

PRODUKSI ASAM LAKTAT OLEH *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DENGAN SUMBER KARBON TETES TEBU**PRODUCTION OF LACTIC ACID BY *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* USING MOLASSES AS CARBON SOURCE**Laita Nurjannah^{1,2*}, Suryani², Suminar Setiati Achmadi³, Azmi Azhari^{1,2}**INFO ARTIKEL**Submit: 20 Desember 2016
Perbaikan: 5 Februari 2017
Diterima: 15 Februari 2017**Keywords:**fermentation, lactic acid,
Lactobacillus delbrueckii
subsp. *bulgaricus*, molasses**ABSTRACT**

Lactic acid is needed in industrial bioplastics. However, the microbial production still uses food material for the substrate. Alternative substrates for the production of lactic acid are needed in industry. Molasses are potential substrates due to the richness in carbon. Molasses are also widely available and low-cost material. The objective of the research was molasses can be used as a carbon source needed by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to produce lactic acid. This study consisted of hydrolysis and detoxification of molasses, analysis qualitative test of reducing sugar from molasses, analysis of total sugar by phenol sulfuric acid, determination of bacterial growth, production and extraction of lactic acid, and analysis of lactic acid using high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that molasses can be used as an alternative carbon source as indicated by the growth of bacteria when the media were given 0,5% molasses. Concentration of the total sugar molasses was 1090 g/L. The reducing sugar test showed positive results for the Seliwanoff, Benedict, and Barfoed tests. The optimum of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* growth was at temperature of 42° C and 150 rpm of agitation. Production of lactic acid was conducted in 24 hours. The lactic acid content was 2,80%. The dry cell biomass was 0,002 g/L at pH of fermentation media 4,0. Analysis HPLC also showed that lactic acid was the product of fermentation.

1. PENDAHULUAN

Senyawa antara yang penting dan memiliki potensi besar untuk aplikasi produk baru seperti plastik ramah lingkungan atau bioplastik adalah asam laktat. Senyawa ini digunakan sebagai bahan polimer untuk aplikasi bidang farmasi dan kedokteran, serta mengatur pertumbuhan tanaman (Koesnandar, 2004). Selain itu, industri bioplastik membutuhkan asam laktat. Pembuatan bioplastik sangat diperlukan untuk mengurangi pencemaran lingkungan, terlebih lagi dengan adanya peningkatan sampah plastik. Fakta lain juga menyebutkan bahwa setiap tahun penduduk dunia menggunakan 500 miliar kantong plastik.

Perhitungan statistika menunjukkan bahwa dihasilkan satu juta kantong plastik tiap menitnya.

Kesadaran terhadap lingkungan semakin meningkat seiring meningkatnya masalah lingkungan yang timbul akibat kegiatan manusia sehari-hari. Salah satu sumber indikator tersebut adalah meningkatnya jumlah produk bioplastik dari tahun ke tahun. Tahun 2014, kapasitas bioplastik di Indonesia sebesar 14.000 ton/tahun (SWA Magazine, 2014). Tahun 2015, diperkirakan kapasitas bioplastik dunia sebesar 1.936.000 ton/tahun (European Bioplastics, 2013).

Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi menghasilkan bahan-bahan plastik yang bersifat *biodegradable* seperti kolagen, kasein, protein dan lipid yang berasal dari hewan dan tumbuhan (Utari *et al.*, 2008). Akan tetapi, bahan yang paling potensial adalah plastik yang berbahan poliasam laktat atau *polylactic acid* (PLA) (Darni, 2008). Penggunaan PLA tidak hanya terbatas pada bahan pembuatan bioplastik, tetapi PLA dapat dikembangkan sebagai bahan penyalut

¹Jurusan Tadris IPA Biologi, IAIN Syekh Nurjati Cirebon²Departemen Biokimia, Institut Pertanian Bogor³Departemen Kimia, Institut Pertanian Bogor*email: laita@syekhnurjati.ac.id

atau pengungkung obat (Robbani, 2004; Lu dan Chen, 2004), industri medis, dan industri tekstil. Substrat untuk pembuatan plastik PLA dengan menggunakan mikroba paling banyak terbuat dari jagung, singkong, dan sagu. Namun, bahan-bahan tersebut termasuk bahan pangan pokok. Oleh sebab itu, sangat diperlukan substrat alternatif untuk produksi asam laktat yang bukan termasuk bahan pangan dan tidak mengganggu lingkungan.

Hasil samping industri gula yaitu tetes tebu, mengandung senyawa nitrogen, unsur mikro, dan kandungan gula yang cukup tinggi terutama kandungan sukrosa 30-40%, glukosa 4-9%, dan fruktosa 5-12% sehingga sangat cocok menjadi sumber karbon untuk fermentasi asam laktat (Hidayat *et al.*, 2006). Menurut News dari Dinas Pertanian Blora (2016), tetes tebu memiliki ketersediaan yang tinggi dan harganya murah. Oleh karena itu, produksi asam laktat dengan penambahan tetes tebu pada fermentasi bakteri *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ini dapat menjadi salah cara untuk memanfaatkan hasil samping industri gula, selain untuk mengurangi penggunaan bahan pangan dalam produksi asam laktat.

Penelitian ini bertujuan memanfaatkan tetes tebu sebagai alternatif substrat yang berharga murah dalam produksi asam laktat dengan bantuan bakteri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Hipotesis dari penelitian ini adalah tetes tebu dapat menjadi alternatif substrat dalam produksi asam laktat secara fermentasi dengan bantuan *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan dasar untuk pembuatan PLA yang ramah lingkungan.

