

BIOSINTESA FOLAT OLEH BAKTERI ASAM LAKTAT

Siti Nur Purwandhani¹

ABSTRACT

Folate, an important B-group vitamin, participates in many metabolic pathways such as DNA and RNA biosynthesis and amino acid inter-conversions. Mammalian cells cannot synthesize folate; therefore, an exogenous supply of this vitamin is necessary to prevent nutritional deficiency. Folic acid is a composite molecule, being made up of three parts: a *pteridine* ring system (6-methylpterin), *para-aminobenzoic acid*, and *glutamic acid*. The folate biosynthesis pathway in micro-organisms can be divided in several parts. The pteridine proportion of folate is made from GTP, that is synthesized in the purine biosynthesis pathway. p-Aminobenzoic acid originates from chorismate and can be synthesized via the same biosynthesis pathways required for the aromatic amino acids, involving glycolysis, pentose phosphate pathway and shikimate pathway. The third component of a folate molecule is glutamate, that is normally taken up from the medium. This review will focus on biosynthesis and folate production by lactic acid bacteria and the folate level production in fermented product.

Keywords: folate, vitamin, lactic acid bacteria, fermented dairy product

ABSTRAK

Folat, merupakan kelompok vitamin B yang berpartisipasi dalam berbagai jalur metabolisme seperti biosintesis DNA, RNA, dan asam amino. Sel mamalia tidak dapat mensintesis folat; oleh karena itu diperlukan asupan vitamin ini untuk mencegah kekurangan nutrisi. Asam folat adalah molekul campuran, yang terdiri dari tiga bagian: cincin pteridin (6-methylpterin), asam para-aminobenzoat, dan asam glutamat. Jalur biosintesis folat dalam mikroorganisme dapat dibagi dalam beberapa bagian. Pteridin pada folat terbentuk dari GTP, yang disintesis dari jalur biosintesis purin. Asam para-aminobenzoat berasal dari chorismate dan dapat disintesis melalui jalur biosintesis yang sama sebagaimana asam amino aromatik, yang melibatkan glikolisis, lintasan pentosa fosfat dan jalur shikimate. Komponen ketiga dari molekul folat adalah glutamat, yang biasanya diambil dari media. Tulisan ini fokus pada biosintesis dan produksi folat oleh bakteri asam laktat serta jumlah folat dalam produk fermentasi.

Kata kunci: folat; vitamin; bakteri asam laktat; produk fermentasi susu

I. Pendahuluan

Vitamin B₉ atau folat adalah nutrisi penting yang tidak bisa diproduksi oleh mamalia, akan tetapi diproduksi oleh tanaman dan mikroorganisme (Burgess *et al.*, 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 (Scott, 1999).

Folat menjadi perhatian karena perannya yang mampu mencegah resiko cacat lahir pada bayi, misalnya cacat pembuluh syaraf (*neural tube defect/NTD*) (Daly *et al.*, 1995). Menurut World Health Organization (WHO), defisiensi folat merupakan masalah kesehatan masyarakat. Rendahnya status gizi folat menyebabkan resiko terkena osteoporosis (Baines *et al.*, 2007), penyakit jantung koroner (Iyer dan Tomar, 2009),

dementia dan Alzheimer's (Luchsinger *et al.*, 2007), anemia (Fishman *et al.*, 2000) serta meningkatnya resiko kanker (Morrison *et al.*, 1995), juga menurunnya kemampuan mendengar (Durga *et al.*, 2007), dan menurunnya performa kognitif (Mitchell *et al.*, 2004).

Diantara mikroorganisme *food-grade*, terutama BAL diketahui mampu memproduksi folat dalam jumlah banyak (Hugensmith *et al.*, 2010). Produksi folat yang dihasilkan bakteri asam laktat tergantung pada spesies, strain dan kondisi inkubasinya (Lin & Young, 2000). Pada fermentasi yogurt, keju dan produk fermentasi yang lain BAL meningkatkan asam folat, niacin, riboflavin, serta vitamin B₁₂ dan B₆ (Tannock, 1997; Salminen *et al.*, 1998).

