

## **PENGARUH VARIASI KONSENTRASI INULIN PADA PROSES FERMENTASI OLEH *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* DAN *Streptococcus thermophilus***

*(The Inulin Variation Concentration Effect in Fermentation Using *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*)*

**R. Haryo Bimo Setiarto<sup>1)</sup>, Nunuk Widhyastuti<sup>1)</sup>, Iwan Saskiawan<sup>1)</sup> dan Rina Marita Safitri<sup>2)</sup>**

<sup>1)</sup>Laboratorium Mikrobiologi Pangan, Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi LIPI, Jalan Raya Bogor Km 46, Kawasan CSC Cibinong 16911, Indonesia

<sup>2)</sup>Departemen Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia  
e-mail: haryobimo88@gmail.com

Naskah diterima 3 Oktober 2016, revisi akhir 15 Desember 2016 dan disetujui untuk diterbitkan 23 Desember 2016

**ABSTRAK.** *Prebiotik adalah komponen bahan pangan yang tidak dapat dicerna oleh saluran pencernaan secara enzimatik sehingga akan difermentasi oleh bakteri probiotik di usus besar. Inulin merupakan salah satu sumber prebiotik yang banyak dimanfaatkan dalam produk pangan olahan seperti susu fermentasi. Pemberian inulin pada kadar tertentu perlu diketahui untuk mengetahui jumlah optimal yang diperlukan untuk menjaga kesehatan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi prebiotik inulin terhadap pertumbuhan bakteri asam laktat starter yogurt (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*). Pengamatan pertumbuhan *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* dilakukan dengan beberapa cara antara lain perhitungan total sel dengan menggunakan prinsip turbidimetrik OD (Optical Density), jumlah total koloni dengan Total Plate Count (TPC), analisis kadar total asam laktat tertitrisasi dan pengukuran pH. Konsentrasi inulin 0,5% (b/v) mampu meningkatkan pertumbuhan *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* secara signifikan dibandingkan perlakuan lainnya. Penurunan nilai pH selama fermentasi inulin mengindikasikan pertumbuhan bakteri penghasil asam laktat. *L. acidophilus* mengalami fase eksponensial pertumbuhannya mulai dari masa inkubasi jam ke-6 hingga jam ke-24. Sementara itu *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* mengalami fase eksponensial pertumbuhannya mulai dari masa inkubasi jam ke-6 hingga jam ke-18. Laju pertumbuhan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* lebih sensitif terhadap penambahan konsentrasi prebiotik inulin jika dibandingkan dengan *L. acidophilus*. Selama pertumbuhan *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* dalam media MRSB yang disuplementasi inulin terjadi penurunan nilai pH dari kisaran 7,00 menjadi di bawah 5,00 karena pembentukan asam-asam organik.*

**Kata kunci:** *Fermentasi, Inulin, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus**

**ABSTRACT.** *Prebiotics are food components that can not enzymatically digested, thus it fermented by probiotic bacteria. Inulin is a prebiotic source that widely used in processed food products such as fermented milk. This study aimed to know the variation concentrations effect of prebiotic inulin on the growth of lactic acid bacteria starter yogurt (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*). The growth of those lactic acid bacteria was determined based on OD (Optical Density), Total Plate Count (TPC), total lactic acid content and pH. Inulin concentration of 0.5% (w/v) increased the growth of those three bacteria. Reduction of pH value during inulin fermentation indicated the growth of bacteria that produced lactic acid. *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* growth rate were more sensitive than *L. acidophilus* in addition of prebiotic inulin concentration. The growth of those*

*bacteria in MRSB medium supplemented inulin decreased pH around 7.00 into below 5.00 due to organic acids formation.*

**Keywords:** Fermentation, Inulin, *L.acidophilus*, *L.bulgaricus*, *S.thermophilus*

## 1. PENDAHULUAN

Biodiversitas mikroorganisme dalam kolon manusia sangat kompleks dan beragam. Kolon manusia merupakan suatu ekosistem yang terdiri dari berbagai macam koloni mikroflora, diperkirakan terdiri atas 300-500 spesies bakteri yang berbeda (Guamaer & Malagelada, 2003). Beberapa koloni mikroba di dalam kolon antara lain *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bifidobacteria*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium* dan *Fusobacteria*. Mikroflora di saluran kolon terdiri dari bakteri menguntungkan, bakteri patogen maupun bakteri yang mempunyai sifat keduanya. Contoh bakteri yang bersifat menguntungkan antara lain *Bifidobacteria*, *Lactobacillus* dan *Streptococcus*. Bakteri yang merugikan atau bersifat patogen antara lain *Clostridia*, *Aeruginosa* dan *Staphylococcus*. Sedangkan bakteri yang mempunyai kedua sifat tersebut antara lain *Bacteroides*, *Escherichia coli* dan *Enterococcus* (Gibson & Robertfroid, 1995).

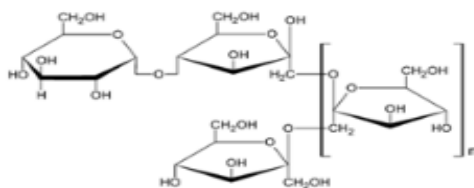
Probiotik merupakan mikroba hidup yang bila diberikan dalam jumlah tertentu akan bermanfaat bagi kesehatan saluran pencernaan (Duncan & Flint, 2013). Beberapa spesies bakteri probiotik yang sering digunakan dalam produk pangan antara lain *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* dan *Streptococcus thermophilus* yang digunakan sebagai starter dalam pembuatan yogurt. Syarat yang harus dipenuhi kelompok bakteri asam laktat (BAL) yang digunakan sebagai bakteri probiotik antara lain: mempunyai ketahanan terhadap cairan asam lambung, garam empedu dan kondisi anaerob; mampu tumbuh dengan cepat dan menempel pada sel epitel usus serta saluran pencernaan lainnya; mampu mendegradasi laktosa; tidak bersifat patogen dan mampu menghambat bakteri

patogen serta memberikan pengaruh yang menguntungkan lainnya; mempunyai viabilitas yang tinggi sehingga tetap hidup; tumbuh dan aktif dalam sistem pencernaan (Akin, *et al.*, 2007).

Prebiotik adalah komponen bahan pangan yang tidak dapat dicerna oleh saluran pencernaan manusia secara enzimatis sehingga akan difermentasi oleh mikroflora yang ada di usus besar (Al-Sheraji, *et al.*, 2013). Prebiotik di dalam usus besar akan mendukung pertumbuhan bakteri probiotik dan menekan bakteri patogen. Terdapat berbagai manfaat yang diperoleh dari mengonsumsi prebiotik, antara lain mencegah konstipasi yaitu kondisi tidak bisa buang air besar secara teratur, menurunkan pH usus dan dapat mengembalikan mikroflora di usus setelah terjadi perubahan akibat penggunaan antibiotik, diare maupun stress (Lopes, *et al.*, 2016).

Secara umum, komponen bahan pangan yang mempunyai sifat prebiotik antara lain polisakarida non pati (seperti pektin, selulosa dan xilan), gula dan oligosakarida (seperti laktosa, rafinosa, fruktooligosakarida, galaktooligosakarida dan laktulosa) (Grimoud, *et al.*, 2010; Machado, *et al.*, 2015). Salah satu contoh dari prebiotik alami yang saat ini terus dikembangkan adalah inulin yang dapat diperoleh dari beberapa tanaman. Inulin merupakan komponen bahan pangan yang tidak dapat dihidrolisis oleh asam lambung maupun enzim pencernaan namun dapat merangsang pertumbuhan dan aktivitas bakteri probiotik dalam saluran pencernaan. Inulin telah banyak dimanfaatkan sebagai bahan pangan fungsional dalam bidang medis serta bidang farmasi. Inulin juga berfungsi sebagai *dietary fiber* yaitu kelompok karbohidrat yang tidak dapat dihidrolisis oleh enzim tubuh manusia tetapi difermentasi oleh mikroflora usus sehingga

berpengaruh pada fungsi usus (Huebner, *et al.*, 2007).



Gambar 1. Struktur inulin

Inulin merupakan kelompok polisakarida alami dari karbohidrat yang tersusun dari gabungan monosakarida fruktosa. Setiap ujung pereduksi untai polimer inulin terdapat gugus terminal berupa glukosa. Masing-masing unit fruktosa dihubungkan oleh suatu ikatan (2→1) β-D- fructofuranosyl. Setiap ujung untai inulin dapat ditemukan glukosa sehingga polimer inulin dapat ditulis (GF)<sub>n</sub> yaitu fruktan dengan ujung terminal glukosa dan F<sub>n</sub> yaitu fruktan tanpa ujung terminal glukosa (Adebola, *et al.*, 2014). Struktur inulin dapat dilihat pada Gambar 1. Inulin terdapat pada beberapa jenis umbi-umbian seperti umbi Dahlia (*Dahlia sp. L*), umbi yacon (*Chicoryum intybus L*), umbi Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*), chicory, dandelion (*Taraxacum officinale Weber*) dan bawang-bawangan seperti bawang merah, bawang putih, asparagus, pisang serta gandum dalam jumlah yang kecil. Inulin juga dapat bersumber dari oat mentah, barley dan gandum (Cardarelli, *et al.*, 2008).

