

# Studi Literatur Tentang Teknik Liofilisasi untuk Preservasi Bakteri

Shifa Syafira Rachmat dan Maya Shovitri

Departemen Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

*email:* maya@bio.its.ac.id

**Abstrak**—Liofilisasi adalah teknik konservasi dengan proses sublimasi cepat dalam kondisi vakum yang dapat diterapkan untuk produksi *biofertilizer* komersial. Liofilisasi menghasilkan produk bakteri kering yang stabil secara struktur, viabilitas bakteri yang tinggi pada penyimpanan lama dan mudah ditransportasikan. Salah satu tahapan penting dalam liofilisasi adalah kultur bakteri dan agen lioprotektan yang menjaga viabilitas sel selama penyimpanan. Tujuan studi literatur ini adalah untuk mencari medium pertumbuhan alternatif yang ekonomis, serta mencari agen lioprotektan terbaik. Data dari jurnal, prosiding dan laporan penelitian, disusun dan dianalisis secara deskriptif. Hasil studi literatur menunjukkan bahwa lentil hitam (*Vigna mungo*), kacang hijau (*Vigna radiata*), splitpea yellow (*Pisum sativum*), kacang tunggak (*Vigna unguiculata*), ubi kuning (*Ipomea batatas*) dan ubi ungu (*Dioscorea alata*) mampu menjadi medium alternatif sumber nutrisi. Jumlah pertumbuhan bakteri di medium tersebut lebih banyak daripada medium paten *nutrient broth* dan *nutrient agar*. Sedangkan agen lioprotektan terbaik adalah sukrosa 5-10% dan skim milk 10-20% untuk sel tidak terimobilisasi atau skim milk 6-10% untuk sel terimobilisasi.

**Kata Kunci**—Agen Lioprotektan, Biofertilizer, Liofilisasi, Preservasi Sel.

## I. PENDAHULUAN

LIOFILISASI atau *freeze drying* merupakan teknik pengeringan beku yang dilakukan secara cepat melalui sublimasi dalam kondisi vakum [1]. Liofilisasi diketahui telah banyak diaplikasikan pada berbagai macam industri, seperti industri farmasi dan industri pangan. Di industri farmasi, untuk pembuatan obat, antibiotik dan vaksin, sedangkan di industri pangan untuk mempreservasi makanan [2]. Selain itu, teknik liofilisasi juga berpotensi untuk industri pertanian, seperti untuk pembuatan biofertilizer. Teknik ini dapat mengeringkan bakteri dalam biofertilizer dengan struktur dan stabilitas yang tetap terjaga, walau disimpan lama. Bakteri kering ini mudah ditransportasikan dan dapat dihidupkan kembali [3].

Namun teknik liofilisasi memiliki beberapa kekurangan, yaitu antara lain biaya alat dan operasional yang mahal, serta dapat menyebabkan kerusakan struktur protein sel. Untuk mengurangi kerusakan struktur sel ini, maka dibutuhkan agen lioprotektan sebagai pelindung sel [2]. Selain itu, agen lioprotektan pada bakteri juga berfungsi untuk mengurangi terbentuknya es kristal pada bagian dalam maupun luar sel [4].

Salah satu tahapan penting dalam teknik liofilisasi untuk bakteri adalah pembiakan bakteri pada medium pertumbuhan yang dapat membuat bakteri tumbuh optimal dan penambahan senyawa lioprotektan untuk menjaga sel agar tetap bertahan hidup selama penyimpanan.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan studi literatur tentang medium pertumbuhan bakteri alternatif yang bernilai ekonomis dan agen lioprotektan terbaik untuk bakteri tanah.

## II. METODOLOGI

### A. Waktu dan Tempat Penelitian

Selama masa pandemi global virus Corona 19 ada kebijakan Pemerintah secara nasional untuk belajar dan bekerja di rumah, sehingga studi literatur ini pun dilakukan di rumah pada bulan Februari 2021 hingga Mei 2021.

### B. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian studi literatur dengan memperoleh data-data melalui sumber pustaka atau dokumen. Studi literatur merupakan penelitian yang mengkaji atau meninjau secara kritis pengetahuan, gagasan atau temuan yang terdapat di dalam literatur berorientasi akademik, serta merumuskan kontribusi teoritis dan metodologisnya untuk topik tertentu [5].

### C. Sumber Data

Sumber data yang digunakan pada penelitian ini berupa buku, jurnal dan review mengenai, pengertian *biofertilizer* dan peranannya; prinsip kerja, mekanisme, dan viabilitas sel bakteri pada preservasi liofilisasi; faktor-faktor yang mempengaruhi preservasi liofilisasi; jenis-jenis dan mekanisme kerja agen lioprotektan; agen lioprotektan yang digunakan pada genus bakteri *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Azotobacter* sp. dan *Azospirillum* sp.; kandungan media pertumbuhan bakteri; dan media pertumbuhan bakteri alternatif yang bernilai ekonomis.

### D. Analisa Data

Data yang telah dipublikasi di jurnal, prosiding atau laporan penelitian, disusun dan dianalisa secara deskriptif.