¹Program Studi Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Widya Mataram Yogyakarta
Email: siti_nurp@yahoo.co.id

II. Bakteri asam laktat (BAL)

Bakteri asam laktat adalah kelompok bakteri yang dalam kehidupannya dapat memetabolisme karbohidrat (gula) dan menghasilkan asam laktat sebagai hasil utamanya. BAL homofermentatif adalah BAL yang hanya menghasilkan asam laktat sebagai produknya, dan BAL homofermentatif sering digunakan dalam pengawetan makanan, karena produksi asam laktat dalam jumlah tinggi di dalam makanan dapat menghambat pertumbuhan bakteri lainnya yang menyebabkan kebusukan makanan. Pada kelompok bakteri ini asam piruvat yang terbentuk dari jalur glikolisis (EMP) bertindak sebagai penerima hidrogen, dimana reduksi asam piruvat oleh NADH₂ menghasilkan asam laktat (Mayo, 2010).

Bakteri asam laktat (BAL) terdapat dalam bahan makanan baik bahan makanan mentah maupun bahan makanan hasil olahan. Keterlibatan BAL tidak hanya dalam masalah pengawetan makanan tetapi juga mampu menghasilkan senyawa-senyawa yang memiliki kontribusi terhadap sifat sensoris suatu makanan (Daeschel, 1989). BAL telah digunakan secara luas sebagai starter dalam fermentasi makanan karena kemampuannya mengkonversi gula menjadi asam-asam organik sehingga meningkatkan sifat-sifat organoleptik dan rheologi produk (van Hylckama dan Hugenholtz, 2007).

Beberapa strain BAL mempunyai kemampuan mensintesis vitamin B₁₂ dan asam folat. Kecepatan biosintesis tergantung dari temperatur dan lama inkubasi serta faktor-faktor lain. Starter BAL untuk produksi keju, aktif mensintesis vitamin B₁₂ dan asam folat, sehingga keju yang dihasilkan mengandung vitamin B yang cukup tinggi. Penelitian lain menyatakan bahwa hasil proses fermentasi sereal menggunakan BAL akan meningkatkan thiamin dan riboflavin secara signifikan (Shahani, 1983).

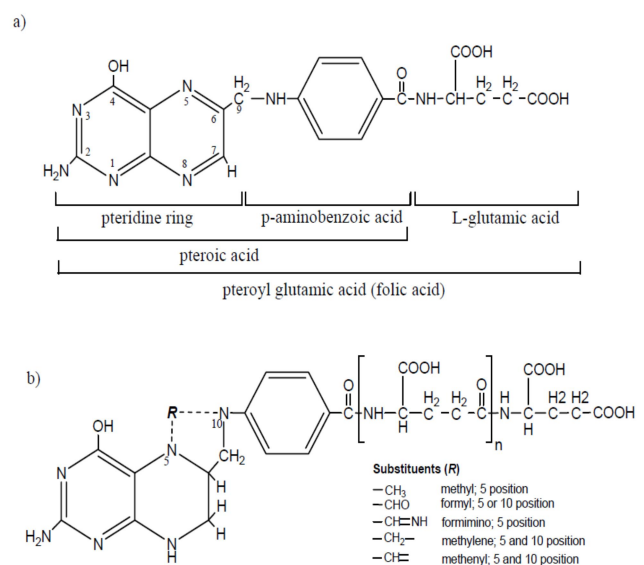
III. Asam folat

Asam folat (Pte Glu, 2-amino-4-hidroksi-6-metilen amino pteridin-L-asam glutamat) tersusun dari asam para amino benzoat yang ujungnya terhubung dengan satu ujung cincin pteridin dan ujung lain dengan L-glutamic acid, atau suatu

pteridin yang diikat melalui gugus metilen pada posisi C-6 gugus amino benzoil glutamate (LeBlanc *et al.*, 2007). Asam folat disebut juga folasin = PGA = pteroyl glutamic acid, dengan rumus kimia sebagai berikut pada Gambar 1a.

Secara alami folat berada dalam keadaan tereduksi, satu karbon menggantikan bentuk pteroylglutamat, berbeda dalam substituent dan jumlah residu glutamil yang menempel pada gugus pteroyl. Fraksi 1-C yang dibawa oleh tetrahidrofolat dapat berupa metil, metilen, metenil, formil dan formimino (Gambar 1b).

