

EVALUASI *IN VIVO* EFEK SINBIOTIK BEKATUL TERFERMENTASI BAKTERI ASAM LAKTAT PROBIOTIK (*Lactobacillus plantarum B₂* DAN *Lactobacillus casei*)

In Vivo Evaluation on Synbiotic Effect of Fermented Rice Bran by Probiotic Lactic Acid Bacteria (Lactobacillus plantarum B₂ and Lactobacillus casei)

Mochamad Nurcholis* dan Elok Zubaidah

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian–Fakultas Teknologi Pertanian–Universitas Brawijaya
Jl. Veteran – Malang

*Penulis korespondensi: email cholis_federer@yahoo.co.id

ABSTRACT

Rice bran contains dietary fiber such as hemicellulose, arabinogalactan, arabinoxylan, xyloglycan, proteoglycan, arabinofuranoside, and raffinose. Those dietary fibers have a potency as prebiotic and to be fermented by probiotic in colon to produce lactic acid and short chain fatty acid (SCFA). Synbiotic effect of fermented rice bran by *Lactobacillus plantarum B₂* and *Lactobacillus casei* on Wistar rats (*Rattus norvegicus*) was investigated. A two month old Wistar rats (*Rattus norvegicus*) consisted of four groups (F0, F1, F2, F3) with five rats of each group were adapted for ten days by giving standard diet (AIN-93). There were four diet formulas: standard diet of AIN 93 M (F0), standard diet with formulated rice bran media (F1), standard diet with fermented rice bran media by *L. casei* (F2) and standard diet with *L. plantarum B₂* (F3). The weight, LAB viability, pH, and total acid of rat faecal were measured in 20 days. SCFA production was measured after 20 days experiment. Data were analyzed using ANOVA ($\alpha=5\%$) and least significant difference ($\alpha=5\%$). The best treatment was obtained using ranking method. F3 was the best treatment with fecal LAB viability of 5.8×10^7 CFU/g, faecal pH of 6.47 on 20th day experiment, caecum LAB viability of 6.77×10^8 CFU/g, caecum total acid of 0.20% lactic acid, caecum pH of 6,34, and SCFA total of 11.49 mg/g (acetic acid of 7.11 mg/g, propionic acid of 3.03 mg/g and butyric acid of 1.35 mg/g).

Keywords: synbiotic, rice bran, probiotic, SCFA, wistar rat

PENDAHULAN

Pangan fungsional yang berkembang pesat dan diminati masyarakat saat ini diantaranya pangan probiotik dan prebiotik. Ahli pangan di Finlandia telah mengembangkan minuman probiotik berbasis serealia (*oat bran*) yang dikenal dengan nama produk Yosa. Minuman ini merupakan hasil fermentasi bakteri *Lactobacillus achidophilus* LA5 dan *Bifidobacterium* Bb 12 serta berpotensi sebagai minuman sinbiotik. Menurut Salovara dan Scharlin (2001), efek sinbiotik diperoleh dari sinergi antara kultur probiotik dan senyawa prebiotik.

Salah satu bagian dari komoditas serealia yang belum dimanfaatkan dan

dapat diaplikasikan sebagai medium fermentasi adalah bekatul padi. Bekatul padi merupakan produk samping hasil penggilingan padi yang mengandung gizi tinggi, diantaranya serat pangan. Menurut Kahlon (1993) kandungan serat bekatul yakni sekitar 22,9%. Serat bekatul yang berperan sebagai prebiotik yaitu oligosakarida rafinosa. Selain serat, bekatul mengandung antioksidan seperti *oryzanol*, tokoferol, tokotrienol, dan asam ferulat. Keberadaan komponen tersebut meningkatkan potensi bekatul sebagai bahan baku pangan fermentasi yang bersifat fungsional.

Zubaidah dkk (2005) telah menghasilkan minuman fermentasi berbasis bekatul dengan menggunakan kultur

bakteri asam laktat (BAL) indigenus *L. plantarum* sp. Menurut Valentine (2006), hasil pengujian kemampuan sembilan isolat probiotik indigenus bekatul secara *in vitro* menunjukkan bahwa *L. plantarum* B₂ merupakan isolat indigenus dengan viabilitas terbaik. Hasil pengujian kemampuan dua kultur probiotik komersial (*L. casei* dan *L. acidophilus*) secara *in vitro*, *L. casei* memiliki viabilitas yang lebih baik. Hidayah (2006) menyatakan melalui pengujian secara *in vitro*, isolat probiotik indigenus dan komersial mampu menunjukkan efek sinbiotik dengan memfermentasi serat pangan pada medium bekatul menghasilkan asam laktat dan asam lemak rantai pendek (SCFA, *short chain fatty acid*).

Studi efek sinbiotik secara *in vitro* memiliki banyak kelemahan dibanding metode *in vivo*. Pada metode *in vitro*, pengaturan kondisi pH dan konsentrasi garam empedu belum menggambarkan kondisi realita saluran pencernaan. Menurut Dunne *et al.* (2001), pengujian secara *in vitro* tidak dapat mencapai kondisi akurat dalam saluran pencernaan. Salah satu realitanya yaitu pH pada lambung dan konsentrasi garam empedu berfluktuasi, tergantung jenis pangan yang dikonsumsi dan jumlah asupannya. Jacobsen *et al.* (1999) menyatakan bahwa pengujian secara *in vitro* tidak dapat digunakan untuk memprediksi potensi keberhasilan hidup *Lactobacillus* dalam saluran pencernaan.