2. MATERIAL DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tetes tebu yang berasal dari pabrik pakan Indofeed yang bertempat di Jalan Sholeh Iskandar, Bogor. Bahan ini digunakan sebagai sumber karbon utama. Mikroba yang digunakan adalah *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain lokal yang berasal dari koleksi kultur laboratorium Mikrobiologi, LIPI Cibinong, yang merupakan isolat lokal.

Bahan lainnya yang digunakan adalah media Mann Rogose and Sharp (MRS) cair. Komposisi media MRS cair per 1000 ml terdiri dari 20 g glukosa, leb.lemco 8 g, ekstrak khamir 4 g, pepton 10 g, Na-asetat 5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g, K_2HPO_4 2 g, dan Tween 80 1 mL. Selain itu, digunakan pula NaOH 0.1131 N, NaOH 0.1037 N, CaCO_3 , fenol 5%, indikator

phenolphthalein (pp), spiritus, alkohol 70%, H_2SO_4 20%, H_2SO_4 absolut, metanol, asam laktat pro analisis, dan akuades.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian adalah autoklaf, sentrifus, pH-meter, spektrofotometer, evaporator vakum, *High Performance Liquid Chromatography*, timbangan analitik, jarum ose, pipet mikro, pipet Mohr, gelas ukur, sudip, batang pengaduk, *hot plate*, *waterbath shaker incubator*, oven, penangas Bunsen, tabung Eppendorf, labu Erlenmeyer, dan gelas piala.

Prosedur Penelitian

Hidrolisis dan Detoksifikasi Tetes Tebu, Uji Kualitatif Gula Pereduksi Tetes Tebu, dan Analisis Gula Total Tetes Tebu (Bintang, 2010)

Sebanyak 500 mL media tetes tebu dimasukkan ke dalam gelas piala. Sebanyak 10 mL H_2SO_4 20% ditambahkan pada media. Setelah itu, media dimasukkan ke dalam penangas air selama 15 menit. Media didinginkan perlahan-lahan, lalu dilakukan detoksifikasi dengan 1% arang aktif, dengan menambahkan arang aktif tersebut pada media.

Uji kualitatif gula pereduksi menggunakan metode uji Benedict, uji Seliwanoff, dan uji Barfoed. Pada uji Seliwanoff, sebanyak 3 mL pereaksi Seliwanoff dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 3 tetes tebu dan diletakkan di dalam penangas air dan diamati perubahan warnanya. Pada uji Barfoed, sebanyak 3 mL pereaksi Barfoed ditambahkan pada 2 mL tetes tebu hasil detoksifikasi dan diletakkan dalam penangas air selama 1 menit. Setelah itu diamati perubahan warnanya dengan seksama. Pada uji Benedict, sebanyak 5 mL pereaksi Benedict ditambahkan pada 8 tetes tebu dan disimpan dalam penangas air selama 3 menit, didinginkan, dan diamati perubahan warnanya.

Setelah itu dilakukan analisis gula total tetes tebu. Metode yang digunakan adalah metode asam fenol sulfat. Pembuatan kurva standar dilakukan terlebih dahulu dengan membuat larutan standar gula pada berbagai konsentrasi yaitu 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, dan 200 ppm. Sampel tetes tebu diambil dengan pipet sebanyak 0.5 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 0.5 mL fenol 5% dan dikocok dengan vorteks. Kemudian, sampel ditambahkan 2.5 mL H_2SO_4 pekat secara hati-hati melalui dinding tabung dan didiamkan selama 10 menit dalam air. Kemudian dikocok dengan vorteks dan didiamkan kembali selama 20 menit. Setelah dingin, diukur nilai absorbansnya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 490 nm. Nilai absorbans yang diperoleh kemudian dimasukkan pada

perhitungan hasil kurva standar. Larutan blanko yang digunakan adalah akuades yang diberi perlakuan sama seperti sampel.

Penentuan Kurva Pertumbuhan *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (MRS, MRS yang ditambah 0.5% tetes tebu) (Aulana, 2005)

Pada penelitian ini, tahapan awal untuk penentuan kurva pertumbuhan bakteri adalah peremajaan bakteri *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pada 25 mL media MRS cair tanpa tetes tebu pada suhu 42°C dan agitasi 150 rpm pada *waterbath shaker* selama 48 jam. Selanjutnya, sebanyak 10 mL media MRS diambil dengan vorteks ke dalam 16 tabung reaksi. Percobaan dilakukan sebanyak dua kali pengulangan. Masing-masing ulangan sebanyak 8 tabung yang terdiri atas waktu inkubasi 0, 2, 4, 8, 16, 32, 48, dan 64 jam. Lalu media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sebanyak 1% inokulum bakteri ditambahkan pada tabung-tabung reaksi yang berisi media MRS cair. Kemudian, tabung-tabung reaksi tersebut diinkubasi ke dalam *waterbath shaker* dengan suhu 42°C dan agitasi sebesar 150 rpm sesuai label waktu inkubasi yang terdapat pada tabung. Kultur bakteri tersebut kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 620 nm. Penentuan kurva pertumbuhan bakteri juga dilakukan pada media MRS cair yang ditambahkan 0.5% dan 1% tetes tebu dengan konsentrasi 100 g/L. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perbandingan pertumbuhan kultur bakteri di media MRS cair dan MRS cair yang ditambahkan tetes tebu.

