

## PENGUJIAN *IN VITRO* XILOOLIGOSAKARIDA SEBAGAI KANDIDAT PREBIOTIK

Asnia Zainuddin\*, Eddy Bagus Wasito\*\*, Ni Nyoman Tri Puspaningsih\*\*\*

\* Jurusan MIPA FKIP Universitas Pattimura

\*\* Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

\*\* Departemen Kimia FST Universitas Airlangga

### ABSTRACT

The objectives of this study were to find the *in-vitro* effect of xylooligosaccharide on the cell count of *Lactobacillus casei* Shirota strain, to identify the effect of xylooligosaccharide on the production of lactic, acetic, propionic and butyric acid (short chain fatty acid = SCFA), and to prove the effect of xylooligosaccharide on the change of pH value. This was a laboratory experimental study using complete randomized design with 4 treatments, i.e. MRS broth media added xylooligosaccharide with concentrations of 0% (control), 1%, 3%, and 5%, which were then inoculated with *Lactobacillus casei* Shirota strain and incubated for 6, 12, 18, and 24 hours. The *Lactobacillus casei* Shirota strain cell count was counted using Drop plate. Data obtained were analyzed statistically using two way ANOVA with significance level of 5%. The type and level of organic acids, i.e., lactic, acetic, propionic, and butyric acids (SCFA), formed in incubation time of 12 hours, were measured using gas chromatography and the change of pH value during incubation time was measured using pH paper. Results showed that xylooligosaccharide addition MRS Broth media provided highly significant interaction effect on the cell count of *Lactobacillus casei* Shirota strain ( $p < 0.05$ ). The result of gas chromatography showed that the addition of xylooligosaccharide in MRS Broth media could increase *Lactobacillus casei* Shirota strain metabolism activity that produced lactic, acetic, propionic, and butyric acid. The reduction of pH value showed that the lowest pH value of 3.8 after the addition of 5% xylooligosaccharide with incubation time of 24 hours. In conclusion, the addition of xylooligosaccharide with concentrations of 1%, 3%, and 5% in MRS Broth media with incubation periods of 6, 12, 18, and 24 hours can increase *Lactobacillus casei* Shirota strain cell count, increase the metabolism activity of *Lactobacillus casei* Shirota strain, capable in producing SCFA in incubation time of 12 hours, and results in the reduction of pH value.

**Key words:** xylooligosaccharide, intestinal microflora, *Lactobacillus casei*, gas chromatography

### PENGANTAR

Mikroekologi usus sangat kompleks dan hasil aktivitas metabolisme dari beberapa jenis bakteri usus tertentu mempunyai peranan penting dalam nutrisi dan kesehatan manusia. Jika keseimbangan mikroekologi usus terganggu, bakteri merugikan akan meningkat sehingga kesehatan tubuh akan terganggu. Oleh karena itu, kesehatan saluran pencernaan utamanya kesehatan usus memegang peranan penting dalam menentukan kesehatan tubuh (Gibson dan Roberfroid, 1995). Salah satu cara untuk memanipulasi mikroekosistem usus dengan tujuan meningkatkan koloni bakteri menguntungkan adalah dengan konsumsi probiotik, prebiotik, atau kombinasi keduanya yang dikenal dengan sinbiotik.

Probiotik adalah suplemen makanan berupa mikroba hidup yang bermanfaat bagi kesehatan tubuh inang (Fuler dan Gibson, 1998), sedangkan prebiotik adalah bahan makanan yang tidak dapat dicerna dan tidak diserap pada saluran pencernaan bagian atas, memberikan pengaruh menguntungkan bagi kesehatan karena dapat menstimulasi

pertumbuhan dan aktivitas bakteri menguntungkan di kolon sehingga dapat meningkatkan kesehatan tubuh.

Prebiotik umumnya merupakan *undigestible*, biasanya dalam bentuk oligosakarida dan *dietary fiber*, misalnya inulin, *galacto-oligosaccharide*, *fructo-oligosaccharide*, *isomalto-oligosaccharide*, *lactofructo-oligosaccharide*, dan *lactulose* (Gibson dan Roberfroid, 1995). Secara umum, *undigestible* karbohidrat misalnya oligosakarida, merupakan sumber karbon bagi bakteri menguntungkan yang hidup di usus. Oligosakarida tersebut akan difermentasi oleh bakteri menguntungkan dan sebagai produk akhirnya adalah asam lemak rantai pendek (SCFA = *Short Chain Fatty Acid*) berupa asam laktat, butirrat, propionat dan asetat, yang mempunyai dampak fisiologi positif bagi tubuh inang (Macfarlane *et al.*, 1992, Fuller dan Gibson, 1998). Selain SCFA juga dihasilkan gas CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub> (Cumings dan Macfarlane, 1991; Tomomatsu, 1994; Cumings *et al.*, 2001).

