

**PENGUJIAN PREBIOTIK HETERO-GALAKTOOLIGOSAKARIDA  
PADA BAKTERI ASAM LAKTAT  
(*Lactobacillus sp.* dan *Streptococcus sp.*)**

**KARYA ILMIAH TERTULIS  
(SKRIPSI)**



Oleh :

|               |           |             |
|---------------|-----------|-------------|
| Asal :        | Hadiah    | Klasifikasi |
| Terima :      | Pembelian | 574.192     |
| No. Induk :   | 260205    | RAT         |
| Pengkatalog : |           | P           |

**Yenny Rahmawati**

**NIM. 991710101132**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2003**

Diterima Oleh :

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER**

Sebagai Karya Ilmiah Tertulis (Skripsi)

---

Dipertahankan pada :

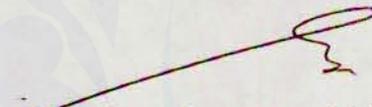
Hari : Jumat

Tanggal : 3 Oktober 2003

Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian  
Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua



Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc  
NIP. 131 832 332

Anggota I



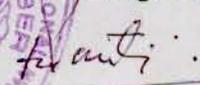
Ir. Giyanto, M.Sc  
NIP. 132 524 412

Anggota II



Ir. Susijahadi, MS  
NIP. 130 287 109

Mengesahkan  
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian



Ir. Hj. Siti Hartanti, MS.  
NIP. 130 350 763

# MOTTO

*Dan barangsiapa yang menyerahkan dirinya kepada Allah, sedang dia orang yang berbuat kebaikan, maka sesungguhnya ia telah berpegang kepada buhul tali yang kokoh. Dan hanya kepada Allah-lah kesudahan segala urusan.*

*(Luqmaan : 22)*

*Allah melapangkan rizki bagi siapa yang dikehendaki-Nya di antara hamba-hamba-Nya dan Dia (pula) yang menyempitkan baginya. Sesungguhnya Allah Maha Mengetahui segala sesuatu.*

*(Al- 'Ankabut : 62)*

*Manusia hanya bisa berusaha, namun Tuhan yang menentukan. Hanya kerja keras dan doa yang tulus yang dapat mewujudkannya.*

*(Yenny .R.)*

## *Karya Ilmiah Tertulis Ini*

### *Aku Persembahkan Untuk :*

*Allah SWT, terima kasih atas segala berkah dan hidayah yang telah  
Engkau limpahkan untukku*

*Mamihku tersayang "Evelyne Maria" yang telah banyak membantuku  
dengan doa dan dorongan semangatnya yang penuh kasih sayang*

*Papaku tersayang "Rusdi Djaelani" terima kasih atas doa dan  
dukungannya selama ini*

*"Teteh Hanny dan Mas Ichsan" atas semua bantuan, doa dan  
dorongan morilnya selama ini*

*Adik-adikku tersayang "Nani dan Benny" yang sudah banyak  
membantuku dan memberi semangat untuk menyelesaikan karya tulis  
ini*

*Keluarga Besar di Bandung, Jember, Bondowoso dan Cirebon yang  
telah mendoakan aku*

# *Terima Kasihku*

## *untuk :*

Teman-teman penelitiaanku : *Yoyok, Fatah* dan *Arifin* (semoga cepat selesai skripsinya)

*Mas Ahjab, Mas Agung, Mas Teguh, Mas Imam & Mbak Luki* (makasih banyak atas bantuannya)

*Doe-Mee, Atik, Heni, Resvathi* dan *Okta* (terima kasih untuk menjadi sahabatku yang baik)

Teman-teman Angkatan '99 yang banyak memberi semangat dan doa : *Faisal, Roy, Hari W, Ari, Ahmad, Haris, Nanik, Anne, Nadi, Ida R, Ari Wah, Iin, Retno, Karel, Robert* dan *teman-teman yang lain*

Adik-adik 2000 : *Renny, Subhkan* (makasih banyak atas bantuannya selama ini), *Naning, Fita, Iksan, Wiwid, Pipin, Dono, Munir, Windy, Erick, Ismaul* dan *yang lainnya*, semoga studi kalian cepat selesai.

Rekan-rekan *BEM Periode 2002*, terima kasih atas kerjasamanya selama ini.

Rekan-rekan *UKKM* : *Eko, Yuni, Novi, Mei, Devi, Utami* dan *temen-temen yang lain*.

Teman-teman *KKN*-ku : *Mas Hadi, Mas Tony, Erna, Nita, Ike, Nining, Evi* dan *Eko* yang telah menjadi teman sekaligus keluarga, yang banyak memberikan semangat dan dorongan.

*D O S E N P E M B I M B I N G :*

*Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc (DPU)*

*Ir. Giyarto, M.Sc (DPA I)*

*Ir. Susijahadi, MS (DPA II)*

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur Kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga kami dapat menyelesaikan penulisan Karya Ilmiah Tulis (Skripsi) yang berjudul “PENGUJIAN PREBIOTIK HETERO-GALAKTOOLIGOSAKARIDA PADA BAKTERI ASAM LAKTAT (*Lactobacillus sp.* dan *Streptococcus sp.*)”

Skripsi ini disusun berdasarkan penelitian yang dilaksanakan di Laboratorium Pengendalian Mutu Bagian Mikrobiologi dan Bioteknologi Pangan, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember mulai bulan Februari 2003 sampai dengan bulan Juni 2003 yang diajukan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan program sarjana strata satu (S-1) pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.

Proses penulisan skripsi ini banyak mendapat bantuan dan fasilitas dari berbagai pihak. Untuk itu dengan terselesaikannya skripsi ini penulis ingin menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada ibu, bapak, saudara-saudaraku yang telah memberikan dukungan baik secara materi maupun moril, dan penulis juga ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Ir. Hj. Siti Hartanti, MS selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
2. Ir. Susijahadi, MS selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
3. Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU) yang telah memberikan fasilitas selama penelitian dan pembimbingan dalam penelitian maupun penulisan skripsi.
4. Ir. Giyarto, M.Sc selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA) I yang telah memberikan arahan dalam penulisan skripsi.
5. Ir. Susijahadi, MS, selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA) II atas bimbingan dan saran yang berguna bagi penulis.

6. Ir. Herlina, MP selaku Dosen Wali yang telah memberikan arahan selama studi.
7. Teknisi laboratorium Mbak Widi, Mbak Wim, Mas Mistar, Mbak Ketut, Mbak Sari yang telah membantu selama penelitian.
8. Seluruh staf dan karyawan di Fakultas Teknologi Pertanian yang telah banyak membantu penulis.
9. Dan semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah berperan dalam penyelesaian skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa karya tulis ini masih mempunyai banyak kekurangan. Oleh karena itu dengan kerendahan hati, penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun bagi kesempurnaan dalam penulisan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca. Amin.

Jember, 3 Oktober 2003

Penulis

DAFTAR ISI

|  |      |
|--|------|
| HALAMAN JUDUL .....                              | i    |
| PENGESAHAN .....                                 | ii   |
| MOTTO .....                                      | iii  |
| PERSEMBAHAN .....                                | iv   |
| DOSEN PEMBIMBING .....                           | vi   |
| KATA PENGANTAR .....                             | vii  |
| DAFTAR ISI .....                                 | ix   |
| DAFTAR TABEL .....                               | xi   |
| DAFTAR GAMBAR .....                              | xii  |
| DAFTAR LAMPIRAN .....                            | xiii |
| RINGKASAN .....                                  | xiv  |
| <br>   |      |
| <b>I. PENDAHULUAN</b>                            |      |
| 1.1 Latar Belakang .....                         | 1    |
| 1.2 Permasalahan .....                           | 3    |
| 1.3 Tujuan Penelitian .....                      | 4    |
| 1.4 Manfaat Penelitian .....                     | 5    |
| <br>   |      |
| <b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b>                      |      |
| 2.1 Makanan Fungsional .....                     | 6    |
| 2.2 Oligosakarida dan Galaktooligosakarida ..... | 8    |
| 2.2.1 Oligosakarida .....                        | 8    |
| 2.2.2 Galaktooligosakarida .....                 | 12   |
| 2.3 Enzim $\beta$ - galaktosidase .....          | 14   |
| 2.4 Probiotik, Prebiotik dan Sinbiotik .....     | 15   |
| 2.5 Bakteri Asam Laktat .....                    | 21   |
| 2.5.1 Genus <i>Lactobacillus</i> .....           | 23   |
| 2.5.2 Genus <i>Streptococcus</i> .....           | 26   |
| 2.6 Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat .....        | 27   |

2.7 Hipotesa ..... 29

**III. METODOLOGI PENELITIAN**

3.1 Bahan dan Alat ..... 30  
    3.1.1 Bahan ..... 30  
    3.1.2 Alat ..... 30  
3.2 Waktu dan Tempat ..... 30  
3.3 Metode Penelitian ..... 30  
    3.3.1 Rancangan Percobaan ..... 30  
3.4 Pelaksanaan Penelitian ..... 31  
    3.4.1 Pemeliharaan Bakteri ..... 31  
    3.4.2 Persiapan Inokulum ..... 31  
    3.4.3 Fermentasi Bakteri Asam Laktat ..... 31  
3.5 Pengamatan ..... 33  
3.6 Prosedur Analisa ..... 34

**IV. HASIL DAN PEMBAHASAN**

4.1 Penelitian Pendahuluan (Pengujian Homo-Galaktooligosakarida) 36  
4.2 Penelitian Utama (Pengujian Hetero-Galaktooligosakarida) ..... 41

**V. KESIMPULAN DAN SARAN**

5.1 Kesimpulan ..... 51  
5.2 Saran ..... 51

**DAFTAR PUSTAKA** ..... 52

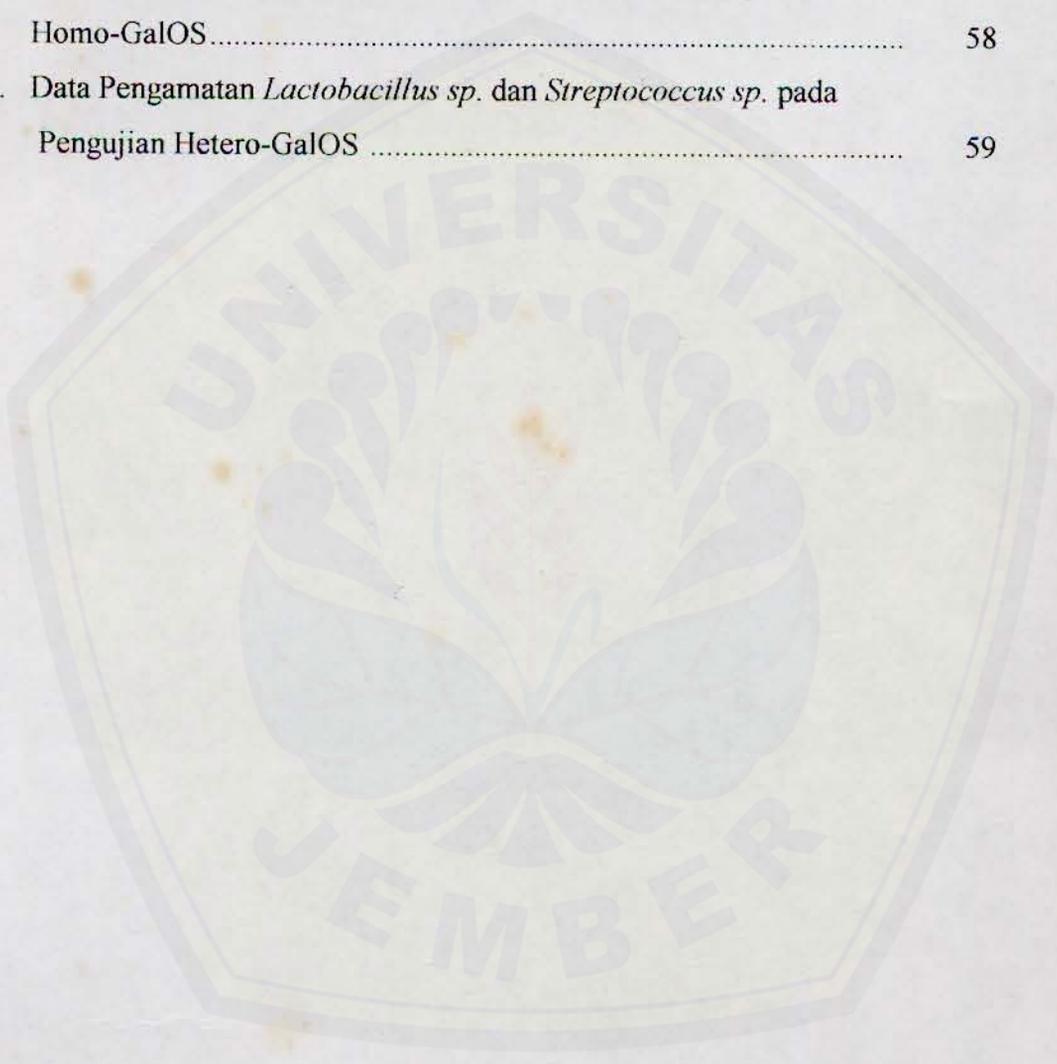
**LAMPIRAN** ..... 56

## DAFTAR GAMBAR

| Gambar  | Halaman |
|---|---------|
| 1. Rumus Struktur Aseptor Substrat Campuran Pada Produksi Hetero-GalOS .....  | 13      |
| 2. Hidrolisa Laktosa .....  | 14      |
| 3. Jalur Fermentasi Glukosa .....   | 24      |
| 4. Metabolisme Galaktosa Pada Bakteri Asam Laktat .....   | 25      |
| 5. Kurva Pertumbuhan Bakteri.....   | 28      |
| 6. Diagram Alir Pengujian Homo-Galaktooligosakarida (Homo-GalOS) Pada Pertumbuhan <i>Lactobacillus bulgaricus</i> .....                           | 32      |
| 7. Diagram Alir Pengujian Hetero-Galaktooligosakarida (Hetero-GalOS) Pada Pertumbuhan <i>Lactobacillus sp.</i> dan <i>Streptococcus sp.</i> ..... | 33      |
| 8. Kurva Perubahan pH <i>Lactobacillus bulgaricus</i> pada media MRS Broth dengan Penambahan Homo-GalOS Pada Suhu Inkubasi 37° C.....             | 38      |
| 9. Kurva Pertumbuhan <i>Lactobacillus bulgaricus</i> pada Media MRS Broth dengan Penambahan Homo-GalOS Pada Suhu Inkubasi 37° C .....             | 39      |

DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran  | Halaman |
|---|---------|
| 1. Kurva Standar Total Mikroba .....  | 56      |
| 2. Data Pengamatan <i>Lactobacillus bulgaricus</i> pada Pengujian<br>Homo-GalOS .....                         | 58      |
| 3. Data Pengamatan <i>Lactobacillus sp.</i> dan <i>Streptococcus sp.</i> pada<br>Pengujian Hetero-GalOS ..... | 59      |



Yenny Rahmawati, NIM. 991710101132, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember, "Pengujian Prebiotik Hetero-Galaktooligosakarida Pada Bakteri Asam Laktat (*Lactobacillus sp.* dan *Streptococcus sp.*)," dibimbing oleh Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ir. Giyarto, M.Sc selaku Dosen Pembimbing Anggota.