Analisis Pola Penurunan Gula Sisa selama Fermentasi (Bintang, 2010)

Fermentasi hanya menggunakan media MRS cair yang ditambahkan 0.5% tetes tebu. Larutan fermentasi hasil penentuan kurva pertumbuhan *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dengan penambahan 0.5% tetes tebu pada media MRS disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan tersebut digunakan untuk analisis total gula yang ada pada media. Sebelum dianalisis, supernatan diencerkan terlebih dahulu dengan akuades hingga mencapai konsentrasi pada kisaran konsentrasi kurva standar (berwarna bening). Selanjutnya, sebanyak 1 mL supernatan diambil dengan pipet dan ditambahkan KOH 4 N sampai pH netral. Metode yang digunakan sama dengan metode yang dilakukan pada analisis total gula tetes tebu pada penelitian sebelumnya (Bintang, 2010).

Analisis Kadar Produksi Asam Laktat (AOAC 942.05, 1998) dan Pola Penurunan pH selama Fermentasi (AOAC 973.41, 1998)

Sebanyak 1 mL supernatan hasil fermentasi dilarutkan dengan akuades menjadi 25 mL di dalam labu erlenmeyer. Larutan ditambahkan 2-3 tetes indikator *phenolftalein* lalu dititrasi dengan larutan NaOH 0.1131 N yang telah distandarisasi dengan larutan asam oksalat 0.1 N. Titik akhir titrasi tercapai saat muncul warna merah muda yang pertama. Perhitungan jumlah persen asam laktat dilakukan dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Asam laktat (\%)} = \frac{V1 \times N \times BE \times FP \times 100\%}{V2 \times 1000}$$

- V1: Volume NaOH 0.1131 N yang telah distandarisasi
N : Normalitas NaOH hasil standarisasi
BE: Bobot ekuivalen asam laktat (90.08 g/ekuivalen)
FP: Faktor pengenceran
V2: Jumlah sampel yang dititrasi (mL)

Setelah itu, analisis pola penurunan pH selama fermentasi dilakukan menggunakan pH meter. Alat pH meter dikalibrasi terlebih dahulu dengan buffer pH 7.00 dan buffer pH 4.00. Tahapan kalibrasi pH adalah elektroda pH meter dibilas terlebih dahulu dengan akuades, dikeringkan dengan tissue, dicelup ke dalam buffer pH, dan ditunggu sampai layar menunjukkan nilai pH sesuai dengan buffer yang digunakan. Selanjutnya, sebanyak 5 mL supernatan diletakkan di dalam gelas piala kemudian diukur pH-nya secara duplo.

Ekstraksi dan Analisis Kualitatif Asam Laktat dengan HPLC (Zhuo *et al.*, 2011; Sikder *et al.*, 2012)

Sebanyak 500 mL media MRS cair dan 10 mL tetes tebu 100 g/L disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya media MRS cair dan 10 mL tetes tebu dicampur dalam keadaan steril. Kemudian ditambahkan 1% inokulum dari bakteri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* yang sudah diremajakan pada media yang telah dicampur tersebut. Sampel diinkubasi dalam *waterbath shaker* pada suhu 42°C dan agitasi 150 rpm selama 24 jam. Setelah 24 jam, sampel disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan dan pelet dipisahkan. Peletnya kemudian dikeringkan pada suhu 50°C. Supernatannya digunakan untuk tahap ekstraksi.

Tahapan awal ekstraksi yaitu supernatan hasil fermentasi terlebih dahulu disaring dengan menggunakan membran saring berukuran 0.45 μm dan 0.22 μm . Setelah disaring, supernatan dievaporasi menggunakan evaporator. Kemudian dilanjutkan dengan analisis HPLC menggunakan kolom C18 (4.6*150 MM, 5 μm). Fase gerak yang digunakan adalah metanol/air (20:80, v/v), kecepatan alirnya 0.5 mL min⁻¹, panjang gelombang yang digunakan adalah 210 nm, dan sampel yang diinjeksikan sebesar 10 μL . Detektor yang digunakan adalah detektor A. Selanjutnya, pH dan kadar asam laktat supernatan hasil fermentasi dihitung, metode yang digunakan untuk penentuan kadar asam laktat yaitu metode titrasi dengan menggunakan NaOH 0.1037 N yang telah distandarisasi asam oksalat 0.1 N.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pada Tahap Awal Penelitian

Hidrolisis tetes tebu menggunakan asam yaitu H₂SO₄ 20%. Hidrolisis ini bertujuan menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa agar lebih mudah digunakan oleh bakteri. Selain itu, detoksikasi bertujuan menghilangkan residu senyawa toksik berupa hidroksil metil furfural (HMF) yang akan menghambat pertumbuhan mikroba dan aktivitas fermentasi *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Carvalho *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2006). Detoksikasi tetes tebu menggunakan 1% arang aktif (Yuliatun dan Kurniawan, 2008).

Uji kualitatif gula pereduksi tetes tebu menggunakan uji Benedict, uji Selliwanof, dan uji Barfoed. Uji ini penting dilakukan untuk memastikan tetes tebu dapat digunakan sebagai substrat utama dalam fermentasi asam laktat yang menggunakan salah satu bakteri asam laktat yaitu *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Uji Benedict digunakan untuk mengetahui kandungan gula pereduksi pada tetes tebu. Uji Benedict berisi larutan alkali. Larutan alkali dari tembaga direduksi oleh gula yang mengandung gugus aldehida atau keton bebas dengan membentuk kupro oksida berwarna. Larutan Benedict mengandung kupri sulfat, natrium karbonat, dan natrium sitrat. Uji Benedict dilakukan pada suasana basa yang menyebabkan transformasi isomerik. Pada suasana basa, reduksi ion Cu²⁺ dari CuSO₄ oleh gula pereduksi akan berlangsung dengan cepat dan membentuk Cu₂O yang merupakan endapan merah bata. Pereaksi Benedict terdiri atas larutan Cu²⁺ dalam suasana basa kuat.