Xilooligosakarida merupakan salah satu jenis oligosakarida yang mempunyai sifat fisika-kimia menarik, yaitu stabil pada suatu cakupan pH dan temperatur yang

luas, bahan rendah kalori, sulit untuk dicerna, merupakan serat yang larut dalam air, dan mempunyai sifat organoleptik yang sesuai untuk dicampurkan ke dalam makanan. Dengan sifat fisika-kimia yang dimiliki xilooligosakarida mempunyai nilai penting untuk digunakan sebagai bahan prebiotik (Dominguez *et al.*, 2003).

Secara alami xilooligosakarida terdapat dalam buah-buahan, sayur-mayur, susu nabati, madu dan dapat diproduksi pada skala industri dari bahan hemiselulosa yang kaya xilan, dapat pula diperoleh dengan mengolah bahan limbah *forestal*, agrikultur atau limbah industri yang bersifat *lignocellulosic* (Alonso *et al.*, 2001). Di Indonesia, bahan-bahan ini mudah didapat dan tersedia dalam jumlah yang banyak sehingga pemanfaatan xilooligosakarida sebagai bahan prebiotik akan sangat menguntungkan baik secara ekologis maupun ekonomi.

Pemanfaatan xilooligosakarida sebagai prebiotik masih dalam tahap pengembangan (Dominguez *et al.*, 2003). Studi *in-vitro* adalah cara mudah untuk mengevaluasi karakteristik kandidat prebiotik karena hasil evaluasi kandidat prebiotik secara *in-vitro* dapat digunakan untuk memprediksi hasilnya secara *in-vivo* (Cummings *et al.*, 2001).

Studi *in-vitro* oleh Cycroft *et al.* (2001), membuktikan bahwa oligosakarida dapat meningkatkan jumlah koloni *Bifidobacteria*. Selanjutnya studi *in-vivo* oleh Kuang *et al.* (2004), membuktikan bahwa xilooligosakarida dan fruktooligosakarida dapat meningkatkan populasi *Bifidobacterium*, menurunkan pH *cecal*, menurunkan konsentrasi serum triglyserides, serta mereduksi *precancerous colonic lesion* pada colon tikus. Berdasarkan studi tentang xilooligosakarida, belum ada laporan tentang efek *in-vitro* xilooligosakarida terhadap pertumbuhan dan aktivitas *Lactobacillus casei*, sementara *Lactobacillus casei* merupakan salah satu jenis bakteri menguntungkan di dalam mikroflora usus dan banyak digunakan sebagai probiotik. Studi-studi klinis membuktikan bahwa kehadiran *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* di dalam usus dapat menghambat bakteri patogen, meningkatkan imunitas tubuh, dan antikarsinogen (Macfarlane dan Cumming, 1999; Sullivan dan Nord, 2002).

Berdasarkan uraian di atas maka perlu dilakukan penelitian tentang efek *in-vitro* xilooligosakarida terhadap pertumbuhan dan aktivitas *Lactobacillus casei*, yang hasilnya diharapkan menjadi bahan acuan dan sebagai studi awal untuk pemanfaatan xilooligosakarida hasil degradasi limbah pertanian secara enzimatik sebagai bahan prebiotik.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini Xilooligosakarida merek Wako, media MRSB (*deMan, Rogosa, and Sharpe Broth: Oxoid*), dan bakteri uji *Lactobacillus casei* Shirota strain.

### Cara Kerja

#### Pembuatan media kultur fermentasi

Media MRSB ditimbang sesuai instruksi pada label produk (52 gram per liter). Kemudian ditambahkan akuades dan diaduk sampai homogen, pH media diatur hingga 7,0, dipanaskan pada autoklaf dengan suhu 121° selama 15 menit. Selanjutnya media dituang ke dalam botol kultur sebanyak 10 ml, sesuai jumlah perlakuan dan replikasi. Pada masing-masing botol yang berisi MRSB tersebut ditambahkan xilooligosakarida dengan konsentrasi 0%, 1%, 3%, 5%. Botol yang berisi medium hangat ditempatkan pada inkubator dengan suhu 37° C selama satu malam.

#### Perbanyak isolat dan pembuatan suspensi bakteri uji

Koloni isolat *Lactobacillus casei* Shirota strain yang diisolasi dari Yakult Indonesia dibiakkan pada media MRSA (*deMan, Rogosa, and Sharpe Agar*) plate dengan cara goresan dan diinkubasi pada CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37° C selama 48 jam. Dari biakan bakteri uji umur 48 jam diambil 1 koloni dengan diameter 0,5 mm, disuspensikan pada 5 ml MRSB dan divortex. Setelah homogen diinkubasi pada kondisi CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37° C, selama 3 jam. Suspensi bakteri siap diinokulasi pada media fermentasi. Kepadatan suspensi bakteri uji adalah 10<sup>6</sup> CFU/ml.

