casei* selama proses fermentasi. *L. casei* dan *L. acidophilus* merupakan bakteri yang secara alami terdapat pada produk seperti susu maupun saluran pencernaan manusia sehingga kemampuannya untuk tumbuh pada media bekatul lebih rendah jika dibandingkan dengan isolat J2 dan D3.

Pada media fermentasi susu skim (Gambar 3) diketahui bahwa pada jam ke-12 *L. casei* memiliki jumlah total BAL tertinggi ( $9,05 \times 10^8$ ) namun jika dilihat dari kenaikan total BAL dari jam ke-0 sampai jam ke-12 diketahui isolat indigenus asal bekatul D3 dan J2 memiliki kenaikan total BAL yang lebih tinggi (sebesar  $1,33 \times 10^{10}$  dan  $1,13 \times 10^{10}$  cfu/mL) dibanding *L. casei* dan *L. acidophilus* (sebesar  $9,4 \times 10^9$  dan  $9,3 \times 10^9$  cfu/mL). Dave dan Shah (1997) dalam Shah (2001) menyatakan bahwa *L. acidophilus* dan *Bifidobacteria* tumbuh lambat pada media susu karena aktivitas proteolitik yang rendah.

### Derajat keasaman (pH)

Penurunan derajat keasaman media fermentasi merupakan salah satu akibat dari proses fermentasi yang terjadi akibat adanya akumulasi asam organik. Rerata nilai pH jam ke-12 pada media fermentasi bekatul berkisar 3,8-4,4 dan 5,2-5,9 pada media fermentasi susu skim.

Penurunan pH tercepat ditunjukkan oleh isolat J2 pada media fermentasi bekatul sedangkan pada media fermentasi susu



**Gambar 4.** Aktivitas penghambatan isolat BAL terhadap pertumbuhan bakteri uji

skim ditunjukkan oleh *L. casei*. Hal ini relevan dengan hasil analisa total BAL yang menunjukkan kedua BAL ini (J2 dan *L. casei*) memiliki nilai total BAL tertinggi pada media fermentasi bekatul dan susu skim ( $1,01 \times 10^{10}$  cfu/mL dan  $9,05 \times 10^8$  cfu/mL).

#### Total asam

Fermentasi oleh bakteri asam laktat ditandai dengan peningkatan jumlah asam organik yang diiringi dengan penurunan pH. Mengingat keempat bakteri asam laktat yang digunakan bersifat homofermentatif maka asam utama yang dihasilkan adalah asam laktat. Rerata total asam jam ke-12 pada media fermentasi bekatul berkisar antara 1,0528-1,1382% dan 0,6504-0,694% pada media fermentasi susu skim. Peningkatan total asam tertinggi pada media fermentasi bekatul ditunjukkan oleh isolat BAL J2 sedangkan pada media fermentasi susu skim ditunjukkan oleh *L. casei*. Hal ini relevan dengan hasil analisa total BAL yang menyatakan isolat J2 dan *L. casei* memiliki angka total BAL tertinggi jam ke-12 pada media fermentasi bekatul dan susu skim.

#### Pengujian aktivitas antibakteri

Hasil pengujian menunjukkan adanya aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri uji oleh isolat BAL yang digunakan pada media fermentasi bekatul sedangkan pada media susu skim tidak terdapat aktivitas penghambatan terhadap bakteri uji sehingga pada bagian ini hanya akan dibahas aktivitas penghambatan oleh isolat BAL pada media fermentasi bekatul. Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antibakteri diketahui bahwa seluruh isolat bakteri asam laktat yang digunakan mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji.

