

3. REVIEW

3.1. Strain Bakteri Asam Laktat (BAL)

Jenis bakteri asam laktat yang banyak digunakan di industri pangan adalah *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* dan *Pediococcus*. Di bidang olahan makanan, bakteri asam laktat berperan sebagai biopreservatif untuk produksi bakteriosin, mencegah pertumbuhan mikroorganisme yang merusak bahan olahan. Beberapa produk pengawet organik yang menggunakan bakteri asam laktat mengandung bahan fermentasi seperti *vegetable juice*, susu, dan minuman probiotik lainnya. Berdasarkan kandungannya bakteri asam laktat dapat dibedakan menjadi dua kelompok yaitu *single* dan *multi strain*.

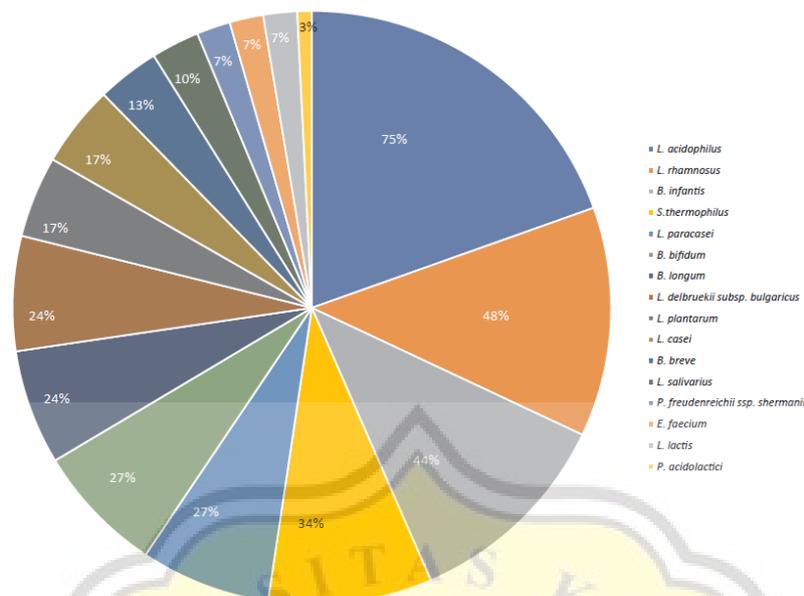
3.1.1. Single Strain Bakteri Asam Laktat (BAL)

Probiotik *single strain* merupakan bakteri probiotik yang terdiri dari satu *strain* bakteri yang memiliki efektivitas terhadap bakteri patogen tertentu (Widianingsih, 2018). *Single strain* biasanya memiliki kandungan *imunoglobulin* dan fagositosis yang tinggi (Chapman *et al.*, 2011). Sebagian besar penelitian tentang probiotik menggunakan *single strain* paling banyak digunakan ke dalam yoghurt yang mengandung *Streptococcus* subspecies *thermophilus* dan *Lactobacillus delbrueckii Bulgaricus* (Chapman *et al.*, 2011). Salah satu contoh lain penggunaan *strain* tunggal bakteri asam laktat yaitu *Lactobacillus Rhamnosus Strain GG*, bakteri ini memiliki sifat potensi probiotik seperti resisten terhadap lambung dan memiliki sifat antimikroba (Vidhyasagar & Jeevaratnam, 2013). Namun, ketika mempertimbangkan berkaitan suplemen makanan, probiotik sering diformulasikan sebagai produk dengan *multi strain*, sedangkan kelangsungan hidup dan keefektifitasannya diselidiki sebagai *single strain* (Forssten & Ouwehand, 2017) . Probiotik *strain* tunggal memiliki efektivitas yang telah dibuktikan dari beberapa penelitian pada mikrobioma usus kompleks dan mengandung > 400 spesies, penggunaan beberapa *strain* mungkin lebih bermanfaat untuk mengembalikan microbiome setelah dysbiosis terjadi (McFarland, 2021).

3.1.2. Multi Strain Bakteri Asam Laktat (BAL)

Probiotik *multi strain* merupakan bakteri probiotik yang terdiri dari dua atau lebih bakteri asam laktat yang dikombinasi dan dapat bekerja secara bersinergi dalam menghambat bakteri patogen dalam tubuh (Widianingsih, 2018). Produk *multi strain* bakteri dibuat berdasarkan sinergi yang seharusnya melihat dari efek *strain* yang disertakan namun terkadang efek ini sering tidak dievaluasi pada manusia menggunakan metode RCT (*Random Controlled Trial*) bahwa menghilangkan *strain* yang berbeda juga bisa menunjukkan efek yang buruk (Laterza *et al.*, 2018). Di luar efek sinergis secara teoritis diantara *strain* yang berbeda, produk *multi strain* biasanya mengandung konsentrasi total yang lebih tinggi dari bakteri asam laktat yang terdiri atas *mono* atau biasa disebut *single strain* dengan kemungkinan dosis yang lebih tinggi akan mempengaruhi (Laterza *et al.*, 2018)).

Peningkatan efektivitas probiotik *multistrain* terhadap patogen disebabkan oleh lebih banyak varietas kapasitas antimikroba yang terkait dengan persiapan campuran, seperti produksi asam organik lemah, bakteriosin, hidrogen peroksida, molekul koagregasi dan/atau biosurfaktan, dan stimulasi produksi sIgA dan sekresi mukus oleh inang (Arqués *et al.*, 2015). Keuntungan dari campuran *multi strain* pada *strain* yaitu peningkatan adhesi dan peningkatan penghambatan patogen (Lynne V. McFarland, 2021). Sedangkan kerugian dari *multi strain* dapat mengurangi keefektifitasan karena adanya penghambatan intra *strain* oleh *strain* probiotik yang berbeda (Lynne V. McFarland, 2021). Berbeda *strain* memiliki mekanisme aksi yang berbeda dan memiliki cakupan yang lebih luas. Dalam beberapa penelitian, perbandingan tidak sepenuhnya valid karena dalam setiap studi dosis probiotik *multi-strain* berbeda dari *strain* tunggal. Untuk menilai efektivitas probiotik *multi strain*, penelitian diperlukan dengan menggunakan dosis yang identik (Chapman *et al.*, 2012).



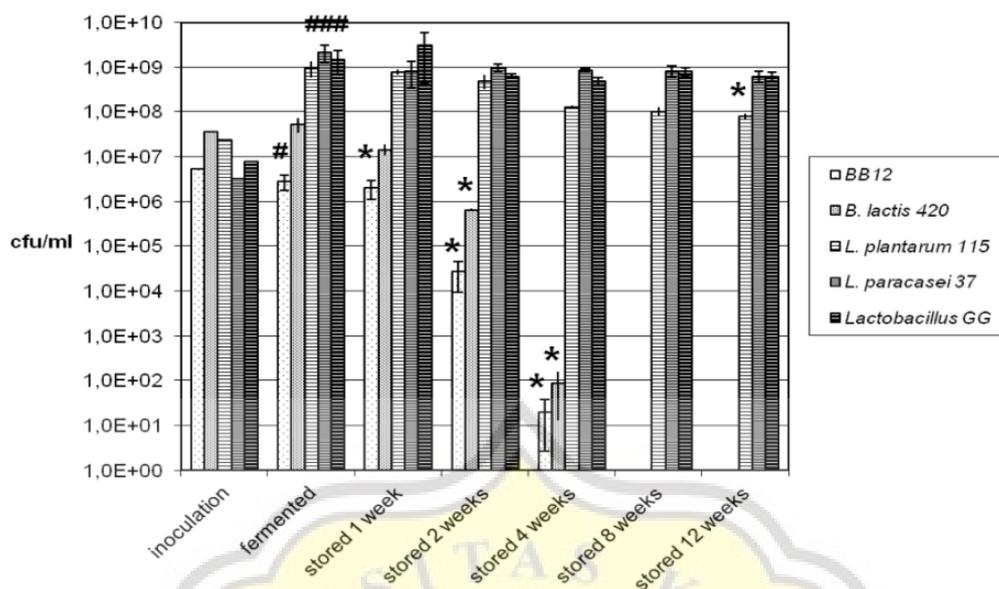
Gambar 4. Komposisi Multi *Strain* Probiotik (Laterza et al., 2018)

Gambar 4 di atas mendeskripsikan bahwa 29 produk *multistrain* yang termasuk dalam ulasan ini memiliki spesies probiotik yang sama. Angka tersebut menunjukkan representasi dari setiap spesies probiotik dalam produk *multistrain* yang dipertimbangkan dalam tinjauan ini dinyatakan sebagai persentase (100% adalah semua 29 produk *multistrain* yang dipertimbangkan). *L. acidophilus* *L. rhamnosus* adalah spesies yang paling terwakili dan *B. infantis* (baru-baru ini diklasifikasikan sebagai *B. animalis subspecies lactis*) dan *B. longum* (baru-baru ini direklasifikasi sebagai *B. animalis subspecies lactis*) dipertimbangkan secara terpisah

3.2. Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat

3.2.1 Jenis Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat yang banyak digunakan dan dikomersialkan sebagai probiotik adalah jenis *strain Bifidobacterium* dan *Lactobacillus*. Kedua bakteri ini merupakan bakteri yang paling banyak dimanfaatkan kegunaannya pada proses fermentasi.

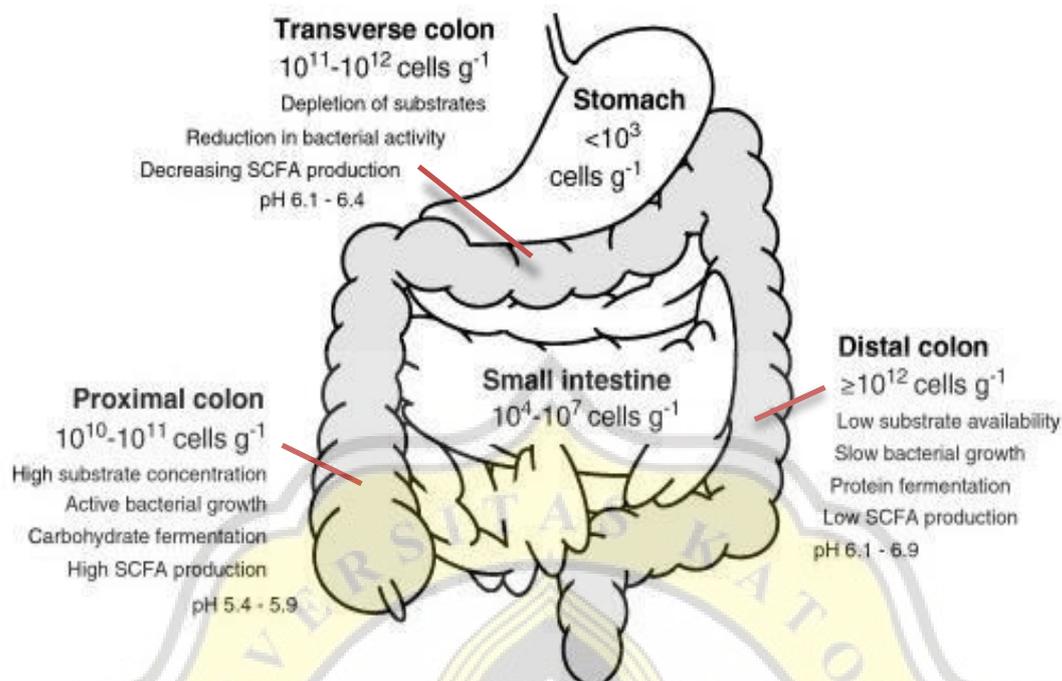


Gambar 5. Pengaruh penambahan jus wortel pada *strain* yang berbeda
(Sumber : Tamminen, 2013)

Berdasarkan Gambar 5. Penggunaan jus wortel dengan dosis yang sama yaitu Jus wortel segar disaring melalui penyaringan, dipasteurisasi 30 detik dalam penangas air dalam botol kaca (500 ml) pada 72 °C dan disentrifugasi (16000 g, 5 menit) dengan *strain* yang berbeda memberikan perbedaan pertumbuhan pada masing – masing BAL. Berdasarkan pada gambar 5, *strain* BAL yang paling menunjukkan pertumbuhan populasi paling signifikan adalah *Lactobacillus Rhamnosus GG* (Tamminen, 2013).