Efek sinbiotik secara *in vivo* terjadi karena probiotik dalam pencernaan memfermentasi prebiotik menjadi asam lemak rantai pendek diantaranya asam asetat, propionat, dan butirir. Terbentuknya asam lemak rantai pendek, menyebabkan penurunan pH dalam pencernaan dan menekan pertumbuhan mikrobia patogen sehingga dapat menurunkan resiko terjadinya kanker usus.

Menurut Karpinem (2003), asam asetat dan propionat berperan dalam penyediaan energi yang cepat bagi sel tubuh, sedangkan asam butirir berperan dalam mempercepat regenerasi sel mukosa usus.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari efek sinbiotik medium bekatul yang terfermentasi oleh kultur probiotik indigenus asal bekatul padi (*Lactobacillus plantarum* B₂) dan kultur probiotik pembanding (*Lactobacillus casei*) secara *in vivo*.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan yaitu kultur probiotik *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* B₂, bekatul dari penggilangan padi varietas IR 64, MRS broth (Oxoid), MRS agar (Pronadisa), pepton (Oxoid), alkohol 70%, akuades, spiritus, asam metafosfat 25% (Merck), bahan kimia untuk analisis proksimat, tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa (umur ± 2 bulan), pakan tikus mengacu pada *American Institute of Nutrition* (AIN, 1993).

Peralatan

Peralatan yang digunakan diantaranya kromatografi gas (GC-14B Shimadzu), autoklaf, *laminar air flow*, inkubator (Binder BD-53), lemari es (Sharp), *vortex mixer* (TM 2000), pengayak 60 mesh, timbangan analitik (Mettler Toledo), mikroskop (Olympus), kandang pemeliharaan, dan timbangan tikus.

Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam 3 tahapan yaitu 1) pembuatan kultur starter probiotik dan medium bekatul terfermentasi, 2) persiapan uji *in vivo* (formulasi pakan perlakuan, adaptasi dan pemberian asupan formulasi pakan perlakuan pada hewan coba), 3) pengumpulan serta analisis data *in vivo*.

Pembuatan Kultur Starter Probiotik

Koloni tunggal kultur probiotik pada media MRS agar steril diambil sebanyak 1-2 ose, kemudian diinokulasi pada 10 mL medium MRSB steril. Hasil inokulasi kultur *Lactobacillus casei* diinkubasi pada suhu 37°C selama 12 jam sedangkan *L. plantarum* B₂ diinkubasi selama 14 jam.

Pembuatan Medium Fermentasi Bekatul

Bekatul diayak hingga berukuran mesh 60, kemudian distabilisasi pada suhu 121°C selama 3 menit. Bekatul terstabilisasi dikemas dengan plastik secara vakum dan disimpan pada freezer suhu -20°C. Pembuatan medium fermentasi bekatul dilakukan dengan homogenisasi larutan bekatul 12% (b/v) pada suhu 85°C selama ± 10 menit. Setelah homogen, medium tersebut disterilisasi pada suhu 121°C selama ± 15 menit. Setelah medium mencapai suhu kamar ± 27°C, diinokulasi dengan masing-masing 2% (v/v) kultur starter probiotik (*L. casei* dan *L. plantarum* B₂). Fermentasi dilakukan pada suhu 37°C selama 12 jam.

Persiapan uji *in vivo*

Kandang tikus yang digunakan yaitu kombinasi kandang plastik dan ram kawat ukuran 45x30x25 cm. Setiap kandang berisi 5 ekor tikus. Sebelum dilakukan pengujian *in vivo* dilakukan adaptasi tikus selama 10 hari dengan pemberian pakan standar (AIN-93) agar diperoleh kondisi homogen pada tikus perlakuan.

Pemberian pakan standar diberikan setiap hari secara *ad libitum*. Pemberian formula pakan perlakuan diberikan melalui metode sonde. Dosis formula perlakuan (medium bekatul dan medium bekatul terfermentasi bakteri probiotik) masing-masing sebanyak 0,5 mL per tikus per hari. Dosis diperoleh dari perbandingan berat tikus jantan dewasa (±250 gram) dengan berat manusia (laki-laki dewasa ±70 kg). Asumsi manusia dewasa mengkonsumsi produk probiotik sebanyak 150 mL per hari.

Rancangan Percobaan

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor, yaitu formula pakan tikus yang terdiri dari 4 level yaitu

- Level 1 : pakan standar tikus (AIN-93) (F0)
Level 2 : pakan standar dan medium bekatul 12% (b/v) (F1)

Level 3 : pakan standar dan medium bekatul terfermentasi kultur probiotik *Lactobacillus casei* (F2)

Level 4 : pakan standar dan medium bekatul terfermentasi *Lactobacillus plantarum* B₂. (F3)

Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor tikus, sehingga jumlah sampel keseluruhan perlakuan adalah 20 ekor tikus Wistar. F2 dan F3 merupakan perlakuan utama, F0 merupakan kontrol negatif, sedangkan F1 merupakan kontrol positif.

Pengumpulan dan Analisis Data

Pengujian pada medium bekatul terfermentasi probiotik meliputi total bakteri asam laktat, pH, dan total asam (analisis pada jam ke-0 dan ke-12). Pengumpulan data *in vivo* dilakukan dengan menimbang berat badan tikus setiap 5 hari sekali untuk masing-masing perlakuan. Pengujian total BAL dan pH feses tikus dilakukan setiap 10 hari sekali (hari ke-0 hingga hari ke-20), pengujian total BAL, total asam, pH, dan total SCFA digesta *caecum* tikus dilakukan pada hari ke-20.