## RINGKASAN

Prebiotik galakto-oligosakarida (GalOS) merupakan salah satu jenis pangan fungsional yang berfungsi sebagai pemacu pertumbuhan dan perkembangan bagi bakteri probiotik, seperti bakteri asam laktat. Senyawa ini merupakan karbohidrat yang tidak dapat dicerna oleh sistem pencernaan manusia. Keberadaan GalOS dalam usus besar merupakan sumber nutrisi bagi mikroflora usus yang menguntungkan seperti *Lactobacillus sp.* dan *Streptococcus sp.* Senyawa ini terdapat secara alami pada ASI, namun jumlahnya akan semakin berkurang seiring dengan bertambahnya usia manusia. Untuk memenuhi kebutuhan akan senyawa ini, saat ini telah dikembangkan sintesa GalOS secara enzimatis dengan menggunakan enzim  $\beta$ -galaktosidase dari *Escherichia coli*, yang menghasilkan dua jenis GalOS yakni homo-galaktooligosakarida (homo-GalOS) dan hetero-galaktooligosakarida (hetero-GalOS). Pada hetero-GalOS digunakan substrat campuran galaktosa sebagai donor dan gula-gula lain sebagai aseptor dengan perbandingan 50% : 50% dengan konsentrasi substrat 40% (w/v).

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh penambahan senyawa hetero-GalOS terhadap pola pertumbuhan bakteri asam laktat dari kelompok *Lactobacillus* dan *Streptococcus* dan untuk mengetahui jenis hetero-GalOS yang dapat dimanfaatkan secara optimal probiotik dari kedua kelompok bakteri tersebut. Penelitian dilakukan dengan variasi jenis hetero-GalOS dan bakteri asam laktat. Pengamatan parameter penelitian yang dilakukan meliputi pertumbuhan, perubahan pH dan perubahan total mikroba. Data penelitian disajikan dalam bentuk tabel pola pertumbuhan *Lactobacillus sp.* dan *Streptococcus sp.* selama masa inkubasi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan hetero-GalOS dengan donor galaktosa dan aseptor variasi jenis oligosakarida umumnya dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri asam laktat selama masa inkubasi. Hal ini ditunjukkan dengan adanya peningkatan pertumbuhan *Lactobacillus sp.* dan *Streptococcus sp.* dengan indikator terjadinya penurunan pH dan peningkatan jumlah total mikroba pada waktu yang sama. Hetero-GalOS dengan kombinasi galaktosil-glukosa merupakan substrat yang umumnya dapat difermentasi secara optimal oleh *Lactobacillus sp.* maupun *Streptococcus sp.* Hal ini ditunjukkan dengan terjadinya peningkatan jumlah total mikroba yang paling tinggi dibanding penambahan jenis hetero-GalOS yang lain.



## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Mikroflora usus merupakan suatu ekosistem yang sangat kompleks, dimana komposisi bakteri-bakteri yang ada dalam sistem ini memiliki peranan yang penting bagi kesehatan manusia. Pada bayi yang mengkonsumsi ASI, komposisi mikroflora usus didominasi oleh *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus*, yang memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan. Efek positif yang menguntungkan dari bakteri-bakteri tersebut antara lain proses pencernaan makanan menjadi lebih baik, gangguan pencernaan berkurang dan tercegahnya diare. Sedang pada bayi yang mengkonsumsi susu formula, ekosistem flora usus akan didominasi oleh bakteri asam laktat dan *bakteri jahat* (patogen). Beberapa jenis bakteri patogen tersebut adalah *Eschericia coli*, *Clostridium* dan *Bacteroides*, yang sering menyebabkan diare dan sepsis. Dalam kondisi tubuh yang sehat, normalnya mikroflora usus didominasi oleh *bakteri baik* dan yang menguntungkan bagi kesehatan (Agus, 2001).

Setelah masa penyapihan, komposisi mikroflora usus akan mengalami perubahan, dimana kolonisasi bakteri baik akan berkurang jumlahnya dan membentuk mikroekosistem yang tidak normal. Dominasi *bakteri baik* sebenarnya dapat dilanjutkan dengan cara memanipulasi jumlahnya sesuai yang dikehendaki, yang merupakan penataan atau manajemen mikroflora usus. Tujuannya agar *bakteri baik* menjadi dominan dan *bakteri jahat* menjadi kalah. Ada beberapa cara yang dapat dilakukan untuk mendapatkan komposisi mikroflora yang dikehendaki, yakni dengan menerapkan konsep probiotik, prebiotik dan sinbiotik (kombinasi probiotik dan prebiotik).

Konsep probiotik dilakukan dengan cara memasukkan bakteri yang dikehendaki dari luar melalui makanan dan minuman, sehingga di dalam usus terjadi perubahan komposisi populasi bakteri menjadi menguntungkan sebagaimana yang dikehendaki. Contohnya dengan menambahkan bakteri jenis *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus termophilus* atau *Lactobacillus casei* ke dalam yoghurt yang dapat dikonsumsi oleh manusia.

Probiotik merupakan bakteri yang masuk dalam keadaan hidup, bertahan hidup dalam saluran pencernaan, tahan terhadap berbagai rintangan dan mampu menjaga keseimbangan mikroflora usus. Probiotik menghasilkan enzim seperti laktase yang mampu mengatasi intoleransi laktosa, *bile salt hidrolase* yang dapat menurunkan kadar kolesterol dan peptidoglikan yang dapat menyerap senyawa karsinogenik. Bakteri asam laktat merupakan probiotik yang dalam metabolismenya akan menghasilkan senyawa-senyawa seperti asam laktat, hidrogen peroksida dan bakteriosin yang bersifat antimikroba bagi bakteri patogen (Kompas, 22 Desember 2002).

Konsep prebiotik dilakukan dengan cara memasukkan zat tertentu ke dalam makanan atau minuman, dimana zat tersebut dapat meningkatkan pertumbuhan dan perkembangbiakan bakteri yang dikehendaki, sehingga dapat menekan pertumbuhan dan perkembangbiakan bakteri yang tidak dikehendaki (Agus, 2001). Prebiotik merupakan senyawa yang tidak dapat dicerna atau diabsorpsi oleh alat pencernaan manusia sehingga akan mencapai usus dalam keadaan utuh dan mendukung pertumbuhan probiotik. Senyawa prebiotik tidak disukai oleh *bakteri jahat* (patogen) sehingga adanya senyawa kelompok ini dapat mendukung dominasi *bakteri baik/probiotik* dalam mikroflora usus (Waspodo, 2001).

ASI mengandung prebiotik alami yang dapat menyebabkan pertumbuhan subur *Bifidobacterium* yakni colostrum yang merupakan suatu oligosakarida *N-acetyl glucosamine*. Jenis gula tersebut ternyata dapat diperoleh secara alamiah pada berbagai jenis buah dan sayuran. Kelompok oligosakarida seperti rafinosa, stakiosa, galakto-oligosakarida, frukto-oligosakarida, inulin, serta beberapa jenis peptida dari protein adalah contoh-contoh senyawa prebiotik yang telah digunakan dalam industri pangan. Beberapa produk makanan atau minuman sudah banyak yang menggunakan prebiotik dalam produknya seperti frukto-oligosakarida pada produk susu bubuk untuk balita (Agus, 2001; Waspodo, 2001).

Di negara-negara maju, yang memiliki pola hidup masyarakat modern yang supersibuk dan bergesernya pola makan, dapat membahayakan keseimbangan mikroflora usus. Penyebabnya adalah kebiasaan mengkonsumsi

makanan cepat saji ala Barat (tinggi lemak dan protein, tapi rendah serat) yang dapat meningkatkan populasi *bakteri jahat* dalam saluran pencernaan. Hal ini tidak akan terjadi bila dalam pola makan tersebut diimbangi dengan mengkonsumsi makanan/minuman fungsional yang dapat menyehatkan, salah satunya adalah makan/minuman yang mengandung prebiotik. Hal ini menjadikan dasar pemikiran bagi para peneliti maupun produser makanan/minuman untuk mensintesis prebiotik, terutama dari kelompok oligosakarida.

Dari beberapa senyawa kelompok oligosakarida yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai prebiotik adalah galakto-oligosakarida (GalOS). Selama ini senyawa galakto-oligosakarida telah banyak digunakan sebagai pangan fungsional. Sintesa GalOS untuk prebiotik dapat dilakukan melalui ekstraksi secara langsung polisakarida alami dari tumbuhan, hidrolisa polisakarida alami dan sintesis secara enzimatik dengan menggunakan enzim  $\beta$ -galaktosidase dari sumber mikroba seperti *Aspergillus oryzae*, *Bacillus circulans*, *Escherichia coli* dan *Thermus aquaticus* (Berger dkk., 1995; Suwasono, 2001).

Dalam penelitian sebelumnya telah dilakukan produksi prebiotik galaktooligosakarida (GalOS) secara enzimatik dengan menggunakan enzim  $\beta$ -galaktosidase dari *Escherichia coli*. Galaktooligosakarida yang dihasilkan terdiri dari homo-oligosakarida (homo-GalOS) dan hetero-oligosakarida (hetero-GalOS). Pengembangan prebiotik ini sangat terkait erat dengan probiotik, karena senyawa ini merupakan nutrisi yang mendorong pertumbuhan dan perkembangbiakan probiotik. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menguji galaktooligosakarida sintetis yang dihasilkan sebagai pemacu pertumbuhan (*growth promotor*) bakteri probiotik yaitu kelompok bakteri asam laktat khususnya *Lactobacillus sp.* dan *Streptococcus sp.*

Senyawa galakto-oligosakarida (GalOS) baik homo-galaktooligosakarida (homo-GalOS) maupun hetero-galaktooligosakarida (hetero-GalOS) merupakan salah satu sumber karbon terfermentasi yang bersifat selektif sebagai sumber nutrisi dan substrat bagi proses metabolisme bakteri asam laktat. Menurut Nuraida (1996), untuk memperbanyak jumlah bakteri asam laktat dalam saluran pencernaan, sumber gula merupakan salah satu faktor yang dapat diatur. Di

samping itu produksi asam laktat atau asam organik lain oleh bakteri asam laktat atau *Bifidobacteria* dalam saluran pencernaan tergantung pada ketersediaan karbohidrat yang tidak dapat diserap oleh tubuh (*non digestible carbohydrate*). Kemampuan bakteri probiotik untuk memfermentasi senyawa GalOS merupakan suatu karakteristik yang sangat penting. Senyawa GalOS hanya dapat difermentasi oleh strain yang spesifik dari bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus sp.* dan *Streptococcus sp.*

## 1.2 Permasalahan

Senyawa hetero-galaktooligosakarida (hetero-GalOS) merupakan prebiotik yang berfungsi sebagai pemacu pertumbuhan (*growth promotor*) bagi pertumbuhan bakteri jenis *Lactobacillus* dan *Streptococcus*. Senyawa hetero-GalOS memiliki beberapa jenis kombinasi oligosakarida yang berbeda sebagai komponen penyusunnya. Dimungkinkan perbedaan jenis hetero-GalOS tersebut dapat menimbulkan pengaruh yang berbeda pula terhadap pertumbuhan bakteri asam laktat (probiotik). Pengaruh jenis hetero-GalOS terhadap pertumbuhan *Lactobacillus sp.* dan *Streptococcus sp.* belum diketahui.

Oleh karena itu untuk mengetahui pengaruh jenis hetero-GalOS terhadap pertumbuhan *Lactobacillus sp.* dan *Streptococcus sp.*, perlu dilakukan pengujian secara *in vitro*, dengan mengamati faktor-faktor pertumbuhan yang meliputi: pertumbuhan mikroba, perubahan pH dan total mikroba selama waktu inkubasi.

## 1.3 Tujuan Penelitian

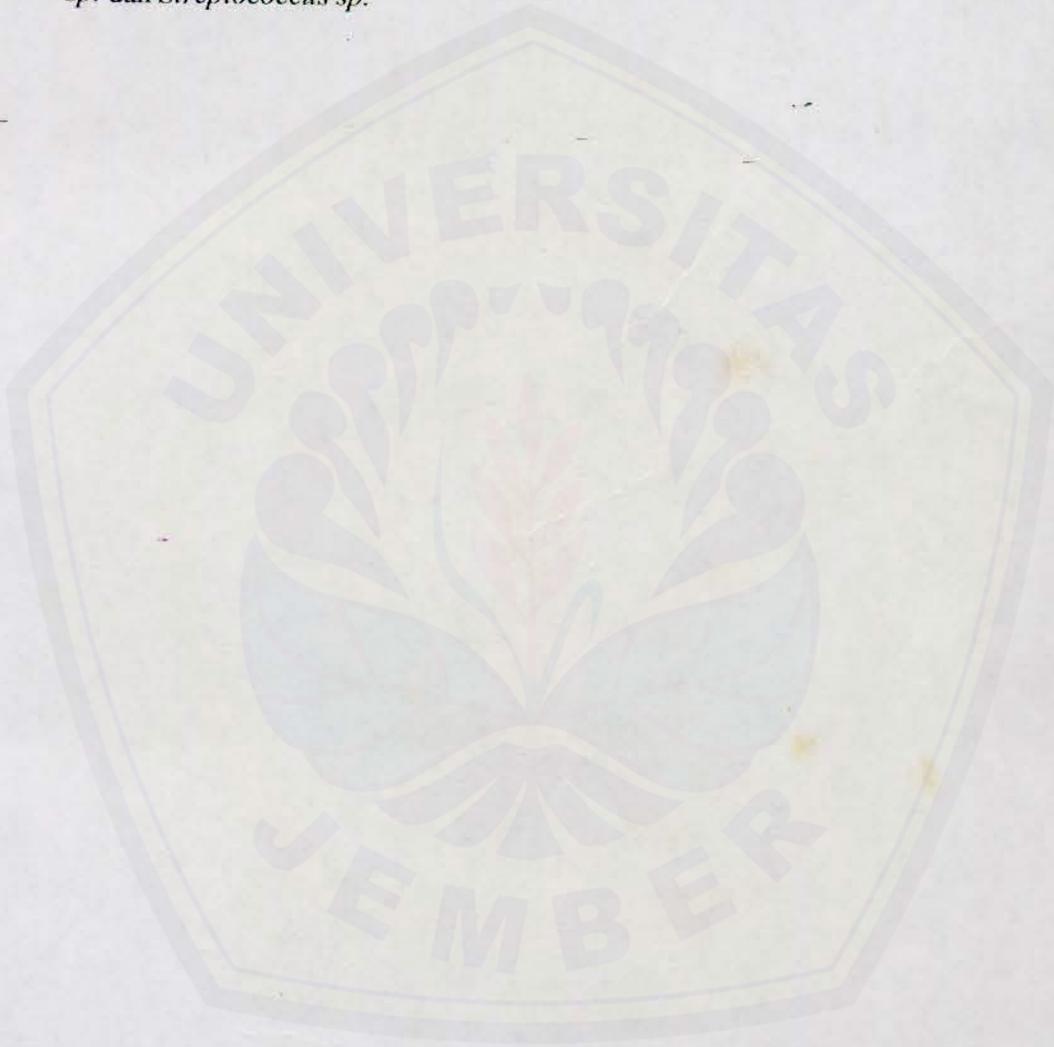
Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui pengaruh jenis hetero-GalOS terhadap pertumbuhan *Lactobacillus sp.* dan *Streptococcus sp.*
2. Mengetahui jenis hetero-GalOS yang dapat dimanfaatkan secara optimal oleh *Lactobacillus sp.* dan *Streptococcus sp.*

#### 1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi tentang :

1. Pengaruh jenis hetero-GalOS terhadap pertumbuhan *Lactobacillus sp.* dan *Streptococcus sp.*
2. Jenis hetero-GalOS yang dapat dimanfaatkan secara optimal oleh *Lactobacillus sp.* dan *Streptococcus sp.*





## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Makanan Fungsional

Menurut Silalahi (2001), semua makanan adalah fungsional karena makanan memberi rasa, aroma dan memiliki nilai gizi. Akhir-akhir ini istilah fungsional pada makanan berkaitan dengan efek fisiologis yang menguntungkan selain fungsi makanan sebagai sumber zat gizi yang diperlukan. Ternyata banyak merupakan komponen minor non nutritif di dalam makanan yang berperan mencegah dan bahkan mengobati beberapa penyakit. Makanan seperti ini disebut sebagai makanan fungsional.