3.2.2 Dosis Komponen atau Substrat

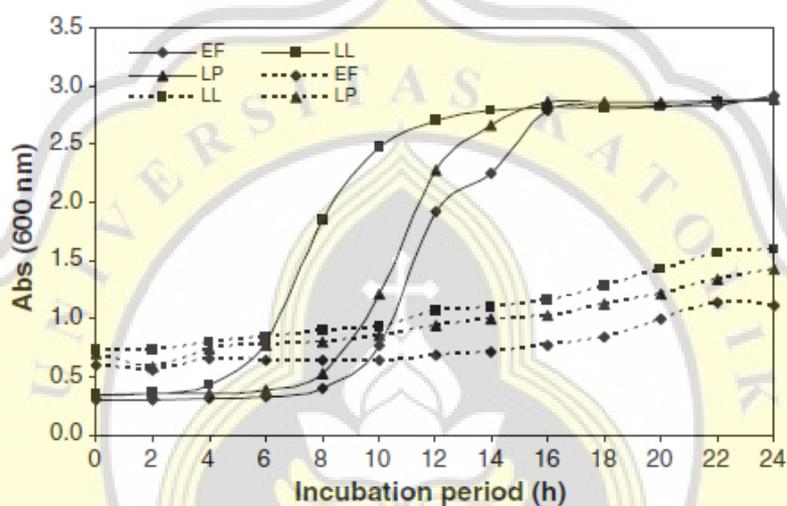
Dosis komponen atau substrat yang masuk ke saluran pencernaan merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi jumlah mikrobiota usus seperti BAL. Secara umum, fermentasi glikolitik yang biasa terjadi di kolon proksimal memproses karbohidrat daripada protein (Gambar 6). Fermentasi proteolitik, umumnya dilakukan di usus besar bagian distal, menghasilkan asam lemak rantai cabang dan berbagai metabolit seperti amonia, indol, dan fenol yang dihasilkan dari karboksilasi asam. Oleh karena itu, makanan dan substrat tertentu yang masuk ke saluran cerna manusia dapat menyebabkan perubahan komposisi flora usus.



Gambar 6. Proses Fermentasi terhadap Karbohidrat dan Protein di Usus Besar
(Sumber : Payne *et al.*, 2012)

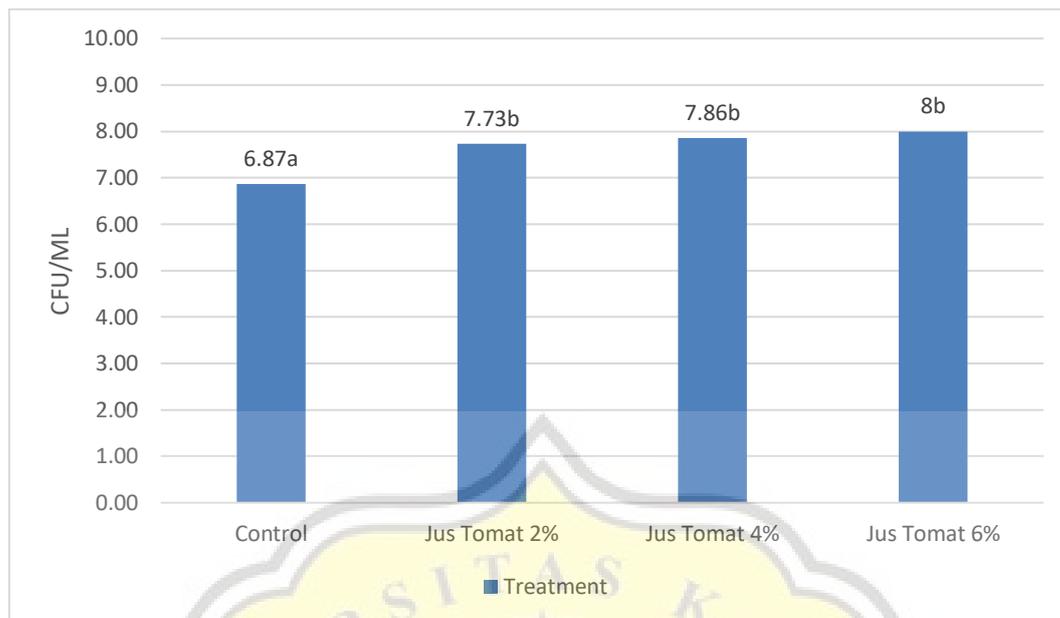
Asupan makanan berbasis hewani akan mengurangi populasi mikroba yang toleran terhadap empedu seperti *Alistipes*, *Bilophila*, *Bacteroides*, dan kelompok mikroba Firmicutes yang mampu melakukan metabolisme sebagai aktivitas polisakarida (Vernocchi *et al.*, 2020). Asupan makanan dengan kandungan lemak yang tinggi akan memicu terjadinya dysbiosis yang merupakan translokasi metabolit pada tubuh manusia dan meningkatkan populasi mikrobiota. Asupan makanan yang berbasis tumbuhan (*plant based food*) akan berdampak pada stabilitas ekosistem mikrobiota usus, dan kemudian meningkatkan kesehatan tubuh. Karbohidrat dan fruktosa yang dapat dicerna oleh tubuh dapat menurunkan populasi bakteri patogen seperti *Clostridium* dan *Bacteroides*. Karbohidrat yang tidak dicerna oleh tubuh dapat meningkatkan mikroflora yang bermanfaat bagi tubuh diantaranya *bifidobacteria*, *lactobacilli*, *ruminansia*, *rosburia*, dan *eubacteria*. Peningkatan populasi bakteri menguntungkan seperti *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* memiliki efek kesehatan yang positif seperti anti-inflamasi, anti-patogen dan *cardiovascular-protect*.

Bahan makanan berbentuk substrat yang masuk ke dalam tubuh manusia mempengaruhi komposisi populasi mikroba yang ikut masuk ke saluran pencernaan manusia. Lemak dapat dibedakan menjadi lemak jenuh dan lemak tidak jenuh (Kawaroe *et al.*, 2019). Diet tinggi lemak jenuh cenderung mengurangi jumlah BAL, sedangkan diet tinggi lemak tak jenuh cenderung meningkatkan jumlah BAL seperti *Lactobacillus* dan *Streptococcus*. Selain itu, diet yang mengandung berbagai gula alami seperti glukosa, sukrosa, fruktosa, dan laktosa dapat meningkatkan populasi *bifidobacteria* dan menurunkan populasi *Bacteroides* dalam suatu periode inkubasi (Gambar 7).



Gambar 7. Kurva Pertumbuhan BAL dalam Substrat MRS Broth dan Jus Tomat
(Sumber : Pianpumepong & Noomhorm, 2010)

Berdasarkan Gambar 7, substrat yang berbeda memiliki efek yang berbeda pada stimulasi pertumbuhan BAL. Populasi bakteri yang dikultur dalam kaldu MRS (diwakili oleh garis lurus) lebih besar daripada yang dikultur dalam jus tomat (diwakili oleh garis putus-putus). Kurva pertumbuhan antara strain *E. faecium* (EF), *L. lactis* (LL), dan *L. plantarum* (LP) menunjukkan pola yang serupa..



Gambar 8. Pengaruh Dosis Penambahan Jus Tomat yang Berbeda pada BAL (Sumber : Savitry & Setiani, 2017)

Berdasarkan Savitry & Setiani (2017) pada gambar 8, penambahan komposisi jus buah tomat yang berbeda menunjukkan efek pertumbuhan yang berbanding lurus pada campuran *strain S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, dan *L. acidophilus*. Meningkatnya penambahan substrat tertentu pada populasi BAL disebabkan karena kondisi lingkungan substrat yang cocok untuk pertumbuhan BAL.

3.2.3. Interaksi Substrat dengan Bakteri Asam Laktat (BAL)

Bakteri asam laktat adalah mikroorganisme alami yang ditemukan di berbagai substrat. Terdapat proses interaksi antara substrat dengan berbagai flora usus, khususnya BAL di pencernaan manusia. Interaksi optimal antara spesies BAL dan komponen substrat diperlukan untuk stimulasi pertumbuhan BAL yang optimal dan proses pencernaan. Prebiotik yang paling umum digunakan adalah substrat karbohidrat (misalnya, serat makanan) dengan kemampuan untuk mempromosikan komponen usus normal mikroflora yang dapat memberikan manfaat kesehatan bagi inangnya. Kelompok substrat ini melibatkan komponen tertentu yang resisten terhadap pencernaan oleh hidrolisis enzim dan yang tidak dapat diserap di bagian atas saluran cerna termasuk usus halus.

Inulin adalah campuran dari rantai fruktan yang ditemukan tersebar luas pada tanaman sebagai karbohidrat terdiri lebih dari 36.000 spesies tanaman salah satunya adalah jenis sayuran. Secara kimiawi, inulin adalah fruktan polidispersi β -(2,1). Unit fruktosa dalam campuran polimer fruktosa linier dan oligomer masing-masing adalah dihubungkan oleh ikatan β -(2,1). Sebuah molekul glukosa biasanya berada di ujung setiap rantai fruktosa dan dihubungkan oleh α -(1, 2) ikatan, mirip dengan sukrosa. Inulin dan oligofruktosa memiliki struktur kimia tertentu yang pencernaan kita enzim tidak dapat menghidrolisis. Kedua zat tersebut dimetabolisme sebagai serat makanan dalam tubuh kita inulin dan oligofruktosa termasuk dalam kelompok karbohidrat dikenal sebagai oligosakarida yang tidak dapat dicerna. hubungan sinergis antara bakteri menguntungkan dan substrat selektif mereka untuk merangsang pertumbuhan mereka ketika mereka bertahan hidup melewati perut ke usus besar untuk membangun dominasi mereka. Inulin dan fruktooligosakarida memiliki efek stimulasi karena kemampuannya untuk difermentasi

Interaksi antara komponen substrat dan mikroorganisme tertentu dapat menunjukkan sifat bioaktif yang berbeda. Misalnya, kombinasi inulin dan *L. Acidophilus*, yang mengatur respon inflamasi dalam tubuh. Hal ini memiliki kemampuan khusus dalam fermentasi komponen seperti inulin dengan *Lactobacillus*. Inulin juga dapat memperbaiki kondisi dysbiosis yang terjadi pada saluran pencernaan dengan meningkatkan jumlah bakteri menguntungkan dan mengurangi jumlah bakteri berbahaya. Dengan cara menggunakan inulin, produksi LPS oleh patogen penyebab inflamasi dapat dikurangi dan kerusakan pada mukosa usus halus dapat dicegah.

