

PENGUNAAN BERBAGAI JENIS BAHAN PELINDUNG UNTUK MEMPERTAHANKAN VIABILITAS BAKTERI ASAM LAKTAT YANG DI ISOLASI DARI AIR SUSU IBU PADA PROSES PENGERINGAN BEKU

[Utilization of various cryogenic agents during freeze drying to Maintain the viability of Lactic Acid Bacteria Isolated from breast milk]

Ni Nyoman Puspawati^{1)*}, Lilis Nuraida²⁾, dan Dede Robiatul Adawiyah²⁾

¹⁾ Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana

²⁾ SEAFast Center dan Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Institut Pertanian Bogor

Diterima 21 Januari 2009 / Disetujui 18 Mei 2010

ABSTRACT

Lactic acid bacteria are the most important bacteria having potential as probiotic. The objectives of the present study were to examine the growth of Lactic Acid Bacteria, identify the Lactic Acid Bacteria capable of surviving and evaluate the best cryogenic agents that protect the viability of Lactic Acid Bacteria during freeze drying. Four cryogenic agents, i.e. sucrose, lactose, skim milk and maltodextrin, were used in freeze drying of three species of Lactic Acid Bacteria, i.e. *Pediococcus pentosaceus* A16, *Lactobacillus brevis* A17 and *Lactobacillus rhamnosus* R21 isolated from breast milk. Evaluation included viability before and after freeze drying, survival of freeze dried culture in 0.5 % bile salt and low pH for 5 hours. The result showed that three of cryogenics, i.e. sucrose, lactose and skim milk improved the viability of freeze dried of all lactobacilli, except maltodextrin that did not give protection to *L. rhamnosus* R21. Evaluation on the survival of LAB in 0.5 % bile salt showed that cryogenic agents improved the survival rate of all Lactic Acid Bacteria during freeze drying. The cryogenic also improved the survival rate of LAB at low pH, with the best protection given by skim milk on *L. rhamnosus* R21.

Key words : isolate from breast milk, freeze drying, cryogenic, probiotic

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat sebagai mikroorganisme probiotik memegang peranan penting dalam meningkatkan dan menjaga kesehatan, sehingga mendorong penggunaan bakteri asam laktat untuk pengembangan pangan fungsional dan farmasetikal. Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup yang mampu mencapai saluran pencernaan dalam jumlah tertentu dan memberi manfaat terhadap kesehatan. Persyaratan sebagai probiotik yang harus terpenuhi antara lain; berasal dari manusia, tidak bersifat patogen, toleran terhadap asam lambung dan garam empedu, mempunyai kemampuan untuk bertahan dalam proses pengawetan dan selama penyimpanan, serta telah terbukti mempunyai efek terhadap kesehatan (Shortt 1999). Manfaat bakteri asam laktat sebagai probiotik dalam meningkatkan kesehatan dapat terjadi bila kultur dikonsumsi dalam keadaan hidup dan mampu bertahan dalam saluran pencernaan. Nuraida *et al.*, (2007) telah mengisolasi bakteri asam laktat dari ASI yang berpotensi sebagai probiotik antara lain: *Pediococcus pentosaceus* A16, *Lactobacillus brevis* A17 dan *Lactobacillus rhamnosus* R21. *P. pentosaceus* A16, *L. brevis* A17 dan *L. rhamnosus* R21 secara *in vitro* memiliki sifat tahan terhadap garam empedu, tahan terhadap pH rendah, dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*. Isolat-isolat ini secara *in vivo* juga mempunyai sifat dapat meningkatkan jumlah bakteri asam laktat dan dapat

menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *E. coli* di sekum. Isolat ini diketahui memiliki potensi sebagai immunomodulator, dimana secara *in vitro* memiliki indeks stimulasi terhadap respon imun antara 1,50 - 1,69 sedangkan secara *in vivo* indeks stimulasi terhadap respon imun antara 1,45 - 1,65 (Susanti *et al.*, 2008). Bakteri asam laktat untuk dapat berfungsi sebagai probiotik, juga harus mampu bertahan selama proses pengolahan dan penyimpanan. Proses penyimpanan dan pengolahan dapat menurunkan jumlah bakteri asam laktat sehingga perannya sebagai probiotik juga akan menurun. Penyimpanan kultur dalam keadaan segar tidak dapat dilakukan untuk jangka waktu yang lama. Dengan demikian perlu suatu metode pengawetan (preservasi) yang dapat mempertahankan viabilitasnya. Metode pengawetan kultur yang biasa digunakan adalah pengeringan semprot (*spray drying*), pembekuan (*freezing*) dan pengeringan beku (*freeze drying*) (Fu dan Etzel, 1995). *Freeze drying* merupakan teknik yang umumnya digunakan untuk mengawetkan kultur dan untuk produksi konsentrat kultur starter. Kerusakan sel bakteri asam laktat akibat proses *freeze drying* dapat diminimumkan dengan penambahan bahan pelindung (kriogenik) tertentu sebelum proses pembekuan dan pengeringan dilakukan (Tamime 1981). Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pola pertumbuhan isolat bakteri asam laktat

¹⁾Korespondensi penulis : 081385314130

E-mail : nnpuspa@yahoo.co.id

asal ASI, mengidentifikasi isolat yang paling tahan terhadap proses *freeze drying*, mengidentifikasi jenis bahan pelindung yang terbaik.