Makanan dikatakan mempunyai sifat fungsional bila mengandung komponen (zat gizi atau non gizi) yang mempengaruhi satu atau sejumlah terbatas fungsi dalam tubuh tetapi yang bersifat positif, sehingga dapat memenuhi kriteria fungsional atau menyetatkan.

Istilah pangan fungsional (*functional foods*) merupakan nama yang paling dapat diterima semua pihak untuk segolongan makanan dan atau minuman yang mengandung bahan-bahan yang diperkirakan dapat meningkatkan status kesehatan dan mencegah timbulnya penyakit-penyakit tertentu. Untuk konsumen, istilah lama yaitu *health foods* mungkin lebih menarik dan lebih berarti; namun hal ini tidak dapat digunakan karena pada prinsipnya semua bahan pangan akan menyetatkan tubuh bila dikonsumsi secara baik dan benar. Sebelumnya pernah pula diusulkan beberapa nama lainnya misalnya *designer foods*, *pharmafoods*, *vitafoods* dan *netraceutical* (Muchtadi, 1996).

Seiring dengan semakin meningkatnya kesadaran masyarakat akan pentingnya hidup sehat, maka tuntutan konsumen terhadap bahan pangan juga kian bergeser. Bahan pangan yang kini mulai banyak diminati konsumen bukan saja yang mempunyai komposisi gizi yang baik (fungsi primer) serta penampakan dan cita rasa yang menarik (fungsi sekunder), tetapi juga harus memiliki fungsi fisiologis tertentu bagi tubuh. Fungsi yang demikian dikenal sebagai fungsi tertier. Saat ini banyak dipopulerkan bahan pangan yang mempunyai fungsi fisiologis tertentu di dalam tubuh, misalnya untuk menurunkan tekanan darah, menurunkan

kolesterol, menurunkan kadar gula darah, meningkatkan penyerapan kalsium dan lain-lain (Astawan, 2003).

Jepang merupakan negara yang paling tegas dalam memberi batasan mengenai pangan fungsional, paling maju dalam perkembangan industrinya. Menurut para ilmuwan Jepang, beberapa persyaratan yang harus dimiliki oleh suatu produk agar dapat dikatakan sebagai pangan fungsional adalah :

1. Harus merupakan produk pangan (bukan berbentuk kapsul, tablet atau bubuk) yang berasal dari ingredien alami
2. Dapat dan layak dikonsumsi sebagai bagian dari diet atau menu sehari-hari
3. Mempunyai fungsi tertentu pada saat dicerna serta dapat memberikan peran bagi proses metabolisme tubuh tertentu, misalnya : memperkuat mekanisme pertahanan tubuh, mencegah timbulnya penyakit tertentu, membantu mengembalikan kondisi tubuh setelah sakit tertentu, menjaga kondisi fisik dan mental, serta memperlambat proses penuaan (Astawan, 2003).

Jepang merupakan negara pertama yang mengembangkan dan memasarkan pangan fungsional pada pertengahan tahun 1980-an. Sebagai pemimpin pasar di Jepang adalah Otsuka Pharmaceutical, yang pada tahun 1988 memasarkan *FibeMini*, suatu minuman yang mengandung serat larut, yaitu *polidekstroza*. Perusahaan ini juga memproduksi *Pocari Sweat*, suatu minuman untuk atlet yang sangat laku di Jepang. Ingredien yang paling penting dalam hubungan dengan pemasaran adalah serat makanan, oligosakarida, kalsium, zat besi, beta-karoten dan DHA. *Bikle*, suatu produk dari Suntory, mengandung bakteri bifidus hidup dan mineral dari whey sebagai sumber kalsium, oligosakarida, serat makanan dan ekstrak teh. Pada tahun 1993, industri juice wortel diperkenalkan dan beta karoten juga ditambahkan dalam produk susu, *confectionary* dan roti. Baru-baru ini *functional health teas* dan produk yang mengandung *Amaranth* serta *Aloe vera* telah juga dipasarkan (Nienaber, 1996).

Karena manfaat kesehatan yang dapat diberikan oleh pangan fungsional dibatasi oleh bahan tambahan pangan yang digunakan, Departemen Kesehatan Jepang mengidentifikasi 12 kelompok bahan tambahan pangan yang meningkatkan kesehatan untuk digunakan pada makanan yang bermanfaat bagi

kesehatan. Yang termasuk dalam kelompok ini adalah : serat pangan (*dietary fiber*), oligosakarida, gula alkohol, peptida dan protein, glikosida, alkohol, isoprenoid dan vitamin, kolin, bakteri asam laktat, mineral, asam lemak tidak jenuh dan lain-lain (Goldberg, 1996).

Berbagai jenis pangan fungsional telah beredar di pasaran, mulai jenis susu probiotik tradisional seperti *yoghurt*, *kefir* dan *coumiss*; diikuti dengan pemunculan produk baru seperti *BioSeven*, *OH BA yoghurt*, *yakult*, *ophilus* dan *BA live*. Produk susu rendah lemak-siap konsumsi yang mengandung serat larut. Selain itu juga beredar produk pangan tanpa lemak (mengandung *fat substitute*) yang diperkaya dengan mineral, produk non kolesterol atau kadar kolesterol dan lemaknya yang telah diturunkan. Pangan fungsional lainnya misalnya *breakfast cereals*, biskuit dan minuman yang diperkaya dengan serat; permen yang mengandung zat besi, vitamin dan fruktooligosakarida; serta sosis yang diperkaya dengan serat, oligosakarida atau kalsium (Muchtadi, 1996).

## **2.2 Oligosakarida dan Galaktooligosakarida**

### **2.2.1 Oligosakarida**

Oligosakarida terdiri dari 2 – 10 monosakarida yang tergabung dalam ikatan glikosida yang segera dapat dihidrolisa secara enzimatis untuk menghasilkan monosakarida. Contoh oligosakarida yang memiliki dua residu monosakarida adalah sukrosa, laktosa, maltosa dan trehalosa, sedangkan yang memiliki tiga monosakarida adalah raffinosa, maltotriosa dan mannotriosa. Oligosakarida dapat juga diklasifikasikan menjadi homo-oligosakarida dan hetero-oligosakarida yang terdiri dari dua atau lebih tepi monosakarida penyusunnya (El Khadem, 1998).

Oleh peneliti terdahulu, senyawa oligosakarida digolongkan sebagai antigizi, karena kerap menimbulkan gas dalam perut atau flatulensi. Seiring dengan makin majunya perkembangan ilmu kimia dan biokimia pangan, senyawa oligosakarida tidak lagi dianggap sebagai antigizi yang mengganggu. Senyawa ini kemudian dianggap berguna bagi tubuh, karena dapat mencegah timbulnya bakteri yang merugikan dalam usus. Senyawa ini kemudian dikenal sebagai prebiotik.

sebabnya oligosakarida acapkali ditambahkan ke dalam makanan ringan seperti biskuit, permen dan berbagai produk olahan susu (Sibuea, 2002).

Kelompok oligosakarida, seperti raffinosa, stakiosa, galakto-oligosakarida, frukto-oligosakarida, inulin, serta beberapa jenis peptida dari protein tidak dapat dicerna manusia, sehingga mencapai usus dan mendukung pertumbuhan bakteri "baik" dalam usus, sehingga pada akhirnya bakteri "baik" mendominasi populasi mikroflora usus (Wasposito, 2001).

Oligosakarida bermanfaat meningkatkan populasi *Bifidobacteria* dan menurunkan jumlah bakteri yang merugikan (Tabel 1). Penelitian menunjukkan bahwa peningkatan jumlah *Bifidobacteria* sesudah mengkonsumsi oligosakarida akan terjadi dan sebaliknya menurunkan bakteri yang merugikan. *Bifidobacteria* juga akan mencegah pertumbuhan bakteri patogen yang masuk dari luar tubuh dan bakteri saluran pencernaan yang merugikan, karena konsumsi oligosakarida akan memproduksi asam lemak rantai pendek (terutama asam asetat dan asam laktat dengan perbandingan 3 : 2) dan kemampuan untuk menghasilkan zat bersifat sebagai antibiotik. Dengan terbentuknya zat-zat anti bakteri dan asam ini maka pertumbuhan bakteri patogen seperti *Salmonella* dan *Eschericia coli* akan dihambat. Melalui pembentukan asam lemak pendek dalam jumlah yang tinggi, *Bifidobacteria* juga mencegah konstipasi dengan merangsang peristaltis usus dan dengan menambah kandungan feses karena adanya tekanan osmosis. Penurunan metabolit toksis oleh oligosakarida atau konsumsi *Bifidobacteria* (probiotik) akan meringankan beban bahan toksis dalam hati. Oligosakarida juga menurunkan kadar kolesterol dalam serum dan tekanan darah dan mempunyai efek anti kanker. Penurunan kadar kolesterol diduga karena perubahan mikroflora usus. Bakteri asam laktat diketahui akan menurunkan kolesterol darah karena dapat mencegah absorpsi kolesterol dari usus. Oligosakarida juga berfungsi dalam menurunkan pembentukan metabolit toksis dan enzim yang merugikan (Silalahi, 2001).

**Tabel 1.** Oligosakarida, Disakarida dan Poliol yang dapat Meningkatkan *Bifidobacteria* dan Bakteri asam Laktat dalam Saluran Pencernaan

| Jenis gula                          | Bakteri yang meningkat                                |
|-------------------------------------|---|
| Frukto-oligosakarida                | <i>Bifidobacteria</i>                                 |
| Transgalaktosil oligosakarida       | <i>Bifidobacteria</i>                                 |
| 4 galaktosil laktosa                | <i>Bifidobacteria</i>                                 |
| Isomalto-oligosakarida              | <i>Bifidobacteria</i>                                 |
| Galakto-oligosakarida (Oligomat 50) | <i>Bifidobacteria</i>                                 |
| Galaktosil oligosakarida            | <i>Bifidobacteria</i>                                 |
| Oligosakarida kedelai               | <i>Bifidobacteria</i> dan beberapa <i>laktobasili</i> |
| Xilo-oligosakarida                  | <i>Bifidobacteria</i>                                 |
| Palatinosa                          | <i>Bifidobacteria</i>                                 |
| Silitol                             | Bakteri asam laktat                                   |
| Laktulosa                           | <i>Bifidobacteria</i> dan bakteri asam laktat         |
| Inulofruktosakarida                 | <i>Bifidobacteria</i>                                 |

Sumber : Nuraida (1996)

Produksi gas merupakan efek samping dari konsumsi oligosakarida dan penelitian Rastall (2000) menunjukkan bahwa nilai rata-rata gas yang diproduksi oleh *Bifidobacteria* selama 48 jam fermentasi dengan penambahan inulin dan FOS (17 - 18 ml) lebih besar daripada yang dihasilkan oleh GalOS dan IMOS (8 - 10 ml). Jelas bahwa variasi oligosakarida yang sedemikian banyak, beberapa di antaranya mampu bersifat prebiotik dan masing-masing memiliki komposisi kimia yang berbeda (**Tabel 2**).

**Tabel 2.** Komposisi Kimia Oligosakarida

| Oligosakarida                | Komposisi kimia  |
|------------------------------|--|
| Fruktooligosakarida (FOS)    | 95% oligosakarida $\beta(2-1)$ fructan; 60% glukosa, fruktosa <sub>(n)</sub> , 40% fruktosa <sub>(n)</sub> dp 2-8, rata-rata 4-5 |
| Inulin                       | >99% oligosakarida $\beta(2-1)$ fructan; rata-rata dp 10-12  |
| Galaktooligosakarida (GalOS) | Oligogalaktosa (85%), glukosa, galaktosa dan laktosa   |
| Oligosakarida kedelai        | Stakiosa (fruktosa, galaktosa, glukosa) dan raffinosa (fruktosa, galaktosa, glukosa), dp 3-4                                     |
| Xilooligosakarida            | $\beta(1-4)$ xilosa; kemurnian 70%, dp 2-4   |
| Isomaltosaoligosakarida      | Campuran oligomer glukosa ikatan $\alpha(1-6)$ (isomaltosa, panosa, isomaltotriosa)  |
| Laktulosa                    | Galaktosa dan disakarida yang mengandung fruktosa  |

Beberapa makanan secara alamiah mengandung oligosakarida, misalnya fruktooligosakarida dapat ditemukan dalam bawang merah, bawang putih, asparagus dan kacang kedelai mengandung *soybean* oligosakarida. Akan tetapi melalui makanan setiap hari tidak mungkin dapat memenuhi jumlah oligosakarida yang dianggap berkhasiat untuk mencegah penyakit, maka konsumsi tambahan diperlukan untuk berfungsi dalam mencegah dan meningkatkan kesehatan. Fruktooligosakarida (FOS) banyak ditambahkan pada susu bubuk untuk konsumsi balita sebagai prebiotik (Silalahi, 2001).

Oligosakarida bersifat fungsional sebab senyawa ini tidak bisa dicerna oleh enzim-enzim pencernaan manusia. Sifatnya menyerupai serat pangan, sehingga tidak bisa diserap usus kecil. Bila oligosakarida ke dalam usus besar, maka akan difermentasi oleh bakteri-bakteri baik yang terdapat di dalam usus besar. Sebaliknya, bakteri jahat tak menyukai zat gizi ini (Sibuea, 2002).

Konsumsi yang berlebihan dari oligosakarida yang tidak dicerna/sebagian dapat diabsorpsi menyebabkan diare terus menerus, meskipun sedikit gejala seperti perut kembung dan flatulensi yang sering timbul pada manusia. Hal ini dinyatakan sebagai hubungan antara dosis dengan gejala yang timbul. Oleh karena itu diperlukan dosis maksimum penggunaan beberapa oligosakarida oleh tubuh seperti tertera pada **Tabel 3**.