3.3. Bakteri Asam Laktat (BAL) pada Fermentasi *Vegetable Juice*

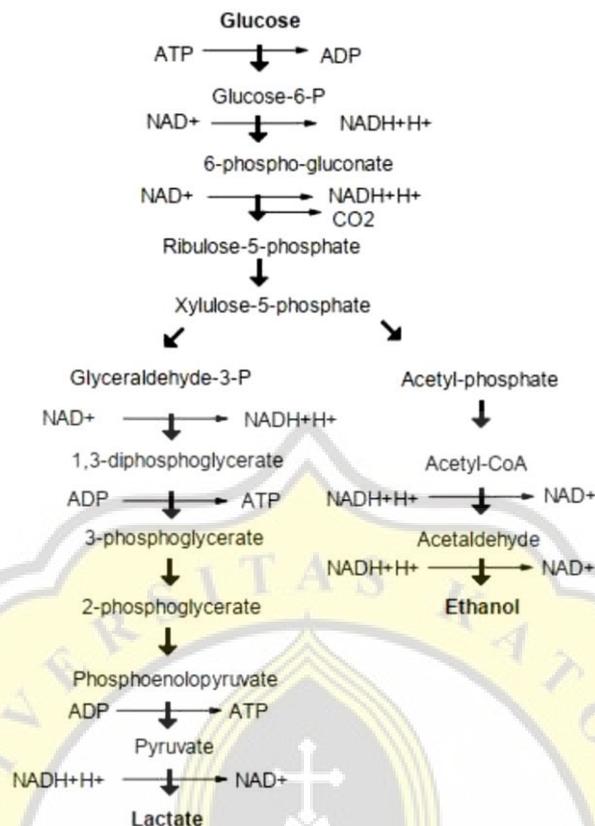
Fermentasi dapat didefinisikan sebagai proses modifikasi biokimia produk pangan primer yang dibawa oleh mikroorganisme dan enzimnya (Soundara *et al.*, 2018). Fermentasi dapat meningkatkan kandungan protein dan serat produk, meningkatkan nilai gizi produk melalui biosintesis vitamin dan asam amino. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah jus. Jus yang dapat digunakan sebagai alternatif minuman fermentasi. *Lactobacilli* biasa ditemukan dalam kandungan buah-buahan dan sayuran. *Lactobacilli* juga dapat

ditemukan pada tomat, mangga, pisang, nanas, krim asam dan makanan lainnya. *Lactobacillus* cocok untuk digunakan dalam produksi minuman fermentasi, terutama karena bakteri asam laktat dari genus *Lactobacillus* dapat hidup pada kisaran pH dan suhu yang luas. Ekstrak fermentasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah campuran dari tiga jenis asam laktat yaitu *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* dan *L. acidophilus*..

3.3.1. Metabolit Sekunder Bakteri Asam Laktat (BAL)

Bakteri asam laktat yang digunakan dalam produksi asam laktat akan menghasilkan metabolit sekunder. Metabolit sekunder yang dihasilkan BAL juga bermanfaat dalam hal pengembangan rasa, tekstur, makanan probiotik dan sintesis peptida dengan sifat antibakteri. Karakteristik metabolisme energi dan karbon yang sederhana serta materi genetik yang relatif kecil, BAL merupakan mikroorganisme yang berpotensi untuk direkayasa secara metabolik agar lebih efisien dalam produk yang diinginkan. Salah satu metode yang dikembangkan untuk mengembangkan jalur metabolisme pada laktobasilus adalah dengan mengubah jalur metabolisme asam piruvat sehingga produk akhir seperti pemanis buatan, perasa, dan aromatik dapat menghasilkan eksopolisakarida dan vitamin melalui kompleks jalur biosintesa.

Bakteri Asam Laktat memproduksi ATP atau energi melalui fermentasi karbohidrat disertai dengan fosforilasi di tingkat substrat. Terdapat dua jalur metabolisme untuk heksosa (gula dengan 6 karbon) adalah glikolisis (jalur Embden-Meyerhof) dan fosfoketolase. Jalur glikolisis memiliki produk akhir utama berupa asam laktat (fermentasi homogen). Jalur fosfoketolase memiliki produk akhir berupa asam asetat, asam propionat, CO₂, etanol, dan beberapa senyawa lain selain asam laktat (heterofermentatif). Pada Gambar 9 dapat dilihat jalur fosfoketolase yang terjadi pada BAL(Tobiang & Purwaningsih, 2020):



Gambar 9. Jalur fosfoketolase yang terjadi pada Bakteri Asam Laktat (BAL)
(Sumber : Tobiang & Purwaningsih, 2020)

Lactococcus lactis merupakan salah satu mikroorganisme yang tergolong BAL dan memiliki proses glikolisis fermentasi homogen, sehingga 90% gula diubah menjadi asam laktat, produk akhir utama. Bacteri ini banyak digunakan sebagai pengawet (*acidifying agent*) dan penambah rasa dalam industri makanan, dan juga digunakan sebagai *emulsifier* dan pelembab dalam bidang kosmetik, dan banyak digunakan dalam bidang kesehatan. Asam laktat juga dapat digunakan dalam sintesis biopolimer, dan asam polilaktat juga digunakan untuk menggantikan berbagai senyawa polimer yang sebelumnya berasal dari minyak bumi. Tujuan utama dari rekayasa metabolisme adalah untuk meningkatkan produksi laktat, terutama dalam hal pemanfaatan gula, glikolisis, dan aliran laktat. Salah satu enzim yang berperan penting dalam pengaturan glikolisis adalah enzim fosfofruktokinase (PFK). Hal ini karena penurunan aktivitas enzim fosfofruktokinase menyebabkan penurunan glikolisis.

Gambar 9 menunjukkan laju glikolisis sangat dipengaruhi oleh proses di luar glikolisis itu sendiri, seperti sifat alosterik enzim fosfofruktokinase, transportasi gula, dan konsumsi ATP, yang berperan penting dalam pengaturan kecepatan proses glikolisis. Peningkatan konsumsi gula diamati pada *Lactococcus lactis* yang direkayasa untuk meningkatkan aktivitas enzim fosfofruktokinase dengan mengkloning gen *pfkA* *Aspergillus niger* atau gen *pfk13* yang dipotong untuk mengkodekan fragmen PFK pendek. 0,8 hingga 1,7 mmol per gram EVA) dan 7,1 hingga 14,5 U/OP600. *Lactate dehydrogenase* (LDH) adalah enzim terakhir dalam jalur yang mengubah gula menjadi asam laktat di *Lactococcus lactis*, sehingga jika gen *ldh* rusak, berbagai jenis asam organik pada akhirnya akan meningkat. produk. Namun, pada *Lactococcus lactis* tipe liar, aktivitas enzim laktat dehidrogenase meningkat 83%, sehingga tidak ada peningkatan produksi laktat yang diamati.

Bakteri asam laktat yang dihasilkan memiliki struktur isomer L atau D. Struktur isomer asam laktat lebih banyak digunakan sebagai monomer untuk sintesis makanan, farmasi dan biopolimer. Struktur isomer D beracun bagi manusia. Oleh karena itu, rekayasa metabolisme BAL berfokus pada lini asam laktat fermentasi homogen. Untuk mendapatkan asam laktat yang memiliki struktur isomer L, enzim yang mengubah struktur isomer asam laktat menjadi asam laktat, yaitu D-laktat dehidrogenase, harus dinonaktifkan. Inaktivasi enzim dicapai dengan menonaktifkan gen yang mengkode enzim yaitu gen *ldhD*, dengan integrasi kromosom, yaitu memasukkan fragmen gen yang menghentikan transkripsi di tengah gen *ldhD* sehingga enzim tidak dapat disintesis dengan benar.

Inaktivasi enzim D-laktat dehidrogenase oleh integrasi kromosom dilakukan pada *strain Lactobacillus helveticus* tipe liar, dan produk akhir metabolisme *Lactobacillus helveticus* adalah asam laktat murni. Pada saat *Lactobacillus helveticus* dengan gen *ldhD* aktif dibandingkan dengan *Lactobacillus helveticus* dengan gen *ldhD* yang tidak aktif, produksi laktat meningkat sekitar 20% di *Lactobacillus helveticus* di mana gen *ldhD* tidak aktif. Hal yang sama terjadi pada *Lactobacillus johnsonii* ketika gen *ldhD* dinonaktifkan. Upaya yang telah dilakukan untuk meningkatkan produksi laktat dengan meningkatkan ekspresi gen *ldhL*, yang mengkodekan enzim L-laktat dehidrogenase, di *Lactobacillus*

plantarum, tetapi tidak ada peningkatan yang signifikan dalam produksi laktat yang diamati.

3.3.2. Penggunaan *Strain BAL* pada *Vegetable Juices*

Penggunaan *strain BAL* pada *vegetables juice* mendorong terjadinya fermentasi asam laktat dengan menggunakan bahan aktif mikroorganisme menginduksi perubahan komposisi fisikokimia produk. Fase cair yang terjadi didalam minuman mengarah kepada biokonversi yang cepat, bersama dengan pelepasan langsung metabolit ke dalam media kultur (Garcia *et al.*, 2020). *Strain BAL* yang dipilih memiliki sifat fungsional dan dapat dianggap sebagai probiotik.



Tabel 5. Penggunaan Berbagai macam *Strain* BAL pada *Vegetables Juice*

No	Jenis BAL	Jenis <i>Vegetables Juice</i>	Jumlah sampel	Masa Percobaan (jam)	pH (0jam)	pH (x jam)	Referensi
1	<i>Lactobacillus Plantarum</i> <i>Lactobacillus Casei</i>	Jus Tomat	500 ml	48	4,3	3,32	(Liu <i>et al.</i> , 2018)
2	<i>Lactobacillus Rhamnosus GG</i> <i>Bifidobacteria Lactis 420</i>	Jus Wortel	500 ml	18	6,7	3,9	(Tamminen, 2013)
3	<i>Lactobacillus Acidophilus</i> <i>Lactobacillus Casei</i> <i>Lactobacillus Plantarum</i>	Jus Tomat	400 ml	72	4,5	3,9	(Kaur <i>et al.</i> , 2016)
4	<i>Lactobacillus Plantarum 1407</i>	Jus Timun	2 kg	72	-	-	(Soundara Rajan <i>et al.</i> , 2018)
5	<i>Lactobacillus fermentum</i> (MTCC1325) <i>Lactobacillus casei</i> (MTCC1423)	Jus semangka + Jus Tomat	100 ml	72	4,8	3,2	(Sivudu <i>et al.</i> , 2014)
6	<i>Lactobacillus Rhamnosus GR-1</i>	Jus Wortel	100 ml	72	4,75	2,51	(Dunkley & Hekmat, 2019)
7	<i>Lactobacillus casei</i> MTCC 1423 <i>Lactobacillus plantarum</i> (MTCC 6161) <i>Lactobacillus acidophilus</i> (MTCC 10307)	Jus Wortel	60 ml	72	6,1	3,9	(Malik <i>et al.</i> , 2019)
					5,5	4	
					5,5	4	

