

**OPTIMASI SUMBER NITROGEN TERHADAP PERTUMBUHAN
Lactobacillus acidophilus DAN UJI AKTIVITAS TERHADAP
PENGHAMBATAN PERTUMBUHAN *Escherichia coli***

Laporan Tugas Akhir

**Suci Roma Basaria
12161037**



**Universitas Bhakti Kencana
Fakultas Farmasi
Program Strata I Farmasi
Bandung
2020**

LEMBAR PENGESAHAN

OPTIMASI SUMBER NITROGEN TERHADAP PERTUMBUHAN *Lactobacillus acidophilus* DAN UJI AKTIVITAS TERHADAP PENGHAMBATAN PERTUMBUHAN *Escherichia coli*

Laporan Tugas Akhir

Diajukan untuk memenuhi syarat kelulusan Program Strata I Farmasi

Suci Roma Basaria
12161037

Bandung, Agustus 2020

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Serta,



(Rahma Ziska., M.Si)



(apt. Garnadi Jafar., M.Si)

ABSTRAK

OPTIMASI SUMBER NITROGEN TERHADAP PERTUMBUHAN *Lactobacillus acidophilus* DAN UJI AKTIVITAS TERHADAP PENGHAMBATAN PERTUMBUHAN *Escherichia coli*

Oleh :

Suci Roma Basaria

12161037

Asam organik yang dihasilkan probiotik merupakan alternatif yang digunakan untuk menggantikan penggunaan antibiotik. Diperlukan beberapa komponen nutrisi dalam media pertumbuhan agar bakteri mampu menghasilkan asam organik sebagai antibakteri. Salah satu nutrisi yang dibutuhkan adalah nitrogen. Optimasi sumber nitrogen dibuat dalam tiga variasi (ekstrak ragi, sodium nitrat, dan kombinasi keduanya) yang ditambahkan pada media pertumbuhan *L. acidophilus* untuk mengetahui pengaruhnya terhadap pertumbuhan bakteri, kadar asam laktat yang dihasilkan, dan aktivitasnya dalam menghambat *E. coli*. Kurva pertumbuhan bakteri pada penelitian ini diamati dari jam ke-16 sampai dengan jam ke-24. Media pertumbuhan dengan penambahan ekstrak ragi menunjukkan peningkatan nilai absorbansi yang signifikan (0.169, 0.619, 0.803, 0.979, dan 1.012); media dengan penambahan sodium nitrat tidak menunjukkan adanya peningkatan nilai absorbansi (0.453, 0.436, 0.429, 0.42, 0.434); dan media dengan penambahan kombinasi kedua sumber nitrogen menunjukkan adanya peningkatan nilai absorbansi (0.578, 0.678, 0.874, 0.99, 1.176). Berdasarkan nilai pH yang diperoleh dari ketiga variasi tersebut media dengan penambahan ekstrak ragi menghasilkan pH yang lebih asam dibandingkan media variasi lainnya. Nilai pH yang semakin asam dapat meningkatkan kemampuan bakteri dalam menghambat pertumbuhan *E. coli*. Hasil penelitian membuktikan bahwa ekstrak ragi mampu memberikan efek terbaik dari variasi sumber nitrogen lainnya.

Kata Kunci : *L. acidophilus*, nitrogen, ekstrak ragi, antibakteri

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF NITROGEN SOURCES ON *Lactobacillus acidophilus* GROWTH AND ACTIVITY TEST ON GROWTH INCREASE *Escherichia coli*

By :

Suci Roma Basaria

12161037

*Organic acid produced by probiotics are an alternative used to replace antibiotics. Several nutritional components are needed in the growth medium so that bacteria are able to produce organic acids as antibacterial. One of the nutrient needed is nitrogen. Optimization of nitrogen sources was made in three variations (yeast extract, sodium nitrate, and a combination of both) which were added to *L. acidophilus* growth medium to determine its effect on bacterial growth, levels of lactic acid produced, and its activity in inhibiting *E. coli*. The bacterial growth curve in this research was observed from the 16th to 24th hour. The growth medium with the addition of yeast extract showed a significant increase in absorbance values (0.169, 0.619, 0.803, 0.979, and 1.012); medium with the addition of sodium nitrate did not show an increase in absorbance values (0.453, 0.436, 0.429, 0.42, 0.434); and medium with the addition of a combination of two nitrogen sources showed an increase in absorbance values (0.578, 0.678, 0.874, 0.99, 1.176). Based on the pH values obtained from the three variations of the medium with the addition of yeast extract produces a more acidic pH than other variation medium. An increasingly acidic pH value can increase the ability of bacteria to inhibit the growth of *E. coli*. The results of the research prove that the yeast extract is able to provide the best effect from other nitrogen source variations.*

Keywords: *L. acidophilus, nitrogen, yeast extract, antibacterial*

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur hanya bagi Tuhan Yesus Kristus, oleh karena kasih setia, kemurahan dan anugerah-Nya yang melimpah, akhirnya penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi berjudul: “Optimasi sumber nitrogen terhadap pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* dan uji aktivitas terhadap penghambatan pertumbuhan *Esherichia coli*”.

Selama penyusunan skripsi ini penulis mendapat banyak motivasi dari berbagai pihak yang telah mendukung dan membimbing penulis. Kasih yang tulus serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Kedua orang tua penulis T. Siagian (†) dan Masrina Lusiana Simangunsong yang dengan tulus memberikan kasih sayang, cinta, doa, perhatian, dukungan moral dan materil yang telah diberikan selama ini. Terima kasih telah meluangkan segenap waktu untuk mengasuh, mendidik, membimbing, dan mengiringi perjalanan hidup penulis dengan dibarengi doa yang tiada henti agar penulis sukses dalam menggapai cita-cita.
2. Untuk adik-adikku tersayang Fransisca Natasya Siagian, Ruben Jeremia Siagian, Ezra Lamhot Abednego Siagian dan Ramot Januar Siagian, terima kasih atas setiap doa yang kalian ucapkan. Dan selalu memberikan dukungan hingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
3. Untuk Mamatua Betsaida, Kak Frida, Bang Roy, Kak Nadia, Bang Niko, Bang Jhon, Kak Anita, Tulang dan Nangtulang Kiking, terimakasih atas semua dukungan yang telah diberikan untuk penulis selama menempuh perkuliahan.
4. Irvan Desmond Octavianus Simbolon yang selalu menemani dalam setiap canda, tawa, tangisan dikala penulis mengalami kesulitan. Selalu memberikan dukungan hingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Ibu Rahma Ziska., M.Si selaku pembimbing utama dan Bapak apt. Garnadi Jafar., M.Si selaku pembimbing serta yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing penulis
6. Industri Farmasi PT MEDION FARMA JAYA yang telah mengizinkan penulis untuk melaksanakan penelitian