METODOLOGI

Strain bakteri

Strain bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah tiga isolat yang berasal dari Air Susu Ibu yaitu *P. pentosaceus* A16, *L. brevis* A17 dan *L. rhamnosus* R21 yang merupakan koleksi Seafast Center, IPB. Perbanyakkan massa sel bakteri asam laktat dilakukan dalam media de Man Rogosa Sharpe Broth (MRSB).

Media dan alat

Media yang digunakan dalam penelitian ini MRSB, MRSA, KH_2PO_4 , PCA, chloramphenicol. Bahan-bahan pelindung yang digunakan adalah sukrosa, susu skim, laktosa dan maltodekstrin diperoleh dari Toko Bratachem di Bogor. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat standar untuk analisa mikrobiologi, *freeze drier*, *deep freezer* dan *sentrifuse*.

Tahapan penelitian

Dalam penelitian ini dipelajari kurva pertumbuhan masing-masing kultur bakteri asam laktat untuk mengetahui waktu panen pada saat produksi biomassa yang paling optimal yaitu lama inkubasi pada saat kultur mencapai pertumbuhan maksimum (fase logaritmik akhir). Selanjutnya dilakukan pembuatan kultur kering dengan proses *freeze drying*. Pembuatan kultur kering mengacu pada Harmayani *et al.*, (2001). Parameter yang diamati dari kultur kering probiotik meliputi: total bakteri asam laktat sebelum dan setelah proses *freeze drying* (Harrigan *et al.*, 1998), ketahanan terhadap pH rendah yang mengacu pada Chou dan Weimer (1999) yang telah dimodifikasi dan ketahanan terhadap garam empedu 0,5% (Moser dan Savage 2001; Ngatirah *et al.*, 2000).

Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 2 faktor. Faktor pertama adalah jenis isolat bakteri asam laktat (3 taraf) dan faktor kedua adalah jenis bahan pelindung (5 taraf) dengan 2 kali ulangan. Data hasil pengamatan diolah dengan analisis ragam (ANOVA), bila hasilnya menunjukkan pengaruh nyata maka dilakukan uji lanjut Duncan (Steel and Torie, 1995).

Kurva pertumbuhan

Sebelum dilakukan pembuatan biomassa sel, maka harus diketahui terlebih dahulu bagaimana kurva pertumbuhan kultur bakteri asam laktat yang akan digunakan. Kurva pertumbuhan dibuat dengan cara menginokulasikan masing - masing kultur yang berumur 24 jam pada media MRSB dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Pada awal inkubasi (jam ke-0) dan setiap 1 jam dilakukan pengukuran jumlah bakteri dengan menggunakan spektrofotometer pada λ 600 nm.

Pembuatan Kultur Kering dengan Pengerinan Beku (Nuraida *et al.*, 1995; Harmayani *et al.*, 2001; Champagne *et al.*, 2001 yang dimodifikasi)

Sebelum proses pengerinan beku dilakukan produksi biomassa sel bakteri asam laktat (Harmayani *et al.*, 2001 yang dimodifikasi). Biomassa bakteri asam laktat dibuat dengan menggunakan media MRSB. Pada medium yang telah steril diinokulasi kultur bakteri asam laktat yang telah disegarkan sebanyak 10 % kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 16 - 20 jam. Kultur kerja selanjutnya dipanen dan disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipisahkan dengan bagian filtrat sehingga diperoleh biomassa basah.

Proses pengerinan beku dilakukan penambahan bahan pelindung berupa laktosa, sukrosa, susu skim dan maltodekstrin dengan konsentrasi 10% (b/v) pada biomassa basah bakteri asam laktat. Perbandingan antara biomassa basah dengan bahan pelindung adalah 1 : 10. Untuk memungkinkan difusi dari bahan pelindung maka larutan disimpan selama 1 jam pada suhu 23°C. Kultur selanjutnya dibekukan pada suhu -80°C selama 12 jam dan kemudian dikeringkan (*drying*) dengan pengering beku merk Labconco pada kondisi -50°C; 0,01 MPa selama 2 hari. Kultur bakteri asam laktat kering yang diperoleh selanjutnya diuji viabilitasnya selama pengerinan beku, ketahanan terhadap pH rendah, ketahanan terhadap garam empedu.

Viabilitas sel

Pengujian viabilitas sel bakteri asam laktat sebelum dan sesudah pengerinan beku dilakukan pada media MRS agar dengan metode tuang (*plate count*) dengan beberapa seri pengenceran. Sebanyak 1 ml kultur sebelum dikeringbekukan dan 0,1 gram kultur kering, kemudian diencerkan sampai pengenceran 10^{-8} , sebanyak 1 ml hasil pengenceran ditanam ke dalam cawan petri steril dan dituang media MRS agar diatasnya, digoyang-goyangkan sampai merata dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Total bakteri asam laktat sebelum dan setelah proses pengerinan beku dibandingkan.

Ketahanan terhadap pH rendah (pH 2,0)

Uji ketahanan terhadap asam dilakukan dengan metode *plate count* dengan modifikasi media. Ketahanan terhadap asam dilakukan dalam medium MRS broth yang diatur pada pH 2,0 menggunakan HCl 37%. Kultur yang telah disegarkan dalam MRS broth selama 24 jam, diinokulasikan ke dalam MRS broth kontrol dan MRS broth yang telah diatur pada pH 2,0, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 0 dan 5 jam. Hal ini sesuai dengan lamanya makanan berada di lambung yaitu 2 - 6 jam (Gropper & Groff 2001). Setelah inkubasi dilakukan hitungan cawan pada MRSA dengan metode tuang dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Ketahanan terhadap asam dihitung berdasarkan selisih unit log jumlah koloni yang tumbuh pada waktu inkubasi 0 jam dengan 5 jam.