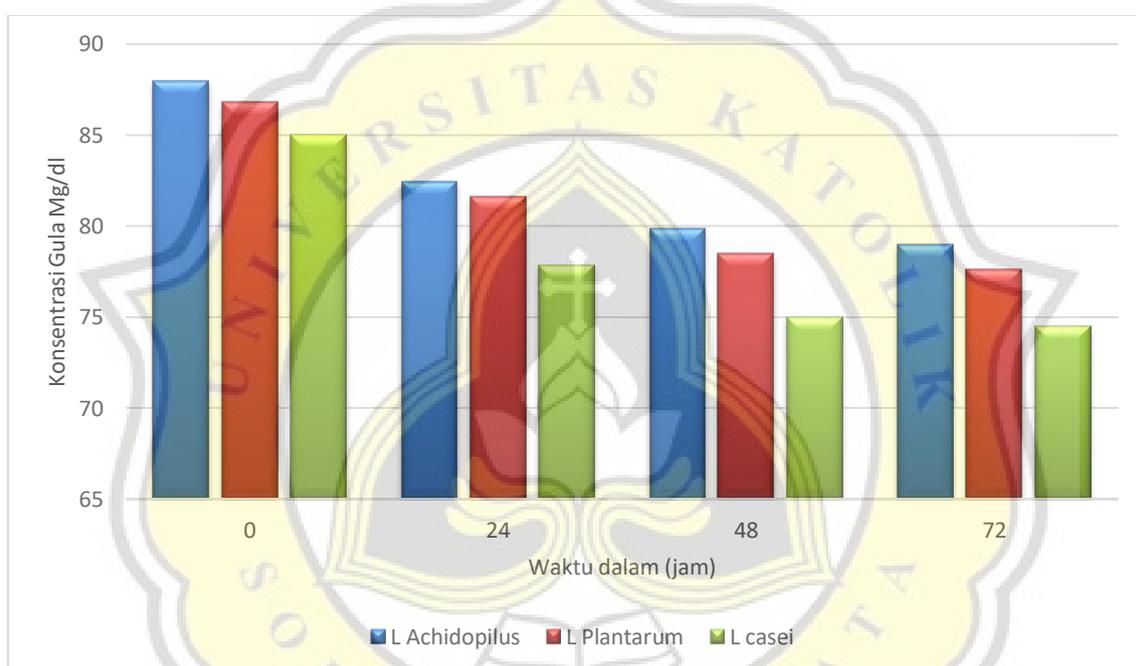
Probiotik secara rutin digunakan dalam pembuatan produk makanan fermentasi karena dapat meningkatkan kualitas, keamanan, dan nilai sensorik dari makanan fungsional (Liu *et al.*, 2018). Jus sayuran yang difermentasi secara alami memiliki senyawa yang rendah lemak, lemak jenuh, kolesterol, energi dan sodium dan kaya akan potasium, serat dan vitamin. Produk yang mengandung probiotik dari tumbuhan bisa menjadi alternatif yang berharga karena fermentasi membuat sayuran tertentu pada produk lebih cocok untuk dikonsumsi manusia

Tomat merupakan salah satu sayuran utama yang banyak dikonsumsi di seluruh dunia. Manfaat kesehatan dari tomat dikaitkan dengan kelimpahannya dalam komponen antioksidan, termasuk likopen, fenolat, -karoten, lutein dan asam askorbat. Tomat yang difermentasi dari jus tomat memberikan efek yang menguntungkan bagi tubuh. Jus tomat mengandung air (93,1%), karbohidrat (4,89%), likopen, vitamin, mineral serta rendah protein dan lemak (Sivudu *et al.*, 2014).

Perubahan nilai pH dan kadar asam pada jus tomat juga bergantung pada *strain* yang digunakan dan waktu yang dibutuhkan selama fermentasi. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Liu *et al.*, (2018) Tidak ada perubahan signifikan yang disebabkan oleh fermentasi terlepas dari *strain* bakteri (*L. casei* atau *L. plantarum*) selama fermentasi; sebaliknya, nilai pH sangat menurun. Untuk *L. plantarum*, pH menunjukkan tren menurun hingga 3,20 (32 jam) dan kemudian meningkat menjadi 3,32 (48 jam). Untuk *L. casei*, pH turun tajam menjadi 2,27 (24 jam), meningkat menjadi 3,43 (32 jam), dan akhirnya stabil pada 3,11 (48 jam). Begitu juga yang dilakukan oleh Kaur *et al.*, (2016) jus tomat yang difermentasi menggunakan 3 *strain* berturut-turut *Lactobacillus Achidoplus*, *Lactobacillus Casei*, dan *Lactobacillus Plantarum* juga memiliki hasil yang menurun dari pH awal. pH awal sampai akhir penelitian yang dilakukan oleh Kaur *et al.*, (2016) dan Liu *et al.*, (2018) memiliki perbedaan karena adanya beberapa faktor.

Penelitian yang dilakukan oleh Kaur *et al.*, (2016) menggunakan 3 kultur bakteri yaitu *L. acidophilus* (MTCC 10307), *L. plantarum* (MTCC 9496), *L. casei* (MTCC 5381) diperoleh dari IMTECH (Institute of Microbial Technology, Chandigarh). Kemurnian dan konfirmasi kultur diaktifkan dalam susu skim pada 37°C dalam 24 jam dan

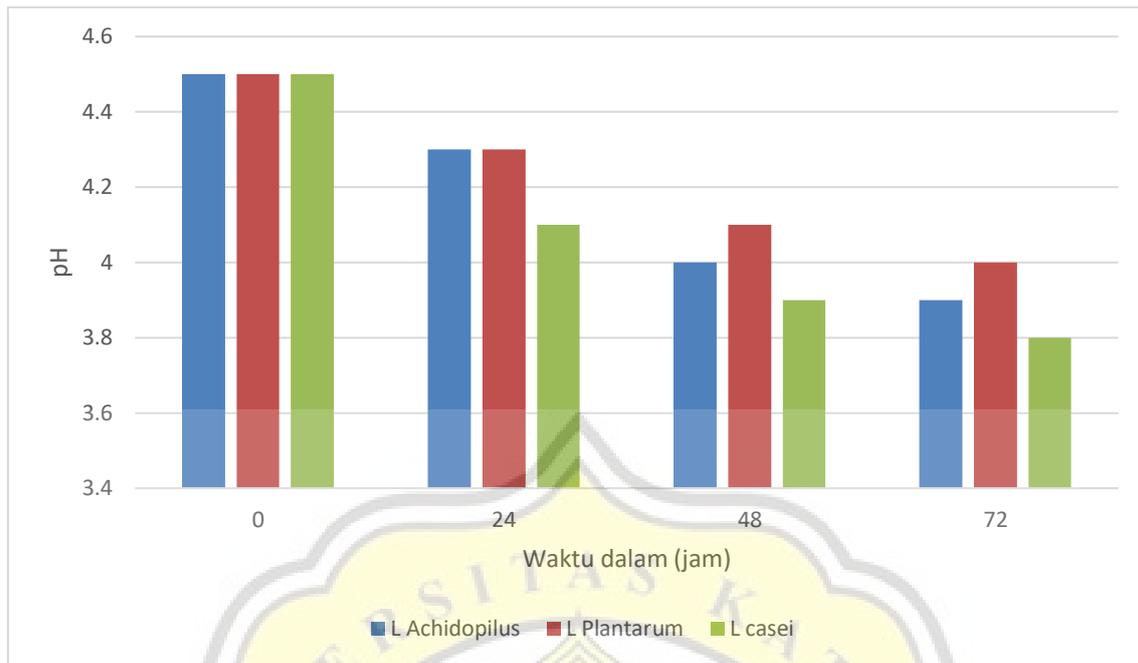
disubkultur setiap bulan. Sebelum digunakan untuk percobaan, kultur diaktifkan dengan 2-3 transfer dalam kaldu MRS (Hi-media, Mumbai, India) pada 37°C selama 24 jam. Jus tomat yang digunakan juga dipasteurisasi dengan menggunakan *waterbath* 65°C selama 30 menit. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Liu *et al.*, (2018) *L. plantarum* kering aktif dan *L. casei* diperoleh dari Lallemand Inc. (Montreal, Quebec, Kanada). Semua suspensi bakteri kemudian diserap oleh inokulasi di MRS dan media susu skim. Sampel diinkubasi pada suhu anaerob konstan 37 °C selama 48 jam. Jus tomat yang digunakan juga dipasteurisasi 90 °C selama 10 menit dan didinginkan pada air mengalir.



Gambar 10. Perubahan konsentrasi gula selama fermentasi jus tomat

(Sumber: Kaur *et al.*, 2016)

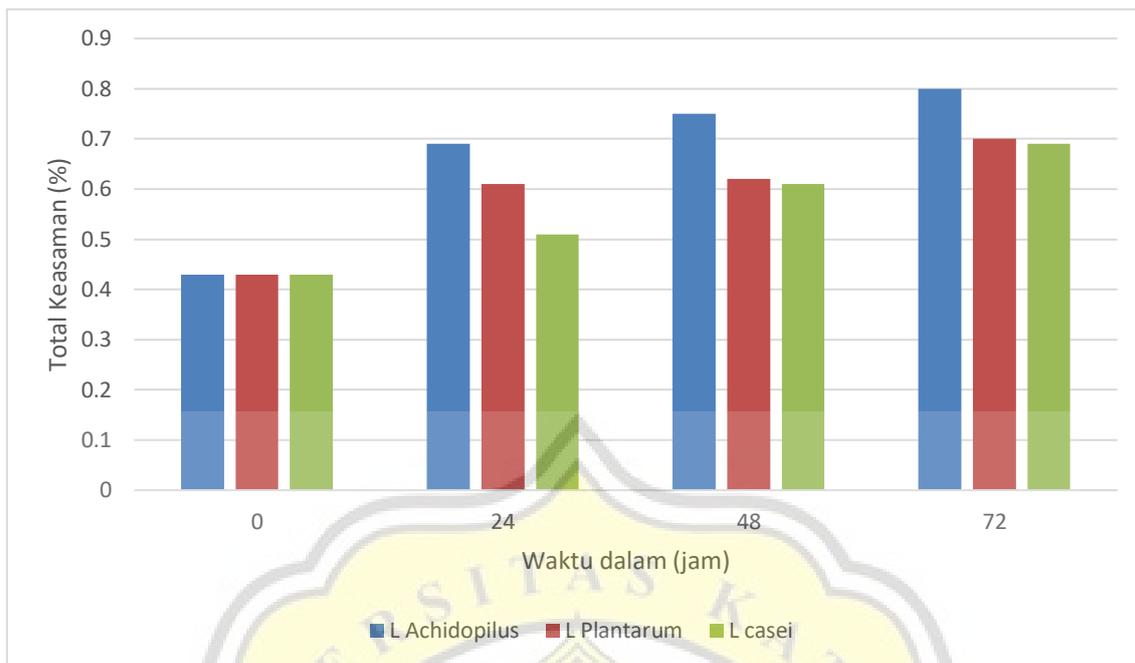
Berdasarkan gambar 10, Ketika jus tomat diinokulasi dengan kultur, penurunan gula diamati pada semua kultur. Kandungan gula awal jus tomat adalah 87.95mg/dl, 86.85mg/dl, 85.0mg/dl *L. acidophilus*, *L. plantarum* dan *L. casei* pada 0 jam yang diturunkan menjadi 82.46mg/dl, 81.64mg/dl dan 77.85mg/dl pada 24 jam, 79.9mg/dl, 78.5mg/dl dan 75.0mg/dl pada 48 jam, 79.0mg/dl, 77.65mg/dl dan 74.52mg/dl masing-masing pada 72 jam inkubasi



Gambar 11. Perubahan nilai PH selama fermentasi jus tomat

(Sumber : Kaur *et al.*, 2016)

Hasil penurunan pH juga menunjukkan kecenderungan yang sama. PH asli adalah 4,5 dari *L. acidophilus*, *L. plantarum* dan *L. casei* pada 0 jam yang berkurang hingga 4,3, 4,3 dan 4,1 pada 24 jam, 4,0, 4,1 dan 3,9 masing-masing pada 48 jam dan 3,9, 4,0, 3,8 pada 72 jam . Penurunan pH tersebut bersamaan dengan penurunan kadar gula sari buah tomat. Hasil penurunan pH didukung dengan baik oleh kecenderungan serupa dalam peningkatan keasaman pada sampel yang diinokulasi dengan *L. acidophilus*, *L. plantarum* dan *L. casei*.



