

Formula Media Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat *Pediococcus pentosaceus* Menggunakan Substrat Whey Tahu

Formulation of Whey Tofu-based Media for the Cultivation of Lactic Acid Bacteria *Pediococcus pentosaceus*

NURLAELA SAFITRI^{1*}, TITI CANDRA SUNARTI², ANJA MERYANDINI³

^{1,3}Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Dramaga IPB, Bogor, Jawa Barat, 16680 Indonesia

²Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Dramaga IPB, Bogor, Jawa Barat, 16680 Indonesia

Diterima 27 Juli 2016/Disetujui 30 Agustus 2016

The lactic acid bacteria (LAB) and its lactic acid are commonly used to preserve the food and to extend the food's shelf life. MRS media is a growth medium for LAB, but it is not feasible for industrial scale application. Cheaper substrate from agriculture products is therefore required, such as tofu *whey*, which is potential to be used as LAB medium. Tofu *whey* contains important components to support the LAB growth, but it needs C source (5% of glucose) and nitrogen source (1% ammonium sulphate or urea) supplementations. This study aimed to investigate the influence of N-source to *Pediococcus pentosaceus* growth and its capability in producing acid compounds. The result showed that addition of urea increased pH fermentation, contrarily to that ammonium sulphate supplementation. The highest bacterial growth rate (μ_{maks}) was observed on media with urea (0.43 jam⁻¹), while the highest acid production was occurred on media with ammonium sulphate (9.13 mg/mL). Supplementation of ammonium sulphate and urea on tofu whey highly supported the growth of bacterial population for about 6.5×10^8 CFU/mL and 5.4×10^8 CFU/mL, respectively, but still lower compared to MRS media (2.03×10^{10} CFU/mL).

Key words: Lactic acid bacteria, *Pediococcus pentosaceus*, nitrogen source, supplementation, tofu *whey*.

PENDAHULUAN

Bahan pangan merupakan salah satu kebutuhan utama untuk kelangsungan hidup manusia yang memiliki masa simpan terbatas, oleh karena itu dibutuhkan suatu bahan pengawet alami agar bahan pangan tersebut tidak mudah mengalami kerusakan. Bakteri asam laktat (BAL) merupakan salah satu jenis bakteri yang mampu memproduksi metabolit sebagai antibakteri. Bakteri asam laktat dinilai tidak berbahaya, sehingga baik digunakan sebagai bahan pengawet alami atau probiotik melawan bakteri patogen (Indriyati 2009). Kelompok bakteri asam laktat merupakan bakteri yang memiliki peran utama dalam proses fermentasi (Hidayat *et al.* 2006). Bakteri ini akan memulai proses pengasaman secara cepat pada bahan baku dengan memproduksi asam laktat (Leroy dan De Vuyst 2004). BAL melalui proses fermentasi maupun metabolit-metabolit yang dihasilkannya, dapat digunakan untuk memperpanjang masa simpan, serta menghambat pertumbuhan mikroba patogen dan pembusuk (Hafsan

2014). Bakteri *Pediococcus pentosaceus* merupakan salah satu bakteri asam laktat yang potensial dalam menghasilkan asam laktat. Pada penelitian sebelumnya, telah dilakukan isolasi BAL yang potensial digunakan sebagai probiotik pada ayam (Hamida 2015).

Bakteri asam laktat biasanya ditumbuhkan pada media *de Mann Rogose and Sharpe* (MRS). Media MRS merupakan media spesifik untuk pertumbuhan bakteri asam laktat. Penggunaan media MRS pada skala industri tidaklah efektif dikarenakan harga yang relatif tinggi. Untuk menangani masalah ini diperlukan media pengganti yang harganya relatif murah namun mengandung sejumlah nutrisi penting yang dapat menunjang pertumbuhan bakteri asam laktat. Media alternatif pengganti yang dapat digunakan salah satunya adalah limbah cair tahu (*whey*). Menurut Ghofar *et al.* (2005) *whey* tahu mengandung senyawa-senyawa organik, seperti N-organik (7.61%), gula total (0.32%), gula reduksi (0.09%), dan mineral. Kandungan protein dari limbah cair tahu (*whey*) dengan penambahan sumber nitrogen dan sumber karbon diharapkan dapat menjadi media tumbuh yang baik untuk bakteri. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa glukosa merupakan sumber karbon yang baik bagi pertumbuhan BAL

*Penulis korespondensi : -
E-mail: nurlaelasafitri90@gmail.com

(Yeni 2016), akan tetapi sumber nitrogen yang tepat digunakan belum diketahui. Sehingga perlu dilakukan pemilihan sumber nitrogen untuk pertumbuhan bakteri. Penelitian ini bertujuan memformulasi media untuk pertumbuhan bakteri *P. pentosaceus* dengan memilih sumber nitrogen yang sesuai untuk pertumbuhan dan kemampuan menghasilkan asam pada media *whey* tahu.

BAHAN DAN METODE

Bahan Penelitian. Bahan yang digunakan meliputi Isolat bakteri E.1222 *P. pentosaceus*, media *de Mann Rogose and Sharpe* (MRS), *whey* tahu yang diambil dari pabrik tahu yang berada di Pasar Cibereum, Kabupaten Bogor. Glukosa, Urea dan Amonium sulfat, Fenol 5%, Asam Sulfat, Gliserol, NaCl, NaOH, dan indikator Phenolptalein.