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis dengan analisis varian (ANOVA) dengan selang kepercayaan 5% ($\alpha=0,05$) untuk melihat pengaruh pemberian formula pakan perlakuan. Uji beda BNT dengan selang kepercayaan 5% dilakukan untuk melihat letak perbedaan masing-masing perlakuan. Pemilihan perlakuan terbaik dilakukan dengan metode ranking (Tabucanon, 1988).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Medium Bekatul Terfermentasi

Berdasarkan hasil analisis, rerata total BAL medium fermentasi bekatul jam ke-0 berkisar antara $4,10 \times 10^7$ - $4,40 \times 10^7$ CFU/mL. Setelah fermentasi selama 12 jam, total BAL medium fermentasi bekatul meningkat menjadi $1,07 \times 10^9$ - $1,25 \times 10^9$ CFU/mL. Interval kenaikan total BAL yaitu

Tabel 1. Rerata hasil analisis medium fermentasi bekatul

Jenis Perlakuan	Total BAL (CFU/mL)			Total Asam (%)			pH Jam ke-		
	Jam ke-			Jam ke-					
	0	12	*	0	12	*	0	12	**
F1	0	0	0	0,20	0,20	0,0015	6,25	6,25	0
F2	4,1x10 ⁷	1,07x10 ⁹	1,03x10 ⁹	0,29	0,88	0,59	5,84	4,41	1,43
F3	4,4x10 ⁷	1,25x10 ⁹	1,21x10 ⁹	0,29	0,88	0,59	5,83	4,38	1,45

* = Selisih (kenaikan), ** = Selisih penurunan)

itu 1,03x10⁹-1,21x10⁹ CFU/mL (Tabel 1). Kenaikan ini dikarenakan BAL mampu memanfaatkan nutrisi bekatul dengan baik selama fermentasi. Menurut Fardiaz (1990) nutrisi berperan sebagai sumber energi mikrobia untuk pertumbuhan dan biosintesis sel. Total BAL medium F3 (medium bekatul yang terfermentasi oleh isolat *L. plantarum B₂*) lebih tinggi dibanding total BAL medium F2 (medium terfermentasi isolat *L. casei*). Fenomena ini dikarenakan medium bekatul merupakan habitat alami bagi isolat *L. plantarum B₂*, sehingga kultur ini dimungkinkan memiliki enzim-enzim yang lebih spesifik dan lengkap untuk memetabolisme nutrisi yang terdapat dalam bekatul. Menurut Schlegel (1994) isolat indigenus mampu memanfaatkan substrat dengan baik dibanding isolat non indigenus. Kultur indigenus memiliki kesesuaian yang lebih tinggi dalam medium asalnya.

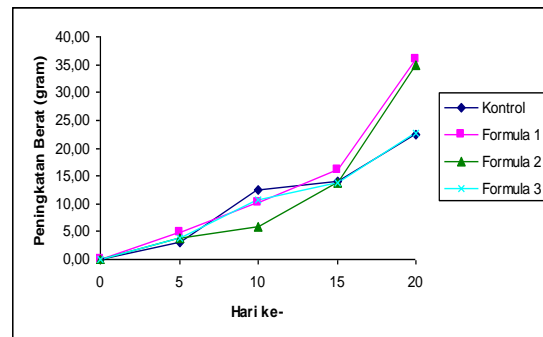
Pertumbuhan BAL selama proses fermentasi akan menghasilkan senyawa asam organik, salah satunya asam laktat. Peningkatan rerata total BAL pada medium bekatul terfermentasi kultur probiotik diikuti dengan meningkatnya rerata total asam. Rerata total asam medium bekatul terfermentasi pada jam ke-12 antara 0,20-0,88% (Tabel 1). Medium yang memiliki total asam tertinggi yaitu F3. Hal ini sesuai dengan nilai total BAL medium fermentasi bekatul, bahwa F3 memiliki total BAL yang paling tinggi. Menurut Yang (2000) adanya proses fermentasi oleh BAL ditandai dengan terakumulasinya asam-asam organik. BAL homofermentatif seperti *L. casei* dan *L. plantarum* memetabolisme glukosa melalui jalur EMP menghasilkan produk utama asam laktat.

Akumulasi asam laktat akibat aktivitas kultur probiotik pada medium bekatul terfermentasi akan mempengaruhi

nilai pH. Semakin tinggi total asam, akan menurunkan pH medium bekatul. Rerata nilai pH medium bekatul fermentasi pada jam ke-12 antara 4,38-6,25. Menurut Charalampopoulos *et al.* (2002) akumulasi asam laktat dan asetat yang dihasilkan melalui metabolisme substrat oleh BAL dapat menurunkan pH medium fermentasi.

Analisis Berat Badan Tikus

Perubahan rerata kenaikan berat badan hewan coba selama 20 hari masa pemberian formula perlakuan dapat dilihat pada Gambar 1. Rerata akumulasi peningkatan berat badan tikus dari awal hingga 20 hari pemberian formula perlakuan berkisar antara (22,33-35,87) gram.