#### Pembuatan larutan stok xilooligosakarida standar

Larutan stok xilooligosakarida standar dibuat dengan konsentrasi 10% (berat/vol), yaitu dengan menimbang 5,5 gram xilooligosakarida dan dilarutkan dalam 55 ml MRSB, diaduk sampai homogen, difilter dengan millipor 0,45 µm.

#### Uji pengaruh xilooligosakarida terhadap jumlah sel *Lactobacillus casei* Shirota strain

Media dasar yang digunakan adalah MRSB, volume 10 ml, dengan konsentrasi xilooligosakarida (XOS) 0%, 1%, 3%, dan 5%, yaitu:

0% XOS (X0 = kontrol): 9 ml MRSB + 1ml suspensi bakteri uji

1% XOS (X1): 8 ml MRSB + 1 ml stok xilooligosakarida + 1 ml suspensi bakteri uji

3% XOS (X3): 6 ml MRSB + 3 ml stok xilooligosakarida + 1 ml suspensi bakteri uji

5% XOS (X5): 4 ml MRSB + 5 ml stok xilooligosakarida + 1 ml suspensi bakteri uji

Masing-masing perlakuan dibuat 6 kali ulangan dan diinkubasi pada CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37° C selama 6, 12, 18, dan 24 jam.

### Penghitungan jumlah sel bakteri

Jumlah sel bakteri uji dihitung pada masing-masing lama inkubasi (6, 12, 18, dan 24 jam), diambil 50 µl sampel hasil fermentasi, dibuat pengenceran sampai 10<sup>-10</sup> dengan NaCl 0,98%. Dari masing-masing pengenceran diambil 20 µl, diinokulasikan pada *MRS agar plate* dengan metode *drop plate* dan diinkubasi pada CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37° C, selama 48 jam. Jumlah koloni *Lactobacillus casei* Shirota strain yang tumbuh dihitung dan dinyatakan dalam *colony forming unit/ml* (Log CFU/ml).

### Pengukuran nilai derajat keasaman (pH)

Nilai derajat keasaman (pH) diukur pada setiap perlakuan setelah inkubasi 0, 6, 12, 18, dan 24 jam dengan menggunakan kertas pH universal.

### Analisis short chain fatty acid (SCFA)

Satu ml sampel hasil kultur fermentasi, disentrifugasi pada 7000 rpm selama 5 menit, supernatan disaring dengan milipor 0,45 µl, kemudian diambil 0,5 µl dan diinjeksikan ke dalam sistem kromatografi gas. Alat Kromatografi gas yang digunakan adalah merek Shimadzu GC 8, jenis kolom gelas (GP 10% SP 1200 on 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), panjang kolom 2 meter, diameter kolom 3 mm, suhu injektor 220° C, suhu kolom 130° C. Jenis detektor *Flame Ionisation Detector* (FID), suhu detektor 220° C, dan tekanan nitrogen (N<sub>2</sub>) sebagai gas pembawa 1,3 ml/cm<sup>2</sup>. Data dari U.V. detector diintegrasikan menggunakan paket *software Value Chrom<sup>TM</sup>*. Produksi asam butirat, propionat, asetat dan

laktat pada masing-masing sampel dihitung dengan kurva kalibrasi eksternal dengan menggunakan standar asam laktat, asam asetat, asam propionat dan asam butirat.

### Analisis Data

Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan 4 perlakuan, yaitu: media MRSB ditambah xilooligosakarida 0% (kontrol), 1%, 3%, 5%. Data jumlah sel *Lactobacillus casei* Shirota strain dianalisis dengan analisis varian dua jalur (*two way ANOVA*) dan dilanjutkan uji LSD (*Least Significance Difference*) dengan program *software* sistem SPSS.

## HASIL

### Jumlah sel *Lactobacillus casei* Shirota strain

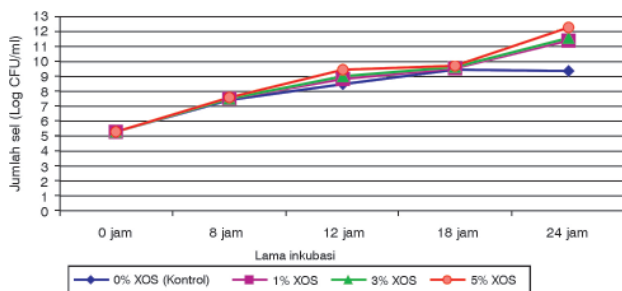
Variabel yang diamati adalah jumlah sel yang tumbuh pada media MRSA plate yang diinkubasi pada CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37° C selama 48 jam, dengan inokulum berasal dari perlakuan setelah lama inkubasi 6, 12, 18, dan 24 jam. Hasil perhitungan rata-rata jumlah sel *Lactobacillus casei* Shirota strain pada perlakuan dan lama inkubasi disajikan pada Tabel 1.