Uji Selliwanof digunakan untuk memastikan bahwa pada tetes tebu terdapat ketosa. Reagen Selliwanof terdiri atas 0.5% resorsinol dan 5 N HCl. Reaksi positif terjadi apabila terbentuk warna merah. HCl akan mengubah heksosa menjadi hidroksi metal furfural yang kemudian akan bereaksi dengan resorsinol membentuk kompleks yang berwarna merah.

Uji Barfoed digunakan untuk membedakan disakarida pereduksi dengan monosakarida produksi pada tetes tebu. Uji Barfoed mengandung kupri asetat yang dilarutkan dalam akuades dan ditambahkan dengan asam laktat. Pereaksi Barfoed dalam suasana asam akan direduksi lebih cepat oleh gula pereduksi monosakarida daripada disakarida dan menghasilkan Cu₂O (kupro oksida) berwarna merah bata (Bintang, 2010).

Semua uji tersebut menunjukkan hasil yang positif yaitu pada Uji Benedict dan Uji Barfoed terdapat endapan merah bata, serta media berubah menjadi merah pada Uji Selliwanof (Gambar 1). Uji gula pereduksi menunjukkan bahwa tetes tebu mengandung glukosa dan fruktosa. Hasil ini sesuai dengan Hidayat *et al.* (2006), yang menyatakan bahwa tetes tebu mengandung sukrosa 30-40%, glukosa 4-9%, dan fruktosa 5-12%.



1

Gambar 1. Hasil uji kualitatif gula pereduksi pada tetes tebu. (1) Uji Selliwanoff (2) Uji Barfoed, dan (3) Uji Benedict.

Analisis gula total tetes tebu menggunakan metode fenol sulfat. Metode ini dapat mengukur dua molekul gula pereduksi. Gula sederhana, oligosakarida, dan turunannya dapat dideteksi dengan fenol dalam asam sulfat yang pekat yang akan menghasilkan warna jingga kekuningan yang stabil (Taiyeb *et al.*, 2011).

Metode ini mampu mendeteksi dua gula pereduksi karena sukrosa yang ada dihidrolisis dahulu menjadi dua molekul glukosa sehingga dapat mengetahui gula pereduksi total. Serapan dibaca pada panjang gelombang 490 nm. Dengan cara ini didapatkan konsentrasi gula tetes tebu sebesar 1090 g/L. Hasil ini menunjukkan bahwa gula total yang dimiliki tetes tebu lebih besar dibandingkan dengan gula total hidrolisat pati sagu yaitu sebesar 435.83 g/L (Aulana, 2005).

Larutan standar glukosa yang digunakan adalah 0, 25, 50, 75, 100, 125, dan 150 ppm. Hasil pengukuran gula total menunjukkan bahwa tetes tebu memiliki kandungan gula yang tinggi sehingga dapat digunakan sebagai karbon utama dalam fermentasi asam laktat dengan bantuan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Menurut Hidayat *et al.* (2006), tetes tebu memiliki kandungan gula yang cukup tinggi yaitu sebesar 62%, data ini juga sesuai dengan hasil penelitian yang telah disebutkan sebelumnya bahwa konsentrasi tetes tebu yang terukur sebesar 1090 g/L. Hasil ini menunjukkan bahwa tetes tebu yang digunakan mengandung gula yang tinggi.

Penetapan kondisi optimum pertumbuhan bakteri didapatkan dari pembuatan kurva pertumbuhan bakteri. Sel bakteri ditumbuhkan dalam media MRS cair dan MRS cair yang ditambahkan 0.5% tetes tebu. Pemberian tetes tebu sebesar 0.5% dilakukan berdasarkan perhitungan konsentrasi gula yang mampu digunakan untuk pertumbuhan bakteri. Berdasarkan percobaan pendahuluan, penggunaan tetes tebu sebesar 1% menyebabkan bakteri tidak dapat tumbuh dengan optimum akibat media fermentasi yang terlalu pekat oleh cairan gula.

Selanjutnya, pengukuran sel bakteri pada panjang gelombang 620 nm dengan spektrofotometer bertujuan untuk mengukur tingkat kekeruhan yang berbanding lurus dengan waktu inkubasi dalam bentuk absorban. Cahaya yang dibiaskan oleh sumber cahaya akan diserap oleh sel sehingga semakin tinggi pertumbuhan sel akan memberikan nilai absorban yang lebih besar. Absorban kemudian dikonversi menjadi nilai *optical density* (OD).

Informasi tentang fase-fase pertumbuhan biomassa sel didapatkan dari kurva pertumbuhan. Kurva ini dibuat dengan pengamatan pada waktu 2n. Pengamatan pola pertumbuhan bakteri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dilakukan pada suhu 42°C dan agitasi 150 rpm dengan menggunakan media MRS cair, hasilnya menunjukkan bahwa bakteri ini dapat tumbuh dengan optimum. Berdasarkan kurva pertumbuhan bakteri yang didapatkan maka pertumbuhan bakteri terdiri atas 3 fase, diantaranya fase lag, eksponensial, dan stasioner.

Pada jam ke-2 dan jam ke-4 pertumbuhan biomassa sel terdeteksi nilai OD 0.04 menjadi 0.19 untuk sel bakteri yang terdapat pada media MRS cair. Nilai OD 0.09 menjadi 0.37 untuk sel bakteri yang terdapat pada media MRS cair yang telah ditambahkan 0.5% tetes tebu (Gambar 2). Hasil tersebut menunjukkan adanya perbedaan pada pertumbuhan bakteri. Hal ini terjadi karena

adanya tetes tebu yang menjadi penambah sumber karbon yang digunakan sebagai sumber energi dalam pembelahan sel. Hasil ini menunjukkan bahwa bakteri dapat beradaptasi dengan baik pada media yang diberi tetes tebu. Hasil pengamatan pada jam ke-2 dan jam ke-4 menunjukkan bahwa sel bakteri berada dalam fase lag. Pertumbuhan biomassa sel pada fase lag cenderung lambat karena adanya adaptasi terhadap media. Pada fase ini tidak terjadi kenaikan jumlah sel, namun ukuran sel mengalami peningkatan.

