

## Potensi *Lactobacillus plantarum* yang Diisolasi dari Dadih dalam Meningkatkan Kadar Folat Susu Fermentasi

Potency of *Lactobacillus plantarum* Isolated from Dadih to Increase the Folate Levels in Fermented Milk

Siti Nur Purwandhani<sup>1\*</sup>, Tyas Utami<sup>2</sup>, Ria Millati<sup>2</sup>, Endang Sutriswati Rahayu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Widyia Mataram Yogyakarta, nDalem Mangkubumen KT III/237, Yogyakarta 55123, Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora No. 1, Bulaksumur, Yogyakarta 55281, Indonesia

Email: [siti\\_nurp@yahoo.co.id](mailto:siti_nurp@yahoo.co.id)

Submisi: 21 Maret 2016; Penerimaan: 3 Agustus 2017

### ABSTRAK

Folat merupakan vitamin B yang berpartisipasi dalam reaksi transfer satu-karbon dalam proses metabolisme, terutama biosintesis purin dan pirimidin (DNA dan RNA). Beberapa strain bakteri asam laktat diketahui mampu memproduksi asam folat melalui konversi guanosis tri pospat dan dengan adanya prekursor *p*-amino benzoat serta asam glutamat. Pada penelitian ini, susu skim difermentasi menggunakan *Lactobacillus plantarum* Dad-13, G-3, dan H-1 untuk meningkatkan kadar asam folatnya. Fermentasi dilakukan pada 37 °C selama 18 jam. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pola pertumbuhan sel, perubahan pH, dan kadar asam folat susu selama fermentasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa selama fermentasi menggunakan *L. plantarum* Dad-13, G-3, dan H-1 jumlah sel meningkat dari 10<sup>7</sup> menjadi 10<sup>8</sup> untuk G-3 dan H-1, sedangkan Dad-13 menjadi 10<sup>9</sup>. Nilai pH mengalami penurunan dan kadar asam folat pada awal fermentasi meningkat dengan cepat tapi setelah mendekati akhir fermentasi mulai stagnan. Kadar asam folat susu skim adalah 23,70 ± 3,25 µg/L. Dibandingkan dengan kadar asam folat susu skim, peningkatan kadar folat susu fermentasi setelah 18 jam fermentasi dengan starter *L. plantarum* Dad-13, G-3, dan H-1 secara berturut-turut 32,04 ± 1,85 µg/L (135,19%), 28,21 ± 0,28 µg/L (118,99%), dan 25,13 ± 1,27 µg/L (106,03%).

**Kata kunci:** Fermentasi; asam folat; *L. plantarum*; susu skim

### ABSTRACT

Folate is a B vitamin that participates in one-carbon transfer reactions of metabolism process, particularly purine and pyrimidine biosynthesis (DNA and RNA). Some strains of lactic acid bacteria are known to produce folic acid through the conversion of guanosine tri phosphate and the presence of precursor *p*-amino benzoic acid and glutamic acid. In this study, skim milk was fermented using *Lactobacillus plantarum* Dad-13, G-3, and H-1 to increase the levels of folate. Fermentation was conducted at 37 °C for 18 hours. The aims of this study were to investigate the population of *L. plantarum* during fermentation period, the change in pH and the levels of folate in fermented milk. The results showed that during the fermentation period using *L. plantarum* G-3, H-1, and Dad-13 cell count increased from 10<sup>7</sup> to 10<sup>8</sup> for G-3 and H-1, while Dad-13 into 10<sup>9</sup>. The pH value decreased and the levels of folic acid in early fermentation increased rapidly but after approaching the end of fermentation, it began to stagnate. The folate level of skim milk was 23.70 ± 3.25 µg/L. Increased levels of folate in fermented milk after 18 hours fermentation using *L. plantarum* Dad-13, G-3, and H-1 were 32.04 ± 1.85 µg/L (135.19%), 28.21 ± 0.28 µg/L (118.99%), and 25.13 ± 1.27 µg/L (106.03%), respectively.

**Keywords:** Fermentation; folic acid; *L. plantarum*; skim milk

## PENDAHULUAN

Vitamin B9 atau folat adalah nutrisi penting yang tidak bisa diproduksi oleh mamalia, akan tetapi diproduksi oleh tanaman dan mikroorganisme (Burgess dkk., 2009). Folat berfungsi dalam metabolisme asam amino dan nukleotida di dalam sel, seperti sintesa DNA dan RNA, biosintesis gugus metil, vitamin, dan beberapa asam amino.

Folat menjadi perhatian karena perannya yang mampu mencegah resiko cacat lahir pada bayi, misalnya cacat pembuluh syaraf (*neural tube defect*/NTD) (Daly dkk., 1995). Menurut *World Health Organization* (WHO, 2001), defisiensi folat merupakan masalah kesehatan masyarakat. Rendahnya status gizi folat menyebabkan resiko terkena osteoporosis (Baines dkk., 2007), *dementia* dan Alzheimer's (Luchsinger dkk., 2007), serta menurunnya kemampuan mendengar (Durga dkk., 2007).