**Tabel 3.** Dosis Maksimum Oligosakarida yang Diijinkan yang Tidak Menimbulkan Diare di Jepang

| Jenis Sakarida             | Dosis Maksimum yang Diijinkan<br>(g/kg berat badan/hari) |        |
|----------------------------|--|--------|
|                            | Pria   | Wanita |
| Neosugar                   | 0.3  | 0.4    |
| 4 galaktosil-sukrosa       | 0.6  | 0.6    |
| 4 galaktosil-oligosakarida | 0.28   | 0.28   |
| 6 galaktosil-laktosa       | 0.3  | 0.3    |
| Xilo-oligosakarida         | 0.12   | 0.12   |
| Maltitol                   | 0.3  | 0.3    |
| Palatinit                  | 0.3  | 0.3    |
| Eritritol                  | 0.66   | 0.8    |
| Sorbitol                   | 0.17   | 0.24   |

Sumber : Goldberg (1999).

### 2.2.2 Galaktooligosakarida

Galakto-oligosakarida (GalOS) merupakan polimer dari 2 – 10 galaktosa yang tergabung oleh ikatan glikosidik. Komposisi kimianya terdiri dari oligogalaktosa (85%), glukosa, galaktosa dan laktosa (Nuraida, 1996).

Galaktooligosakarida, merupakan oligosakarida yang dapat merangsang perkembangbiakan *Bifidobacteria*, yang terdapat pada ASI, susu sapi dan yoghurt komersial. Senyawa ini adalah suatu campuran oligosakarida dari laktosa yang disintesa secara enzimatik oleh  $\beta$ -D-galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* dan *Streptococcus termophilus*. Studi yang sama juga mengindikasikan bahwa galaktooligosakarida yang diproduksi dari laktosa oleh enzim yang sama memiliki pengaruh yang penting bagi flora fekal. Terdapat hubungan yang linear antara dosis galaktooligosakarida dengan fekal *Bifidobacteria*. Juga terjadi peningkatan jumlah *Lactobacili*. Konsumsi galaktooligosakarida dengan dosis 10 gram/hari dianjurkan untuk memperoleh efek yang menguntungkan tersebut (Ito dkk., 1990).

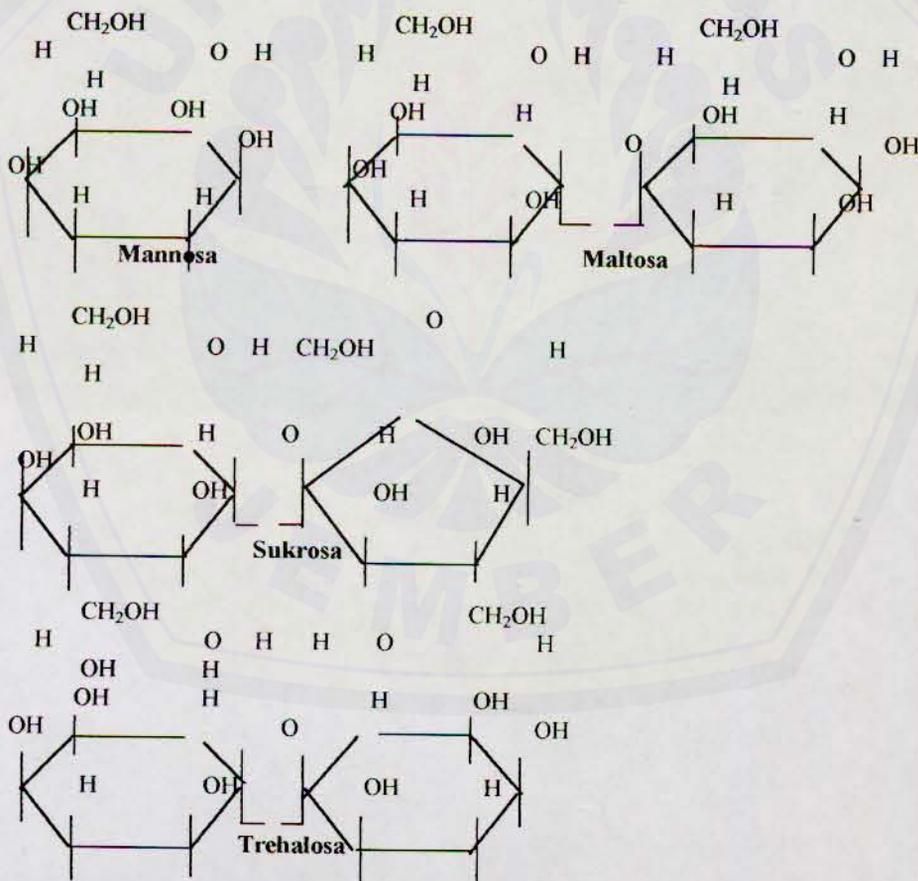
Galaktooligosakarida pada ASI juga analog atau cocok dengan senyawa reseptor permukaan sel epitel (Kunz dan Rudolf, 1996). Dengan adanya galakto-oligosakarida yang terkandung dalam susu ibu, maka air susu memiliki lebih banyak komponen pengkebal/pelindung dan sistem pertahanan (Muchtadi dan Wijaya, 1996). Sehingga bayi yang mengkonsumsi ASI mempunyai pertahanan tubuh yang lebih baik daripada bayi yang tidak mengkonsumsi ASI.

Dalam produksi galaktooligosakarida menggunakan enzim  $\beta$ -galaktosidase membutuhkan substrat. Galaktosa merupakan gula sederhana atau monosakarida yang dapat dipakai sebagai substrat dalam reaksi enzimatik menggunakan enzim  $\beta$ -galaktosidase. Hidrolisa laktosa dalam produksi galaktooligosakarida menjadi 2 komponen yaitu glukosa dan galaktosa (Rastall, 1999).

Pada produksi hetero-oligosakarida menggunakan campuran 2 jenis karbohidrat, sebagai donor dan aseptor. Menurut Rastall (2000), sebagai donor dengan menggunakan glikosiltransferase yang paling menarik adalah memanfaatkan sukrosa. Beberapa prebiotik dapat dibuat dengan cara ini, tetapi ada pendekatan yang lebih mudah dan berpotensi yang dapat digunakan adalah

penggunaan glikosidase. Glikosidase sendiri merupakan enzim hidrolitik, reaksi di bawah kondisi terkendali dapat diinduksi untuk mensintesa ikatan glikosida. Sebagai contoh adalah produksi galaktooligosakarida dengan menggunakan  $\beta$ -galaktosidase dari substrat laktosa. Pada konsentrasi laktosa tinggi enzim ini mengkatalisa pemindahan yang akan membentuk tri dan tetrasakarida dari laktosa.

Dalam produksi hetero-GalOS mannosa digunakan sebagai aseptor substrat campuran. Seperti halnya glukosa, mannosa termasuk karbohidrat sederhana atau monosakarida. Sedangkan untuk maltosa, sukrosa dan trehalosa masing-masing merupakan disakarida. Dalam produksi hetero-GalOS secara enzimatik, maltosa, sukrosa dan trehalosa juga berperan sebagai aseptor dari substrat campuran. Berikut pada **Gambar 1** diberikan rumus struktur gula-gula tersebut :

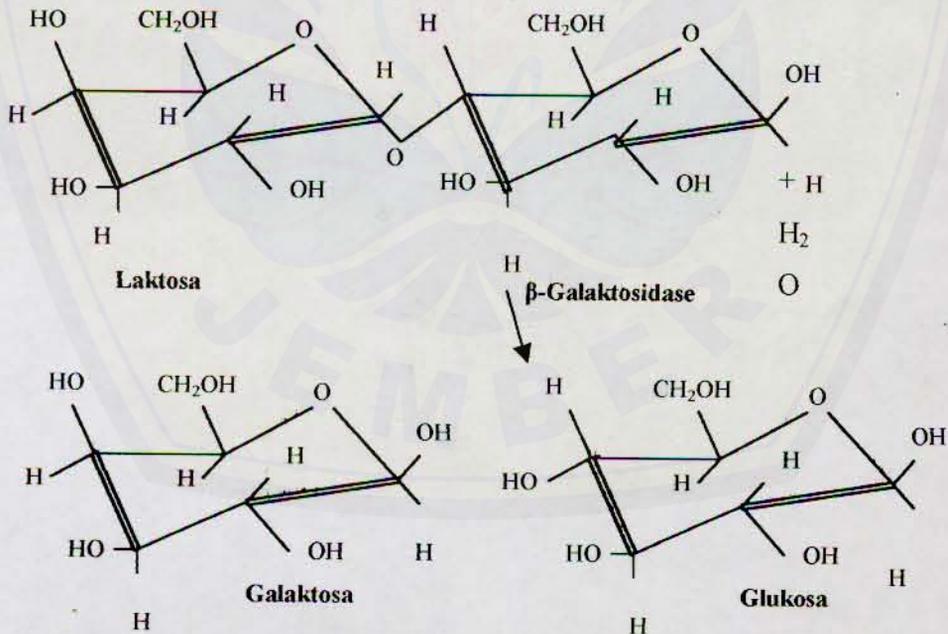


**Gambar 1.** Rumus Struktur Aseptor Substrat Campuran pada Produksi Hetero – GalOS

### 2.3 Enzim $\beta$ - Galaktosidase

Laktase atau biasa disebut  $\beta$ -galaktosidase merupakan enzim yang penting karena dapat mengubah laktosa yang sukar larut dengan tingkat kemanisan rendah menjadi gula yang mudah larut, tidak mudah mengkristal dan rasanya lebih manis karena terhidrolisa menjadi glukosa dan galaktosa (**Gambar 2**). Enzim ini terdapat pada buah-buahan seperti : peach, apel, bakteri (*E. coli*), jamur (*Aspergillus oryzae*) dan pada binatang terutama saluran pencernaannya. Selain itu dalam fungsinya sebagai enzim hidrolase,  $\beta$ -galaktosidase mampu menguraikan 2 macam substrat, yaitu laktosa dan *o*-nitrofenil- $\beta$ -galaktosida (ONPG) yang menghasilkan *khromogen-o*-nitrofenol (Winarno, 1986).

Menurut Winarno (1986), enzim  $\beta$ -galaktosidase dalam prosesnya membutuhkan laktosa sebagai substrat. Dalam penggunaannya, enzim yang diperoleh dari tanaman jarang digunakan, yang lebih sering digunakan dari bakteri *Esherichia coli* dan *Aspergillus niger*. Enzim  $\beta$ -galaktosidase yang berasal dari jamur biasanya digunakan pada suhu tinggi dan pH rendah



**Gambar 2.** Hidrolisa Laktosa (Roberts, dkk, 1995)

Agar aktivitas enzim meningkat maka suhu reaksi yang digunakan adalah  $40^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C}$ . Pada suhu ini enzim pada konsentrasi gula tinggi akan tetap stabil dan tidak terjadi denaturasi (Nakano, dkk, 1995).

#### 2.4 Probiotik, Prebiotik dan Sinbiotik

Konsep tentang probiotik muncul pada akhir abad ke-20 atas kerja keras Metchnikoff di Institut Pasteur – Paris. Konsep tersebut diterima oleh para ilmuwan dan konsumen sebagai bahan tambahan pangan. Di beberapa negara, prebiotik pada masa itu dicoba pada susu sapi perahan tradisional (Fuller, 1997).

Probiotik merupakan sekumpulan mikroba yang memberikan efek positif bagi kesehatan yang secara alami terdapat pada saluran pencernaan manusia, atau merupakan bahan tambahan pangan yang berupa bakteri tidak merugikan dan tidak beracun serta keberadaannya tergantung kondisi manusia (Macfarlane dan Cummings, 1999). Mikroflora yang digolongkan sebagai probiotik adalah yang memproduksi asam laktat terutama misalnya *Lactobacilli* dan *Bifidobacteri* walaupun jenis yang lain juga ada (Pertemuan Ilmiah Jatim Garden Palace, 13/1/2000).

Pada tahun 1908, Elie Metchnikoff menyatakan bahwa konsumsi susu fermentasi dengan *Lactobacillus* akan memperpanjang hidup manusia (Metchnikoff, 1908). Organisme utama yang digunakan adalah spesies *Bifidobacterium* dan/atau *Lactobacillus*. Efek yang menguntungkan bagi kesehatan berhubungan dengan organisme ini termasuk perbaikan pencernaan laktosa, kontrol patogen usus, pengurangan serum kolesterol, efek penghambatan tumor, stimulasi sistim kekebalan tubuh, pencegahan konstipasi, pembentukan vitamin B, produksi bakteriosin dan inaktivasi beberapa komponen toksik (Potter, 1990; Sanders dkk. 1991). Probiotik juga mempengaruhi produksi beberapa nutrien usus seperti asam lemak rantai pendek dan asam amino, arginin, sistein, dan glutamin (Bengmark, 1996).

Enzim yang dimiliki bakteri probiotik seperti laktase mampu mengatasi intoleransi susu (laktosa), *bile salt hidrolase* mampu menurunkan kadar kolesterol, senyawa dinding sel bakteri probiotik (peptidoglikan) menyerap

senyawa karsinogenik (pemicu kanker), asam laktat yang dihasilkan merangsang gerak peristaltik usus sehingga mencegah sembelit dan meningkatkan penyerapan kalsium yang diperlukan untuk mencegah osteoporosis. Bakteri probiotik juga mampu mencegah diare yang disebabkan *Helicobacter pylori* (Waspodo, 2001).

Tidak semua bakteri asam laktat bersifat probiotik. Bakteri probiotik adalah yang dikonsumsi dalam keadaan hidup, bertahan hidup dalam saluran pencernaan setelah melalui pelbagai rintangan dan mampu menjaga keseimbangan mikroflora usus. Rintangan antara lain enzim di air liur, suasana asam lambung dan asam empedu. Bakteri probiotik yang telah melalui uji klinis antara lain *Lactobacillus casei subsp casei strain Shirota*, *Bifidobacteria* dan *Lactobacillus acidophilus* (Waspodo, 2001).

Probiotik yang efektif harus memenuhi beberapa kriteria :

1. Memberikan efek yang menguntungkan bagi tubuh
2. Tidak patogenik dan tidak toksik
3. Mengandung sejumlah besar sel hidup
4. Mampu bertahan dan melakukan kegiatan metabolisme dalam usus
5. Tetap hidup selama dalam penyimpanan dan waktu digunakan
6. Mempunyai sifat sensori yang baik
7. Diisolasi dari tubuh (Fuller, 1991).

Menurut Lee Yuan Kun (2002), kriteria pemilihan probiotik selain mampu bertahan terhadap suasana asam dan berfungsi meningkatkan kesehatan juga harus mampu tumbuh cepat dalam medium fermentasi yang sederhana dan murah, mampu bertahan dalam pengolahan tanpa kehilangan kemampuan, serta bisa digabung dengan pelbagai jenis makanan.