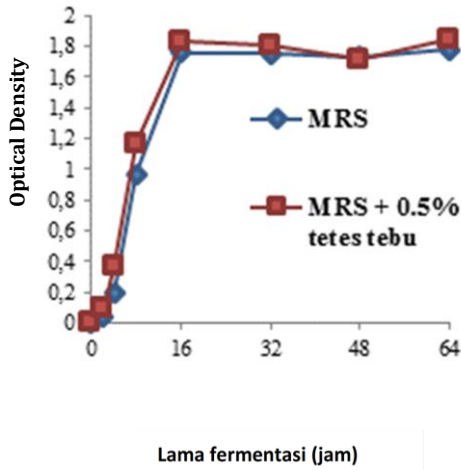
Fase ekponensial terjadi pada jam ke-4 sampai jam ke-16, sel menggunakan sumber karbon dan bahan-bahan lainnya yang terdapat dalam media untuk tumbuh. Pada fase ini terjadi peningkatan atau penggandaan populasi sel bakteri. Nilai OD pada media MRS cair mencapai 1.75, sedangkan pada media MRS cair yang ditambahkan 0.5% tetes tebu nilai OD mencapai 1.83. Peningkatan sel bakteri terjadi akibat adanya pembelahan biner sel yang meningkatkan jumlah sel hidup.

Kurva pertumbuhan menunjukkan bahwa pertumbuhan sel bakteri melambat (fase stasioner) pada jam ke-16 hingga jam ke-64). Pada fase ini fungsi sel masih berlangsung seperti metabolisme energi dan proses biosintesis. Fase ini juga memperlihatkan keseimbangan antara jumlah sel yang tumbuh dan yang mati (Sunatmo, 2009).

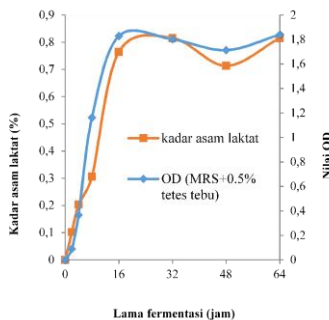
Kurva pertumbuhan menunjukkan perbedaan peningkatan pertumbuhan bakteri pada media MRS dan MRS yang ditambahkan 0.5% tetes tebu. Setelah membandingkan jumlah sel bakteri yang ditumbuhkan pada media MRS cair dan MRS Cair yang ditambahkan 0.5% tetes tebu, pada jam ke-64, pertumbuhan sel bakteri yang ditambahkan 0.5% tetes tebu memiliki peningkatan pertumbuhan sekitar 3.5%.

Hubungan pertumbuhan bakteri pada suhu 42°C dan agitasi 150 rpm, serta kadar asam laktat, maka lamanya fermentasi untuk produksi dilakukan di antara selang waktu 16-32 jam. Pada selang waktu tersebut terjadi peningkatan pertumbuhan bakteri yang maksimum. Selain itu, dari data pola produksi asam laktat pun menunjukkan bahwa produksi asam laktat maksimum terjadi pada selang waktu 16-32 jam (Gambar 3), sehingga fermentasi dilakukan selama 24 jam. Fermentasi yang dilakukan di atas 24 jam menyebabkan pertumbuhan bakteri sudah memasuki fase stasioner yang mendekati fase kematian karena substrat sudah mulai habis. Hal tersebut merangsang enzim-enzim yang berperan untuk pembentukan metabolit sekunder yaitu bacteriocin. Hal ini sesuai dengan penelitian yang

dilakukan Todorov dan Dicks (2007), menyebutkan bahwa aktivitas antibakteri berupa bacteriocin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus pentosus* ST712BZ optimum setelah lama fermentasi 24 jam dengan media pertumbuhan yang ditambahkan 20-40 g/L glukosa.



Gambar 2. Kurva pertumbuhan *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dalam media MRS cair dan media MRS cair yang ditambah 0.5% tetes tebu pada suhu 42 °C dan agitasi 150 rpm



Gambar 3. Hubungan kurva pertumbuhan bakteri (media MRS cair yang ditambah 0.5% tetes tebu) dengan kadar asam laktat

Bakteri dapat tumbuh pada media MRS cair yang ditambahkan 0.5% tetes tebu, sehingga terbukti dapat digunakan sebagai sumber karbon pada fermentasi asam laktat. Hal ini juga diperkuat dengan adanya hubungan yang berbanding lurus antara kurva pertumbuhan bakteri dengan kadar asam laktat. Semakin tinggi jumlah sel bakteri, maka semakin tinggi pula kadar asam laktat. Dengan membandingkan kadar asam laktat dan jumlah sel bakteri pada jam ke-64, kadar asam laktat sekitar 44% dari jumlah sel bakteri. Oleh karena itu, tetes tebu dapat menjadi alternatif substrat yang potensial.