7. Divisi Corporate Legal, Bapak Bambang Irawan, Mba Yuyu, Mba Okky, dan Mas Radit. Terimakasih untuk segala kemudahan bagi penulis dalam melaksanakan bekerja dibarengi kuliah, semangat dan motivasi dari awal penulis memulai perkuliahan hingga saat ini penulis selesai menyusun skripsi
8. Mba Vede selaku pengawas penulis dari tahun 2014 – 2019, terimakasih atas bimbingannya saat penulis memulai perkuliahan hingga saat ini.
9. Mas Randy Jullihar dan Mas Surya Atmaja telah membimbing penulis dari awal memikirkan judul penelitian hingga skripsi ini selesai disusun. Dan Mba Citra Arifin telah membantu sebagian tahapan kerja dalam penelitian penulis
10. Segenap karyawan dan karyawan Divisi Biological Product Research and Development, khususnya anak persiapan (Teh Ina, Teh Wulan, Hesti, Fadia) yang telah membantu penulis dalam menyiapkan setiap alat dan bahan yang diperlukan selama penelitian, anak steril (Fahri, Nida, A Anto, Teh Ani) yang telah membantu penulis dalam penelitian.
11. Ibu apt. Elis Susilawati, M.Si selaku Kaprodi Fakultas Farmasi Universitas Bhakti Kencana sekaligus dosen wali penulis yang mau membimbing dan meluangkan waktunya untuk berdiskusi mengenai kelancaran penulis dalam berkuliah
12. Segenap dosen pengajar Fakultas Farmasi Universitas Bhakti Kencana atas pengetahuan yang telah diberikan kepada penulis selama duduk dibangku kuliah
13. Segenap staff dan karyawan Universitas Bhakti Kencana Bandung yang telah memberikan bantuan kepada penulis selama duduk dibangku kuliah
14. Komunitas Kristen YOUTH FRESH, dan Sekolah Minggu GSJA Cimahi yang selalu mendukung dalam doa, dan memberikan semangat kepada penulis hingga saat ini.
15. Keluarga besar Siagian dan Simangunsong yang selalu memberikan dukungan doa untuk penulis
16. Teman – teman angkatan 2016 Fakultas Farmasi khususnya Farmasi 5 (lima), terimakasih atas kebersamaan selama empat tahun ini, terimakasih untuk setiap kehebohan, canda tawa, gurauan dari awal perkuliahan hingga saat ini. Sukses untuk kita semua.

17. Seluruh pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terimakasih untuk semua doa dan dukungan yang telah diberikan kepada penulis.

Mohon maaf jika dalam penulisan skripsi ini terdapat kekurangan, kiranya skripsi ini dapat bermanfaat dan memberikan pengetahuan tambahan bagi pembaca.

Terima Kasih

Bandung, Agustus 2020

Penulis,

Suci Roma Basaria

NPM. 12161037

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian	3
1.4 Hipotesis Penelitian	4
1.5 Tempat dan Waktu Penelitian.....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Probiotik.....	5
2.1.1 Probiotik sebagai Antibakteri	5
2.1.2 Jenis bakteri Probiotik	7
2.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	12
2.3 <i>Escherichia coli</i>	15
2.4 Fermentasi.....	16
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	18
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	18
3.2 Subyek Penelitian	18
3.3 Metode Pengumpulan Data.....	18
3.4 Analisis Data.....	19
BAB IV. PROSEDUR PENELITIAN	20
4.1 Kultivasi Bakteri	20
4.2 Optimasi sumber nitrogen terhadap pertumbuhan.....	20
4.3 Kuantifikasi kadar Asam Laktat dengan <i>High Performance Liquid Chromatography (HPLC)</i>	20
4.4 Uji Aktivitas Antibakteri	21

BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	23
5.1 Kultivasi Bakteri	23
5.2 Optimasi sumber nitrogen terhadap pertumbuhan.....	24
5.3 Kuantifikasi kadar asam laktat dengan <i>High Performance Liquid Chromatography (HPLC)</i>	30
5.4 Uji aktivitas antibakteri.....	32
BAB VI. SIMPULAN DAN SARAN	34
6.1. SIMPULAN	34
6.2. SARAN.....	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	41

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Morfologi koloni <i>L. acidophilus</i> secara makroskopik.....	23
Tabel 4.2 Jumlah koloni <i>E. coli</i> yang tumbuh dari hasil campuran kultur bakteri <i>L. acidophilus</i> dan <i>E. coli</i>	32

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Mekanisme kerja probiotik	6
Gambar 2.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	8
Gambar 2.3 <i>Lactobacillus casei</i>	8
Gambar 2.4 <i>Lactobacillus plantarum</i>	8
Gambar 2.5 <i>Bifidobacterium bifidum</i>	9
Gambar 2.6 <i>Bifidobacterium longum</i>	9
Gambar 2.7 <i>Bifidobacterium breve</i>	10
Gambar 2.8 <i>Bifidobacterium lactis</i>	10
Gambar 2.9 Genus Bacillus	11
Gambar 2.10 <i>Aspergillus oryzae</i>	11
Gambar 2.11 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
Gambar 2.12 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	13
Gambar 2.13 Kurva Pertumbuhan bakteri	14
Gambar 2.14 <i>Escherichia coli</i>	15
Gambar 5.1 <i>L. acidophilus</i> pada media MRSA	23
Gambar 5.2 Kurva pertumbuhan <i>L. acidophilus</i> pada media MRS	24
Gambar 5.3 Kurva pertumbuhan <i>L. acidophilus</i> pada media hasil dimodifikasi dengan ekstrak ragi	26
Gambar 5.4 Kurva pertumbuhan <i>L. acidophilus</i> pada media hasil dimodifikasi dengan sodium nitrat	27
Gambar 5.5 Kurva pertumbuhan <i>L. acidophilus</i> media hasil dimodifikasi dengan kombinasi sumber nitrogen	28
Gambar 5.6 Grafik perbandingan nilai pH dari ketiga media variasi.....	29

