

Pengaruh Penambahan Prebiotik Inulin dan Fruktooligosakarida (FOS) terhadap Pertumbuhan Probiotik *Bifidobacterium* sp. Bb2E

Azma Nurizqi Isnasari, Dyah Fitri Kusharyati, Oedjijono

Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman
Jalan dr. Suparno 63 Purwokerto 53122.
email: azma.isna23@gmail.com

Rekam Jejak Artikel:

Diterima : 13/10/2020
Disetujui : 12/12/2020

Abstract

Human health is very closely related to the condition of the human digestive tract since the beginning of life. The diversity of microorganisms found in the human digestive tract is very diverse, consisting of 300-500 different species of bacteria to increase the working power of nutrition. Prebiotics such as inulin and FOS and probiotics such as *Bifidobacteria* are aspects that can be added for the increase of nutrition. Optimal bacterial growth can be seen in the bacterial growth curve. The research problems were how the effect of prebiotic inulin and FOS on the growth of *Bifidobacterium* sp. Bb2E, the amount of incubation time needed to support the growth of *Bifidobacterium* sp. Bb2E, and how the interaction between prebiotic types and incubation times on the growth of *Bifidobacterium* sp. BB2E. The purposes of this study were to study the effect of prebiotic inulin and FOS on the growth of *Bifidobacterium* sp. Bb2E, to know the optimal incubation time of *Bifidobacterium* sp. Bb2E, and to know the interaction between prebiotic types and incubation times on the growth of *Bifidobacterium* sp. BB2E. This research was conducted using a completely randomized design (CRD) with factorial patterns. The main parameter measured was the population of *Bifidobacterium* sp. Bb2E, and the additional parameters measured were the pH level and the value of lactic acid titrated. The independent variable discussed in this study is prebiotic estimation on the medium, while the dependent variable considered is the population of *Bifidobacterium* sp. BB2E. The results of this study showed that the addition of inulin and fructooligosaccharide prebiotic at different incubation times had a significant effect on the growth of *Bifidobacterium* sp. Bb2E. The best treatment was a combination of inulin + FOS at incubation time of 18 hours with an optical density value was 1,794 and a total population density was $2,44 \times 10^{10}$ CFU/mL.

Keywords: *Bifidobacterium* sp. Bb2E, FOS, inulin, prebiotic, probiotic

Abstrak

Kesehatan manusia sangat erat kaitannya dengan kondisi saluran pencernaan manusia sejak awal kehidupannya. Diversitas mikroorganisme yang terdapat dalam saluran pencernaan manusia sangat beragam, yaitu berkisar 300-500 spesies bakteri berbeda. Penambahan beberapa aspek dalam nutrisi diperlukan untuk meningkatkan daya kerja nutrisi. Prebiotik seperti inulin dan FOS serta probiotik seperti *Bifidobacteria* adalah aspek yang dapat ditambahkan untuk meningkatkan nutrisi. Pertumbuhan bakteri yang optimal dapat diketahui berdasarkan pada kurva pertumbuhan bakteri. Permasalahan penelitian yang muncul yaitu bagaimana pengaruh prebiotik inulin dan FOS terhadap pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E, berapa waktu inkubasi yang diperlukan untuk mendukung pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E, dan bagaimana interaksi antara jenis prebiotik dan waktu inkubasi terhadap pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh prebiotik inulin dan FOS terhadap pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E, mengetahui waktu inkubasi optimal *Bifidobacterium* sp. Bb2E, dan mengetahui interaksi antara jenis prebiotik dan waktu inkubasi terhadap pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E. Penelitian ini dilakukan menggunakan rancangan percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pola faktorial. Parameter utama yang diukur yaitu jumlah populasi *Bifidobacterium* sp. Bb2E, sedangkan parameter pendukung yang diukur yaitu nilai pH dan kadar asam laktat dititrasi. Variabel bebas yang diamati dalam penelitian ini adalah penambahan prebiotik pada medium, sedangkan variabel terikat yang diamati yaitu jumlah populasi dari *Bifidobacterium* sp. Bb2E. Hasil penelitian ini menunjukkan penambahan prebiotik inulin dan FOS dengan waktu inkubasi berbeda berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E. Hasil terbaik yang dapat meningkatkan pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E yaitu kombinasi prebiotik inulin+FOS dan waktu inkubasi 18 jam dengan nilai *optical density* sebesar 1,794 dan jumlah kepadatan populasi sebanyak $2,44 \times 10^{10}$ CFU/mL.

Kata kunci: *Bifidobacterium* sp. Bb2E, FOS, inulin, prebiotik, probiotik.

PENDAHULUAN

Kesehatan manusia sangat erat kaitannya dengan kondisi saluran pencernaannya. Ciri-ciri saluran pencernaan yang baik yaitu memiliki kemampuan dalam mencerna dan menyerap makanan, memiliki fungsi imun yang baik, serta keseimbangan mikroorganisme yang sesuai. Saluran pencernaan dapat mencegah infeksi mikroorganisme patogen karena memiliki respon memori terhadap antigen dan dapat membedakan antigen asing dengan antigen yang berasal dari dalam tubuhnya (Hegar, 2017).