Fermentasi Tetes Tebu

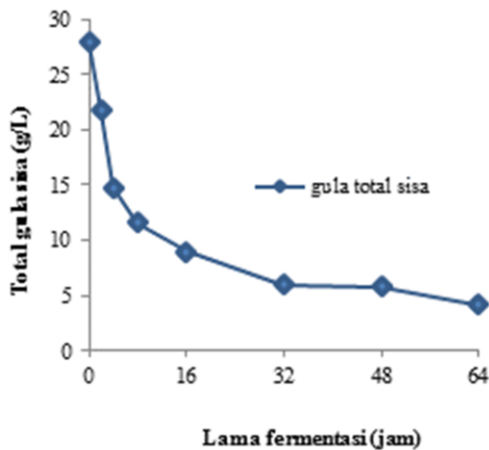
Selama fermentasi, sumber karbon akan dikonversi oleh mikroba menjadi biomassa sel dan produk yang ditandai dengan menurunnya konsentrasi sumber karbon dalam media. Perhitungan sisa total gula selama fermentasi dilakukan untuk mengetahui gula total yang tersisa pada larutan media fermentasi, sehingga dapat menggambarkan konsumsi gula oleh bakteri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Sisa gula total dihitung pada jam ke-2, 4, 8, 16, 32, 48, dan 64 jam. Hasilnya menunjukkan bahwa dari jam ke-0 sampai dengan jam ke-64 terjadi penurunan gula dari 27.92 g/L menjadi 4.16 g/L, sehingga pada jam ke-64 gula telah dikonsumsi sebesar 85% (Gambar 4). Penurunan gula sisa tertinggi terjadi pada selang waktu 2-4 jam yaitu sebesar 32%, karena bakteri berada pada fase lag, fase bakteri membutuhkan energi untuk pertumbuhan sel. Tingginya gula yang dikonsumsi oleh bakteri menunjukkan bahwa bakteri hidup dalam media gula yang cocok bagi pertumbuhannya. Sumber karbon dalam MRS cair adalah glukosa murni ditambah tetes tebu yang telah dihidrolisis.

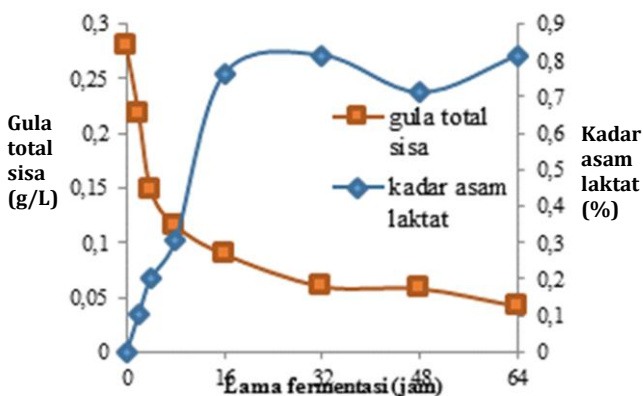
Pada jam ke-0 hingga jam ke-64 terjadi penurunan gula total dalam larutan media dengan laju yang tinggi disebabkan karena *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dapat dengan mudah mengkonsumsi gula-gula sederhana dalam media. Semakin tinggi konsentrasi gula total semakin banyak substrat (sumber karbon) yang dapat digunakan oleh bakteri. Dengan demikian bakteri mempunyai sumber karbon yang berlimpah sehingga akan memperpanjang fase eksponensial. Namun, jika pemecahan substrat secara berlebihan terus berlangsung, maka akan menyebabkan terakumulasinya asam laktat secara berlebihan pada media fermentasi sehingga akan menghambat pertumbuhan mikroba (Mirdamadi *et al.*, 2002). Maka pemberian substrat yang berlebihan dapat dicegah dengan menggunakan konsentrasi substrat secara tepat. Pada penelitian ini, kadar asam laktat yang dihasilkan berbanding terbalik dengan gula total sisa pada fermentasi (Gambar 5).

Penelitian yang dilakukan oleh Petry *et al.* (2000), menyebutkan bahwa *Lactobacillus bulgaricus* hanya dapat memanfaatkan glukosa sebanyak 2.0-3.5 g/L dalam fase eksponensial dan 8.0 g/L pada fase stasioner karena bakteri memerlukan banyak energi untuk mengubah substrat menjadi produk metabolit yang dapat mematikan bakteri peggangu. Pada penelitian ini,

gula yang berasal dari tetes tebu dapat digunakan sebagai sumber karbon bagi bakteri. Hal ini terjadi karena bakteri dapat beradaptasi dengan baik pada media yang diberi 0.5% tetes tebu yang diambil dari tetes tebu yang berkonsentrasi 100 g/L. Pernyataan ini diperkuat dengan adanya kurva antara kadar asam laktat dan gula total sisa menunjukkan hubungan yang berbanding terbalik. Semakin tinggi kadar asam laktat, maka semakin rendah gula total sisa pada cairan fermentasi.



Gambar 4. Pola penurunan gula sisa selama fermentasi dalam MRS cair yang ditambah 0.5% tetes tebu pada suhu 42°C dan agitasi 150 rpm



Gambar 5. Hubungan antara kadar asam laktat dengan gula total sisa selama fermentasi pada media yang ditambahkan 0.5% tetes tebu suhu 42°C dan agitasi 150 rpm

Komposisi media fermentasi yang digunakan untuk produksi asam laktat akan berpengaruh terhadap kinerja sel. Glukosa pada media digunakan sebagai sumber karbon, sedangkan ekstrak khamir digunakan sebagai sumber nitrogen. Garam-garam mineral dalam penelitian ini adalah $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ dan K_2HPO_4 . Beberapa logam dan mineral berpengaruh pada pertumbuhan sel dan fermentasi. Salah satunya

adalah magnesium. Ion magnesium adalah esensial untuk produksi enzim dan berperan sebagai aktivator untuk beberapa enzim (Birch *et al.*, 2003). Nutrisi lengkap yang terkandung dalam media produksi ini bertujuan agar sel dapat tumbuh dengan optimum sehingga dapat menghasilkan kadar asam laktat yang tinggi. Perhitungan kadar asam laktat dilakukan untuk mengetahui kadar asam laktat yang dihasilkan pada saat fermentasi oleh bakteri *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Selain itu, lama fermentasi juga berpengaruh terhadap pembentukan total asam, karena semakin lama fermentasi, bakteri *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mengalami peningkatan jumlah sel sehingga menghasilkan asam laktat semakin banyak (Astawan, 2008).