Sifat khas pada inulin yaitu dapat larut dalam air dan sulit dihidrolisis oleh enzim yang berada di saluran pencernaan sehingga dapat secara utuh sampai ke usus besar. Di dalam usus besar, inulin akan difermentasi oleh bakteri probiotik yang ada di dalam usus menjadi asam-asam lemak rantai pendek dan beberapa mikroflora spesifik menghasilkan asam laktat. Hal tersebut akan memberikan efek positif terhadap kesehatan tubuh. Sifat-sifat inulin antara lain berbentuk serbuk putih, tidak berasa, tidak berbau dan tahan panas (Roberfroid, 2007). Inulin Sebagai prebiotik memberikan manfaat yang penting dalam tubuh karena dapat

mengikat air dari beberapa polisakarida penting dalam mempertahankan air di dalam lambung. Selain itu, ada beberapa manfaat inulin di bidang pangan antara lain sebagai pengganti lemak dan gula pada produk makanan rendah kalori, campuran mayones, es krim, bahan baku sosis dan saus (Karimi, *et al.*, 2015).

Beberapa negara sudah memiliki aturan mengenai standar jumlah prebiotik yang dikonsumsi terutama inulin. Inulin merupakan salah satu jenis prebiotik yang banyak dimanfaatkan di dalam produk pangan sehingga perlu ditambahkan dalam kadar yang sesuai untuk produk makanan olahan seperti susu fermentasi. Kadar pemberian inulin perlu diketahui untuk mendapatkan jumlah optimal inulin yang bermanfaat bagi kesehatan tubuh. Berdasarkan uraian diatas maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui kadar optimal inulin sebagai bahan prebiotik sehingga dapat diaplikasikan pada bakteri asam laktat starter yogurt.

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat dijadikan acuan dan sebagai studi awal untuk pemanfaatan inulin sebagai sumber prebiotik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi prebiotik inulin terhadap pertumbuhan bakteri asam laktat starter yogurt (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus*) pada proses fermentasi. Pertumbuhan bakteri asam laktat dianalisis menggunakan beberapa parameter yaitu peningkatan kekeruhan sel dengan prinsip turbidimetrik OD (*Optical Density*), peningkatan jumlah total koloni bakteri asam laktat dengan *Total Plate Count* (TPC), analisis kadar total asam laktat tertitrasi dan penurunan nilai pH selama fermentasi (Adebola, *et al.*, 2014; Rossi, *et al.*, 2005).

## 2. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong, Bogor, Jawa Barat pada bulan Juni hingga September 2016. Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini berupa labu

erlenmeyer Pyrex 300 mL dan 500 mL, tabung reaksi 20 mL, autoklaf Hirayama HVE-50, Vortex Autovortex Mixer SA2, mikropipet Sibata (10-100 µL), mikropipet Eppendorf (100-1000 µL), mikropipet Sibata (1000-5000 µL), inkubator Isuzu Himawari, spektrofotometer Biospec 160i, timbangan, pH meter TOA, buret, jarum inokulasi, cawan petri, pembakar spiritus dan termometer.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain Inulin dari *chicory* (*Sigma-Aldrich*), media *Man Rogosa and Sharpe Broth (MRSB)* (*Oxoid*) untuk menumbuhkan bakteri asam laktat dan bakteri uji *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* dari Fakultas Peternakan IPB. Komposisi media MRS terdiri dari *Glukosa (D(+)-glucose Merck)* 20 g/2%, *Yeast extract (Bacto TM Yeast Extract)* 4 g/0,4%, *Beef extract, Bacto pepton (BBL TM Polypeptone TM Peptone)* 10 g/1% , *sodium acetat* 5 g/0,5%, *K<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)* 2 g/0,2%, *MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Merck)* 0,05 g/0,005%, *ammonium citrate tribasic (SIGMA)* 2 g/0,2%, *Tween 80 (Merck)* 1 mL/0,1% dan *agar powder (American Bacteriological Agar)* 20 g/2%.

#### **Pembuatan Media MRSB dan MRSA Kultur Fermentasi (Instant)**

Media MRSB instan ditimbang sebanyak 52 g kemudian dilarutkan dalam 1 liter akuades. Larutan diaduk sampai homogen dan disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya, MRSB dituang ke dalam erlenmeyer masing-masing 25 mL, sesuai jumlah perlakuan dan ulangan. Pada masing-masing erlenmeyer yang berisi MRSB tersebut ditambahkan inulin dengan konsentrasi 0%; 0,1%; 0,3% dan 0,5%.

#### **Pembuatan MRSB Modifikasi**

Komposisi media MRSB modifikasi (1L) ditimbang dengan neraca digital yaitu *yeast extract* 20 g (sumber N), *beef extract* 4 g (sumber N), *bacto pepton* 10 g, *sodium acetat* 5 g, *K<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>* 2 g, *MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O* 0,2 g, *Ammonium citrate tribasic* 2 g, *Tween 80* 1 mL, *MnSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O* 0,05 g (Adebola, et al., 2014). Semua bahan dilarutkan

dengan akuades hingga mencapai 1 L. Campuran diaduk hingga homogen lalu disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### **Pembuatan Suspensi Bakteri *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus***

Koloni isolat *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* dibiakkan pada media MRSB dengan cara masing-masing bakteri diambil sebanyak 2% dari volume MRSB dan diinkubasi suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inokulasi berumur 24 jam, suspensi bakteri siap diinokulasi pada media fermentasi MRSB yang mengandung inulin 0%, 0,1%, 0,3% dan 0,5% sebanyak 1 mL.

#### **Pembuatan Larutan Stok Inulin Standar**

Larutan stok inulin standar dibuat dengan konsentrasi 5% (b/v) yaitu dengan menimbang masing-masing sebanyak 7,5 g inulin dan dilarutkan dalam 150 mL media MRSB kemudian diaduk sampai homogen, difilter dengan millipur 0,45 µm. Selanjutnya dilakukan pengenceran untuk memperoleh konsentrasi inulin 0,1%, 0,3% dan 0,5% (b/v) dalam media MRSB guna pengujian pertumbuhan bakteri asam laktat.

#### **Uji Pengaruh Variasi Inulin Terhadap Pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus***

Uji pengaruh variasi inulin terhadap pertumbuhan *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* dilakukan dengan beberapa cara antara lain perhitungan jumlah total sel dengan menggunakan prinsip turbidimetrik OD, perhitungan jumlah total koloni dengan TPC di MRSA serta mengetahui kadar total asam laktat dengan cara titrasi dan pengukuran pH menggunakan pH meter. Jumlah sel bakteri uji dihitung pada masing-masing lama inkubasi (6, 12, 18 dan 24 jam) diambil sebanyak 1 mL untuk dilakukan pengukuran OD pada panjang gelombang 600 nm. Sebanyak 1 mL sampel hasil

fermentasi (0, 6, 12, 18 dan 24 jam) diambil untuk dilakukan pengenceran dengan 9 mL akuades steril. Dua pengenceran paling akhir dari masing-masing sampel hasil fermentasi (0, 6, 12, 18 dan 24 jam) diambil 1 mL untuk diinokulasikan pada *MRS agar plate* dengan metode *spread plate*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Jumlah koloni *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* yang tumbuh dihitung dan dinyatakan dalam *logarithmic colony forming unit/mL* (Log CFU/mL).

#### **Pengukuran Nilai Optical Density (OD)**

Nilai OD diukur pada setiap beda perlakuan konsentrasi variasi inulin setelah inkubasi selama 0, 6, 12, 18 dan 24 jam dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm.

#### **Analisis Kadar Total Asam Laktat dan Pengukuran Nilai Derajat Keasaman (pH)**

Nilai derajat keasaman (pH) diukur pada setiap perlakuan beda konsentrasi inulin setelah masa inkubasi 0, 6, 12, 18 dan 24 jam dengan menggunakan pH meter. Sebelum digunakan, pH meter dikalibrasi dengan buffer fosfat (pH 6,86) dan buffer asetat (pH 4,00). Sementara itu pengukuran kadar total asam laktat dilakukan dengan pengambilan sampel sebanyak 25 mL dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Campuran ini ditambahkan indikator PP untuk uji total asam sebanyak 2 hingga 3 tetes. Sampel kemudian dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N hingga terjadi perubahan warna menjadi merah muda yang menandakan telah tercapai titik akhir titrasi.