## III. HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Kebutuhan Nutrisi Mikroorganisme

Nutrisi merupakan hal yang penting untuk kebutuhan fisiologi mikroorganisme. Setiap mikroorganisme memiliki kebutuhan nutrisi dengan kadar yang berbeda-beda. Nutrisi utama yang dibutuhkan oleh mikroorganisme berupa makronutrisi, mikronutrisi, vitamin dan mineral [6]. Makronutrisi merupakan nutrisi yang dibutuhkan dalam jumlah yang relatif besar, seperti karbon (C), hidrogen (H), oksigen (O) nitrogen (N), fosfor (P), belerang (S), potasium (K), magnesium (Mg), kalsium (Ca), dan natrium (Na) [7].

Mikronutrisi adalah senyawa yang dibutuhkan oleh mikroorganisme dalam jumlah yang lebih kecil dibandingkan

Tabel 1.  
Bahan media alternatif pengganti *nutrient broth*

Bahan Media	Genus	Pertumbuhan Bakteri (OD)	
		Media Alternatif	<i>Nutrient Broth</i>
Lentil hitam* ( <i>V. mungo</i> )	<i>Staphylococcus</i> <i>E. coli</i>	1,25 0,62	0,57 0,77
Kacang hijau* ( <i>V. radiata</i> )	<i>Staphylococcus</i> <i>E. coli</i>	0,69 0,47	0,57 0,77
<i>Yellow Gram/splitpea yellow</i> * ( <i>P. sativum</i> )	<i>Staphylococcus</i> <i>E. coli</i>	1,35 1,02	0,57 0,77

\*Pengolahan bahan baku media alternatif dengan perendaman

Tabel 2.  
Bahan media alternatif pengganti *nutrient agar*

Bahan Media Alternatif	Genus	Pertumbuhan Bakteri (CFU/ml)	
		Media Alternatif	<i>Nutrient Agar</i>
Kacang Tunggak** ( <i>V. unguiculata</i> )	<i>Klebsiella</i> <i>Enterobacter</i>	$4,8 \times 10^3$ $3,5 \times 10^4$	$2,4 \times 10^3$ $1,92 \times 10^4$
Ubi Kuning** ( <i>I. batatas</i> )	<i>E. coli</i>	$2,84 \times 10^7$	$1,71 \times 10^7$
Ubi Ungu** ( <i>D. alata</i> )	<i>E. coli</i>	$1,73 \times 10^7$	$1,71 \times 10^7$

\*\*Pengolahan bahan baku media alternatif dengan perebusan

Tabel 3.  
Harga bahan baku media alternatif cair dibandingkan dengan *nutrient broth*

Kuantitas	Harga Media			
	Lentil Hitam ( <i>V. mungo</i> )	<i>Yellow Gram/Splitpea Yellow</i> ( <i>P. sativum</i> )	Kacang Hijau ( <i>V. radiata</i> )	NB
Per-kg	Rp 83.000	Rp 45.000	Rp 30.000	Rp 3.600.000
Kebutuhan per-liter	100g/1000ml	100g/1000ml	100g/1000ml	13g/1000ml
Produksi skala besar per-liter	Rp 8.300	Rp 4.500	Rp 3.000	Rp 46.800

Tabel 4.  
Harga bahan baku media alternatif cair dibandingkan dengan *nutrient agar*

Kuantitas	Harga Media			
	Kacang Tunggak ( <i>V. unguiculata</i> )	Ubi Kuning ( <i>I. batatas</i> )	Ubi Ungu ( <i>D. alata</i> )	NA
Per-kg (Rp)	Rp 40.000	Rp 11.500	Rp 15.000	Rp 3.300.000
Kebutuhan per-liter	30g/1000ml	300g/1000ml	300g/1000ml	28g/1000ml
besar per-liter	Rp 1.200	Rp 3.450	Rp 4.500	Rp 92.400

dengan makronutrisi dan berperan dalam mendukung fungsi enzim serta pemeliharaan struktur protein [8]. Mikronutrisi terbagi menjadi *trace element* dan *growth factor*. *Trace element* berfungsi sebagai kofaktor enzim seperti besi (Fe), mangan (Mn), tembaga (Cu), kobalt (Co), seng (Zn), nikel (Ni), dan molibdenum (Mo) [9]. *Growth factor* merupakan senyawa organik yang tidak dapat disintesis secara spesifik dan berperan untuk mendukung pertumbuhan suatu mikroorganisme yang terdiri atas asam amino, purin dan pirimidin, serta vitamin [6]. Tidak semua bakteri membutuhkan *growth factor* seperti, *E. coli* memiliki kemampuan untuk mensintesis seluruh purin, pirimidin, asam amino dan vitamin esensial sehingga tidak membutuhkan *growth factor*. Sedangkan *Lactobacillus*, *Streptococcus*, dan *Leuconostoc* membutuhkan *growth factor* sebagai pendukung pertumbuhannya [8].

### B. Media Pertumbuhan Bakteri

Media buatan adalah campuran nutrisi untuk menumbuhkan mikroorganisme. Media pertumbuhan mengandung air untuk menjaga kelembaban dan pertukaran zat; sumber makronutrisi dan mikronutrisi; keadaan tekanan osmotik yang seimbang; derajat keasaman (pH) yang umumnya netral; dan steril [10]. Setiap media memiliki kompleksitas kandungan yang berbeda-beda bergantung pada kebutuhan dan jenis mikroorganisme yang akan ditumbuhkan [11].