Peremajaan dan Perbanyakkan Kultur. Kultur stok bakteri sebanyak 100 µL diinokulasikan ke dalam 10 mL media cair MRS steril dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Perbanyakkan kultur dilakukan pada media campuran 80 mL MRS dengan 20 mL *whey* tahu, yang kemudian dipisahkan ke dalam tabung ulir berisi 9 mL media propagasi. Sterilisasi dilakukan pada suhu 121 °C selama 15 menit. Bakteri *P. pentosaceus* hasil peremajaan diinokulasikan sebanyak 1 mL dalam 9 mL media propagasi dan diinkubasi pada suhu 37°C hingga tercapai fase logaritmik (5-6 jam inkubasi) (Yeni 2016), kemudian dilakukan perhitungan jumlah sel koloni bakteri dengan metode TPC (*total plate count*).

Formulasi Media untuk Pertumbuhan Bakteri. Formulasi media ditentukan berdasarkan persyaratan substrat yang memiliki C/N rasio yang sesuai untuk pertumbuhan bakteri. Berdasarkan penelitian Yeni (2016) sumber karbon yang paling baik untuk pertumbuhan bakteri *P. pentosaceus* adalah media (*whey* tahu) WT + 5% glukosa (rasio C/N 7,4).

Pemilihan Sumber Nitrogen. Percobaan dilakukan dengan menggunakan 4 perlakuan, sebanyak 2 kali ulangan, sebagai berikut :

Perlakuan 1 : media *whey* tahu tanpa suplementasi (WT)

Perlakuan 2 : media WT + 5% glukosa + 1% Urea

Perlakuan 3 : media WT + 5% glukosa + 1% Amonium sulfat

Perlakuan 4 : media MRS (kontrol)

Seluruh media diatur tingkat keasamannya pada pH 6, untuk kemudian disterilisasi selama 15 menit pada suhu 121 °C. Selanjutnya media diinokulasikan dengan 1% bakteri *P. pentosaceus* dari media MRS cair yang telah diinkubasi selama 6 jam, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pertumbuhan

bakteri *P. pentosaceus* diamati pada jam ke 0, 3, 5, 7, 9, 11, 24 dan 30 jam dengan metode TPC (*total plate count*), analisis total gula metode Fenol-H₂SO₄ (Dubois *et al.* 1956), pembentukan total asam (AOAC 1995), dan pengukuran pH dengan menggunakan pH meter. Parameter utama yang digunakan untuk menentukan perlakuan terbaik adalah perlakuan media yang memberikan jumlah bakteri *P. pentosaceus* dan total asam tertinggi. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis varian (ANOVA).

Analisis C/N Rasio. Salah satu aspek yang penting untuk pertumbuhan bakteri adalah rasio organik karbon dengan nitrogen (C/N). Rasio C/N bahan organik adalah perbandingan antara banyaknya kandungan unsur karbon (C) terhadap banyaknya kandungan unsur nitrogen yang ada pada suatu bahan organik. Analisis C/N Rasio dilakukan dengan menganalisis kadar C organik dan kadar N total pada media. Analisis komponen C dalam sampel dilakukan dengan metode Walkley dan Black (AOAC 1999), sedangkan analisis komponen N dalam sampel dilakukan dengan metode Kjeldahl (AOAC 1980). Analisis ini dilakukan oleh jasa analisis di Laboratorium Terpadu (IPB).

HASIL

Karakteristik *Whey* Tahu. Dengan menggunakan metode Oven (AOAC 1995) untuk kadar air, metode Tanur (AOAC 1995) untuk kadar abu, metode Soxhlet (AOAC 1995) untuk kadar lemak, metode Kjeldahl Mikro (AOAC 1995) untuk kadar protein, Kadar serat kasar (AOAC 1995), dan kadar karbohidrat *by difference* (AOAC 1995) diketahui komposisi kimiawi *whey* tahu, dimana disajikan pada (Tabel 1).

Tabel 1 Komposisi kimia *whey* tahu

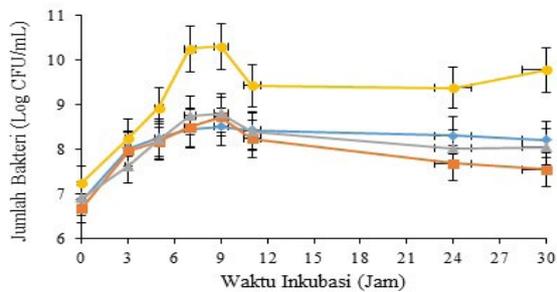
Komponen	Jumlah (%bb)	% bk
Kadar air	98,02	
Kadar abu	0,11	5
Lemak kasar	0,11	5
Protein kasar	1,75	88,38
Serat kasar	0,003	0,1
Karbohidrat (by difference)	0,01	
Total gula	0,26	
pH	4,05	
Rasio C/N	0,3	

Keterangan : data adalah rata-rata hasil tiga kali ulangan (Yeni 2016).

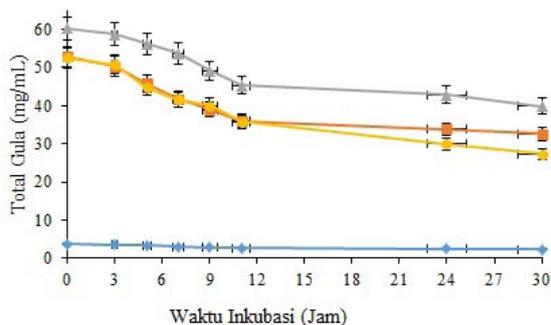
Pemilihan Sumber Nitrogen. Pemilihan sumber nitrogen dilakukan dengan mengukur pertumbuhan bakteri *P. pentosaceus* dengan metode TPC (*total plate count*), penurunan total gula dengan metode analisis total gula metode Fenol-H₂SO₄, analisis total gula metode Fenol-H₂SO₄, pembentukan total asam dengan