#### **Analisis Statistik**

Data hasil penelitian diolah secara statistik dengan menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf signifikansi 5% apabila hasil yang diperoleh berbeda nyata antar sampel dengan menggunakan Software SPSS 17,0. Rancangan yang

digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan variabel tetap adalah konsentrasi inulin dan variabel bebas adalah jumlah total koloni bakteri asam laktat, nilai pH dan kadar total asam laktat tertitrasi.

### **3. HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **Pengaruh Variasi Konsentrasi Inulin Terhadap pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus***

Pertumbuhan *L. acidophilus* dipengaruhi oleh jumlah konsentrasi inulin yang ditambahkan ke dalam media MRSB modifikasi, meskipun nilainya tidak terlalu signifikan ( $p < 0,05$ ). Hal ini ditunjukkan dengan meningkatnya pertumbuhan jumlah total koloni *L. acidophilus* selama masa inkubasi 24 jam. Pada masa inkubasi 24 jam telah terjadi peningkatan pertumbuhan sebanyak lebih dari 2 log (CFU/mL) koloni *L. acidophilus* baik pada perlakuan tanpa pemberian inulin maupun pemberian inulin 0,1%; 0,3% dan 0,5% (Tabel 1). Semakin banyak jumlah konsentrasi inulin yang ditambahkan dalam media MRSB modifikasi maka akan meningkatkan pertumbuhan jumlah total koloni *L. acidophilus*. Bakteri *L. acidophilus* memasuki fase eksponensial pertumbuhan mulai dari masa inkubasi jam ke-6 hingga jam ke-24 sebagaimana yang digambarkan oleh grafik peningkatan nilai OD *L. acidophilus* pada Gambar 1. Sampai akhir masa inkubasi 24 jam masih terus terjadi peningkatan pertumbuhan *L. acidophilus* dan belum masuk fase stasioner. Penambahan konsentrasi inulin 0,5% ke dalam media MRSB merupakan modifikasi yang paling efektif dalam meningkatkan pertumbuhan *L. acidophilus* jika dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Hal ini disebabkan perlakuan tersebut mampu menghasilkan peningkatan pertumbuhan jumlah total koloni *L. acidophilus* tertinggi yaitu sebesar 2,73 log (CFU/mL).

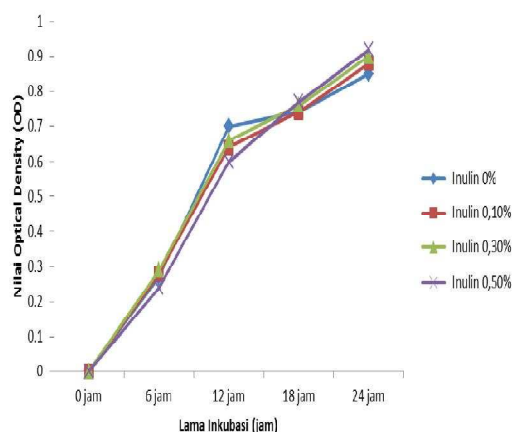
*L. acidophilus* dan *L. bulgaricus* merupakan kelompok jenis bakteri asam laktat yang bersifat homofermentatif.

Tabel 1. Jumlah total koloni *L. acidophilus* (log CFU/mL sampel) pada beberapa variasi kadar inulin (0%; 0,1%; 0,3%; 0,5%) selama 24 jam.

Interval lama Inkubasi	Jumlah total koloni <i>L. acidophilus</i> (log CFU/mL)			
	Inulin 0%	Inulin 0,10%	Inulin 0,30%	Inulin 0,50%
0 jam	7,81±0,02 <sup>a</sup>	7,65±0,03 <sup>a</sup>	7,38±0,02 <sup>g</sup>	7,33±0,01 <sup>g</sup>
6 jam	8,47±0,04 <sup>b</sup>	8,54±0,01 <sup>b</sup>	8,69±0,01 <sup>f</sup>	8,75±0,07 <sup>f</sup>
12 jam	9,42±0,01 <sup>c</sup>	8,96±0,02 <sup>f</sup>	8,84±0,04 <sup>f</sup>	8,81±0,03 <sup>f</sup>
18 jam	9,10±0,05 <sup>d</sup>	9,08±0,06 <sup>d</sup>	8,99±0,03 <sup>d</sup>	9,92±0,02 <sup>e</sup>
24 jam	9,99±0,02 <sup>e</sup>	9,91±0,04 <sup>e</sup>	9,49±0,01 <sup>e</sup>	10,06±0,05 <sup>e</sup>

Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan nilai yang berbeda nyata dengan taraf nyata 95%, ( $\alpha=5\%$ ), setelah dilakukan uji statistik dengan uji BNT pada SPSS 17,0.

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-Meyarhoff Pathway* (Cummings, *et al.*, 2001). Sementara itu bakteri asam laktat bersifat heterofermentatif dapat menghasilkan laktat dari fermentasi karbohidrat melalui jalur heksosa monofosfat (HMP) atau biasa juga disebut jalur fosfoketolase dan jalur pentosa fosfat. *L. acidophilus* dan *L. bulgaricus* bersifat homofermentatif sehingga dalam proses metabolismenya dapat menghasilkan asam laktat melalui jalur heksosa difosfat (HDP). Karimi, *et al.*, (2015) melaporkan bahwa asam laktat yang terbentuk pada proses fermentasi sebagian besar diubah menjadi asam asetat, asam propionat dan butirrat melalui jalur asetil-KoA.



Gambar 1. Nilai OD *L. acidophilus* dari beberapa variasi kadar inulin (0%; 0,1%; 0,3%; 0,5%) selama 24 jam.

Berdasarkan hasil penelitian, fermentasi inulin oleh *L. acidophilus* belum mencapai fase stasioner pada jam ke-24 (Gambar 1). Apabila proses fermentasi inulin dilanjutkan setelah fermentasi 24 jam, dapat dilihat waktu ketika *L. acidophilus* memasuki fase stasioner dan fase kematian. Pengamatan pertumbuhan *L. acidophilus* dibatasi sampai jam ke-24 untuk mencegah penurunan kualitas sensorik produk yogurt akibat produksi asam laktat berlebih. Hal ini disebabkan tujuan fermentasi inulin ini adalah untuk diaplikasikan pada produksi yogurt sinbiotik.

Selain itu, setelah memasuki fase stasioner dan kematian sebagian besar asam laktat hasil fermentasi inulin akan mengalami fermentasi alkohol oleh enzim laktat dehidrogenase sehingga dapat menimbulkan cita rasa pahit (Karimi, *et al.*, 2015). Konsentrasi optimum inulin untuk meningkatkan pertumbuhan *L. acidophilus* ditentukan berdasarkan jumlah total koloni tertinggi dan nilai OD setelah masa inkubasi 24 jam. Semakin tinggi nilai OD dan jumlah total koloni bakteri menunjukkan peningkatan pertumbuhan bakteri asam laktat secara signifikan.

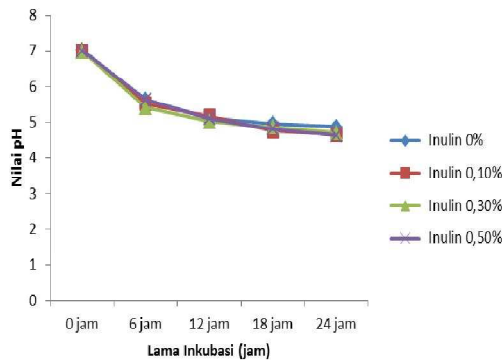
Pada fermentasi inulin oleh *L. acidophilus* selama 24 jam terjadi penurunan nilai pH dan peningkatan kadar asam laktat baik pada perlakuan tanpa pemberian inulin maupun pemberian inulin 0,1%; 0,3% dan 0,5% (Gambar 2).

Macfarlane dan Cummings (1999) melaporkan bahwa penurunan pH dipengaruhi oleh meningkatnya kadar asam laktat yang dihasilkan oleh BAL.

Tabel 2. Kadar total asam laktat tertitrisi *L. acidophilus* dengan beberapa variasi kadar inulin (0%; 0,1%; 0,3%; 0,5%) selama 24 jam

Interval lama Inkubasi	Nilai kadar total asam laktat <i>L. acidophilus</i> (%)			
	Inulin 0%	Inulin 0,10%	Inulin 0,30%	Inulin 0,50%
0 jam	0,63±0,02 <sup>a</sup>	0,63±0,02 <sup>a</sup>	0,49±0,03 <sup>c</sup>	0,36±0,02 <sup>d</sup>
6 jam	0,54±0,01 <sup>b</sup>	0,63±0,02 <sup>a</sup>	0,54±0,02 <sup>b</sup>	0,54±0,02 <sup>b</sup>
12 jam	0,45±0,01 <sup>c</sup>	0,32±0,01 <sup>d</sup>	0,50±0,04 <sup>c</sup>	0,36±0,02 <sup>d</sup>
18 jam	0,45±0,02 <sup>c</sup>	0,54±0,01 <sup>b</sup>	0,36±0,02 <sup>d</sup>	0,45±0,01 <sup>c</sup>
24 jam	0,41±0,02 <sup>c</sup>	0,59±0,01 <sup>e</sup>	0,36±0,01 <sup>d</sup>	0,36±0,03 <sup>d</sup>

Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan nilai yang berbeda nyata dengan taraf nyata 95%, ( $\alpha=5\%$ ), setelah dilakukan uji statistik dengan uji BNT pada SPSS 17,0.