Gambar 12. Perubahan nilai keasaman selama fermentasi jus tomat

(Sumber : Kaur *et al.*, 2016)

L. acidophilus, *L. plantarum* dan *L. casei*, mampu meningkatkan keasaman dari 0,43% pada 0 jam menjadi 0,69%, 0,61% dan 0,51% pada 24 jam, 0,75%, 0,62%, 0,61% pada 48 jam dan 0,80%, 0,70%, 0,69% masing-masing pada 72 jam inkubasi. Tingkat keasaman dihitung dari kadar presentase asam laktat yang dihasilkan BAL melalui proses titrasi.

$$\text{Kadar asam Laktat (\%)} = \frac{V \times N \times B \times F_p \times 100\%}{\text{Volume Sampel} \times 1000}$$

V= Volume larutan NaOH 0,1 M

N=Normalitas NaOH

B=Bobot setara asam laktat (90 g/mol)

Fp=Faktor Pengenceran

Titrasi dilakukan dengan menggunakan 5 mL sampel (jus) diambil dalam erlenmeyer dan diencerkan dengan air suling dalam jumlah yang sama. Tiga sampai empat tetes Phenolphthalein ditambahkan untuk menandai titik akhir. Basa (0,1N NaOH) dari buret ditambahkan setetes demi setetes ke dalam labu bersama dengan pencampuran terus menerus sampai titik akhir yaitu muncul warna merah muda. Pembacaan dicatat. Prosedur

di atas diulangi untuk mendapatkan pembacaan yang sesuai (Kaur et al., 2016). *L. acidophilus* menunjukkan toleransi asam yang tinggi yang memungkinkannya untuk berhasil melewati pH lambung yang rendah dan mencapai usus inang yang diperlukan untuk kolonisasi dan perbanyakan yang berhasil untuk ekspresi efek peningkatan kesehatannya. . Dua isolat *Lactobacillus* yaitu *L. plantarum* dan *L. acidophilus* diamati tidak hanya dapat bertahan hidup tetapi juga memanfaatkan sari buah untuk sintesis selnya, yang ditunjukkan dengan penurunan gula dan pH buah, serta peningkatan keasaman dan jumlah bakteri. Namun, isolat *L. acidophilus* ditemukan mengkonsumsi gula lebih cepat daripada *L. plantarum*; meskipun penurunan gula dan pH serta peningkatan keasaman lebih cepat selama 24 jam pertama dan menjadi sedikit lebih lambat selama 48 jam berikutnya yang dapat disebabkan oleh pH yang sangat rendah dan keasaman tinggi yang dicapai selama 24 jam awal fermentasi. Selain itu, mungkin ada beberapa faktor lain yang dapat mempengaruhi kelangsungan hidup/pertumbuhan sel, misalnya, akumulasi produk akhir metabolik lainnya seperti asam laktat dan asam organik lainnya, diacetyl, acetylaldehyde dan acetoin dll yang dapat mengurangi viabilitas kultur jika terakumulasi dalam jumlah tinggi.

Penggunaan gabungan jus buah dan sayuran ternyata juga memiliki hasil yang optimal. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Sivudu *et al.*, (2014) *mixed juice* antara jus tomat dengan jus semangka dengan menggunakan *strain Lactobacillus Fermentum* dan *Lactobacillus Casei* memberikan hasil yang bermanfaat. Penurunan pH selama 72 jam fermentasi pada suhu 30°C berturut-turut pada *L Fermentum* dan *L Casei* 4,8 dan 4,75 pada 0 jam dan 3,20 , 2,51 pada 72 jam. Kadar gula menurun 9,67 (mg/ml) dan 9,37 (mg/ml) 0 jam menjadi 1,83 (mg/ml) dan 4,08 (mg/ml) saat 72 jam. Begitu pula diikuti tingkat keasaman dan jumlah bakteri yang meningkat selama fermentasi. Artinya penggunaan *mixed juice* antara jus buah dan sayuran bisa dikombinasikan dengan baik.

Wortel merupakan sayuran yang umum digunakan sebagai bahan pangan. Penggunaan wortel yang difermentasi menjadi produk jus ternyata mempunyai sifat fungsional yang baik. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Tamminen *et al.*, (2013) Sebelum fermentasi, nilai pH wortel jus adalah 6,7. Jus wortel yang difermentasi selama 18 jam pada suhu 37°C dengan *lactobacilli* memiliki nilai pH yang lebih rendah menjadi (3,8-

3,9). Selama penyimpanan 12 minggu kadar jumlah dari *strain Lactobacillus Rhamnosus GG* tidak menurun secara signifikan pada wortel yang difermentasi. Hal ini terjadi karena dari awal Setelah fermentasi, *lactobacillus* ada di angka yang lebih tinggi (10^8 - 10^9 CFU/ml), meningkat dari 10^6 - 10^7 CFU/ml pada inokulasi dan tersedia nutrisi dan pH yang cocok untuk berkembang pada *strain*.

Hampir sama dengan penelitian diatas, penelitian yang dilakukan dunkley & Hekmat, (2019) fermentasi jus wortel yang dilakukan menggunakan *strain Lactobacillus Rhamnosus GR-1* mengubah nilai pH 6,1 menjadi 3,9 selama 72 jam fermentasi, hal ini wajar karena lamanya fermentasi menjadikan suasana asam semakin tinggi. Sedangkan pada penelitian Malik *et al.*, (2019) pH berkurang dari 6,0 menjadi 4,0 selama 72 jam fermentasi.

L. rhamnosus GR-1 adalah *strain Lactobacillus* yang tahan empedu dan mampu bertahan hidup perjalanan melalui saluran pencernaan manusia tanpa induksi respon imun atau inflamasi sistemik (Dunkley & Hekmat, 2019). Biasanya *strain L Rhamnosus GR-1* digunakan sebagai fermentasi produk susu untuk kesehatan pencernaan. Jumlah viabilitas *strain L Rhamnosus GR-1* meningkat pada 72 jam fermentasi sekitar $9,2 \pm 8,4$ log CFU/ml dari $8,5 \pm 8,3$ log CFU/ml (mean \pm SD). Begitu juga yang dilakukan Malik *et al.*, (2019) jumlah viabilitas *strain L Casei*, *L Achidopilus*, *L Plantarum* masing-masing memiliki jumlah $8,35 \pm 0,8$ log CFU/ml, $8,82 \pm 0,6$ log CFU/ml, dan $8,35 \pm 0,8$ log CFU/ml pada 72 jam fermentasi.

Dari ketiga penelitian yang dilakukan oleh Tamminen, (2013) , Dunkley & Hekmat, (2019) dan Malik *et al.*, (2019) semua mengalami penurunan pH tetapi memiliki pH awal dan akhir yang berbeda. Hal ini dikarenakan ada beberapa faktor dan mekanisme yang mempengaruhinya. Faktor utama adalah jenis *strain* BAL yang digunakan dan tempat kultivasinya, waktu percobaan, dan jenis bahan. Pada penelitian Tamminen (2013), digunakan *Lactobacillus Rhamnosus GG* (Disimpan oleh Valio Ltd, Helsinki, Finlandia di American Type Culture Collection ATCC53103 *strain* diprakultur secara anaerobik pada 37 °C semalaman dalam kaldu MRS (Oxoid). Jus yang digunakan adalah jus wortel segar disaring dan dipasteurisasi selama 30 detik dalam *waterbath* dalam botol kaca (500

ml) pada 72 °C dan disentrifugasi (16000 g, 5 menit). Sedangkan pada penelitian Malik *et al.*, (2019), tiga strain bakteri probiotik yang digunakan yaitu *Lactobacillus casei* (MTCC 1423), *Lactobacillus plantarum* (MTCC 6161), dan *Lactobacillus acidophilus* (MTCC 10307) diperoleh dari MTCC (Pengumpulan Kultur Jenis Mikroba dan Bank Gen), Chandigarh diinkubasi di MRS pada suhu 35 °C selama 24 jam. Jus wortel diekstraksi dan disaring, diikuti dengan pasteurisasi pada 80 °C selama 10 menit. Jus dengan cepat didinginkan hingga 35 °C, dipindahkan secara aseptik ke dalam botol kaca yang disanitasi, dan disimpan pada suhu 4 °C. Terakhir, penelitian yang dilakukan Dunkley & Hekmat, (2019), *strain* BAL yang digunakan adalah *L. rhamnosus GR-1* bersumber dari Pusat Penelitian dan Pengembangan Kanada untuk Probiotik, Institut Penelitian Kesehatan Lawson. Bakteri diinokulasi ke dalam De Man Rogosa, dan Sharpe, kaldu MRS yang disterilkan dan diinkubasi secara anaerob menggunakan GasPak (BD GasPak™ EZ Anaerobe Container System, Becton Dickinson and Co., Sparks, BD, USA) pada suhu 37°C selama 24 jam. Sedangkan jus wortel yang digunakan adalah jus wortel lokal yang dipasteurisasi 80 °C selama 10 menit. Jus tersebut kemudian didinginkan hingga 37°C dan diinokulasi dengan, 2 persen (b/v) yang mengandung kultur.

Studi lain yang dilakukan oleh Daneshi *et al.*, (2013) yang berusaha menentukan viabilitas bakteri probiotik dalam minuman campuran susu/jus wortel non-fermentasi, menemukan bahwa *Lactobacillus acidophilus* dan *L. rhamnosus* mempertahankan jumlah mikroba yang melampaui tingkat kritis 10⁶ CFU/ml selama 20 hari penyimpanan. Berdasarkan temuan Daneshi *et al.*, ditentukan bahwa susu/jus wortel adalah media yang cocok untuk mempertahankan viabilitas *L. rhamnosus* lebih dari 90 persen selama penyimpanan dingin, mencapai jumlah sel yang layak 6,75-6,08 log/CFU/ml setelah 20 hari (Daneshi *et al.*, 2013). Ketika hasil ini diperhatikan, jus wortel dengan *strain* *Lactobacillus* yang digunakan memiliki potensi yang cukup besar dalam probiotik berbasis sayuran produk. Fermentasi dari jus wortel terkadang menyebabkan koagulasi bahan tetapi tidak sebanyak dengan misalnya menggunakan autoklaf. Masalahnya tidak selalu sama dan akan berguna untuk mengetahui komponen yang berkontribusi pada reaksi ini

Mentimun mengandung 95% air yang mencegah dehidrasi (Rahman *et al.*, 2015). Mentimun sangat rendah kalori dan kaya serat makanan serta nol kolesterol dan baik untuk pasien jantung (Soundara Rajan *et al.*, 2018). Selain itu juga dapat mencegah banyak masalah pencernaan seperti keasaman, sembelit dan pembentukan maag. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Soundara Rajan *et al.*, (2018), *Strain* BAL yang digunakan adalah *Lactobacillus plantarum* 1407 [diperoleh dari Microbial Type Culture Collection and Gene Bank (MTCC), Chandigarh] yang diinokulasi dalam kaldu MRS. Kultur berusia 24 jam sekitar 15 ml disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit. Jus mentimun Disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C, ekstrak sari buah mentah dimasukkan ke dalam labu kerucut steril dan ditambahkan berbagai konsentrasi prebiotik (inulin) dan stevia dan disimpan dalam penangas air dengan suhu 63 °C selama 30 menit dan kemudian didinginkan sampai suhu kamar. pH awal jus mentimun dengan menggunakan 1% sampai 5% prebiotik (inulin) adalah 4,95. Spesies *L. plantarum* yang digunakan dalam penelitian ini ditemukan memanfaatkan komponen jus mentimun untuk kelangsungan hidupnya, yang menyebabkan penurunan pH dari 4,95 menjadi 3,2 pada akhir 72 jam fermentasi untuk semua konsentrasi prebiotik. Terjadi penurunan pH yang menunjukkan bahwa *L. plantarum* aktif memfermentasi sari buah (Soundara Rajan *et al.*, 2018). Dapat dijelaskan bahwa tingkat pH produk probiotik tergantung pada spesies probiotik dan bahan dasar produk dapat berupa air/susu (Pereira *et al.*, 2011)