Jika dibandingkan kemampuan antar isolat BAL dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji maka diketahui bahwa isolat D3 memiliki aktivitas penghambatan terbesar terhadap pertumbuhan *S. aureus*, *L. monocytogenes* dan *S. typhi*. Sedangkan aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *E. coli* ditunjukkan oleh isolat J2. Diduga perbedaan aktivitas penghambatan antara isolat BAL D3 dan J2 disebabkan perbedaan jenis dan komposisi asam organik yang dihasilkan oleh masing-masing isolat. Berdasarkan hasil pengujian aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri uji dapat disimpulkan bahwa isolat indigenus asal bekatul (D3 dan J2) memiliki kemampuan yang lebih baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji dibandingkan isolat BAL komersial (*L. casei* dan *L. acidophilus*). Perbandingan aktivitas penghambatan antar isolat BAL terhadap bakteri uji ditunjukkan pada Gambar 4.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa bakteri Gram positif (*S. aureus* dan *L. monocytogenes*) lebih mudah dihambat pertumbuhannya dibandingkan bakteri Gram negatif (*E. coli* dan *S. typhi*). Hal ini dikarenakan perbedaan susunan dinding sel antara bakteri Gram positif dan negatif yang mempengaruhi ketahanannya terhadap asam. Russel (1991) dalam Beales (2003) menyatakan bahwa bakteri gram negatif lebih tahan terhadap asam organik dibandingkan bakteri gram positif yang disebabkan perbedaan struktur dan komposisi kimia lapisan luar sel antara bakteri gram positif dan negatif (Nikaido dan Varra 1985 dalam Beales 2003).

#### Pemilihan perlakuan terbaik

Pemilihan perlakuan terbaik pada penelitian ini didasarkan pada parameter dan kemampuan penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri patogen (*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* dan *S. typhi*) pada waktu fermentasi jam ke-12 dengan menggunakan metode ranking (Tabucanon 1983). Berdasarkan skala ranking yang dilakukan maka diketahui bahwa perlakuan isolat BAL J2 dengan media fermentasi bekatul sebagai perlakuan terbaik.

#### Analisa kimia larutan bekatul

Hasil pemilihan perlakuan terbaik menyatakan bahwa perlakuan fermentasi



**Tabel 3.** Hasil analisa kimia larutan bekatul sebelum (kontrol bekatul) dan setelah fermentasi (J2-B).

Analisa	Kontrol Bekatul (%)	J2-B (%)
Pati	1,5105	1,0150
Gula reduksi	0,1181	0,0619
Gula total	1,2749	1,4309
N total	0,2095	0,2032
N amino	0,0372	0,1245
Lemak	2,3425	1,1975
Serat kasar	0,9801	0,8940

Keterangan: J2-B = Fermentasi media bekatul dengan isolat indigenus asal bekatul J2

larutan bekatul dengan menggunakan isolat BAL indigenus asal bekatul J2 sebagai perlakuan terbaik. Selanjutnya dilakukan analisa kimia terhadap perlakuan terbaik ini baik sebelum dan setelah fermentasi untuk mengetahui aktivitas dari isolat BAL yang digunakan dalam memfermentasi bekatul. Analisa kimia yang dilakukan meliputi kadar pati, kadar gula reduksi, total gula, N-total, N-amino dan kadar serat. Hasil analisa kimia dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3 menunjukkan terjadinya peningkatan total gula, N-amino setelah fermentasi dilakukan dibandingkan sebelum fermentasi, namun Kadar pati, gula reduksi, lemak dan serat kasar mengalami penurunan. Peningkatan total gula setelah fermentasi terjadi diduga akibat akumulasi senyawa antara, akibat pemecahan pati oleh mikroba. Hal ini terlihat dari penurunan kadar pati setelah fermentasi dilakukan. Isolat BAL J2 yang telah diidentifikasi sebagai *L. plantarum* diduga memiliki kemampuan memecah pati menjadi senyawa lebih sederhana yang akan dimanfaatkan dalam metabolisme sel

Kadar gula reduksi setelah proses fermentasi mengalami penurunan. Penurunan kadar gula reduksi ini diduga akibat pemanfaatan gula reduksi sebagai sumber karbon untuk menghasilkan energi oleh mikroba selama fermentasi. Selain pemecahan karbohidrat, perubahan lain yang terjadi akibat aktivitas bakteri asam laktat adalah perubahan protein. Berdasarkan hasil analisa diketahui bahwa kadar protein yang ditunjukkan oleh nilai N-total tidak mengalami perubahan akibat proses fermentasi. Menurut Fardiaz (1990) kultur bakteri akan menghidrolisis protein untuk memperoleh nitrogen yang diperlukan untuk

pertumbuhannya dalam susu. Aktivitas bakteri asam laktat dalam pemecahan protein terlihat dari nilai total N-amino yang meningkat akibat proses fermentasi. Peningkatan nilai N-amino menunjukkan jumlah asam amino yang terdapat pada media fermentasi akibat aktivitas enzim proteolitik bakteri asam laktat.