Angka kecukupan gizi folat yang dianjurkan per orang per hari bagi manusia dewasa adalah 200–400 µg sedangkan untuk wanita hamil memerlukan 600 µg dan ibu yang menyusui memerlukan 500 µg per hari (Iyer dan Tomar, 2009). Kebutuhan folat bisa diatasi dengan mengkonsumsi asam folat sintetis atau sayuran hijau; buah-buahan seperti jeruk/lemon, pisang, melon; kacang-kacangan, daging dan produk makanan yang difortifikasi. Selain itu, sebagai alternatif pemenuhan asam folat adalah dengan mengkonsumsi produk fermentasi bakteri asam laktat (BAL) (Forsse'n dkk., 2000). Lebih jauh LeBlanc dkk. (2011) menyatakan bahwa folat yang biasa digunakan untuk fortifikasi adalah asam folat yang merupakan bentuk sintetis dari folat, sedangkan yang secara alami berada di dalam makanan atau yang diproduksi mikroorganisme adalah semua kelompok derivat folat yang tereduksi termasuk *5-methyltetrahydro-folate* (5-MTHF) dan *polyglutamat*. Konsumsi folat natural misalnya 5-MTHF lebih efisien dan aman dibanding dengan konsumsi folat dalam bentuk asam folat sebagai suplemen (Lamers dkk., 2006). Selain itu pemanfaatan mikroorganisme yang memproduksi vitamin dalam fermentasi makanan lebih natural dan ekonomis dibanding vitamin buatan yang diproduksi secara kimia, dan akan dihasilkan makanan dengan jumlah folat dengan konsentrasi cukup yang meniadakan efek samping yang tidak diinginkan (LeBlanc dkk., 2011). Kennedy dkk. (2011), juga menyatakan bahwa *intake* folat dalam bentuk sintetis akan meningkatkan resiko terjadinya kanker kolon.

Beberapa strain bakteri asam laktat termasuk dalam golongan mikroorganisme *food-grade*, dan beberapa diantaranya mampu memproduksi folat dalam jumlah banyak. Folat dimanfaatkan oleh BAL untuk biosintesis purin, glicin, serin, histidin, metionin dan pirimidin yang berperan penting dalam proses metabolismenya (Wegkamp dkk., 2007). Produksi folat yang dihasilkan BAL tergantung

pada spesies, strain, dan kondisi inkubasinya (Lin dan Young, 2000). Pada fermentasi yogurt, keju, dan produk fermentasi yang lain, bakteri asam laktat meningkatkan asam folat, niacin, riboflavin, serta vitamin B12, dan B6 (Purwandhani, 2011 dan Le Blanc dkk., 2011).

Susu skim bukan merupakan sumber folat sehingga bisa digunakan sebagai basal medium bagi proses fermentasi dimana folat bisa disintesa, dan sebagai media untuk menentukan jumlah folat yang bisa dihasilkan oleh mikrobial. Mikrobial pensintesis folat mampu memfermentasi susu skim dan menghasilkan produk susu fermentasi yang mengandung folat. Menurut Wouters dkk. (2002), konsentrasi folat pada yogurt meningkat tiga kali lipat dibandingkan dengan susu tanpa fermentasi. Crittenden dkk. (2003), menyatakan bahwa di dalam susu skim yang difermentasi menggunakan campuran kultur (*Bifidobacterium animalis* CSCC 1941 dan *Streptococcus thermophilus* CSCC 2000) akan meningkatkan kadar folat enam kali lebih banyak.

Skrining BAL yang diisolasi dari dadih sebagai penghasil folat dilakukan dengan menginokulasikan isolat yang diisolasi dari dadih tersebut pada susu skim, dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18 jam. Hasilnya menunjukkan bahwa BAL dari dadih mampu memproduksi folat dengan kisaran 12,42 ± 3,13 µg/L – 27,84 ± 5,80 µg/L. Isolat yang menghasilkan folat tinggi adalah *Lactobacillus plantarum* G-3, memproduksi folat 27,84 ± 5,80 µg/L dan *Lactobacillus plantarum* H-1 memproduksi folat 26,29 ± 0,27 µg/L (Purwandhani dkk., 2017). Sedangkan *Lactobacillus plantarum* Dad-13 yang diisolasi dari dadih dan telah teridentifikasi sebagai probiotik menghasilkan asam folat 29,27 ± 3,91 µg/L (Purwandhani dkk., 2017; Rahayu dkk., 2015 dan Utami dkk., 2015). Penelitian tersebut baru dilakukan terbatas pada skrining jenis BAL yang diisolasi dari dadih sebagai penghasil folat pada susu skim fermentasi yang diinokulasi dengan BAL terpilih, belum mempelajari kondisi fermentasinya. Oleh sebab itu tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik susu fermentasi yang menggunakan bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* Dad-13, *Lactobacillus plantarum* G-3, dan *Lactobacillus plantarum* H-1; dalam hal populasi bakteri asam laktat, perubahan pH, dan peningkatan kadar asam folat di dalam susu fermentasi.

## METODE PENELITIAN

### Isolat Bakteri Asam Laktat

Isolat bakteri asam laktat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *L. plantarum* Dad-13 (Rahayu dkk., 2015) dan *Lactobacillus plantarum* G-3 dan H-1 (Purwandhani dkk., 2017). Seluruh isolat diisolasi dari dadih yang berasal dari Bukittinggi, Sumatra Barat. Isolat bakteri

asam laktat ini disimpan dalam pendingin dengan campuran gliserol dan susu skim (Merek Lactona) sebagai stok kultur. Apabila akan digunakan kultur dipindah dari stok kultur beku ke media MRS cair dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18–24 jam (Djafar dkk., 2013 dan Suhartatik dkk., 2014).