Gambar 5.7 Struktur kimia Asam Laktat	30
Gambar 5.8 Puncak kromatogram asam laktat	30
Gambar 5.9 Jalur biosintesis fermentasi asam laktat	31

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Protokol	Persiapan	Analisis	Asam	Laktat	menggunakan	HPLC.....	42		
Lampiran 2	Perhitungan	kesetaraan	bobot	molekul	Ca-Lactate.5H ₂ O	dengan	Asam	laktat	44	
Lampiran 3	Profil	Kromatogram	Standar	Asam	Laktat	dan	Sampel	menggunakan	HPLC	45

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

SINGKATAN

HPLC

MCA

MRS

MAKNA

High Performance Liquid Chromatography

Mac Conkey Agar

Man Rogosa Sharpe

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Antibiotic Growth Promoters (AGP) merupakan salah satu bahan obat yang mengandung antibiotik dan biasanya ditambahkan kedalam pakan ternak (Permentan RI, 2017). AGP diberikan dalam pakan ternak untuk menstabilkan mikroflora usus (Waldroup et al., 1985), meningkatkan pertumbuhan (Miles et al., 1984) dan mencegah penyakit usus spesifik (Gunal et al., 2006).

Namun penggunaan AGP yang berlebihan dalam pakan ternak dapat memberikan efek buruk kepada masyarakat selaku konsumen olahan hewan ternak. Pemerintah Indonesia melarang adanya penggunaan antibiotik sebagai peningkat pertumbuhan yang ditambahkan dalam pakan ternak (Permentan RI, 2017). Larangan pemakaian AGP pada pakan ternak dikarenakan zat tersebut dapat mengganggu kesehatan manusia yang mengkonsumsi produk ternak tersebut, dan menyebabkan karsinogenik pada manusia atau hewan (Permentan RI, 2017).

Ternak unggas sangat rentan terhadap infeksi mikroorganisme patogen seperti *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Clostridium perfringens*, dan *Campylobacter sputorum* (Gunal et al., 2006). Mikroba patogen tersebut hidup dalam tubuh inang salah satunya didalam saluran pencernaan sehingga pelarangan pemakaian AGP menyebabkan mikroba patogen bersaing dengan inang untuk mendapatkan nutrisi, akibatnya mengurangi penyerapan lemak dan vitamin yang larut dalam lemak (Engberg et al, 2000), mengganggu pertumbuhan dan menimbulkan penyakit usus (Gunal et al., 2006). Mikroba patogen yang sering ditemui dalam saluran pencernaan adalah *Escherichia coli*.

E. coli merupakan flora normal yang terdapat pada saluran pencernaan dan berperan dalam proses metabolisme didalam usus (Widianingsih, 2018). *E. coli* dapat bersifat patogen jika berada diluar usus (Widianingsih, 2018), menyebabkan diare (Muhajir et al, 2016), bahkan kematian (Widianingsih, 2018). Muhajir, 2016 menyatakan bahwa sekitar 29% pengobatan bakteri *E. coli* sudah menunjukkan efek resisten terhadap antibiotik (Muhajir et al, 2016).

Untuk menanggulangi kondisi tersebut, Industri Farmasi berupaya mencari alternatif penggunaan AGP dengan menggunakan produk farmasi lain yang memiliki aktivitas sejenis. Alternatif yang dapat digunakan sebagai pengganti AGP adalah probiotik, prebiotik, *synbiotic*, enzim dan tanaman dengan aktivitas antibakteri (Verstegen et al., 2002). Dari berbagai jenis alternatif pengganti AGP, asam organik yang dihasilkan probiotik khususnya asam laktat diketahui memiliki kemampuan untuk mereduksi bakteri patogen dan meningkatkan daya cerna nutrisi melalui perubahan pH pada *gastrointestinal tract* (GIT) (Verstegen et al, 2002).

Salah satu genus bakteri asam laktat yang sering dijumpai pada saluran pencernaan adalah *Lactobacillus acidophilus* (Manin, 2010). Genus *Lactobacillus* dapat memproduksi asam laktat dan bakteriosin yang memiliki kemampuan sebagai antibakteri yang bersifat bakteriostatik terhadap pertumbuhan *E. coli* (Özdemir, 2010).

Pertumbuhan genus *Lactobacillus* tergantung pada nutrisi yang terkandung dalam media yang digunakan. Kebutuhan nutrisi pada media pertumbuhan bakteri terdiri dari makronutrien (*Carbon, Hidrogen, Nitrogen, Oksigen, Fosfor*) dan mikronutrien (*Logam, Mineral, dll*). Selama ini media yang banyak digunakan untuk pertumbuhan bakteri asam laktat adalah *Man Rogosa and Sharpe (MRS)*. Media MRS memiliki komposisi yang kompleks dan mengandung nutrisi yang dibutuhkan bakteri (Venigalla et al., 2017). Hanya saja penggunaan media tersebut mengeluarkan biaya yang sangat mahal (Venigalla et al., 2017).

Dalam penelitian ini akan dilakukan optimasi terhadap sumber makronutrien pada media pertumbuhan *L. acidophilus* dengan biaya yang lebih murah namun tetap memberikan efek yang baik terhadap pertumbuhan bakteri dan aktivitasnya dalam menghambat *E. coli* sehingga bisa dijadikan sebagai pengganti AGP. Secara khusus, fermentasi yang menggunakan jenis karbon seperti glukosa, sukrosa, laktosa dapat digunakan dalam proses produksi asam laktat (Wang et al., 2015). Menurut Chen dalam penelitiannya, glukosa merupakan sumber karbon terbaik dalam mengoptimalkan pertumbuhan bakteri dengan konsentrasi minimal 20 g/L (Chen et al., 2015). Sedangkan untuk penggunaan fosfor sudah dibuktikan optimal

dalam media pertumbuhan *L. acidophilus* adalah menggunakan KH_2PO_4 dan K_2HPO_4 (Subagiyo et al, 2016).