Media dapat diklasifikasikan berdasarkan tiga kelas yaitu, bentuk fisik, komposisi kimia dan tipe fungsional.

Berdasarkan bentuk fisik, media terbagi menjadi media cair, media semi padat, dan media padat. Berdasarkan komposisi kimia, media terbagi menjadi media tertentu (*defined media*) dan media kaya (*complex media*). Berdasarkan tipe fungsi yang disesuaikan dengan tujuan penggunaan media, ada media untuk isolasi bakteri; enumerasi bakteri; diferensiasi terhadap kelompok-kelompok bakteri; menjaga kultur di dalam lab; serta menentukan biokimia dan karakteristik pertumbuhan bakteri [12].

*Nutrient agar* dan *nutrient broth* merupakan contoh dari *complex media*. Per liter, *nutrient agar* mengandung *beef extract* (3 g), pepton (5 g), dan agar (15 g), sedangkan *nutrient broth* mengandung *beef extract* (3 g) dan pepton (5 g) tanpa mengandung agar. Komposisi *nutrient agar* dan *nutrient broth* sebagai media pertumbuhan bakteri dapat disubstitusi dengan bahan alternatif yang memiliki kandungan nutrisi yang relatif sama dalam mendukung pertumbuhan bakteri.

Hasil studi literatur mengenai bahan alternatif yang berpotensi untuk menggantikan *nutrient broth* pada Tabel 1 adalah lentil hitam (*Vigna mungo*); kacang hijau (*Vigna radiata*); dan *splitpea yellow* (*Pisum sativum*). Sebanyak 2 gr bahan baku media direndam semalaman dalam air sebanyak 20 ml dan kemudian disaring.

Berdasarkan pertumbuhan 24 jam bakteri, terlihat bahwa lentil hitam (*V. mungo*), kacang hijau (*V. radiata*) dan *splitpea yellow* (*P. sativum*) lebih mendukung pertumbuhan bakteri genus *Staphylococcus* daripada media *nutrient broth* tertera pada Tabel 1. Pertumbuhan dapat mencapai kekeruhan

sel pada OD 600 nm hingga > 1,00 pada media alternatif tersebut. Namun pertumbuhan bakteri *E. coli* relatif lebih rendah atau sama, bila menggunakan media alternatif. Hal ini menunjukkan bahwa pertumbuhan dan kelimpahan bakteri bergantung pada makro dan mikro nutrisi yang terkandung dalam media pertumbuhannya [13].

Lentil hitam, kacang hijau dan *splitpea yellow* termasuk kedalam kelompok tanaman legum yang memiliki kandungan kaya akan protein dan karbohidrat. Kandungan protein pada lentil hitam sebesar 27,13 – 34,41%; kacang hijau 24 – 26% dan *splitpea yellow* 28%. Kandungan karbohidrat pada lentil hitam sebesar 51,48 – 58,73%; kacang hijau 51%; dan *splitpea yellow* 48% [14]. Kandungan protein dan karbohidrat yang tinggi dapat berperan dalam memenuhi kebutuhan makronutrisi C dan N bakteri [15].

Berdasarkan hasil studi literatur yang tertera pada Tabel 2, pembuatan media alternatif padat dapat menggunakan kacang tunggak (*Vigna unguiculata*), ubi kuning (*Ipomea batatas*) dan ubi ungu (*Dioscorea alata*). Pembuatan media alternatif padat berbahan baku kacang tunggak direbus terlebih dahulu sebanyak 2 g dalam 100 ml air. Kemudian biji kacang dikeringkan dan ditumbuk lalu disaring bertingkat dengan kertas saring ukuran 2 mm dan ukuran 0,2 mm. Bubuk kacang yang didapatkan akan digunakan dalam pembuatan media alternatif [16]. Sedangkan media alternatif berbahan baku ubi kuning dan ubi ungu direbus sebanyak 30 g dalam 100 ml air dan disaring. Air filtrat rebusan tersebut digunakan untuk pembuatan media alternatif [27].

Tabel 2 menunjukkan bahan baku kacang tunggak (*V. unguiculata*), ubi kuning (*I. batatas*) dan ubi ungu (*D. alata*) mampu mendukung pertumbuhan bakteri genus *Klebsiella*, *Enterobacter*, dan *E. coli* yang lebih tinggi dari pertumbuhannya pada media *nutrient agar*. Berdasarkan data tersebut, kacang tunggak, ubi kuning dan ubi ungu diduga memiliki makro dan mikro nutrisi yang lebih sesuai untuk kebutuhan pertumbuhan mikroorganisme. Kacang tunggak, ubi kuning dan ubi ungu memiliki kandungan karbohidrat dan protein yang bervariasi. Kacang tunggak mengandung 25,38 – 27,56% protein dan 45,64 – 57,12% karbohidrat. Ubi kuning dan ubi ungu mengandung karbohidrat sebesar 14,86 – 38,92% dan 31,36 – 39,39%. Namun, kedua ubi tersebut memiliki kandungan protein yang rendah yaitu 1,97 – 4,09 % untuk ubi kuning dan 1,05 – 1,81 untuk ubi ungu [17]. Karbohidrat dapat menjadi sumber elemen makro karbon yang dapat mendukung pertumbuhan bakteri untuk berproliferasi. Sedangkan kandungan protein berfungsi sebagai sumber makro elemen nitrogen bagi bakteri [18]. Elemen nitrogen dibutuhkan oleh bakteri untuk proses sintesis asam amino dan nukleotida. Selain karbohidrat dan protein, bahan baku media alternatif tersebut juga mengandung beberapa elemen makronutrisi, mikronutrisi, *trace element* dan vitamin lainnya [6].