Sel mamalia tidak mampu mensintesa asam folat, sehingga harus disuplai dari luar untuk menghindari kekurangan nutrisi. Folat terdapat dalam legum (kedelai dan kacang tanah) sebesar 92 µg/100 g; sayuran berdaun hijau (bayam) mengandung folat 128 µg/100 g, brokoli mengandung folat 65 µg/100 g, kubis 53 µg/100 g; beberapa buah-buahan, seperti pepaya dan mangga mengandung folat 32 µg/100 g, jeruk mengandung folat 26 µg/100 g, pisang 19 µg/100 g; gandum dan roti mengandung folat 16 µg/100 g, serta daging 18 µg/100 g (Subar *et al.*, 1989). Sebagai alternatif lain pemenuhan asam folat adalah dengan mengkonsumsi produk fermentasi bakteri asam laktat, misalnya susu fermentasi seperti yogurt dan kefir.



Gambar 1. Struktur asam folat (pte Glu) 1a) dan struktur folat di alam, tereduksi, satu karbon menggantikan polyglutamat 1b) (Sumber : LeBlanc *et al.*, 2007)

Angka kecukupan gizi folat yang dianjurkan per orang per hari bagi manusia dewasa 200 - 400 µg sedangkan untuk wanita hamil memerlukan 600 µg dan ibu yang menyusui memerlukan 500 µg per hari (Iyer & 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 (Lin and Young, 2000; Forssen *et al.*, 2000). Lebih jauh LeBlanc *et al.*, (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-methyltetrahidrofolat (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 *et al.*, 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 *et al.*, 2011).

IV. Potensi BAL sebagai penghasil folat

Berdasar penelitian Gangadharan & Nanpoothiri (2011), *Lactococcus Lactis* ssp *cremoris* yang diisolasi dari susu segar mampu menghasilkan folat 17,2 µg/L. *Streptococcus thermophilus* yang diisolasi dari susu fermentasi menghasilkan folat 20-150 µg/kg (Smid *et al.*, 2001 dalam Holasova *et al.*, 2004). Penelitian Sybesma *et al.*, 2003 menyatakan bahwa *Lactobacillus helveticus* ATCC 10797 yang merupakan starter pembuatan keju dapat menghasilkan folat 89 µg/L, serta *Streptococcus thermophilus* dari yogurt menghasilkan folat 29-202 µg/L.

Penelitian Wouters *et al.*, 2002 dalam LeBlanc *et al.*, 2011; menyatakan bahwa *Lactococcus lactis* dan *Streptococcus thermophilus* mampu meningkatkan kadar folat pada susu fermentasi, dari 20 – 50 µg/L pada susu segar, setelah difermentasi menjadi yogurt kadar folatnya meningkat menjadi 200 µg/L. Potensi bakteri asam laktat sebagai penghasil folat dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 1. Potensi bakteri asam laktat sebagai penghasil asam folat

No	Spesies – Strain	Sumber	Media/Level folat	Pustaka
1	<i>Lactococcus Lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	Susu segar	Susu skim/ 17,2 (µg/L)	Gangadharan & Nanpoothiri, 2011
2	BAL CM 22 dan CM 28	Susu segar	Susu skim/ 12,5 – 14,2 (µg/L)	Gangadharan <i>et al.</i> , 2010
3	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Susu fermentasi	Susu UHT/ 20-150 (µg/kg)	Smid <i>et al.</i> , 2001 dalam Holasova <i>et al.</i> , 2004
4	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Yogurt	M17/ 29-202 (µg/L)	Sybesma <i>et al.</i> , 2003
5	<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 10797	Swiss-cheese starter	MRS/ 89 (µg/L)	Sybesma <i>et al.</i> , 2003

Folat yang terdapat dalam makanan akan hilang 20 – 75% selama pengolahan dengan air dan dapat rusak waktu pemanasan. Diantara folat-folat yang tereduksi (tetrahidrofolat/THF) mempunyai stabilitas yang berbeda. Dalam beberapa kasus asam folat mempunyai stabilitas yang lebih tinggi

dibanding folat yang tereduksi. Urutan stabilitasnya dari 5-formyl-THF, 5- methyl-THF, 10-formyl-THF, terakhir THF. Stabilitas folat juga tergantung pH; folat yang tereduksi lebih stabil pada pH > 8 dan pH < 2, dan kurang stabil pada pH 4–6. Penurunan stabilitas folat karena