Sehingga pada penelitian kali ini hanya sumber nitrogen yang akan dioptimasi. Nitrogen digunakan untuk mensintesis asam amino dan karbohidrat yang menjadi sumber utama pertumbuhan *Lactobacillus* (Coelho et al., 2011). Nitrogen terbagi kedalam dua jenis yaitu nitrogen organik dan nitrogen anorganik (Chen et al., 2015). Jenis nitrogen tersebut ditambahkan dalam media pertumbuhan *L. acidophilus* yang dibuat dalam tiga variasi diharapkan dapat mendukung pertumbuhan *L. acidophilus*, dan memberikan efek terhadap penghambatan pertumbuhan *E.coli*.

1.2 . Rumusan masalah

1. Dari dua jenis sumber nitrogen yang digunakan (nitrogen organik dan nitrogen anorganik), manakah yang dapat mendukung pertumbuhan *L. acidophilus* untuk menghasilkan asam laktat dengan konsentrasi tertinggi
2. Dari dua jenis sumber nitrogen yang digunakan (nitrogen organik dan nitrogen anorganik), manakah yang dapat mendukung aktivitas antibakteri dari *L. acidophilus* dalam menghambat pertumbuhan *E. coli*

1.3. Tujuan dan manfaat penelitian

1.3.1 Tujuan Penelitian

1. Menentukan sumber nitrogen terbaik yang dapat mendukung pertumbuhan *L. acidophilus* untuk memproduksi asam laktat dengan konsentrasi tertinggi
2. Menentukan sumber nitrogen terbaik yang dapat mendukung aktivitas *L. acidophilus* dalam menghambat pertumbuhan *E. coli*

1.3.4 Manfaat Penelitian

Sebagai referensi pada proses produksi probiotik menggunakan *L. acidophilus* dan aktivitasnya dalam menghambat pertumbuhan *E. coli*

1.4. Hipotesis penelitian

Sumber nitrogen organik dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri *L. acidophilus*, meningkatkan kadar asam laktat dan menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* (Pedram et al., 2014).

1.5. Tempat dan waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari – Juni 2020, bertempat di salah satu Industri Farmasi yang beralamat di Jln. Raya Batujajar No. 29, Cimareme, Ngamprah, Bandung Barat – Indonesia.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Probiotik

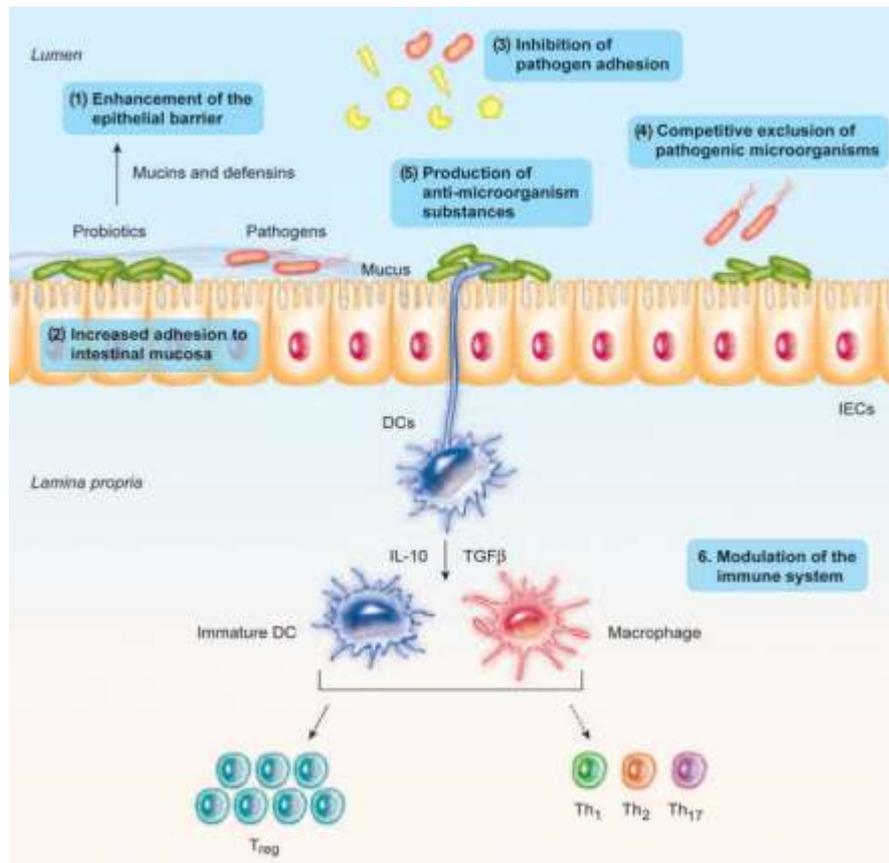
Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme yang dapat memberikan kontribusi baik terhadap kesehatan makhluk hidup. Istilah probiotik diberikan karena mikroba hidup tersebut dapat memberikan manfaat terhadap kesehatan inang yang mengkonsumsinya dan biasanya diformulasikan kedalam berbagai jenis sediaan, termasuk makanan dan suplemen (Guarner et al, 2011). Salah satu pengaruh baik probiotik bagi sel inang, yaitu dapat membantu menjaga kestabilan mikroflora intestinal (Widiyaningsih, 2011).

Probiotik yang efektif harus memenuhi beberapa kriteria yaitu kultur probiotik yang dibuat harus tahan asam dan empedu, mengandung bakteri minimal 30×10^9 CFU/ml (Patterson et al, 2003), menggunakan strain yang spesifik dan memiliki kemampuan bertahan hidup yang tinggi, dapat berkembang biak dengan cepat (Choudhari et al, 2008), tidak memiliki efek samping, tidak toksik (Patterson & Burkholder, 2003), memberikan efek menguntungkan yang signifikan terhadap saluran pencernaan (Choudhari et al., 2008), mampu mengurangi mikroorganisme patogen, memodulasi respons imun (Patterson & Burkholder, 2003), dan menghasilkan zat anti mikroba (Widiyaningsih, 2011). Bakteri yang sesuai dengan kriteria probiotik yang baik ditemukan berasal dari Bakteri Asam Laktat (BAL) (Guarner et al., 2011).