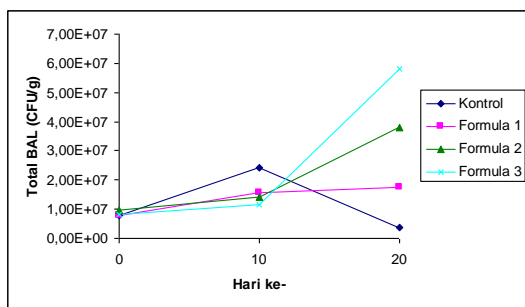
Gambar 1. Kurva rerata akumulasi peningkatan berat badan tikus selama 20 hari pemberian formula perlakuan

Rerata akumulasi peningkatan berat badan tertinggi pada kelompok perlakuan F1 yaitu sebesar 35,87 gram, sedangkan rerata peningkatan berat badan terendah pada tikus perlakuan kontrol yaitu sebesar 22,33 gram. Peningkatan berat badan tikus tergantung pada individu tikus, sistem metabolisme dan faktor genetis. Menurut Wolfensohn dan Lloyd (1998), tikus seperti kebanyakan rodentia lainnya, merupakan hewan pengerat. Pemberian pakan dilakukan secara *ad libitum*. Tikus mengkonsumsi 5 gram

pakan per 100 gram berat badannya per hari dan minum sebanyak 10 mL air per 100 gram berat badannya per hari.

Analisis Feses Tikus

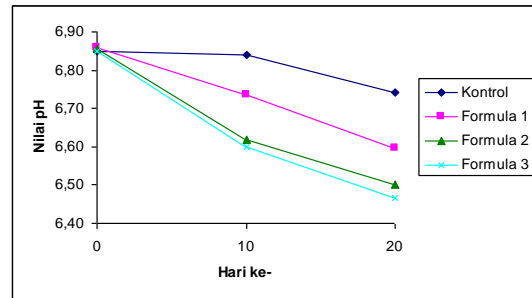
Rerata total BAL feses tikus pada hari ke-0 berkisar antara $7,87 \times 10^6$ – $9,55 \times 10^6$ CFU/g. Setelah pemberian formula perlakuan selama 20 hari, rerata total BAL mengalami kenaikan menjadi $1,74 \times 10^7$ – $5,80 \times 10^7$ CFU/g (Gambar 2). Total BAL feses pada kelompok kontrol mengalami penurunan. Fenomena ini dimungkinkan karena kelompok tikus tersebut mengalami stres selama perlakuan.



Gambar 2. Kurva rerata total bal feses tikus selama 20 hari pemberian formula perlakuan

Total BAL pada feses tikus perlakuan F3 lebih tinggi dibanding F2 (Tabel 2). Fenomena ini diduga karena perlakuan F3 mengandung kultur probiotik *L. plantarum B2* yang merupakan isolat indigenus asal bekatul padi. Kultur probiotik indigenus ini diduga memiliki viabilitas yang lebih baik dibandingkan *L. casei*. Menurut Valentine (2006) berdasarkan hasil pengujian secara *in vitro* yang meliputi ketahanan isolat probiotik terhadap pH rendah (pH 2 dan 3),

ketahanan terhadap garam empedu serta sifat antimikrobia (penghambatan patogen), secara umum isolat indigenus *L. plantarum B2* memiliki sifat ketahanan yang lebih baik dibandingkan *L. casei*. Hasil pengujian viabilitas BAL probiotik secara *in vivo* memberikan respon yang relatif sama, bahwa *L. plantarum B2* memiliki viabilitas lebih baik dibandingkan dengan *L. casei*.



Gambar 3. Kurva penurunan pH feses selama 20 hari pemberian formula perlakuan

Viabilitas BAL probiotik pada saluran pencernaan menunjukkan kemampuannya dalam mendegradasi komponen nutrisi bekatul menjadi senyawa sederhana, termasuk asam-asam organik melalui proses fermentasi kolonik. Peningkatan jumlah asam organik berimplikasi terhadap penurunan derajat keasaman (pH) feses (Gambar 3). Hasil uji BNT taraf 5% pada hari ke-10 dan ke-20 memberikan perbedaan yang nyata pada nilai pH feses tikus. Rerata nilai pH feses tikus hari ke-0 berkisar 6,85–6,86 dan pada hari ke-20 menurun menjadi 6,47–6,74. Kisaran penurunan nilai pH feses sampai hari ke-20 sebesar 0,11–0,38 unit/gram feses segar.

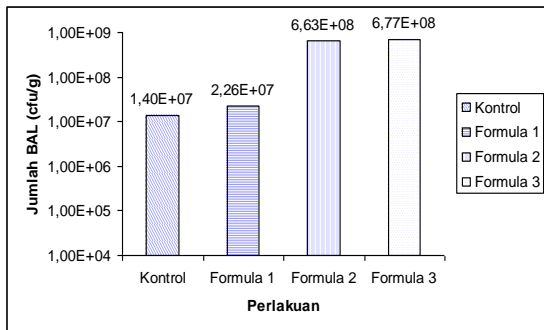
Tabel 2. Pemilihan Perlakuan Terbaik

Ranking	Feses		Digesta Caecum			
	BAL (cfu/g)	pH	BAL (cfu/g)	pH	Total Asam (%)	SCFA (mg/g)
1	F3 ($5,80 \times 10^7$)	F3 (6,47)	F3 ($6,77 \times 10^8$)	F3 (6,34)	F3 (0,20)	F3 (11,49)
2	F2 ($3,78 \times 10^7$)	F2 (6,50)	F2 ($6,63 \times 10^8$)	F2 (6,38)	F2 (0,18)	F2 (11,05)
3	F1 ($1,74 \times 10^7$)	F1 (6,60)	F1 ($2,26 \times 10^7$)	F1 (6,51)	F1 (0,13)	F1 (10,56)
4	K ($3,58 \times 10^6$)	K (6,74)	K ($1,40 \times 10^7$)	K (6,65)	K (0,12)	K (9,58)

Analisis Digesta *Caecum* Tikus

Analisis digesta caecum tikus meliputi analisis total BAL, total asam, pH dan total SCFA (asam asetat, propionat, butirat). Rerata total BAL digesta caecum berkisar antara $1,4 \times 10^7$ - $6,77 \times 10^8$ CFU/g. Total BAL tertinggi yaitu kelompok F3 dengan nilai $6,77 \times 10^8$ CFU/g. Kelompok F3 memiliki total BAL lebih tinggi dibanding F2, dikarenakan isolat *L. plantarum B₂* merupakan isolat indigenus bekatul. Adanya serat bekatul seperti rafinosa, galaktooligosakarida (GOS) berperan sebagai prebiotik bagi *L. plantarum B₂*.