### Kondisi Fermentasi/Fermentasi Susu Skim

Starter untuk fermentasi susu disiapkan dengan menginokulasikan 2% (v/v) kultur bakteri asam laktat ke dalam media MRS (Oxoid) cair dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18 jam. Fermentasi susu dilakukan dengan menginokulasikan 5% (v/v) starter ke dalam 10% susu skim steril. Inokulasi starter sebesar 5% dipilih berdasar penelitian pendahuluan yaitu yang menghasilkan produk susu fermentasi (*curd*) yang paling cepat. Kemudian susu skim yang telah diinokulasi bakteri asam laktat diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 18 jam, yaitu saat *curd* terbentuk sempurna. Selama proses fermentasi, dilakukan pengamatan secara periodik pada jam ke 0, 3, 6, 9, 12, 15, dan 18. Analisa pengamatan yang dilakukan yaitu meliputi populasi bakteri asam laktat, perubahan pH, dan kadar asam folat. Data dikerjakan dengan analisis sidik ragam rancangan acak lengkap dan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil pada taraf nyata 5%. Analisis dilakukan dengan menggunakan program SAS v.9.3 dengan bantuan PROC GLM.

### Enumerasi Populasi Bakteri Asam Laktat

Populasi bakteri asam laktat selama fermentasi susu ditentukan menggunakan metoda pengenceran dilanjutkan *plating* secara *pour plate* dengan media MRS (Oxoid). Sampel diencerkan dalam beberapa seri pengenceran, kemudian diinokulasi pada media MRS agar yang ditambah 0,2% CaCO<sub>3</sub>. Inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama 18 jam; koloni dengan zona jernih yang tampak pada cawan Petri untuk setiap seri pengenceran dihitung dalam CFU/mL.

### Analisa pH dan Kadar Folat Susu Fermentasi

Nilai pH susu fermentasi selama proses fermentasi diukur menggunakan pH meter. Setiap akan mengukur pH susu fermentasi, pH meter dikalibrasi menggunakan larutan buffer standar (pH 4,0 dan 7,0). Kadar folat susu fermentasi dianalisis menggunakan Vita fast folate kit (R-Biopharm, Darmstadt, Jerman). Sebanyak 4 mL susu skim 10% steril diinokulasi dengan 200mL kultur bakteri asam laktat yang telah diinkubasi selama 18 jam, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama waktu fermentasi yang ditentukan (0, 3, 6, 9, 12, 15, dan 18 jam). Susu yang terkoagulasi/terfermentasi dianalisa kadar folatnya berdasar prosedur yang tertera pada petunjuk kit (Biopharm). Pengujian mikrobiologis terhadap kadar asam folat di dalam susu fermentasi ini dilakukan menggunakan *96-well microplate*. Strain *Lactobacillus*

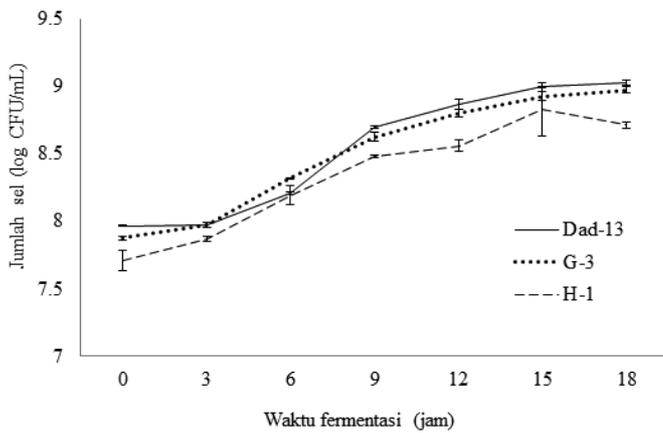
*rhamnosus* yang berada di dalam kit digunakan sebagai kontrol produksi folat. Pertumbuhan *L. rhamnosus* tergantung dari besarnya kadar folat dalam media. Inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama 44–48 jam di dalam gelap. Intensitas metabolisme atau pertumbuhan *Lactobacillus rhamnosus* berhubungan dengan kadar asam folat yang terekstrak, dan diukur sebagai kekeruhan, kemudian dibandingkan dengan kurva standar (Arcot dan Shrestha, 2005). Pengukuran kekeruhan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 630 nm (Horne dan Patterson, 1988).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Populasi Bakteri Asam Laktat Selama Fermentasi