2.1.1 Probiotik sebagai Antibakteri

Mikroflora dalam usus membentuk ekosistem yang beragam, dinamis, dan telah beradaptasi untuk hidup dipermukaan mukosa atau lumen usus (Guarner et al., 2011). Interaksi normal antara bakteri usus dan inangnya merupakan interaksi simbiosis yang saling menguntungkan (Guarner et al., 2011). Probiotik bekerja dengan beberapa mekanisme (Gambar 2.1) yaitu memelihara pertahanan epitel usus yang memiliki penghalang usus untuk menjaga dan melindungi organisme dari lingkungan (Ohland et al., 2010). Pertahanan penghalang usus terdiri dari lapisan mukosa, peptida antimikroba, sekretori IgA dan kompleks adhesi epitel

(Ohland et al., 2010). Kompetisi nutrisi yang terjadi antara bakteri patogen dan probiotik untuk membatasi konsentrasi bakteri patogen yang berpotensi dalam saluran pencernaan (Goldin, 1998). Probiotik memiliki efek secara langsung pada mikroorganisme merugikan melalui penghambatan adhesi patogen (Goldin, 1998). Mekanisme tersebut sebagai sistem pertahanan utama dalam tubuh untuk menjaga kondisi kesehatan usus.



Gambar 2.1. Mekanisme kerja probiotik (Bermudez et al., 2012)

Bendali et al., (2011) menyatakan genus *Lactobacilli* terbukti menghambat berbagai bakteri patogen dengan mengkolonisasi bakteri patogen kemudian melakukan aktivitas antagonis terhadap bakteri tersebut untuk mendapatkan keseimbangan mikroflora dan mencegah sekaligus menyembuhkan infeksi yang disebabkan patogen tersebut (Bendali et al., 2011). Bakteri asam laktat bekerja sebagai probiotik dengan menghasilkan senyawa antimikroorganisme seperti asam organik dan bakteriosin (Goldin, 1998).

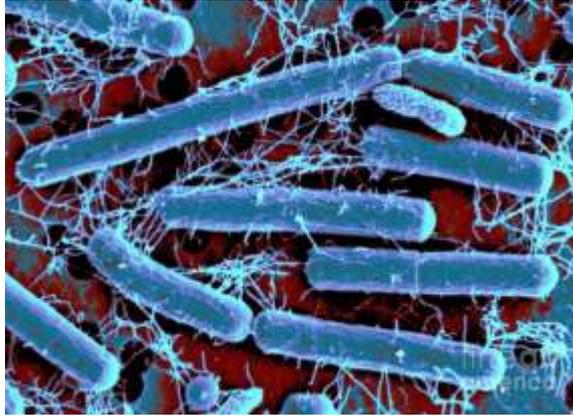
Asam organik, khususnya asam asetat dan asam laktat memiliki efek penghambatan yang kuat terhadap bakteri Gram-negatif, sehingga asam organik dianggap sebagai antimikroba utama yang bertanggung jawab dalam penghambatan patogen (Alakomi et al., 2005), meningkatkan produksi sekresi imunoglobulin A (IgA) baik lokal maupun sistemik (Guarner et al., 2011), dan menurunkan pH usus dari bentuk asam organik yang terionisasi dapat menyebabkan kematian patogen (Bermudez et al., 2012).

Bakteriosin dihasilkan oleh Bakteri Asam Laktat (BAL) yang memiliki aktivitas spektrum sempit (Nielsen et al., 2010). Mekanisme kematian patogen yang dimediasi oleh bakteriosin adalah penghancuran sel target dengan penghambatan sintesis dinding sel (Hassan et al., 2012). Penelitian yang dilakukan O'Shea et al., (2012) menyatakan bahwa produksi bakteriosin yang dihasilkan BAL dapat meningkatkan prevalensi strain yang diproduksi dan memungkinkan terjadinya penghambatan langsung terhadap pertumbuhan patogen dalam saluran pencernaan.

2.1.2 Jenis bakteri Probiotik

Bakteri yang dapat dijadikan sebagai probiotik berasal dari genus *Lactobacillus* dan genus *Bifidobacterium*. Kedua genus ini memiliki peran yang berbeda terhadap sistem pencernaan (Widiyaningsih, 2011). Bakteri yang berasal dari genus *Lactobacillus* yaitu spesies *L. acidophilus*, *L. casei*, dan *L. plantarum*. Sedangkan dari genus *Bifidobacterium* yang dapat dijadikan probiotik yaitu spesies *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. lactis*.

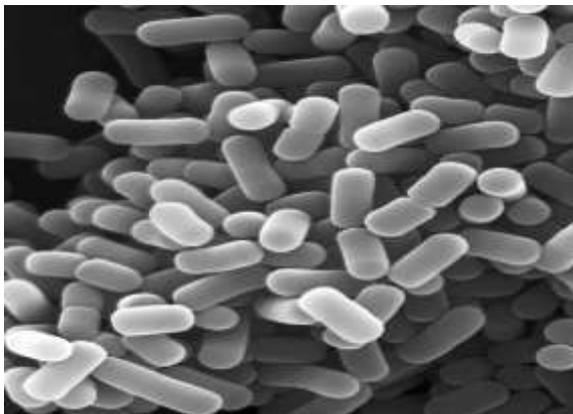
Lactobacillus acidophilus (Gambar 2.2) salah satu bakteri asam laktat yang membantu proses pencernaan laktosa dalam usus, mampu merangsang respon kekebalan tubuh terhadap mikroba patogen (Widiyaningsih, 2011), spesies *Lactobacillus casei* (Gambar 2.3) sering digunakan dalam produk fermentasi seperti yoghurt, dan dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Adolfsson et al., 2004) dan spesies *Lactobacillus plantarum* (Gambar 2.4) dapat membantu penyerapan vitamin dan antioksidan serta menghilangkan komponen beracun dalam tubuh (Widiyaningsih, 2011).