Keanekaragaman mikroorganisme yang terdapat dalam saluran pencernaan manusia sangat beragam, yaitu berkisar 300-500 spesies bakteri yang berbeda. Bakteri dalam kolon manusia yang bersifat menguntungkan antara lain *Bifidobacteria*, *Streptococcus*, dan *Lactobacillus*. Bakteri yang bersifat merugikan diantaranya adalah *Clostridia* dan *Staphylococcus* (Setiarto *et al.*, 2016).

Kualitas makanan yang baik dengan kandungan nutrisi yang tepat dapat menjaga kesehatan tubuh. Penambahan beberapa aspek dalam nutrisi diperlukan untuk meningkatkan daya kerja nutrisi. Prebiotik dan probiotik adalah aspek yang dapat ditambahkan pada nutrisi. Probiotik didefinisikan sebagai strain dari mikroorganisme yang telah terseleksi dan memenuhi syarat menjadi probiotik, dan apabila diberikan dalam jumlah yang tepat dapat memberikan keuntungan bagi inangnya (Markowiak & Katarzyna, 2017). Prebiotik merupakan komponen nutrisi yang tidak dapat dicerna dan menghasilkan pengaruh menguntungkan bagi inang dengan cara menstimulir pertumbuhan mikroorganisme dalam saluran pencernaan sehingga terjadi peningkatan kesehatan inang (Vrese & Marteau, 2008).

Bifidobacteria adalah salah satu strain probiotik yang banyak dikembangkan karena menguntungkan bagi kesehatan manusia. Keberadaan bakteri ini menjadi salah satu indikator tingkat kesehatan saluran pencernaan manusia (Collins & Gibson, 1999). *Bifidobacteria* merupakan salah satu Bakteri Asam Laktat (BAL) yang memiliki kemampuan mengkatalisis polimer-polimer karbohidrat dan memanfaatkannya sebagai sumber energi (Ganzle & Follador, 2012). Sumber nutrisi probiotik dapat diperoleh melalui pemberian prebiotik (Setiarto *et al.*, 2017).

Inulin dan fruktooligosakarida (FOS) merupakan senyawa prebiotik yang umum digunakan sebagai sumber nutrisi bagi probiotik. Inulin dan FOS secara alami dapat ditemukan pada berbagai macam sayur dan buah seperti bawang merah, bawang putih, gandum dan pisang. Inulin dan FOS dapat difermentasi oleh bakteri probiotik dan menghasilkan produk berupa asam laktat dan asam karboksilat rantai pendek lainnya (Setiarto *et al.*, 2017). Berdasarkan uraian di atas, masalah yang muncul yaitu bagaimana pengaruh prebiotik inulin dan FOS terhadap pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E, berapa waktu inkubasi yang diperlukan untuk mendukung pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E, dan bagaimana interaksi antara jenis prebiotik dan waktu inkubasi terhadap pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh penambahan prebiotik inulin dan FOS dengan waktu inkubasi berbeda terhadap pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E.

MATERI DAN METODE

Pemurnian dan rekultur (Usmiati & Juniawati, 2011)

Isolat *Bifidobacterium* sp. Bb2E diambil sebanyak satu ose secara aseptis, kemudian diinokulasikan kedalam medium MRSB 10 mL dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Hasil inkubasi dimurnikan dengan cara diambil sebanyak satu ose secara aseptis lalu dilakukan goresan kuadran pada medium MRSA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Koloni tunggal yang didapat kemudian diambil satu ose secara aseptis dan dilakukan goresan pada medium MRSA tabung miring sebagai kultur aktif. Aktivasi kultur dilakukan sebanyak dua kali pengulangan.

Konfirmasi isolat dan pembuatan stok kultur

Konfirmasi kultur dilakukan melalui pewarnaan Gram dan uji katalase. Pewarnaan Gram dilakukan menggunakan gelas objek yang telah dibersihkan menggunakan alkohol dan dikeringkan. Kultur aktif diambil sebanyak satu ose secara aseptis dan diletakkan di atas gelas objek. Akuades ditambahkan sedikit supaya kultur tidak terlalu padat. Gelas objek kemudian difiksasi di atas api Bunsen untuk mematikan sel tanpa merusak struktur sel tersebut. Gelas objek yang telah difiksasi ditetesi dengan pewarna violet kristal dan didiamkan selama satu menit. Gelas objek kemudian dibilas dengan akuades dengan posisi gelas objek miring, lalu ditetaskan

larutan Lugol's *iodine* dan didiamkan selama satu menit. Gelas objek dibilas dengan akuades dengan posisi miring, lalu dibilas dengan alkohol 96% selama sepuluh detik. Gelas objek dibilas menggunakan akuades dengan posisi miring, kemudian ditetaskan pewarna safranin dan didiamkan selama 45 detik. Gelas objek dibilas dengan akuades kembali pada posisi miring, kemudian dikeringkan dengan tisu. Gelas objek kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Sel berwarna menunjukkan Gram positif dan sel berwarna merah menunjukkan Gram negatif. Bentuk sel juga dapat dilihat di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x (Jagadeeshwari, 2019).