oksidatif meningkat dengan adanya oksigen, cahaya dan panas. Oksidasi menyebabkan pemecahan molekul menjadi bentuk yang tidak aktif, dimana *p*-aminobenzoylglutamate merupakan bentuk utama. Dengan adanya antioksidan dalam jumlah cukup, misalnya asam askorbat dan thiol, akan melindungi folat dari oksidasi. Dengan adanya oksigen, kecepatan reaksi pemecahan folat tergantung pada tipe derivatif folat dan kondisi alami pangan, misalnya pH, komposisi buffer, elemen minor yang bersifat katalitik dan antioksidan (Forsse'n *et al.*, 2000).

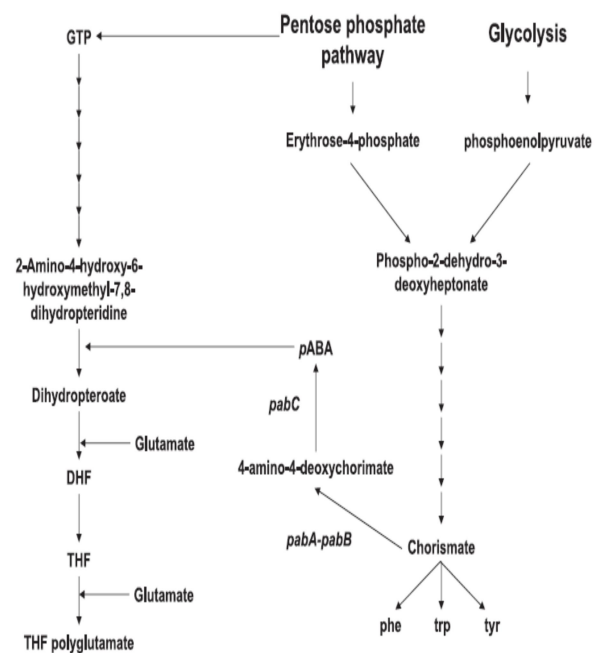
Susu fermentasi potensial sebagai sumber folat karena *folate binding protein* pada susu meningkatkan stabilitas folat dan mendukung bioavailability dari 5-methyltetrahydrofolat maupun asam folat (Verwei *et al.*, 2003).

V. Biosintesa folat oleh BAL

Biosintesis folat (Gambar 2) pada *Lactococcus lactis* berlangsung melalui konversi GTP (guanosa tripospat) dengan 7 tahap menjadi tetrahydrofolat (THF). Dua reaksi kondensasi berperan dalam jalur biosintesis THF. Reaksi kondensasi pertama adalah antara asam para-aminobenzoat dengan 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7, 8-dihydropteridine untuk menghasilkan dihydropteroate. Reaksi kondensasi kedua antara glutamat dengan dihydropteroate membentuk dihydrofolate. pABA (para-aminobenzoic acid) disintesa dari jalur pentosa fosfat; pada jalur ini D-erythrose 4-phosphate terkondensasi dengan phosphoenolpyruvate membentuk chorismate. Dari chorismate terbentuk asam amino aromatik (phenil alanin, triptopan dan tyrosin) dan pABA (Wegkamp *et al.*, 2007).

Molekul folat terdiri dari satu cincin pteridin yang berasal dari 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate (DHPPP) yang berikatan dengan asam para-aminobenzoat (pABA). Jalur *de novo* biosintesis folat oleh bakteri probiotik, terlihat pada Gambar 2.6., memerlukan dua precursor, DHPPP dan pABA. DHPPP dan pABA bisa diproduksi oleh tanaman dan bakteri dari jalur pentosa fosfat (Rossi *et al.*, 2011).

Erythrose 4-phosphate dan phosphoenolpyruvate melalui jalur shikimate akhirnya terbentuk chorismate, yang merupakan cabang menuju biosintesis asam amino aromatik dan pABA. Chorismate diubah oleh enzim aminodeoxychorismate synthase (EC 2.6.1.85) menjadi 4-amino-4-deoxychorismate. Kemudian, pyruvate dipecah oleh 4-amino-4-deoxychorismate lyase (EC 4.1.3.38) untuk membentuk pABA, yang merupakan prekursor terjadinya biosintesa folat. Biosintesa DHPPP terjadi melalui perubahan guanosa trifosfat (GTP) dengan 4 (empat) tahap yang berurutan.