Gambar 2.2. *Lactobacillus acidophilus*

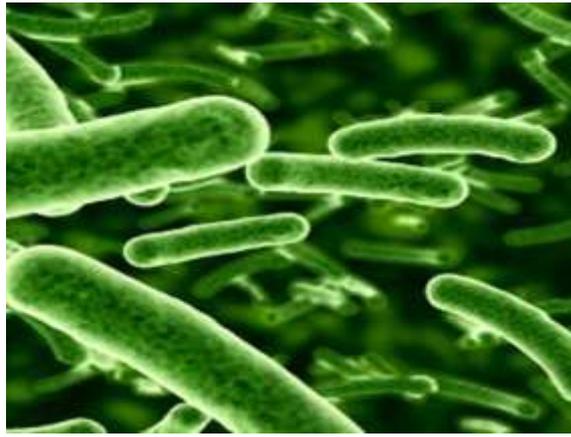


Gambar 2.3. *Lactobacillus casei*



Gambar 2.4. *Lactobacillus plantarum*

Bifidobacterium bifidum (Gambar 2.5) dapat mencegah perkembangbiakan *Salmonella*, dan *Clostridium*. *Bifidobacterium longum* (Gambar 2.6) dapat meningkatkan nilai gizi dari makanan dengan memproduksi vitamin dengan cara mensintesis enzim pencernaan yaitu kasein. *Bifidobacterium breve* (Gambar 2.7) dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen. *Bifidobacterium lactis* (Gambar 2.8) dapat menjaga keseimbangan mikroflora usus, dan meningkatkan penyerapan nutrisi dalam usus (Widiyaningsih, 2011).



Gambar 2.5. *Bifidobacterium bifidum*



Gambar 2.6. *Bifidobacterium longum*



Gambar 2.7. *Bifidobacterium breve*

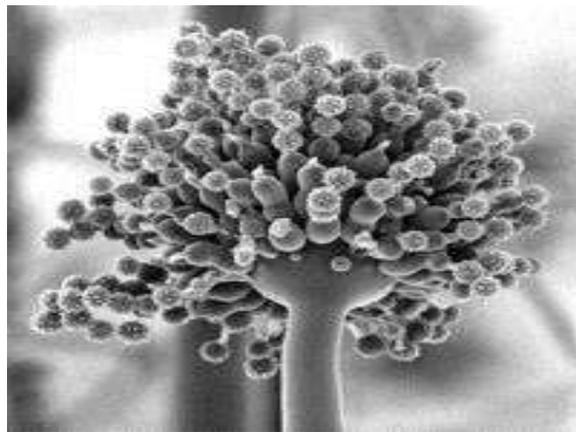


Gambar 2.8. *Bifidobacterium lactis*

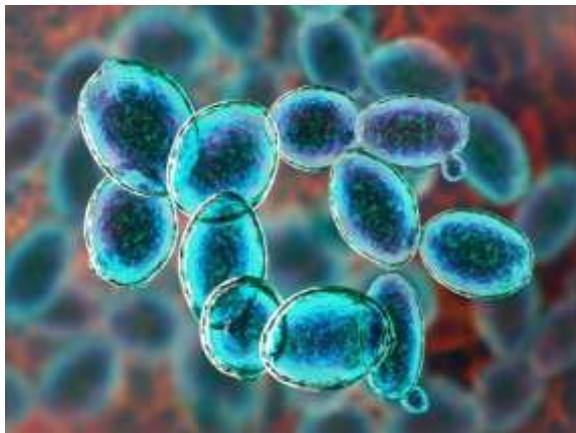
Selain genus *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium*, terdapat pula bakteri probiotik pembentuk spora yang sebagian besar didominasi oleh genus *Bacillus* (Gambar 2.9) (Pandey et al., 2015). Beberapa jamur yang bisa dijadikan sebagai probiotik adalah *Aspergillus oryzae* (Gambar 2.10), dan *Saccharomyces cerevisiae* (Gambar 2.11) (Khan et al., 2013).



Gambar 2.9. Genus *Bacillus*



Gambar 2.10. *Aspergillus oryzae*



Gambar 2.11. *Saccharomyces cerevisiae*

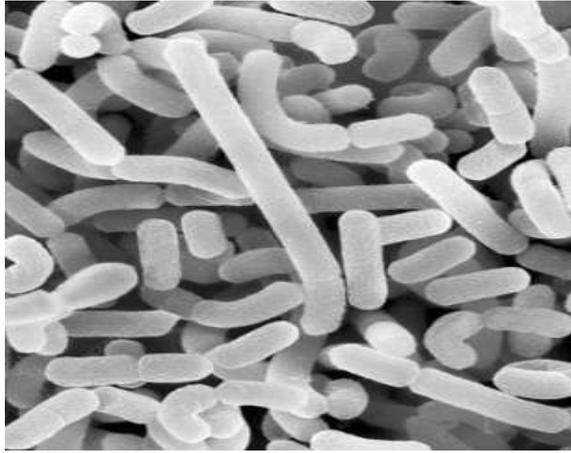
Dari berbagai bakteri yang dapat digunakan sebagai probiotik, aktivitasnya sebagai antibakteri adalah salah satu kemampuan yang paling dibutuhkan di dunia kesehatan. Karena saat ini semakin banyak mikroba patogen yang resisten terhadap antibiotik.

Bendali et al, (2011) melakukan penelitian menggunakan *L. paracasei* subsp. *paracasei* yang diisolasi dari feses bayi sapi kemudian diujikan aktivitasnya terhadap bakteri *Listeria*, *E. coli*, *Salmonella sp* dan *S. aureus*. Dengan metode difusi sumur, *L. paracasei* menunjukkan adanya zona hambat pada media agar yang diberikan kultur mikroba patogen tersebut. Hasil penelitiannya membuktikan *L. paracasei* dapat menghambat pertumbuhan keempat mikroba patogen tersebut (Bendali et al., 2011). Hal serupa dilakukan oleh Shokryazdan et al., (2014) strain probiotik dari 9 (sembilan) jenis bakteri genus *Lactobacillus* yang diujikan aktivitasnya terhadap 12 (dua belas) bakteri patogen secara *in vitro*. Hasil penelitian menunjukkan adanya aktivitas penghambatan pertumbuhan yang baik terhadap semua bakteri patogen uji (Shokryazdan et al., 2014).

2.2 *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus merupakan salah satu bakteri asam laktat (BAL) yang sering digunakan sebagai mikroba probiotik. Bakteri ini mampu menjaga keseimbangan bakteri menguntungkan didalam saluran cerna, sehingga *L. acidophilus* dijadikan sediaan probiotik yang dapat diberikan tunggal maupun kombinasi (Sanders et al, 2001). Spesies *L. acidophilus* berasal dari Kingdom *Bacteria*, Divisi *Firmicutes*, kelas *Bacilli*, Ordo *Lactobacillales*, Famili *Lactobacillaceae*, dengan Genus *Lactobacillus* (Gambar 2.12).