Ketahanan terhadap garam empedu 0,5%

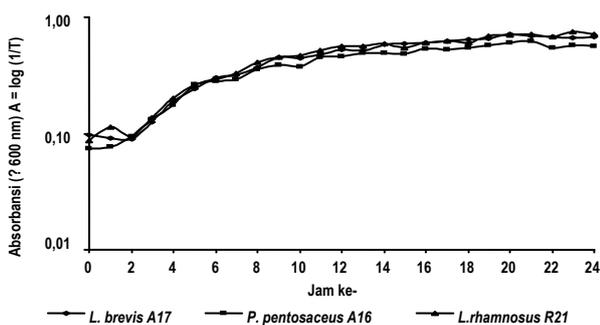
Uji ketahanan terhadap garam empedu dilakukan menurut Ngatirah *et al.*, (2000) tetapi konsentrasi garam empedu yang digunakan sebesar 0,5% (Moser dan Savage 2001). Konsentrasi ini dipilih karena ekuivalen dengan konsentrasi fisiologis garam empedu di dalam duodenum.

Sebanyak 1 ml kultur bakteri asam laktat dalam MRS broth berumur 24 jam dimasukkan ke dalam 9 ml MRS broth yang mengandung 0,5 % garam empedu kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 0 dan 5 jam. Jumlah bakteri asam laktat dihitung dengan metode tuang pada media MRSA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Ketahanan terhadap garam empedu dihitung berdasarkan selisih unit log jumlah koloni yang tumbuh setelah inkubasi selama 0 jam dengan kultur yang tumbuh setelah diinkubasi selama 5 jam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kurva pertumbuhan kultur bakteri asam laktat

Isolat bakteri asam laktat yang berasal dari ASI yaitu *P. pentosaceus* A16, *L. brevis* A17 dan *L. rhamnosus* R21 yang berpotensi sebagai probiotik mempunyai pola pertumbuhan yang hampir sama. Pertumbuhan diartikan sebagai penambahan dan dapat dihubungkan dengan penambahan ukuran, jumlah bobot, massa dan banyak parameter lainnya dari suatu bentuk hidup. Pengukuran peningkatan jumlah sel selama masa inkubasi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada λ 600 nm. Padatan pada medium yang merupakan sel dari bakteri asam laktat dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang ini. Semakin banyak jumlah sel yang tumbuh maka penyerapan cahaya semakin tinggi yang diketahui dari peningkatan absorbansi. Kurva pertumbuhan bakteri asam laktat dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan isolat Bakteri Asam Laktat dari ASI

Sel mengalami tahap adaptasi (fase lag) pada jam ke-0 sampai jam ke-2 (awal inkubasi). Fase lag merupakan masa penyesuaian mikroba sejak inokulasi sel mikroba ke dalam medium pertumbuhan (Mangunwidjaja *et al.* 1994). Pada fase lag tidak ada penambahan populasi, sel mengalami perubahan dalam komposisi kimiawi dan bertambahnya ukuran, terjadi sintesis enzim oleh sel yang diperlukan untuk metabolisme metabolit serta mengalami penambahan substansi intraseluler. Setelah fase lag selesai sel memasuki fase logaritma

(eksponensial) reproduksi selular mulai berlangsung. Konsentrasi selular atau biomassa meningkat sehingga massa sel menjadi dua kali lipat dengan laju sama dimana sel akan mengalami pembelahan dengan laju konstan (Pelczar *et al.*, 2005). Fase logaritmik berlangsung mulai jam ke-2 sampai jam ke-21, dimana masing-masing isolat memiliki waktu generasi dan kecepatan pertumbuhan yang spesifik.

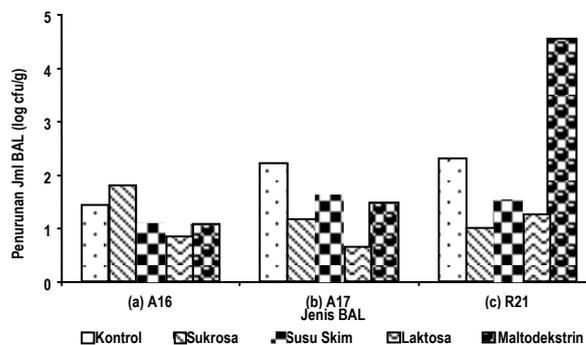
Semua isolat yang digunakan memasuki fase akhir logaritmik pada jam ke-15 sampai jam ke-21 inkubasi. Pada saat memasuki fase stationer, konsentrasi biomassa menjadi maksimal, jumlah sel cenderung stabil, pertumbuhan berhenti dan menyebabkan terjadinya modifikasi struktur biokimiawi sel. Berdasarkan pola pertumbuhan dapat diketahui bahwa isolat *L. rhamnosus* R21 memiliki kecepatan pertumbuhan yang paling tinggi dibandingkan dengan isolat lain yang kemudian diikuti oleh isolat *L. brevis* A17 dan *P. pentosaceus* A16. Dari kurva pertumbuhan tersebut dapat ditentukan waktu panen untuk produksi biomassa sel yaitu sekitar jam ke-15 sampai jam ke-21 inkubasi (pada saat akhir fase logaritmik).