Hasil analisis Anova menunjukkan bahwa terdapat pengaruh langsung antara perlakuan dan lama inkubasi 6, 12, 18, dan 24 jam, terhadap rata-rata jumlah sel *Lactobacillus casei* Shirota strain. Perlakuan memberikan nilai F hitung sebesar 110256,339 dan sangat signifikan pada  $\alpha = 0,05$ . Hal ini berarti ada perbedaan rata-rata jumlah sel *Lactobacillus casei* Shirota strain antarperlakuan berbagai konsentrasi xilooligosakarida. Lama waktu inkubasi memberikan nilai F hitung sebesar 137256,4 juga sangat signifikan pada  $\alpha = 0,05$ . Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata jumlah *Lactobacillus casei* Shirota strain antar lama waktu inkubasi 6, 12, 18, dan 24 jam. Hasil interaksi antarperlakuan berbagai konsentrasi xilooligosakarida dan lama inkubasi 6, 12, 18, dan 24 jam memberikan nilai F hitung sebesar 4585,011 dan signifikan pada  $\alpha = 0,05$ . Hal ini berarti terdapat pengaruh interaksi antara perlakuan berbagai konsentrasi xilooligosakarida dan lama

**Tabel 1.** Rata-rata jumlah sel (Log CFU/ml) ± SE *Lactobacillus casei* Shirota strain pada perlakuan berbagai konsentrasi xilooligosakarida dan lama inkubasi 6, 12, 18, dan 24 jam (XOS = xilooligosakarida).

Lama inkubasi (jam)	Konsentrasi XOS			
	0%	1%	3%	5%
6	7,397 ± 0,011	7,452 ± 0,004	7,494 ± 0,056	7,588 ± 0,003
12	8,468 ± 0,037	8,762 ± 0,022	8,948 ± 0,013	9,235 ± 0,010
18	9,397 ± 0,022	9,507 ± 0,025	9,564 ± 0,010	9,625 ± 0,021
24	9,334 ± 0,010	11,352 ± 0,016	11,523 ± 0,043	12,185 ± 0,014

inkubasi terhadap rata-rata jumlah sel *Lactobacillus casei* Shirota strain, peningkatan konsentrasi xilooligosakarida dan bertambahnya lama waktu inkubasi menyebabkan jumlah sel *Lactobacillus casei* Shirota strain semakin meningkat pula. Hubungan interaksi tersebut dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Grafik rata-rata jumlah sel *Lactobacillus casei* Shirota strain pada perlakuan dan lama inkubasi 0, 6, 12, 18, dan 24 jam

Selanjutnya untuk membandingkan efek setiap perlakuan dan lama inkubasi terhadap rata-rata jumlah

*Lactobacillus casei* Shirota strain, analisis dilanjutkan dengan uji LSD, hasilnya disajikan pada Tabel 2 dan Tabel 3.

Hasil uji LSD pada Tabel 2. menunjukkan bahwa rata-rata jumlah sel *Lactobacillus casei* Shirota strain pada perlakuan penambahan xilooligosakarida 1%, 3%, 5% menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan kontrol (0% XOS) ( $P < 0,05$ ). Demikian pula antara perlakuan penambahan xilooligosakarida 1%, 3% dan 5% juga terdapat perbedaan yang bermakna.

Hasil uji LSD lama inkubasi terhadap rata-rata jumlah sel *Lactobacillus casei* Shirota strain pada Tabel 3, menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara rata-rata jumlah sel *Lactobacillus casei* Shirota strain pada lama inkubasi 6, 12, 18, dan 24 jam pada  $\alpha = 0,05$ .

### Produksi SCFA (Short chain fatty acid)

Kadar dan jenis asam organik yang terbentuk, yaitu asam laktat, asam asetat, asam propionat, asam butirrat (SCFA) dianalisis menggunakan kromatografi gas (KG).

**Tabel 2.** Hasil Uji *Least Significance Difference* (LSD) perbedaan rata-rata jumlah sel *Lactobacillus casei* Shirota strain pada perlakuan (XOS = Xilooligosakarida)

Perlakuan	0% XOS (Kontrol)	1% XOS	3% XOS	5% XOS
0% XOS(Kontrol)		0,618 *	0,732 *	1,008*
1% XOS			0,114 *	0,390 *
3% XOS				0,276 *
5% XOS				

\* Berbeda bermakna pada  $\alpha = 0,05$ .

**Tabel 3.** Hasil Uji *Least Significance Difference* (LSD) perbedaan rata-rata jumlah sel *Lactobacillus casei* Shirota strain pada lama inkubasi

Lama Inkubasi	6 jam	12 jam	18 jam	24 jam
6 jam		1,370 *	2,040 *	3,616*
12 jam			0,670*	2,246 *
18 jam				1,576*
24 jam				

\* Berbeda bermakna pada  $\alpha = 0,05$ .