Uji katalase dilakukan dengan cara kultur aktif diambil sebanyak satu ose secara aseptis dan diletakkan di atas objek gelas yang telah dibersihkan dengan alkohol. Reagen H_2O_2 ditetaskan sebanyak dua sampai tiga tetes, kemudian dilakukan pengamatan terhadap gelembung gas. Katalase positif ditandai dengan terbentuknya gelembung gas pada gelas objek dan katalase negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung gas pada gelas objek (Fardiaz, 1990).

Pembuatan stok kultur dibuat dari kultur aktif yang telah terkonfirmasi sebagai anggota genera *Bifidobacteria*, yaitu termasuk dalam kelompok bakteri Gram positif dan hasil negatif pada uji katalase (Usmiati & Juniawati, 2011). Kultur aktif diambil sebanyak satu ose, kemudian digoreskan pada MRSA tabung miring sebanyak dua tabung. Stok kultur tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Pembuatan medium MRSB dengan penambahan prebiotik (Modifikasi Setiarto *et al.*, 2017)

Medium MRSB dengan penambahan FOS dibuat dengan cara melarutkan 2 g FOS pada MRSB hingga volumenya menjadi 200 mL untuk konsentrasi 1%, kemudian dihomogenkan dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium MRSB dengan penambahan inulin dibuat dengan cara melarutkan 2 g inulin pada MRSB hingga volumenya menjadi 200 mL untuk konsentrasi 1%, kemudian dihomogenkan dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium MRSB dengan penambahan FOS dan inulin dibuat dengan cara melarutkan 2 g FOS pada MRSB hingga volumenya menjadi 200 mL dan 2 g inulin

pada MRSB hingga volumenya menjadi 200 mL untuk konsentrasi 1%, kemudian dihomogenkan dan masing-masing disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Pembuatan kurva standar kepadatan populasi (Modifikasi Yohan *et al.*, 2018).

Kurva standar dibuat untuk mendapatkan persamaan regresi yang digunakan dalam penghitungan jumlah populasi *Bifidobacterium* sp. Bb2E. Pembuatan kurva standar dilakukan berdasarkan pengukuran nilai absorbansi dengan metode spektrofotometri dan menghitung total koloni dengan metode TPC. Persamaan yang dihasilkan yaitu $y = ax + b$ dengan y adalah jumlah populasi berdasarkan metode TPC dan x adalah nilai absorbansi. Spektrofotometer diatur panjang gelombangnya pada 600 nm. Nilai absorbansi dipilih pada pengaturan mode pembacaan. Blanko akuades dimasukkan terlebih dahulu untuk kalibrasi, selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi. Sebanyak 3 mL medium MRSB diambil dan dituang ke dalam tabung kuvet spektrofotometer untuk pembacaan nilai absorbansi untuk tiap pengenceran. Pengukuran absorbansi dilakukan berdasarkan hukum Lambert-Beer yang dimasukkan ke dalam bahasa program arduino pada spektrofotometer. Penghitungan jumlah total koloni dilakukan dengan cara sebanyak 1 mL *Bifidobacterium* sp. Bb2E diinokulasikan pada cawan MRSA dengan metode *Pour Plate* (PP) secara duplo untuk tiap pengenceran. Cawan MRSA tersebut diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Jumlah koloni yang tumbuh dihitung dan dinyatakan dalam log CFU/mL dan dimasukkan ke dalam persamaan regresi yang sudah diperoleh dari kurva standar (Modifikasi Setiarto *et al.*, 2017).

$$TPC = \text{Jumlah koloni} \times \frac{1}{P} \times \frac{1}{PP}$$

Keterangan:

P : Pengenceran

PP : *Pour Plate*

Pengukuran dilakukan sebanyak enam pengenceran berbeda dengan metode pengenceran bertingkat untuk mendapatkan nilai presisi sebesar 99,35%.

Pembuatan kurva pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E (Wahyuningsih & Zulaika, 2019)

Kurva pertumbuhan dibuat dengan cara menginokulasikan 1 mL kultur *Bifidobacterium* sp. Bb2E ke dalam medium MRSB hingga volumenya menjadi 20

mL. Kepadatan populasi diukur menggunakan metode spektrofotometri dengan panjang gelombang 600 nm dari jam ke-0 hingga jam ke-28 dengan interval waktu 2 jam. Nilai absorbansi yang didapat dimasukkan ke dalam persamaan regresi hasil kurva standar untuk mencari nilai CFU/mL.

Pembuatan inokulum bakteri untuk fermentasi (Modifikasi Setiarto *et al.*, 2017)

Inokulum dibuat dengan cara mengambil 1 ose kultur *Bifidobacterium* sp. Bb2E dan dimasukkan ke dalam 10 mL MRSB, kemudian diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C. Kepadatan populasi dibuat menjadi 10⁸ CFU/mL.

Pengaruh penambahan prebiotik inulin dan FOS pada waktu inkubasi yang berbeda terhadap jumlah populasi *Bifidobacterium* sp. Bb2E

Sebanyak 1 mL *Bifidobacterium* sp. Bb2E dengan kepadatan populasi 10⁸ CFU/mL (mengacu pada cara kerja bagian 5) diinokulasikan ke dalam medium MRSB dengan penambahan prebiotik (berdasarkan cara kerja bagian 3) hingga volume MRSB menjadi 10 mL. Kepadatan populasinya sesuai dengan unit percobaan. Pengukuran kepadatan populasi dilakukan pada jam ke 14, 16, 18, 20, dan 22 dengan metode spektrofotometri (pada cara kerja bagian 4). Hasil yang didapatkan dimasukkan ke dalam persamaan regresi yang sudah diperoleh dari kurva standar (Artanti, 2009).