Genus *Klebsiella*, *E. coli*, *Staphylococcus*, dan *Enterobacter* berhasil ditumbuhkan dengan menggunakan media alternatif [16]. Selain itu, genus *Azotobacter*, *Azospirillum*, dan bakteri pelarut fosfat juga berhasil ditumbuhkan pada media alternatif, dimana media alternatif tersebut berhasil meningkatkan 10-100x pertumbuhan bakteri *Azotobacter* dan bakteri pelarut fosfat dibandingkan dengan menggunakan *nutrient broth*.

Pengolahan bahan baku seperti perendaman dan perebusan, dilaporkan juga dapat mengurangi nutrisi yang terkandung pada media alternatif dan mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Bahan baku yang diolah dengan perendaman dan perebusan akan mengeluarkan kandungan nutrisi ke dalam air olahan. Legum yang dimasak dengan perendaman kemudian dilanjutkan dengan perebusan hingga bertekstur halus mengalami penurunan kandungan karbohidrat sebanyak 26,70 – 36,86%; protein 14,78 – 21,83%; dan mineral 18,99 – 39,50% [19]. Selain itu, ubi kuning yang direbus selama 20 menit mengalami penurunan kandungan karbohidrat sebanyak 9,32%; protein 0,65%; dan lemak 0,01% [20]. Penurunan kadar protein dan lemak akibat perebusan dapat terjadi karena adanya denaturasi protein dan kerusakan struktur lemak yang disebabkan oleh suhu yang tinggi [21]. Pengurangan kandungan nutrisi pada suatu bahan juga dapat dipengaruhi oleh lama waktu pengolahan.

Walaupun kandungan bahan baku media alternatif mengalami reduksi nutrisi, bahan-bahan tersebut tetap memiliki kemampuan untuk menumbuhkan bakteri dengan angka pertumbuhan bakteri yang lebih tinggi dari media *nutrient broth* dan *nutrient agar* seperti yang ditunjukkan oleh Tabel 1 dan Tabel 2.

Konsentrasi agar yang digunakan dalam pembuatan media alternatif padat juga menjadi pertimbangan untuk mendukung pertumbuhan bakteri. Konsentrasi agar yang digunakan dalam pembuatan media dapat mempengaruhi tingkat kepadatan media yang berpengaruh pada difusi oksigen dan laju pertumbuhan mikroorganisme [37]. Konsentrasi agar yang terlalu tinggi akan mengurangi ketersediaan oksigen pada media. Konsentrasi agar yang umum digunakan pada *nutrient agar* dengan merek HiMedia dan Difco adalah sebesar 15 gram/liter [22].

Semua bahan pembuat media alternatif tersebut (lentil hitam, kacang hijau, *splitpea yellow*, ubi kuning, ubi ungu dan kacang tunggak) mudah didapat dan murah harganya. Total harga untuk membuat 1 liter media *nutrient broth* dan *nutrient agar* adalah sekitar Rp 50,000 pada Tabel 3 dan Rp 100,000 yang tertera pada Tabel 4. Bila dibandingkan dengan media alternatif, maka harga produksi media alternatif menurun menjadi hanya Rp 1,000– Rp 8,000 per-liter. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan bahan media alternatif dapat menurunkan biaya produksi secara signifikan untuk menumbuhkan mikroorganisme dalam skala produksi. Penggunaan media alternatif tersebut hanya membutuhkan biaya sebesar 2-3% dari harga media komersil *nutrient broth*.

### C. Mekanisme Liofilisasi Sel Bakteri

Preservasi mikroorganisme merupakan suatu usaha untuk menyimpan sel agar tetap viabel dengan mengurangi laju metabolisme sel. Liofilisasi atau *freeze drying* merupakan salah satu teknik preservasi mikroorganisme yang terdiri atas beberapa tahapan yaitu, pengkulturan sel bakteri; penambahan kultur bakteri dengan agen protektan; pembekuan; liofilisasi/*freeze drying*; penyimpanan; rehidrasi; dan pemulihan sel [23].

*Freeze drying* memiliki tiga fase pengeringan yaitu *pre-freezing*, *primary drying* dan *secondary drying* [24]. *Pre-freezing* merupakan proses pembekuan sel dengan menurunkan dan memastikan suhu sampel berada dibawah suhu eutektik agar mencegah terjadinya kerusakan sel saat

liofilisasi [25]. Suhu eutektik merupakan titik leleh terendah pada suatu substansi. Kemudian dilanjutkan dengan proses *primary drying* dimana terjadi proses berlangsungnya sublimasi yaitu penghilangan air pada sel yang merubah fase air dalam bentuk padat menjadi gas tanpa melalui fase cair dengan suhu dan tekanan dibawah *triple point*. *Triple point* merupakan kondisi suhu dan tekanan air dimana fase cair, padat dan gas berada dalam kesetimbangan termodinamika yaitu berada pada suhu  $0,01^{\circ}\text{C}$  dengan tekanan  $0,00603\text{ atm}$  [26]. Seiring berjalannya waktu, suhu *primary drying* pada *freeze dryer* akan terus meningkat hingga memasuki proses *secondary drying*. *Secondary drying* merupakan proses berlangsungnya desorpsi, yaitu penyerapan residu air yang tersisa pada sel dengan meningkatkan suhu *freeze dryer* [24]. Selanjutnya sel yang telah diliofilisasi disimpan di tempat penyimpanan dengan suhu yang dingin agar sel tetap terjaga [27]. Sel hasil preservasi yang ingin digunakan harus dipulihkan terlebih dahulu melalui proses rehidrasi [28].