Asam laktat diukur melalui metode titrasi. Total asam secara tidak langsung menunjukkan asam laktat yang dihasilkan. Metode titrasi hanya mengukur titik ekuivalen nilai pH, dimana asam yang terbentuk selama proses fermentasi akan dinetralkan dengan basa (NaOH) sebagai peniternya, sehingga konsentrasi asam laktat yang sebenarnya tidak dapat diketahui dan membutuhkan analisis lain yang lebih spesifik seperti KCKT. Titrasi asam basa merupakan metode yang sudah banyak digunakan oleh para peneliti sebelumnya. Metode ini mudah digunakan, harganya murah, serta mudah ditemukan di laboratorium.

Kadar asam laktat dihitung pada jam ke-2, 4, 8, 16, 32, 48, dan 64 jam. Pada rentang jam ke-16 sampai jam ke-64 dihasilkan asam laktat sebesar 0.76%-0.82%. Total asam laktat yang dihasilkan yaitu sebesar 0.10%-0.82%. Hasil ini mendekati Standar Nasional Indonesia untuk produksi asam laktat dari hasil fermentasi (1992) yaitu 0.5%-2%.

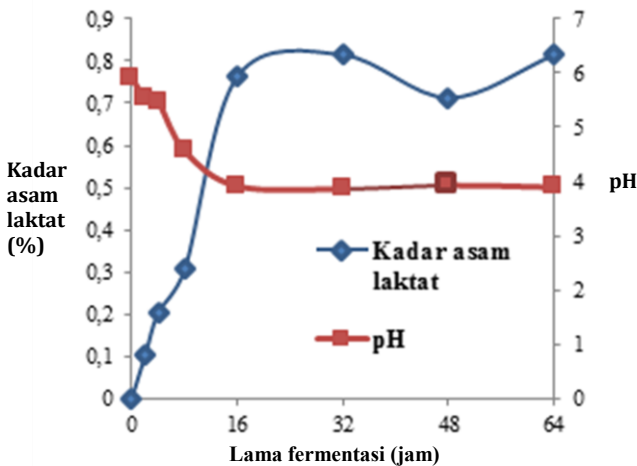
Selain itu, perhitungan nilai derajat keasaman juga dilakukan yang bertujuan untuk mengetahui nilai pH dimana nilainya berbanding terbalik dengan kadar asam laktat dalam larutan fermentasi, semakin tinggi kadar asam laktat maka pH larutan fermentasi akan semakin rendah (Gambar 6). Kadar asam laktat tertinggi terjadi pada selang waktu 16-32 jam sesuai dengan penurunan pH pada larutan fermentasi.

Nilai pH sangat berkaitan dengan kadar asam laktat. Asam laktat merupakan salah satu metabolit primer yang dihasilkan dalam proses fermentasi. Penurunan nilai pH menunjukkan pembentukan asam organik akibat metabolisme mikroba. Hal ini didukung dengan pernyataan Sunatmo (2009), bahwa pada media fermentasi, pH dapat berubah selama pertumbuhan berlangsung sebagai akibat reaksi metabolisme

yang mengkonsumsi atau menghasilkan substansi asam atau basa. Bakteri *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* merupakan bakteri asam laktat yang bersifat homofermentatif (Hidayat *et al.*, 2006), sehingga sangat cocok digunakan sebagai bakteri penghasil asam laktat.

Lama fermentasi mempengaruhi derajat keasaman. Menurut Surono (2004), lama fermentasi berpengaruh terhadap pH dan aktivitas antibakteri, karena semakin lama fermentasi, bakteri semakin aktif dan semakin banyak jumlahnya sehingga mempunyai kemampuan yang lebih besar untuk memecah substrat. Pemecahan substrat akan berpengaruh terhadap produksi asam laktat. Penurunan pH diakibatkan adanya akumulasi asam laktat.

Derajat keasamaan (pH) dihitung pada jam ke-0, 2, 4, 8, 16, 32, 48, dan 64 jam. Hasilnya menunjukkan bahwa pH pada jam ke-0 sebesar 5.92 dan pH pada jam ke 64 sebesar 3.9 (Gambar 6). Hasil ini sesuai dengan pernyataan bahwa pola pembentukan asam total sebanding dengan pembentukan asam laktat. Kadar asam laktat tertinggi terjadi pada selang waktu 16-64 jam yaitu dari 0.76-0.82. Berdasarkan hasil tersebut, nilai asam total yang terbentuk selama fermentasi meningkat dengan bertambahnya waktu fermentasi.



Gambar 6. Hubungan antara kadar asam laktat dengan nilai pH selama fermentasi

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* menghasilkan asam laktat yang disaring dengan membran filtrasi berukuran 0.45 µm dan 0.22 µm (Sikder *et al.*, 2012). Penyaringan ini bertujuan untuk memisahkan bakteri dan khamir dari larutan hasil fermentasi. Selanjutnya, dilakukan filtrasi untuk memisahkan bakteri dan evaporasi untuk memekatkan asam laktat.