metode titrasi asam basa, dan penurunan nilai pH dengan menggunakan pH meter. Pertumbuhan bakteri diamati pada jam ke 0, 3, 5, 7, 9, 11, 24 dan 30 jam. Pengaruh penambahan sumber nitrogen dengan jenis yang berbeda terhadap pertumbuhan BAL dapat dilihat pada (Gambar 1). Peningkatan jumlah BAL diikuti penurunan nilai total gula seiring dengan lamanya waktu fermentasi. Adanya penurunan kadar glukosa selama proses fermentasi menunjukkan tingkat konsumsi glukosa oleh bakteri *P. pentosaceus* (Gambar 2). Dari hasil pengukuran diketahui bahwa nilai total gula yang terkandung pada media WT sangat rendah pada awal fermentasi, yaitu 3.68 mg/mL. Pada media WT + 5% glukosa + 1% urea, nilai total gula mencapai 53.43 mg/mL, media WT +5% glukosa + 1% amonium sulfat mencapai 60.81 mg/mL, dan pada media MRS mencapai 53.20 mg/mL pada awal fermentasi. Penurunan nilai total gula sangat signifikan terjadi pada media MRS sebesar 53.20 mg/mL. Penurunan total gula pada media MRS menunjukkan bakteri *P. pentosaceus* mampu mengkonsumsi gula sebesar 47.43% pada akhir fermentasi. Sementara pada media WT + 5% glukosa + 1% urea dan WT +5% glukosa + 1% amonium sulfat, gula yang berhasil dikonsumsi bakteri *P. pentosaceus* sebesar 37.98% dan 33.36% gula pada akhir fermentasi. Pada media WT tanpa suplementasi penurunan total gula sebesar 37.49 mg/mL.

Substrat gula yang dikonsumsi pada media



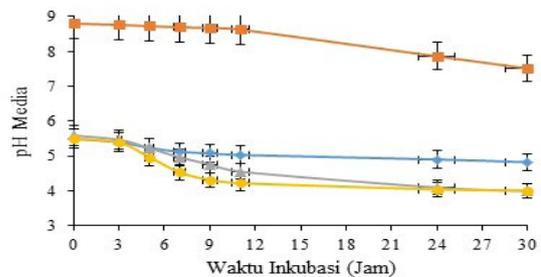
Gambar 1 Pengaruh penambahan sumber nitrogen terhadap pertumbuhan *P. pentosaceus* pada media whey tahu (♦), disuplementasi dengan 5% glukosa + 1% Urea (■), dan 5% glukosa + 1% Amonium sulfat (▲) dan media MRS (●).



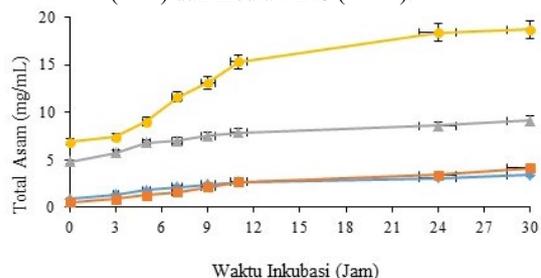
Gambar 2 Pengaruh penambahan sumber nitrogen terhadap konsumsi gula *P. pentosaceus* pada media whey tahu (♦), disuplementasi dengan 5% glukosa + 1% Urea (■), dan 5% glukosa + 1% Amonium sulfat (▲) dan media MRS (●).

digunakan oleh bakteri untuk pertumbuhan dan pemeliharaan sel, serta pembentukan asam-asam organik terutama asam laktat. Pembentukan asam organik pada media dapat dilihat dengan pengukuran nilai total asam dan nilai pH. Penurunan pH tertinggi ada pada media WT +5% glukosa + 1% amonium sulfat yaitu sebesar 1,6 dari pH awal 5.99 menjadi 3.99, pada media MRS penurunan pH sebesar 1.49 dari pH awal 5.49 menjadi 4.05, pada media WT + 5% glukosa + 1% urea penurunan pH sebesar 1.29 dari pH awal 8.8 menjadi 7.51, sedangkan pada media WT tanpa suplemensi penurunan pH sebesar 0.67 dari pH awal 5.49 menjadi 4.82 (Gambar 3). Media WT + 5% glukosa + 1% urea pH media berubah dari pH awal 6 menjadi 8 dikarenakan urea tersebut mengalami perubahan menjadi amonia pada saat sterilisasi.

Asam laktat merupakan golongan asam organik dan mempunyai nilai jual tinggi karena memiliki kegunaan yang sangat beragam di bidang industri. Pembentukan total asam dapat dilihat pada (Gambar 4). Asam laktat merupakan hasil metabolit utama fermentasi oleh BAL. Pada penelitian ini pembentukan total asam tertinggi dihasilkan oleh bakteri *P. pentosaceus* pada media MRS yaitu sebesar 18.72 mg/mL pada akhir fermentasi selama 30 jam, kemudian diikuti dengan media WT + 5% glukosa + 1% amonium sulfat sebesar 9.135 mg/mL, selanjutnya media WT + 5% glukosa + 1% urea sebesar 4.14 mg/mL, kemudian total asam pada media WT tanpa suplemetasi sebesar 3.42 mg/mL.

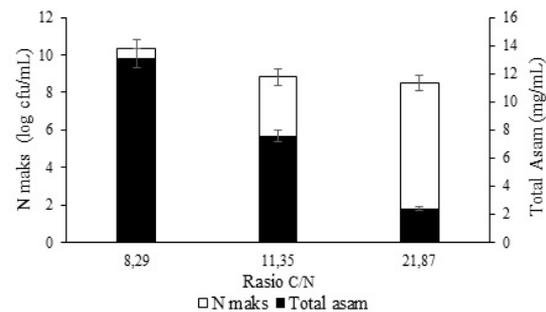


Gambar 3 Pengaruh penambahan sumber nitrogen terhadap pertumbuhan *P. pentosaceus* pada media whey tahu (♦), disuplementasi dengan 5% glukosa + 1% Urea (■), dan 5% glukosa + 1% Amonium sulfat (▲) dan media MRS (●).