**Tabel 4.** Hasil analisis kromatografi gas, asam laktat, asam setat, asam propionat dan asam butirrat pada lama inkubasi 12 jam

No.	Kode Sampel	Kadar Asam Organik (%)			
		Asam Laktat	Asam Asetat	Asam Propionat	Asam Butirat
1.	X0-12	0,518	0,276	0,022	0,011
2	X1-12	0,669	0,384	0,0003	0,001
3	X3-12	0,836	0,219	0,029	0,002
4	X5-12	0,855	0,251	0,012	0,001

Keterangan:

X0 -12: Media MRSB (kontrol) pada 12 jam

X1 -12: Media MRSB + 1% xilooligosakarida pada 12 jam

X3 -12: Media MRSB + 3% xilooligosakarida pada 12 jam

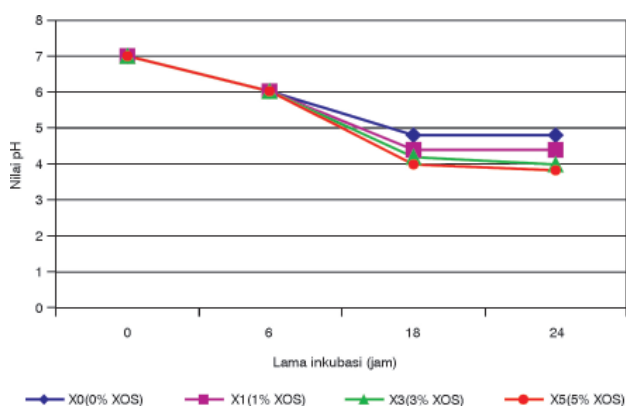
X5 -12: Media MRSB + 5% xilooligosakarida pada 12 jam

Hasil analisis SCFA dengan kromatografi gas disajikan pada Tabel 4.

Pada Tabel 4 terlihat bahwa kadar asam laktat setelah inkubasi 12 jam pada perlakuan penambahan xilooligosakarida 1% (X1-12), 3% (X3-12), dan 5% (X5-12) lebih tinggi dibanding kontrol 0% (X0-12). Produksi asam laktat tertinggi 0,855 ditunjukkan oleh penambahan xilooligosakarida 5% (X5-12). Sedangkan produksi asam asetat, asam propionat, dan asam butirat juga berbeda-beda untuk semua perlakuan.

### Derajat keasaman (pH)

Nilai pH sebelum inkubasi adalah 7,0 menurun sejalan bertambahnya waktu inkubasi. Rata-rata nilai pH pada perlakuan dan lama inkubasi 6, 12, 18, dan 24 jam, disajikan dalam grafik garis pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Grafik nilai pH setiap perlakuan pada lama inkubasi 0, 6, 12, 18, dan 24 jam

Gambar 2 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi dan semakin lama waktu inkubasi maka nilai pH semakin rendah. Nilai pH pada lama inkubasi 6 jam, untuk kontrol maupun pada perlakuan penambahan xilooligosakarida standar 1%, 3%, dan 5% mempunyai nilai yang sama, yaitu 6,0. Hal ini berarti tidak ada perubahan nilai pH untuk semua perlakuan pada lama inkubasi 6 jam. Nilai pH terendah adalah 3,8 ditunjukkan oleh perlakuan penambahan 5% xilooligosakarida pada lama inkubasi 24 jam. Hal ini berarti ada perbedaan nilai pH pada perlakuan dan lama inkubasi 6, 12, 18, dan 24 jam.

## PEMBAHASAN

*Lactobacillus casei* Shirota strain adalah salah satu jenis bakteri heterotrof yang memanfaatkan golongan karbohidrat misalnya oligosakarida dan *dietary fiber* sebagai salah satu sumber karbonnya (Purwoko, 2007). Penggunaan

xilooligosakarida sebagai media tambahan dalam media dasar MRSB bermanfaat sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan *Lactobacillus casei* Shirota strain. Pada kontrol atau tanpa penambahan xilooligosakarida (0% XOS), jumlah sel *Lactobacillus casei* Shirota strain meningkat pada lama inkubasi 6 dan 12 jam, namun pada lama inkubasi 18 sampai 24 jam pertambahan jumlah sel hampir sama bahkan tetap. Hal ini disebabkan pada lama inkubasi 6 dan 12 jam *Lactobacillus casei* Shirota strain mengalami fase eksponensial dalam pertumbuhannya, pada fase eksponensial ini pembelahan sel berlangsung cepat, massa menjadi dua kali lipat. Sedangkan pada lama inkubasi 18 dan 24 jam, pertumbuhannya telah masuk dalam fase stasioner. Pada fase ini pertumbuhan mulai diperlambat dan akhirnya mengalami jumlah bakteri yang berbiak sama dengan jumlah bakteri yang mati dan pada kurva pertumbuhan fase ini menunjukkan garis yang hampir horizontal. Keadaan ini disebabkan semakin berkurangnya persediaan nutrisi, akumulasi metabolik toksik misalnya bakteriosin, dan asam-asam organik, serta perubahan pH yang menjadi asam.