Gambar 2. Nilai pH *L. acidophilus* dengan beberapa variasi kadar inulin (0%; 0,1%; 0,3%; 0,5%) selama 24 jam

Hidrolisis inulin sebagai sumber karbon dalam sel *L. acidophilus* akan menghasilkan energi yang dimanfaatkan untuk pertumbuhan, reproduksi sel maupun aktivitas bakteri probiotik. Selain menghasilkan energi untuk metabolisme dan pembelahan sel, fermentasi ini juga menghasilkan produk sampingan berupa asam laktat. Pembentukan asam laktat tersebut akan menurunkan nilai pH. Pada penelitian ini, kadar total asam laktat yang dihasilkan oleh *L. acidophilus* relatif mengalami fluktuasi (peningkatan maupun penurunan) pada setiap interval periode analisis. Fluktuasi tersebut terjadi karena asam laktat sebagai asam lemak rantai pendek juga dimanfaatkan sebagai sumber karbon oleh *L. acidophilus* untuk pertumbuhannya melalui jalur metabolisme  $\beta$ -oksidasi sehingga asam laktat hasil metabolisme inulin langsung dimanfaatkan sebagai sumber nutrisi oleh *L. acidophilus*.

Macfarlane dan Cummings (1999) melaporkan 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 sehingga 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 karena protein dan asam amino 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 asam lemak rantai pendek, pemanfaatan inulin tersebut akan didegradasi oleh enzim fruktosidase yang dihasilkan oleh *L. acidophilus* menjadi fruktosa. Selanjutnya, fruktosa 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 (Wang & Gibson, 1993).

Sebagaimana yang dikemukakan oleh Cummings, *et al.*, (2001), karbohidrat utama di dalam usus berupa oligosakarida dan *dietary fiber* akan difermentasi oleh bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* menjadi asam lemak rantai pendek terutama asam 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. Produksi asam lemak rantai pendek 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 asam lemak rantai pendek dan peningkatan jumlah bakteri menguntungkan antara lain meningkatkan fungsi usus, absorpsi kalsium, metabolisme lipid dan mengurangi risiko kanker kolon (Cycroft, *et al.*, 2001).

### Pengaruh Variasi Konsentrasi Inulin Terhadap pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus*

Pertumbuhan *L. bulgaricus* sangat dipengaruhi secara signifikan oleh konsentrasi inulin yang ditambahkan ke dalam media MRSB modifikasi ( $p < 0,05$ ). Hal ini ditunjukkan dengan meningkatnya pertumbuhan jumlah total koloni *L. bulgaricus* selama masa inkubasi 24 jam dimana telah terjadi peningkatan pertumbuhan sebanyak lebih dari 2 log (CFU/mL) koloni *L. bulgaricus* baik pada perlakuan tanpa pemberian inulin maupun dengan pemberian inulin 0,1%; 0,3% dan 0,5% (Tabel 3). Semakin banyak jumlah konsentrasi inulin yang ditambahkan dalam media MRSB modifikasi maka pertumbuhan jumlah total koloni *L. bulgaricus* akan meningkat.

Bakteri *L. bulgaricus* memasuki fase eksponensial pertumbuhannya mulai dari masa inkubasi jam ke-6 hingga jam ke-18, sebagaimana yang digambarkan oleh

grafik peningkatan nilai OD *L. bulgaricus* (Gambar 3). Selanjutnya pertumbuhan sedikit melambat pada interval waktu inkubasi antara jam ke-12 dan jam ke-18. Setelah memasuki jam ke-24, pertumbuhan *L. bulgaricus* memasuki fase stationer karena habisnya substrat inulin dan nutrisi sumber karbon maupun sumber nitrogen yang terkandung dalam media MRSB. Penambahan konsentrasi inulin 0,5% ke dalam media MRSB modifikasi paling efektif dalam meningkatkan pertumbuhan *L. bulgaricus* jika dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Hal ini disebabkan perlakuan tersebut mampu menghasilkan peningkatan pertumbuhan jumlah total koloni *L. bulgaricus* tertinggi yaitu sebesar 2,75 log (CFU/mL). Selain itu perlakuan tersebut juga mempercepat *L. bulgaricus* masuk ke fase pertumbuhan eksponensial selama periode inkubasi pada jam ke-6 sampai jam ke-12.

Gambar 3 memperlihatkan grafik pola pertumbuhan *L. bulgaricus* yang berbeda jika dibandingkan dengan grafik pola pertumbuhan *L. acidophilus* pada Gambar 1. Pertumbuhan *L. bulgaricus* meningkat secara signifikan setelah pemberian konsentrasi inulin 0,3% dan 0,5%. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi inulin yang ditambahkan ke dalam media MRSB akan semakin mempercepat laju pertumbuhan *L. bulgaricus*. Kecepatan pertumbuhan sel *L. bulgaricus* berbanding lurus dengan kebutuhan energi metabolisme yang diperlukan oleh bakteri tersebut untuk melakukan pembelahan sel. Kebutuhan

Tabel 3. Jumlah total koloni *L. bulgaricus* (log CFU/mL sampel) pada beberapa variasi kadar inulin (0%; 0,1%; 0,3%; 0,5%) selama 24 jam

Interval lama Inkubasi	Jumlah total koloni <i>L. bulgaricus</i> (log CFU/mL)			
	Inulin 0%	Inulin 0,10%	Inulin 0,30%	Inulin 0,50%
0 jam	7,37±0,02 <sup>a</sup>	7,35±0,04 <sup>a</sup>	7,35±0,06 <sup>a</sup>	7,30±0,02 <sup>a</sup>
6 jam	7,60±0,03 <sup>b</sup>	7,65±0,06 <sup>b</sup>	7,95±0,03 <sup>b</sup>	7,82±0,04 <sup>b</sup>
12 jam	8,71±0,01 <sup>c</sup>	8,49±0,02 <sup>f</sup>	8,70±0,05 <sup>c</sup>	8,51±0,07 <sup>f</sup>
18 jam	9,24±0,06 <sup>d</sup>	8,94±0,03 <sup>c</sup>	9,59±0,02 <sup>d</sup>	9,23±0,03 <sup>d</sup>
24 jam	9,74±0,04 <sup>c</sup>	9,87±0,05 <sup>e</sup>	9,86±0,01 <sup>e</sup>	10,05±0,02 <sup>h</sup>

Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan nilai yang berbeda nyata dengan taraf nyata 95%, ( $\alpha=5\%$ ), setelah dilakukan uji statistik dengan uji BNT pada SPSS 17,0.

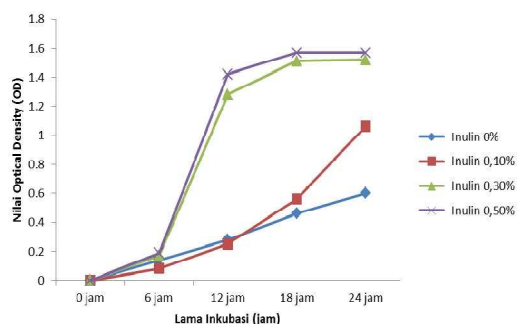


energi yang tinggi ini akan menginduksi sel untuk mempercepat proses metabolismenya sehingga nutrisi yang terkandung dalam media pertumbuhan *L. bulgaricus* lebih cepat habis. Hal inilah yang membuat *L. bulgaricus* lebih cepat masuk ke fase stasioner dan kematian pada pemberian konsentrasi inulin 0,3% dan 0,5%. Pada perlakuan tanpa pemberian konsentrasi inulin (0%) dan penambahan inulin 0,1% laju pertumbuhan *L. bulgaricus* justru lebih lambat sehingga pada akhir jam ke-24 *L. bulgaricus* masih terus mengalami fase eksponensial dan belum mencapai fase stasioner (Gambar 3). Hal ini semakin membuktikan bahwa prebiotik inulin merupakan sumber nutrisi penting dan esensial yang dibutuhkan oleh *L. bulgaricus* dalam meningkatkan dan mempercepat laju pertumbuhannya.