Tingkat keasaman awal yang diamati adalah 0,18% dan meningkat menjadi 0,241% setelah 72 jam fermentasi. Peningkatan persentase keasaman menunjukkan kemampuan *L. plantarum* untuk memfermentasi jus mentimun dengan bantuan sumber karbohidrat yang ada dalam jus. Jus dengan prebiotik 2% menunjukkan nilai keasaman yang lebih tinggi sebesar 0,239% jika dibandingkan dengan konsentrasi prebiotik lainnya pada akhir 48 jam fermentasi. Alasan utama penurunan pH dan peningkatan keasaman telah dikaitkan dengan konsumsi gula dan produksi asam organik oleh kultur asam laktat (Soundara Rajan *et al.*, 2018). Viabilitas mikroba dari konsentrasi 2% prebiotik awalnya $3,2 \times 10^7$ CFU/mL (pada jam ke-0). Saat fermentasi berlangsung, viabilitas mikroba meningkat menjadi $4,9 \times 10^7$, $1,36 \times 10^7$ CFU/mL masing-masing pada akhir 24 dan 48 jam. Akhirnya pada akhir 72 jam fermentasi, viabilitas mikroba menurun menjadi $2,2 \times$

10^6 CFU/mL. Viabilitas ditemukan paling baik untuk jus mentimun dengan konsentrasi prebiotik 2% yang memiliki unit pembentuk koloni maksimum 10^7 CFU/mL karena efek gabungan dari probiotik (*L. plantarum*), prebiotik dan sumber karbohidrat yang ada di dalamnya. Jus timun. Jumlah minimum organisme probiotik dalam suatu produk makanan harus 10^7 CFU/mL (Soundara Rajan *et al.*, 2018). Oleh karena itu, kebutuhan jus probiotik yang sehat telah dipenuhi oleh kelangsungan hidup organisme dalam jus mentimun, yang membuat jus mentimun cocok untuk dikonsumsi.

3.3.3. Faktor Fermentasi Bakteri Asam Laktat (BAL)

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi fermentasi diantaranya pH, ketersediaan oksigen, suhu, aktivitas air, nutrisi, dan kultur *starter*. Fermentasi *vegetable juice* dan minuman probiotik telah terbukti menekan pertumbuhan bakteri patogen dan pembusuk serta menjaga keseimbangan flora mikroba usus. Hal ini dikarenakan bakteri asam laktat ini menghasilkan asam organik dan senyawa bakteriosin selama proses fermentasi. Suhu optimum untuk pertumbuhan kultur langsung adalah pH 5,6. Penurunan BAL dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain kultur yang digunakan, kondisi kultur, produksi hidrogen peroksida, keasaman produk akhir, dan konsentrasi asam asetat dan asam laktat. Jumlah bakteri probiotik yang berfungsi di usus setidaknya 10^9 sel di usus. Bakteri asam laktat terutama genus *Lactobacillus* memiliki sifat yang sesuai untuk produksi minuman fermentasi karena BAL dapat hidup pada rentang pH dan suhu yang berbeda. Kultur yang biasa digunakan dalam penelitian adalah campuran tiga asam laktat: *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, dan *L. acidophilus*. Ketiga kultur tersebut dapat bertahan hidup di saluran cerna manusia.

3.4. Sifat Fungsional Mekanisme Simbiotik Bakteri Asam Laktat pada Fermentasi *Vegetable Juice*

3.4.1. Hubungan *Strain* BAL di *Vegetable Juice* dan Kesehatan Tubuh

Peran bakteri probiotik adalah menjaga homeostasis agar tubuh manusia tetap sehat. Tubuh inang bertanggung jawab untuk mengaktifkan *gastrointestinal* dan mengatur komposisinya melalui sekresi peptida antibakteri dan imunoglobulin. Selain diatur oleh

mutualisme antara mikrobiota dengan sistem pencernaan, sistem imun pencernaan serta homeostasis juga diatur oleh jaringan limfoid yang terasosiasi dengan pencernaan. Metabolisme BAL sebagai probiotik mampu memberikan berbagai dampak positif bagi kesehatan manusia, diantaranya adalah memproduksi vitamin, modulasi sistem imun, mengoptimalkan pencernaan dan penyerapan, menghambat berbagai bakteri berbahaya, serta membuang karsinogen dan berbagai senyawa toksik lainnya. Selain itu, pada anak umur 6 hingga 36 bulan dengan kondisi diarrhea, ditemukan bahwa bakteri asam laktat seperti *Bactobacillus* dan *Streptococcus faecium* efektif untuk menjadi antibakteri untuk diare.



Gambar 13. *Strain* Probiotik pada *vegetables juice* dan sayuran fermentasi

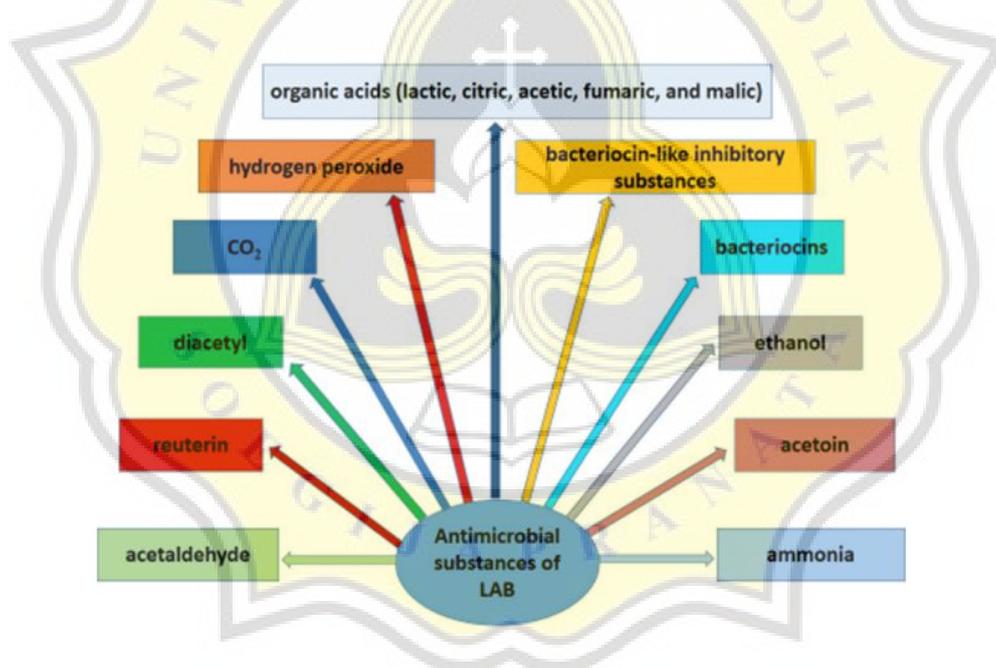
(Sumber : Garcia *et al.*, 2020)

Berdasarkan Gambar 13 dapat diamati bahwa dasar kriteria yang relevan untuk pemilihan BAL untuk mengembangkan minuman buah dan sayuran fungsional terdiri dari komponen penting dari flora usus manusia dan memiliki peran yang bermanfaat dalam saluran pencernaan. BAL dapat dianggap sebagai probiotik, yang merupakan suplemen makanan mikroba hidup, yang menguntungkan mempengaruhi inang dengan

meningkatkan keseimbangan mikroba usus (Cagno *et al.* , 2013). Populasi BAL dalam jus buah atau sayuran fermentasi laktat yang dikembangkan baru-baru ini berada di atas batas 6–7 log CFU/mL, yang diperlukan untuk produk probiotik, pada akhir fermentasi dan bahkan setelahnya masa penyimpanan minuman buah atau sayur.

Strain Lactobacillus yang digunakan sebagai BAL untuk memfermentasi *vegetables juice* mampu menghambat patogen, memodulasi respon imun inang, yang akan meningkatkan nutrisi, mencegah gangguan usus, meningkatkan sistem kekebalan tubuh, mengoptimalkan ekologi usus dan akhirnya meningkatkan kesehatan secara keseluruhan (Cagno *et al.*, 2013). *Strain Bifidobacterium* juga dapat digunakan untuk fermentasi karena kemampuannya untuk menjajah saluran usus dan kontrol bakteri usus yang tidak diinginkan (Garcia *et al.*, 2020).

3.4.2. Bakteri Asam Laktat (BAL) sebagai Antimikroba



Gambar 14. Senyawa Antimikroba pada Bakteri Asam Laktat

(Sumber : Garcia *et al.*, 2020)

Berdasarkan gambar 14 dapat diamati bahwa BAL menghasilkan berbagai senyawa antimikroba, seperti asam organik (laktat, sitrat, asetat, fumarat, dan asam malat), hidrogen peroksida, CO₂, diacetyl, ethanol, reuterin, acetaldehyde, acetoin, amonia, bakteriosin, zat penghambat mirip bakteriosin (BLIS), dan metabolit penting lainnya,

yang memiliki aktivitas antagonis yang kuat terhadap banyak mikroorganisme (Zehra *et al.*, 2014)

Berbagai metabolit yang dihasilkan oleh BAL telah terbukti aman untuk diproduksi menjadi *vegetable juice*. Bakteri asam laktat memberikan efek antibakteri dengan menghambat bakteri tertentu seperti patogen. Mikroba saluran pencernaan dapat berperan sebagai barier atau penghalang agar patogen tidak mengganggu kerja organ dan jaringan. Aktivitas antibakteri disebabkan oleh penurunan pH lumen akibat produksi asam asetat dan asam laktat, akumulasi bakteriosin dan reuterisiklin, serta senyawa yang menghalangi pengikatan bakteri ke sel epitel sehingga mengurangi produksi toksin. Karbon dioksida dan hidrogen peroksida yang dihasilkan oleh fermentasi heterolaktik juga dapat mencegah pertumbuhan bakteri yang tidak diinginkan dengan menciptakan lingkungan yang tidak mendukung