Gambar 4 Pengaruh penambahan sumber nitrogen terhadap pembentukan total asam *P. pentosaceus* pada media whey tahu (♦), disuplementasi dengan 5% glukosa + 1% Urea (■), dan 5% glukosa + 1% Amonium sulfat (▲) dan media MRS (●).

Kinetika pertumbuhan bakteri merupakan sebuah hubungan antara pertumbuhan biomassa, penggunaan substrat dan produk yang dihasilkan. Pengaruh penambahan sumber karbon dan nitrogen terhadap parameter kinetika pertumbuhan bakteri *P. pentosaceus* pada media perlakuan dapat dilihat pada (Tabel 2). Nilai μ_{maks} tertinggi ada pada media MRS yaitu 0.67 jam^{-1} pada pertumbuhan jam 5 ke 7 jam inkubasi. Kemudian diikuti oleh media whey tahu + 5% glukosa + 1% urea yaitu 0.43 jam^{-1} pada pertumbuhan jam 0 ke 3 jam inkubasi, selanjutnya media whey tahu tanpa suplemensi sebesar 0.38 jam^{-1}



Gambar 5 Grafik Hubungan N maks, Rasio C/N dan Total asam

Tabel 2 Pengaruh penambahan sumber karbon dan nitrogen terhadap parameter kinetika pertumbuhan bakteri *P. pentosaceus* pada media perlakuan

Jenis Media	μ_{maks} (Jam ⁻¹)	N_{maks} (Log CFU/mL)	$Y_{p/s}$ (mg/mL)	$Y_{N/s}$ (CFU/mg)	$\Delta S/S$ (mg/mL)
Whey tahu	0.38	8.51	0.90	2.31	0.37
Whey tahu + 5% glukosa + 1% Urea	0.43	8.73	0.07	0.16	0.38
Whey tahu + 5% glukosa + 1% Amonium sulfat	0.29	8.81	0.15	0.14	0.33
Media MRS	0.67	10.31	0.35	0.19	0.47

Tabel 3 Hasil Analisis C/N Rasio Media

Media Pertumbuhan	Kadar C-Organik	Kadar N-Total	C/N Rasio
Whey tahu tanpa suplemensi	1.75	0.08	21.87
WT + 5% glukosa + 1% Amonium sulfat	3.18	0.28	11.35
Media MRS	2.82	0.34	8.29

pada pertumbuhan jam 0 ke 3 jam inkubasi dan whey tahu + 5% glukosa + 1% amonium sulfat sebesar 0.29 jam^{-1} pada pertumbuhan jam 3 ke 5 jam inkubasi. Nilai $Y_{p/s}$ bakteri *P. pentosaceus* pada media whey tahu, whey tahu + 5% glukosa + 1% Urea, whey tahu + 5% glukosa + 1% amonium sulfat dan Media MRS berturut-turut adalah 0.90 mg/mL , 0.07 mg/mL , 0.15 mg/mL , 0.35 mg/mL . Nilai $Y_{x/s}$ media WT tanpa suplementasi paling tinggi yaitu sebesar 2.31 CFU/mg , nilai S/S bakteri *P. pentosaceus* pada media whey tahu, whey tahu + 5% glukosa + 1% urea, whey tahu + 5% glukosa + 1% amonium sulfat dan media MRS berturut-turut adalah 0.37 mg/mL , 0.38 mg/mL , 0.33 mg/mL , 0.47 mg/mL (Tabel 2).

Analisis C/N Rasio. Nilai C/N rasio formula media pertumbuhan bakteri *P. pentosaceus* dapat dilihat pada (Tabel 3). Berdasarkan variasi rasio C/N yang digunakan pada tahapan ini, dapat dilihat pengaruhnya terhadap jumlah biomassa, dan nilai total asam (Gambar 5). Berdasarkan hasil pengamatan diketahui bahwa semakin tinggi rasio C/N media, N_{maks} (jumlah biomassa), dan nilai total asam semakin tinggi dan menurun pada rasio C/N tertinggi (21.87). Jumlah biomassa, dan nilai total asam tertinggi diperoleh pada media dengan rasio C/N 8.29 (Media MRS), $2.03 \times 10^{10} \text{ CFU/mL}$, dan 18.72 mg/mL .

PEMBAHASAN

Whey tahu merupakan limbah cair yang dikeluarkan oleh industri pengolahan kedelai menjadi tahu (Manfaati 2010). Limbah cair tahu dapat dimanfaatkan kembali antara lain sebagai pupuk, pembuatan biogas maupun media pertumbuhan bakteri, karena mengandung bahan organik yang tinggi. Limbah cair tahu yang tidak dimanfaatkan dapat berpotensi merusak lingkungan (Darsono 2007), hal tersebut dikarenakan membusuknya senyawa-senyawa organik yang terkandung dalam whey tahu, sedangkan pemanfaatannya masih sangat terbatas (Hariyadi 2002). Hasil analisis komposisi kimia whey tahu menunjukkan bahwa media whey tahu merupakan media yang baik digunakan untuk pertumbuhan bakteri asam laktat karena masih mengandung sejumlah N yang dapat dimanfaatkan untuk kelangsungan hidup bakteri (Sriharti dan Salim 2008).