L. acidophilus merupakan bakteri golongan gram positif dan tidak membentuk spora seperti bakteri lainnya. Berbentuk batang panjang bersifat anaerob (Sanders et al, 2001). *L. acidophilus* memproduksi asam laktat untuk menghentikan pertumbuhan mikroorganisme merugikan didalam tubuh (Manin, 2010). Bakteri ini dapat berkembang biak dengan cepat saat ada asupan karbohidrat yang banyak (Sanders et al., 2001).

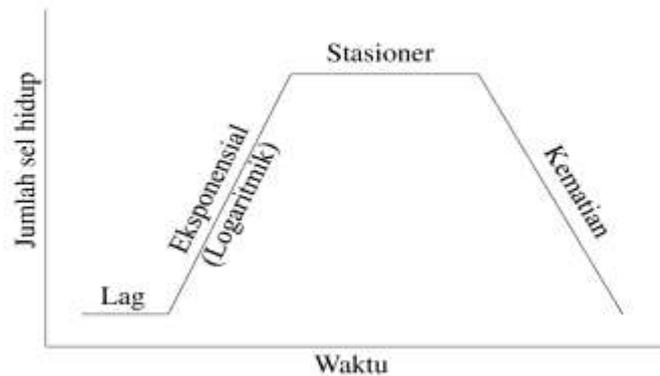


Gambar 2.12. *Lactobacillus acidophilus*

Bakteri tumbuh dengan melewati empat fase, yaitu fase lag, fase log, fase stasioner, dan fase kematian (Gambar 2.13). Fase lag adalah fase adaptasi bakteri untuk menyesuaikan kondisi lingkungan dalam media pertumbuhan, biasanya proses pertumbuhan bakteri pada fase ini berlangsung lambat. Fase log atau eksponensial adalah fase bakteri mulai berkembang biak secara cepat dan konstan mengikuti kurva logaritmik (Mondragón-Parada et al., 2006).

Kecepatan pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh banyaknya kandungan nutrisi, pH, suhu dan kelembaban media. Pada fase ini pula bakteri membutuhkan energi yang lebih banyak dan terjadi kompetisi antar bakteri untuk mendapatkan nutrisi agar bakteri dapat bertahan hidup (Mondragón-Parada et al., 2006). Senyawa metabolit yang dihasilkan oleh bakteri timbul pada fase ini sebagai bentuk pertahanan diri. Fase stasioner adalah fase lambat pertumbuhan bakteri karena jumlah bakteri yang hidup tumbuh sesuai dengan bakteri yang mati. Ukuran bakteri pada fase ini menjadi lebih kecil karena nutrisi yang dibutuhkan sudah habis. Fase kematian adalah fase terakhir dari masa hidup bakteri. Nutrisi pada media sudah habis, energi pun sudah tidak ada lagi sehingga pertumbuhan bakteri tidak dapat berlangsung lagi.

Kurva Pertumbuhan Bakteri



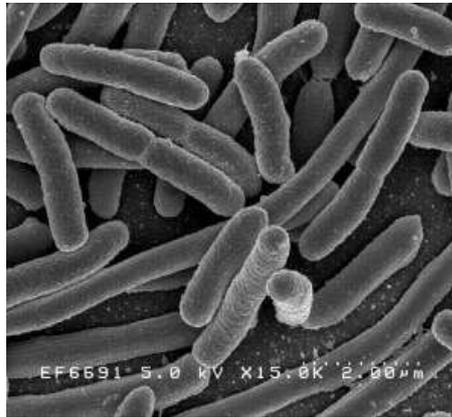
Gambar 2.13. Kurva Pertumbuhan bakteri (Mazzeo et al., 2015)

L. acidophilus dapat tumbuh optimum pada suhu berkisar antara 30-40 °C dengan pH optimum 5,5-6,5 (Leoanggraini et al, 2011). Penelitian yang dilakukan Mazzeo, bakteri *L. acidophilus* yang ditumbuhkan dalam media MRS yang diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C, dan diamati setiap dua jam. Didapati bahwa *L. acidophilus* dapat tumbuh dengan baik sesuai dengan fase pertumbuhan bakteri, yaitu fase lag, fase log dan fase stasioner (Mazzeo et al, 2015).

Mazzeo et al., (2015) menunjukkan *L. acidophilus* mulai menunjukkan fase lag dari jam ke-0 sampai dengan jam ke-14. Fase eksponensial atau log dimulai dari jam ke-15 sampai dengan jam ke-20. Dan fase stasioner dimulai dari jam ke-21 sampai dengan jam ke-28 (Mazzeo et al., 2015). Pertumbuhan bakteri dihitung dengan menggunakan metode turbidimetri. Metode perhitungan ini menggunakan alat yaitu spektrofotometri. Hal ini digunakan karena bakteri yang dihitung menggunakan media cair, sehingga dapat dideteksi berdasarkan kekeruhannya. Pertumbuhan bakteri yang tumbuh dalam media cair akan meningkatkan kekeruhan pada media sehingga mempengaruhi jumlah sinar yang bisa ditransmisikan untuk bisa melewati media. Semakin keruh menandakan semakin banyak pertumbuhan bakteri dalam media cair tersebut (Shibata, 1958).

2.3 *Escherichia coli*

E. coli adalah jenis bakteri Gram-negatif (Sutiknowati, 2016). *E. coli* ditemukan pada tahun 1885 oleh *Theodore Escherich*, diberi nama sesuai dengan penemunya. Spesies *E.coli* berasal dari Kingdom *Eubacteria*, Divisi *Proteobacteria*, Kelas *Gammaproteobacteria*, Ordo *Enterobacteriales*, Famili *Enterobacteriaceae*, dengan Genus *Escherichia* (Gambar 2.14).