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada awal fermentasi, jumlah sel *L. plantarum* Dad-13, G-3, dan H-1 secara berturut-turut  $9,3 \times 10^7$  CFU/mL,  $7,6 \times 10^7$  CFU/mL, dan  $5,2 \times 10^7$  CFU/mL; kemudian pada jam ke-3 jumlah sel tidak berbeda nyata yaitu secara berturut-turut  $9,4 \times 10^7$  CFU/mL,  $9,4 \times 10^7$  CFU/mL, dan  $7,5 \times 10^7$  CFU/mL (Gambar 1). Hal ini terjadi karena pada awal fermentasi masih berlangsung proses adaptasi sehingga jumlah sel belum bertambah. Pada fase ini bakteri belum mengadakan perbanyakan, tetapi baru mulai membesar karena adanya air imbibisi dan penyesuaian dalam lingkungan baru. Setelah fermentasi jam ke-6 jumlah sel *L. plantarum* Dad-13, meningkat menjadi  $1,6 \times 10^8$  CFU/ml, *L. plantarum* G-3 dan H-1 menjadi  $2,1 \times 10^8$  dan  $1,6 \times 10^8$  CFU/mL. Peningkatan jumlah sel untuk *L. plantarum* Dad-13 dan *L. plantarum* H-1 berlangsung sampai dengan jam ke-15, sedangkan *L. plantarum* G-3 sampai dengan jam ke-18 masih terjadi penambahan jumlah sel. Waktu yang diperlukan oleh bakteri untuk mencapai siklus pertumbuhan sangat bervariasi tergantung beberapa faktor, diantaranya adalah faktor nutrisi yang tersedia dan faktor genetik (Madigan dkk., 1997). Pada jam ke-15 jumlah sel *L. plantarum* Dad-13 mencapai  $1,1 \times 10^9$  CFU/mL dan pada jam ke-18 jumlahnya tidak berbeda nyata, yaitu  $1,1 \times 10^9$  CFU/mL. Jumlah sel *L. plantarum* G-3 pada jam ke-15 dan 18 yaitu  $8,5 \times 10^8$  CFU/mL dan  $9,5 \times 10^8$  CFU/mL. Jumlah sel susu fermentasi yang diinokulasi dengan *L. plantarum* H-1 pada waktu fermentasi jam ke-15 dan 18 secara statistik berbeda nyata dan mengalami penurunan jumlah sel, yaitu  $6,8 \times 10^8$  CFU/mL menjadi  $5,2 \times 10^8$  CFU/mL. Diduga pada waktu mencapai 15 jam fermentasi, *L. plantarum* Dad-13, *L. plantarum* G-3, dan *L. plantarum* H-1 telah mencapai fase pertumbuhan stasioner, bahkan *L. plantarum* H-1 sudah mendekati phase kematian.

Penelitian Lin dan Young (2000), menyatakan bahwa fermentasi susu skim menggunakan *L. bulgaricus* 448, *L. bulgaricus* 449 dan *St. thermophilus* 573; dengan suhu inkubasi 37 °C, jumlah sel awal adalah  $10^7$  CFU/mL dan



Gambar 1. Jumlah bakteri asam laktat selama fermentasi susu

setelah 18 jam menjadi  $10^8$ – $10^9$  CFU/mL. Pereira dkk., (2013) menyatakan bahwa pada fermentasi susu skim menggunakan *L. plantarum* pada suhu 37 °C selama 10 jam terjadi peningkatan jumlah sel 2 log cycle, yaitu dari populasi awal  $10^8$  CFU/mL setelah fermentasi selama 10 jam menjadi  $10^{10}$  CFU/mL. Penelitian Sanna dkk. (2005) menggunakan *L. delbrueckii* sbsp *bulgaricus* dengan suhu inkubasi 42 °C jumlah sel awal  $2,91 \times 10^6$  CFU/mL dan setelah inkubasi 8 jam terjadi pertumbuhan bakteri asam laktat sehingga jumlah sel menjadi  $5,6 \times 10^8$  CFU/mL akan tetapi setelah 24 jam menurun menjadi  $8,4 \times 10^6$  CFU/mL.

Bertambahnya jumlah sel selama fermentasi ini sesuai dengan penelitian Lin dan Young (2000), Pereira dkk. 2013, dan Sanna dkk. (2005) yang menyatakan bahwa penambahan jumlah sel pada fermentasi susu skim dengan inokulan beberapa BAL, termasuk *L. plantarum* sp terjadi sebanyak 2–3 log cycle.

## Fermentasi Susu Kim

### Total asam folat

Konsentrasi asam folat pada larutan susu skim 10% sebelum diinokulasi adalah  $23,70 \pm 3,25$  µg/L. Pada Tabel 1 terlihat bahwa kadar asam folat jam ke-0 pada masing-masing isolat yaitu *Lactobacillus plantarum* Dad-13, G-3, dan H-1 secara berturut-turut adalah  $8,68 \pm 3,31$  µg/L,  $4,39 \pm 0,07$  µg/L, dan  $2,89 \pm 0,00$  µg/L. Perbedaan ini disebabkan karena kandungan asam folat pada masing-masing starter tidak sama. Pada starter media *L. plantarum* Dad-13 yang diinkubasi selama 18 jam, jumlah asam folatnya  $102,54 \pm 3,86$  µg/L, starter *L. plantarum* G-3 mempunyai kadar asam folat  $80,93 \pm 2,28$  µg/L, dan starter *L. plantarum* H-1 kadar asam folatnya  $51,33 \pm 1,78$  µg/L.

Konsentrasi asam folat di dalam susu skim yang diinokulasi *L. plantarum* Dad-13 adalah  $32,38$  µg/L, sehingga penambahan jumlah asam folat di dalam susu skim yang

diinokulasi *L. plantarum* Dad-13 adalah  $8,68 \pm 3,31$  µg/L. Konsentrasi asam folat di dalam larutan susu skim setelah diinokulasi *L. plantarum* G-3 adalah  $28,09$  µg/L, sehingga penambahan jumlah asam folat setelah diinokulasi *L. plantarum* G-3 adalah  $4,39 \pm 0,07$  µg/L. Produksi asam folat di dalam larutan susu skim setelah diinokulasi *L. plantarum* H-1 adalah  $26,59$  µg/L, sehingga jumlah asam folat pada awal fermentasi di dalam susu skim yang diinokulasi *L. plantarum* H-1 adalah  $2,89 \pm 0,00$  µg/L.