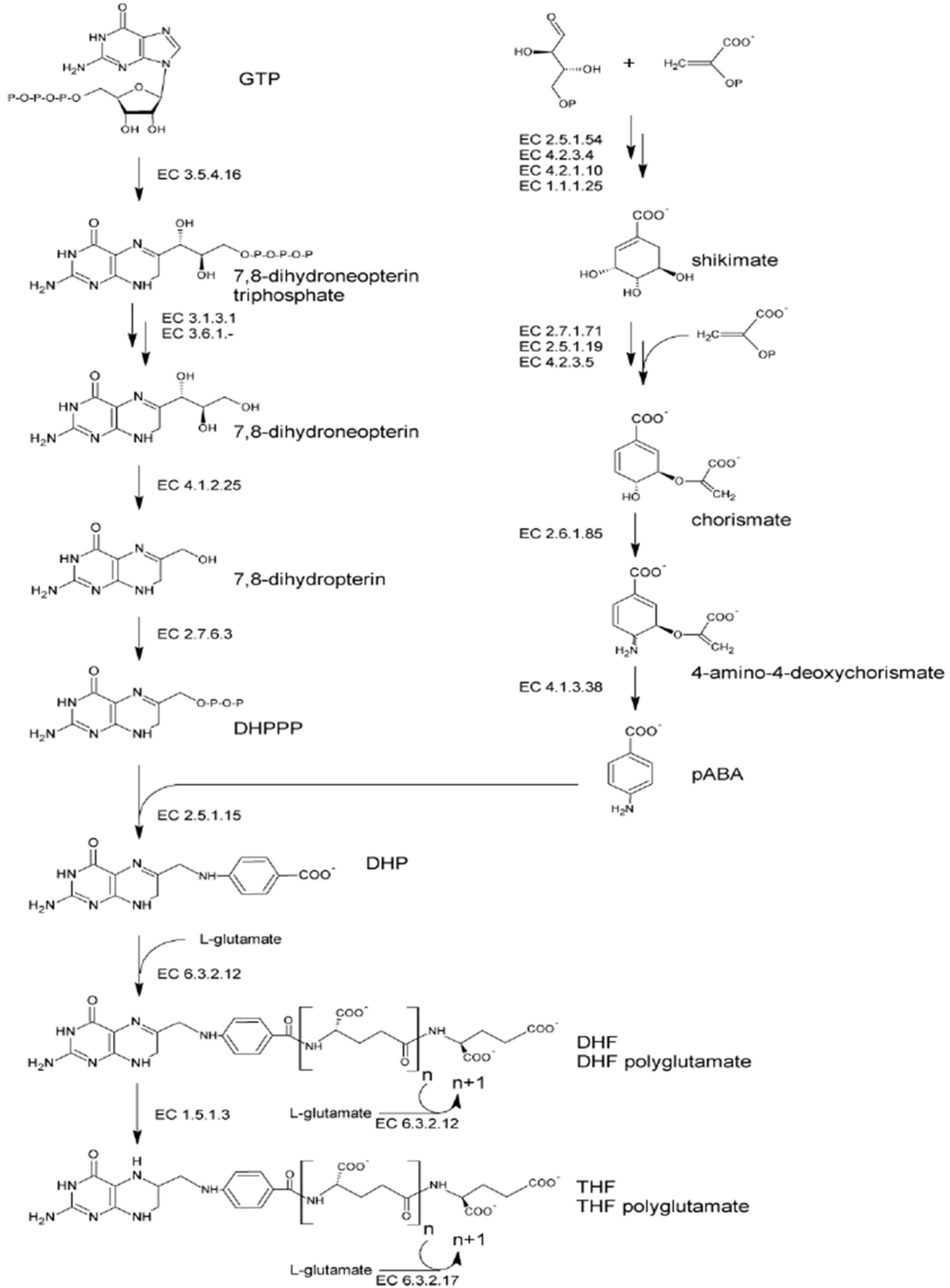


Gambar 2. Jalur biosintesis pABA dan folat pada *L. lactis*, menunjukkan konversi GTP menjadi THF, jalur biosintesis pABA dari chorismate dan perubahan pABA menjadi THF. Sumber : Wegkamp *et al.*, 2007.