Penelitian dilakukan secara eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pola faktorial. Perlakuan terdiri atas dua faktor, yaitu jenis prebiotik dan waktu inkubasi. Faktor pertama terdiri atas empat taraf, yaitu kontrol, inulin, FOS, dan inulin+FOS. Faktor kedua terdiri atas lima taraf yaitu 14 jam, 16 jam, 18 jam, 20 jam, dan 22 jam. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali, sehingga diperoleh 60 unit percobaan. Pengukuran pH dilakukan pada jam ke 14, 16, 18, 20, dan 22 sesuai dengan unit percobaan (AOAC, 1995). Pengukuran nilai asam laktat dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 10 mL dari tiap unit percobaan dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Indikator PP ditambahkan untuk uji total asam sebanyak 3 tetes. Sampel dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N hingga terjadi perubahan warna menjadi merah. Pengukuran nilai asam laktat dilakukan pada jam ke 14, 16, 18, 20, dan 22 (Setiarto *et al.*, 2017).

$$\text{Persentase asam laktat} = \frac{V1 \times N \times BE \times FP \times 100\%}{V2 \times 1000}$$

Keterangan:

Persentase asam laktat: Total asam laktat (% v/v)

V1 : Volume NaOH sebagai titran (mL)

N : Normalitas NaOH sebagai titran (N)

BE : Bobot ekuivalen asam laktat (90.08)

FP : Faktor pengenceran

V2 : Jumlah contoh yang dititrasi (mL)

Analisis Data

Data kepadatan populasi yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis ragam pada tingkat kepercayaan 95%. Hasil percobaan menunjukkan bahwa perlakuan berbeda nyata, sehingga dilanjutkan dengan uji beda nyata jujur (BNJ) pada tingkat kesalahan 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultur murni *Bifidobacterium* sp. Bb2E ditandai dengan munculnya koloni tunggal pada medium MRSA yang berwarna putih susu, tepi koloni rata, dan elevasinya *convex*. Hal ini sesuai dengan pernyataan Indrato *et al.* (2017) bahwa karakteristik makromorfologi *Bifidobacteria* adalah memiliki warna koloni putih susu hingga krem, bentuk koloni bulat, dan elevasinya *convex*. Hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat *Bifidobacterium* sp. Bb2E memiliki sifat Gram positif dan katalase negatif. Bakteri dengan Gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tebal jika dibandingkan dengan bakteri Gram negatif (Puspita, 2016). Bentuk sel isolat *Bifidobacterium* sp. Bb2E menunjukkan dominan batang pendek dan bentuk *curved*. Menurut Martinez *et al.* (2013), *Bifidobacteria* memiliki bentuk sel pleomorfik, seperti batang, *curved*, dan *bifurcated*. Y. BAL secara umum memiliki katalase negatif. Hasil uji katalase isolat *Bifidobacterium* sp. Bb2E yaitu negatif karena tidak muncul gelembung setelah ditetesi oleh reagen H₂O₂. Dewi (2018) menyatakan bahwa isolat *Bifidobacterium* sp. Bb2E memiliki karakteristik Gram positif dan katalase negatif

Menurut Sharah *et al.* (2015), fase pertumbuhan yang dimiliki oleh bakteri secara umum ada 4, yaitu fase lag (fase adaptasi), fase log (fase logaritmik), fase stasioner, dan fase kematian. Isolat *Bifidobacterium* sp. Bb2E mengalami fase adaptasi dari jam ke-0 hingga jam ke-6, fase logaritmik dari jam ke-8 hingga jam ke-20, dan mengalami fase stasioner pada jam ke-22 hingga jam ke-26. Yuliana (2008) menyatakan bahwa faktor yang

berpengaruh dalam penentuan lama fase adaptasi dari suatu bakteri yaitu jumlah sel yang diinokulasikan, kondisi fisiologis dan morfologis dari bakteri tersebut, serta medium pertumbuhannya. Khoiriyah & Ardiningsih (2014) menyatakan bahwa fase adaptasi dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti pH, suhu, dan nutrisi. Fase adaptasi menunjukkan peningkatan sel yang cukup lambat.

Fase selanjutnya setelah adaptasi yaitu fase logaritmik. Fase ini ditunjukkan dengan meningkatnya pertumbuhan sel bakteri secara signifikan. Sel bakteri pada fase ini memiliki laju membelah diri dan metabolisme yang cepat serta konstan (Sharah *et al.*, 2015). Isolat perlakuan diambil pada fase eksponensial karena memiliki laju pertumbuhan spesifik (μ) yang konstan (Wahyuningsih & Zulaika, 2018). Inokulum pada jam ke-18 dipilih untuk digunakan karena pada jam tersebut memiliki nilai μ terbesar kedua dan berada pada fase akhir eksponensial. Fase ketiga yang dapat teramati menggunakan kurva pertumbuhan berdasarkan nilai

absorbansi yaitu fase stasioner. Jumlah populasi sel pada fase ini tetap karena jumlah sel yang mati setara dengan jumlah sel yang hidup (Sharah *et al.*, 2015). Khoiriyah & Ardiningsih (2014) menyatakan bahwa pada fase stasioner pertumbuhan menurun karena menipisnya sumber nutrisi dan bakteri mulai membentuk metabolit sekunder.