Adanya aktivitas fermentasi prebiotik oleh probiotik akan memberikan efek sinergis bagi viabilitas mikrobiota dalam usus. Menurut Drucker dan Andrea (2000) kandungan polisakarida bekatul yang berpotensi sebagai prebiotik diantaranya hemiselulosa, arabinogalaktan, arabinoxylan, xyloglikan, proteoglikan, arabinofuranosida. Menurut Tortuero (1997) prebiotik seperti rafinosa dapat menstimulasi pertumbuhan *Lactobacillus* dalam usus besar. Diagram rerata total BAL digesta tikus dapat dilihat pada Gambar 4.



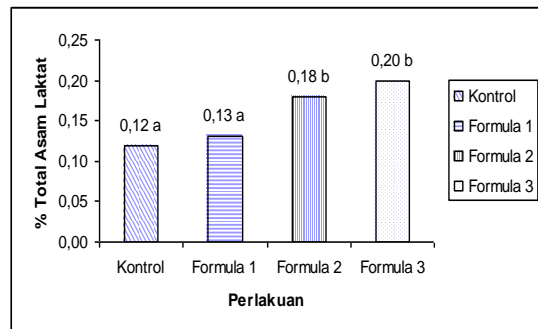
Gambar 4. Diagram rerata total BAL digesta tikus

Menurut Valentine (2006) berdasarkan hasil pengujian secara *in vitro* yang meliputi ketahanan isolat probiotik terhadap pH rendah (pH 2 dan 3), ketahanan terhadap garam empedu serta sifat antimikrobia (penghambatan patogen), secara umum isolat indigenus *L. plantarum B₂* memiliki sifat ketahanan yang lebih baik dibandingkan *L. casei*. Pada hasil pengujian secara *in vivo* juga

menunjukkan kecenderungan yang relatif sama, bahwa total BAL digesta perlakuan F3 (bekatul terfermentasi *L. plantarum B₂*) memiliki hasil yang terbaik dari seluruh perlakuan.

Peningkatan jumlah BAL pada digesta tikus, berimplikasi pada peningkatan nilai total asam digesta. Rerata nilai total asam digesta tikus antara 0,12-0,20% asam laktat. F3 memiliki total asam tertinggi (0,20%). Fenomena ini sesuai dengan total BAL F3 yang paling tinggi yaitu sebesar $6,77 \times 10^8$ CFU/g. Serat pada bekatul diduga dapat menstimulasi pertumbuhan mikroflora (probiotik) usus besar membentuk asam-asam organik seperti asam laktat.

Menurut Tortuero (1997) beberapa jenis prebiotik seperti rafinosa memicu pertumbuhan *Lactobacillus* sehingga meningkatkan produksi asam organik dan SCFA (asetat). Diagram rerata total asam digesta tersaji pada Gambar 5.

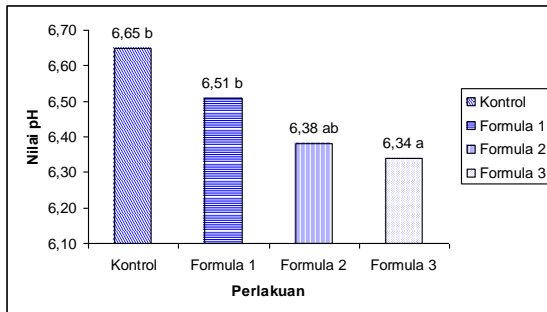


Gambar 5. Diagram rerata total asam digesta tikus (rerata yang didampingi huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada taraf $\alpha=0,05$)

Peningkatan total asam digesta berpengaruh terhadap perubahan nilai pH digesta. Rerata nilai pH digesta berkisar antara 6,34-6,65. Digesta merupakan isi dari organ *caecum* (bagian pertemuan usus halus dengan usus besar). *Caecum* merupakan organ dalam saluran pencernaan yang memiliki kondisi sakarolitik tinggi. Di dalam organ *caecum*, proses fermentasi karbohidrat tak tercerna oleh mikroflora kolon menjadi asam organik berlangsung.

F3 merupakan perlakuan dengan nilai pH terendah (6,34). Hal ini sesuai de-

ngan tingginya total BAL dan total asam digesta F3. Richard *et al.* (2005) menyatakan kombinasi probiotik dan prebiotik (efek sinbiotik) menunjukkan penurunan pH kolon signifikan ($P < 0,01$). Diagram rerata nilai pH tersaji pada Gambar 6.