Nilai pH sangat berkaitan dengan kadar asam laktat yang dihasilkan selama fermentasi inulin oleh *L. bulgaricus* (Tabel 4 dan Gambar 4). Asam laktat yang dihasilkan dari metabolisme inulin menyebabkan penurunan pH. Hal tersebut berkaitan dengan kenaikan jumlah populasi bakteri asam laktat yang memanfaatkan inulin sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan. Semakin banyak jumlah inulin sebagai sumber karbon yang dapat dimetabolisme maka semakin banyak pula asam lemak rantai pendek yang dihasilkan sehingga secara otomatis pH akan semakin rendah. Fluktuasi kadar asam laktat yang dihasilkan selama fermentasi inulin oleh *L. bulgaricus* menunjukkan bahwa asam laktat sebagai asam lemak rantai pendek dimanfaatkan sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan *L. bulgaricus* sehingga asam laktat langsung dimanfaatkan sebagai sumber nutrisi (Tabel 4).

Seluruh senyawa prebiotik yang masuk dalam saluran pencernaan manusia akan mengalami fermentasi oleh bakteri di usus besar melalui beberapa jalur metabolisme untuk fermentasi inulin. Produk utama dari fermentasi inulin adalah butirir sedangkan produk utama dari fermentasi Fruktosa Oligosakarida (FOS) adalah asam asetat dan asam laktat (Rossi, *et al.*, 2005). Selain itu, populasi *Clostridium* pada saluran pencernaan

bertanggung jawab untuk peningkatan produksi gas seperti CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub> sebagai hasil samping dari fermentasi fruktan melalui degradasi langsung dari inulin (Duncan, *et al.*, 2004). Asam butirir adalah salah satu asam lemak rantai pendek paling penting yang dihasilkan selama fermentasi inulin. Jalur metabolisme untuk menghasilkan asam butirir terdiri dari kondensasi dua molekul asetil koenzim A dan pengurangan senyawa butirir-CoA (Duncan, *et al.*, 2002). Asam butirir dapat dihasilkan melalui aktivitas enzim butirir kinase (Diez-Gonzalez, *et al.*, 1999). Di jalur metabolisme lain yang melibatkan senyawa butirir-CoA dan enzim asetat transferase CoA, senyawa CoA dapat berpindah ke asetat ekstrinsik sehingga menghasilkan produk asam butirir dan asetil-CoA (Louis, *et al.*, 2004).



Gambar 3. Nilai OD *L. bulgaricus* dengan beberapa variasi kadar inulin (0%; 0,1%; 0,3%; 0,5%) selama 24 jam

Hasil penelitian tentang metabolisme inulin dalam menghasilkan asam butirir melalui jalur butirir-CoA dan asetat transferase CoA menunjukkan keragaman yang tinggi di antara mikroorganisme dalam saluran pencernaan terkait kemampuan mereka untuk memanfaatkan asetat eksternal sebagai *acosubstrate* (Falony, *et al.*, 2009). Meskipun aktivitas prebiotik dari inulin telah dipelajari secara ekstensif sebagai bahan pangan fungsional, masih sedikit informasi yang diperoleh mengenai korelasi antara kemampuan fermentasi bakteri probiotik di usus dengan panjang rantai polimer fruktan. Bakteri *L. bulgaricus* telah menunjukkan kemampuan degradasi tinggi pada rantai terpanjang

inulin tetapi belum menunjukkan selektivitasnya terhadap derajat polimerisasinya (Rossi, *et al.*, 2005). *L. bulgaricus* juga dapat melepaskan enzim glikosil hidrolase dan β-fruktofuranosida untuk mencerna inulin (Schell, *et al.*, 2002).

Salah satu dampak dari penggunaan prebiotik inulin adalah pH di kultur sel maupun di dalam saluran pencernaan bersifat sedikit lebih asam sehingga menguntungkan untuk pertumbuhan probiotik. Jadi meskipun penurunan pH kolon dapat lebih meningkatkan pertumbuhan bakteri probiotik dengan menghambat pertumbuhan bakteri patogen, konsentrasi yang tinggi dari beberapa sumber prebiotik tersebut juga memiliki dampak negatif terhadap pertumbuhan bakteri probiotik. Prebiotik inulin juga dapat meningkatkan pertumbuhan probiotik dengan menurunkan pH usus ke tingkat optimal yang dipengaruhi oleh sifat fisikokimia asam empedu (Rodrigues, *et al.*, 1998). Konsentrasi tinggi prebiotik inulin juga dapat menurunkan kelarutan asam empedu sehingga dapat menurunkan kadar toksisitas.

Su, Henriksson & Mitchell (2007) melaporkan bahwa bakteri *Lactobacillus casei* dan *Bifidobacterium lactis* dapat tumbuh dalam medium MRSB yang ditambahkan inulin. Huebner, *et al.*, (2007) telah melakukan penelitian untuk memilih prebiotik dengan penambahan FOS, inulin dan GOS yang terbukti ketiganya mampu meningkatkan pertumbuhan *Lactobacillus sp.* dan *Bifidobacteria*. Kombinasi tertentu

antara probiotik dan prebiotik dapat memberi peningkatan yang tertinggi. Hal ini termasuk *L. paracasei* 1195 yang dapat ditumbuhkan pada media yang mengandung inulin.

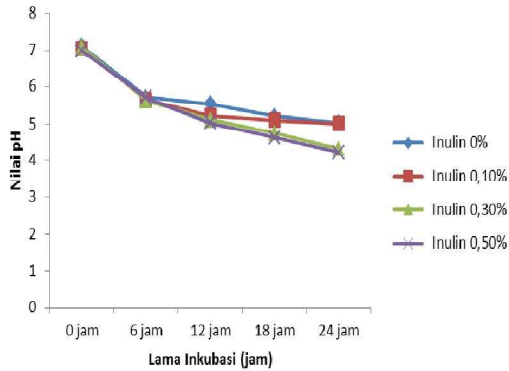
Rata-rata nilai pH pada awal fermentasi untuk semua perlakuan adalah sama yaitu 7,0 dan nilai pH menurun sejalan dengan bertambahnya waktu fermentasi (Gambar 4). Perubahan nilai pH disebabkan karena terbentuknya asam-asam organik dengan produk utamanya adalah asam laktat. Sebagaimana dilaporkan oleh Alvarez-Olmas dan Oberhelman (2001) bahwa fermentasi karbohidrat oleh bakteri asam laktat menghasilkan asam-asam organik seperti laktat dan asetat yang menyebabkan penurunan pH di sekitarnya sehingga organisme patogen tidak mampu hidup. 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, *et al.*, 1996). Mekanisme lain dari sifat antimikroba ini adalah bakteri asam laktat juga menghasilkan peptida antimikroba misalnya bakteriosin. Bakteriosin mempunyai sifat daya hambat karena polipeptida yang terkandung 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).

Tabel 4. Kadar total asam laktat tertitrisasi *L. bulgaricus* dengan beberapa variasi kadar inulin (0%; 0,1%; 0,3%; 0,5%) selama 24 jam

Interval lama Inkubasi	Nilai kadar total asam laktat <i>L. bulgaricus</i> (%)			
	Inulin 0%	Inulin 0,10%	Inulin 0,30%	Inulin 0,50%
0 jam	0,49±0,02 <sup>a</sup>	0,45±0,02 <sup>a</sup>	0,54±0,01 <sup>b</sup>	0,63±0,02 <sup>c</sup>
6 jam	0,54±0,01 <sup>b</sup>	0,63±0,02 <sup>c</sup>	0,54±0,01 <sup>b</sup>	0,54±0,01 <sup>b</sup>
12 jam	0,54±0,01 <sup>b</sup>	0,45±0,01 <sup>a</sup>	0,63±0,02 <sup>c</sup>	0,72±0,04 <sup>c</sup>
18 jam	0,54±0,01 <sup>b</sup>	0,45±0,01 <sup>a</sup>	0,54±0,02 <sup>b</sup>	0,99±0,03 <sup>f</sup>
24 jam	0,54±0,01 <sup>b</sup>	0,45±0,01 <sup>a</sup>	0,90±0,04 <sup>d</sup>	0,72±0,02 <sup>c</sup>

Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan nilai yang berbeda nyata dengan taraf nyata 95%, (α=5%), setelah dilakukan uji statistik dengan uji BNT pada SPSS 17,0

Apajalahti, *et al.*, (2002), membuktikan bahwa pemberian inulin pada diet tikus mengakibatkan peningkatan jumlah bakteri *caecum* dan peningkatan asam lemak rantai pendek sehingga terjadi reduksi pH.