Berdasarkan hasil studi literatur, suhu dan waktu pembekuan yang terbaik adalah berkisar antara  $-20$  hingga  $-30^{\circ}\text{C}$  untuk pendinginan lambat yang berlangsung selama 2 – 3 jam atau 24 jam. Sedangkan suhu untuk pendinginan cepat adalah  $-196^{\circ}\text{C}$ . Proses pembekuan terbagi menjadi dua, yaitu proses pendinginan lambat (*slow freezing*) dan pendinginan cepat (*quick freezing*). Pendinginan lambat memerlukan waktu pembekuan yang lama, sedangkan pendinginan cepat memerlukan waktu pembekuan yang cepat bahkan dapat dihitung dalam hitungan detik. Secara umum pendinginan lambat pada liofilisasi memiliki suhu diatas  $-24^{\circ}\text{C}$  dan pendinginan cepat memiliki suhu antara  $-40^{\circ}\text{C}$  hingga  $-196^{\circ}\text{C}$  bergantung pada jenis sampel yang digunakan [57,58]. Pendinginan lambat menghasilkan ukuran es kristal pada sel yang besar sehingga porositas sel juga akan membesar dan meningkatkan permeabilitas sel serta perpindahan massa uap air. Oleh karena itu penggunaan pendinginan lambat untuk proses *freezing* dapat mengurangi waktu dan biaya liofilisasi. Sedangkan pendinginan cepat menghasilkan ukuran es kristal yang lebih kecil sehingga membutuhkan waktu liofilisasi yang lebih lama [23].

Suhu *freeze drying* berdasarkan hasil studi literatur yang terbaik adalah  $-20$  hingga  $-80^{\circ}\text{C}$  yang berlangsung dibawah suhu eutektik untuk menghindari kehancuran sel. Secara umum suhu eutektik untuk material biologis berada diantara  $-10$  hingga  $-25^{\circ}\text{C}$ , sehingga liofilisasi pada umumnya dimulai pada suhu  $-50$  hingga  $-80^{\circ}\text{C}$  [27].

Selain suhu, waktu saat *freeze drying* juga perlu diperhatikan. Waktu *freeze drying* berdasarkan hasil studi literatur yang terbaik adalah 20 atau 24 jam. Lama waktu *freeze-drying* dapat dipengaruhi oleh jenis dan volume sampel serta wadah yang digunakan. Semakin besar volume maka waktu yang dibutuhkan dalam melangsungkan *freeze drying* akan semakin lama. Namun, waktu tersebut juga dipengaruhi oleh wadah yang digunakan. Semakin besar wadah maka akan menyebabkan luas permukaan sampel menjadi lebih besar mengikuti besarnya wadah, sehingga waktu melangsungkan *freeze drying* akan lebih cepat dibandingkan dengan wadah yang kecil dengan jumlah volume sampel yang sama. Waktu yang digunakan secara umum untuk melangsungkan *freeze drying* adalah selama 24 jam [29].

Suhu penyimpanan terbaik berdasarkan hasil studi literatur adalah  $4^{\circ}\text{C}$ . Sel yang telah melalui proses liofilisasi harus disimpan pada *freezer* agar suhu sel tetap terjaga. Sel pasca liofilisasi umumnya disimpan pada *freezer* dengan suhu antara  $4-8^{\circ}\text{C}$ . Penyimpanan sel pada suhu yang rendah dapat memperpanjang kelangsungan hidup sel. Semakin tinggi suhu tempat penyimpanan semakin cepat produk terdegradasi [27].

Media rehidrasi yang digunakan untuk memulihkan sel pasca liofilisasi bervariasi. Namun, media hasil studi literatur ini menyebutkan bahwa *Phosphate Buffer Saline* (PBS) bagus untuk digunakan, karena memiliki kemampuan memulihkan sel dengan mempertahankan pH sehingga mengurangi terjadinya kerusakan sel [30].

#### D. Liofilisasi Bakteri menggunakan Agen Protektan dan Imobilisasi Gel

Tekanan osmotik dan pembentukan es kristal yang terjadi selama berlangsungnya liofilisasi berpotensi merusak DNA, protein dan membran sel serta menyebabkan denaturasi enzim [31]. Kerusakan tersebut dapat dikurangi dengan penambahan senyawa agen protektan dan imobilisasi sel [32]. Agen protektan berfungsi untuk menggantikan air yang terdapat pada sel agar es kristal tidak terbentuk pada intraseluler maupun ekstraseluler pada suhu dingin sehingga menghasilkan sel yang tetap utuh (*intact*) [33]. Selain itu, agen protektan juga memberikan perlindungan pada sel dengan menstabilkan membran dan menjaga struktur sel agar tetap berpori [34].