Tahap yang pertama dikatalisa oleh GTP cyclohydrolase I (EC 3.5.4.16) dan melibatkan perubahan GTP melalui Amadori rearrangement (pengaturan Amadori), untuk membentuk struktur cincin pterin. Diikuti defosforilasi, molekul pterin berubah menjadi aldolase dan reaksi pyrophosphokinase, yang mengaktifkan pyrophosphorylated DHPPP synthase (EC 2.5.1.15) menghasilkan 7,8-dihydropteroate (DHP). Oleh dihydrofolate synthase (EC 6.3.2.12) DHP diubah menjadi dihydrofolat (DHF). Kemudian direduksi oleh DHF reduktase (EC 1.5.1.3) menjadi kofaktor

tetrahidrofolat (THF) dan dengan penambahan glutamat dalam jumlah banyak oleh folylpolyglutamate synthase (EC 6.3.2.17) untuk menghasilkan THF-polyglutamate. Biosintesa folat berlanjut dengan terbentuknya ikatan C-N yang

terbentuk dari bergabungnya DHPPP dengan pABA. Reaksi kondensasi ini dikatalisa oleh dihydropteorat.



Gambar 3. Jalur *de novo* biosintesis folat oleh bakteri probiotik (Rossi *et al.*, 2011)

VI. Peningkatan kadar folat oleh BAL pada susu fermentasi

Bakteri asam laktat penghasil folat dapat meningkatkan kadar folat pada susu fermentasi. Menurut LeBlanc *et al.*, 2011; BAL yang digunakan untuk industri misalnya *L. lactis* dan *Streptococcus thermophilus* mempunyai kemampuan untuk memproduksi folat, sehingga beberapa produk susu fermentasi, termasuk yogurt, mengandung folat yang lebih tinggi (200 µg/L) dibanding susu segar (20 - 50 µg/L). Demikian pula penelitian Sanna *et al.*, 2005, bahwa susu kambing segar yang tidak terdeteksi mengandung folat, setelah difermentasi menggunakan *Streptococcus thermophilus* kandungan folatnya menjadi 24 - 59 µg/kg, dengan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* menjadi 27 - 32 µg/kg, dengan *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* menjadi 63 µg/kg dan dengan *Lb. helveticus* 52 µg/kg.

Susu segar mengandung folat 50 µg/kg. Setelah difermentasi menggunakan BAL, yogurt yang dihasilkan mengandung folat 70 - 120 µg/kg (Forsse'n *et al.*, 2000). Penelitian lain, oleh Lin & Young (2000), menyatakan sebelum fermentasi, folat dalam medium susu tanpa lemak 23 µg/L, setelah fermentasi 6 jam menggunakan *St. thermophilus* MC jumlah folat menjadi 59,6 µg/L.

VII. Penutup

Folat adalah nutrisi penting yang berfungsi dalam sintesa DNA, RNA dan beberapa asam amino. Folat bisa dihasilkan oleh beberapa bakteri asam laktat, misalnya *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus plantarum*. Biosintesis folat di dalam sel bakteri asam laktat terjadi dari 3 komponen dasar yaitu GTP, para-amino benzoat dan asam glutamat. Folat yang bisa dihasilkan bakteri asam laktat selama fermentasi susu berkisar antara 17,2 - 202 mg/L

VIII. Daftar pustaka

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.

Daly, L.E, Kirke, P. N., Molloy, A., Weir, D. G., dan Scott, J. M. (1995). Folate levels and neural tube defects. *Journal American Medical Association* 247: 1698-702.

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.

Daeschel, M.A. (1989). Antimicrobial substance of lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*. 9(33): 5383-5391.

Durga, J., Verhoef, P.V, 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.

Fishman, S. M., Christian, P., and West Jr., K. P. (2000). The Role of Vitamins in the Prevention and Control of Anaemia. *Health Nutrition* 3(2): 125 - 150.

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., Nampoothiri, K. M. (2011). Folate production using *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* with Implications for Fortification of Skim Milk and Fruit Juices. *LWT - Food Science and Technol.* 44: 1859 - 1864.

- Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Pandey, A., and Nampoothiri, K. M. (2010). Folate-producing lactic acid bacteria from cow's milk with probiotic characteristics. *International Journal Of Dairy Technology* 63 (3): 339-348.
- Holasová, M., Fiedlerová, V., Roubal, P., and Pechačová, M. (2004). Biosynthesis of Folates by Lactic Acid Bacteria and Propionibacteria in Fermented Milk. *Czech Journal Food Science* Vol. 22, No. 5: 175–181.
- Hughenoltz, J. (2008). The Lactic Acid Bacterium as a Cell Factory for Food Ingredient Production. *International Dairy Journal* 18: 466–475.
- 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
- 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 Clinical Nutrition* 84: 156–61.
- Lin, M. Y. dan Young, C.M. (2000). Folate Level in Culture of Lactic Acid Bacteria. *International Dairy Journal* 10: 409 – 413.
- LeBlanc, J.G., Savoy de Giori, G., Smid, E. J., Hugenholtz, J., dan Sesma, F. (2007). Folate production by lactic acid bacteria and other food-grade Microorganisms. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. A. Méndez-Vilas: 329 -339
- LeBlanc, J.G., Lainço, J.E., Juarez del Valle, M., Vannini, V., van Sinderen, D., Taranto, M.P., Font de Valdez, G., Savoy de Giori, G., dan Sesma, F. (2011). B-Group vitamin production by lactic acid bacteria – current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology* 111: 1297- 1309.
- Luchsinger, J. A., Tang, M. X., Miller, J., Green, R., dan Mayeux Arch, R. (2007). Relation of Higher Folate Intake to Lower Risk of Alzheimer Disease in the Elderly. *American Medical Association* 64: 86 -92
- Mayo, B., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez-Martin, P., dan Bardowski, J. (2010). *Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. Dalam: Mozzì, F., Raya, R, R, dan Vignolo, G. M. (ed). Biotechnology of lactic acid bacteria : Novel Application*, hal 3-33. John Wiley & Sons, Inc. Publication. IOWA. USA.
- Mitchell, L. E., Adzick, N S., Melchionne, J., Pasquariello, P. S, Sutton, L. N., dan Whitehead, A. S. (2004). Spina Bifida. *The Lancet* 364: 1885–1895.
- Morrison, H. I., Schaubel, D., Desmeules, M., dan Wigle, D. T. 1996. Serum folate and risk of fatal coronary heart disease. *Journal of American Medical Association*, June 26, 275 : 1893-1896.
- Rossi, M., Amaretti, A., dan Raimondi, S. (2011). Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients* 3:118-134.
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W. M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., dan Sandholm, T. M. (1998). Demonstration of

- Safety of Probiotics - a Review. *International Journal of Food Microbiology* 44: 93 - 106.
- Sanna, M. G., Mangia, N. P., Garau, G., Murgia, M. A., Massa, T., Franco, A. and Deiana, P. (2005). Selection of folate-producing lactic acid bacteria for improving fermented goat milk. *Italian Journal Food Science* 2(17): 143–154.
- Scott, J. M. (1999). Folate and vitamin B12. *Proceedings of the Nutrition Society* 58 : 441–448
- Shahani, K.M. (1983). *Nutritional Impact of Lactobacillic Fermented Foods. Dalam: Bo Hallgren, M. D. (ed). Nutrition and the Intestinal Flora.* Almqvist & Wiksell International Stockholm/Sweden
- Sybesma, W., Starrenburg, M., Tijsseling, L., Hoefnagel, M. H. N., and Hugenholtz, J. (2003). Effects of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria. *Applied And Environmental Microbiology* 69 (8): 4542–4548.
- Tannock, G. W. (1997). Probiotic Properties of Lactic-acid Bacteria : Plenty of Scope for Fundamental R & D. *Tibtech July*. 15: 270 – 274
- van Hylckama Vlieg, J. E., Hugenholtz, J. (2007). Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavour and health benefits. *International Dairy Journal* 17 :1290–1297
- Verwei, M., Arkbåge, K., Havenaar, R., van den Berg, H., Witthoft, C., and Schaafsma, G. (2003). Folic Acid and 5-Methyltetrahydrofolate in Fortified Milk Are Bioaccessible as Determined in a Dynamic In Vitro Gastrointestinal Model. *Nutrition Journal* 133: 2377-2383.
- Wegkamp, A., Oorschot, W. V., De Vos, W. M., and 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.