Gambar 4. Nilai pH *L. bulgaricus* dengan beberapa variasi kadar inulin (0%; 0,1%; 0,3%; 0,5%) selama 24 jam

Menurut Cummings, *et al.*, (2001), manfaat asam lemak rantai pendek hasil fermentasi bakteri probiotik yaitu dapat diabsorpsi oleh mukosa usus dan berperan dalam pemenuhan kebutuhan energi. Asam laktat akan menjadikan kondisi usus menjadi asam sehingga bakteri patogen yang tidak tahan asam akan mati. Asam asetat akan dimetabolisme pada sel otot, ginjal, jantung dan otak. Asam 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 *L. fermentum*. Naruszewicz, *et al.* (2002) membuktikan bahwa *L. plantarum* dapat menurunkan tekanan darah, fibrinogen dan kolesterol LDL serta menaikkan kolesterol HDL. Sementara itu asam butirat merupakan sumber energi utama untuk kolonosit, dimana butirat dimetabolisme oleh epitel kolon dan berfungsi sebagai regulator pertumbuhan dan diferensiasi sel (Russell, *et al.*, 2013). Di samping itu, asam butirat memegang peranan penting dalam mencegah kanker (Topping & Clifton, 2001).

### Pengaruh Variasi Konsentrasi Inulin Terhadap pertumbuhan *Streptococcus thermophilus*

Hampir serupa dengan *L. bulgaricus*, pertumbuhan *S. thermophilus* sangat dipengaruhi secara signifikan oleh konsentrasi inulin yang ditambahkan ke dalam media MRSB modifikasi ( $p < 0,05$ ). Hal ini ditunjukkan dengan meningkatnya pertumbuhan jumlah total koloni *S. thermophilus* selama masa inkubasi 24 jam. Selama masa inkubasi 24 jam telah terjadi peningkatan pertumbuhan sebanyak lebih dari 2 log (CFU/mL) koloni *S. thermophilus* baik pada perlakuan tanpa pemberian inulin maupun pemberian inulin 0,1%; 0,3% dan 0,5% (Tabel 5).

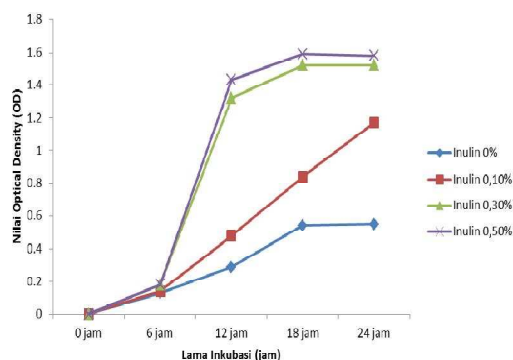
Semakin banyak jumlah konsentrasi inulin yang ditambahkan dalam media MRSB modifikasi maka akan meningkatkan pertumbuhan jumlah total koloni *S. thermophilus*. Bakteri *S. thermophilus* memasuki fase eksponensial pertumbuhannya mulai dari masa inkubasi jam ke-6 hingga jam ke-18 sebagaimana yang digambarkan oleh grafik peningkatan nilai OD *L. bulgaricus* (Gambar 5). Pada periode jam ke-18 sampai jam ke-24, pertumbuhan *S. thermophilus* memasuki fase stasioner. Setelah jam ke-24 pertumbuhan *S. thermophilus* memasuki fase kematian (*death*) karena telah habisnya substrat inulin dan nutrisi sumber karbon maupun sumber nitrogen yang terkandung dalam media MRSB. Penambahan konsentrasi inulin 0,5% ke dalam media MRSB modifikasi paling efektif dalam meningkatkan pertumbuhan *S. thermophilus* jika dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Hal ini disebabkan perlakuan tersebut mampu menghasilkan peningkatan pertumbuhan jumlah total koloni *S. thermophilus* tertinggi yaitu sebesar 2,84 log (CFU/mL). Selain itu perlakuan tersebut juga mempercepat *S. thermophilus* masuk ke fase pertumbuhan eksponensial selama periode inkubasi jam ke-6 sampai jam ke-12. Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa kecepatan pertumbuhan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* lebih sensitif terhadap penambahan konsentrasi prebiotik inulin jika dibandingkan dengan *L. acidophilus*.

Tabel 5. Jumlah total koloni *S. thermophilus* ( log CFU/ml sampel) pada beberapa variasi kadar inulin (0%; 0,1%; 0,3%; 0,5%) selama 24 jam

Interval lama Inkubasi	Jumlah total koloni <i>S. thermophilus</i> (log CFU/ml)			
	Inulin 0%	Inulin 0,10%	Inulin 0,30%	Inulin 0,50%
0 jam	7,28±0,04 <sup>a</sup>	7,26±0,02 <sup>a</sup>	7,24±0,03 <sup>a</sup>	6,85±0,02 <sup>g</sup>
6 jam	7,97±0,06 <sup>b</sup>	7,91±0,04 <sup>b</sup>	7,52±0,02 <sup>f</sup>	7,99±0,05 <sup>b</sup>
12 jam	8,71±0,02 <sup>c</sup>	8,93±0,02 <sup>c</sup>	9,00±0,06 <sup>d</sup>	9,17±0,03 <sup>d</sup>
18 jam	9,02±0,03 <sup>d</sup>	9,67±0,04 <sup>e</sup>	9,42±0,02 <sup>e</sup>	9,65±0,04 <sup>e</sup>
24 jam	9,27±0,05 <sup>d</sup>	9,58±0,03 <sup>e</sup>	9,82±0,02 <sup>f</sup>	9,69±0,05 <sup>e</sup>

Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan nilai yang berbeda nyata dengan taraf nyata 95%, ( $\alpha=5\%$ ), setelah dilakukan uji statistik dengan uji BNT pada SPSS 17,0.

Gambar 5 memperlihatkan grafik pola pertumbuhan *S. thermophilus* yang hampir serupa jika dibandingkan dengan grafik pola pertumbuhan *L. bulgaricus* pada Gambar 3 namun sangat berbeda dengan grafik pola pertumbuhan *L. acidophilus* (Gambar 1).

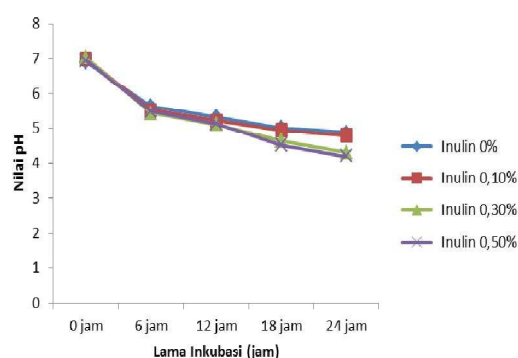


Gambar 5. Nilai OD *S. thermophilus* dengan beberapa variasi kadar inulin (0%; 0,1%; 0,3%; 0,5%) selama 24 jam

Pertumbuhan *S. thermophilus* meningkat secara signifikan setelah pemberian konsentrasi inulin 0,3% dan 0,5%. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi inulin yang ditambahkan ke dalam media MRSB akan semakin mempercepat laju pertumbuhan *S. thermophilus*. Kecepatan pertumbuhan sel *S. thermophilus* berbanding lurus dengan kebutuhan energi metabolisme yang diperlukan oleh bakteri tersebut untuk melakukan pembelahan sel. Kebutuhan energi yang tinggi ini akan menginduksi sel untuk mempercepat proses metabolismenya sehingga nutrisi yang

terkandung dalam media pertumbuhan *S. thermophilus* lebih cepat habis. Hal inilah yang membuat *S. thermophilus* lebih cepat masuk ke fase stasioner dan kematian pada pemberian konsentrasi inulin 0,3% dan 0,5%. Pada perlakuan tanpa pemberian konsentrasi inulin (0%) dan penambahan inulin 0,1% laju pertumbuhan *L. bulgaricus* justru lebih lambat sehingga pada akhir jam ke-24 *L. bulgaricus* masih terus mengalami fase eksponensial dan belum mencapai fase stasioner (Gambar 5). Hal ini semakin membuktikan bahwa prebiotik inulin merupakan sumber nutrisi penting dan esensial yang dibutuhkan oleh *L. bulgaricus* dalam meningkatkan dan mempercepat laju pertumbuhannya.

Penurunan pH selama fermentasi inulin oleh *S. thermophilus* dipengaruhi oleh adanya aktivitas bakteri tersebut dalam menghidrolisis inulin menjadi asam laktat (Gambar 6 dan Tabel 6).