Agen protektan terbagi menjadi dua, yaitu agen protektan penetrasi dan non-penetrasi. Mekanisme agen protektan penetrasi memberikan perlindungan pada intraseluler dengan menembus lapisan membran sel. Sedangkan mekanisme agen protektan non-penetrasi memberikan perlindungan pada bagian ekstraseluler yang tidak dapat menembus membran sel karena memiliki berat molekul yang besar [34].

Imobilisasi merupakan teknik pelekatan sel atau partikel pada material pendukung yang berfungsi untuk melindungi dan memberikan stabilitas sel terhadap stres lingkungan. Imobilisasi pada teknik liofilisasi menggunakan jenis pelekatan enkapsulasi, yaitu penyalutan sel dengan suatu bahan penyalut khusus yang memiliki kemampuan untuk melindungi sel dari faktor-faktor penyebab kerusakan selama proses pengolahan dan penyimpanan [35]. Fungsi utama enkapsulasi adalah untuk melindungi sel dari stres lingkungan luar, seperti tingkatan pH yang terlalu asam maupun basa serta suhu dingin pada saat *freeze drying* dan suhu panas pada saat *spray drying* sehingga dapat menjaga viabilitas sel [36].

Alginat dan *K-carrageenan* termasuk kedalam polimer alami yang paling banyak digunakan sebagai material enkapsulasi yang bersifat tidak toksik. Alginat merupakan polimer yang terbuat dari alga cokelat dan tersusun atas monomer  $\beta(1,4)\text{-D-mannuronic acid}$  dan  $\alpha(1,4)\text{-L-guluronic acid}$ . Sedangkan *K-carrageenan* merupakan polisakarida yang terbuat dari alga merah dan tersusun atas unit *D-galactose-4-sulphate* dan *3,6-anhydro-D-galactose* yang terikat oleh ikatan  $\beta 1-4\text{ glycosidic}$  [37].

Penggabungan agen protektan dan imobilisasi sel saat liofilisasi dapat memberikan perlindungan ekstra terhadap kondisi yang ekstrim sehingga presentase viabilitas

mikroorganisme meningkat [32]. Namun di sisi lain, diketahui bahwa konsentrasi dan jenis senyawa agen protektan serta material imobilisasi sel yang digunakan dapat mempengaruhi tingkat viabilitas sel suatu mikroorganisme [38]. Tingkat viabilitas sel juga dipengaruhi oleh jenis mikroorganisme bahkan *strain* dari spesies tertentu yang digunakan.

Berdasarkan hasil studi literatur, agen protektan yang dapat mendukung viabilitas sel bakteri relatif tinggi adalah sukrosa dan *skim milk*, dimana konsentrasi sukrosa 5-10% dapat mendukung viabilitas sel bakteri sekitar 50,8% - 102,3%. Dan konsentrasi *skim milk* 10-20% dapat mendukung viabilitas sel bakteri sekitar 60% - 90%, baik digunakan secara tunggal ataupun ditambahkan dengan agen protektan lain seperti glutamat, meso inositol, dan sukrosa. Selain itu, hasil studi literatur juga menghasilkan agen protektan yang paling banyak digunakan pada sel yang terimobilisasi adalah *skim milk* 6-10% dengan kemampuan mendukung viabilitas sel hingga 89,48% - 92,50%. Secara umum konsentrasi agen protektan yang digunakan untuk memberikan efek optimal pada sel saat liofilisasi berkisar antara 5-20%, dimana konsentrasi 10% merupakan angka yang cukup untuk memberikan efek proteksi sel rata-rata [32].

*Skim milk* merupakan susu tak berlemak yang mengandung lemak sekitar 0,6-1,25%; protein 34-37%; laktosa 49-52%; dan Abu 8,2-8,6% [39]. *Skim milk* tergolong pada jenis agen protektan nonpenetrasi, yaitu memproteksi sel dengan melapisi bagian ekstraseluler tanpa menembus ke dalam sel yang dilaporkan dapat digunakan secara tunggal atau ditambah dengan agen protektan lain seperti laktosa [40]. *Skim milk* bersifat higroskopis yang memiliki kemampuan untuk mengikat air dalam jumlah yang banyak. Selain itu, kandungan kalsium pada *skim milk* dapat meningkatkan viabilitas sel dan kandungan fosfat serta sitrat dapat bersifat sebagai larutan penyangga untuk menstabilkan pH dan menjaga sel saat liofilisasi [41].

Sukrosa (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) merupakan disakarida yang terdiri atas glukosa dan fruktosa. Sukrosa tergolong pada jenis agen protektan "penetrasi pada dinding sel", yaitu memiliki kemampuan proteksi dengan menempel pada dinding sel [40]. Sukrosa dapat menstabilkan membran dan protein pada sel dengan menggantikan air pada sel atau disebut juga dengan teori "water replacement", yaitu pembentukan ikatan hidrogen antara sukrosa sebagai agen protektan dengan protein atau fosfolipid yang menggantikan ikatan hidrogen antara protein atau fosfolipid dengan air [41]. Penggantian air oleh sukrosa dapat mencegah terbentuknya es kristal yang menyebabkan kerusakan sel pada saat liofilisasi. Selain itu, sel yang ditambahkan oleh sukrosa akan membentuk fase *amorphous* atau *glassy matrix* sehingga memberikan stabilitas pada membran sel [32].

