

## KINETIKA PERTUMBUHAN *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus sp.* PADA MEDIA MRS CAIR

[Growth Kinetics of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sp.* in MRS Medium]

Yoyok B. Pramono<sup>1)</sup>, Eni Harmayani<sup>2)</sup>, dan Tyas Utami<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281. E-mail : yok\_bp@hehe.com

<sup>2)</sup> Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, FTP Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281.

Diterima 23 September 2002/Disetujui 17 April 2003

### ABSTRACT

*Lactobacillus plantarum* FNCC 250 and *Lactobacillus sp.* FNCC 401 were isolated from traditional fermented food which had potential properties as probiotic agents and to reduce cholesterol. The aim of the research was to study the growth kinetics of *Lactobacillus plantarum* FNCC 250 and *Lactobacillus sp.* FNCC 401 at MRS medium, using glucose a substrate limiting factor. Cells were inoculated into MRS medium containing glucose concentration of 0.05 ; 0.1 ; 0.2 ; 0.3 ; 0.5 ; 1 ; 1.5 ; 2 ; and 3 % (w/v). Fermentation was carried out at 37°C, with initial pH 6.8 and was monitored for 24 hours. During the fermentation, dry cell weight, reducing sugar and pH were analysed. The results showed that  $K_s$  (the substrate saturation constant) of *Lactobacillus plantarum* FNCC 250 was 0.04 (g.l<sup>-1</sup>) ;  $\mu_{max}$  (the maximum growth rate) was 0.17 (h<sup>-1</sup>) ; and  $Y$  (growth yield) was 0.24 (g.g<sup>-1</sup>), meanwhile for *Lactobacillus sp.* FNCC 401  $K_s$  was 0.06 (g.l<sup>-1</sup>),  $\mu_{max}$  was 0.26 (h<sup>-1</sup>) ; and  $Y$  (growth yield) was 0.24 (g.g<sup>-1</sup>).

**Key words :** Fermentation, growth kinetics, *Lactobacillus plantarum*, and *Lactobacillus sp.*

### PENDAHULUAN

*Lactobacillus plantarum* FNCC 250 dan *Lactobacillus sp.* FNCC 401 merupakan bakteri asam laktat yang diisolasi dari makanan fermentasi tradisional, yaitu dari gatot dan dadih. Isolat ini berpotensi untuk menurunkan kolesterol sehingga dapat digunakan sebagai agensia probiotik yang dapat memberikan efek kesehatan yang menguntungkan (Ngatirah, 2000). Untuk mencapai tujuan tersebut diperlukan jumlah biomasa sel yang cukup besar agar dapat mencapai saluran pencernaan.

Disatu sisi informasi data kinetika pertumbuhan isolat lokal yang dapat digunakan sebagai informasi awal dalam suatu proses fermentasi dalam memproduksi biomasa sel saat ini masih terbatas. Informasi ini diperlukan sebagai pendekatan kuantitatif dalam memahami proses fermentasi. Oleh karena itu diperlukan suatu penelitian untuk mempelajari kinetika pertumbuhan bakteri khususnya, untuk referensi awal dalam simulasi desain proses fermentasi guna produksi sel yang lebih besar untuk jangka berikutnya.

Kinetika pertumbuhan dapat memberikan informasi tentang kecepatan produksi biomasa sel dan pengaruh lingkungan terhadap kecepatan pertumbuhan. Data pengamatan dapat disajikan dalam parameter-parameter pertumbuhan yaitu : a). kecepatan pertumbuhan spesifik, b). *growth yield*, c). *metabolic quotient*, d). afinitas substrat,

e). jumlah maksimum biomasa (Whitaker dan Stanburry, 1984). Adapun parameter yang diukur adalah  $\mu_{max}$  yaitu kecepatan pertumbuhan spesifik maksimum (per jam),  $Y$  (*growth yield*) yang menunjukkan efisiensi penggunaan nutrisi oleh suatu mikroorganisme untuk pertumbuhannya (g/g) dan  $K_s$  (konstanta saturasi).