Bakteri asam laktat dapat mengalami fase kematian yang disebabkan oleh beberapa faktor seperti: ketersediaan nutrisi pada media berkurang, energi cadangan dalam sel habis, adanya penumpukan asam dan metabolit lainnya. Perubahan pH medium dan metabolit dapat menurunkan jumlah sel-sel yang tumbuh pada fase berikutnya, kecepatan pembelahan menjadi menurun. Pertumbuhan bakteri asam laktat dapat terus berlangsung bila karbohidrat, asam amino, dan nutrisi lainnya tersedia, komponen penghambat atau racun dihilangkan, didegradasi atau diencerkan serta konsentrasi ion hidrogen diatur dibawah level toleransi spesies tersebut (Hutkins & Nannen 1993).

Pengaruh pengeringan beku (freeze drying) terhadap kultur kering Lactobacillus

Perubahan total bakteri asam laktat selama pengeringan beku

Uji ketahanan bakteri asam laktat dilakukan dengan membandingkan jumlah total bakteri asam laktat sebelum dan setelah pengeringan beku. Perubahan jumlah bakteri asam laktat selama pengeringan beku disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Penurunan jumlah bakteri asam laktat setelah proses pengeringan beku (freeze drying), (a) *P. pentosaceus* A16, (b) *L. brevis* A17, (c) *L. rhamnosus* R21

Ketahanan bakteri asam laktat dihitung berdasarkan berat kering. Gambar 2 menunjukkan bahwa diantara ketiga kultur bakteri asam laktat yang digunakan, kultur yang paling tinggi mengalami penurunan adalah *L. rhamnosus* R21 dan yang paling rendah mengalami penurunan adalah *P. pentosaceus* A16. Semakin rendah penurunan jumlah total bakteri maka kultur tersebut semakin tahan terhadap proses *freeze drying*. Penurunan total bakteri asam laktat pada kultur kering *P. pentosaceus* A16 tanpa perlakuan (kontrol) yaitu sebesar 1,44 log cfu/g lebih rendah dibandingkan *L. brevis* A17 (2,21 log cfu/g) dan *L. rhamnosus* R21 sebesar 2,33 log cfu/g. Hal ini menunjukkan bahwa kultur *P. pentosaceus* A16 lebih resisten terhadap perlakuan *freeze drying* dibandingkan dengan *L. brevis* A17 dan *L. rhamnosus* R21.

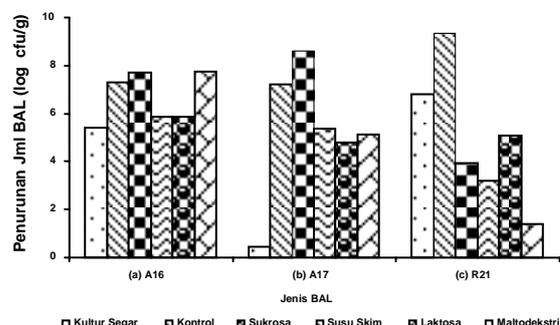
Pada kultur *P. pentosaceus* A16, penambahan bahan pelindung laktosa dengan penurunan jumlah bakteri sebesar 0,85 log cfu/g, susu skim (1,05 log cfu/g) dan maltodekstrin (1,08 log cfu/g) mampu melindungi viabilitas sel setelah *freeze drying* dengan penurunan total BAL lebih rendah dari kontrol (1,44 log cfu/g) sedangkan penambahan sukrosa (1,79 log cfu/g) kurang mampu memberikan perlindungan dengan penurunan total bakteri yang lebih besar dari kontrol (Gambar 2). Seluruh bahan pelindung seperti sukrosa (1,17 log cfu/g), susu skim (1,61 log cfu/g), laktosa (0,63 log cfu/g) dan maltodekstrin (1,48 log cfu/g) yang ditambahkan pada kultur *L. brevis* A17 mampu mempertahankan viabilitas sel dengan penurunan total bakteri lebih rendah dari kontrol (2,21 log cfu/g). Penambahan sukrosa (0,99 log cfu/g), susu skim (1,53 log cfu/g) dan laktosa (1,25 log cfu/g) pada kultur *L. rhamnosus* R21, mampu melindungi viabilitas sel setelah *freeze drying* dengan penurunan total bakteri asam laktat lebih rendah dari kontrol (2,33 log cfu/g), sedangkan penambahan maltodekstrin (4,56 log cfu/g) kurang mampu memberikan perlindungan dengan penurunan total bakteri lebih tinggi dibandingkan kontrol.

Hasil analisis statistik secara keseluruhan terhadap ketahanan *P. pentosaceus* A16 dengan penurunan jumlah bakteri 1,24 log cfu/g dan *L. brevis* A17 (1,42 log cfu/g) secara nyata ($p < 0,05$) lebih baik dibandingkan dengan *L. rhamnosus* R21 (2,134 log cfu/g). Penambahan bahan pelindung susu skim (1,39 log cfu/g), laktosa (0,91 log cfu/g) dan sukrosa (1,32 log cfu/g) secara nyata ($p < 0,05$) mampu mempertahankan viabilitas sel lebih baik dibandingkan dengan kontrol (1,99 log cfu/g) dan maltodekstrin (2,37 log cfu/g).

Penurunan ketahanan sel selama *freeze drying* kemungkinan disebabkan oleh proses pembekuan dan pengeringan. Proses pembekuan menyebabkan sel kehilangan kestabilannya, sehingga menjadi mudah rusak selama pengeringan. Faktor utama penyebab kerusakan akibat pengeringan sel bakteri kemungkinan karena *shock osmotik* dengan kerusakan membran dan perpindahan ikatan hidrogen yang berpengaruh terhadap sifat-sifat makromolekul hidrofilik dalam sel (Ray 1993). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Leslie *et al.*, (1995) menunjukkan bahwa gula dapat meningkatkan ketahanan mikroba terhadap *freeze drying* karena kemampuannya menurunkan suhu pada fase transisi membran dan melindungi struktur protein dalam keadaan kering.

