

METABOLISME PREBIOTIK OLEH KANDIDAT PROBIOTIK ISOLAT ASI SEBAGAI DASAR PENGEMBANGAN PRODUK SINBIOTIK

[Prebiotics Metabolism by Probiotics Candidates Isolated from Breast Milk as a Basis for Development of Sinbiotics Product]

Lilis Nuraida^{1,2)*}, Nur Rita Mardiana²⁾, Didah Nur Faridah^{1,2)}, dan Hana¹⁾

¹⁾ South East Asian Food and Agriculture Science and Technology (SEAFast) Center, Institut Pertanian Bogor

²⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

Diterima 05 Juli 2011 / Disetujui 22 November 2011

ABSTRACT

Five *Lactobacillus* strains and two *Pediococcus* strains isolated from breast milk were evaluated for their ability to metabolite oligosaccharide known as prebiotics, i. e. inulin, FOS, GOS, FOS:GOS (1:9), and inulin:GOS (1:9). The result shows that all *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains were able to grow in medium with prebiotics as carbon sources. The best growth was observed when GOS or FOS were used as carbon source, while inulin was the worst. The best growth in all oligosaccharides was observed in *Lactobacillus* R23H, followed by *L. rhamnosus* B16, *L. rhamnosus* R23, and *L. rhamnosus* R14. Further study on R23H (heterofermenter) and R23 (homofermenter) shows that there was no difference in metabolizing oligosaccharides between heterofermenter and homofermenter. GOS was the best prebiotic used by the both lactic acid bacteria as shown by rapid decrease of total sugar. The reducing sugar in medium containing GOS was higher than other oligosaccharides. The decrease of total sugar in medium containing inulin was the slowest, indicating that inulin was the most difficult prebiotic to be metabolized by the lactic acid bacteria. When inulin mixed with GOS in the ratio 1:9, the rate of decreasing of total sugar in the medium was similar to the medium with GOS as single carbon source, however it cannot be distinguished if the role of inulin took place after GOS disappeared. The rate of sugar metabolism was in accordance with the growth of lactic acid bacteria isolates in medium containing prebiotics. *L. rhamnosus* R23 was used in sinbiotic fermented milk product combine with FOS, inulin, and inulin:GOS (1:9). After fermentation, remaining sugar in skim milk with additional prebiotics was higher than skim milk without additional prebiotics. Remaining sugar on fermented milk product includes the amount of prebiotic that will be used as carbon source in colon. Combination of potential probiotic *L. rhamnosus* R23 and mixture of inulin:GOS (1:9) could be used to make sinbiotic fermented milk product.

Key words: lactic acid bacteria, prebiotic, inulin, FOS, GOS

PENDAHULUAN

Probiotik didefinisikan sebagai sel mikroba hidup yang jika dikonsumsi dalam jumlah yang cukup akan memberikan manfaat kesehatan (FAO/WHO, 2006). Mikroba yang umum digunakan adalah bakteri asam laktat (BAL). Ducluzeau *et al.* (1991) menyatakan beberapa BAL probiotik yang umum dan aman digunakan antara lain adalah *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Sterptococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium adolescentis*, dan *Bifidobacterium coagulans*.

Prebiotik didefinisikan sebagai bahan pangan yang tidak dapat dicerna (oleh manusia) dan memiliki manfaat yang menguntungkan dengan menstimulasi pertumbuhan dan aktivitas beberapa bakteri yang terdapat pada usus sehingga dapat meningkatkan kesehatan inang (Gibson, Roberfroid, 1995). Fruktooligosakarida (FOS), galaktooligosakarida (GOS), dan inulin adalah beberapa jenis prebiotik yang banyak digunakan (Bouhnik *et al.*, 1999). Baik inulin, FOS maupun GOS bukan merupakan substrat bagi enzim hidrolitik pada saluran pencernaan bagian atas (Macfarlane *et al.*, 2008; Gropper *et al.*, 2009).

Penggunaan probiotik pada produk pangan fungsional seringkali disertai dengan penambahan prebiotik. Hal ini dilakukan untuk mendukung pertumbuhan bakteri probiotik yang digunakan dan sekaligus memperoleh manfaat dari prebiotik yang ditambahkan. Kombinasi probiotik dan prebiotik dalam suatu produk pangan dikenal dengan istilah sinbiotik (Gibson dan Roberfroid, 1995). Shin *et al.* (2000) meneliti pengaruh beberapa jenis prebiotik komersial yaitu inulin, FOS, dan GOS terhadap probiotik *Bifidobacterium spp.* Dengan penambahan prebiotik pada media, proliferasi sel *Bifidobacterium spp.* menjadi lebih cepat. Bouhnik *et al.* (1999) meneliti pengaruh pemberian susu fermentasi yang mengandung probiotik *Bifidobacterium sp.* dan prebiotik FOS terhadap manusia. Hasilnya menunjukkan bahwa terdapat peningkatan jumlah *Bifidobacteria* pada feses manusia yang mengonsumsi susu fermentasi dibandingkan dengan yang tidak mengonsumsi susu fermentasi. Penelitian yang dilakukan Moro *et al.* (2002) juga menunjukkan bahwa pemberian susu formula yang difortifikasi dengan campuran FOS dan GOS dengan konsentrasi 0,4 g/100ml atau 0,8 g/100ml selama 28 hari menunjukkan peningkatan *Bifidobacteria* dan *Lactobacillus* dalam feses. Penambahan campuran prebiotik tersebut menghasilkan formulasi yang lebih mendekati komposisi ASI di-bandingkan dengan penambahan satu jenis prebiotik saja.

*Korespondensi Penulis :
Email : lilis@seafast.org

Pemanfaatan berbagai jenis prebiotik oleh probiotik bersifat spesifik. Prebiotik yang dapat dimanfaatkan oleh satu jenis probiotik belum tentu dapat digunakan pula oleh jenis probiotik lainnya (Manning *et al.*, 2004), tergantung dari kemampuan mikroorganisme tersebut dalam memproduksi enzim yang diperlukan untuk memetabolisme prebiotik. Oleh karena itu kemampuan BAL yang berpotensi sebagai probiotik untuk menggunakan prebiotik sebagai sumber karbon dan energi perlu dikaji.