Gambar 6. Diagram rerata nilai pH digesta tikus

SCFA Digesta *Caecum*

Bakteri asam laktat yang bersifat probiotik memiliki viabilitas yang baik dalam saluran pencernaan. Bakteri ini akan memfermentasi substrat prebiotik dalam usus besar menjadi asam organik dan SCFA. SCFA merupakan asam lemak rantai pendek yang dapat menstimulasi regenerasi sel-sel epitel dalam usus besar. Karakteristik ini menunjukkan bahwa SCFA berpotensi untuk menurunkan resiko terjadinya kanker usus besar.

Gibson dan Roberfroid (1995) dalam Tunland (2002) menyatakan bahwa saluran pencernaan bagian bawah (usus besar) mengandung mikroflora alami yang kompleks yaitu 10^{11} CFU/g bakteri gram negatif maupun positif. Di dalam saluran pencernaan terdapat lebih dari 100 spesies bakteri baik menguntungkan maupun patogen. Bakteri menguntungkan yang dominan pada usus besar yaitu genus *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus*.

Menurut Custom Probiotic Inc (2001) total mikroflora pada kolon manusia 10^{11} – 10^{12} CFU/g. Mikroflora aerob yang dominan pada usus besar diantaranya genus *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, khamir dengan total sekitar 10^2 – 10^6 CFU/g. Mikroflora anaerob jumlahnya relatif lebih banyak dibandingkan mikroflora aerob yaitu 10^8 – 10^{12} CFU/g. Selain *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus*, mikroflo-

ra anaerob dominan lainnya yaitu *Peptostreptococcus*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Veilonella*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*.

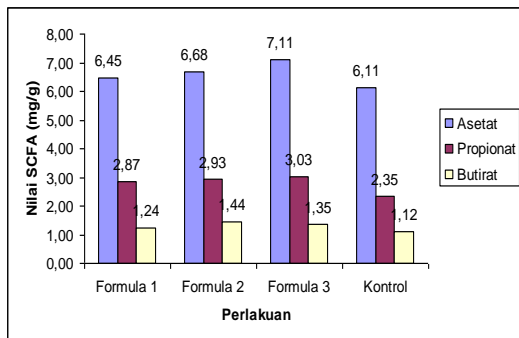
SCFA hasil penelitian diperoleh dari digesta *caecum* tikus (organ penghubung antara usus kecil dengan usus besar). *Caecum* diambil, karena merupakan organ dengan tingkat sakarolitik tinggi terhadap karbohidrat. Menurut Topping dan Clifton (2001) *caecum* merupakan daerah atau lokasi pada pencernaan yang menghasilkan SCFA tertinggi. Jumlah SCFA pada *caecum* lebih tinggi dibanding pada kolon transversal maupun kolon distal.

Miller dan Wollin (1996) menyatakan bahwa, SCFA merupakan hasil fermentasi serat pangan oleh mikroorganisme intestinal. Menurut Charalampopoulos (2002), SCFA merupakan hasil dari fermentasi pati resisten, sedangkan Mcfarlane dan Mcfarlane (1997) menyatakan bahwa SCFA merupakan hasil degradasi oligosakarida tak tercerna. Rerata total SCFA tertinggi yaitu kelompok F3 dengan kandungan sebesar 11,49 mg/g (7,11 mg/g asam asetat, 3,03 mg/g asam propionat, dan 1,35 mg/g asam butirrat). Kemampuan produksi SCFA yang tinggi dikarenakan ketersediaan enzim-enzim spesifik isolat *L. plantarum B₂* untuk menfermentasi serat pada medium bekatul.

Hudayah (2006) menyatakan bahwa hasil pengujian secara *in vitro* terhadap konsentrasi SCFA (asetat, propionat, butirrat) pada medium bekatul terfermentasi selama 48 jam oleh isolat *L. Plantarum B₂* berturut-turut yaitu 8,75 mM, 5,75 mM, dan 1,486 mM. Hasil pengujian secara *in vitro* memiliki kecenderungan yang sama dengan pengujian secara *in vivo*, dimana asam asetat memiliki nilai molar tertinggi (Gambar 7).

Tikus perlakuan kontrol dapat menghasilkan SCFA diduga karena adanya fermentasi karbohidrat pada pakan standar oleh mikroflora usus besar. Pakan standar yang digunakan dalam penelitian mengandung karbohidrat (pati jagung, dekstrin, sukrosa), protein (kasein), dan lemak (minyak kedelai). Menurut Anonymous (2005), SCFA dapat dibentuk dari fermentasi karbohidrat, lemak maupun

protein oleh bakteri usus besar. Akan tetapi protein memberikan kontribusi yang rendah dalam pembentukan SCFA.



Gambar 7. Diagram rerata konsentrasi SCFA digesta tikus selama 20 hari pemberian formula perlakuan

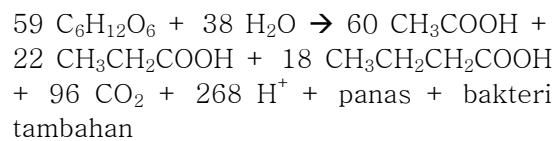
Total SCFA kelompok F2 dan F3 dibanding kelompok F1 tidak berbeda nyata pada analisis ragam ($\alpha=0,05$). Ketiga formula ini memiliki komposisi yang relatif sama (pakan standar dan medium bekatul). Keberadaan isolat probiotik pada F2 (*L. Plantarum B₂*) dan F3 (*L. casei*) diharapkan mampu menstimulasi pertumbuhan mikroflora menguntungkan yang lain di usus besar seperti *Bifidobacterium*. Isolat probiotik yang digunakan merupakan isolat BAL homofermentatif yang memproduksi asam laktat sebagai metabolit utamanya dan asam organik lain termasuk SCFA.