Agar suatu mikroorganisme menjadi probiotik yang efektif dalam memberi efek kesehatan maka disyaratkan : berasal dari manusia (*human origin*), stabil terhadap asam maupun cairan empedu, dapat menempel pada sel intestin manusia, dapat berkolonisasi di saluran pencernaan manusia, memproduksi senyawa antimikroba, dapat melawan bakteri patogenik dan kariogenik, telah teruji secara klinis, aman dikonsumsi serta tetap hidup selama pengolahan dan penyimpanan. Selain itu konsumsi harus dilakukan secara teratur sebanyak 100 –

150 ml produk (berisi  $10^8$  /ml bakteri hidup) setiap 2 atau 3 minggu sekali (Prangdimurti, 2001). Pada saat ini sudah banyak variasi produk pangan yang mengandung probiotik beredar di pasaran komersial (**Tabel 4**).

**Tabel 4.** Tipe-tipe Produk Probiotik dan Bakteri Probiotik yang Digunakan

| Probiotik  | Bakteri<br>(yang umumnya digunakan)   |
|--|---|
| Produk-produk susu fermentasi<br>(yoghurt, buttermilk, susu asidofilus, dan lain-lain) | <i>Lactobacillus bulgaricus</i><br><i>Streptococcus termophilus</i><br><i>Leuconostoc mesenteroides</i><br><i>Lactobacillus acidophilus</i><br><i>Lactobacillus casei</i><br><i>Bifidobacteria spp.</i><br><i>Lactobacillus reuteri</i> |
| Pangan yang disuplementasi<br>(susu pasteurisasi, minuman-minuman)                     | <i>Lactobacillus bulgaricus</i><br><i>Streptococcus termophilus</i><br><i>Lactobacillus acidophilus</i><br><i>Bifidobacteria spp.</i><br><i>Lactobacillus reuteri</i>   |
| Pharmaceuticals<br>(tablet, kapsul, granula)   | <i>Lactobacillus bulgaricus</i><br><i>Lactobacillus acidophilus</i><br><i>Bifidobacteria spp.</i>   |
| Produk-produk health food<br>(cairan, kapsul, bubuk)                                   | <i>Lactobacillus acidophilus</i><br><i>Bifidobacteria spp.</i><br><i>Lactobacillus spp.</i>   |

Sumber : Prangdimurti (2001).

Menurut Broste (1999), dari dasar probiotik muncul suatu konsep baru yang lebih menguntungkan yaitu prebiotik. Prebiotik adalah bahan tambahan makanan yang tidak dapat dicerna yang memiliki efek menguntungkan bagi tubuh dengan merangsang pertumbuhan dan atau aktifitas satu atau beberapa jenis bakteri dalam usus secara selektif, yang dapat memperbaiki kesehatan tubuh.

Syarat bahan tambahan makanan sebagai prebiotik :

1. Tidak dapat dihidrolisa maupun diabsorpsi pada bagian atas saluran pencernaan.
2. Sebagai substrat yang selektif untuk satu atau beberapa jenis bakteri komensal yang bermanfaat dalam usus, jadi merangsang untuk tumbuh dan atau memiliki aktifitas metabolik.

3. Mudah untuk merubah komposisi koloni mikroflora tubuh menjadi menguntungkan bagi kesehatan, contohnya dengan menambahkan spesies sakarolitik dan mengurangi mikroorganisme pembusuk seperti *Clostridia asakarolitik* (Gibson dan Roberfroid, 1995).

Sumber prebiotik dapat diperoleh dari ASI dalam bentuk *human milk oligosaccharide* yang hanya kurang dari 5% dicerna dalam usus (Gnoth, 2000) dan secara alami karbohidrat yang mengandung fruktooligosakarida terdapat dalam berbagai sayur dan buah misalnya onion, asparagus, chicory (mengandung inulin), pisang dan artichoke (Gibson, 1998). Jenis prebiotik meliputi FOS (frukto-oligosakarida), inulin, GOS (galakto-oligosakarida), laktulosa, laktitol (Colin, 1999; McFarlane, 1999). Bahan-bahan tersebut paling sering dipakai sebagai prebiotik, disamping itu terdapat pula bahan lain yang memenuhi kriteria prebiotik misalnya, xilosa, soya dan manosa (Gibson, 1998).

Untuk menentukan substrat yang cocok dan prebiotik yang akan meningkatkan jumlah *Bifidobacteria* dan *Lactobacili* yang hidup di saluran pencernaan manusia sangat sulit, beberapa hal berikut harus dipertimbangkan :

1. Senyawa tersebut tidak dapat diserap tubuh atau dapat diserap secara lambat
2. Sakarida non-pereduksi cenderung sulit dimetabolisme bakteri asam laktat
3. *Bifidobacteria* biasanya menggunakan di- atau trisakarida yang mengandung galaktosa tanpa adaptasi terlebih dahulu
4. Fruktooligosakarida, laktulosa dan laktitol umumnya digunakan oleh *Bifidobacteria* dan Bakteri Asam Laktat untuk meningkatkan pertumbuhannya
5. Gula yang terdiri atas galaktosa, glukosa dan/atau fruktosa dapat digunakan oleh *Bifidobacteria*
6. Turunan inulin digunakan oleh *Bifidobacteria*
7. Polioliol diperkirakan memiliki efek obat
8. Penurunan pH fekal umumnya dibutuhkan oleh substrat dan meningkatkan keseimbangan mikroekologi yang menyehatkan
9. Kombinasi substrat dapat digunakan untuk meningkatkan *Lactobacili* dan *Bifidobacteria*
10. Pengaruh substrat prebiotik terhadap aktivitas patogen

11. Komponen prebiotik dapat digunakan untuk memodifikasi koloni mikroflora manusia secara selektif, yang dapat mempengaruhi *Lactobacili* dan *Bifidobacteria* dan fungsi metabolismenya (Salminen, 1998).

Untuk memperoleh oligosakarida yang akan dipakai sebagai prebiotik dapat dilakukan melalui :

1. Ekstraksi langsung polisakarida alami dari tumbuhan
2. Hidrolisa polisakarida alami
3. Sintesa enzimatik dengan menggunakan hidrolase dan atau glikol transferase, kedua enzim tersebut mengkatalisa reaksi transglukosilasi sehingga terjadi oligosakarida sintetik dari mono dan disakarida (Grizard, 1999).

Beberapa prebiotik saat ini sedang disintesa secara enzimatik, seperti galaktooligosakarida, fruktooligosakarida, isomaltooligosakarida, gentioligosakarida, xilooligosakarida, laktulosa dan laktosukrosa (Chicoke, 2000). Saat ini di Eropa, inulin tipe fruktan yang dicirikan mengandung ikatan fruktosil unit pada beta-2,1 sukrosa juga dipakai sebagai bahan prebiotik (Grizard, 1999). Industri di Jepang telah tumbuh di sekitar kemampuan untuk memproduksi secara lebih luas dengan metode bioteknologi serangkaian prebiotik oligosakarida (**Tabel 5**).

**Tabel 5** . Produksi Prebiotik di Jepang Tahun 1995

| Oligosakarida          | Produksi (ton) |
|------------------------|----------------|
| Laktulosa              | 20 000         |
| Galakto-oligosakarida  | 15 000         |
| Frukto-oligosakarida   | 12 000         |
| Isomalto-oligosakarida | 11 000         |
| Palatinose             | 5 000          |
| Soybean oligosakarida  | 2 000          |
| Laktosukrosa           | 1 600          |
| Gentio-oligosakarida   | 400            |
| Xylo-oligosakarida     | 300            |

Sumber: Rastall (2000).

Tidak semua oligosakarida (*Non-Digestible Oligosaccharides*) bersifat prebiotik dai diantara NDO yang ada inulin, fruktooligosakarida (FOS) dan galaktooligosakarida (GalOS) merupakan prebiotik yang kuat (Macfarlane dan Cummings, 1999).

Manfaat penggunaan prebiotik tidak terlepas dari peranan prebiotik untuk meregulasi dan memodulasi populasi bakteri probiotik. Prebiotik dalam usus terutama usus besar yang difermentasi oleh bakteri probiotik yang menghasilkan asam lemak rantai pendek dalam bentuk asam asetat, asam propionat dan asam butirat, L-laktat, CO<sub>2</sub> dan hidrogen (Grizard, 1999). Asam lemak rantai pendek tersebut oleh tubuh dapat dipakai sebagai sumber energi, efek stimulasi efektif terhadap pertumbuhan bakteri probiotik terutama *Bifidobacteria* dan *Lactobacillus* akan memberikan efek yang menguntungkan bagi kesehatan, antara lain :

1. Memperbaiki keluhan malabsorpsi laktosa
2. Meningkatkan ketahanan alami terhadap infeksi di usus oleh kuman patogen, *Clostridium perfringen*, *Eschericia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* (Gizard, 1999)
3. Supresi kanker
4. Memperbaiki metabolisme lipid dan mengurangi kadar kolesterol darah
5. Memperbaiki pencernaan (Fuller, 1991)
6. Stimulasi kekebalan (imunitas) gastrointestinal (McCracken, 1999; McFarlane, 1999).

Prebiotik dapat diberikan dalam bentuk bahan asli atau dalam makanan yang telah diproses yang dapat memberikan manfaat bagi kesehatan (Gibson, 1998).

Setelah pemunculan konsep probiotik dan prebiotik, kini dari keduanya dapat dikombinasikan dengan istilah sinbiotik (Broste, 1999). Penambahan mikroorganisme hidup (probiotik) dan substrat (prebiotik) untuk pertumbuhan bakteri misalnya frukto-oligosakarida (FOS) dengan *Bifidobacterium* atau laktitol dengan *Lactobacillus*. Keuntungan karena substrat yang spesifik telah tersedia untuk fermentasi sehingga tubuh mendapat manfaat yang lebih sempurna dari kombinasi ini (Collin, 1999).

Broste (1999) menyatakan bahwa peluang pengembangan prebiotik lebih menjanjikan daripada probiotik. Hal ini ditandai dengan diluncurkannya produk berbasis prebiotik bermerk Actilight oleh perusahaan makanan Eropa yaitu industri Meiji Behn, dimana dalam produknya tergantung frukto-oligosakarida.

Selain itu perusahaan Jerman juga mengembangkan produk sinbiotik yang meliputi dua strain probiotik dan prebiotik Rafilose. Sedangkan Vivis di Prancis mengeluarkan produk berlabel Ligne Bifide yang merupakan biskuit, sup dan makanan siap saji yang mengandung Actilight. Namun di lain pihak, industri makanan terkemuka Nestle tetap mengedepankan probiotik sebagai produk yang mampu meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan dikategorikan telah berhasil di pasar Eropa. Keberhasilan tersebut diketahui dari produk yoghurt LCI yang diperkaya, berawal dari titik tersebut dikembangkan produk LAI yang mengandung dua strain *Lactobacillus*. Sehingga kemudian pihak Nestle merekomendasikan bahwa produk tersebut dapat dikonsumsi sehari-hari sebagai bagian dari diet yang sehat.

## 2.5 Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri Gram – positif yang dikelompokkan berdasarkan kesamaan karakteristik morfologi, metabolisme dan fisiologi. Deskripsi secara umum bakteri yang termasuk kelompok ini adalah Gram – positif, tidak berspora, berbentuk bulat atau batang, anaerob tapi aerotolerant, toleran terhadap asam, memetabolisme karbohidrat secara fermentatif, yang memproduksi asam laktat sebagai produk akhir yang utama selama fermentasi karbohidrat. *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* dan *Streptococcus* termasuk ke dalam kelompok ini. Dalam taksonomi yang diperbarui, bakteri asam laktat terdiri dari : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Sterptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* dan *Weisella*. Beberapa penulis memasukkan *Bifidobacterioum spp* ke dalam bakteri asam laktat karena kesamaan ekologi dan fungsi (Axelsson, 1988).

Ciri khas bakteri asam laktat adalah kebutuhannya akan zat-zat suplemen. Tidak ada satupun anggotanya dapat hidup pada media mineral murni dengan glukosa dan amonium. Sebagian besar membutuhkan sederet vitamin (laktoflavin, tiamina, asam pantotenat, asam nikotinat, asam folat, biotin) dan asam-asam

amino, senyawa purin dan pirimidin. Dengan demikian bakteri ini dibiakkan terutama pada media kompleks yang mengandung ekstrak ragi, sari tomat, air dadih bahkan darah dalam jumlah relatif besar (Schlegel, 1994).

Bakteri asam laktat memiliki dua ekologi sebagai habitatnya : di selaput membran manusia dan binatang dan produk susu. Beberapa spesies bakteri asam laktat digunakan secara komersial untuk produk susu fermentasi dan produk daging dan makanan lainnya. Yang termasuk produk ini yoghurt, buttermilk, salami, salami tipe sosis dan pikle (Salminen, 1998). Karakteristik penting bakteri ini digunakan dalam produk pangan karena kemampuannya memfermentasi gula menjadi asam laktat (Frazier dan Westhoff, 1988). Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang tahan asam (asidofil), dapat tumbuh baik pada pH yang rendah yaitu 3,0 –6,0 (Buckle, dkk, 1987).

Karakter penting yang digunakan dalam klasifikasi kelompok bakteri asam laktat adalah cara fermentasi glukosa di bawah kondisi normal yaitu konsentrasi glukosa yang tidak dibatasi dan faktor-faktor pertumbuhan ( asam amino, vitamin dan prekursor asam nukleat) dan persediaan oksigen yang terbatas. Pada kondisi ini bakteri asam laktat dapat dibagi ke dalam dua kelompok : homofermentatif, mengkonversi hampir seluruh glukosa menjadi asam laktat dan heterofermentatif, memfermentasi glukosa menjadi asam laktat, etanol/asam asetat dan CO<sub>2</sub> (Axelsson, 1998).

Bakteri asam laktat digunakan sebagai probiotik untuk mengatasi gangguan usus seperti intoleransi laktosa, radang lambung akut dan patogen lainnya, efek merugikan dari radioterapi, konstipasi, radang usus besar dan alergi makanan (Axelsson, 1998). Beberapa spesies bakteri probiotik, di antaranya *Bifidobacteria ssp.*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus termophilus*, *Streptococcus lactis* dan *Saccharomyces boulardii*. Hanya saja komposisi bakteri probiotik ini berbeda menurut usia. *Bifidobacteria* misalnya lebih dominan pada anak-anak, sedang *Lactobacillus* lebih dominan pada orang dewasa.

Metabolisme pokok dari bakteri asam laktat adalah kemampuannya untuk memfermentasi karbohidrat. Jalur fermentasi gula bakteri asam laktat dapat

dibedakan menjadi dua. Jalur glikolisis (Embden – Meyerhoff Pathway) menghasilkan asam laktat (*homolactic fermentation/homofermentatif*). Jalur 6-fosfoglukonat/fosfoketolase menghasilkan etanol, asetat, CO<sub>2</sub> dan asam laktat (*heterolactic fermentation/heterofermentatif*) seperti terlihat pada **Gambar 3**.

Monosakarida selain glukosa, seperti manosa, galaktosa dan fruktosa yang difermentasi oleh bakteri asam laktat masuk jalur metabolisme pada glukosa-6-fosfat atau fruktosa-6-fosfat setelah isomerisasi dan/atau fosforilasi. Galaktosa-6-fosfat dapat menggunakan jalur tagatose-6-fosfat atau jalur Leloir (**Gambar 4**). Sedang disakarida akan dihidrolisa terlebih dahulu menjadi monosakarida, baru kemudian memasuki jalur metabolisme (Axelsson, 1998).