Beberapa BAL asal ASI memiliki potensi sebagai probiotik, penelitian yang dilakukan oleh Nuraida *et al.* (2007) menunjukkan bahwa beberapa strain BAL yang diisolasi dari ASI berpotensi sebagai probiotik karena memiliki kemampuan untuk bertahan pada kondisi asam dan resisten terhadap garam empedu. Dalam penelitian ini akan dikaji kemampuan isolat BAL asal ASI untuk menggunakan beberapa jenis prebiotik untuk pertumbuhannya, yaitu inulin, FOS dan GOS. *European Commission* (EC) telah merekomendasikan kombinasi prebiotik FOS:GOS (1:9) sebanyak 0,8 g/100ml untuk produk susu formula (SCF, 2001a; SCF, 2001b), sehingga dalam penelitian ini juga dilakukan pengujian untuk kombinasi prebiotik FOS:GOS (1:9) dan inulin:GOS (1:9).

Probiotik dan prebiotik yang terdapat dalam produk sinbiotik harus sampai pada kolon untuk dapat meningkatkan kesehatan saluran pencernaan inang. Oleh karena itu, untuk memperoleh manfaat dari prebiotik dan probiotik secara optimal harus dapat dipastikan bahwa prebiotik yang ditambahkan tidak habis digunakan oleh probiotik selama proses fermentasi. Dengan demikian kejelasan proses dan waktu metabolisme dari prebiotik yang digunakan juga menjadi penting untuk diketahui.

Pada penelitian ini diseleksi kandidat probiotik isolat ASI yang mampu memanfaatkan inulin, FOS, GOS, kombinasi FOS:GOS, dan kombinasi inulin:GOS sebagai sumber karbon, dan dipelajari metabolismenya selama pertumbuhan BAL pada media yang mengandung probiotik, serta dipilih kombinasi probiotik dan prebiotik terbaik untuk diaplikasikan dalam produk susu fermentasi.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah fruktooligosakarida (QHTFOS-G50L™), galaktooligosakarida (QHTGOS-50L™), inulin (Frutafit IQ™), kultur BAL asal ASI diperoleh dari SEAFast Center IPB. Bahan yang digunakan untuk media pertumbuhan diantaranya adalah media MRS (*deMan, Rogosa and Sharpe*) broth, MRS agar, yeast extract (Oxoid™), susu skim (Sunlac™), protease peptone (Difco™), Tween 80, K₂HPO₄·3H₂O, MgSO₄·7H₂O, MnSO₄·4H₂O (Merck™), dan sodium asetat (Cica™). Bahan-bahan untuk analisis oligosakarida meliputi larutan fenol 5%, H₂SO₄ pekat, Na₂CO₃, NaHCO₃, KCN, FeNH₄(SO₄)₂ (Merck™), dan potassium ferricyanide (Cica™). Bahan yang digunakan untuk analisis asam laktat adalah NaOH 0.1 N (Cica™), indikator penolftalein (Merck™). Alat-alat yang digunakan meliputi membran filter steril 0,2 µm, sentrifus, spektrofotometer dan peralatan standar untuk analisa mikrobiologi.

Persiapan kultur bakteri asam laktat

Tujuh BAL asal ASI digunakan dalam penelitian ini yaitu *Lactobacillus rhamnosus* B16, *Lactobacillus rhamnosus* R14, *Lactobacillus rhamnosus* R21, *Lactobacillus rhamnosus* R23, *Lactobacillus* R23H, *Pediococcus pentosaceus* 1-A22, dan *Pediococcus pentosaceus* 1-A23. Kultur stok disimpan pada suhu -20°C dengan konsentrasi gliserol dalam medium (MRSB) sebesar 20%. Sebelum digunakan kultur diaktifkan terlebih dahulu pada medium MRSB (37°C, 24 jam).

Seleksi BAL isolat ASI yang dapat memanfaatkan prebiotik sebagai sumber karbon

Media uji yang digunakan adalah media berbasis MRSB yang diganti kandungan glukosanya dengan beberapa jenis prebiotik yang digunakan. Media dibuat dengan mencampurkan protease pepton (10 g), yeast extract (5 g), sodium asetat (5 g), Tween 80 (1 g), dan akuades (1 L). Kemudian pH media diatur dengan menggunakan HCl dan NaOH hingga mencapai 6,4-6,6 dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sumber mineral yang terdiri dari K₂HPO₄·3H₂O (2 g/1L media), MgSO₄·7H₂O (0,2 g/1L media), MnSO₄·4H₂O (0,05 g/1L media) masing-masing dibuat terpisah dengan membuat larutan stok yang memiliki konsentrasi 100 kali konsentrasi media. Selanjutnya larutan mineral disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit.

Konsentrasi prebiotik FOS, GOS, inulin, campuran FOS:GOS (1:9) dan inulin:GOS (1:9) pada media berbasis MRSB adalah sebesar 5%. Terlebih dahulu dibuat larutan stok prebiotik dengan konsentrasi 10 kali konsentrasi media, kecuali untuk inulin dibuat larutan stok dengan konsentrasi 2 kali konsentrasi media. Larutan prebiotik tersebut disterilisasi dengan menggunakan filter steril 0,2 µm. Penambahan larutan prebiotik ke dalam medium steril dilakukan sesaat sebelum media digunakan. Kemudian sebanyak 0,1 ml kultur BAL ditambahkan pada tabung reaksi berisi media uji untuk selanjutnya dilakukan inkubasi pada 37°C selama 24 jam. Analisis total BAL dilakukan setelah inkubasi selama 24 jam dengan metode cawan tuang (BAM, 2001) menggunakan media MRSA.

Uji metabolisme prebiotik oleh BAL isolat ASI

Metabolisme prebiotik oleh BAL diamati dengan menganalisis kandungan gula dan asam pada media pertumbuhan yang digunakan. Kultur BAL yang terpilih berdasarkan seleksi pada tahap sebelumnya (*L. rhamnosus* R23 dan *Lactobacillus* R23H), ditumbuhkan pada media berbasis MRSB dengan prebiotik sebagai sumber karbon. Media berbasis MRSB dan kombinasi prebiotik yang digunakan sama dengan pengujian pada tahap seleksi, kecuali pada tahap ini larutan prebiotik dipasteurisasi pada suhu 85°C selama 30 menit.