Tabel 1 menunjukkan bahwa kadar asam folat pada susu fermentasi yang diinokulasi *L. plantarum* Dad-13 pada jam ke-0 adalah  $8,68 \pm 3,31$  µg/L dan pada jam ke-3 adalah  $14,04 \pm 4,1$  µg/L. Berdasar analisa statistik kadar asam folat pada waktu fermentasi yang berbeda tersebut berbeda nyata secara signifikan pada taraf signifikansi sebesar 5%. Demikian pula pola produksi asam folat *L. plantarum* G-3, pada fermentasi awal yaitu pada jam ke-0 jumlahnya  $4,39 \pm 0,07$  µg/L menjadi  $9,00 \pm 1,17$  µg/L pada jam ke-3, berbeda nyata secara signifikan, atau sudah terjadi peningkatan jumlah asam folat. Berbeda dengan *L. plantarum* H-1, pada jam ke-0 jumlahnya  $2,89 \pm 0,00$  µg/L dan pada jam ke-3 jumlah asam folatnya tidak berbeda nyata, yaitu sebesar  $3,16 \pm 3,23$  µg/L. Pada *L. plantarum* H-1 ini diawal fermentasi belum terjadi peningkatan biosintesa asam folat secara nyata sehingga belum terjadi sintesa DNA maupun RNA yang berakibat belum terjadi pembelahan sel sehingga jumlah sel yang terlihat pada Gambar 1 meskipun meningkat akan tetapi tidak berbeda nyata, diduga pada saat ini sel masih berada pada fase adaptasi.

Pada tahap fermentasi selanjutnya terjadi peningkatan kadar asam folat secara nyata, baik susu yang difermentasi dengan *L. plantarum* Dad-13, G-3 maupun H-1. Kadar asam folat susu fermentasi dengan inokulan *L. plantarum* Dad-13, pada jam ke-6, 9, dan 12 adalah  $13,2 \pm 3,44$  µg/L,  $18,95 \pm 0,83$  µg/L, dan  $29,38 \pm 5,52$  µg/L. Demikian juga susu fermentasi dengan inokulan *L. plantarum* G-3, dengan jumlah asam folat pada jam ke 6, 9, dan 12 adalah  $12,67 \pm 0,00$  µg/L,  $16,08 \pm 0,08$  µg/L, dan  $21,46 \pm 0,98$  µg/L. Peningkatan kadar asam folat susu fermentasi dengan inokulan *L. plantarum* H-1, pada jam ke 6, 9, dan 12 adalah  $10,98 \pm 3,19$  µg/L,  $14,95 \pm 3,80$  µg/L, dan  $19,29 \pm 0,45$  µg/L.

Pada fermentasi jam ke 15 dan 18 jam, kadar asam folat susu yang difermentasi menggunakan *L. plantarum* Dad-13 adalah  $31,33 \pm 5,20$  µg/L dan  $32,04 \pm 1,85$  µg/L; *L. plantarum* H-1  $24,9 \pm 1,35$  µg/L dan  $25,13 \pm 1,27$  µg/L; tidak berbeda nyata antara jumlah asam folat waktu fermentasi 15 dan 18 jam (Tabel 1). Hal ini menandakan bahwa produksi asam folat tidak terjadi lagi. Sedangkan jumlah asam folat susu yang difermentasi menggunakan *L. plantarum* G-3 pada 15 dan 18 jam fermentasi masih meningkat secara signifikan, yaitu dari  $25,45 \pm 2,04$  µg/L menjadi  $28,21 \pm 0,28$  µg/L.

Selama proses fermentasi susu, asam folat diproduksi dalam jumlah berbeda oleh strain bakteri asam laktat yang tidak sama; tergantung suhu, waktu inkubasi, pH, media dan lain-lain. Susu skim difermentasi menggunakan 2% *L. bulgaricus* 448 dengan media susu skim pada suhu 37 °C selama 6 jam meningkatkan kadar asam folat dari 22,8 ± 1,4 µg/L menjadi 62,8 ± 2,1 µg/L, atau meningkat 175%. Sedangkan *St. thermophilus* 573 meningkatkan kadar asam folat dari 22,8 ± 1,5 µg/L menjadi 46,7 ± 5,0 µg/L, atau meningkat 104% (Lin dan Young, 2000). Penelitian Dana dkk. 2010, menyatakan bahwa *L. plantarum* IL 127 yang diisolasi dari susu fermentasi tradisional di Iran mampu memproduksi asam folat 12,8 µg/L.

Biosintesis folat memerlukan prekursor GTP (guanosin tri fosfat), *p*-ABA (*p*-amino benzoat) dan asam glutamat. *L. plantarum* mempunyai gen dan enzim yang berperan mensintesis folat. DHPPP (6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyropospat) disintesis dari GTP oleh gen dan enzim *folB* 4.1.2.25, *folQ* 3.6.1, *folQ* 3.1.3.1. serta *folE* 3.5.4.16. Gen dan enzim *aroC* 4.2.3.5, *aroA* 2.5.1.19, *aroK* 2.7.1.71, *aroE* 1.1.1.25, *aroD* 4.2.1.10, *aroB* 4.2.3.4 dan *aroF* 2.1.54 mensintesis chorismate membentuk pABA. DHPPP, pABA dan asam glutamat dari media disintesis menjadi THF (tetrahydrofolat)-polyglutamat (folat) oleh gen dan enzim *dfra* 1.5.1.3, *folC* 6.3.2.12/17 dan *folP* 2.5.1.15 (Rossi dkk., 2011).