Prebiotik seperti inulin dan FOS telah banyak digunakan untuk optimalisasi pertumbuhan berbagai macam probiotik seperti genera *Lactobacillus* dan *Bifidobacteria*. Pemberian kombinasi prebiotik juga dapat dilakukan untuk mendapatkan formula terbaik untuk setiap jenis bakteri yang spesifik. Menurut Kadlec & Jakubec (2014), kombinasi prebiotik untuk probiotik bersifat sangat spesifik, dapat menunjukkan perbedaan hasil meskipun masih dalam satu genera bahkan satu spesies.

Hasil analisis ragam (Tabel 1.) menunjukkan bahwa penambahan prebiotik dan waktu inkubasi berbeda memberikan pengaruh nyata ($F > 0,01$) terhadap pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E.

Tabel 1. Hasil Analisis Ragam Pengaruh Penambahan Prebiotik Inulin dan FOS serta Waktu Inkubasi Berbeda terhadap Pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E.

Sumber Keragaman (SK)	Derajat Bebas (db)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F Hitung	F Tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	19	8,5296	0,4489	215,0105**	1,85	2,39
Prebiotik (P)	3	0,8703	0,2901	138,9475**	2,84	4,31
Waktu inkubasi (W)	4	7,5058	1,8764	898,7174**	2,61	3,83
P x W	12	0,1534	0,0128	6,1239**	2,00	2,66
Galat	40	0,0835	0,0021			
Total	59	8,6131				

Keterangan : ** = Berpengaruh sangat nyata

Hasil uji BNJ (Tabel 2.) menunjukkan bahwa perlakuan penambahan FOS 1% +inulin 1% memiliki kepadatan yang paling tinggi dengan nilai 1,5637 dan berbeda nyata dengan perlakuan kontrol maupun perlakuan penambahan inulin 1%. Kepadatan terendah didapat oleh perlakuan penambahan FOS 1% (1,2982) dan tidak berbeda nyata dengan perlakuan kontrol (1,3067). Interaksi antara penambahan prebiotik dengan waktu inkubasi berbeda yang menghasilkan kepadatan populasi tertinggi yaitu perlakuan penambahan FOS 1%+inulin 1% dengan waktu inkubasi 22 jam (tidak berbeda nyata dengan perlakuan penambahan FOS 1%+inulin 1%

dengan waktu inkubasi 20 jam) dan sangat berbeda nyata dengan perlakuan kontrol. Perlakuan penambahan FOS 1% dengan waktu inkubasi 22 jam dan perlakuan penambahan inulin 1% dengan waktu inkubasi 22 jam juga memiliki kepadatan populasi lebih tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol dan untuk perlakuan penambahan FOS 1% dengan waktu inkubasi 22 jam tidak berbeda nyata dengan perlakuan kontrol untuk waktu inkubasi yang sama. Hal ini membuktikan bahwa penambahan prebiotik dengan waktu inkubasi berbeda berpengaruh dalam meningkatkan pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E. Prebiotik terbaik yang mampu

dimanfaatkan oleh *Bifidobacterium* sp. Bb2E yaitu kombinasi inulin 1%+FOS 1% yang berarti hipotesis penelitian nomor 1 ditolak. Waktu inkubasi yang optimal untuk pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E yaitu pada jam ke-18 karena memiliki laju pertumbuhan tertinggi untuk setiap perlakuan yang berarti hipotesis nomor 2 diterima. Interaksi antara penambahan prebiotik dengan waktu inkubasi berbeda terbaik yaitu perlakuan penambahan inulin 1% +FOS 1% dengan waktu inkubasi 18 jam yang berarti hipotesis nomor 3 ditolak. Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini untuk

setiap prebiotik sama, yaitu 1%. Menurut Artanti (2009), Perbedaan respon tiap strain terjadi karena perbedaan pengkodean gen dalam sistem metabolik yang berpengaruh terhadap nilai aktivitas prebiotik. Pemanfaatan prebiotik oleh BAL membutuhkan keberadaan sistem transportasi dan hidrolisis yang spesifik. Genera *Bifidobacteria* memiliki spesifitas berbeda terhadap fruktan, tidak hanya dalam hal kemampuan fermentasi, juga dalam hal kemampuan menginduksi enzim yang terletak berbeda (intraseluler dan ekstraseluler) (Rossi, 2005).

Tabel 2. Hasil BNJ Pengaruh Penambahan Prebiotik Inulin dan FOS serta Waktu Inkubasi Berbeda terhadap Pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E.