Gambar 2.14. *Escherichia coli*

Pada umumnya bakteri *E. coli* merupakan bakteri yang terdapat dalam usus dan ikut membantu proses pencernaan didalam tubuh manusia dan hewan. *E. coli* merupakan bakteri yang tidak berbahaya, namun jika jumlah *E. coli* didalam tubuh berlebihan akan menyebabkan efek yang merugikan yaitu diare, dan bila bakteri ini menjalar ke bagian tubuh lain maka akan menyebabkan infeksi (Zikra et al., 2018). Jenis *E. coli* patogen dapat menyebabkan penyakit dengan mengeluarkan racun yang disebut *Shiga-like toxin* (Rananda et al., 2016). Hal ini terjadi karena racun tersebut dihasilkan oleh verotoksin. Jika seseorang terinfeksi bakteri ini, gejala yang timbul ialah sakit dan kejang otot perut yang datang secara tiba-tiba, kemudian diikuti dengan diare dalam waktu 24 jam. Toksin ini bekerja dengan cara menghilangkan satu basa adenine dari unit 28 RNA, akibatnya *E. coli* menjadi bakteri patogen yang memberikan efek merugikan terhadap sel inangnya (Sutiknowati, 2016). Jika tidak segera diatasi maka penyakit ini akan menimbulkan komplikasi yang lebih berbahaya seperti diare berdarah, nekrosis jaringan usus, *hemorrhagic* dan sindrom hemolitik uremik (Rananda et al., 2016).

2.4 Fermentasi

Fermentasi adalah suatu proses pemanfaatan mikroorganisme untuk menghasilkan senyawa metabolit primer atau sekunder, enzim mikroba, biomassa mikroba, dan dapat memodifikasi senyawa kimia. Keberhasilan fermentasi ditentukan oleh kondisi lingkungan tempat fermentasi dilakukan. Faktor-faktor yang mempengaruhi proses fermentasi tersebut diantaranya pH, temperatur, oksigen, air, mikroba dan substrat (media) yang dipakai (Kunaepah, 2008).

Faktor terpenting dalam proses fermentasi adalah media yang digunakan untuk fermentasi. Media untuk fermentasi menyediakan nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroba untuk mendapatkan energi, mendukung pertumbuhan dan pembentukan senyawa metabolit yang dapat menghasilkan aktivitas tertentu (Kunaepah, 2008). Jenis substrat yang dipakai yaitu sumber karbon, dan sumber nitrogen. Yang termasuk kedalam sumber karbon yaitu serelia, pati, laktosa, glukosa, dan sukrosa (Kunaepah, 2008). Beberapa penelitian menyebutkan bahwa glukosa merupakan sumber karbon yang optimal dalam mendukung pertumbuhan bakteri (Distantina et al, 2009; Fifendy, 2013; Dailin et al., 2015). Sedangkan untuk sumber nitrogen yang dipakai yaitu ekstrak ragi, tepung ikan, asam amino, garam ammonium, tepung kedelai, urea dan nitrat (Kunaepah, 2008).

Nitrogen adalah salah satu makronutrien yang dibutuhkan mikroorganisme untuk kelangsungan hidup bakteri (Minnesota Pollution Control Agency, 2008). Nitrogen berperan sebagai komponen utama sumber protein dan asam nukleat yaitu berkisar $\pm 10\%$ dari berat kering sel bakteri (Bolner De Lima et al., 2009). Nitrogen juga merupakan gas yang paling banyak jumlahnya di atmosfer dan mencapai 78% dari total gas di udara (Supono, 1990). Meskipun konsentrasi nitrogen di atmosfer sebagai gas nitrogen (N_2) sangat berlimpah, namun sebagian besar nitrogen tidak dapat digunakan secara langsung oleh beberapa mikroorganisme. Perlu dilakukan konversi terlebih dahulu dari gas nitrogen menjadi ammonia (NH_3) dengan bantuan mikroorganisme tertentu (Setiapermana, 2006). Nitrogen yang ditambahkan kedalam media fermentasi memberikan efek positif terhadap pertumbuhan bakteri (Gozan et al, 2016), karena nitrogen berperan penting dalam mengontrol produktivitas suatu mikroorganisme (Setiapermana, 2006).

Nitrogen terbagi kedalam dua jenis yaitu nitrogen organik dan nitrogen anorganik. Yang termasuk kedalam nitrogen organik yaitu ekstrak ragi, pepton, *meat extract*, *casein hydrolysate* (Dailin et al., 2015). Nitrogen anorganik yaitu senyawa dengan bentuk NO_3^- , NO_2^- , NH_4^- (Setiapermana, 2006). Penggunaan jenis nitrogen yang berbeda pada suatu media mempengaruhi pertumbuhan dan biomassa yang dihasilkan. Kedua jenis nitrogen ini sangat berperan dalam meningkatkan pertumbuhan bakteri. Ekstrak ragi dan *meat extract* dalam media berperan untuk memberikan suplai vitamin, bahan organik seperti asam lemak, lipid serta beberapa mineral untuk mendukung pertumbuhan bakteri (Lai, 2020). Pepton merupakan sumber nitrogen untuk pertumbuhan bakteri yang terdiri dari campuran polipeptida, dipeptide dan asam amino yang diperoleh melalui reaksi hidrolisis asam atau proses enzimatik (Saputra et al., 2014). *Casein hydrolysate* biasa ditambahkan kedalam media pertumbuhan tanaman dan berperan sebagai peningkat asam amino, jumlah klorofil dan aktivitas fotosintesis pada tanaman (Aruan et al., 2015).

Penelitian terhadap nitrogen lain dilakukan oleh Gozan et al., (2016) dengan membandingkan penggunaan sumber nitrogen yang berbeda yaitu tripton dan pepton terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* dan produksi Polyhydroxybutyrate (PHB). Hasil penelitian membuktikan bahwa fermentasi dengan penambahan tripton dapat menghasilkan pertumbuhan bakteri yang tinggi dengan kadar PHB rendah, sedangkan fermentasi dengan penambahan pepton menghasilkan pertumbuhan bakteri yang rendah dengan kadar PHB tinggi (Gozan et al., 2016). Aragón-Rojas et al., (2018) dalam penelitiannya melakukan optimalisasi ekspresi karakteristik probiotik *L. fermentum* dengan menggunakan kombinasi tepung kedelai dan ekstrak ragi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi kedua sumber nitrogen menghasilkan pertumbuhan bakteri hingga 10,783 log (CFU/ml) setelah 24 jam diinkubasi dan dinyatakan bahwa optimalisasi ini layak dilakukan (Aragón-Rojas et al., 2018).