*Lactococcus lactis* ssp *cremoris* memfermentasi susu pada suhu 37 °C dan meningkatkan kadar asam folat yang sebelum fermentasi 2,5 µg/L menjadi 17,2 µg/L setelah 8 jam fermentasi. Akan tetapi setelah 12 jam kadar folatnya menjadi 11 µg/L dan terus menurun menjadi 2 µg/L setelah 18 jam fermentasi. Produksi asam folat *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* terjadi sejak awal fermentasi sampai dengan

jam ke 8, kemudian semakin lama fermentasi kadar asam folatnya menurun. Penurunan kadar folat ini bersamaan dengan meningkatnya pertumbuhan sel yang memerlukan folat untuk mensintesa pasangan basa nukleotida DNA dan RNA sehingga mengurangi kadar folat yang digunakan untuk pembelahan sel tersebut (Gangadharan dan Nampoothiri, 2011).

Berdasar data pada Gambar 1 dan Tabel 1, produksi asam folat *L. plantarum* Dad-13 terjadi sejak phase adaptasi di awal fermentasi sampai dengan akhir phase logaritmik atau mendekati phase stationer, yaitu jam ke-12. Produksi asam folat *L. plantarum* G-3 terjadi sejak awal fermentasi yaitu jam ke-0 sampai dengan fermentasi jam ke 18. Sedangkan pada *L. plantarum* H-1 produksi asam folat terjadi pada phase pertumbuhan logaritmik sampai dengan fermentasi jam ke-15.

Selama fermentasi, beberapa bakteri asam laktat, termasuk *L. plantarum* memproduksi asam folat sehingga kadar asam folat di dalam susu meningkat (Rossi dkk., 2011). Pada fermentasi pada jam ke 18, asam folat dalam susu fermentasi yang diinokulasi menggunakan *L. plantarum* Dad-13 adalah 32,04 ± 1,85 µg/L, kadarnya lebih tinggi 135,19% dibandingkan dengan susu skim yang tidak difermentasi. Asam folat dalam susu fermentasi yang dihasilkan *L. plantarum* G-3 menghasilkan folat 28,21 ± 0,28 µg/L, kadar folat susu fermentasi lebih tinggi sebesar 118,99% dibandingkan dengan susu skim yang tidak difermentasi. Susu fermentasi 18 jam yang menggunakan *L. plantarum* H-1 menghasilkan folat 25,13 ± 1,27 µg/L, lebih tinggi kadar asam folatnya sebesar 106,03% dibandingkan folat susu skim yang tidak difermentasi.

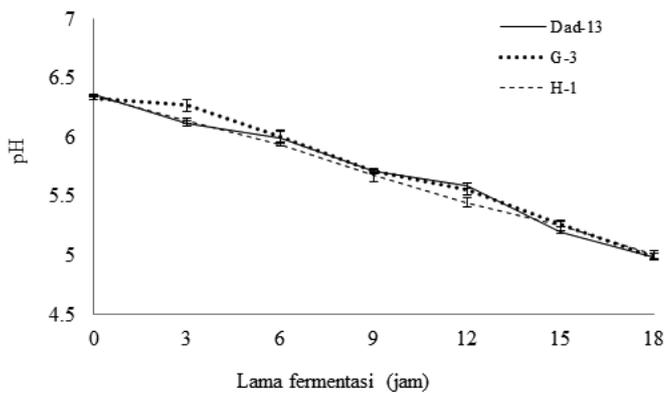
**Nilai pH**

Hasil penelitian menunjukkan bahwa selama periode fermentasi susu skim menggunakan bakteri asam laktat terjadi penurunan nilai pH. Berdasar hasil penelitian, nilai pH larutan susu skim 10% adalah mendekati netral yaitu 6,83; setelah difermentasi dengan *L. plantarum* Dad-13, *L. plantarum* G-3, dan *L. plantarum* H-1 pada awalnya secara berturut-turut nilai pHnya adalah 6,36 ± 0,01; 6,33 ± 0,01; dan 6,35 ± 0,01; dan pada jam ke 3 fermentasi menurun secara berturut-turut menjadi 6,12 ± 0,02; 6,27 ± 0,05; dan 6,14 ± 0,02 (Gambar 2). Selama fermentasi menggunakan *L. plantarum* Dad-13, *L. plantarum* H-1, dan *L. plantarum* G-3 terjadi penurunan pH pada setiap tahap fermentasi. Penurunan pH dari fermentasi 15 jam ke fermentasi 18 jam menggunakan *L. plantarum* Dad-13 adalah dari 5,20 ± 0,01 menjadi 4,99 ± 0,03; *L. plantarum* G-3 dari pH 5,27 ± 0,03 menjadi 4,99 ± 0,03, dan *L. plantarum* H-1 dari 5,25 ± 0,04, menjadi 5,01 ± 0,04. Perbedaan ini disebabkan karena kondisi proses metabolisme masing-masing strain bakteri asam laktat tidak sama.

Tabel 1. Perubahan kadar asam folat susu fermentasi pada berbagai waktu fermentasi dengan inokulan *Lactobacillus plantarum* Dad-13, G-3, dan H-1.