Ketahanan terhadap pH rendah (pH 2,0)

Ketahanan kultur kering terhadap pH rendah ditunjukkan dengan penurunan total bakteri asam laktat setelah inkubasi dalam media yang mengandung asam selama 5 jam (Gambar 3).



Gambar 3. Penurunan jumlah bakteri asam laktat setelah inkubasi dalam media yang mengandung asam selama 5 jam (a) *P. pentosaceus* A16, (b) *L. brevis* A17 dan (c) *L. rhamnosus* R21

Gambar 3 menunjukkan bahwa penurunan jumlah kultur segar *P. pentosaceus* A16 (5,39 log cfu/g) lebih rendah dibandingkan dengan kultur kering setelah *freeze drying* (kontrol) yaitu 7,30 log cfu/g. Jumlah kultur segar *L. brevis* A17 sebesar 0,46 log cfu/g sementara penurunan kultur kering setelah *freeze drying* (kontrol) sebesar 7,20 log cfu/g. Penurunan kultur segar *L. rhamnosus* R21 (6,80 log cfu/g) lebih rendah dibandingkan dengan kultur kering setelah *freeze drying* (kontrol) yaitu 9,35 log cfu/g. Hal ini menunjukkan bahwa proses *freeze drying* dapat menurunkan ketahanan semua kultur kering terhadap pH rendah.

Penambahan bahan pelindung susu skim dan laktosa pada kultur kering *P. pentosaceus* A16 mampu meningkatkan ketahanannya terhadap pH rendah dibandingkan dengan kontrol (7,30 log cfu/g) dengan penurunan jumlah sel berturut-turut 5,84 dan 5,85 log cfu/g, sedangkan sukrosa dan maltodekstrin kurang mampu mempertahankan ketahanannya terhadap pH rendah dengan penurunan jumlah sel berturut-turut 7,70 dan 7,76 log cfu/g dibandingkan dengan kontrol (7,30 siklus log). Penambahan bahan pelindung susu skim, laktosa dan maltodekstrin mampu meningkatkan ketahanan kultur *L. brevis* A17 terhadap pH rendah (masing-masing terjadi penurunan sebesar 5,37 log cfu/g, 4,78 log cfu/g, 5,13 log cfu/g) dibandingkan dengan kontrol (7,20 log cfu/g), sedangkan sukrosa kurang mampu mempertahankan ketahanannya terhadap pH rendah dengan penurunan jumlah sel 8,62 log cfu/g lebih tinggi dari kontrol (7,20 log cfu/g). Penambahan semua jenis bahan pelindung pada kultur *L. rhamnosus* R21 mampu meningkatkan ketahanannya terhadap pH rendah dibandingkan dengan kontrol (9,35 log cfu/g), dengan penurunan jumlah bakteri sebesar 3,95 log cfu/g pada sukrosa, 3,21 log cfu/g pada susu skim, 5,09 log cfu/g pada laktosa dan 1,38 log cfu/g pada maltodekstrin.

Hasil analisis statistik ketahanan kultur *L. rhamnosus* R21 secara keseluruhan terhadap pH rendah lebih baik secara nyata ($p < 0,05$) dengan rata-rata penurunan 4,96 log cfu/g dibandingkan *L. brevis* A17 (5,23 log cfu/g) dan *P. pentosaceus*

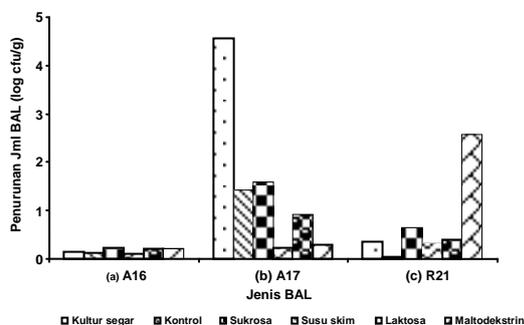
A16 (6,64 log cfu/g). Penambahan semua jenis bahan pelindung secara nyata ($p < 0,05$) mampu meningkatkan ketahanan sel terhadap pH rendah dibandingkan dengan kontrol.

Nilai pH rendah (pH 2,0) memiliki sifat merusak yang sangat kuat terhadap semua kultur yang diuji. Hal ini ditunjukkan dari penurunan jumlah sel setelah diinkubasi pada pH 2,0 selama 5 jam. Penghambatan asam terhadap pertumbuhan sel bakteri terjadi melalui efek denaturasi enzim-enzim yang ada dipermukaan sel, kerusakan lipopolisakarida dan membran luar serta penurunan pH sitoplasma melalui peningkatan permeabilitas membran. Selain itu sel bakteri telah mengalami stres yang cukup kuat karena pengaruh pengeringan dan pembekuan.

Asam lambung (HCl) termasuk asam kuat yang terdisosiasi dalam medium dan mampu menurunkan pH eksternal tetapi tidak dapat menembus membran sel. Adaptasi struktur membran luar merupakan mekanisme resistensi bakteri terhadap asam yang tergolong asam kuat. Adaptasi dapat berupa perubahan komposisi asam lemak dan fosfolipid membran. Hal yang serupa juga ditunjukkan dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Jacobsen (1999), terhadap 47 galur bakteri asam laktat dari berbagai sumber pada pH 2,5. Hasil pengujian tersebut menunjukkan bahwa hanya 29 galur bakteri asam laktat yang mampu bertahan pada pH 2,5 dan tidak ada satupun yang mampu tumbuh setelah inkubasi selama 4 jam.