Nutrisi utama yang dibutuhkan oleh BAL adalah sumber karbon dan nitrogen (Azizah et al. 2012). Bakteri asam laktat menggunakan sumber karbon sebagai sumber energi dan bahan pembentuk asam laktat, sedangkan nitrogen digunakan sebagai bahan pembentuk biomassa sel. Bakteri asam laktat pada fase pertumbuhan memanfaatkan protein

sebagai sumber nitrogen, yang digunakan oleh bakteri untuk sintesis protein, asam amino (Nisa *et al.* 2001). Dalam penelitiannya Yeni (2016) menyatakan bahwa sumber karbon yang baik untuk pertumbuhan bakteri asam laktat adalah glukosa. Glukosa sebagai monosakarida merupakan senyawa yang langsung dapat digunakan secara penuh oleh bakteri *P. pentosaceus* dalam metabolismenya.

Jumlah populasi bakteri *P. pentosaceus* pada keempat media perlakuan menunjukkan peningkatan yang sejalan dengan meningkatnya waktu fermentasi, namun setiap perlakuan media menghasilkan jumlah bakteri yang berbeda. Fase adaptasi (fase lag) terjadi sampai jam ke-3 masa inkubasi. Menurut Yuliana (2008) jika mikroba dipindahkan ke dalam suatu media mula-mula akan mengalami fase lag untuk menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan sekitarnya. Sel mengalami perubahan dalam komposisi kimia dan bertambahnya ukuran pada fase lag. Setelah fase lag selesai sel memasuki fase logaritma (eksponensial), pada fase ini reproduksi selular mulai berlangsung (Puspawati *et al.* 2010). Pada fase logaritmik, bakteri membelah dengan cepat dan konstan, pada fase ini kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh media tempat tumbuhnya seperti, pH dan kandungan nutrisi, juga kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembaban. Fase logaritmik pada keempat media berlangsung mulai jam ke-3 sampai jam ke-6, dimana bakteri pada masing-masing media memiliki waktu generasi dan kecepatan pertumbuhan yang spesifik.

Bakteri pada semua media memasuki fase akhir logaritmik pada jam ke-6 inkubasi. Saat memasuki fase stasioner, konsentrasi biomassa menjadi maksimal, jumlah sel cenderung stabil, dan peningkatan jumlah sel berhenti. Fase stasioner terjadi mulai jam ke-7 sampai jam ke-30 waktu inkubasi. Pada fase stasioner jumlah BAL tertinggi terdapat pada media MRS yaitu sebesar 2.03×10^{10} CFU/mL. Media MRS merupakan media spesifik untuk pertumbuhan bakteri asam laktat. Media terbaik kedua adalah media *whey* tahu dengan penambahan 5% glukosa + 1% amonium sulfat dengan jumlah sel 6.5×10^8 CFU/mL. Media berikutnya adalah media *whey* tahu dengan penambahan 5% glukosa + 1% urea dengan jumlah sel 5.4×10^8 CFU/mL. Pada media *whey* tahu tanpa suplemensi terdapat 3.32×10^8 CFU/mL.

Perbedaan jumlah BAL pada berbagai media dikarenakan proses fermentasi yang terjadi akibat perbedaan struktur molekul kedua sumber nitrogen yang digunakan. amonium sulfat merupakan sumber nitrogen yang dibutuhkan dalam jumlah kecil, adanya penambahan konsentrasi amonium sulfat yang berlebih dapat menjadi inhibitor.

Liu *et al.* (2008) mempelajari pengaruh dari penambahan garam anorganik yang berbeda pada produksi etanol. Amonium sulfat dapat menginduksi produksi etanol yang lebih tinggi daripada urea oleh *Saccharomyces cerevisiae*. Amonium sulfat merupakan molekul yang sederhana dan harganya murah, sedangkan urea merupakan suatu senyawa organik yang terdiri atas unsur karbon, hidrogen, oksigen dan memiliki kandungan nitrogen yang tinggi (Anunputtikul dan Rodrong 2004). Sumber nitrogen dibutuhkan untuk pertumbuhan dan pembentukan polisakarida, akan tetapi kelebihan nitrogen pada umumnya dapat mengurangi konversi substrat menjadi polisakarida (Kang dan Cottrell 1979).

Jumlah BAL yang rendah (3.32×10^8 CFU/mL) pada media *whey* tahu disebabkan karena sedikitnya sumber karbon yang terkandung dalam media, sehingga sedikit pula kandungan gula yang difermentasikan oleh bakteri. Sejalan dengan yang dilakukan oleh Thi *et al.* (2003), media *whey* tahu tanpa suplementasi menghasilkan pertumbuhan bakteri *L. paracasei* ssp. *paracasei* yang lebih rendah dibandingkan dengan *whey* tahu dengan suplementasi, hal ini dikarenakan sedikitnya kandungan gula yang dapat difermentasi oleh bakteri. Jumlah BAL mengalami penurunan mulai jam ke-9 dikarenakan ada sebagian mikroorganisme yang mati. Bakteri asam laktat mengalami kematian disebabkan oleh beberapa faktor seperti ketersediaan nutrisi pada media berkurang, energi cadangan dalam sel habis, adanya penumpukan asam dan metabolit lainnya (Puspawati *et al.* 2010). Menurut Shah (2000) faktor utama turunnya kelangsungan hidup organisme probiotik dikaitkan dengan adanya penurunan pH medium dan akumulasi asam organik sebagai hasil metabolit fermentasi. Pada media MRS dan media *whey* tahu + glukosa 5% + amonium sulfat 1% jumlah bakteri mengalami peningkatan kembali menjadi 5.9×10^9 CFU/mL pada media MRS, dan pada media *whey* tahu + 5% glukosa + 1% amonium sulfat (Gambar 1). Ini menunjukkan bahwa masih tersedianya nutrisi untuk pertumbuhan bakteri *P. pentosaceus*.