Hasil menunjukkan bahwa pada fermentasi selama 24 jam, biomassa sel kering yang

dihasilkan sebesar 0.002 g/L, sampel mempunyai pH sebesar 4.0, dan asam laktat yang dihasilkan sebesar 2.80% (28 g/L). Hasil ini didapat setelah dilakukan filtrasi dan pemekatan sebesar 50%. Asam laktat yang dihasilkan dari proses ini lebih besar daripada asam laktat yang dihasilkan dari fermentasi dengan media hidrolisat pati sagu yang sebesar 1.244%. (Aulana, 2005). Analisis HPLC menunjukkan bahwa asam yang dihasilkan adalah asam laktat. Hal ini dapat dilihat dari waktu retensi yang sama antara larutan standar asam laktat dengan sampel yaitu pada rentang waktu ke 20-40 menit. Kromatogram sampel menunjukkan bahwa sampel belum 100% murni asam laktat. Oleh karena itu, sangat diperlukan metode yang efektif untuk pemurnian asam laktat yang berasal dari hasil fermentasi.

4. KESIMPULAN

Tetes tebu dapat digunakan sebagai salah satu alternatif sumber karbon untuk produksi asam laktat oleh *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dengan konsentrasi gula total 1090 g/L. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* memiliki pertumbuhan yang optimum pada suhu 42°C dengan kecepatan agitasi 150 rpm. Produksi asam laktat oleh *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dengan 0.5% tetes tebu sebagai sumber karbon pada media MRS (27.92 g/L) mencapai optimum pada jam ke-24 dengan kadar asam laktat sebesar 2.800% dan biomassa sel kering sebesar 0.002 g/L serta pH media fermentasi sebesar 4.0. Analisis kualitatif dengan menggunakan KCKT menunjukkan bahwa asam laktat adalah produk yang dihasilkan dari proses fermentasi.

DAFTAR PUSTAKA

AOAC. 1998. Official Method of Analysis of The Association of Official Analytical Chemist. Washington.

Astawan, M. 2008. Brem. [terhubung berkala]. <http://cyberned.cbn.net> [29 April 2012].

Aulana, L.N. 2005. Pemanfaatan hidrolisat pati sagu untuk produksi asam laktat oleh *Lactobacillus casei* FNCC 266. [Skripsi]. Institut Pertanian Bogor, Bogor

Bintang, M. 2010. Biokimia Teknik Penelitian. Erlangga, Jakarta

Birch, R.M., Ciani, M., Walker, G.M. 2003. Magnesium, calcium, and fermentative metabolism in wine yeast. *J Wine Res* 14: 3-15.

Carvalho, W. 2002. Use of immobilized candida yeast cell for xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysis. *Applied Biochem and Biotechnology* 98:489-496.

Darni, Y., Chici, A., Ismiyati, D. 2008. Sintesa bioplastik dari pisang dan gelatin dengan palsticizer gliserol. Di dalam: *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II2008*. Univeritas Lampung, Lampung

European Bioplastics. 2013. Global production capacities of bioplastics 2014 (by material type).[terhubung berkala]

- www.bio-based.eu/markets. [11 Februari 2017].
- Hidayat, N., Padaga, M.C., Suhartini, S. 2006. Mikrobiologi Industri. Andi Offset, Yogyakarta.
- Koesnandar. 2004. Penelitian dan pengembangan asam laktat di Indonesia. Simposium asam laktat: Peluang dan aplikasi di industri. 20 April 2004. Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Jakarta.
- Mirdamadi, S.H. 2002. Comparison of lactic acid isomers produced by fungal and bacterial strains. *Iran Biomedic Journal* 6 (2):69-75.
- News. 2016. Beternak cerdas bagi pemalas. [terhubung berkala]<http://dintanbunnakikanblora.com/beternak-cerdas-bagi-pemalas-metode-praktis-usaha-penggemukan-sapi-potong-yang-menguntungkan/>. [12 Februari 2017].
- Petry, S., Furlan, S., Crepeau, M.J., Cerning, J., Desmazeud, M. 2000. Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (8):3427-3431.
- Pranamuda, H. 2001. Bahan Bioplastik Berbahan Baku Pati Tropis. BPPT, Jakarta.
- Robbani, M.N. 2004. Biodegradasi struktur dan morfologi mikrosfer polilaktat [skripsi]. Departemen Kimia, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Sikder, J., Roy, M., Dey, P., Pal, P. 2012. Techno-economic analysis of membrane-integrated bioreactor system for production of lactic acid from sugarcane juice. *Biochemical Engineering Journal* 63:81-87.
- Sunatmo, T.I. 2009. Mikrobiologi Esensial. Ardy Agency, Jakarta.
- Surono, I.S. 2004. Probiotik, Susu Fermentasi, dan Kesehatan. TRICK, Jakarta.
- SWA Magazine. 2014. Enviplast, inovasi kantong ramah lingkungan.[terhubung berkala] www.MajalahSWAOnline.htm. [11 Februari 2017].
- Taiyeb, M. 2011. Penuntun Praktikum Analisis Gizi Pangan. Laboratorium Biologi FMIPA UNM, Makassar.
- Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. 2007. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolated from boza. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:1.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. 2006. *Microbiology: an Introduction* 9th ed. Pearson Education, San Fransisco.
- Utari, S.M., Darni, Y., Utami, H. 2008. Pemanfaatan agar-agar *Gracilaria cornonapifolia* dan kitosan untuk pembuatan bioplastik dengan gliserol sebagai plasticizer. Di dalam: *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II 2008*. Universitas Lampung, Lampung.
- Yuliatun, S., Kurniawan, Y. 2008. Detoksifikasi ampas tebu sebagai perlakuan pendahuluan substrat fermentasi bioetanol. *Majalah Penelitian Gula* 44 (4):249-258.