Mengingat pentingnya informasi tentang kinetika pertumbuhan suatu mikroorganisme, maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan mempelajari kinetika pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* FNCC 250 dan *Lactobacillus sp.* FNCC 401 pada media MRS cair dengan glukosa sebagai substrat pembatas.

### METODOLOGI

#### Preparasi kultur

Kultur bakteri yang digunakan adalah *Lactobacillus plantarum* FNCC 250 yang berasal dari gatot, dan *Lactobacillus sp.* FNCC 401 yang berasal dari dadih. Kultur berasal dari PAU, Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Kultur diuji kemurniannya dalam medium agar, pengecatan Gram, dan pengujian mikroskopis. Setelah itu dilakukan pembuatan kultur stok dengan cara menambahkan gliserol 20 % dan skim 10 % (1:1) pada massa sel, dicampur hingga homogen dan dimasukkan

dalam tabung *ependorf* dan disimpan pada suhu  $-40^{\circ}\text{C}$ . Sub kultur dilakukan setiap akan digunakan untuk kultur kerja dengan cara menginokulasikan 1 ose dari kultur stok, dimasukan ke dalam media cair MRS yang ditambahkan dengan 20 % ekstrak tomat diinkubasikan selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ .

Pembuatan kurva standar dilakukan untuk menentukan berat sel kering. Berat sel kering diukur dengan mengambil 5 ml dari kultur yang telah diinkubasikan selama 24 jam dengan pengenceran berseri, sehingga konsentrasi dapat diketahui. Kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang 660 nm dengan spektrofotometer.

### Media

Untuk peremajaan atau untuk subkultur digunakan media de Mann Rogose and Sharp (MRS cair) dengan glukosa yang bervariasi : 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1; 1,5; 2, dan 3 %. Komposisi per 1000 ml adalah sebagai berikut: lab. lemco 8 g, ekstrak yeast 4 g, pepton 10 g, sodium asetat 5 g dipotasium hidrogen fosfat 2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,2 g;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  0,05 g; tween 80 1 ml, dan triamonium sitrat 2 g.

### Bahan kimia.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah NaOH 0,1 N dan HCl untuk pengaturan pH medium, dan buffer pH 4 dan 7 untuk standarisasi pH meter, untuk analisa gula reduksi diperlukan glukosa standar dengan reagensia arsenomolibdat.

### Peralatan penelitian

Peralatan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah inkubator (Forma Scientific), outoflaf (Hiramaya), sentrifuge (Labofuge 200 heraus) *magnetik stirrer*, pH meter, cawan timbang, desikator, neraca analitik, spektrofotometer (UV-Vis Shimadzu) dan beberapa jenis alat gelas.

### Fermentasi

Penyiapan starter dilakukan pada 50 ml media dengan cara menginokulasikan media dengan 5 ml kultur umur 20 – 24 jam dalam media MRS cair dan diinkubasikan selama 20 – 24 jam. Untuk produksi biomasa sel digunakan 10 % starter.

Fermentasi dilakukan dalam erlenmeyer yang digoyang dengan kecepatan rpm 200 rpm/menit pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Pemanenan sel dilakukan dengan sentrifugasi 3500 rpm selama 15 menit. Sampling dilakukan per 30 menit pada 2 jam pertama, kemudian per 2 jam selama 24 jam.

### Metode pengukuran dan perhitungan parameter kinetika pertumbuhan

Untuk mengetahui konsumsi substrat dilakukan pengukuran gula reduksi dengan metode Nelson-Somogyi, sedangkan untuk mengukur jumlah sel sebagai berat sel kering dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang 660 nm dengan spektrofotometer. Pengukuran pH dengan pH meter.