Waktu fermentasi	Produksi asam folat pada <i>Lactobacillus plantarum</i> (µg/L)		
	Dad-13	G-3	H-1
0 jam	8,68 ± 3,31 <sup>c</sup>	4,39 ± 0,07 <sup>g</sup>	2,89 ± 0,00 <sup>d</sup>
3 jam	14,04 ± 4,11 <sup>bc</sup>	9,00 ± 1,17 <sup>f</sup>	3,16 ± 3,23 <sup>d</sup>
6 jam	13,2 ± 3,44 <sup>bc</sup>	12,67 ± 0,00 <sup>e</sup>	10,94 ± 3,19 <sup>c</sup>
9 jam	18,95 ± 0,83 <sup>b</sup>	16,08 ± 0,08 <sup>d</sup>	14,95 ± 3,8 <sup>bc</sup>
12 jam	29,38 ± 5,52 <sup>a</sup>	21,46 ± 0,98 <sup>c</sup>	19,29 ± 0,45 <sup>b</sup>
15 jam	31,33 ± 5,20 <sup>a</sup>	25,45 ± 2,04 <sup>b</sup>	24,9 ± 1,35 <sup>a</sup>
18 jam	32,04 ± 1,85 <sup>a</sup>	28,21 ± 0,28 <sup>a</sup>	25,13 ± 1,27 <sup>a</sup>

Keterangan: angka rerata yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya beda nyata berdasarkan uji lanjut beda nyata terkecil pada taraf nyata 5%



Gambar 2. Perubahan nilai pH susu selama fermentasi

Selama pertumbuhannya di dalam proses fermentasi, BAL akan menggunakan sumber gula (laktosa) dan menghidrolisisnya. Hasil metabolisme gula laktosa oleh BAL berupa energi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel. BAL juga menghasilkan asam organik terutama asam laktat sehingga dengan meningkatnya populasi bakteri asam laktat selama fermentasi dari jam ke-0 sampai dengan jam ke-18, dapat menyebabkan terjadinya akumulasi asam laktat. Akumulasi asam laktat ini menyebabkan peningkatan keasaman yang mengakibatkan penurunan pH selama fermentasi.

Sybesma dkk. (2003), menyatakan bahwa asam folat yang diproduksi sel BAL bervariasi antara strain yang satu dengan strain yang lain. *Streptococcus thermophilus* B119 yang ditumbuhkan pada media dengan pH 5,5 retensi sitoplasmiknya terhadap folat rendah (45%) sehingga mengakibatkan kenaikan sekresi asam folat ke media. Pada pH tinggi (6–6,5) kebanyakan folat tertahan di dalam sel dan meningkatkan pertumbuhan sel. Pada penelitian ini terjadi peningkatan pertumbuhan sel pada awal fermentasi saat pH media tinggi (5,68–6,36), diduga asam folat berada di dalam sel dan dimanfaatkan oleh sel untuk sintesa DNA dan RNA untuk memperbanyak jumlah sel. Kemudian semakin lama fermentasi pH semakin menurun dan diduga asam folat yang jumlahnya semakin sedikit disekresikan keluar dan mengakibatkan pertumbuhan sel berkurang dan mencapai phase stationer.

## KESIMPULAN

Peningkatan jumlah bakteri asam laktat di dalam susu fermentasi yang difermentasi selama 18 jam menggunakan *Lactobacillus plantarum* Dad-13, G-3, dan H-1 secara berturut-turut adalah  $1,0 \times 10^9$  CFU/mL,  $9,5 \times 10^8$  CFU/mL; dan  $5,2 \times 10^8$  CFU/mL. Sedangkan nilai pHnya secara berurutan 4,99, 4,99, dan 5,01. *L. plantarum* Dad-13, G-3,

dan H-1 mampu mensintesa folat sejak awal pertumbuhan sampai dengan phase pertumbuhan logaritmik akhir, dan berpotensi meningkatkan kadar asam folat susu fermentasi. Dalam media susu skim, *L. plantarum* Dad-13, G-3, dan H-1 kadar asam folatnya secara berturut-turut sebesar  $32,04 \pm 1,85$  µg/L,  $28,21 \pm 0,28$  µg/L, dan  $25,13 \pm 1,27$  µg/L. Kadar asam folat susu skim adalah  $23,70 \pm 3,25$  µg/L. Dengan demikian, potensi bertambahnya kadar folat pada susu skim setelah difermentasi menggunakan *Lactobacillus plantarum* Dad-13, G-3, dan H-1 berturut-turut sebesar 135,19%, 118,99%, dan 106,03%.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arcot, J. dan Shrestha, A. (2005). Folate: methods of analysis. *Trends in Food Science and Technology* **16**: 253–266.
- Baines, M., Kredan, M.B., Usher, J., Davison, A., Higgins, G., Taylor, W., West, C., Fraser, W.D. dan Ranganath, L.R. (2007). The association of homocysteine and its determinants MTHFR genotype, folate, vitamin B12 and vitamin B6 with bone mineral density in postmenopausal British women. *Bone* **40**: 730–736.
- Burgess, C.M., Smid, E.J. dan van Sinderen, D. (2009). Bacterial vitamin B2, B11 and B12 overproduction: an overview. *International Journal of Food Microbiology* **133**: 1–7.
- Crittenden R.G., Martinez, N.R. dan Playne, M.J. (2003). Synthesis dan utilisation of folate by yoghurt starter cultures dan probiotic bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **80**: 217–222.
- Daly, L.E., Kirke, P.N., Molloy, A., Weir, D.G. dan Scott, J.M. (1995). Folate levels and neural tube defects. *Journal of the American Medical Association* **247**: 1698–1702.
- Djafaar, T.F., Cahyanto, M.N., Santoso, U. dan Rahayu, E.S. (2013). Growth of indigenous lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum-pentosus* T4 dan *L. plantarum-pentosus* T35 in kerandang (*Canavalia virosa*) milk and changes of raffinose. *Malaysian Journal of Microbiology* **9**(3): 213–218.
- Durga, J., Verhoef, P., Anteunis, L.J.C., Schouten, E. dan Kok, F.J. (2007). Effects of folic acid supplementation on hearing in older adults. *Annals of Internal Medicine* **146**: 1–9.
- Forsse'n, K.M., Ja'gerstad, M.I., Wigertz, K. dan Wittho'ft, C.M. (2000). Foliates and dairy products: A critical update. *Journal of the American College of Nutrition* **19**(2): 100S–110S.