Selain memiliki kemampuan dalam menggunakan karbohidrat dan protein, beberapa bakteri asam laktat juga menunjukkan aktivitas lipolitik. Aktivitas lipolitik terlihat dari penurunan kadar lemak yang ditunjukkan oleh hasil analisa, sehingga diperkirakan isolat J2 yang telah diidentifikasi sebagai *L. plantarum* memiliki enzim yang dapat menghidrolisis lemak yang terdapat pada media bekatul. Kemampuan ini diduga mengingat isolat BAL J2 yang digunakan adalah isolat indigenus dari bekatul yang komponen utamanya adalah lemak sehingga secara alami isolat BAL J2 memiliki enzim yang dapat menghidrolisis lemak yang terdapat pada bekatul.

#### Jenis dan konsentrasi asam organik

Selama proses fermentasi menggunakan bakteri asam laktat akan dihasilkan asam organik sebagai metabolit primer. Asam organik yang dihasilkan selama proses fermentasi berasal dari metabolisme komponen nutrisi oleh mikroba. Jenis dan konsentrasi asam organik yang dihasilkan selama proses fermentasi pada waktu fermentasi jam ke-48 dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4 menunjukkan bahwa selama fermentasi dihasilkan asam organik berupa asam laktat dan asam lemak rantai pendek asetat, propionat dan butirrat. Konsentrasi asam laktat yang tinggi disebabkan karena asam organik ini merupakan produk utama

**Tabel 4.** Jenis dan konsentrasi asam organik pada media bekatul terfermentasi jam ke-48

Kode Sampel	SCFA			Asam Laktat (mM)
	Asetat (mM)	Propionat (mM)	Butirat (mM)	
Kontrol	1,612	6,068	-	-
D3	8,424	4,635	1,195	120,26
J2	8,766	5,861	0,137	122,13
<i>L. casei</i>	9,677	5,236	1,563	42,577
<i>L. acidophilus</i>	10,50	5,166	1,244	92,044

yang dihasilkan selama proses fermentasi menggunakan bakteri asam laktat.

Adanya asam lemak rantai pendek asetat, propionat dan butirir pada larutan fermentasi bekatul jam ke-48 diduga disebabkan terjadinya fermentasi karbohidrat kompleks yang terdapat pada bekatul. Pati resisten, beberapa oligosakarida dan serat pangan merupakan karbohidrat kompleks yang tidak dapat dicerna (*non-digestible carbohydrate*) pada saluran pencernaan bagian atas dan kemudian difermentasi didalam usus besar oleh berbagai bakteri. Hasil fermentasinya sebagian besar adalah asam lemak rantai pendek (SCFA) atau volatile fatty acid, methane, hidrogen dan karbon dioksida. Asam lemak rantai pendek asetat, propionat dan butirir merupakan produk utama hasil fermentasi karbohidrat kompleks dan mencapai 83 sampai 95% dari total asam lemak rantai pendek pada usus besar (Nordgaard dan Mortensen 1995 dalam Tunland 2002). Beberapa faktor yang mempengaruhi tingkat produksi SCFA adalah tipe dan jumlah karbohidrat yang tidak tercerna, oligosakarida, pati resisten, dan polisakarida non pati (serat pangan) (Knudsen 2005).

Asam lemak rantai pendek (SCFA) yang dihasilkan akibat proses fermentasi karbohidrat berperan dalam menyumbangkan energi bagi tubuh dari proses metabolismenya di hati, selain itu SCFA juga berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen, menurunkan kadar kolesterol dan trigliserida dalam darah, menjaga keseimbangan mikroflora usus dan meningkatkan penyerapan mineral didalam usus (Tunland 2002). Asam asetat yang dihasilkan dari fermentasi dapat mempengaruhi fungsi sistem metabolik, asetat dapat mempengaruhi kadar asam lemak pada darah yang dapat secara langsung mencegah terjadinya lipolisis pada jaringan adiposa (Tunland 2002). Asam butirir dan asam propionat merupakan asam yang memiliki peranan penting bagi kesehatan sebagai hasil fermentasi karbohidrat kompleks yang tak dapat dicerna (*non-digestible carbohydrate*) karena asam ini mempengaruhi efek kesehatan (Cummins 1995 dalam Karpinnen 2003). Asam propionat memiliki peranan menurunkan kadar gula dalam darah (Tunland 2002). Diketahui juga bahwa

asam butirir dapat memberikan efek perlindungan terhadap kanker kolon (Russo et al. 1999 dalam Karpinnen 2003).