### 2. 5.1 Genus *Lactobacillus*

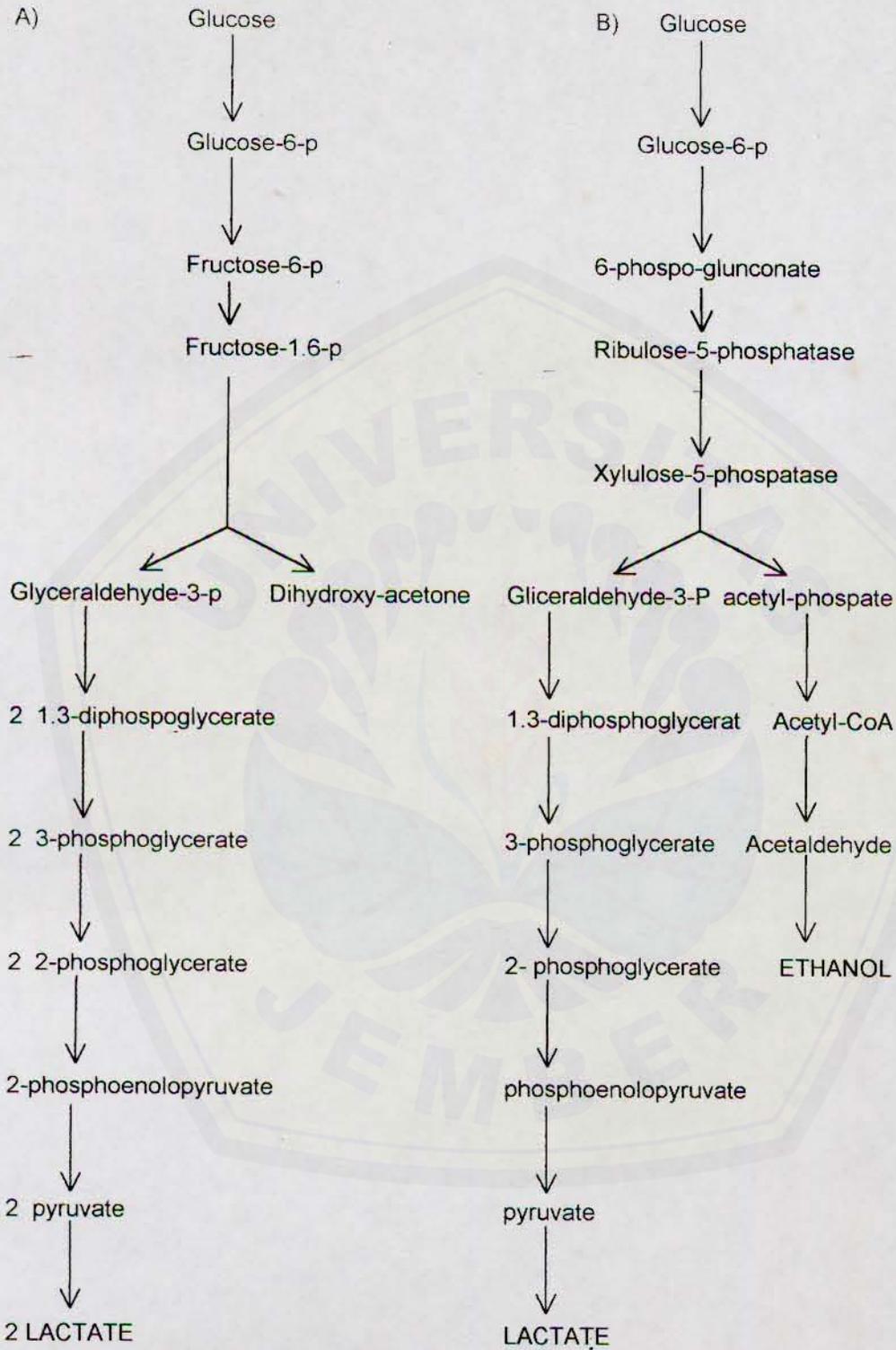
Beberapa genus anggota bakteri asam laktat banyak digunakan dalam produk pangan, termasuk sebagai probiotik karena kemampuannya untuk memfermentasi gula menjadi asam laktat. Spesies-spesies dari kelompok *Lactobacillus* paling banyak digunakan.

Menurut Frazier dan Westhoff (1988), genus *Lactobacillus* berupa batang, biasanya panjang atau ramping, microaerophilic (beberapa anaerob), katalase negatif dan gram positif dan memfermentasi gula menjadi asam laktat sebagai hasil utamanya. Berdasarkan hasil metabolismenya bakteri ini dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu :

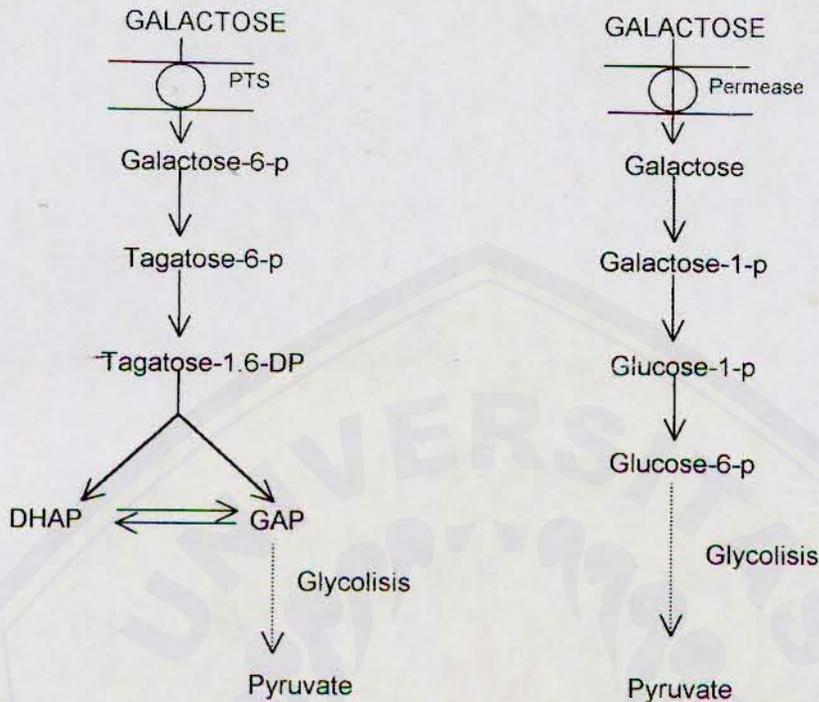
a. homofermentatif

- homofermentatif dengan temperatur optimal adalah *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus termophilus* dan *Lactobacillus delbrueckii*.
- homofermentatif yang hidup baik pada temperatur tinggi adalah *Lactobacillus fermentum*.
- homofermentatif yang memiliki temperatur optimal rendah adalah *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus leichmanii*.

Bakteri homofermentatif ini dapat tumbuh pada suhu 37°C atau lebih (Fardiaz, 1992).



**Gambar 3.** Jalur Fermentasi glukosa (A) Homofermentatif (Glikolisis, Jalur Embden Meyerhoff); (B) Heterofermentatif (6-fosfogluconat /fosfoketolase)



**Gambar 4.** Metabolisme Galaktosa pada Bakteri Asam Laktat (A) Jalur tagatose-6-fosfat (B) Jalur Leloir

b. Heterofermentatif

yang termasuk heterofermentatif adalah *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pastorianus*, *Lactobacillus hilgardii* dan *Lactobacillus trichodes*.

Dasar fisiologis pengelompokan adalah ada atau tidak adanya enzim kunci metabolisme gula homofermentatif dan heterofermentatif, fruktosa-1,6-difosfat aldolase dan fosfoketolase (Kandler, 1983, 1984; Kandler dan Weiss, 1986) seperti tertera pada **Tabel 6**.

Beberapa spesies *Lactobacillus* yang memiliki manfaat menguntungkan bagi kesehatan dan banyak digunakan dalam produk pangan :

- a. *Lactobacillus acidophilus*, hidup dalam usus kecil dan memproduksi enzim yang memecah gula susu menjadi asam laktat. Bakteri ini dapat mati karena makanan rendah gizi, stress dan antibiotik. Karena dapat mencegah penyakit akibat bakteri, *L. acidophilus* digunakan dalam terapi, termasuk mengganti bakteri usus yang rusak oleh spektrum antibiotik, membantu pencernaan,

meneakan bakteri penyebab penyakit, mengurangi infeksi kandung kemih, memperbaiki penyerapan laktosa pada penderita intoleransi laktosa, membantu produksi vitamin B dan vitamin K.

**Tabel 6.** Susunan Genus *Lactobacillus*

| Karakter                      | Kelompok I   | Kelompok II  | Kelompok III   |
|-------------------------------|--|--|--|
|                               | Homofermentatif Obligat  | Heterofermentatif Fakultatif   | Heterofermentatif Obligat  |
| Fermentasi pentosa            | -  | +  | +  |
| CO <sub>2</sub> dari glukosa  | -  | + <sup>a</sup>   | + <sup>a</sup>   |
| CO <sub>2</sub> dari glukonat | +  | +  | -  |
| FDP aldolase                  | -  | + <sup>b</sup>   | +  |
| Fosfoketolase                 | <i>L. acidophilus</i><br><i>L. delbrueckii</i><br><i>L. helveticus</i><br><i>L. salivarius</i> | <i>L. casei</i><br><i>L. curvatus</i><br><i>L. plantarum</i><br><i>L. sake</i> | <i>L. brevis</i><br><i>L. buchneri</i><br><i>L. fermentum</i><br><i>L. reuteri</i> |

<sup>a</sup> saat difermentasi

<sup>b</sup> induksi oleh pentosa

Sumber : Sharpe (1981) dan Kandler dan Weiss (1986) dalam Salminen (1998)

- b. *L. bulgaricus* (*L. delbrueckii* subspesies *bulgaricus*), biasanya digunakan dalam pembuatan yoghurt dan susu fermentasi. Bakteri ini memproduksi asam laktat dalam perut.
- c. *L. plantarum*, digunakan untuk perawatan Sindrom Iritasi Usus.
- d. *L. casei* strain *shirota*, digunakan secara komersial oleh perusahaan Jepang dalam bentuk susu fermentasi (Yakult), dapat memperbaiki saluran pencernaan.
- e. *L. rhamnosus*, memiliki aktivitas antimikrobal untuk melawan *Candida* dan patogen lainnya, dapat memperbaiki saluran pencernaan.

### 2.5.2 Genus *Streptococcus*

Genus *Streptococcus*, berbentuk kokus yang dapat berupa rantai pendek atau rantai panjang tergantung dari jenis spesies dan kondisi pertumbuhannya dan semuanya merupakan homofermentatif (Frazier dan Westhoff, 1988). Menurut Salminen (1998), genus ini dibagi menjadi tiga kelompok lagi yaitu :

- a. Kelompok piogenik, terdiri dari bakteri-bakteri penyebab penyakit, contohnya *S. pyogenes* dan *S. agalactiae*.
- b. Kelompok oral, contohnya *S. mutans*.
- c. Kelompok *Streptococci* lainnya, contohnya *S. termophilus* yang biasanya digunakan dalam pembuatan yoghurt (bersama dengan *L. delbrückii* subsp. *bulgaricus*).

*Streptococcus termophilus* merupakan spesies *Streptococcus* yang paling banyak digunakan. Bakteri ini sangat penting dalam pembuatan keju yang dimasak pada suhu tinggi dan biasanya terdapat pada susu fermentasi seperti yoghurt. *Streptococcus termophilus* merupakan bakteri termoduric (tahan terhadap suhu yang tinggi seperti pasteurisasi). Spesies ini dapat tumbuh pada suhu 45°C tapi tidak pada suhu 10°C (Frazier dan Westhoff, 1988).

## 2.6 Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat

Istilah pertumbuhan umum digunakan untuk bakteri dan mikroorganisme lain dan biasanya mengacu pada perubahan di dalam hasil panen (pertambahan total massa sel). Inokulum hampir selalu mengandung ribuan organisme; pertumbuhan menyatakan pertambahan jumlah dan atau massa yang melebihi yang ada di dalam inokulum asalnya (Pelczar, 1986).

Cara khas reproduksi bakteri ialah pembelahan biner melintang ; satu sel membelah diri, menghasilkan dua sel. Jadi bila kita mulai dengan satu bakteri tunggal, maka populasi bertambah secara geometrik.

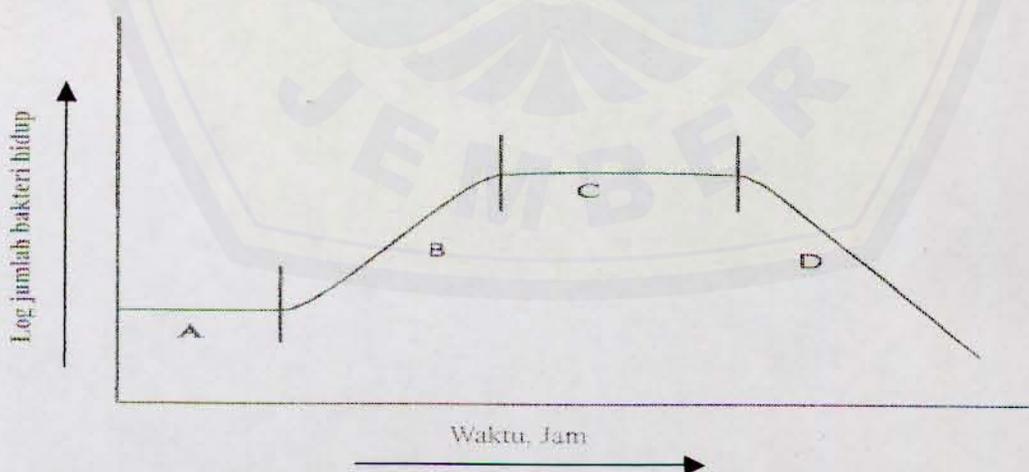
Selang waktu yang dibutuhkan bagi sel untuk membelah diri atau untuk populasi menjadi dua kali lipat dikenal sebagai waktu generasi. Tidak semua spesies bakteri mempunyai waktu generasi yang sama. Waktu generasi untuk suatu spesies bakteri tertentu juga tidak sama pada segala kondisi. Waktu generasi amat tergantung pada cukup tidaknya nutrien di dalam medium serta pada sesuai tidaknya kondisi fisik. Waktu generasi beberapa bakteri dapat dilihat pada **Tabel 7**.

**Tabel 7.** Waktu Generasi Beberapa Spesies bakteri

| Bakteri                           | Medium   | Suhu (°C) | Waktu generasi (menit) |
|-----------------------------------|----------|-----------|------------------------|
| <i>Bacillus mycooides</i>         | Broth    | 37        | 28                     |
| <i>B. thermophilus</i>            | Broth    | 55        | 18,3                   |
| <i>Escherichia coli</i>           | Broth    | 37        | 17                     |
|                                   | susu     | 37        | 12,5                   |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i>  | Susu     | 37        | 66-87                  |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | Sintetik | 37        | 792-932                |
| <i>Staphylococcus aureus</i>      | Broth    | 37        | 27-30                  |
| <i>Streptococcus lactis</i>       | Broth    | 37        | 48                     |
|                                   | Susu     | 37        | 26                     |

Sumber: Fardiaz (1992)

Penambahan dan pertumbuhan jumlah sel mikroba pada umumnya dapat digambarkan dalam bentuk kurva pertumbuhan (**Gambar 5**). Kurva tersebut merupakan penjabaran dari penambahan jumlah sel dalam waktu tertentu (Suriawiria, 1985).