Karbohidrat merupakan sumber karbon dan energi yang paling banyak digunakan dalam proses fermentasi. Karbohidrat sebagai sumber energi dimetabolisme melalui 2 cara yaitu respirasi dan fermentasi. Fermentasi merupakan proses konversi gula menjadi asam atau alkohol dengan bantuan bakteri atau ragi. Fermentasi berlangsung dalam kondisi anaerobik atau tanpa adanya oksigen. Bakteri asam laktat merupakan bakteri homofermentatif yang dapat memfermentasikan gula atau karbohidrat untuk memproduksi asam laktat dalam jumlah besar melalui jalur Embden-Mayerhorf

Parnas (EMP). Ciri-ciri bakteri asam laktat secara umum adalah selnya bereaksi positif terhadap pewarnaan Gram, tidak memiliki enzim katalase dan tidak membentuk spora (Romadhon *et al.* 2012).

Yuliana (2008) menyatakan bahwa secara umum substrat dimanfaatkan mikroorganisme untuk pertumbuhan biomassa, pemeliharaan sel, dan membentuk asam organik sebagai produk. Penurunan total gula pada media pertumbuhan sejalan dengan bertambahnya jumlah bakteri *P. pentosaceus* pada media (Gambar 1). Busairi (2010) menyatakan bahwa peningkatan jumlah total gula yang difermentasi sejalan dengan meningkatnya jumlah bakteri yang tumbuh pada media fermentasi. Substrat gula yang dikonsumsi pada media digunakan oleh bakteri untuk pertumbuhan dan pemeliharaan sel, serta pembentukan asam-asam organik terutama asam laktat. Pembentukan asam organik pada media dapat dilihat dengan pengukuran nilai total asam dan nilai pH. pH merupakan salah satu parameter penting dalam proses fermentasi.

Penurunan nilai pH merupakan salah satu akibat dari proses fermentasi yang terjadi karena adanya akumulasi asam laktat sebagai produk utama dari aktifitas bakteri homofermentatif. pH awal proses fermentasi menggunakan bakteri *P. pentosaceus* dikondisikan pada pH 6, hal ini dimaksudkan untuk menyamakan pH media MRS yang memiliki pH 6 ± 0.2 . Penurunan pH disebabkan oleh ion H yang berasal dari perombakan senyawa asam hasil metabolisme bakteri asam laktat. Pada media WT + 5% glukosa + 1% Urea pH media berubah dari pH awal 6 menjadi 8 dikarenakan urea tersebut mengalami perubahan menjadi ammonia pada saat sterilisasi.

Amonia mempunyai pH basa sehingga tidak cocok untuk pertumbuhan bakteri asam laktat. Menurut Anunputtikul dan Rodrong (2004) urea berisi nitrogen yang menjadi sumber nutrisi bagi pertumbuhan mikroorganisme, namun dapat menghambat produksi asam laktat karena mempunyai pH yang basa ketika sudah berubah menjadi ammonia. Menurut Bagenda *et al.* (2008) bakteri *P. pentosaceus* optimal tumbuh pada kisaran pH media 5–6, dan toleran terhadap pH 4.5 dan 7.5. Nannen dan Hutkins (1991) melaporkan bahwa pertumbuhan BAL yang baik ketika pH media mendekati netral (pH 6) dan laju pertumbuhannya menurun apabila media ekstraselulernya menjadi asam. Penurunan pH dan kenaikan nilai total asam pada media fermentasi disebabkan karena aktivitas bakteri asam laktat sehingga terjadi akumulasi asam organik, terutama asam laktat. Penurunan pH dan peningkatan nilai total asam pada media fermentasi ini sangat menguntungkan karena dapat menghambat beberapa mikroba patogen.

Sesuai dengan Busairi (2010) produksi asam pada media fermentasi tergantung pada pertumbuhan organisme dan kemampuan mereka dalam memfermentasi karbohidrat. Jumlah total asam yang dihasilkan sesuai dengan jumlah bakteri yang tumbuh pada media. Media MRS memiliki nutrisi yang sesuai dengan kebutuhan pertumbuhan bakteri asam laktat, hal tersebut menyebabkan tingginya total asam yang dihasilkan pada media ini. Total asam laktat terendah dihasilkan pada bakteri yang terdapat pada media WT tanpa suplemensi, hal tersebut dikarenakan pada media tersebut tidak disuplementasikan unsur tambahan seperti sumber karbon dan sumber nitrogen. Bakteri hanya memanfaatkan nutrisi yang ada pada *whey* tahu yang hanya mengandung gula sebesar 3.68 mg/mL saja. Asam laktat yang cukup tinggi dihasilkan pada media WT + 5% glukosa + 1% Amonium sulfat dikarenakan terdapat nutrisi yang mencukupi bagi bakteri untuk memproduksi asam. Rendahnya asam laktat yang terdapat pada media WT + 5% glukosa + 1% urea dikarenakan pH media tersebut bersifat basa, selain itu dimungkinkan juga tidak semua karbon digunakan untuk memproduksi asam. Huang *et al.* (2005) melaporkan bahwa selama proses fermentasi ada persaingan penggunaan karbon untuk pembentukan biomassa dan untuk produksi asam laktat.