Ketahanan terhadap garam empedu 0,5 %

Ketahanan terhadap garam empedu ditunjukkan dengan penurunan total bakteri asam laktat setelah inkubasi dalam media yang mengandung garam empedu 0,5 % selama 5 jam (Gambar 4). Gambar 5 menunjukkan bahwa penurunan jumlah kultur segar *P. Pentosaceus* A16 (0,15 log cfu/g) lebih tinggi dibandingkan dengan kultur kering setelah *freeze drying* (kontrol) yaitu 0,12 log cfu/g. Jumlah kultur segar *L. brevis* A17 mengalami penurunan sebesar 4,56 log cfu/g sementara penurunan kultur kering setelah *freeze drying* (kontrol) yaitu 1,43 log cfu/g. Penurunan kultur segar *L. rhamnosus* R21 (0,36 log cfu/g) lebih tinggi dibandingkan dengan kultur kering setelah *freeze drying* (kontrol) yaitu 0,03 log cfu/g. Hal tersebut menunjukkan bahwa proses *freeze drying* tidak menurunkan ketahanan kultur kering terhadap garam empedu 0,5%.



Gambar 4. Penurunan jumlah bakteri asam laktat setelah diinkubasi dengan MRSB yang mengandung garam empedu 0,5% selama 5 jam (a) *P. pentosaceus* A16, (b) *L. brevis* A17 dan (c) *L. rhamnosus* R21

Penambahan bahan pelindung susu skim pada kultur kering *P. pentosaceus* A16 mampu meningkatkan ketahanannya terhadap garam empedu 0,5% dengan penurunan sebesar 0,11 log cfu/g dan tidak berbeda jauh dengan kontrol (0,12 log cfu/g) sedangkan penambahan sukrosa, laktosa dan maltodekstrin mengalami penurunan jumlah sel lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol yaitu pada sukrosa sebesar 0,24 log cfu/g, laktosa dan maltodekstrin sebesar 0,22 log cfu/g. Penambahan bahan pelindung susu skim, laktosa dan maltodekstrin pada kultur *L. brevis* A17 mampu meningkatkan ketahanannya terhadap garam empedu 0,5% dengan penurunan jumlah sel pada susu skim sebesar 0,24 log cfu/g, laktosa (0,92 log cfu/g) dan maltodekstrin (0,30 log cfu/g) dibandingkan dengan kontrol (1,43 log cfu/g) sedangkan sukrosa (1,60 log cfu/g) kurang mampu mempertahankan ketahanannya terhadap garam empedu 0,5 % dengan penurunan jumlah sel lebih besar dari kontrol. Penambahan bahan pelindung sukrosa, susu skim, laktosa dan maltodekstrin pada kultur *L. rhamnosus* R21 kurang mampu mempertahankan ketahanannya terhadap garam empedu 0,5% dengan penurunan pada sukrosa (0,66 log cfu/g), susu skim (0,31 log cfu/g), laktosa (0,40 log cfu/g) dan maltodekstrin (2,56 log cfu/g) dibandingkan dengan kontrol (0,03 log cfu/g). Hal ini menunjukkan penurunan yang terjadi relatif kecil pada semua bahan pelindung yang digunakan kecuali pada maltodekstrin.

Hasil analisis statistik ketahanan terhadap garam empedu 0,5% menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,05$) dimana kultur *P. pentosaceus* A16 dengan penurunan 0,18 log cfu/g lebih tahan dibandingkan *L. rhamnosus* R21 dengan penurunan sebesar 0,76 log cfu/g dan *L. brevis* A17 sebesar 1,51 log cfu/g. Perlakuan penambahan bahan pelindung berpengaruh sangat nyata ($p < 0,05$) terhadap ketahanan kultur kering terhadap garam empedu 0,5%, dimana penambahan susu skim dengan penurunan sebesar (0,22 log cfu/g) memberikan hasil terbaik dalam meningkatkan ketahanan sel terhadap garam empedu 0,5% dibandingkan dengan laktosa (0,51 log cfu/g), sukrosa (0,83 log cfu/g), maltodekstrin (1,11 log cfu/g) dan kontrol (0,53 log cfu/g). Data di atas menunjukkan bahwa kultur kering yang diberi bahan pelindung maupun yang tidak diberi bahan pelindung memiliki ketahanan yang tinggi terhadap garam empedu 0,5% setelah diinkubasi selama 5 jam kecuali pada kultur segar *L. brevis* A17 penggunaan bahan pelindung maltodekstrin pada *L. rhamnosus* R21.

Penurunan jumlah bakteri karena adanya garam empedu 0,5% diduga disebabkan karena terjadinya kebocoran pada sel yang diinduksi oleh garam empedu, namun tidak sampai menyebabkan sel mengalami lisis. Toleransi terhadap garam empedu diduga disebabkan oleh peranan polisakarida sebagai salah satu komponen penyusun dinding sel bakteri gram positif namun mekanisme yang terlibat didalamnya belum diketahui dengan jelas (Surono *et al.*, 2000). Komponen lipid yang lebih dominan ditemukan pada membran bakteri gram positif, merupakan bagian penting untuk menjaga struktur membran (Kimoto *et al.*, 2001). Asam lemak dapat menurunkan kebocoran sel yang disebabkan oleh garam empedu.