**Gambar 5.** Kurva Pertumbuhan Bakteri : (A) Fase Lambat (*lag phase*), (B) Fase Logaritmik/Eksponensial (*log phase*), (C) Fase Tetap/Statis (*stationary phase*) dan (D) Fase Penurunan/Kematian (*decline death phase*)

### 1. Fase Lambat (*lag phase*)

Pada awal inokulasi sel ke dalam media nutrisi segar biasanya pada suatu periode dimana tidak terjadi pembelahan sel. Fase lambat ini dapat terjadi antara beberapa menit sampai beberapa jam tergantung pada spesies, umur dari sel inokulum dan lingkungannya. Waktu pada fase lambat dibutuhkan untuk kegiatan metabolisme dalam rangka persiapan dan penyesuaian diri dengan kondisi pertumbuhan dalam lingkungan yang baru.

### 2. Fase Log (*log phase*)

Setelah beradaptasi terhadap kondisi baru, sel-sel ini akan tumbuh dan membelah diri secara eksponensial sampai jumlah maksimum yang dapat dibantu oleh kondisi lingkungan yang dicapai.

### 3. Fase Tetap (*stationary phase*)

Pertumbuhan populasi mikroorganisme biasanya dibatasi oleh habisnya bahan gizi yang tersedia atau penimbunan zat racun sebagai hasil akhir metabolisme. Akibatnya kecepatan pertumbuhan menurun dan akhirnya pertumbuhan terhenti. Komposisi sel-sel pada fase ini berbeda dibandingkan dengan sel-sel saat fase eksponensial dan umumnya lebih tahan terhadap perubahan-perubahan kondisi fisik seperti panas, dingin dan radiasi maupun bahan-bahan kimia.

### 4. Fase Menurun (*decline/death phase*)

Sel-sel yang berada dalam fase tetap akhirnya akan mati bila tidak dipindahkan ke media segar lainnya. Sebagaimana pertumbuhan, kematian sel juga secara eksponensial dan karenanya dalam bentuk logaritmis, fase menurun atau kematian ini merupakan penurunan secara garis lurus yang digambarkan oleh jumlah sel-sel yang hidup terhadap waktu. Kecepatan kematian berbeda-beda tergantung dari spesies mikroorganisme dan kondisi lingkungannya (Buckle, 1987).

## 2.7 Hipotesa

Berdasarkan uraian di atas dapat diambil hipotesa bahwa hetero-galaktooligosakarida (hetero-GalOS) berpengaruh terhadap pertumbuhan *Lactobacillus* dan *Streptococcus*.



### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Bahan dan Alat

##### 3.1.1 Bahan :

Bahan yang digunakan antara lain : MRS (Malt Rigorose Sharp) – Broth (Difco), aquades, buffer pH 4,0 dan 7,0, Laktosa (Sigma L-365), Galaktosa (E-Merck 4061), Mannosa (Sigma M-4625), Maltosa (Sigma M-5885), Sukrosa (Sigma S-9378), Maltotriosa (Fluka 63430), Trehalosa (Sigma T-5251), enzim  $\beta$ -galaktosidase E.C. 3.2.1.23 (Sigma G-5635; 1,4 mg solid; 769 units/mg solid; 864 units/mg protein) dari *Eshericia coli* dan biakan agar tegak *Lactobacillus bulgaricus* FNCC 0053, *Lactobacillus casei* FNCC 0090, *Lactobacillus plantarum* FNCC 123, *Lactobacillus rhmanosus* FNCC 52, *Lactobacillus lactis* 3024 dan *Streptococcus termophilus* FNCC 040 .

##### 3.1.2 Alat :

Alat-alat yang digunakan antara lain : tabung eppendorf, pipet volume, pipet mikro, erlenmeyer, beaker glass, tabung reaksi, tabung kuvet, wadah film, gelas ukur, timbangan analitik, otoklaf, inkubator, pH meter, mikroskop, spektrofotometer dan haemacytometer.

#### 3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Februari sampai dengan bulan Juni 2003 di Laboratorium Pengendalian Mutu bagian Mikrobiologi dan Bioteknologi Pangan, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.

#### 3.3 Metode Penelitian

##### 3.3.1 Rancangan Percobaan

Pada penelitian ini digunakan kombinasi gula donor galaktosa dan gula aseptor glukosa (galaktosil-glukosa), mannanosa (galaktosil-mannosa), maltosa (galaktosil-maltosa), sukrosa (galaktosil-sukrosa) dan trehalosa (galaktosil-

trehalosa) pada *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* dan *Streptococcus thermophilus*. Media yang sudah mengandung hetero-GalOS dan inokulum selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengambilan sampel dilakukan pada jam ke - 3 dan 24.

Hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel dan kurva kemudian dianalisa secara deskriptif.

### **3.4 Pelaksanaan Penelitian**

#### **3.4.1 Pemeliharaan Bakteri**

Biakan murni dari bakteri yang digunakan dalam penelitian ini tersedia dalam bentuk kering (*lyophilized culture*) di dalam tabung kaca steril. Pada tabung tersebut harus dibuat lubang kecil atau dipatahkan sehingga memudahkan 1 ml MRS-Broth steril masuk ke dalamnya. Sebanyak 0,5 ml kultur murni tersebut dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml MRS-Broth untuk diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Selanjutnya sebanyak satu ose kultur murni dari MRS-Broth ditanamkan pada MRS-agar tegak dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam untuk dijadikan kultur stok (*Stock culture*).

#### **3.4.2 Persiapan Inokulum**

Inokulum disiapkan dengan cara mengambil kultur bakteri pada agar tegak dengan menggunakan jarum ose, dan selanjutnya dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml MRS-Broth.

#### **3.4.3 Fermentasi Bakteri Asam Laktat**

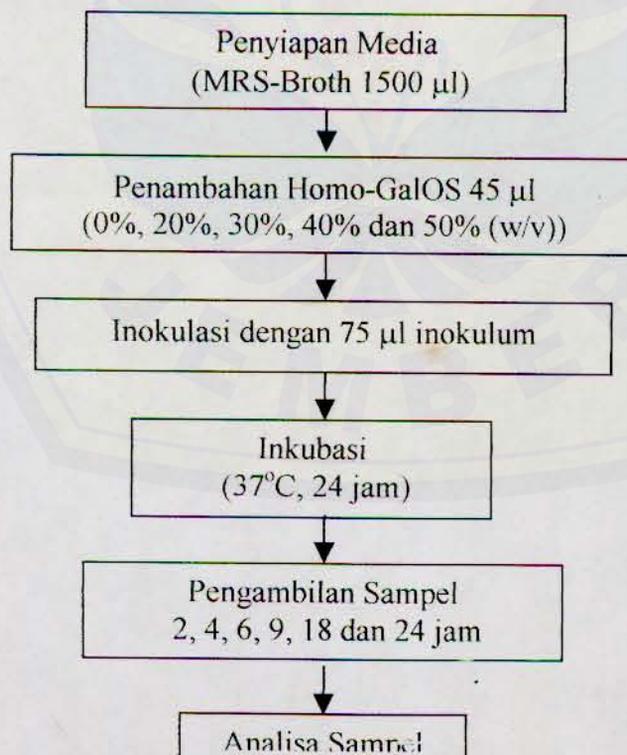
Penelitian dilakukan dalam dua tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan ditujukan untuk menentukan pengaruh penambahan seyawa galaktooligosakarida dengan substrat galaktosa (homo-GalOS) terhadap pola pertumbuhan bakteri asam laktat. Diharapkan dalam penelitian utama akan didapatkan pola pertumbuhan yang sama dengan hasil penelitian pendahuluan.

Pada penelitian pendahuluan, pengujian pertumbuhan bakteri asam laktat menggunakan homo-galaktooligosakarida (homo-GalOS), konsentrasi homo-

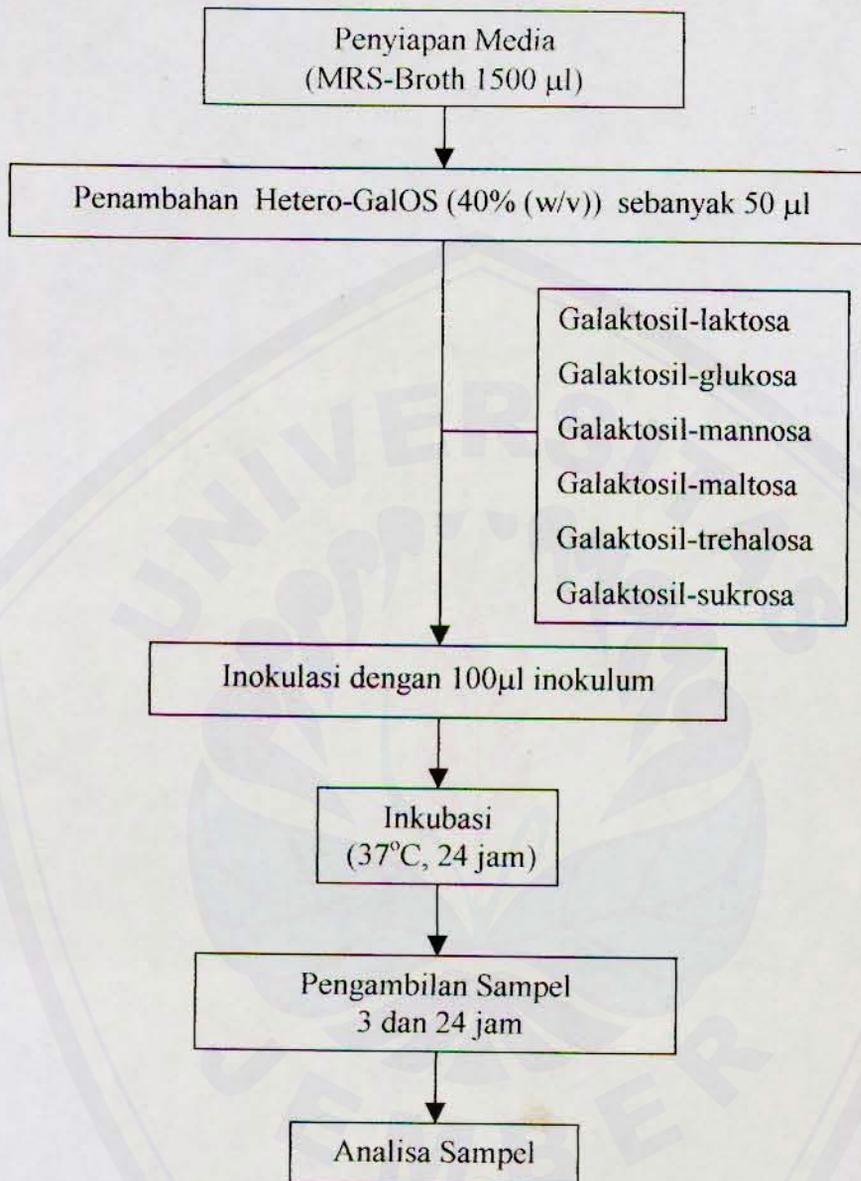
GalOS standar pembuatan yang digunakan adalah 0%, 20%, 30%, 40% dan 50% (w/v) dan bakteri asam laktat yang digunakan adalah *Lactobacillus bulgaricus*. Media yang sudah mengandung homo-GalOS dan diinokulasi dengan *Lactobacillus bulgaricus* selanjutnya diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Pengambilan sampel dilakukan pada jam ke – 2, 4, 6, 9, 18 dan 24.

Pada penelitian utama, pengujian pertumbuhan bakteri asam laktat dengan menggunakan hetero-galaktooligosakarida (hetero-GalOS) konsentrasi 40% (w/v), kombinasi gula donor galaktosa dan gula aseptor glukosa (galaktosil-glukosa), mannosa (galaktosil-mannosa), maltosa (galaktosil-maltosa), sukrosa (galaktosil-sukrosa) dan trehalosa (galaktosil-trehalosa) pada *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* dan *Streptococcus termophilus*. Media yang sudah mengandung hetero-GalOS dan inokulum selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengambilan sampel dilakukan pada jam ke – 3 dan 24.

#### A. Penelitian Pendahuluan



**Gambar 6.** Diagram Alir Pengujian Homo-Galaktooligosakarida (Homo-GalOS) Pada Pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus*

**B. Penelitian Utama**

**Gambar 7.** Diagram Alir Pengujian Hetero-Galaktooligosakarida (Hetero-GalOS) Pada Pertumbuhan *Lactobacillus sp.* dan *Streptococcus sp.*

**3.5 Pengamatan**

Pengamatan yang dilakukan terhadap sampel meliputi : pertumbuhan mikroba, perubahan pH dan total mikroba.

### 3.6 Prosedur Analisa

#### 1. Pertumbuhan Mikroba

Analisa pertumbuhan mikroba dilakukan dengan mengamati pertambahan konsentrasi biomassa melalui kekeruhan sampel. Untuk menentukan tingkat pertumbuhan mikroba dilakukan dengan melihat besar absorbansinya pada panjang gelombang 620 nm (Kaplan dan Hutkins, 2000).

#### 2. pH

Analisa pH dilakukan dengan menggunakan alat pH meter, adapun langkah-langkah yang dilakukan sebagai berikut :

- a. Kalibrasi pH meter dengan menggunakan buffer pH 7
- b. Menuangkan sampel dari dalam tabung eppendorff ke dalam tabung film
- c. Mengukur pH sampel

#### 3. Total mikroba

Penghitungan total mikroba dilakukan dengan menggunakan metode kerapatan optik dengan alat bantu spektrofotometer. Dasar tekniknya adalah banyaknya cahaya yang diabsorpsi (OD = Optical Density) sebanding dengan kerapatan (banyaknya) sel bakteri dalam suspensi biakan.

Nilai OD tidak langsung menunjukkan jumlah mikroba, tapi menunjukkan jumlah cahaya yang disebarkan oleh populasi sel tersebut. Untuk menentukan jumlah sel mikroba, maka nilai OD harus disetarakan terlebih dahulu dengan jumlah mikroba (CFU – Colony Forming Units / ml) dengan menggunakan Haemacytometer. Untuk itu perlu dilakukan berbagai pengenceran sampel yang digunakan dalam OD. Setelah diperoleh nilai OD dari berbagai pengenceran tadi, selanjutnya dibuat suatu kurva kalibrasi (standar) dengan sumbu X sebagai jumlah sel hidup dan sumbu Y sebagai nilai OD – nya. Dari kurva standar tersebut dapat digunakan untuk menentukan jumlah sel hidup suatu suspensi biakan (Anonim, 2001).