Keberhasilan penggunaan agen protektan dan imobilisasi dapat dilihat dengan presentase viabilitas sel pasca liofilisasi diatas 50%. Berdasarkan hasil studi literatur, konsentrasi *skim milk* 6-10% pada sel terimobilisasi serta konsentrasi sukrosa 5-10% dan *skim milk* 10-20% pada sel yang tidak terimobilisasi sukses memproteksi sel pada saat liofilisasi dengan presentase viabilitas yang relatif tinggi yaitu diatas 50%.

#### IV. KESIMPULAN

Berdasarkan studi literatur ini dapat disimpulkan bahwa bahan baku lentil hitam (*Vigna mungo*), kacang hijau (*Vigna radiata*) dan *yellow gram/splitpea yellow* (*Pisum sativum*) dapat menjadi bahan media alternatif cair. Kacang tunggak (*Vigna unguiculata*), ubi kuning (*Ipomea batatas*) dan ubi ungu (*Dioscorea alata*) merupakan bahan media alternatif padat. Bahan tersebut mengandung makro dan mikro nutisi yang sesuai dan mendukung pertumbuhan bakteri. Agen lioprotektan yang potensial untuk digunakan adalah sukrosa 5-10% dan *skim milk* 10-20% untuk sel yang tidak terimobilisasi dan *skim milk* 6-10% untuk sel yang terimobilisasi.

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1] R. Anna, "Function Test of Radiopharmaceutical Freeze Dryer," in *Prosiding Seminar BATAN*. 2013.
- [2] P. Kumar, "Lyophilization: an important formulation technique," *Int. J. Res.*, vol. 7, no. 9, pp. 11--15, 2019.
- [3] A. Altuhaish and A. Tjahjoleksono, "Biofertilizer effects in combination with different drying system and storage period on growth and production of tomato plant under field conditions," *Emirates J. Food & Agric.*, vol. 26, no. 8, 2014.
- [4] S. Alonso, "Novel Preservation Techniques For Microbial Cultures. In Novel Food Fermentation Technologies," in *Novel Food Fermentation Technologies*, Los Angeles, CA: Springer, 2016.
- [5] B. T. Arsyillah and A. Muhiid, "Pendidikan multikultural dalam membentuk karakter pemuda di perguruan tinggi," *Al-Fikr J. Pendidik. Islam*, vol. 6, no. 1, pp. 17--26, 2020.
- [6] M. T. MADIGAN, *Brock Biology of Microorganisms*, 11th ed. Upper Saddle River (NJ): Prentice Hall, 2005.
- [7] K. Talaro, B. Chess, D. S. Wiersema, and P. Sen, *Foundations in Microbiology*. California: McGraw-Hill, 2013.
- [8] E. Chan, "Microbial Nutrition and Basic Metabolism," in *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, London: Elsevier, 2003, pp. 3--33.
- [9] S. Hogg, *Essential Microbiology*. New York: John Wiley & Sons, 2013.
- [10] M. Bonnet, J. C. Lagier, D. Raoult, and S. Khelafia, "Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology," *New microbes new Infect.*, vol. 34, 2020.
- [11] M. A. Oberhardt, R. Zarecki, S. Gronow, and E. Lang, "Harnessing the landscape of microbial culture media to predict new organism-media pairings," *Nat. Commun.*, vol. 6, no. 1, pp. 1--14, 2015.
- [12] C. T. Welsh, *Microbiology a Laboratory Manual*. London: Pearson, 2019.
- [13] K. . Raju, "Alternative culture media for cultivation of bacteria," *Int. J. Sci. Res.*, vol. 9, no. 3, 2019, [Online]. Available: doi: 10.21275/SR20320131331.
- [14] Rezekikasari and R. Harianto, "Modifikasi media alternatif dari sayuran untuk analisis kuantitatif pertumbuhan mikroorganisme asal tanah gambut Kalimantan Barat dengan metode TPC," *Perkeb. dan Lahan Trop.*, vol. 9, no. 1, pp. 1--8, 2019.
- [15] E. TAŞĞIN, "Macronutrients and micronutrients in nutrition," *Int. J. Innov. Res. Rev.*, vol. 1, no. 1, pp. 10--15, 2017.
- [16] A. Annan-Prah, S. Akorli, and K. Sedofia, "Growth and cultural characteristics of selected bacteria on cowpea agar (*Vigna unguiculata*)," *African J. Microbiol. Res.*, vol. 4, no. 23, pp. 2626--2628, 2010.
- [17] A. Sanoussi *et al.*, "Possibilities of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] value chain upgrading as revealed by physico-chemical composition of ten elites landraces of Benin," *African J. Biotechnol.*, vol. 15, no. 13, pp. 481--489, 2016.
- [18] P. H. Sukenda and E. Harris, "Pengaruh pemberian sukrosa sebagai sumber karbon dan probiotik terhadap dinamika populasi bakteri dan kualitas air media budidaya udang vaname, *Litopenaeus vannamei*," *J. Akuakultur Indones.*, vol. 5, no. 2, pp. 179--190, 2006.
- [19] N. Huma, M. Anjum, S. Sehar, M. I. Khan, and S. Hussain, "Effect of soaking and cooking on nutritional quality and safety of legumes," *Nutr. & Food Sci.*, vol. 38, no. 6, 2008.
- [20] R. Ogliari and J. M. Soares, "Chemical, nutritional and sensory characterization of sweet potato submitted to different cooking methods," *Int. J. Res.*, vol. 8, no. 10, pp. 147--156, 2020.