Data	Optical Density
P1	1,3067 c
P2	1,2982 c
P3	1,5185 b
P4	1,5637 a
W1	0,9533 d
W2	1,0380 c
W3	1,6004 b
W4	1,7550 a
W5	1,7621 a
P1W1	0,8480 jk
P1W2	0,9477 i
P1W3	1,4453 f
P1W4	1,6627 de
P1W5	1,6297 e
P2W1	0,7727 k
P2W2	0,8577 j
P2W3	1,4070 f
P2W4	1,7410 bc
P2W5	1,7127 cd
P3W1	1,0800 h
P3W2	1,1413 gh
P3W3	1,7547 bc
P3W4	1,8003 b
P3W5	1,8160 ab
P4W1	1,1127 h
P4W2	1,2053 g
P4W3	1,7947 b
P4W4	1,8160 ab
P4W5	1,8900 a

Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada BNT 5%

Keterangan:

P1: MRSB kontrol	W1: Inkubasi jam ke-14
P2: MRSB+FOS 1%	W2: Inkubasi jam ke-16
P3: MRSB+Inulin 1%	W3: Inkubasi jam ke-18
P4: MRSB+FOS 1% +Inulin 1%	W4: Inkubasi jam ke-20
	W5: Inkubasi jam ke-22

Penambahan prebiotik dengan waktu inkubasi berbeda secara keseluruhan mampu mempengaruhi pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E (Gambar 1.). Fermentasi prebiotik sangat dipengaruhi oleh enzim yang dihasilkan oleh probiotik untuk dapat memecah prebiotik tersebut menjadi komponen yang lebih sederhana. Menurut Setiarto (2017), probiotik seperti *Lactobacillus* dan *Bifidobacteria* mampu menghasilkan enzim β -fruktofuranosidase yang dapat memecah inulin dan FOS menjadi fruktosa yang kemudian menjadi SCFA yang esensial. Lopes *et al.* (2016) menyatakan bahwa fermentasi berbagai macam karbohidrat bergantung dari sistem enzimatik yang dimiliki oleh bakteri. Enzim β -fruktofuranosidase akan menghidrolisis gugus fruktosa pada bagian terminal posisi β -2,1 yang berperan dalam metabolisme fruktan. Faktor yang berhubungan dengan polisakarida yang mempengaruhi proses fermentasi diantaranya yaitu struktur sakarida (ikatan glikosidik) dan derajat polimerisasi (panjang rantai).

Bifidobacterium sp. Bb2E mengalami pertumbuhan paling optimal dengan penambahan kombinasi prebiotik inulin+FOS dalam medium MRSB, sedangkan penambahan FOS pada medium MRSB untuk pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E memiliki pertumbuhan yang paling lambat jika dibandingkan dengan kontrol. Menurut Setiarto (2016), FOS memiliki DP yang lebih rendah dari inulin, karena FOS merupakan hasil hidrolisis parsial dari inulin. Medium dengan penambahan FOS lebih cepat dimanfaatkan oleh probiotik. Lopes *et al.* (2016) menyatakan bahwa setiap prebiotik memiliki spesifitas sendiri untuk tiap genera bahkan spesies probiotik. Optimalisasi pertumbuhan

probiotik perlu dilakukan penelitian secara spesifik pula untuk mengetahui prebiotik terbaik untuk spesies tersebut. Kombinasi prebiotik seperti inulin+FOS menunjukkan hasil pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E tertinggi dari awal hingga akhir. Hal ini membuktikan bahwa prebiotik sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E.

Perlakuan kontrol dan penambahan FOS 1% pada jam ke-22 sudah memasuki fase stasioner, namun untuk perlakuan penambahan inulin 1% dan penambahan FOS 1%+inulin 1% masih dalam fase eksponensial akhir karena kepadatannya masih bertambah meskipun tidak signifikan (Gambar 1.). Menurut Nuraida *et al.* (2011), selain derajat polimerisasi dan ikatan glikosidik, konsentrasi prebiotik yang ditambahkan juga mempengaruhi pertumbuhan probiotik. Setiarto (2017) menyatakan bahwa pertumbuhan probiotik semakin cepat jika konsentrasi prebiotik yang diberikan semakin banyak. Probiotik memasuki fase stasioner apabila sumber nutrisi yang digunakan untuk metabolisme sudah mulai menipis. Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini untuk setiap prebiotik sama, yaitu 1%. Menurut Artanti (2009), Perbedaan respon tiap strain terjadi karena perbedaan pengkodean gen dalam sistem metabolik yang berpengaruh terhadap nilai aktivitas prebiotik. Pemanfaatan prebiotik oleh BAL membutuhkan keberadaan sistem transportasi dan hidrolisis yang spesifik. Genera *Bifidobacteria* memiliki spesifitas berbeda terhadap fruktan, tidak hanya dalam hal kemampuan fermentasi, juga dalam hal kemampuan menginduksi enzim yang terletak berbeda (intraseluler dan ekstraseluler) (Rossi, 2005).