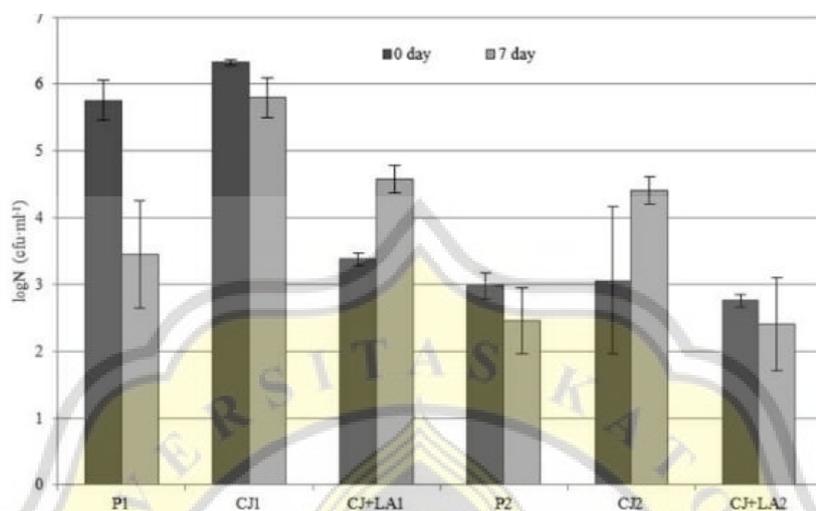
Bakteriosin merupakan peptida kecil dengan sifat anti-bakteri, umumnya diproduksi oleh Gram-positif dan bakteri gram negatif. Ini terdiri dari sebagian besar *heatstable* yang dilepaskan secara ekstraseluler molekul protein yang disintesis secara ribosom yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap galur yang terkait erat dan di mana sel produsen mengekspresikan tingkat kekebalan spesifik, meskipun ada peningkatan jumlah bakteriosin yang dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba yang luas (König & Fröhlich, 2017). Senyawa bakteriosin digunakan oleh bakteri sebagai pertahanan terhadap mikroorganisme yang mengancam (Mani-lópez *et al.*, 2018). Sifat anti-virus dan anti-jamur juga dapat disebabkan oleh beberapa bakteriosin (Juturu & Wu, 2018). Bakteriosin berbeda dari antibiotik, karena diproduksi selama fase lag dan diklasifikasikan sebagai metabolit primer, sedangkan antibiotik diproduksi setelah akhir mikroba pertumbuhan dan diklasifikasikan sebagai metabolit sekunder. Ada dua jenis bakteriosin yang berbeda, sesuai dengan spektrum penghambatannya. Pada tipe pertama, bakteriosin mengerahkan aktivitas penghambatannya melawan bakteri dari spesies yang sama dengan bakteri penghasil bakteriosin; mereka disebut bakteriosin spektrum sempit. Pada tipe kedua, bakteriosin mengerahkan aktivitas penghambatannya terhadap bakteri genus yang berbeda; mereka disebut bakteriosin spektrum luas. Bakteriosin dianggap ideal ketika konsentrasi kecil diperlukan untuk bertindak, memiliki berbagai tindakan terhadap

beberapa patogen mikroorganisme, tidak menyebabkan kerusakan pada produk yang diterapkan.

Bakteriosin yang diproduksi oleh BAL, adalah peptida antimikroba, mengandung sekitar 30-60 asam amino, dengan berat molekul kecil yang dapat digunakan sebagai pengawet makanan alami dan aman dalam berbagai makanan, termasuk buah-buahan dan sayuran, tanpa mengubah sifat nutrisi dan sensorik atau karakteristik fisikokimia makanan (Mokoena, 2017). Bakteriosin bekerja melawan sitoplasma bakteri membran dengan mengganggu pergerakan proton (Mokoena, 2017), menyebabkan kebocoran ion, ATP, RNA atau DNA molekul dan kematian seluler mikroorganisme patogen dan pembusuk (Andréa *et al.*, 2017). Bakteriosin aktif dapat terhitung sampai dalam kisaran nanomolar (Tumbariski *et al.*, 2018). Bakteriosin memiliki stabilitas suhu tinggi (Quinto *et al.*, 2019). Berbagai faktor mempengaruhi produksi bakteriosin, termasuk faktor lingkungan, suhu, dan pH-nya. Suhu 30–37 C dan pH 5,0–8,0 adalah kondisi optimum di mana bakteriosin biasanya dikembangkan (Mani-lópez *et al.*, 2018). Penurunan efektivitas bakteriosin dapat dikaitkan dengan perkembangan resistensi oleh mikroorganisme patogen tertentu, terhadap interaksi, inaktivasi, atau bahkan untuk ikatannya dengan berbagai bahan makanan, serta distribusi acaknya di makanan. Bakteriosin dibagi dalam beberapa klasifikasi, klasifikasi ini didasarkan pada mekanisme biosintesis, genetika, dan struktur; karena itu, bakteriosin diklasifikasikan menjadi tiga kelas, kelas I stabil panas (<10 kDa), dan Kelas II, dan termolabil (>10 kDa) Kelas III (Alvarez-sieiro, Montalbán-lópez, Mu, & Kuipers, 2016). Bakteriosin Kelas I, bakteriosin Kelas II, dan Kelas III bakteriosin juga disebut lantibiotik, non-lantibiotik, atau antibiotik seperti pediocin, dan sensitif terhadap panas, masing-masing (Ahmad *et al.*, 2017).

review ini, didapatkan beberapa penelitian menggunakan *strain* BAL pada *vegetables juice* yang dimana adanya penambahan *strain* BAL memberikan fungsi untuk menghambat bakteri patogen ditunjukkan dengan adanya senyawa antimikroba termasuk bakteriosin. Faktor pH, suhu dan penyimpanan paling mempengaruhi pada aktivitas antimikroba. Dalam penelitian yang dilakukan oleh (Trzaskowska & Gasentzer, 2016) *Lb. rhamnosus* LOCK900 dan proses inkubasi (32°C) berpengaruh terhadap jumlah *S aureus* dalam jus wortel. Sedangkan penambahan asam laktat tidak terlalu menyebabkan

perubahan jumlah *S aureus* dari segi sudut pandang statistik. Jumlah patogen yang sedikit lebih tinggi tercatat dalam jus wortel murni.

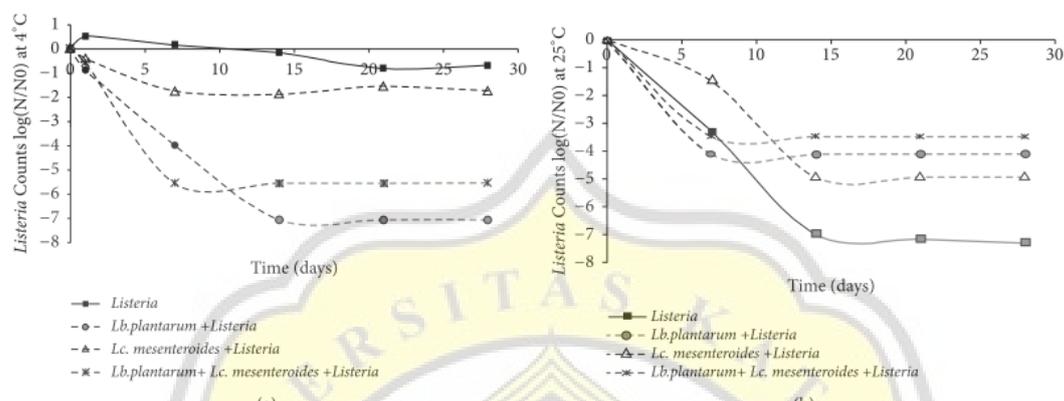


Gambar 15. Jumlah *S. Aureus* pada fermentasi jus wortel
(Sumber : Trzaskowska & Gasentzer, 2016)

Berdasarkan gambar 15 (P1 ; jus wortel dan *Lb rhamnosus*, CJ1 ; jus wortel murni, CJ dan LA1 ; jus wortel dan asam laktat ; sebelum inkubasi. P2 ; jus wortel dan *Lb rhamnosus*, CJ2 ; jus wortel murni, CJ dan LA2 ; jus wortel dan asam laktat ; setelah inkubasi) dapat diamati bahwa Peningkatan jumlah *S. aureus* sekitar tiga tingkat log dalam sampel jus wortel sebelum diinkubasi menunjukkan bahwa patogen menemukan kondisi yang menguntungkan untuk berkembang meskipun probiotik juga berkembang biak. *Lb rhamnosus* akan menurunkan pH secara drastis sesuai dengan karakteristik genus *Lactobacillus* yang membuat bakteri patogen lama kelamaan akan menyesuaikan kondisi asam dan pH yang meningkat. Setelah diinkubasi (32°C) selama 15 jam jumlah *S. Aureus* menurun drastis sampai sekitar 2 log CFU/ml pada sampel yang ditambahkan *Lb. Rhamnosus* LOCK900 dan juga asam laktat (gambar 15).

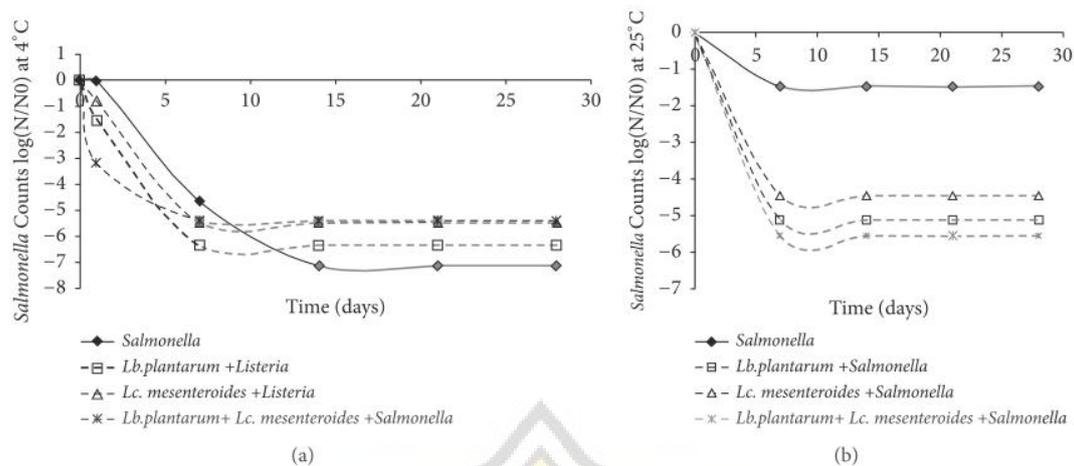
Pada penelitian yang dilakukan (Bah *et al.*, 2019), jus tomat diinokulasi dengan *Lb. plantarum* dan *Lc. mesenteroides* telah menunjukkan produksi asam organik yang tinggi

dibandingkan dengan sampel kontrol di kedua kondisi. Kondisi yang dimaksud adalah fermentasi pada suhu 4°C dan 25°C, sehingga asam laktat dan pH rendah dalam jus mempengaruhi kelangsungan hidup BAL pada akhir penyimpanan.



Gambar 16. Laju penurunan *Listeria* secara logaritma pada fermentasi jus tomat
(Sumber : Bah et al., 2019)

Lb. plantarum yang diinokulasi sendiri, terdapat perbedaan bahwa penghambatan total *Listeria* diperoleh setelah dua minggu penyimpanan pada 4°C. Namun, ketika jus tomat diinokulasi dengan *Lc. mesenteroides*, penghambatan total diamati hanya untuk kondisi penyimpanan 25°C, setelah dua minggu. Perbedaan viabilitas tersebut pada suhu penyimpanan mungkin disebabkan oleh penurunan laju pertumbuhan dan pelepasan metabolit sekunder pada 4°C.



Gambar 17. Laju penurunan *salmonella* secara logaritma pada fermentasi jus tomat
(Sumber : Bah *et al.*, 2019)

Pengamatan langsung yang dilakukan pada jus tomat dapat diungkapkan bahwa ketika jumlah BAL meningkat, jumlah sel *Salmonella* berkurang setelah penyimpanan pada 4°C dan 25°C selama 28 hari. Pada sampel kontrol, jumlah *Salmonella* juga menurun secara progresif selama penyimpanan pada suhu 4°C dan sedikit berbeda dari yang diamati pada sampel yang disimpan pada suhu 25°C, menunjukkan keterlibatan berbagai senyawa antimikroba (asam asetat dan laktat, hidrogen peroksida (H₂O₂), dan bakteriosin). Jumlah BAL meningkat pesat pada semua awal fermentasi, akan terjadi penurunan pH, karena aktivitas metabolisme BAL yang menghambat patogen.