Sebanyak 1 ml kultur diinokulasikan pada 100 ml media. Setiap 2 jam dari jam ke-0 sampai ke-12 dan selanjutnya pada jam ke-24 dilakukan analisis pertumbuhan sel dengan metode spektrofotometri (Widdel, 2007), analisis total gula metode fenol-sulfat (Dubois *et al.*, 1956), gula pereduksi metode Park-Johnson (Takeda, 2003), persen asam laktat (AOAC, 1998), dan pH (AOAC, 1998). Untuk analisis total gula dan gula pereduksi, persiapan sampel dilakukan dengan memisahkan BAL dengan cara mensentrifusi media selama 10 menit pada

kecepatan 4000 rpm. Kemudian sebanyak 1 ml supernatan dipipet dan ditambahkan NaOH 1 N sampai pH netral (2 tetes). Sebelum dianalisis, sampel diencerkan terlebih dahulu dengan akuades hingga mencapai konsentrasi pada kisaran konsentrasi kurva standar.

Aplikasi pada produk susu fermentasi

Kultur BAL terpilih (*Lactobacillus* R23) sebanyak 2% ditumbuhkan pada media susu skim 10% yang telah disterilisasi pada suhu 100°C selama 30 menit. Media susu skim yang telah diinokulasi dengan BAL diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dan digunakan sebagai kultur starter. Media susu fermentasi yang digunakan adalah susu skim 12% (b/v). Kombinasi prebiotik yang digunakan adalah FOS, Inulin, dan campuran inulin:GOS (1:9). Prebiotik yang telah dipasteurisasi pada 85°C selama 30 menit ditambahkan ke dalam media susu skim sebanyak 5% sesaat sebelum media digunakan. Media susu skim tanpa penambahan prebiotik digunakan sebagai pembanding. Selanjutnya, 1% kultur starter diinokulasikan ke dalam media susu skim dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Analisis dilakukan pada 0, 24 dan 48 jam terhadap total BAL dengan menggunakan metode hitungan cawan (BAM, 2001), analisis total gula metode fenol-sulfat (Dubois *et al.*, 1956), gula pereduksi metode Park-Johnson (Takeda, 2003), asam laktat (AOAC, 1998), dan pH (AOAC, 1998). Persiapan sampel untuk analisis total gula dan gula pereduksi dilakukan dengan metode yang sama seperti pada tahap sebelumnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

BAL isolat ASI yang dapat memanfaatkan prebiotik sebagai sumber karbon

Hasil perhitungan pertumbuhan BAL menunjukkan bahwa ketujuh isolat yang digunakan mampu tumbuh lebih baik pada media dengan prebiotik sebagai sumber karbon dibandingkan pada media kontrol yang tidak mengandung gula. Hal ini terlihat dari jumlah koloni yang tumbuh pada media dengan prebiotik lebih banyak dari pada jumlah koloni pada media kontrol (Tabel 1). Selisih jumlah BAL pada media kontrol dan media dengan prebiotik disajikan pada Gambar 1.

Tabel 1. Jumlah BAL dalam media berbasis MRSB dengan prebiotik sebagai sumber karbon

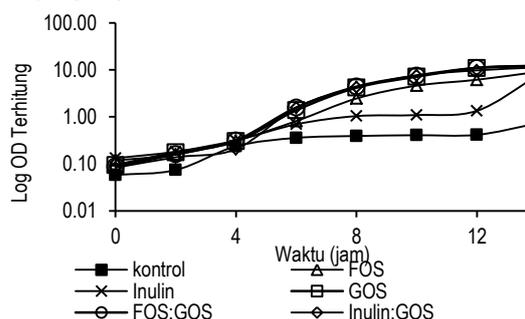
Kode Isolat	Jumlah BAL (Log CFU/ml)					
	Kon-trol	Inulin	FOS	GOS	FOS:GOS (1:9)	Inulin:GOS (1:9)
A22	8,47	8,35	9,26	8,72	9,08	8,81
A23	9,19	9,45	9,64	9,40	9,35	9,28
B16	8,42	9,12	9,72	9,69	9,86	9,94
R14	8,59	9,01	9,89	9,85	9,66	9,51
R21	8,55	9,00	9,56	8,83	9,17	9,53
R23	8,83	9,54	9,84	9,93	10,00	9,89
R23H	8,19	9,54	10,02	10,72	10,04	9,94

Pada media dengan inulin sebagai sumber karbon, secara umum pertumbuhan seluruh isolat terlihat lebih rendah dibandingkan dengan media yang mengandung jenis prebiotik lain. Inulin mempunyai derajat polimerisasi kurang dari 25

dengan rata-rata sebesar 14 (Manning dan Gibson, 2004). Penelitian yang dilakukan Shin *et al.* (2000) menunjukkan inulin paling tidak efektif dalam menstimulir pertumbuhan *Bifido-bacterium* Bf-1 dan Bf-6 pada media susu skim dibandingkan dengan sumber prebiotik uji lainnya yaitu FOS dan GOS yang memiliki nilai DP<10. Hal ini disebabkan kemampuan BAL dalam memfermentasi oligosakarida dengan DP>10 hanya setengah dari kecepatan fermentasi oligosakarida dengan DP<10.

Seluruh isolat ASI yang diuji menunjukkan pertumbuhan yang baik pada media dengan FOS sebagai sumber karbon. Pada Gambar 1 terlihat bahwa *Lactobacillus* R23H menunjukkan jumlah pertumbuhan tertinggi pada media dengan FOS sebagai sumber karbon. FOS lebih mudah difermentasi dibandingkan dengan inulin karena FOS memiliki nilai DP 2-7 (Gibson dan Angus, 2000) dan FOS juga dapat dihasilkan melalui hidrolisis inulin. Pertumbuhan kandidat probiotik isolat ASI pada media dengan GOS sebagai sumber karbon menunjukkan hasil yang berbeda untuk setiap isolat. *L. rhamnosus* R14, *L. rhamnosus* R23, dan *Lactobacillus* R23H menunjukkan tingkat pertumbuhan yang cukup tinggi dan hampir sama dengan pertumbuhannya pada media FOS. Tetapi keempat isolat lain menunjukkan pertumbuhan yang lebih rendah dari pertumbuhan pada media FOS. Kombinasi prebiotik FOS:GOS (1:9) dan inulin:GOS (1:9) mampu dimanfaatkan dengan baik oleh sebagian besar isolat BAL yang diujikan yaitu *L. rhamnosus* R23, *L. rhamnosus* B16, *L. rhamnosus* R14, *L. rhamnosus* R21, dan *Lactobacillus* R23H (Gambar 1).