Tabel 1. Perkiraan jumlah bakteri asam laktat yang mampu mencapai kolon

Perlakuan	Σ awal kultur kering BAL (log cfu/g)	Penurunan setelah terpapar pH 2,0 di lambung (log cfu/g)	Penurunan setelah terpapar garam empedu 0,5% di usus halus (log cfu/g)	Perkiraan Jumlah BAL di kolon (log cfu/g)
A16-K	10,75	7,30	0,12	3,33
A16-S	9,64	7,70	0,24	1,70
A16-SK	10,32	5,84	0,11	4,37
A16-L	10,53	5,85	0,22	4,47
A16-M	10,37	7,77	0,22	2,38
A17-K	10,20	7,20	1,43	1,58
A17-S	10,89	8,62	1,60	0,68
A17-SK	10,38	5,37	0,24	4,76
A17-L	10,84	4,78	0,92	5,14
A17-M	10,17	5,13	0,30	4,74
R21-K	10,14	9,35	0,03	0,76
R21-S	10,716	3,95	0,66	6,11
R21-SK	10,32	3,21	0,31	6,80
R21-L	10,54	5,09	0,40	5,05
R21-M	7,08	1,38	2,80	2,89

Keterangan :

A16 : *P. pentosaceus* A16

A17 : *L. brevis* A17

R21 : *L. rhamnosus* R21

K : Kontrol tanpa bahan pelindung

S : Bahan pelindung sukrosa

SK : Bahan pelindung susu skim

L : Bahan pelindung laktosa

M : Bahan pelindung maltodekstrin

Perkiraan jumlah bakteri asam laktat yang mencapai kolon

Bakteri asam laktat akan memiliki fungsi sebagai probiotik jika mampu mencapai kolon dalam keadaan hidup. Untuk dapat mencapai kolon, bakteri asam laktat akan melalui berbagai rintangan seperti kondisi asam tinggi pada lambung dan garam empedu di usus halus. Jumlah bakteri asam laktat yang mampu mencapai kolon dihitung berdasarkan selisih antara jumlah awal bakteri asam laktat dengan penurunan jumlah bakteri asam laktat setelah dipapar dengan asam (pH 2,0) dan garam empedu 0,5% selama 5 jam. Jika dikonsumsi sebesar 1 gram kultur kering maka perkiraan jumlah bakteri asam laktat yang mampu mencapai kolon dapat dilihat pada Tabel 1.

Pada Tabel 1 menunjukkan bahwa bakteri asam laktat yang mampu mencapai kolon dalam jumlah yang paling tinggi adalah *L. rhamnosus* R21 dengan bahan pelindung susu skim yaitu mencapai $6,4 \times 10^6$ cfu/g yang tidak berbeda jauh dengan kultur *L. rhamnosus* R21 dengan bahan pelindung sukrosa yaitu sebesar $1,3 \times 10^6$ cfu/g. Sedangkan jumlah bakteri asam laktat yang paling rendah mencapai kolon adalah *L. brevis* A17 dengan bahan pelindung sukrosa yaitu sebesar $4,8 \times 10^1$ cfu/g (48 cfu/g) yang tidak berbeda jauh dengan kontrol pada kultur *L. rhamnosus* R21 yaitu sebesar $5,8 \times 10^1$ cfu/g (58 cfu/g). Jumlah sel mikroba hidup yang harus terdapat pada produk probiotik masih menjadi perdebatan tetapi umumnya sebesar $10^6 - 10^8$ cfu/ml (Tannock 1999). Berdasarkan hal tersebut, kultur *Lactobacillus rhamnosus* R21 dengan bahan pelindung susu skim dapat dikatakan memiliki potensi sebagai probiotik.

Setiap jenis bahan pelindung memiliki kemampuan yang berbeda dalam kapasitasnya sebagai pelindung. Susu skim dan laktosa menunjukkan kemampuan melindungi yang paling baik diantara bahan yang lain. Namun antara laktosa dan susu skim memiliki kemampuan yang berbeda dari setiap stres/hambatan yang dialami oleh bakteri asam laktat. Laktosa mampu memberikan perlindungan yang lebih baik terhadap pengaruh pengeringan beku sedangkan susu skim mampu memberikan perlindungan terbaik kultur kering terhadap paparan asam lambung (pH 2,0) dan garam empedu 0,5%. Hal ini disebabkan karena komponen penyusun laktosa yaitu berupa glukosa dan galaktosa lebih sederhana dibandingkan susu skim, dimana susu skim tersusun dari berbagai bahan yang kompleks seperti laktosa, protein kasein, sitrat, fosfat yang mampu berperan sebagai buffer sehingga mampu melindungi sel dari paparan pH rendah dan garam empedu. Berat molekul laktosa lebih rendah dari susu skim sehingga laktosa dapat masuk ke dalam sel bakteri asam laktat dan memberikan perlindungan dari dua sisi membran sel selama proses pengeringan beku. Kasein susu yang berbentuk misel (*micelles*) mempunyai ukuran yang besar sehingga tidak dapat berdifusi ke dalam sel bakteri hanya komponen whey dari susu yang mampu berdifusi (Passos *et al.* 1993 diacu dalam Champagne *et al.*, 2001). Hal ini juga didukung hasil penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa penggunaan medium sukrosa-whey memberikan hasil lebih efektif sebagai bahan pelindung pada proses pengeringan beku dibandingkan medium berbasis susu (Champagne *et al.*, 1996 diacu dalam Champagne *et al.*, 2001).