Di dalam tubuh asam propionat akan dimetabolisme pada hati dan epithelium usus. Propionat merupakan satu-satunya asam lemak rantai pendek yang dapat digunakan sebagai glukosa. Asam asetat, butirir dan asam lemak rantai pendek lainnya tidak dapat digunakan dalam sintesis glukosa. Ketika asam propionate diserap maka tubuh dapat menggunakannya untuk reaksi glukoneo-genesis ataupun untuk menghasilkan energi melalui siklus TCA (*Tricarboxylic Acid*) (Khattak 2002).

## KESIMPULAN

Jenis media fermentasi akan sangat menentukan didalam proses fermentasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan BAL (D3, J2, *L. acidophilus*, *L. casei*) pada media fermentasi bekatul lebih tinggi dibandingkan pada media susu skim. Bakteri asam laktat indigenus asal bekatul D3 dan J2 memiliki kemampuan yang lebih baik untuk tumbuh pada media fermentasi bekatul jika dibandingkan dengan *L. acidophilus* dan *L. casei*. Perlakuan isolat BAL indigenus bekatul J2 dengan media fermentasi bekatul diperoleh sebagai perlakuan terbaik.

Selain kemampuan untuk tumbuh pada bekatul diketahui juga bahwa seluruh isolat BAL (D3, J2, *L. acidophilus* dan *L. casei*) yang digunakan pada penelitian ini mampu memfermentasi komponen prebiotik yaitu karbohidrat kompleks (pati resisten, oligosakarida dan serat pangan) yang terdapat pada bekatul menjadi asam lemak rantai pendek (asetat, propionat dan butirir).

## DAFTAR PUSTAKA

- Beales N (2003) Adaptation of Microorganisms to Cold Temperature, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety
- Chandra L (2001) Pengaruh Tingkat Penambahan Skim dan Na-CMC Terhadap Sifat Fisik, Kimia, dan Sifat Organoleptik Whey Terfermentasi Dalam Bentuk Yoghurt. Skripsi Jurusan THP- Fakultas Teknologi

- Pertanian-Unibraw. Malang
- Charalampopoulos D, Wang R, Pandiella SS, Webb C (2002) Application of Cereals and Cereal Components in Functional Food: A Review. Intern J Food Microbiol. 79:131-141
- Doesburg B (2006) Strong Performance by Weak Acids. Food and Beverage Asia, 50-54
- Fardiaz S (1990) Mikrobiologi Pangan. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Khattak M (2002) Physiological Effects of Dietary Complex Carbohydrates and its Metabolites Role in Certain Diseases. Pak J Nutr 1:161-168
- Karppinen S (2003) Dietary Fiber Components of Rye Bran and their Fermentation In Vitro. VTT Technical Research Centre of Finland. Machlin, JL (1991) Hand book of Vitamins. Marcel Dekker, Inc. New York
- Schved F, Lalazar A, Henis Y, Juven BJ (1993) Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* J Appl Microbiol 74:67-77
- Shah SP (2001) Functional Foods from Probiotics and Prebiotics. Food Technol 55:46
- Ray B (1996) Fundamental Food Microbiology, CRC Press, Boca Raton
- Tungland (2002) Dietary Fiber and Human Health. Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety, Vol 3
- Wanyo P, Chomnawang C, Siriamornpun S (2009). Substitution of Wheat Flour with Rice Flour and Rice Bran in Flake Products: Effects on Chemical, Physical and Antioxidant Properties. World Appl Sci J 7:49-56
- Widowati S, Misgiyarta (2002) Efektifitas Bakteri Asam Laktat (BAL) dalam Pembuatan Produk Fermentasi Berbasis Protein/Susu Nabati. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
- Yamamoto Y, Togawa Y, Shimosaka M, Okazaki M (2003) Purification and Characterization of a Novel Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecalis* Strain RJ-11. Appl Environ Microbiol 69:5746-5753
- Yang Z (2000) Antimicrobial Compounds and Extracellular Polysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. Academic Dissertation Department of Food Technology, University of Helsinki