Kinetika pertumbuhan bakteri merupakan sebuah hubungan antara pertumbuhan biomassa, penggunaan substrat dan produk yang dihasilkan (Yeni 2016). Nilai μ_{maks} tertinggi ada pada media MRS yaitu 0.67 jam⁻¹ hal ini sejalan dengan penelitian Erdiandini *et al.* (2015) dimana pada media MRS nilai μ_{maks} dicapai pada saat kultur bakteri *P. pentosaceus* berumur 6 jam. Pertumbuhan bakteri pada masing-masing media memiliki μ_{maks} pada waktu yang berbeda, sesuai dengan pernyataan Yuliana (2008) bahwa bakteri akan menunjukkan perbedaan pola pertumbuhan, periode waktu yang dibutuhkan untuk tumbuh maupun beradaptasi, dan metabolit yang dihasilkan bergantung pada media pertumbuhannya. Tingginya nilai μ_{maks} yang diperoleh pada media MRS mengindikasikan bahwa bakteri *P. pentosaceus* cukup baik dalam memfermentasi gula yang terkandung dalam media MRS. Hal ini berbanding lurus dengan tingginya nilai N_{maks} pada media MRS sebesar 10.31 Log CFU/mL.

Secara umum substrat dimanfaatkan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhan biomassa, pemeliharaan sel dan menghasilkan produk (Yuliana 2008). *Product yield* ($Y_{p/s}$) menunjukkan banyaknya nutrisi atau substrat yang digunakan oleh bakteri untuk membentuk produk. Data pada (Tabel 2) menunjukkan bahwa nilai $Y_{p/s}$ pada media *whey*

tahu tanpa suplementasi memiliki nilai yang paling tinggi, artinya bahwa efisiensi penggunaan substrat membentuk produk lebih tinggi jika dibandingkan dengan ketiga media lainnya. *Growth yield* ($Y_{N/S}$) adalah hasil bagi antara perubahan jumlah biomassa dengan substrat. *Growth yield* merupakan suatu cara yang penting untuk menyatakan kebutuhan nutrisi oleh suatu mikroorganisme secara kuantitatif (Yuliana 2008). Diketahui bahwa nilai $Y_{x/s}$ media WT tanpa suplementasi paling tinggi yaitu sebesar 2.31 CFU/mg, artinya bahwa efisiensi substrat yang dikonversi menjadi biomassa juga tinggi. Nilai $\Delta S/S$ menunjukkan banyaknya gula yang dipakai hingga akhir fermentasi. Nilai $\Delta S/S$ bakteri *P. pentosaceus* pada media whey tahu, whey tahu + 5% glukosa + 1% urea, whey tahu + 5% glukosa + 1% amonium sulfat dan media MRS berturut-turut adalah 0.37 mg/mL, 0.38 mg/mL, 0.33 mg/mL, 0.47 mg/mL.

Berdasarkan data-data yang diperoleh bahwa whey tahu dapat digunakan sebagai media pertumbuhan BAL, dimana media WT tanpa suplementasi sudah bisa menumbuhkan bakteri *P. pentosaceus* mencapai 1.67×10^8 CFU/mL pada akhir fermentasi, namun untuk bisa meningkatkan pertumbuhan perlu dilakukan penambahan suplementasi berupa sumber karbon dan nitrogen. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa terdapat pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) pada pemilihan sumber nitrogen terhadap jumlah bakteri *P. pentosaceus*, konsumsi gula, pH, dan pembentukan total asam. Perlakuan terbaik dipilih berdasarkan jumlah populasi bakteri *P. pentosaceus*. Berdasarkan nilai N_{maks} (Tabel 2) pada perlakuan dengan penambahan Amonium sulfat pada media WT merupakan perlakuan terbaik dalam penelitian ini karena memberikan nilai N_{maks} yang lebih besar dari nilai N_{maks} dengan penambahan urea yaitu sebesar 8.81 Log CFU/mL.

Kualitas media dapat diukur dengan menghitung C/N rasio. Rasio C/N bahan organik adalah perbandingan antara banyaknya kandungan unsur karbon (C) terhadap banyaknya kandungan unsur nitrogen yang ada pada suatu bahan organik. Mikroorganisme membutuhkan karbon dan nitrogen untuk aktivitas hidupnya (Widarti *et al.* 2015). Rasio C/N terbaik yang didapat pada penelitian ini masih termasuk kedalam syarat rasio C/N untuk pertumbuhan biomassa bakteri menurut Riadi (2007) yaitu 7 – 10. Sementara itu dapat dilihat pula bahwa penambahan sumber nitrogen amonium sulfat baik digunakan untuk pertumbuhan bakteri dikarenakan C/N Rasio media dengan penambahan amonium sulfat mendekati syarat rasio C/N untuk pertumbuhan bakteri yaitu 11.35, jumlah biomassa, dan nilai total asam yang tinggi yaitu sebesar 6.5×10^8 CFU/mL, dan 9.13 mg/mL.

Dari penelitian ini diketahui bahwa whey tahu dapat dijadikan media pertumbuhan bakteri karena masih memiliki nutrisi penting untuk menunjang pertumbuhan bakteri. Sumber nitrogen terbaik untuk meningkatkan pertumbuhan BAL adalah amonium sulfat karena memiliki jumlah bakteri *P. pentosaceus* dan total asam tertinggi dibandingkan dengan whey tahu dengan suplementasi urea. Penambahan urea menyebabkan adanya peningkatan pH kultur selama fermentasi, sedangkan amonium sulfat sebaliknya. Laju pertumbuhan (μ_{maks}) tertinggi dihasilkan pada media dengan suplementasi urea (0.43 jam^{-1}), sedangkan pembentukan asam tertinggi dihasilkan pada media dengan suplementasi amonium sulfat (9.13 mg/mL). Penggunaan amonium sulfat dan urea mampu menghasilkan jumlah bakteri sebanyak 6.5×10^8 CFU/mL dan 5.4×10^8 CFU/mL, namun masih lebih rendah dibandingkan dengan media MRS (2.03×10^{10} CFU/mL).