Parameter ( $\mu$ ) menyatakan kecepatan pertumbuhan spesifik (per jam). Cara menentukan  $\mu$  ialah dengan mengamati pada fase pertumbuhan logaritmik dengan rumus :

$$\mu = \frac{\ln x_t - \ln x_0}{t}$$

dimana  $X_t$  adalah konsentrasi biomasa setelah interval waktu  $t$  (jam).

Untuk menentukan  $\mu_{\max}$  (kecepatan pertumbuhan spesifik maksimum) dan  $K_s$  (konstanta saturasi) dipergunakan persamaan Monod :

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S}$$

Yang menyatakan pengaruh kadar substrat terhadap laju pertumbuhan spesifik, kurva yang terbentuk berupa hiperbolik dengan garis *asymtot*, sehingga sulit untuk diinterpretasikan, oleh karena itu persamaan Monod tersebut dimodifikasi menjadi persamaan :

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{K_s}{\mu_m} \frac{1}{S}$$

sehingga didapat garis lurus yang dapat di tarik garis regresi liniernya.

Menentukan *growth yield* digunakan rumus :

$$Y = - \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

dimana  $\Delta X$  adalah jumlah perubahan biomasa dan  $\Delta S$  adalah jumlah perubahan substrat (glukosa) yang dikonsumsi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

**Kecepatan pertumbuhan spesifik maximum ( $\mu_{max}$ ), dan konstanta saturasi (Ks) pada *Lactobacillus plantarum* FNCC 250 dan *Lactobacillus sp.* FNCC 401.**

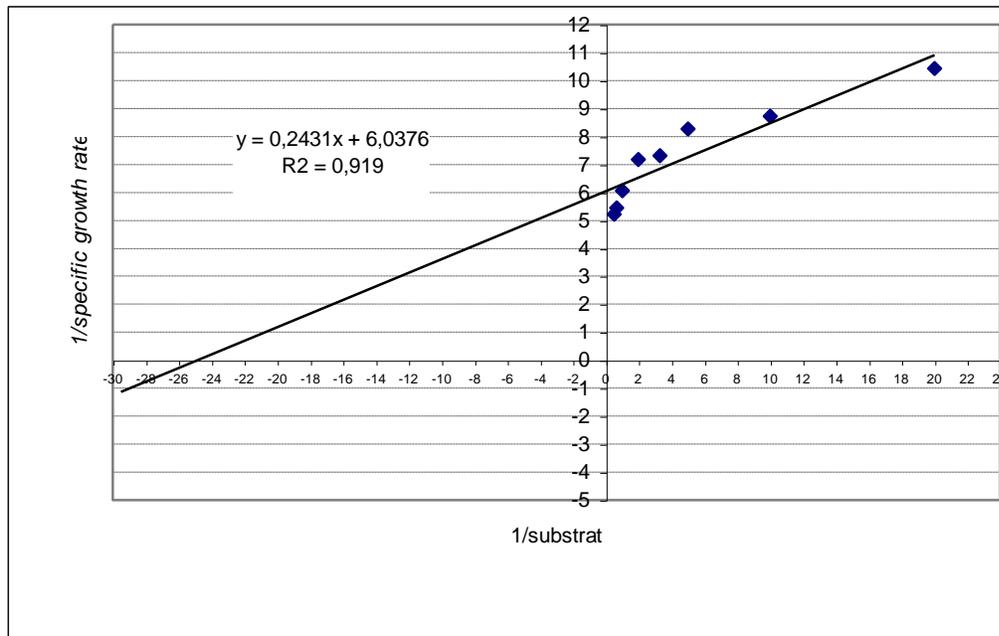
Kecepatan pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) didasarkan pada persamaan yang berlaku pada fase pertumbuhan logaritmik. Hal ini akan berlaku jika perbandingan kondisi biomasa dan kondisi lingkungan konstan (Pirt, 1975), yaitu inokulum yang masih hidup dan aktif, adanya sumber energi dan nutrisi, minimalnya inhibitor yang menghambat pertumbuhan dan kondisi lingkungan yang cocok. Secara umum fase logaritmik kedua strain terjadi pada jam 2-6 untuk semua variasi glukosa yang dalam hal ini berlaku sebagai substrat pembatas.