- Gangadharan, D. dan Nampoothiri, K.M. (2011). Folate production using *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* with implications for fortification of skim milk and fruit juices. *LWT - Food Science dan Technology* **44**: 1859–1864.
- Horne, D.W. dan Patterson, D. (1988). *Lactobacillus casei* microbiological assay of folic acid derivatives in 96-well microtiter plates. *Clinical Chemistry* **34**: 2357–2359.
- Hugenschmidt, S., Schwenninger, S.M., Gnehm, N. dan Lacroix, C. (2010). Screening of natural biodiversity of lactic and propionic acid bacteria for folate and vitamin B12 production in supplemented whey permeate. *International Dairy Journal* **20**: 852–857.
- Iyer, R. dan Tomar, S.K. (2009). Folate: A functional food constituent. *Journal of Food Science*. **74**: R114–R122.
- Kennedy, D.A., Stern, S.J., Matok, I., Moretti, M.E., Sarkar, M., Adams-Webber, T. dan Koren, G. (2011). Folate intake, MTHFR polymorphisms, and the risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiology* **35**: 2–10.
- Lamers Y., Prinz-Langenohl, R., Braamswig, S. dan Pietrzik, K. (2006). Red blood cell folate concentrations increase more after supplementation with [6S]-5-methyltetrahydrofolate than with folic acid in women of childbearing age. *American Journal of Clinical Nutrition* **84**: 156–61.
- LeBlanc, J.G., Laino, J.E., del Valle, M. J., Vannini, V., van Sinderen, D., Taranto, M.P., de Valdez, G. F., de Giori, G. S. dan Sesma, F. (2011). B-Group vitamin production by lactic acid bacteria – current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology* **111**: 1297–1309.
- Lin, M.Y. dan Young, C.M. (2000). Folate level in culture of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* **10**: 409–413.
- Luchsinger, J.A., Tang, M.X., Miller, J., Green, R. dan Mayeux, A.R. (2007). Relation of higher folate intake to lower risk of alzheimer disease in the elderly. *American Medical Association* **64**: 86–92.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., dan Parker, J. (1984). *Biology of Microorganism*. Prentice Hall, International, Inc. London.
- Pereira, A.H., Costa, G.A.N., Miglioranza, L., Furlaneto-Maia, L. dan Flavia, O.A. (2013). Microbiological, physical, chemical and sensory characteristics of milk fermented with *Lactobacillus plantarum*. *Acta Scientiarum. Health Sciences. Maringa* **35(1)**: 125–131
- Purwandhani, S.N. (2016). Biosintesa folat oleh bakteri asam laktat. *Agrotech* **1(1)**: 11–18.
- Purwandhani, S.N., Millati, R., Utami, T. dan Rahayu, E.S. (2017). Isolation, characterization and screening of folat-producing bacteria from traditional fermented food (dadih). *International Food Research Journal* (Accepted, 25 Januari 2017).
- Rahayu, E.S., Yogeswara, A., Mariyatun, Windiarti, L., Utami, T. dan Watanabe, K. (2015). Molecular characteristics of indigenous probiotic strains from Indonesia. *International Journal of Probiotic dan Prebiotic* **10(4)**: 109–116.
- Rossi, M., Amaretti, A. dan Raimondi, S. (2011). Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients* **3**: 118–134.
- Sanna, M.G., Mangia, N.P., Garau, G., Murgia, M.A., Massa, T., Franco, A. dan Deiana, P. (2005). Selection of folate-producing lactic acid bacteria for improving fermented goat milk. *Italia Journal Food Science* **2(17)**: 143–154.
- Suhartatik, N., Cahyanto, M.N. dan Rahayu, E.S. (2014). Isolation and identification of lactic acid bacteria producing  $\beta$ -glukosidase from Indonesian fermented food. *International Food Research Journal* **21(3)**: 973–978.
- Sybesma, W., Starrenburg, M., Tijsseling, L., Hoefnagel, M.H.N. dan Hugenholtz, J. (2003). Effects of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **69(8)**: 4542–4548.
- Utami, T., Cahyanto, M.N., Juffrie, M. dan Rahayu, E.S. (2015). Recovery of *Lactobacillus casei* strain Shirota (LCS) from the intestine of healthy Indonesian volunteers after intake of fermented milk dan its impact on the *Enterobacteriaceae* faecal microbiota. *International Journal of Probiotics dan Prebiotics* **10(2/3)**: 77–84.
- Wegkamp, A., Oorschot, W.V., De Vos, W.M. dan Smid, E.J. (2007). Characterization of the role of *para*-aminobenzoic acid biosynthesis in folate production by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* **73(8)**: 2673–2681.
- Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J. dan Smit, G. (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal* **12(2-3)**: 91–109.