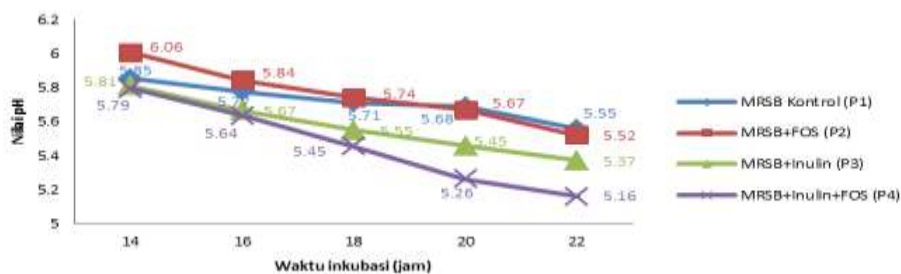


Gambar 1. Kepadatan Populasi Berdasarkan Pengukuran Absorbansi Isolat *Bifidobacterium* sp. Bb2E dengan Penambahan Prebiotik dan Waktu Inkubasi Berbeda

Pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E juga dipengaruhi oleh nilai pH (Gambar 2.) dan kadar asam laktat (Gambar 3.). Fermentasi prebiotik oleh probiotik akan menghasilkan SCFA, dimana dengan diproduksi SCFA sebagai hasil fermentasi maka akan menurunkan nilai pH dan asam laktat. Menurut Al Faridhi *et al.* (2013), bakteri asam laktat akan memfermentasi prebiotik dan menghasilkan peningkatan jumlah produk asam laktat dan asam-asam organik berantai pendek seperti asam asetat, butirir propionat sehingga pH medium akan turun.

Derajat keasaman dapat mendukung kepadatan populasi *Bifidobacterium* sp. Bb2E. Semakin tinggi kepadatan populasinya, semakin cepat dan banyak laju fermentasinya, sehingga SCFA yang semakin banyak mengakibatkan terjadinya penurunan pH medium. Perlakuan penambahan FOS 1%+inulin 1% memiliki nilai pH terendah pada waktu inkubasi jam ke-22 yaitu 5,16,

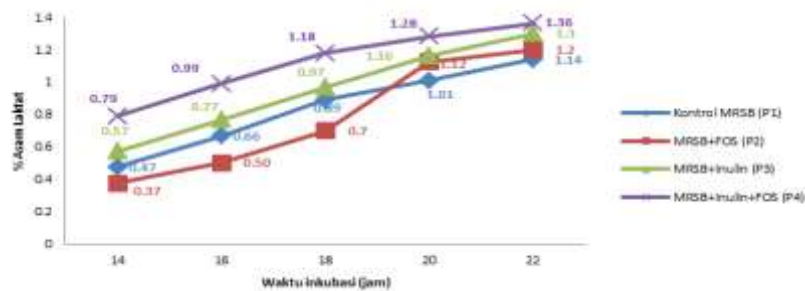
sedangkan untuk waktu inkubasi yang sama, perlakuan penambahan FOS 1% memiliki pH 5,52. Hal ini juga berkorelasi dengan berpengaruhnya penambahan prebiotik dalam medium untuk pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E. *Bifidobacteria* memiliki sifat heterofermentatif, dimana aktivitas metabolismenya memanfaatkan jalur 6-fosfoglukonat/fosfoketolase dan mampu menghasilkan asam laktat beserta produk sampingannya seperti asam asetat, CO₂, asam butirir, etanol, mannitol dan beberapa senyawa lainnya. Produktivitas asam laktat tidak setinggi bakteri asam laktat yang bersifat homofermentatif karena dapat menghasilkan asam laktat dua kali lebih banyak dibandingkan dengan bakteri heterofermentatif (Surono, 2004).



Gambar 2. Pengaruh pH terhadap Isolat *Bifidobacterium* sp. Bb2E dengan Penambahan Prebiotik dan Waktu Inkubasi Berbeda

Kadar asam laktat tertinggi pada akhir inkubasi yaitu sebesar 1,36 ditunjukkan oleh perlakuan penambahan inulin 1%+FOS 1% dan kadar asam laktat terendah pada akhir inkubasi didapat oleh perlakuan kontrol sebesar 1,14 (Gambar 3.). Menurut Nurjannah *et al.* (2017), asam laktat (C₃H₆O₃) merupakan hasil metabolit primer dari fermentasi yang merupakan jenis asam yang mudah terdisosiasi menjadi ion H⁺ dan

CH₃CHOHCOO⁻, sehingga semakin tinggi konsentrasi asam laktat akan menghasilkan konsentrasi ion H⁺ yang semakin tinggi sehingga pH akan semakin rendah. Fermentasi asam laktat dengan memanfaatkan prebiotik akan menghasilkan ATP. ATP berperan penting dalam proses pertumbuhan karena merupakan sumber energi dalam aktivitas sel, salah satunya adalah pertumbuhan (Artanti, 2009).



Gambar 3. Pengaruh Kadar Asam Laktat terhadap Isolat *Bifidobacterium* sp. Bb2E dengan Penambahan Prebiotik dan Waktu Inkubasi Berbeda

Seluruh senyawa prebiotik yang masuk dalam saluran pencernaan manusia akan mengalami fermentasi oleh bakteri di usus besar melalui beberapa jalur metabolisme untuk fermentasi prebiotik. Produk utama dari fermentasi inulin adalah butirir sedangkan produk utama dari fermentasi FOS adalah asam asetat dan asam laktat. Banyaknya asam laktat yang terbentuk sebagai hasil metabolisme prebiotik berkaitan dengan semakin meningkatnya jumlah populasi BAL yang menggunakan prebiotik tersebut sebagai sumber karbon untuk pertumbuhannya (Setiarto, 2017).