Penambahan xilooligosakarida dengan konsentrasi 1%, 3%, dan 5% pada media dasar MRSB memberikan pengaruh yang signifikan terhadap jumlah sel *Lactobacillus casei* Shirota strain dibanding kontrol, dan pada hasil aktivitas metabolismenya memproduksi asam laktat, asam asetat, asam propionat, dan asam butirat (SCFA). Hal ini disebabkan xilooligosakarida yang mengandung senyawa karbon digunakan oleh *Lactobacillus casei* Shirota strain sebagai sumber nutrisi dalam proses metabolisme. Sehingga dengan meningkatnya metabolisme maka meningkat pula energi yang dihasilkan untuk pembelahan sel dan mengakibatkan bertambahnya jumlah sel. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Rowland dan Wise (1985) bahwa, *Lactobacillus casei* merupakan salah satu jenis mikroflora dominan pada usus manusia. Mikroflora usus mendapatkan substrat pertumbuhannya dari diet misalnya oligosakarida, serat makanan, dan protein yang belum sempat tercerna sampai di usus, serta dari sumber endogen misalnya musin (penyusun klorogen utama dari mukus yang melapisi dinding saluran cerna).

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa, pada perlakuan penambahan xilooligosakarida memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap pertambahan jumlah sel *Lactobacillus casei* Shirota strain berturut-turut dari konsentrasi 5%, 3%, dan 1%, baik pada lama inkubasi 6, 12, 18, dan 24 jam. Dan seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi maka jumlah sel *Lactobacillus casei* Shirota strain pada setiap perlakuan juga mengalami peningkatan. Hal ini

disebabkan penambahan xilooligosakarida memberikan persediaan nutrisi yang lebih, utamanya sebagai sumber karbon dalam proses metabolisme sel. Sehingga walaupun pada lama inkubasi 18 dan 24 jam merupakan fase stasioner bagi pertumbuhan *Lactobacillus casei* Shirota strain, namun dengan tersedianya sumber karbon yang cukup menyebabkan masih meningkatnya proses metabolisme. Hal ini mengakibatkan masih meningkatnya jumlah sel. Namun jika persediaan nutrisi berkurang maka aktivitas metabolisme juga akan menurun. Jumlah sel pun akan berkurang dan pada akhirnya akan mengalami kekurangan nutrisi, terakumulasinya senyawa-senyawa toksik yang dihasilkan oleh bakteri yang menyebabkan kematian bagi sel-sel bakteri (Purwoko, 2007). Hal ini sesuai dikemukakan oleh Kailasapathy dan Chin (2000) bahwa kehadiran karbohidrat terbukti meningkatkan survivabilitas *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* secara *in-vitro*.

Macfarlane *et al.* (1992), mengemukakan bahwa fermentasi karbohidrat adalah sumber energi utama bagi mikroflora usus misalnya *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium*, namun seiring dengan pergerakan bahan cerna di sepanjang distal kolon, ketersediaan karbohidrat akan berkurang, hingga protein dan asam amino akan menjadi sumber energi metabolik dominan untuk bakteri di daerah distal kolon. Hal ini akan menyebabkan meningkatnya bakteri patogen di usus sebab protein dan asam amino adalah merupakan sumber nutrisi utama bagi bakteri patogen. Oleh karena itu, diet karbohidrat yang sulit dicerna tetap dibutuhkan untuk menjaga keseimbangan mikroflora di usus, yang akhirnya memunculkan konsep prebiotik.

Pada produksi SCFA, pemanfaatan xilooligosakarida tersebut akan didegradasi oleh enzim  $\beta$ -xilosidase yang dihasilkan oleh *Lactobacillus casei* Shirota strain menjadi xilosa. Selanjutnya xilosa yang merupakan pentosa melalui fermentasi mengalami proses glikolisis menjadi asam piruvat. Dalam proses metabolisme selanjutnya asam piruvat akan diubah menjadi asam laktat, asam asetat, asam propionat, asam butirat dan gas. Hal ini dikarenakan *Lactobacillus casei* Shirota strain merupakan kelompok jenis bakteri asam laktat yang bersifat heterofermentatif fakultatif yang berarti bakteri ini dapat bersifat heterofermentatif (homolaktat) maupun homofermentatif (heterolaktat). Bakteri asam laktat yang bersifat homofermentatif dapat memproduksi asam laktat sebagai produk mayoritas dari fermentasi karbohidrat dan sebagian kecil asetat melalui jalur heksosa difosfat (HDP) atau disebut juga *Embden – Meyerhoff Pathway*. Sedangkan bakteri asam laktat bersifat heterofermentatif dapat menghasilkan laktat dari fermentasi karbohidrat melalui jalur heksosa monofosfat

(HMP) atau biasa juga disebut jalur fosfoketolase atau jalur pentosa fosfat atau jalur *warburg dicken*. Dalam hal ini karena kuman *Lactobacillus casei* Shirota strain bersifat heterofermentatif fakultatif, maka dalam proses metabolismenya dapat menghasilkan asam laktat melalui kedua jalur fermentasi tersebut. Purwoko (2007) bahwa asam laktat yang terbentuk pada proses fermentasi sebagian besar diubah menjadi asam asetat, asam propionat dan butirat melalui jalur asetil-KoA.