Beberapa penelitian juga dilakukan untuk membuktikan bahwa *strain* BAL yang diisolasi dari beberapa sumber pangan dapat menghambat bakteri patogen dengan meningkatkan aktivitas antimikrobanya. Penelitian yang dilakukan (Valente *et al.*, 2019) dua *strain Lactobacillus Plantarum B7* dan *Lactobacillus Rhamnosus D1* dengan mikroorganisme target *L Monocytogenesis* memberikan hasil zona inhibisi masing masing 3,9 mm dan 4,0 mm. *Lactobacillus Plantarum NF4* yang diisolasi dari cuka jeruk keprok dengan mikroorganisme target *E.Coli*, *S typhi*, dan *S, Auerus* memberikan hasil zona inhibisi masing-masing >2,1mm, 1,1-2 mm, dan 1,1-2 mm (Sui *et al.*, 2021)

3.4.3. Bakteri Asam Laktat Membantu Meningkatkan Aktivitas Antioksidan

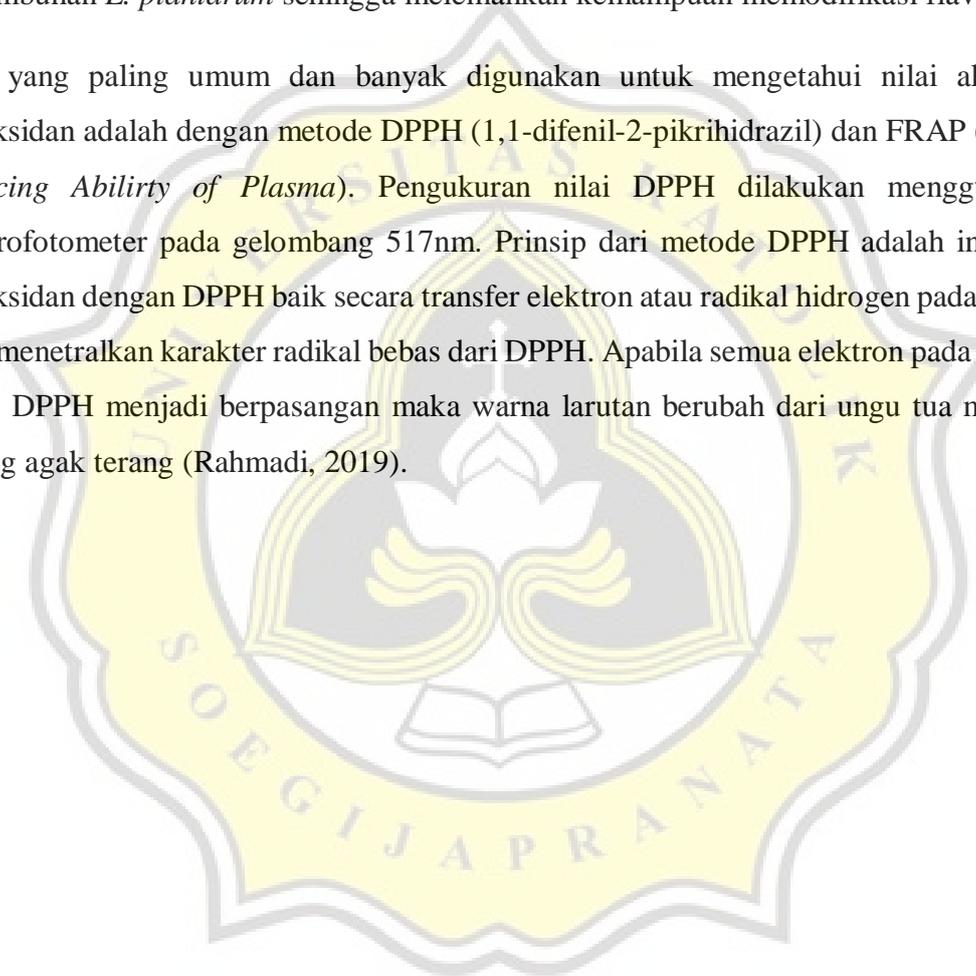
Antioksidan pangan didefinisikan sebagai senyawa kompleks yang terdapat pada makanan ataupun bahan pangan yang dapat melindungi jaringan dari kerusakan akibat oksidasi (Rahmadi, 2019). Antioksidan bekerja dengan mendonorkan satu elektronnya ke senyawa yang bersifat oksidan, sehingga aktivitas senyawa oksidan dapat dihambat. Tubuh manusia memproduksi beberapa antioksidan untuk mencegah stres oksidatif. Radikal bebas yang dihasilkan dalam tubuh dapat dinetralkan dengan beberapa mekanisme pertahanan tubuh alami seperti *glutathione* (GSH), superoksida dismutase (SOD) dan katalase. Tetapi, kapasitas antioksidan yang diproduksi oleh tubuh manusia tidak selalu mencukupi untuk mencegah terjadinya stres oksidatif. Oleh karena itu, kekurangan ini harus dikompensasi dengan ditambahkan antioksidan pangan alami yang berasal dari tumbuhan seperti tokoferol, flavon, beta-karoten, dan beberapa komponen polifenol pada tanaman.

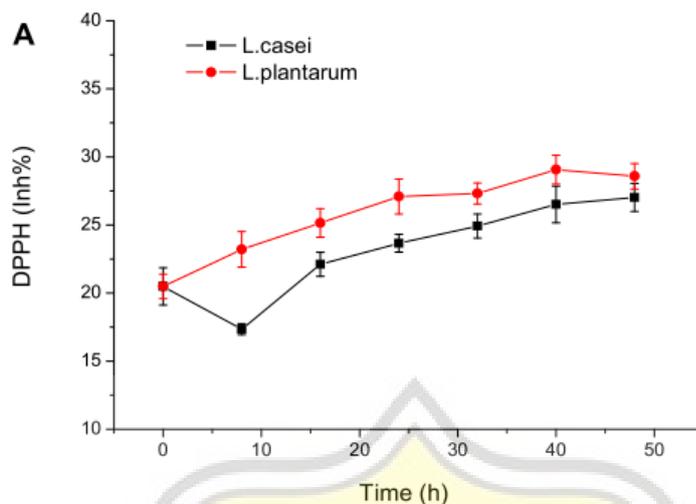
Salah satu kontributor utama aktivitas antioksidan jus buah atau sayuran adalah kandungan senyawa fenoliknya, yang merupakan komponen penting dari produk nabati (Szutowska, 2020). Fenolat memenuhi peran penting dalam pencegahan banyak penyakit yang berkorelasi dengan stres oksidatif, seperti penyakit kardiovaskular atau degeneratif. Sebagian besar penelitian berfokus pada perubahan antioksidan aktivitas, total fenolik, flavonoid dan kandungan antosianin selama proses fermentasi jus. Dalam studi yang dianalisis, baik kenaikan maupun penurunan dari yang disebutkan di atas karakteristik yang diamati. Kandungan fitokimia bervariasi tergantung *strain* yang digunakan; antara lain, penggunaan *L. paracasei* menyebabkan peningkatan kandungan quercetin, sedangkan *L. plantarum* menghasilkan kandungan total fenolik pada umumnya. Sedangkan menurut Liu *et al.*, (2018) *Lactobacillus casei* dan *Lactobacillus plantarum* adalah dua probiotik utama yang secara signifikan meningkatkan aktivitas antioksidan dan antimikroba berbagai makanan karena adanya biosurfaktan.

Fenolik dan flavanoid merupakan salah satu sumber antioksidan yang pada umumnya berasal dari tumbuhan. BAL pada umumnya mampu memodulasi kadar fenolik dan flavanoid produksi hasil fermentasi asal tumbuhan. Berdasarkan penelitian Gao *et al.*, (2019) TPC (*Total Phenolic Compound*) jus kubis yang disterilisasi maupun

difermentasi meningkat secara signifikan. Jus kubis yang disterilkan-fermentasi memiliki lebih banyak TPC daripada yang difermentasi karena sterilisasi menghilangkan mikroorganisme dari jus kubis untuk mendorong pertumbuhan *L. plantarum* NCU116. Faktor lain yang mempengaruhi peningkatan TPC terjadi karena enzim mikroba, seperti dekarboksilase, reduktase, dan tannase, melepaskan aglikon yang sesuai. Di sisi lain, TFC (*Total Flavanoid Compound*) yang disterilkan sebesar $0,19 \pm 0,04$ mg CAE/g secara signifikan lebih tinggi dari yang hanya di fermentasi tanpa sterilisasi dapat mempengaruhi pertumbuhan *L. plantarum* sehingga melemahkan kemampuan memodifikasi flavonoid.

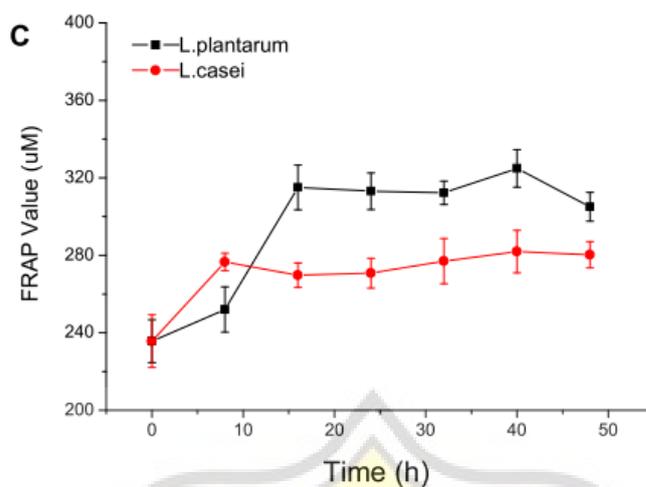
Cara yang paling umum dan banyak digunakan untuk mengetahui nilai aktivitas antioksidan adalah dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrihidrazil) dan FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*). Pengukuran nilai DPPH dilakukan menggunakan spektrofotometer pada gelombang 517nm. Prinsip dari metode DPPH adalah interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH. Apabila semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning agak terang (Rahmadi, 2019).





Gambar 18. Perubahan DPPH pada jus tomat selama fermentasi
(Sumber : Liu *et al.*, 2018)

Berdasarkan gambar 18, perubahan nilai DPPH dengan absorbansi 517nm pada jus tomat selama fermentasi berubah secara signifikan. Perubahan nilai DPPH pada *strain* berbeda – beda yaitu dari 20,48% menjadi 27,02% untuk *L. casei*, dan dari 20,48% menjadi 28,57% untuk *L. plantarum*. Hal yang sama juga dilakukan oleh Zhang *et al.*, (2019) dengan menguji perubahan nilai DPPH pada jus wortel yang difermentasi selama 72 jam menggunakan *strain Lactobacillus Plantarum WZ-01* dengan nilai 76,2% - 81,7%. artinya seiring berjalannya waktu selama fermentasi, jus pada sayuran yang difermentasi mengalami peningkatan perubahan nilai DPPH.



Gambar 19. Perubahan nilai FRAP pada jus tomat selama fermentasi fermentasi
(Sumber : Liu *et al.*, 2018)

Berdasarkan Gambar 19, perubahan nilai FRAP dengan absorbansi 593nm pada jus tomat selama fermentasi berubah secara signifikan. Data menunjukkan peningkatan yang luar biasa dari 235,67 menjadi 305,02 uM untuk *L. casei*, dan dari 235,67 menjadi 280,27 uM untuk *L. plantarum*. Sedangkan pada penelitian Gao *et al.*, (2019) dengan fermentasi jus kubis selama 48 jam dengan konsentrasi 0,3 ml/mL, v/v berubah dari 20% sampai 38%, dan meningkat seiring ditambahkan konsentrasi. Perubahan nilai FRAP meningkat diikuti dengan lamanya waktu fermentasi dan konsentrasi yang digunakan.