Untuk *Lactobacillus plantarum* FNCC 250 didapat hubungan antara konsentrasi glukosa (substrat) dengan kecepatan pertumbuhan spesifiknya ( $\mu$ ) ada dalam tabel 1.

Data tersebut diperoleh pada konsentrasi substrat 0,05 hingga 2 %. Semakin besar kadar substrat maka semakin besar harga  $\mu$ . Untuk menentukan  $\mu_m$  dan Ks dibuat kurva  $1/\mu$  vs  $1/s$  dari data tersebut (Gambar 1.), mulai dari konsentrasi substrat 0,05 hingga 2 %, kemudian dibuat persamaan garis regresi liniernya didapat  $Y = 6,03756 + 0,2431 x$ . Dari hasil perhitungan *Lactobacillus plantarum* FNCC 250 mempunyai  $\mu_m$  (kecepatan pertumbuhan spesifik maksimum) = 0,17 per jam dan Ks (konstanta saturasi) = 0,04 g/l.

Tabel 1. Hubungan antara konsentrasi Substrat (glukosa) dengan kecepatan pertumbuhan untuk *Lactobacillus plantarum* FNCC 250.

Konsentrasi substrat (s) %	Kecepatan pertumbuhan spesifik $\mu$ (per jam)
0,05	0,0958
0,1	0,1146
0,2	0,1211
0,3	0,1369
0,5	0,1393
1,0	0,1650
1,5	0,1835
2,0	0,1919
3,0	0,1740



Gambar 1. Kurva untuk mencari  $\mu$  max dan konstanta saturasi *Lactobacillus. plantarum* FNCC 250

Sedangkan untuk *Lactobacillus sp.* FNCC 401 dari hasil perhitungan diperoleh hubungan antara konsentrasi glukosa (substrat) dengan kecepatan pertumbuhan spesifik seperti dalam Tabel 2.

Tabel 2. Hubungan antara konsentrasi substat (glukosa) dengan kecepatan pertumbuhan untuk *Lactobacillus sp.* FNCC 401.

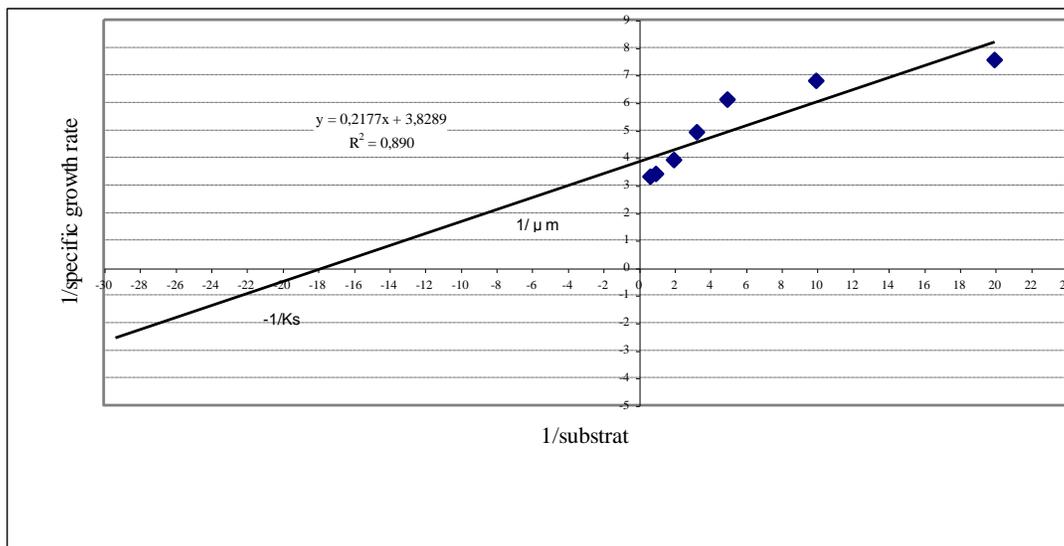
Konsentrasi substrat (s) %	Kecepatan pertumbuhan spesifik $\mu$ (per jam)
0,05	0,1329
0,1	0,1473
0,2	0,1639
0,3	0,2030
0,5	0,2560
1,0	0,2945
1,5	0,3033
2,0	0,2680
3,0	0,3071