Gambar 6. Nilai pH *S. thermophilus* dengan beberapa variasi kadar inulin (0%; 0,1%; 0,3%; 0,5%) selama 24 jam

Tabel 6. Kadar total asam laktat tertitiasi *S. thermophilus* dengan beberapa variasi kadar inulin (0%; 0,1%; 0,3%; 0,5%) selama 24 jam

Interval lama Inkubasi	Nilai kadar total asam laktat <i>S. thermophilus</i> (%)			
	Inulin 0%	Inulin 0,10%	Inulin 0,30%	Inulin 0,50%
0 jam	0,58±0,04 <sup>a</sup>	0,40±0,01 <sup>c</sup>	0,49±0,02 <sup>d</sup>	0,49±0,01 <sup>d</sup>
6 jam	0,63±0,02 <sup>a</sup>	0,54±0,02 <sup>b</sup>	0,68±0,01 <sup>e</sup>	0,68±0,03 <sup>e</sup>
12 jam	0,59±0,01 <sup>a</sup>	0,41±0,04 <sup>c</sup>	0,72±0,04 <sup>e</sup>	1,17±0,02 <sup>g</sup>
18 jam	0,63±0,03 <sup>a</sup>	0,63±0,02 <sup>a</sup>	0,99±0,04 <sup>f</sup>	0,90±0,04 <sup>h</sup>
24 jam	0,54±0,02 <sup>b</sup>	0,50±0,01 <sup>d</sup>	0,72±0,02 <sup>e</sup>	1,17±0,02 <sup>g</sup>

Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan nilai yang berbeda nyata dengan taraf nyata 95%, ( $\alpha=5\%$ ), setelah dilakukan uji statistik dengan uji BNT pada SPSS 17,0.

Asam laktat yang terbentuk sebagai hasil metabolisme inulin menyebabkan penurunan pH. Hal tersebut berkaitan dengan semakin meningkatnya jumlah populasi bakteri asam laktat yang menggunakan inulin sebagai sumber karbon untuk pertumbuhannya. Semakin banyak sumber karbon yang dapat dimetabolisme maka semakin banyak pula asam laktat yang dihasilkan sehingga secara otomatis pH juga akan semakin rendah. Duncan dan Flint (2013) melaporkan bahwa bakteri jenis *Streptococcus sp.* bertanggung jawab atas penurunan pH awal yogurt menjadi sekitar 5,0 sedangkan *Lactobacillus sp.* bertanggung jawab atas penurunan lebih lanjut sampai pH mencapai 4,5.

Inulin relatif masih utuh setelah transisi melalui sistem pencernaan. Inulin di dalam usus besar dicerna oleh enzim fruktofuransidase yang dihasilkan oleh *Bifidobacteria* (Pokusaeva, *et al.*, 2011). Inilah sebabnya inulin tidak dapat dicerna oleh enzim pencernaan manusia kecuali melalui aktivitas bakteri probiotik. Inulin dapat mengubah komposisi mikroflora di dalam usus manusia dengan proses fermentasi yang didominasi oleh *Bifidobacteria*. Seperti disebutkan sebelumnya, derajat polimerisasi inulin biasanya berkisar 3-60 (Murphy, 2001). Hal inilah yang membuat fermentasi inulin dengan spesies *Lactobacillus sp.* relatif lebih mudah (Buriti, *et al.*, 2007) karena kemampuan untuk memfermentasi jenis inulin merupakan kemampuan spesifik dari *Lactobacillus sp.* (Makras, *et al.*, 2005). Efektivitas prebiotik inulin tidak hanya

dipengaruhi oleh derajat polimerisasinya, namun juga tergantung pada kadar inulin (Van Loo, 2004).

Alves, *et al.* (2013) meneliti penerapan inulin sebagai prebiotik di dalam keju krim yang dibentuk melalui fermentasi *S. thermophilus*, *Bifidobacterium animalis* Bb-12 dan *L. acidophilus* La-5. *S. thermophilus* menunjukkan viabilitas yang baik (6,66-9,38 log cfu g<sup>-1</sup>) sedangkan *Bifidobacterium animalis* memiliki viabilitas di atas 6 log cfu g<sup>-1</sup> selama periode penyimpanan 45 hari. Namun *L. acidophilus* menunjukkan penurunan nilai viabilitas sebesar 3,1 log cfu g<sup>-1</sup> pada akhir periode penyimpanan. Hal tersebut menunjukkan bahwa inulin dalam krim keju lebih spesifik dapat menjaga pertumbuhan *S. thermophilus*, *Bifidobacterium animalis* Bb-12.

Cardarelli, *et al.*, (2008) meneliti pengaruh penambahan inulin, oligofruktosa dan oligosakarida lainnya terhadap viabilitas bakteri probiotik *Bifidobacterium lactis* dan *L. acidophilus* yang terkandung dalam keju *petitsuisse*. Mereka menemukan bahwa populasi probiotik bervariasi antara 7,20-7,69 log cfu g<sup>-1</sup> untuk *Bifidobacterium lactis* dan 6,08-6,99 log cfu g<sup>-1</sup> untuk *L. acidophilus*. Jumlah populasi probiotik menurun selama penyimpanan untuk kedua bakteri probiotik tersebut. Penurunan jumlah viabilitas koloni selama penyimpanan tidak pernah di atas 0,74 log cfu g<sup>-1</sup> untuk *L. acidophilus* dan 0,37 log cfu g<sup>-1</sup> untuk *Bifidobacterium lactis*. Modzelewska-Kapitula, *et al.*, (2007) meneliti jumlah

total populasi koloni *L. plantarum* dalam keju yang diberikan penambahan inulin dan melaporkan bahwa jumlah total koloni *L. plantarum* sangat dipengaruhi oleh penambahan inulin. Jumlah total koloni *L. plantarum* dalam sampel keju yang mengandung inulin berada di kisaran 7,27-7,66 cfu g<sup>-1</sup>. Nilai rata-rata jumlah total koloni *L. plantarum* jauh lebih tinggi daripada viabilitas bakteri tersebut pada sampel keju tanpa inulin selama periode penyimpanan 45 hari. Hal inilah yang berhasil dibuktikan yaitu penambahan inulin dengan konsentrasi 0,1-0,5% (b/v) ke dalam media MRSB sangat berpengaruh dalam meningkatkan viabilitas pertumbuhan bakteri *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* sebesar 2,0-2,5 log cfu/mL. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa inulin dengan konsentrasi 0,1-0,5% (b/v) dapat diaplikasikan dalam pembuatan yogurt sinbiotik.

Salem, *et al.*, (2007) meneliti efek dari penambahan 1% inulin pada pertumbuhan dan stabilitas *L. reuteri* B-14171, *L. johnsonii* B-2178 dan *L. salivarius* B-1950 sebagai kultur untuk starter pembuatan keju selama 30 hari penyimpanan pada suhu 5°C. Mereka membuktikan bahwa inulin tidak memiliki pengaruh pada pola pertumbuhan dari *S. thermophilus* dan *L. delbreuckii ssp. bulgaricus* selama penyimpanan dingin keju. Mereka juga menunjukkan bahwa kelangsungan hidup ketiga strain bakteri probiotik menurun selama penyimpanan. Namun kelangsungan hidup probiotik ini dalam percobaan yang mengandung inulin lebih tinggi dari kontrol (tanpa inulin).

Viabilitas tertinggi ditemukan pada sampel dengan inulin yaitu 87,8% untuk *L. reuteri*, 81,68% untuk *L. johnsonii* dan 79,16% untuk *L. salivarius*. Sebaliknya, sampel kontrol yang tidak mengandung prebiotik memiliki tingkat rata-rata kelangsungan hidup 77,8% untuk *L. reuteri*, 74% untuk *L. johnsonii* dan 76% untuk *L. salivarius* (Salem, *et al.*, 2007). Akin & Kirmaci (2007) melaporkan bahwa penambahan prebiotik inulin pada produk es krim tidak berpengaruh pada pertumbuhan jumlah koloni bakteri

probiotik *S. thermophilus* dan *L. delbreuckii ssp. bulgaricus*, akan tetapi akan meningkatkan jumlah total koloni *L. acidophilus* dan *Bifidobacterium lactis*. Sementara itu pada penelitian ini diketahui bahwa penambahan 0,5% (b/v) inulin ke dalam media MRSB mampu meningkatkan pertumbuhan *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* secara signifikan. Oleh karena itu prebiotik inulin dengan konsentrasi 0,5% (b/v) dapat diaplikasikan untuk meningkatkan kualitas sifat fungsional dari yogurt sinbiotik.