Menurut Duncan *et al.* (2004), komunitas mikrobia kolon manusia dan hewan mengandung berbagai jenis bakteri yang mampu memproduksi asam laktat. Asam L- maupun D-Laktat dapat diproduksi oleh BAL (*Lactobacillus*), *Bifidobacterium*, *Enterococcus* dan *Eubacterium spp.* Asam laktat dapat dimanfaatkan oleh beberapa spesies bakteri kolon. *Veilonella* mampu mengkonversi asam laktat menjadi asam propionat, *Megasphaera* dan *Eubacterium hallii* mengkonversi asam laktat menjadi butirat.

Menurut Karppinen (2003) *Bifidobacterium* merupakan spesies kolon yang memiliki peranan penting dalam memfermentasi serat pangan. Spesies ini mampu memproduksi asam laktat dan asetat, tetapi tak dapat membentuk butirat. Tahap awal fermentasi serat pada

kolon ditandai dengan terbentuknya asam laktat dan sebagian asam asetat. Tahap berikutnya memungkinkan terbentuk asam organik lain seperti asam propionat dan butirat. Konversi asam-asam organik ini tergantung pada ketersediaan jumlah serat dalam kolon dan mikroflora yang mengkonversinya. Kabel *et al.* (2002) dalam Karppinen (2003) menyatakan asam propionat dan butirat dapat diproduksi dari fermentasi bekatul pada kolon. Asam butirat dapat dimetabolisme oleh sel epitel kolon serta meningkatkan kesehatan mukosa.

Berdasarkan Gambar 7, semua perlakuan memiliki rerata rasio persamaan reaksi asam asetat : propionat : butirat yaitu 62:26:12. Cumming (1987) dalam Khattak (2002) menyatakan bahwa kisaran perbandingan molar asam asetat, propionat, dan butirat yaitu 60:25:15. Menurut Topping dan Clifton (2001), secara umum persamaan reaksi fermentasi karbohidrat (heksosa) menjadi SCFA dalam kolon sebagai berikut:



Pada pencernaan manusia dewasa, produksi SCFA seiring dengan produksi gas lain seperti CO₂, CH₄, H₂ dan produksi panas. Menurut Cummings *et al.* (2001) molar SCFA (asetat:propionat:butirat) pada fermentasi gandum dan *oat bran* (64:16:20). Molar SCFA pada fermentasi pektin (80:12:8), sedangkan molar untuk pati (62:15:23). Jenis polisakarida non pati (NSP, *non starch polysaccharide*) yang lain memiliki rasio molar 63:22:8.

Pada Gambar 7 terlihat bahwa kandungan SCFA tertinggi adalah asam asetat, kemudian berturut-turut diikuti asam propionat dan butirat. Kandungan asam asetat paling tinggi diduga karena jalur metabolismenya lebih singkat dari kedua senyawa SCFA yang lain (propionat dan butirat). Menurut Wollin *et al.* (1999) pembentukan asam asetat melalui pemecahan glukosa menjadi piruvat, dan satu

senyawa antara asetil-KoA. Pembentukan asam propionat melalui 2 senyawa antara yaitu oksaloasetat dan suksinat. Hasil penggabungan 2 mol asetil-KoA dari 2 mol piruvat akan membentuk asam bu-tirat.

Pendugaan lain bahwa asetil-KoA tersedia melimpah dalam tubuh manusia dan hewan. Fardiaz (1990) menyatakan asetil-KoA merupakan salah satu senyawa hasil katabolisme karbohidrat, lemak maupun protein. Fermentasi karbohidrat (glukosa) pada grup bakteri asam laktat (BAL) homofermentatif melalui jalur glikolisis (EMP) akan terjadi reduksi asam piruvat oleh NADH₂ menjadi asam laktat. Noor (1990) menyatakan semua asam amino pembentuk piruvat dapat dikonversi menjadi asetil-KoA. Asam amino pembentuk piruvat diantaranya alanin, sistein, sistin, glisin, serin dan threonin. Asam amino yang secara langsung dapat membentuk asetil-KoA tanpa melalui piruvat yaitu lisin dan leusin. Asam amino tersebut banyak terdapat pada bekatul.

Menurut Pelczar dan Chan (1986), jalur pembentukan asam asetat meliputi tahap pemecahan karbohidrat menjadi glukosa kemudian diubah menjadi piruvat. Perubahan senyawa piruvat menjadi asetat dapat melalui 2 cara. Pertama, piruvat diubah langsung menjadi asam asetat dan asam format. Kedua, perubahan melalui senyawa antara asetil-KoA, setelah itu diubah menjadi asam asetat.

Pembentukan asam propionat meliputi tahap pemecahan karbohidrat menjadi glukosa, setelah itu diubah menjadi asam piruvat. Setelah terbentuk piruvat, akan diubah menjadi senyawa antara asam suksinat, yang kemudian akan dikonversi menjadi asam propionat dan CO₂. Pembentukan asam butirat meliputi tahap pemecahan karbohidrat menjadi glukosa, setelah itu menjadi piruvat. Sebelum terbentuk asam butirat melalui 2 senyawa antara yaitu berturut-turut asetil-KoA dan asam asetoasetat (Pelczar dan Chan, 1986).

Perlakuan Terbaik

Pemilihan perlakuan terbaik dilakukan dengan metode ranking (Tabucanon, 1988) berdasarkan parameter pengujian feses (total BAL dan pH), pengujian digesta (total BAL, total asam, pH dan profil SCFA) (data tersaji pada Tabel 2).