Kemampuan setiap isolat dalam memproduksi enzim yang dapat menghidrolisis prebiotik merupakan faktor yang sangat berpengaruh terhadap efektivitas dari prebiotik. Penelitian Barrangou *et al.* (2003) yang diacu di dalam Saulnier *et al.* (2007) menunjukkan adanya peran dari fruktosidase dalam hidrolisis FOS oleh *L. acidophilus*. Yoon (2008) meneliti peran enzim galaktosidase yang dihasilkan beberapa strain *L. curvatus* dan *L. mesenteriodes* dalam memetabolisme oligosakarida kedelai. Hasilnya menunjukkan bahwa terdapat perbedaan aktivitas enzim galaktosidase dari masing-masing strain yang diuji.



Gambar 1. Perbedaan nilai log BAL pada media fermentasi berbasis MRSB dengan prebiotik sebagai sumber karbon dibandingkan dengan kontrol (tanpa gula)

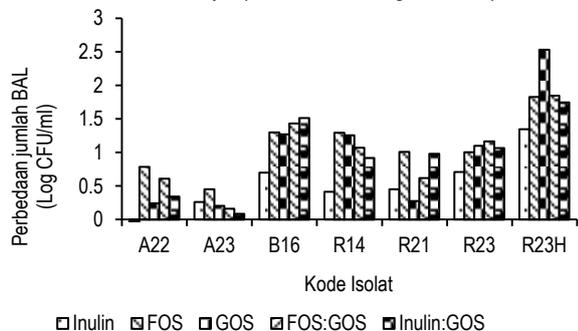
Metabolisme prebiotik oleh BAL isolat ASI

Pada uji metabolisme prebiotik oleh BAL digunakan *L. rhamnosus* R23 yang bersifat homofermentatif dan *Lactobacillus* R23H yang bersifat heterofermentatif. *L. rhamnosus* R23 dipilih karena memiliki kemampuan untuk me-

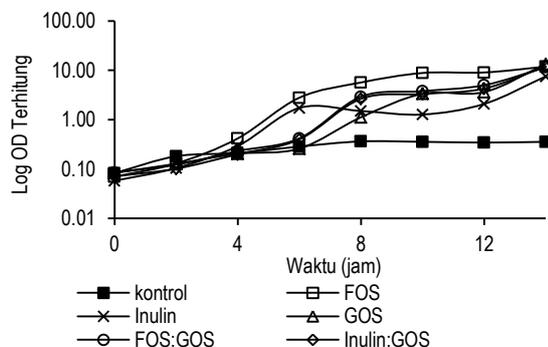
metabolisme inulin yang relatif sama dengan *L. rhamnosus* B16. Selain itu penelitian lain (Hartanti, 2010) menunjukkan bahwa kemampuan *L. rhamnosus* R23 dalam mencegah diare lebih baik daripada *L. rhamnosus* B16.

Pertumbuhan BAL

Secara umum kenaikan nilai OD selama pertumbuhan kedua isolat pada media dengan GOS sebagai sumber karbon menunjukkan nilai tertinggi dibandingkan media dengan prebiotik uji lainnya (Gambar 2-3). Hal ini menunjukkan kemungkinan bahwa kedua isolat mampu memproduksi enzim β -galaktosidase yang berperan dalam pemecahan GOS. Pada media dengan inulin, nilai OD yang rendah selama waktu inkubasi menunjukkan tingkat pertumbuhan yang paling rendah. Pertumbuhan berlangsung lambat pada masa awal inkubasi karena inulin sebagai sumber karbon memiliki rantai yang panjang (nilai derajat polimerisasi 2-60) sehingga BAL sulit untuk memetabolismenya (Gibson dan Angus, 2000).



Gambar 2. Grafik pertumbuhan *L. rhamnosus* R23 pada media berbasis MRSB dengan prebiotik sebagai sumber karbon



Gambar 3. Grafik pertumbuhan *Lactobacillus* R23H pada media berbasis MRSB dengan prebiotik sebagai sumber karbon

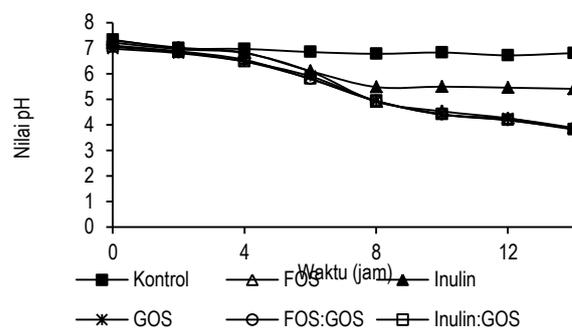
Perbedaan kecenderungan kedua isolat dalam memfermentasi prebiotik terlihat pada media dengan GOS dan FOS. Pada media dengan GOS sebagai sumber karbon *L. rhamnosus* R23 menunjukkan tingkat pertumbuhan yang tinggi sejak awal sampai akhir inkubasi, sedangkan *Lactobacillus* R23H menunjukkan pertumbuhan yang lambat di awal inkubasi dan mengalami peningkatan yang cepat pada akhir waktu inkubasi (Gambar 2-3).

Sebaliknya pada media dengan FOS sebagai sumber karbon tunggal, *L. rhamnosus* R23 menunjukkan tingkat pertumbuhan yang sedikit lebih rendah dibanding *Lactobacillus* R23H. Kombinasi dua jenis prebiotik yang digunakan yaitu

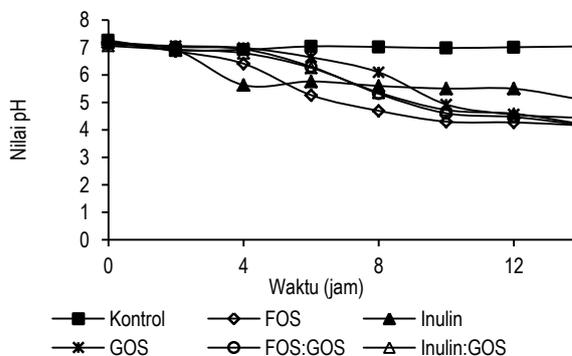
FOS:GOS (1:9) dan inulin:GOS (1:9) dapat dimanfaatkan dengan baik oleh *L. rhamnosus* R23 dan *Lactobacillus* R23H. Hal ini terlihat dari tingginya pertumbuhan yang ditunjukkan dengan nilai OD yang tinggi pada setiap waktu pengamatan.