#### 4. KESIMPULAN

Penambahan inulin sebesar 0,5% (b/v) ke dalam media MRSB mampu meningkatkan pertumbuhan *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* secara signifikan. Selama fermentasi inulin, *L. acidophilus* mengalami fase eksponensial pertumbuhan mulai dari jam ke-6 hingga jam ke-24. Sementara itu *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* mengalami fase eksponensial pertumbuhan mulai dari jam ke-6 hingga jam ke-18. Fermentasi bakteri asam laktat dalam penelitian ini belum mencapai fase stasioner pada jam ke-24. Hal ini disebabkan tujuan fermentasi inulin adalah untuk produksi yogurt sinbiotik sehingga pengamatan dibatasi sampai jam ke-24 untuk mencegah penurunan kualitas sensorik produk yogurt akibat produksi asam laktat berlebih. Laju pertumbuhan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* lebih sensitif terhadap penambahan konsentrasi prebiotik inulin, jika dibandingkan dengan *L. acidophilus*. Selama pertumbuhan *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* dalam media MRSB yang ditambahkan inulin terjadi penurunan nilai pH dari kisaran 7,00 menjadi di bawah 5,00 karena pembentukan asam lemak rantai pendek. Prebiotik inulin lebih spesifik untuk meningkatkan pertumbuhan *Lactobacillus* sp. Untuk penelitian ke depannya dapat dilakukan studi komparatif dengan membandingkan kemampuan pertumbuhan ketiga isolat bakteri asam laktat starter yogurt tersebut terhadap sumber prebiotik yang lain seperti Fruktosa Oligosakarida

(FOS), Gluko Oligosakarida (GOS), rafinosa dan pati resisten.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Kegiatan Inkubasi Teknologi Pusat Inovasi LIPI 2016. Terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada Ibu Kasirah, Nimas Ayu Rikmawati, Dewi Rista dan Nety Agustin yang telah membantu baik secara teknis maupun non teknis sehingga penelitian ini berjalan lancar.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adebola, O.O., Corcoran, O. & Morgan, W.A. (2014). Synbiotics: the impact of potential prebiotics inulin, lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of lactobacilli probiotics. *Journal of Functional Foods*, 10, 75–84.
- Akin, M.B., Akin, M.S. & Kirmaci, Z. (2007). Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice cream. *Food Chemistry*, 104, 93–99.
- Al-Sheraji, S.H., Ismaila, A., Manap, M.Y., Mustafa, S., Yusof, R.M. & Hassan, F.A. (2013). Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods*, 5, 1542–1553.
- Alvarez-Olmos, M.I. & Oberhelman, R.A. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 32, 1567–1576.
- Alves, L.L., Richards, N.S.P.S., Mattanna, P., Andrade, D.F., Rezer, A.P.S. & Milani, L.I.G. (2013). Cream cheese as a symbiotic food carrier using *Bifidobacterium animalis* Bb-12 and *Lactobacillus acidophilus* La-5 and inulin. *International Journal of Dairy Technology*, 66, 63–69.
- Anderssen, E.L., Diep, D.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G.H. & 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.
- Apajalahti, J.H., Kettunen, H., Kettunen, A., Holben, W.E., Nurminen, P.H., Rautonen, N. & Mutanen, M. (2002). Culture independent microbial community analysis reveals that insulin in the diet primarily affects previously unknown bacteria in the mouse cecum. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4986–4995.
- Buriti, F.C.A., Cardarelli, H.R., Filisetti, T.M.C.C. & Saad, S.M.I. (2007). Symbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *Food Chemistry*, 104, 1605–1610.
- Cardarelli, H.R., Buriti, F.C.A., Castro, I.A. & Saad, S.M.I. (2008). Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially symbiotic petisuisse cheese. *LWT – Food Science and Technology*, 41, 1037–1046.
- Cummings, J. H., Macfarlane, G. T. & Englyst, H. N. (2001). Prebiotic digestion and fermentation. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 415–420.
- Cycroft, C.E., Jones, M.R., Gibson, G.R. & Rostall, R.A. (2001). A Comparative In Vitro Evaluation on the Fermentation properties of Prebiotic Oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 878–897.
- Diez-Gonzalez, F., Bond, D.R., Jennings, E. & Russell, J.B. (1999). Alternative schemes of butyrate production in *Butyrivibrio fibrisolvens* and their relationship to acetate utilization, lactate production, and phylogeny. *Archives of Microbiology*, 171, 324–330.
- Djaafar, T.F., Rahayu, E.S., Wibowo & Sudarmadji. (1996). Substansi Antimikroba Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Makanan Hasil Fermentasi Tradisional Indonesia. *Jurnal Pertanian Indonesia*, 1, 15–21.
- Duncan, S.H., Barcenilla, A., Stewart, C.S., Pryde, S.E. & Flint, H.J. (2002). Acetate utilization and butyryl-coenzyme A (CoA): acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine.

- Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5186–5190.
- Duncan, S.H. & Flint, H.J. (2013). Probiotics and prebiotics and health in ageing populations. *Maturitas*, 75(1), 44–50.
- Duncan, S., Louis, P. & Flint, H.J. (2004). Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5810–5817.
- Falony, G., Lazidou, K., Verschaeren, A., Weckx, S., Maes, D. & De Vuyst, L. (2009). In vitro kinetic analysis of fermentation of prebiotic inulin-type fructans by Bifidobacterium species reveals four different phenotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 454–461.
- Gibson, G.R. & Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutrition*, 125(6), 1401–1412.
- Grimoud, J., Durand, H., Courtin, C., Monsan, P., Ouarné, F., Theodorou, V. & Roques, C. (2010). In vitro screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. *Anaerobe*, 16, 493–500.
- Guamer, F. & Malagelada J.R. (2003). Gut flora in health and disease. *European Nutrition Research*, 361 (9356), 512–519.
- Huebner, J., Wehling, R.L. & Hutkins, R.W. (2007). Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 17, 770–775.
- Karimi, R., Azizi, M.H., Ghasemlou, M. & Vaziri, M. (2015). Application of inulin in cheese as prebiotic, fat replacer and texturizer: A review. *Carbohydrate Polymers*, 119, 85–100.
- Lopes, S.M.S., Francisco, M.G., Higashi, B., de Almeida, R.T.R., Krausová, G., Pilau, E.J., Goncalves, J.E., Goncalves, R.A.C. & de Oliveira, A.J.B. (2016). Chemical characterization and prebiotic activity of fructo-oligosaccharides from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) roots and in vitro adventitious root cultures. *Carbohydrate Polymers*, 152, 718–725.
- Louis, P., Duncan, S.H., McCrae, S.I., Millar, J., Jackson, M.S. & Flint, H.J. (2004). Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. *Journal of Bacteriology*, 186, 2099–2106.
- Macfarlane, G.T. & Cumming, J.H. (1999). Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health. *Br. Med. J.*, 318, 999–1003.
- Machado, M.T.C., Kaliana, S.E., Vieira, G.S., Menegalli, F.C., Martínez, J. & Hubinger, M.D. (2015). Prebiotic oligosaccharides from artichoke industrial waste: evaluation of different extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 76, 141–148.
- Makras, L., Van Acker, G. & De Vuyst, L. (2005). *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6531–6537.
- Modzelewska-Kapituła, M., Kłębukowska, L. & Kornacki, K. (2007). Influence of inulin and potentially probiotic *Lactobacillus plantarum* strain on microbiological quality and sensory properties of soft cheese. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57, 143–146.
- Murphy, O. (2001). Non-polyol low-digestible carbohydrates: Food applications and functional benefits. *British Journal of Nutrition*, 85(1), 547–553.
- Naruszewicz, M., Johansson, M.L., Zapolska-Downar, D. & Bukowska, H. (2002). Effect of *Lactobacillus plantarum* on cardiovascular disease risk factors in smokers. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 1249–1255.
- Pereira, D.I.A., McCartney, A.L. & Gibson, G.R. (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.
- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G.F. & van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate



- metabolism in bifidobacteria. *Genes & Nutrition*, 6, 285–306.
- Roberfroid, M.B. (2007). Prebiotic: the concept revisited. *The Journal of Nutrition*, 137, 830–837.
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A. & Zanoni, S. (2005). Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: A comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6150–6158.
- Rodrigues, D., Rocha-Santos, T.A.P., Pereira, C.I., Gomes, A.M., Malcata, F.X. & Freitas, A.C. (2011). The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices. *LWT—Food Science and Technology*, 44, 100–108.
- Russell, W.R., Duncan, S.H. & Flint, H.J. (2013). The gut microbial metabolome: Modulation of cancer risk in obese individuals. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 72, 177–188.
- Salem, M.M.E., Abd El-Gawad, M.A.M., Hassan, F.A.M. & Effat, B.A. (2007). Use of symbiotics for the production of functional low-fat Labneh. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57, 151–159.
- Schell, M.A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B. & Pessi, G. (2002). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22), 14422–14427.
- Su, P., Henriksson, A. & Mitchell, H. (2007). Selected prebiotics support the growth of probiotic monocultures in vitro. *Anaerobe*, 13, 134–139.
- Topping, D.L. & Clifton, P.M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*, 81, 1031–1064.
- Van Loo, J. (2004). The specificity of the interaction with intestinal bacterial fermentation by prebiotic determine their physiological efficacy. *Nutrition Research Reviews*, 17, 89–98.
- Wang, X. & Gibson, G.R. (1993). Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J. Appl. Bacteriol.*, 75, 373–380.