Hasil analisis menunjukkan bahwa hasil metabolit *Lactobacillus casei* Shirota strain, baik kontrol maupun pada perlakuan penambahan xilooligosakarida pada media MRSB mengandung asam laktat, asam asetat, asam propionat, dan asam butirat. Namun pada perlakuan dengan penambahan xilooligosakarida memperlihatkan jumlah asam laktat yang lebih banyak dibanding kontrol. Hal ini menunjukkan penggunaan xilooligosakarida pada penelitian ini dapat meningkatkan aktivitas metabolisme *Lactobacillus casei* Shirota strain sehingga mampu memproduksi SCFA lebih banyak dibanding kontrol. Sebagaimana yang dikemukakan oleh Cummings *et al.* (2001), di dalam usus, karbohidrat utamanya oligosakarida dan *dietary fiber* akan difermentasi oleh bakteri asam laktat misalnya *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* menjadi asam lemak rantai pendek (SCFA) terutama laktat, asam asetat, propionat dan butirat, serta sejumlah metabolit lainnya seperti etanol, suksinat, gas CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, CH<sub>4</sub> dan H<sub>2</sub>S. Wang dan Gibson (1993) bahwa produksi SCFA dan gas merupakan produk dari aktivitas mikroflora pada fermentasi, namun pola untuk menghasilkan produk ini, oleh masing-masing mikroflora berbeda dan masih banyak yang belum diketahui.

Efek produksi SCFA dan peningkatan jumlah bakteri menguntungkan antara lain meningkatkan fungsi usus, absorpsi kalsium, metabolisme lipid dan mengurangi risiko kanker kolon (Cycroft *et al.*, 2001). Menurut Cumming (1995), manfaat SCFA terhadap kesehatan, antara lain adalah SCFA yang dihasilkan oleh fermentasi bakteri baik, diabsorpsi oleh mukosa usus dan berperan dalam pemenuhan kebutuhan energi inang. Asam laktat akan menjadikan kondisi usus menjadi asam sehingga bakteri patogen yang tidak tahan asam akan mati. Asetat akan dimetabolisir pada sel otot, ginjal, jantung dan otak. Propionat merupakan prekursor glukoneogenik yang menekan sintesis kolesterol dalam hati. Hal ini dibuktikan dengan percobaan *in vitro* oleh Pereira *et al.*, (2003) terhadap penurunan kadar kolesterol yang disebabkan tingginya kadar propionat oleh *Lactobacillus fermentum*. Naruszewicz *et al.* (2002) membuktikan bahwa *Lactobacillus plantarum* dapat

menurunkan tekanan darah, fibrinogen dan kolesterol LDL serta menaikkan kolesterol HDL. Sedangkan butirrat merupakan sumber energi utama untuk kolonisasi, dimana butirrat dimetabolisme oleh epitel kolon dan berfungsi sebagai regulator pertumbuhan dan diferensiasi sel. Di samping itu butirrat memegang peranan penting dalam mencegah kanker (Topping dan Clifton, 2001).