- [21] A. Lamid, Almasyhuri, and D. Sundari, "Pengaruh proses pemasakan terhadap komposisi zat gizi bahan pangan sumber protein," *Media Penelit. dan Pengemb. Kesehat.*, vol. 25, no. 4, 2015.
- [22] Z. MJ and D. Power, "*Difco™ and BBL™ Manual*," *Manual of Microbiological Culture Media*. Maryland: Becton Dickson, 1981.
- [23] C. Morgan and G. Vesey, "Freeze-Drying of Microorganisms," *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press, 2019, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00114-0>.
- [24] K. A. Gaidhani, M. Harwalkar, D. Bhambere, and P. S. Nirgude, "Lyophilization/freeze drying—a review," *World J. Pharm. Res.*, vol. 4, no. 8, pp. 516--543, 2015.
- [25] A. Molnar, T. Lakat, A. Hosszu, B. Szebeni, and A. Balogh, "Lyophilization and homogenization of biological samples improves reproducibility and reduces standard deviation in molecular biology techniques," *Amino Acids*, vol. 53, no. 6, pp. 917--928, 2021.
- [26] A. Baheti, L. Kumar, and A. K. Bansal, "Excipients used in lyophilization of small molecules," *J. Excipients Food Chem.*, vol. 1, no. 1, 2016.
- [27] Labconco, *A Guide to Freeze Drying for the Laboratory*. Kansas: LABCONCO, 2008.
- [28] G. F. de Valdez, G. S. de Giori, A. P. de Ruiz Holgado, and G. Oliver, "Effect of the rehydration medium on the recovery of freeze-dried lactic acid bacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 50, no. 5, pp. 1339--1341, 1985.
- [29] A. Martin, "Pengering Bengkuang dengan Sistem Pengeringan Beku Vakum (Vacuum Freeze Drying System)," Departemen Teknik Mesin: Riau University, 2014.
- [30] A. Rosdiana and Y. E. Hadisaputri, "Studi pustaka tentang prosedur kultur sel," *Farmaka*, vol. 14, no. 1, pp. 236--249, 2016.
- [31] S. Kandil and M. El Soda, "Influence of freezing and freeze drying on intracellular enzymatic activity and autolytic properties of some lactic acid bacterial strains," *Adv. Microbiol.*, vol. 5, no. 6, 2015.
- [32] M. Halim, N. A. M. Mustafa, M. Othman, H. Wasoh, M. R. Kapri, and A. B. Ariff, "Effect of encapsulant and cryoprotectant on the viability and exposure to high acidity, bile salts and heat," *LWT-Food Sci. Technol.*, vol. 81, pp. 210--216, 2017, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.009>.
- [33] A. S. Carvalho, J. Silva, P. Ho, P. Teixeira, F. X. Malcata, and P. Gibbs, "Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria," *Int. Dairy J.*, vol. 14, no. 10, pp. 835--847, 2004.
- [34] M. Darwin, A. de Wolf, and C. de Wolf, "Cryonics," *The Science of Cryonics*, Arizona, 2007.
- [35] R. F. Hasrini, F. R. Zakaria, and D. R. Adawiyah, "Mikroenkapsulasi minyak sawit mentah dengan penyalut maltodekstrin dan isolat protein kedelai," *J. Teknol. dan Ind. Pangan*, vol. 28, no. 1, pp. 10--19, 2017.
- [36] S. Iravani, H. Korbekandi, and S. V. Mirmohammadi, "Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 52, no. 8, 2015.
- [37] M. Cassidy, H. Lee, and J. Trevors, "Environmental applications of immobilized microbial cells: a review," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 16, no. 2, pp. 79--101, 1996.
- [38] D. Stephan, A.-P. M. Da Silva, and I. L. Bisutti, "Optimization of a freeze-drying process for the biocontrol agent *Pseudomonas* spp. and its influence on viability, storability and efficacy," *Biol. Control*, vol. 94, pp. 74--81, 2016.
- [39] G. N. Handayani and N. Ida, "Pemanfaatan susu skim sebagai bahan dasar dalam pembuatan produk olahan makanan tradisional dangke dengan bantuan bakteri asam laktat," *J. Farm. UIN Alauddin Makassar*, vol. 2, no. 2, pp. 56--61, 2014.
- [40] C. Soukoulis, S. Behboudi-Jobbehdar, L. Yonekura, and C. Parmenter, "Impact of milk protein type on the viability and storage stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 using spray drying," *Food Bioprocess Technol.*, vol. 7, no. 5, 2014.
- [41] L. C. Ming, R. Abd Rahim, H. Y. Wan, and A. B. Ariff, "Formulation of protective agents for improvement of *Lactobacillus salivarius* I 24 survival rate subjected to freeze drying for production of live cells in powdered form," *Food Bioprocess Technol.*, vol. 2, no. 4, pp. 431--436, 2009.
- [42] M. Halim, N. A. M. Mustafa, M. Othman, H. Wasoh, M. R. Kapri, and A. B. Ariff, "Effect of encapsulant and cryoprotectant on the viability of probiotic *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 during freeze-drying