SIMPULAN

Jenis formula perlakuan yang diberikan pada kelompok tikus berpengaruh nyata pada pH feses, (total asam dan pH) digesta tikus ($\alpha=0,05$) tetapi tidak berpengaruh yang nyata terhadap berat badan dan total SCFA digesta tikus ($\alpha= 0,05$). Formula pakan standar dan medium bekatul terfermentasi *Lactobacillus plantarum* B₂ (F3) memiliki karakteristik yang paling baik dengan total BAL feses $5,8 \times 10^7$ CFU/g dan pH feses 6,47 pada hari ke-20, total BAL digesta $6,77 \times 10^8$ CFU/g, total asam digesta 0,20% asam laktat, pH digesta. Profil SCFA kelompok ini yaitu total SCFA 11,49 mg/g (asam asetat 7,11 mg/g, asam propionat 3,03 mg/g, asam butirat 1,35 mg/g).

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2005. Short Chain Fatty Acids. <http://www.google.co.id/search?hl=id&q=short+chain+fatty+acids&meta>. Tanggal akses 17 Februari 2007
- Charalampopoulos, D., S.S. Pandiella, and C. Webb. 2002. *Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates*. Journal of Applied Microbiology 851-859
- Cummings, J.H. 1981. *Short chain fatty acid in human colon*. Gut 22:763
- Cummings, J.H., G.T. Mcfarlane, H.N. Englyst. 2001. *Prebiotic digestion and fermentation*. American Journal of Nutrition 415-420
- Custom Probiotic Inc. 2001. Intestinal Microflora and Probiotic http://images.google.co.id/imgres?imgurl=http://www.customprobiotics.com/images/gestivesystem.jpg&imgrefurlhttp://www.customprobiotics.com/about_probiotics_a.htm&h. Tanggal akses 25 Februari 2007

- Duncan, S.H., P. Louis, H.J. Flint. 2004. *Lactate utilizing bacteria, isolated from human feces that produce butyrate as a major fermentation product*. Applied Environmental Microbiology.
- Dunne, C., L. O'Mahony, L. Murphy, G. Thronton, D. Morrissey, S. O' Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G.C. O'sullivan, F. Shahanan, and J. K. Collins. 2001. *In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings*. The American Journal of Clinical Nutrition 386-392
- Fardiaz, S. 1990. Mikrobiologi Pangan. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta
- Hudayah, N. 2006. Studi Viabilitas Probiotik Indigenus Asal Bekatul Padi (Isolat B2 dan J1) dan Probiotik Komersial pada Media Fermentasi Bekatul dan Susu Skim. Skripsi. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. FTP. Brawijaya Malang.
- Jacobsen, C.N., V.R. Nielsen, A.E. Hayford, P.L. Moller, K.F. Michaelsen, A.P. Erregard, B. Sandstorm, M. Tvede and M. Jakobsen. 1999. *Screening of probiotic activities of forty seven strains of lactobacillus spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans*. J. Appl. and Environ 65:4949-4956
- Kahlon, T. S. 1993. Cholesterol-lowering Properties of Cereal Fibres and Fractions. Advanced Dietary Fiber Technology. Blackwell Publishing, London
- Karppinen, S. 2003. Dietary Fiber Component of Rye Bran and The Fermentation *In Vitro*. Biotech Faculty of Science University of Helsinki, Finland 500 : 96
- Macfarlane, S., G.T. Macfarlane, G.R. Gibson, and J.M. Savedra. 1997. Probiotics and Intestinal Infections: Applications and Practical Aspects. Chapman and Hall, London
- Noor, Z. 1990. Biokimia Nutrisi. PAU UGM, Yogyakarta
- Pelczar, M.J., and E.C.S. Chan. 1986. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Penerjemah R.S. Hadioetomo, T. Imas, S.S. Tjitrosomo, S.L. Angka. UI Press, Jakarta
- Salovara, H. and M. Scharlin. 2001. Yosa, A Prebiotic Fermented Oat Vellie 3rd. European Conference on Functional Properties in OATS. Upsala, Swedia
- Schlegel, H.G. 1994. Mikrobiologi Umum. Penerjemah Tedjo Baskoro. UGM Press, Yogyakarta
- Tabucanon, M. 1988. Multiple Criteria Decision Making in Industry. Elsevier Science Publisher, New York
- Topping, D.L and P.M. Clifton. 2001. *Short chain fatty acid and human colonic function: rules of resistant starch and polysaccharide*. jurnal Physiol Rev 81(2): 1031-1064,2001
- Tortuero, F., E. Fernandez, P. Rupbrez, and M. Moreno. 1997. *Raffinose and lactic acid bacteria influence caecum fermentation and serum cholesterol in rats*. Nutrition. Res. 17: 41-49
- Tungland, B.C. 2002. *Dietary fiber and human health*. Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety 3
- Valentine, V. 2006. Studi Isolat Probiotik Secara *In Vitro*. Skripsi. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian FTP. Universitas Brawijaya, Malang
- Wolfensohn, S. and M. Llyod. 1998. Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare. Blackwell Science Ltd, UK, London.
- Wollin, M.J., T. L. Miller, S. Yerry, and Y. Zhang. 1999. *Changes of fermentation pathways of fecal microbial communities associated with a drug treatment that increases dietary starch in the human colon*. American Society for Microbiology, Applied and Environmental 2807-2812
- Zubaidah, E dan Farida. 2006. Isolasi dan Karakterisasi Isolat Bakteri Asam Laktat Asal Bekatul. Prosiding PATPI, Malang