KESIMPULAN

Proses pengeringan beku (*freeze drying*) menurunkan jumlah bakteri asam laktat namun masih dapat menghasilkan kultur kering probiotik yang memiliki viabilitas yang tinggi. Isolat *P. pentosaceus* A16 memiliki ketahanan paling tinggi terhadap proses *freeze drying* dengan penurunan rata-rata sebesar 1,24 log cfu/g, selanjutnya *L. brevis* A17 (1,42 log cfu/g) dan *L. rhamnosus* R21 (2,13 log cfu/g). Proses *freeze drying* dapat menurunkan ketahanan kultur kering terhadap pH rendah. Ketahanan terhadap pH rendah paling tinggi dimiliki oleh kultur kering *L. rhamnosus* R21 dengan penurunan jumlah bakteri 4,96 log cfu/g, kedua *L. brevis* A17 (5,26 log cfu/g) dan terakhir *P. pentosaceus* A16 (6,64 log cfu/g). Proses *freeze drying* tidak terlalu berpengaruh terhadap ketahanan kultur kering terhadap garam empedu 0,5%. Ketahanan terhadap garam empedu 0,5% paling tinggi pada *P. pentosaceus* A16 dengan penurunan jumlah bakteri 0,18 log cfu/g, kedua *L. rhamnosus* R21 (0,76 log cfu/g) dan terakhir *L. brevis* A17 (1,51 log cfu/g). Bahan pelindung yang paling baik digunakan untuk melindungi kultur kering adalah susu skim walaupun tidak berbeda nyata dengan laktosa. Dari hasil penelitian ini menyarankan bahwa perlu dilakukan pengujian lebih lanjut terhadap sifat-sifat probiotik yang lainnya pada kultur kering yang telah di *freeze drying* seperti kemampuan menurunkan jumlah bakteri patogen.

DAFTAR PUSTAKA

- Champagne CP, Gardner NJ. 2001. The Effect Protective Ingredients On The Survival of Immobilized Cells of *Streptococcus thermophilus* to Air and Freeze Drying. *Journal of Biotechnology*. Vol. 4 No. 3: 1-7.
- Chou LS, Weimer B. 1999. Isolation and characterization of acid and bile tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci* 82:23-31.
- Fu W, Etzel MR. 1995. Spray Drying of *Lactococcus lactis* sp. *lactis* C2 and Cellular injury. *J. Food Sci.* 60:195-200.
- Groff JL, Gropper SS. 2001. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. Wadsworth, Canada.
- Harmayani E, Ngatirah, Rahayu ES, Utami T. 2001. Ketahanan dan Viabilitas Probiotik Bakteri Asam Laktat selama Proses Pembuatan Kultur Kering dengan Metode Freeze dan Spray Drying. *J. Teknologi dan Industri Pangan*. XII: 126-132.
- Harrigan WF. 1998. *Laboratory Methods in Food Microbiology* 3rd edition. Academic Press, Inc., New York.
- Hutkins RW, Nannen NL. 1993. pH Homeostatis in *Lactic Acid Bacteria*. *J. Dairy Sci.* 76: 2354-2365.
- Jacobsen CN. 1999. Screening of probiotics activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp by in vitro techniques and evaluation the colonization of five selected strains in humans. *J. Appl and Environ Microbial* 65(11): 4949-4959.
- Kimoto H, Ohmomo S, Okamoto T. 2002. Enhancement of bile tolerance in *Lactococci* by Tween 80. *J. of Applied Microbiology*. 92: 41- 46.
- Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM. 1995. Trehalose and Sucrose Protect Both Membranes and Proteins in Intact Bacteria during Drying. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3592-3597.
- Mangunwidjaja D, Suryani A. 1994. *Teknologi Bioproses*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Moser SA, Savage DC. 2001. Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salt are unrelated properties in *Lactobacilli*. *J Appl and Environ Microbial* p:3476-3480.
- Ngatirah, Harmayani E, Rahayu ES, Utami T. 2000. Seleksi Bakteri Asam Laktat sebagai Agensia Probiotik yang Berpotensi Menurunkan Kolesterol. Seminar Nasional Industri Pangan. Patpi. 2000. Surabaya 10 – 11 Oktober 2000.
- Nuraida L, Susanti, Hartanti AW. 2007. Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Profile of Breast Milk and Their Potency as Probiotics 10th Asean Food Conference. Food for Mankind- Contribution of Science and Technology. Kuala Lumpur, Malaysia.
- Pelczar MJ, Chan ECS. 2005. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Penerjemah Ratna Siri Hadioetomo, Teja Imas, S. Sutarni Tjitrosomo, Sri Lestari Angka. Penerbit Universitas Indonesia.
- Ray B. 1993. Sublethal injury, bacteriocins and food microbiology. *ASM News* 59, 258-291.
- Shortt C. 1999. The Probiotic century: Historical and Current Perspectives. *Review Trends Food Science and Tech.* 10:411-417.
- Steel RGD, Torrie JH. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Suatu Pendekatan Biometrik. Edisi kedua. Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Surono, Nurani D. 2000. Exploration of indigenous *Lactic Acid Bacteria* from Dadih of West Sumatra for Good Starter Cultures and Probiotic bacteria. Laporan Akhir DCRG.
- Susanti, Nuraida L, Palupi NS. 2008. Immunomodulatory properties of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk in vitro and in vivo. *International Symposium on Probiotic from Asian Traditional Fermented for Healthy Gut Function*. 2008. Jakarta 19 – 20 Agustus 2008.
- Tamime AY. 1981. *Microbiology of Culture Structure*. Di dalam: Robinson, R.K.(ed). *Dairy Micobiology Vol II*. Appl. Sci. Publ., London.