SIMPULAN

Simpulan dari penelitian kali ini yaitu penambahan prebiotik inulin dan fruktoooligosakarida (FOS) dalam medium dapat meningkatkan pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E., waktu inkubasi 18 jam merupakan waktu optimal untuk meningkatkan pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E, dan penambahan prebiotik kombinasi FOS 1%+inulin 1% dengan waktu inkubasi 18 jam menghasilkan pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bb2E tertinggi.

DAFTAR REFERENSI

- Association of Official Analytical Chemist (AOAC)., 1995, *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. Inc.*, Arlington, Virginia
- Collins, M. D., & Gibson G. R., 1999, Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Approaches for Modulating the Microbial Ecology of the Gut. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69 : 1052S-1057S.
- Fardiaz, S., 1990, *Penuntun Praktek Mikrobiologi Pengolahan Pangan. Program Studi Ilmu Pangan. Program Pasca Sarjana. Bogor: Institut Pertanian Bogor.*
- Ganzle, M. G. & R. Follador, 2012, Metabolism of Oligosaccharides and Starch in *Lactobacilli*. *Frontiers in Microbiology*, 3(340): 1-15.
- Hegar, B., 2017, Kesehatan Saluran Cerna pada Awal Kehidupan untuk Kesehatan pada Masa Mendatang. *Jurnal Kedokteran Indonesia*, 5(2): 73-77.
- Indrato, A.F., Sulistyarsi, A. & Ardhi, M.W., 2017, Isolasi Bakteri Probiotik dari Usus Ikan Lele Untuk Fermentasi Yoghurt Sebagai Bahan Modul Berbasis Riset dan Keterampilan Proses Sains. *In Prosiding Seminar Nasional SIMBIOSIS*, 2 : 315-328.
- Jagadeeshwari, P. A. T., 2019, Correlation of Direct Gram Smear Findings with Bacterial Isolation in Sputum of Patients. *Indian Journal of Applied Research*, 9(11) : 68-69.
- Lopes, S.M.S., Francisco, M.G., Higashi, B., de Almeida, R.T.R., Krausová, G., Pilau, E.J., Gonçalves, J.E., Gonçalves, 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.
- Khoiriyah H, & Ardiningsih P., 2014, Penentuan Waktu Inkubasi Optimum terhadap Aktivitas Bakteriosin *Lactobacillus* Sp. RED. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 3(4) : 14-20.
- Markowiak, P. & Katarzyna S., 2017, Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, 9(1021) : 1-30.
- Martinez, F.A.C., Eduardo, M.B., Attilio, C., Paul D. C., & Ricardo, P.S.O., 2013. Bacteriocin Production By *Bifidobacterium* Spp. A Review. *Biotechnology Advances*, 31 : 482-488.
- Nuraida, L., Nur R. M., Didah N. F., & Hana, 2011, Metabolisme Prebiotik Oleh Kandidat Probiotik Isolasi ASI sebagai Dasar Pengembangan Produk Sinbiotik. *Jurnal Teknol. dan Industri Pangan*, 21(2) : 156-163.
- Nurjannah, L., Suryani., Achmadi, S. S., & Azhari, A., 2017. Produksi Asam Laktat Oleh *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dengan Sumber Karbon Tetes Tebu. *JTIP Indonesia*, 9(1) 1-9.
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zannoni, S. & Matteuzzi, D., 2005, Fermentation of Fructooligosaccharides and Inulin by *Bifidobacteria*: A Comparative Study of Pure and Fecal Cultures. *Applied and environmental microbiology*, 71(10) : 6150-6158.
- Setiarto, R. H. B., Nunuk W., Iwan S., & Rina M. S., 2016, Pengaruh Variasi Konsentrasi Inulin pada Proses Fermentasi oleh *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*. *Biopropal Industri*, 8(1): 1-17.
- Setiarto, R. H. B., Nunuk W., & Nimas A. R., 2017, Optimasi Konsentrasi Fruktoooligosakarida untuk Meningkatkan Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Starter Yoghurt. *Jurnal Veteriner*, 18(3) : 428-440.
- Sharah, A., Karnila, R., & Desmelati, 2015, Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat yang di Isolasi dari Ikan Peda Kembung (*Rastrelliger Sp.*), *JOM* : 1-8.
- Surono, I.S., 2004. *Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan*. Jakarta:Tri Cipta Karya.
- Usmiati, S. & Juniawati, 2011, Karakteristik Dadih Probiotik Menggunakan Kombinasi *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, dan *Bifidobacterium longum* Selama Penyimpanan. *Journal of Nutrition and Food*, 6(1) : 1-12.

- Vrese, D., & Marteau S., 2008, Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. *Food Biotechnology, Advances in Biochemical Engineering*: 1-66.
- Wahyuningsih, N. & Zulaika, E., 2019, Perbandingan Pertumbuhan Bakteri Selulolitik pada Media Nutrient Broth dan Carboxy Methyl Cellulose. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 7(2): 36-38.
- Yohan, Y., Astuti, F., & Wicaksana, A., 2018, Pembuatan Spektrofotometer Edukasi untuk Analisis Senyawa Pewarna Makanan. *Chimica et Natura Acta*, 6(3) : 111-115.