Perubahan pH selama pertumbuhan BAL

Perubahan pH selama pertumbuhan *L. rhamnosus* R23 dan *Lactobacillus* R23H pada media kontrol menunjukkan perubahan yang tidak signifikan selama waktu inkubasi ($p < 0,05$) (Gambar 4 dan 5). Pada media lain dengan prebiotik sebagai sumber karbon penurunan pH yang signifikan terjadi selama pertumbuhan kedua isolat ($p < 0,05$). Media dengan GOS sebagai sumber karbon mengalami penurunan pH paling tinggi, sedangkan media dengan inulin sebagai sumber karbon mengalami penurunan pH yang paling rendah.



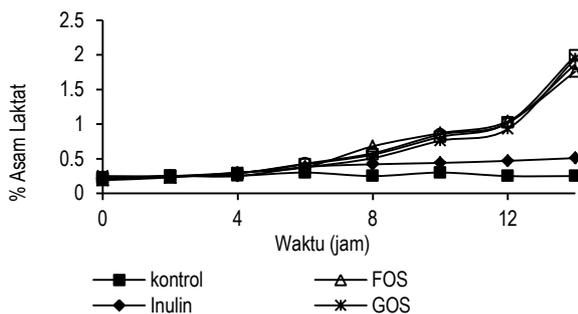
Gambar 4. Grafik perubahan pH selama pertumbuhan *L. rhamnosus* R23 pada media berbasis MRSB dengan prebiotik sebagai sumber karbon



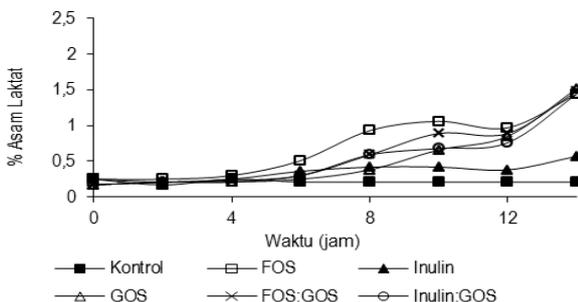
Gambar 5. Grafik perubahan pH selama pertumbuhan *Lactobacillus* R23H pada media berbasis MRSB dengan prebiotik sebagai sumber karbon

Perubahan jumlah konsentrasi asam laktat selama pertumbuhan BAL

Hasil pengukuran TAT (% asam laktat) sebanding dengan hasil pengukuran pH (Gambar 6 dan 7). Pada media kontrol jumlah asam laktat selama waktu inkubasi cenderung konstan, sedangkan pada kelima media uji yang mengandung prebiotik terjadi peningkatan nilai TAT yang signifikan ($p < 0,05$) selama pertumbuhan *L. rhamnosus* R23 dan *Lactobacillus* R23H. Peningkatan nilai TAT yang paling tinggi selama pertumbuhan kedua isolat dicapai pada media yang memanfaatkan GOS sebagai sumber karbon.



Gambar 6. Grafik perubahan TAT selama pertumbuhan *L. rhamnosus* R23 pada media berbasis MRSB dengan prebiotik sebagai sumber karbon



Gambar 7. Grafik perubahan TAT selama pertumbuhan *Lactobacillus* R23H pada media berbasis MRSB dengan prebiotik sebagai sumber karbon

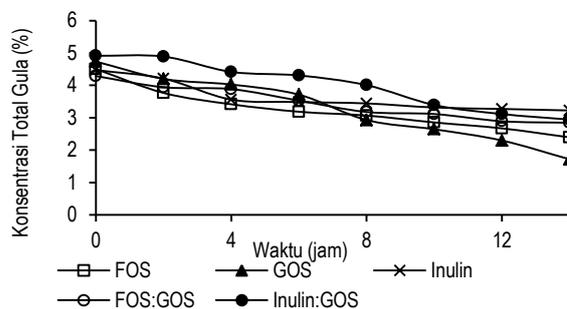
Perubahan total gula selama pertumbuhan BAL

Selama pertumbuhan *L. rhamnosus* R23 dan *Lactobacillus* R23H terjadi penurunan total gula pada keseluruhan media uji yang mengandung prebiotik sebagai sumber karbon (Gambar 8 dan 9). Hal ini mengindikasikan bahwa prebiotik sebagai sumber gula tunggal yang terdapat dalam media dapat dimanfaatkan oleh BAL untuk pertumbuhannya.

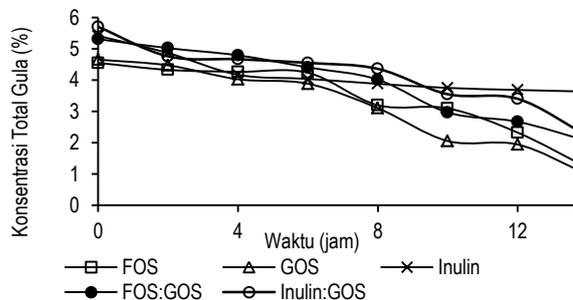
Penurunan total gula tercepat teramati pada media dengan GOS sebagai sumber karbon. Nilai DP GOS yang tidak terlalu tinggi yaitu berkisar antara 2-7 menyebabkan GOS lebih mudah untuk difermentasi. Pada media dengan inulin sebagai sumber karbon, penurunan total gula selama pertumbuhan kedua isolat berlangsung lambat (Gambar 8-9). Inulin yang memiliki rantai lebih panjang dibandingkan FOS dan GOS sehingga lebih sulit untuk dimetabolisme oleh BAL. Kemampuan BAL dalam memetabolisme inulin terkait dengan keberadaan enzim inulinase yaitu enzim yang dapat menghidrolisis inulin (Nakamura *et al.*, 1995). Enzim ini akan diproduksi ketika BAL tumbuh pada media atau lingkungan yang mengandung inulin. Mula-mula *L. rhamnosus* R23 dan *Lactobacillus* R23H tidak mampu menggunakan inulin sehingga pertumbuhan di masa awal inkubasi cenderung lambat. Setelah fase adaptasi maka enzim diproduksi dan selanjutnya enzim dapat digunakan untuk memecah inulin selama pertumbuhan kedua isolat.