Rata-rata nilai pH pada awal fermentasi untuk semua perlakuan adalah sama 7,0 dan nilai pH menurun sejalan dengan bertambahnya waktu fermentasi. Perubahan nilai pH disebabkan karena terbentuknya asam-asam organik yang berifat asam utamanya asam laktat. Sebagaimana dikemukakan oleh Alvarez-Olmos dan Oberhelman (2001) bahwa dalam fermentasi karbohidrat oleh bakteri asam laktat menghasilkan asam-asam organik seperti laktat dan asetat yang membuat asam pH di sekitarnya sehingga organisme patogen tidak mampu hidup. Dengan demikian perubahan pH menjadi asam akan menyebabkan efek antimikroba bagi mikroba patogen, sebaliknya bakteri asam laktat masih dapat hidup dalam suasana asam dengan pH optimum 3–8 (Djaafar dkk., 1996). Mekanisme lain dari sifat antimikroba ini bahwa bakteri asam laktat juga menghasilkan peptida antimikroba misalnya bakteriosin, bakteriosin mempunyai sifat daya hambat karena polipeptidanya mampu bergabung dengan protein-protein lapisan membran sel bakteri patogen sehingga membran sel tidak dapat berfungsi dengan baik dalam hal menyeleksi molekul-molekul keluar masuk sel (Anderssen *et al.*, 1998). Apajalahati *et al.* (2002), membuktikan bahwa pemberian inulin pada diet tikus, mengakibatkan peningkatan jumlah bakteri *caecum* dan peningkatan SCFA, sehingga terjadi reduksi pH.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan xilooligosakarida pada media MRSB dengan konsentrasi 1%, 3%, dan 5%, serta lama inkubasi 6, 12, 18, dan 24 jam memberikan efek yang signifikan terhadap pertambahan jumlah sel *Lactobacillus casei* Shirota strain. Aktivitas pertumbuhan *Lactobacillus casei* Shirota strain pada perlakuan dengan penambahan xilooligosakarida memproduksi asam laktat, asam asetat, asam propionat, dan asam butirrat sehingga menyebabkan penurunan nilai pH pada media. Penambahan 5% xilooligosakarida pada media MRSB dengan lama inkubasi 24 jam memperlihatkan hasil yang terbaik terhadap peningkatan jumlah sel *Lactobacillus casei* Shirota strain. Hasil Penelitian ini membuktikan bahwa xilooligosakarida cukup prospektif untuk diaplikasikan sebagai prebiotik.

## KEPUSTAKAAN

- Alvarez-Olmos MI dan Oberhelman RA, 2001. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 32: 1567–1576.
- Alonso JL, Vaquez MJ, Dominguez H, Parajo JC, 2001. Xilooligosaccharides: Manufacture and Application, *J. Food Science and Technology*, 11: 387–93.
- Anderssen EL, Diep DB, Nes IF, Eijsink VGH, dan Nissen-Meyer J, 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2269–2272.
- Apajalahati JH, Kettunen H, Kettunen A, Holben WE, Nurminen PH, Rautonen N, dan Mutanen M, 2002. Culture-independent microbial community analysis reveals that insulin in the diet primarily affects previously unknown bacteria in the mouse caecum. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4986–4995.
- Cycroft CE, Jones MR, Gibson GR, and Rostall RA, 2001. A Comparative In Vitro Evaluation on the Fermentation properties of Prebiotic Oligosaccharides, *Journal of Applied Microbiology*, 91: 878–97.
- Cummings JH, 1995. Short chain fatty acids. In: Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology. GR Gibson and GT Macfarlane (Eds). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 101–130.
- Cummings JH dan Macfarlane GT, 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*, 70: 443–459.
- Cummings JH, Macfarlane GT, Englyst HN, 2001. Prebiotic Digestion and Fermentability, *American Journal of clinical nutrition*, 73(2): 415S–20S.
- Dominguez Herminia, Alonso JL, Garrote Gil, Carlos Juan, 2003. Xilooligosaccharides: Properties and Technologies, *Electron Journal Environ. Agric Food Chem*; 2(1): 1579–4377.
- Fuller R dan Gibson GR, 1998. Probiotics and prebiotics: microflora management for improved gut health. *Clinical Microbiology and Infection*, 4: 477–480.
- Gibson GR dan Roberfroid MB, 1995. Dietary Modulation of the Human colonic microbiota: Introducing the Concept of Prebiotic. *Journal of Nutrition* 125: 1401–12.
- Djaafar TF, Rahayu ES, Wibiwo, dan Sudarmadji, 1996. Substansi Antimikroba Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Makanan Hasil Fermentasi Tradisional Indonesia, *Jurnal Pert. Indonesia*, 1: 15–21.
- Kailasapathy K dan Chin J, 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology*, 78: 80–88.

- Macfarlane GT, Gibson GR dan Cummings JH, 1992. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon, *Journal of Applied Bacteriology*, 72: 57–64.
- Macfarlane GT, Cumming JH, 1999. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *Br. Med. J.* 318: 999–1003.
- Naruszewicz M, Johansson ML, Zapolska-Downar D dan Bukowska H, 2002. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76: 1249–1255.
- Pereira DIA, McCartney AL dan Gibson GR, 2003. An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolysing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *J. Applied and Environmental Microbiology*, 69: 4743–4752.
- Purwoko Tjahjadi, 2007. Fisiologi Mikroba, Bumi Aksara, Jakarta.
- Rowland IR dan Wise A, 1985. The effect of diet on the mammalian gut flora and its metabolic activities. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 16: 31–103.
- Sullivan A, Nord CE, 2002. Probiotic in human infections, *J. Antimicrobial Chemotherapy*, 50: 625–627.
- Tomomatsu H, 1994. Health effects of oligosaccharides. *Food Technology* October issue, 61–65.
- Topping DL dan Clifton PM, 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*, 81, 1031–1064.
- Wang X, Gibson GR, 1993. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J. Appl. Bacteriol*, 75: 373–80.

Reviewer: **Dr. Ni'matuzahroh**