DAFTAR PUSTAKA

- Anunputtikul W, Rodrong S. 2004. Investigation of the potential of biogas from *Cassava tuber*. Symposium. Thailand (TH). [AOAC] Association of Analytical Chemist. 1980. *Official Methods of Analysis*. Washington DC (US): Assoc of Official Analytical Chemist.
- [AOAC] Association of Analytical Chemist. 1995. *Official Methods of Analysis*. Washington DC (US): Assoc of Official Analytical Chemist.
- [AOAC] Association of Analytical Chemist. 1999. *Official Methods of Analysis*. Washington DC (US): Assoc of Official Analytical Chemist.
- Azizah AN, Baarri S, Mulyani S. 2012. Pengaruh lama fermentasi terhadap kadar alkohol, pH, dan produksi gas pada proses fermentasi bioethanol dari whey dengan substitusi kulit nanas. *J Aplikasi Teknol Pangan*. 1(2): 72-77.
- Bagenda DK, Hayashi K, Yamazaki K, Kawai Y. 2008. Characterization of an antimicrobial substances produced by *Pediococcus pentosaceus* Iz3.13 isolated from Japanese fermented marine food. *Fish Sci.* (74) : 439-448.
- Busairi AM. 2010. Effect of nitrogen sources and initial sugar concentration on lactic acid fermentation of pineapple waste using *Lactobacillus delbrueckii*. *J Teknik*. 1(31) : 10-17.
- Darsono V. 2007. Pengolahan limbah cair tahu secara anaerob dan aerob. *J Teknol Ind*. 11(1): 9-20.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA dan Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *J Anal Chem*. 28 (3): 350-356.
- Erdiandini I, Sunarti TC, Meryandini A. 2015. Seleksi bakteri asam laktat dan pemanfaatannya sebagai starter kering menggunakan matriks tapioka asam. *J Sumberdaya Hayati*. 1(1): 26-32.
- Ghofar A, Ogawa S, Kokugan T. 2005. Production of L-lactic acid from fresh cassava roots slurried with tofu liquid waste by *Streptococcus bovis*. *J Biosci Bioeng*. 100 (6): 606-612.
- Hafsan. 2014. Bakteriosin asal bakteri asam laktat sebagai biopreservatif pangan. *J Teknosains*. 2 (8): 175-184.
- Hamida F. 2015. Seleksi bakteri asam laktat sebagai kandidat probiotik ayam. [Tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.

- Hariyadi P. 2002. Pemanfaatan limbah cair tahu untuk memproduksi ingredien pangan fungsional [Abstrak penelitian]. Lembaga penelitian dan pengabdian kepada Masyarakat (LPPM IPB). Bogor (ID).
- Hidayat N, Masdiana CP, Sri H. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta (ID): Andi Pr.
- Huang LP, Jin B, Zhou. 2005. Simultaneous saccharification of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. *J Biochem Eng.* 23: 256-276.
- Indriyati AS. 2009. Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat (BAL) dari susu formula balita yang berpotensi menghasilkan substansi antimikroba. [Skripsi]. Yogyakarta (ID): UIN Sunan Kalijaga.
- Kang KS, Cottrell IW. 1979. *Microbial Technology and Microbial processes, second edition*. London (GB): Academic Pr.
- Leroy F, Vuyst D. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry [review]. *Trends in Food Sci Tech.* 15:67-78.
- Liu R, Shen F. 2008. Refining sweet sorghum from stalk juice of sweet sorghum by immobilised yeast fermentation. *Renewable Energy.* 33: 1130-1135.
- Manfaati R. 2010. Kinetika dan variabel optimum fermentasi asam laktat dengan media campuran tepung tapioka dan limbah cair tahu oleh *Rhizopus oryzae*. [Tesis]. Semarang (ID): Universitas Diponegoro.
- Nannen NL, Hutkins RW. 1991. Intracellular pH effect in lactic acid bacteria. *Dairy Sci.* 74: 741-746.
- Nisa CF, Hani RH, Wastono T, Baskoro B. Moestijanto. 2001. Produksi nata dari limbah cair tahu (*whey*) kajian penambahan sukrosa dan ekstrak kecambah. *J Teknol Pert.* 2 (2): 74-78.
- Puspawati NN, Nuraida L, Adawiyah DR. 2010. Penggunaan berbagai jenis bahan pelindung untuk mempertahankan viabilitas bakteri asam laktat yang diisolasi dari air susu ibu pada proses pengeringan beku. *J Teknol Ind Pangan.* 1: 59-65.
- Riadi L. 2007. *Teknologi Fermentasi*. Yogyakarta (ID): Graha Ilmu Pr.
- Romadhon, Subagiyo, Margino S. 2012. Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat dari usus udang penghasil bakteriosin sebagai agen antibakteria pada produk-produk hasil perikanan. *J Saintek Perikanan.* 8(1): 61-66.
- Shah NP. 2000. Probiotic bacteria : selective enumeration and survival in dairy foods. *J Dairy Sci.* 83 : 894-907.
- Sriharti, Salim T. 2008. Pemanfaatan limbah pisang untuk Pembuatan Pupuk Kompos Menggunakan Kompos Rotary Drum. *Prosiding Seminar Nasional Bidang Teknik Kimia dan Tekstil*. Yogyakarta (ID).
- Thi LN, Champagne CP, Lee BH, Goulet J. 2003. Growth of *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* on tofu whey. *Int J Food Microbiol.* 89:67-75.
- Yeni. 2016. Pengembangan starter bakteri asam laktat menggunakan substrat whey tahu. [Tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Yuliana N. 2008. Kinetika pertumbuhan bakteri asam laktat isolat T5 yang berasal dari tempoyak. *J Teknol Ind Hasil Pert.* 13(2): 108-116.
- Widarti BN, Wardhini WK, Sarwono E. 2015. Pengaruh rasio C/N pada pembuatan kompos dari kubis dan kulit pisang. *J Integrasi Proses.* 5(2): 75-80.