Penurunan total gula pada media dengan FOS sebagai sumber karbon lebih besar dibandingkan media inulin. FOS dapat dipecah oleh enzim β -fruktosidase menghasilkan molekul glukosa dan fruktosa. Enzim ini merupakan enzim ekstraseluler yang bersifat induktif. Jadi enzim hanya akan diproduksi ketika

substrat yang sesuai yaitu FOS ada di lingkungan pertumbuhan BAL. Pada media dengan kombinasi inulin:GOS (1:9), menunjukkan penurunan total gula yang lebih besar jika dibandingkan dengan media dengan inulin saja. Pada media yang berisi kombinasi FOS:GOS (1:9), penurunan total gula selama pertumbuhan sedikit lebih lambat dibandingkan dengan media yang hanya menggunakan FOS secara tunggal. Selama pertumbuhan *L. rhamnosus* R23 dan *Lactobacillus* R23H, penurunan total gula pada kedua media dengan kombinasi dua jenis prebiotik tidak terlalu berbeda satu sama lain. Gambar 8 dan menunjukkan bahwa kombinasi prebiotik lebih cepat dimetabolisme daripada inulin tetapi lebih lambat jika dibandingkan dengan FOS dan GOS. Kondisi tersebut diharapkan pada aplikasi produk sinbiotik, yaitu prebiotik tidak akan habis dipecah oleh BAL dan akan dimanfaatkan sebagai sumber karbon oleh probiotik di dalam kolon setelah produk dikonsumsi.



Gambar 8. Grafik perubahan total gula selama pertumbuhan *L. rhamnosus* R23 pada media berbasis MRSB dengan prebiotik sebagai sumber karbon



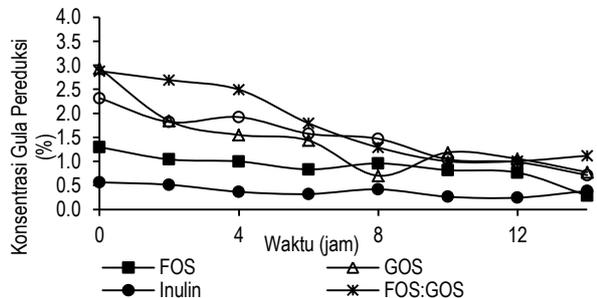
Gambar 9. Grafik perubahan total gula selama pertumbuhan *Lactobacillus* R23H pada media berbasis MRSB dengan prebiotik sebagai sumber karbon

Perubahan konsentrasi gula pereduksi

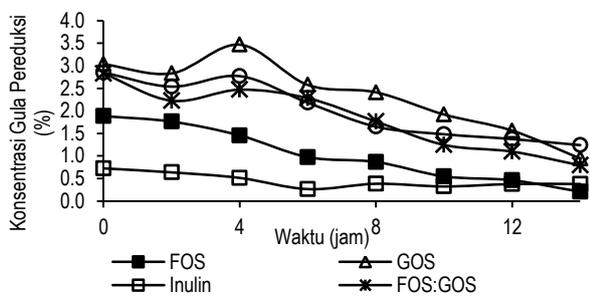
Penurunan gula pereduksi selama pertumbuhan *L. rhamnosus* R23 dan *Lactobacillus* R23H pada media dengan inulin terjadi secara lambat (Gambar 10-11). Hal ini berkaitan dengan monosakarida utama penyusun inulin yaitu fruktosa yang bukan merupakan gula pereduksi. Nilai gula pereduksi yang terukur selama pertumbuhan berasal dari gugus glukosa yang terdapat pada setiap ujung struktur inulin.

Penurunan jumlah gula pereduksi pada media dengan FOS lebih besar jika dibandingkan dengan media yang mengandung inulin (Gambar 10-11). Jumlah awal gula pereduksi pada media dengan FOS juga menunjukkan nilai yang lebih tinggi daripada inulin. Hal ini terjadi karena FOS

memiliki rantai yang lebih pendek sehingga pada konsentrasi yang sama molekul FOS lebih banyak daripada inulin sehingga gugus gula pereduksi pada FOS juga lebih banyak daripada inulin. Nilai gula pereduksi berasal dari ujung rantai glukosa yang memiliki gugus -OH bebas pada struktur FOS yang telah dipecah oleh bakteri.



Gambar 10. Grafik perubahan gula pereduksi selama pertumbuhan *L. rhamnosus* R23 pada media berbasis MRSB dengan prebiotik sebagai sumber karbon



Gambar 11. Grafik perubahan gula pereduksi selama pertumbuhan *Lactobacillus* R23H pada media berbasis MRSB dengan prebiotik sebagai sumber karbon

Hasil pengukuran gula pereduksi pada media dengan GOS sebagai sumber karbon menunjukkan bahwa GOS memiliki kandungan gula pereduksi terbanyak dibandingkan sumber prebiotik uji lainnya. Selama pertumbuhan kedua isolat, jumlah gula pereduksi mengalami perubahan yang fluktuatif tetapi cenderung menurun (Gambar 10-11). Hasil pengukuran yang fluktuatif ini menunjukkan pada awal inkubasi GOS terus dipecah oleh isolat sehingga jumlah gula pereduksi sempat meningkat. Namun kemudian gula pereduksi ini dimetabolisme sehingga jumlahnya semakin menurun selama waktu pertumbuhan.

Pada Gambar 10 dan 11 terlihat grafik perubahan kadar gula pereduksi pada media yang mengandung FOS:GOS (1:9) dan inulin:GOS (1:9) juga menurun, walaupun nilainya fluktuatif. Kombinasi antara inulin yang memiliki DP tinggi dengan GOS yang memiliki kandungan gula pereduksi tinggi dan DP rendah ternyata dapat dimanfaatkan mendukung pertumbuhan BAL lebih baik.

Aplikasi pada produk susu fermentasi

Susu fermentasi digunakan untuk mengaplikasikan konsep sinbiotik dalam penelitian ini dengan menggunakan *L. rhamnosus* R23. Dalam penelitian ini diketahui bahwa kemampuan *Lactobacillus* R23H untuk memetabolisme prebiotik

lebih baik dari *L. rhamnosus* R23, namun karena *Lactobacillus* R23H bersifat heterofermentatif maka *Lactobacillus* R23H kurang sesuai digunakan untuk produk susu fermentasi yang menyerupai yogurt, sehingga pada tahap ini dipilih *L. rhamnosus* R23. Hasil analisis total BAL selama proses fermentasi susu disajikan pada Tabel 2.