**Perubahan pH**

Berdasarkan penelitian sebelumnya (Ngatirah, 2000) *Lactobacillus plantarum* FNCC 250 dan *Lactobacillus sp.* FNCC 401 dapat tumbuh optimum pada pH 6,8, untuk itu pH awal diatur 6,8 sebelum sterilisasi, ternyata setelah sterilisasi pH turun menjadi 6,44 – 5,97, pada awal inokulasi starter. Setelah fermentasi pH medium turun menjadi antara 4,49-2,99. Hal ini diduga terjadi karena perbedaan jumlah sel awal.

**Growth yield (Y)**

Untuk isolat *Lactobacillus plantarum* FNCC 250 maupun isolat *Lactobacillus sp.* FNCC 401 diperoleh untuk diperoleh Y yang sama yaitu  $Y = 0,24$  (g/g). Rangkuman data tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.



Gambar 2. Kurva untuk mencari  $\mu$  max dan konstanta saturasi *Lactobacillus sp.* FNCC 401

Dari tabel 2. didapat pada substrat 0,05 - 1,5 % semakin besar kadar substrat maka semakin besar harga  $\mu$ . Untuk mengetahui berapa kecepatan  $\mu_m$  yang akan tercapai dibuat kurva  $1/\mu$ . vs  $1/s$  dari data tersebut (Gambar 2), kemudian dibuat persamaan regresi liniernya hingga didapat  $y = 3,8289 + 0,218 x$ . Dari hasil perhitungan dengan modifikasi persamaan Monod untuk *Lactobacillus sp.* FNCC 401 diperoleh  $\mu_m$  (kecepatan pertumbuhan maksimum) 0,26 per jam dan konstanta saturasi ( $K_s$ ) 0,06 g/l.

Tabel 3. Parameter kinetika pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* FNCC 250 dan *Lactobacillus sp.* FNCC 401.

Isolat	$\mu_{max}$ (perjam)	$K_s$ (g/l)	Y (g/g)
<i>Lactobacillus plantarum</i> FNCC 250	0,17	0,04	0,24
<i>Lactobacillus sp.</i> FNCC 401	0,26	0,06	0,24

Kondisi lingkungan yang cocok akan mendukung penggunaan nutrisi dalam medium sebagai sumber energi pertumbuhan, biosintesis dan pembuatan produk metabolit yaitu asam laktat. Hasil penelitian menunjukkan *growth*

yield pada *Lactobacillus plantarum* FNCC 250 maupun isolat *Lactobacillus* sp. FNCC 401 diperoleh  $Y = 0,24$  (g/g). Perubahan pH yang terjadi menunjukkan adanya produksi asam laktat, hal ini akan mempengaruhi terhadap penurunan pH yang ada. Schuler dan Kargi (1992) menunjukkan bahwa *growth yield* untuk *Streptococcus faecalis* dengan menggunakan glukosa sebagai substrat pembatas dengan kondisi aerob dan anaerob didapat  $58,2 \text{ g.mol}^{-1}$  dan  $21,5 \text{ g. mol}^{-1}$ , yang menunjukkan efisiensi penggunaan substrat bervariasi tergantung lingkungan dan cara fermentasinya. Jika dilihat dari hasil penelitian ini, nilai *growth yield* untuk *Lactobacillus plantarum* FNCC 250 maupun *Lactobacillus* sp. FNCC 401 sebesar  $43,2 \text{ g. mol}^{-1}$ . menunjukkan efisiensi penggunaan substrat (glukosa) antara kedua isolat tersebut sama.