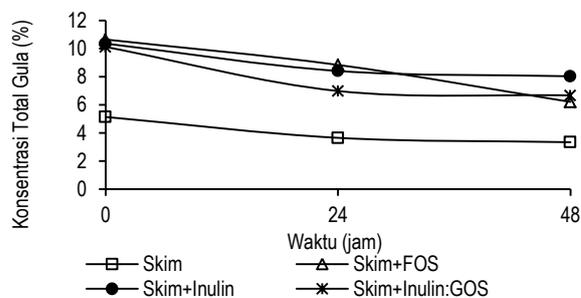
Tabel 2. Jumlah *L. rhamnosus* R23 pada media susu skim dengan penambahan prebiotik

Waktu inkubasi (jam)	Jumlah BAL (Log CFU/ml)			
	Skim	Skim+FOS	Skim+Inulin	Skim+Inulin:GOS (1:9)
0	8,35	8,29	8,35	8,42
24	9,92	10,15	10,05	10,11
48	9,60	9,49	9,79	9,92

Total BAL meningkat hingga hari pertama inkubasi, kemudian jumlahnya sedikit menurun pada hari kedua inkubasi. Pada jam ke-24 menunjukkan terjadi peningkatan jumlah BAL pada keempat media. Peningkatan jumlah BAL pada keempat media tersebut tidak berbeda nyata satu sama lain ($p < 0,05$).

Pengukuran total BAL pada jam ke-48 menunjukkan terjadinya penurunan pada keempat media susu skim. Hasil analisis menunjukkan bahwa jumlah akhir *L. rhamnosus* R23 pada keempat media tidak berbeda nyata secara signifikan ($p < 0,05$). Tabel 2 menunjukkan bahwa jumlah akhir *L. rhamnosus* R23 telah memenuhi syarat jumlah minimal BAL pada produk susu fermentasi yaitu berkisar antara 10^8 - 10^9 CFU/ml (Kurmann dan Rasic, 1991).

Secara umum total gula pada keempat media susu skim mengalami penurunan selama waktu fermentasi. Hal ini menunjukkan *L. rhamnosus* R23 telah memfermentasi gula yang terdapat dalam media menjadi asam laktat (Gambar 12).

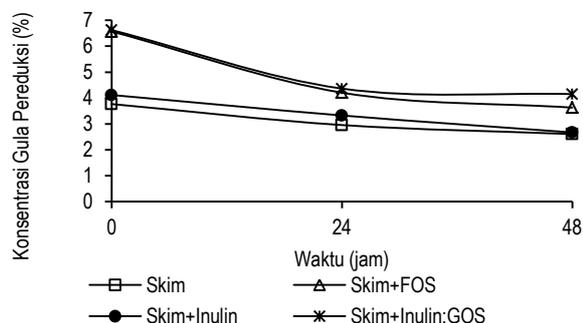


Gambar 12. Grafik perubahan total gula selama proses fermentasi susu skim dengan kultur *L. rhamnosus* R23 dengan penambahan prebiotik

Total gula yang terukur pada media skim tanpa prebiotik merupakan laktosa yang terkandung dalam susu, sedangkan pada ketiga media lainnya total gula menunjukkan kandungan laktosa dan prebiotik yang ditambahkan, sehingga total gula yang tersisa pada media kontrol paling sedikit dibanding ketiga media lainnya.

Jumlah awal gula pereduksi pada media skim dengan penambahan FOS dan inulin:GOS (1:9) lebih tinggi dibanding media uji lainnya. Tingginya jumlah gula pereduksi ini karena FOS dan GOS yang ditambahkan pada masing-masing media memiliki kandungan gula pereduksi yang cukup tinggi. Selama

proses fermentasi berlangsung, terjadi penurunan total gula pereduksi pada keempat media (Gambar 13). Inulin sebagai sumber prebiotik tunggal difermentasi secara lambat oleh *L. rhamnosus* R23.



Gambar 13. Grafik perubahan gula pereduksi selama proses fermentasi susu skim dengan kultur *L. rhamnosus* R23 dengan penambahan prebiotik

Sementara itu, dengan mengkombinasikan inulin dan GOS (1:9), kemampuan *L. rhamnosus* R23 untuk tumbuh dengan memetabolisme prebiotik menjadi lebih baik. Dengan memanfaatkan kombinasi tersebut, sumber prebiotik tidak terlalu cepat dicerna sehingga tidak akan habis dipecah oleh BAL selama di dalam produk.

KESIMPULAN

Ketujuh BAL isolat ASI yaitu *L. rhamnosus* B16, *L. rhamnosus* R14, *L. rhamnosus* R21, *L. rhamnosus* R23, *Lactobacillus* R23H, dan *P. pentosaceus* 1-A22 dan *P. pentosaceus* 1-A23 dapat memanfaatkan inulin, FOS, dan GOS sebagai sumber karbon untuk pertumbuhannya. Isolat R23H, R23, B16, dan R14 tumbuh lebih baik dibandingkan isolat BAL lainnya. Uji metabolisme prebiotik oleh BAL yang diwakili oleh *L. rhamnosus* R23 dan *Lactobacillus* R23H secara umum menunjukkan tidak ada perbedaan antara isolat homofermentatif dan isolat heterofermentatif dalam memetabolisme prebiotik. Kedua isolat BAL tersebut paling mudah tumbuh pada media dengan GOS dan paling sulit tumbuh pada media dengan inulin. Pada kombinasi prebiotik inulin:GOS (1:9), kemampuan kedua isolat dalam memfermentasi prebiotik menjadi lebih baik daripada penggunaan inulin saja sebagai sumber karbon. Penelitian ini mengkonfirmasi bahwa semakin tinggi DP yang dimiliki oleh prebiotik, kemampuan BAL dalam memfermentasinya semakin berkurang.

Pada aplikasi produk sinbiotik berbasis susu fermentasi, hasil analisis total gula menunjukkan sisa gula yang jauh lebih tinggi pada ketiga media susu skim dengan penambahan prebiotik (FOS, inulin, dan kombinasi inulin dan GOS) setelah proses fermentasi berlangsung dibandingkan dengan media susu skim tanpa prebiotik. Perpaduan jenis prebiotik berantai panjang seperti inulin dan prebiotik berantai pendek seperti GOS serta *L. rhamnosus* R23 yang merupakan BAL kandidat prebiotik dapat digunakan pada produk susu fermentasi sinbiotik. Dengan memanfaatkan kombinasi tersebut, sumber prebiotik tidak terlalu cepat dicerna sehingga tidak akan habis

dipecah oleh BAL selama di dalam produk sehingga setelah produk dikonsumsi sisa prebiotik dapat dimetabolisme oleh probiotik di kolon.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC [Association of Official Analytical Chemist]. 1998. Official Methods of Analysis of AOAC International. AOAC International Virginia, USA.
- BAM [Bacteriological Analytical Manual]. 2001. Bacteriological Analytical Manual Chapter 3: Aerobic Plate Count. U.S. Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/Bacteriology/cAlAnalyticalManualBAM/ucm063346.htm> [15 Juni 2010].
- Bornet FRJ. 1994. Undigestible sugars in food products. Am J Clin Nutr 59:763S-769S.
- Bouhnik Y, Kvahedi, Achou L, Attar A, Salfat J, Pochart P, Marteau P, Flourie B. 1999. Short chain fructooligosaccharide administration dose dependently increases faecal bifidobacteria in healthy humans. J Nutr 129: 113-116.
- Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Roberts P, Smith F. 1956. Colorimetric method for determining sugars and related substances. Analytical Chemistry 28:350-354.
- Ducluzeau RP, Gouet P, Williams PEV. 1991. Probiotics in Ruminants. Di dalam Jouany JP (ed.). Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion. INRA, Paris.
- FAO/WHO [Food and Agriculture Organization/World Health Organization]. 2006. Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO/WHO, Roma.
- Franck A. 2008. Food applications of prebiotics. Dalam Gibson GR, Roberfroid MR (eds). Handbook of Prebiotics. P. 437-448. CRC Press, Boca Raton.
- Franz Z, Jane AW, Hanz K. 1998. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Gibson GR, Angus F. 2000. LFRA Ingredients Handbook of Prebiotics and Probiotics. Leatherhead Food RA Publishing Limited, UK.
- Gibson GR, Roberfroid M. 1995. Dietary modulation of human colonic microbiota – introducing the concept of prebiotics. J Nutr 125: 1401-1412.
- Gropper SS, Smith JL, Groff JR. 2009. Advanced Nutrition and Human Metabolism. Wadsworth Publishing, USA.
- Hartanti WH. Evaluasi Aktivitas Antidiare Isolat *Lactobacillus* dari Air Susu Ibu. Tesis. Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Kurmann JA, Rasic JL. 1991. The health potential of products containing bifidobacteria. Di dalam Robinson RK (ed). Therapeutic Properties of Fermented Milks. Elsevier Appl Sci., London.
- Loo JV, Vancraeynest D. 2008. Probiotics and animal nutrition. Di dalam Gibson GR dan Roberfroid MR (Eds.). Handbook of Prebiotics. CRC Press, Boca Raton, USA.

- Macfartane GT, Steed H, Macfartane S. 2008. Bacterial metabolism and health related effects of galactooligosaccharides and other prebiotics. *J of Appl Microbiol* 104: 305-344.
- Manning TS, Gibson, GR. 2004. Prebiotics. *Best Practice Clinical Gastroenterology* 18(2): 287-298.
- Manning TS, Rastall R, Gibson G. 2004. Prebiotics and lactic acid bacteria. Dalam Salminen S, Wright AV, Ouwehand A (Eds). *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects* 3rd Edition, Revised and Expanded. P. 419-430. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Mitsuoka T, Hidaka H, Eida T. 1987. Effect of fructooligosaccharides on intestinal microflora. *Food/Nahrung*, 31: 427-436.
- Moro G, Minoli I, Mosca M, Fanaro S, Jelinek J, Stahl B, Boehm G. 2002. Dosage-related bifidogenic effects of galacto and fructo-oligosaccharides in formula-fed term infants. *J Pediatric Gastroenterol Nutr* 34: 291-295.
- Nakamura T, Ogata Y, Shitasa A, Nakamura A, Ohta K. 1995. Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* Mutan 817. *J of Fermentation and Bioeng* 80(2): 164-169.
- Nuraida L, Hana, Dwari SR, Faridah DN. 2008. Pengujian sifat prebiotik dan sinbiotik produk olahan ubi jalar secara *in vivo*. *J Teknol dan Industri Pangan* 19(2): 89-96.
- Nuraida L, Susanti, Hartanti AW. 2007. Lactic acid bacteria and *Bifidobacteria* profile of breast milk and their potency as probiotics. 10th ASEAN Food Conference. Food for Mankind-Contribution of Science and Technology 21-23 August. Kuala Lumpur, Malaysia.
- Pedreschi R, Campos D, Noratto G, Chirinos R, Cisneros-Zevallos L. 2003. Andean yacon root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. *J Agric Food Chem* 51(8): 5278-5284.
- Saulnier DMA, Molenaar D, de Vos WM, Gibson GR, Kolida S. 2007. Identification of prebiotic fructooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFSI through microarrays. *J Appl and Env Microbiol* 73: 1753-1765.
- SCF [Scientific Committee on Food]. 2001a. Statement on the use of resistant short chain carbohydrates (oligofructose and oligogalactose) in infant formulae and in follow-on formulae. Opinion expressed on 26 September 2001. <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf-out103-en.pdf> [20 Juli 2010].
- SCF [Scientific Committee on Food]. 2001b. Additional statement on the use of resistant short chain carbohydrates (oligofructosyl-saccharose and oligogalactosyl-lactose) in infant formulae and in follow-on formulae. Opinion expressed on 13 December 2001. <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf-out109-en.pdf> [20 Juli 2010].
- Semjonovs P, Danilevics A, Upite D, Kaminska E, Runca E, Marauska M, Bekers V. 2008. Synbiotic properties of functional food additive from jerusalem artichoke tubers in regard to lactic acid bacteria starter cultures for fermented foods. Proceeding "The 3rd Baltic Conference on Food Science and Technology" 17-18 April 2008, Jelgava, Lithuania. <http://lufb.ltu.lv/conference/foodbalt/Foodbalt-Proceedings-2008.pdf>. [6 Februari 2011].
- Shin SH, Lee JH, Pestika JJ, Ustunol Z. 2000. Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp in skim milk containing oligosaccharides and inulin. *J Food Sci* 65(5): 884-887.
- Takeda Y, Hanashiro M. 2003. Examination of the structure of amylase and amylo-pectin by fluorescent labeling terminal. *J Appl Glyco-science* 48: 123-130.
- Widdel F. 2007. Theory and measurement of bacterial growth. Di dalam *Grundpraktikum Mikrobiologie*, 4 Sem (B.Sc). Universitat Bremen.
- Yoon MY, Hwang HJ. 2008. Reduction of soybean oligosaccharides and properties of α -D-galactosidase from *L. curvatus* R08 and *L. mesenteroides* JK55. *J Food Microbiology* 25: 815-823.