Owens dan Legan (1987) melakukan penghitungan konstanta saturasi untuk *Streptococcus sanguis* dan *Streptococcus mutans* didapat  $110 \mu \text{ M}$  dan  $2170 \mu \text{ M}$ , ini menunjukkan bahwa afinitas antar mikroba terhadap substrat berbeda. Demikian juga antara *Lactobacillus plantarum* FNCC 250 konstanta saturasinya sebesar  $223,9 \mu \text{ M}$  dan *Lactobacillus* sp. FNCC 401 sebesar  $316,1 \mu \text{ M}$ .  $K_s$  merupakan cerminan dari afinitas mikroba terhadap substrat, dimana  $K_s$  semakin kecil semakin baik.

Hasil penelitian Payot et al., (1998) menunjukkan bahwa  $\mu_{\text{max}}$  untuk *Bacillus coagulans* dengan media yang menggunakan sukrosa dan berbagai variasi nutrisi didapat  $0,28$  per jam. Hal ini menunjukkan bahwa media mempengaruhi kecepatan pertumbuhan yang diperoleh disamping juga kondisi lingkungan yang ada serta strain isolatnya. Dari hasil penelitian diperoleh  $\mu_{\text{max}}$  untuk *Lactobacillus plantarum* FNCC 250 sebesar  $0,17$  per jam dan *Lactobacillus* sp. FNCC 401  $0,26$  per jam yang berarti bahwa kecepatan pertumbuhan spesifik maksimum *Lactobacillus* sp. FNCC 401 lebih cepat dari pada *Lactobacillus plantarum* FNCC 250.

## KESIMPULAN

Laju pertumbuhan spesifik maksimum untuk *Lactobacillus plantarum* FNCC 250 adalah  $0,17$  per jam,

dengan  $K_s$  (konstanta saturasi  $0,04 \text{ (g/l)}$ ) dan *growth yield* ( $Y$ )  $0,24 \text{ (g/g)}$ , sedangkan untuk *Lactobacillus* sp. FNCC 401 laju pertumbuhan spesifik maksimumnya adalah  $0,26$  per jam dengan konstanta saturasi  $0,06 \text{ (g/l)}$  dan *growth yield*  $0,24 \text{ (g/g)}$ . Terjadi perubahan pH (penurunan) dari sekitar  $6,44$  hingga  $2,99$  selama proses fermentasi. Konsentrasi glukosa  $1,5 = 2\%$  dalam MRS cair mencukupi untuk pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* FNCC 250 dan *Lactobacillus* sp. FNCC 401

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai dari dana hibah bersaing IX tahun 2002 untuk itu disampaikan terima kasih kepada Direktorat Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia yang telah mendanai penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ngatirah. 2000. Seleksi bakteri asam laktat sebagai agensia probiotik yang berpotensi menurunkan kolesterol. Tesis UGM. Yogyakarta. Tidak diterbitkan.
- Owen, J.D. and Logan, J.D. 1987. Determination of the monod substrate saturation constant for microbial growth. FEMS. Mic. Rev. 46 : 419. Elsevier. NY. USA.
- Payot, T., Chemaly, Z. and Fick, M. 1999. Lactid acid production by *Bacillus coagulans*. Kinetics studies and optimization of culture medium for batch and continous fermentations. Enz. & Mic. Tech 24 :191-199. Elsevier. NY. USA.
- Pirt, J.S. 1975. Principle of microbe and cultivation. John Willey and sons. NY. USA
- Schuler, M.L. dan Kargi, F. 1992. Bioprocess engineering. Basic Concep. Prentice Hall. Englewood. New Jersey.
- Whitaker, A. and Stanbury, P.F. 1984. Principles of fermentation technology. Pergamon Press. Ltd. England.