#### 4. Menghitung Angka Pertumbuhan Spesifik ( $\mu$ )

Angka pertumbuhan spesifik dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{\Delta t}$$

dimana :

$x_1$  = total mikroba pada jam ke - 0

$x_2$  = total mikroba pada jam ke - 2

$\Delta t$  = selisih waktu ( $t_2 - t_1$ )

### 5. Menghitung Waktu Generasi ( $t_d$ )

Waktu generasi dihitung dengan menggunakan rumus :

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

dimana :

$t_d$  = waktu generasi

$\ln 2 = \ln (2X_1) - \ln (X_1) = 0,693$

$\mu$  = kecepatan pertumbuhan spesifik



## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Penelitian Pendahuluan (Pengujian Homo-Galaktooligosakarida)

Dalam penelitian ini dilakukan pengujian senyawa galakto-oligosakarida dengan substrat galaktosa-galaktosa (homo-GalOS) pada bakteri asam laktat. Pengujian dilakukan dengan menambahkan homo-GalOS dengan konsentrasi 20%, 30%, 40% dan 50% (w/v) ke dalam media MRS cair (MRS Broth). Sebagai pembanding juga dilakukan pengujian pertumbuhan bakteri asam laktat pada media MRS Broth murni (tanpa penambahan homo-GalOS). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan senyawa galakto-oligosakarida tanpa kombinasi substrat terhadap pola pertumbuhan bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat yang digunakan dalam penelitian pendahuluan ini adalah *Lactobacillus bulgaricus*. *Lactobacillus bulgaricus* merupakan bakteri asam laktat yang banyak digunakan dalam produk susu dan hasil olahannya termasuk produk probiotik seperti yoghurt. Hasil penelitian pendahuluan ini dapat dilihat pada **Tabel 8**.

Hasil pada **Tabel 8** tersebut mengindikasikan bahwa homo-GalOS yang ditambahkan umumnya dapat difermentasi oleh *Lactobacillus bulgaricus*, baik konsentrasi 20%, 30%, 40% maupun 50%. Hal ini ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus* selama waktu inkubasi 24 jam. Pada media yang tidak ditambahkan homo-GalOS juga menunjukkan adanya pertumbuhan selama waktu inkubasi. Selama waktu inkubasi tersebut *Lactobacillus bulgaricus* meningkat jumlah biomasanya sehingga terjadi peningkatan total mikroba dan peningkatan produk metabolit berupa asam laktat. Peningkatan total mikroba ini terlihat dari meningkatnya nilai absorbansi sampel pada panjang gelombang tertentu. Sedang peningkatan produksi asam laktat terbukti dengan terjadinya penurunan pH media.

Kondisi pH media selama inkubasi cenderung menunjukkan penurunan, baik pada media MRS Broth maupun pada media campuran MRS Broth dengan senyawa homo-GalOS (**Gambar 8**). Namun penurunan pH pada media yang ditambahkan homo-GalOS lebih signifikan.

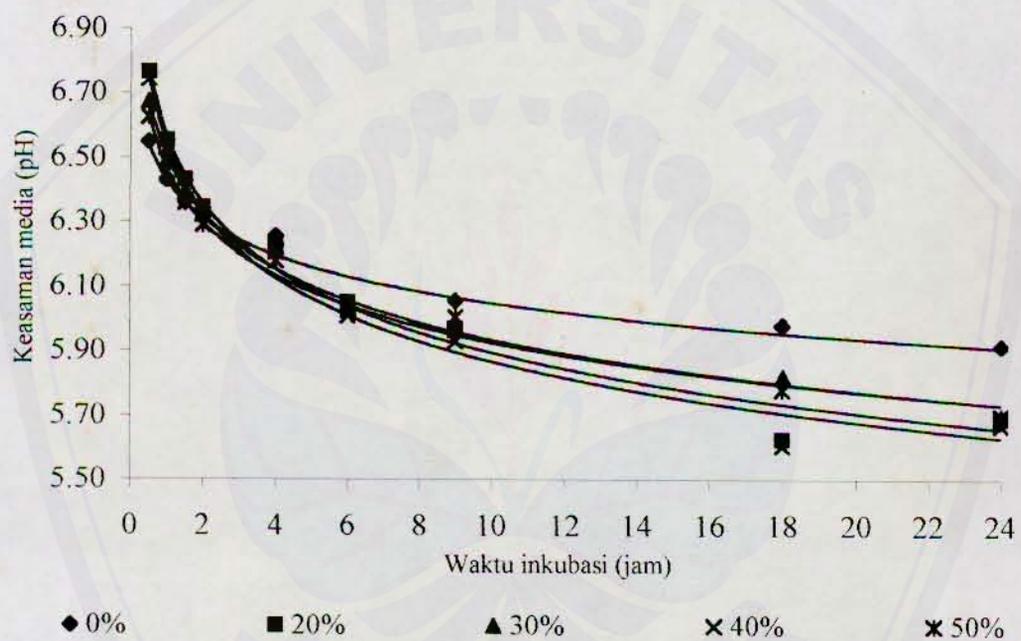
Tabel 8 . Data Pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus* pada Media Homo-GalOS

| Konsentrasi Homo-GalOS | Jam ke - | Pertumbuhan | pH   | Total Mikroba (CFU/ml) |
|------------------------|----------|-------------|------|------------------------|
| 0%                     | 2        | +++         | 6,31 | $1,62 \times 10^8$     |
|                        | 4        | ++++        | 6,26 | $3,98 \times 10^8$     |
|                        | 6        | ++++        | 6,05 | $4,93 \times 10^8$     |
|                        | 9        | ++++        | 6,06 | $6,27 \times 10^8$     |
|                        | 18       | ++++        | 5,98 | $5,81 \times 10^8$     |
|                        | 24       | ++++        | 5,92 | $9,22 \times 10^8$     |
| 20%                    | 2        | +++         | 6,34 | $1,74 \times 10^8$     |
|                        | 4        | ++++        | 6,24 | $4,02 \times 10^8$     |
|                        | 6        | ++++        | 6,05 | $4,50 \times 10^8$     |
|                        | 9        | ++++        | 5,97 | $5,84 \times 10^8$     |
|                        | 18       | ++++        | 5,63 | $7,96 \times 10^8$     |
|                        | 24       | ++++        | 5,69 | $7,60 \times 10^8$     |
| 30%                    | 2        | +++         | 6,32 | $1,68 \times 10^8$     |
|                        | 4        | ++++        | 6,22 | $3,93 \times 10^8$     |
|                        | 6        | ++++        | 6,04 | $4,48 \times 10^8$     |
|                        | 9        | ++++        | 5,97 | $5,88 \times 10^8$     |
|                        | 18       | ++++        | 5,82 | $6,06 \times 10^8$     |
|                        | 24       | ++++        | 5,70 | $6,90 \times 10^8$     |
| 40%                    | 2        | +++         | 6,32 | $1,84 \times 10^8$     |
|                        | 4        | ++++        | 6,21 | $3,95 \times 10^8$     |
|                        | 6        | ++++        | 6,01 | $4,33 \times 10^8$     |
|                        | 9        | ++++        | 5,93 | $5,67 \times 10^8$     |
|                        | 18       | ++++        | 5,61 | $7,71 \times 10^8$     |
|                        | 24       | ++++        | 5,67 | $6,33 \times 10^8$     |
| 50%                    | 2        | +++         | 6,29 | $1,71 \times 10^8$     |
|                        | 4        | ++++        | 6,18 | $4,26 \times 10^8$     |
|                        | 6        | ++++        | 6,03 | $4,04 \times 10^8$     |
|                        | 9        | ++++        | 6,01 | $5,11 \times 10^8$     |
|                        | 18       | ++++        | 5,78 | $6,81 \times 10^8$     |
|                        | 24       | ++++        | 5,70 | $5,02 \times 10^8$     |

Keterangan : jumlah mikroba awal setara dengan  $1,00 \times 10^7$  CFU/ml.

Terjadinya penurunan pH selama masa inkubasi ini disebabkan adanya produksi asam laktat oleh *Lactobacillus bulgaricus* selama pertumbuhan. Substrat Homo-GalOS yang merupakan oligomer dari galaktosa akan dihidrolisa oleh  $\beta$ -

galaktosidase menjadi gula yang lebih sederhana yaitu galaktosa. Galaktosa ini akan dimetabolisme oleh *Lactobacillus* melalui jalur tagatose-6-fosfat atau jalur Leloir yang akan menghasilkan asam piruvat sedang glukosa akan dimetabolisme melalui jalur glikolisis yang juga menghasilkan asam piruvat. Asam piruvat yang dihasilkan ini selanjutnya direduksi menjadi asam laktat (Axelsson, 1998). Dengan penambahan homo-GalOS, substrat yang akan dimetabolisme jumlahnya akan bertambah dan dapat meningkatkan produksi asam laktat sehingga penurunan pH selama waktu inkubasi lebih signifikan.



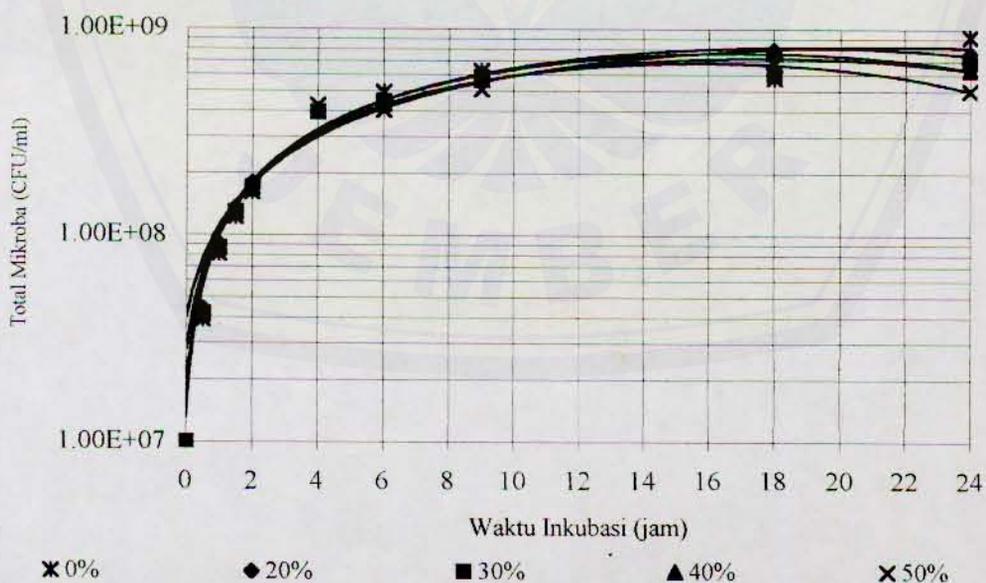
**Gambar 8.** Kurva Perubahan pH *Lactobacillus bulgaricus* pada Media MRS Broth dengan Penambahan Homo-GalOS pada Suhu Inkubasi 37<sup>0</sup> C.

Bakteri *Lactobacillus* merupakan bakteri yang tahan asam (asidofil), dapat tumbuh baik pada pH yang rendah yaitu 3,0 – 6,0 (Buckle, 1997). Kondisi media yang asam sangat cocok bagi pertumbuhan *Lactobacillus* sehingga akan meningkatkan pertumbuhannya. Hal ini sesuai dengan pernyataan Nuraida (1996) dan Salminen (1998), bahwa produksi asam yang menyebabkan penurunan pH fekal merupakan sifat yang diinginkan sebagai hasil metabolisme substrat yang

digunakan. Menurut Hidaka *et al.* (1984) dan Fuller (1997), produksi asam lemak rantai pendek dapat menurunkan pH menuju pH asam dan pada waktu yang sama jumlah total mikroba akan bertambah.

Pola pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus* pada media MRS Broth murni dan pada media yang ditambah Homo-GalOS selama waktu inkubasi dapat dilihat pada **Gambar 9**. Dari gambar tersebut tampak bahwa pada media MRS Broth yang ditambahkan homo-GalOS menunjukkan peningkatan pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus* yang lebih baik tanpa penambahan homo-GalOS. Peningkatan jumlah total mikroba yang lebih tinggi diperoleh pada media dengan penambahan homo-GalOS terutama pada konsentrasi 40%.

Dari **Gambar 9** juga menunjukkan pola pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus* selama 24 jam inkubasi yang meliputi fase adaptasi (*lag phase*), fase eksponensial (*log phase*), dan fase diam (*stationery phase*). Penambahan inokulum dalam volume dan konsentrasi mikroba yang cukup tinggi akan mampu mempersingkat fase adaptasi. Pada penelitian ini, inokulum yang digunakan cukup sehat sehingga kultur mikroba langsung tumbuh dengan cepat pada media pertumbuhan yang sama.



**Gambar 9.** Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus* pada Media MRS Broth dengan Penambahan Homo-GalOS pada Suhu Inkubasi 37<sup>0</sup> C.

Dengan penambahan homo-GalOS peningkatan total mikroba lebih tinggi dibanding tanpa penambahan homo-GalOS. Dengan adanya penambahan homo-GalOS yang mengandung disakarida dan trisakarida dengan substrat galaktosa dalam media, *Lactobacillus* dapat menggunakan media ini dengan masa adaptasi yang sangat singkat sehingga akan memperpendek fase lag (Nuraida, 1996). Pada fase log terjadi pertumbuhan mikroba secara logaritmik/eksponensial dengan kecepatan pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) yang tetap dan komposisi kimiawi media biakan berubah akibat sintesis produk dan penggunaan substrat yang ditandai dengan bertambahnya kekeruhan media (Djumali dan Suryani, 1994).

Selama fase eksponensial laju pertumbuhan semakin meningkat berbanding dengan jumlah biomassa. Pada fase ini dapat ditentukan kecepatan pertumbuhan spesifik suatu mikroba (Suwasono *et al.*, 2002). Kecepatan pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) dan waktu generasi ( $t_d$ ) *Lactobacillus bulgaricus* dapat dilihat pada Tabel 9.

**Tabel 9.** Kecepatan Pertumbuhan Spesifik *Lactobacillus bulgaricus* pada Media Homo-GalOS

| Konsentrasi Homo-GalOS | $X_1$ (CFU/ml)     | $X_2$ (CFU/ml)     | $\Delta t$ (jam) | $\mu$ ( $\text{jam}^{-1}$ ) | $t_d$ (menit) |
|------------------------|--------------------|--------------------|------------------|-----------------------------|---------------|
| 0%                     | $1,00 \times 10^7$ | $1,62 \times 10^8$ | 2                | 1,392                       | 29,88         |
| 20%                    | $1,00 \times 10^7$ | $1,74 \times 10^8$ | 2                | 1,429                       | 29,10         |
| 30%                    | $1,00 \times 10^7$ | $1,68 \times 10^8$ | 2                | 1,410                       | 29,49         |
| 40%                    | $1,00 \times 10^7$ | $1,84 \times 10^8$ | 2                | 1,457                       | 28,54         |
| 50%                    | $1,00 \times 10^7$ | $1,71 \times 10^8$ | 2                | 1,420                       | 29,28         |

Penambahan homo-GalOS dengan konsentrasi 20%, 30%, 40% dan 50% (w/v) ke dalam media biakan *Lactobacillus bulgaricus* dapat meningkatkan kecepatan pertumbuhan spesifik selama fase logaritmik. Penambahan homo-galOS akan mampu meningkatkan kecepatan pertumbuhan spesifik, dimana konsentrasi 40% (w/v) memberikan kecepatan pertumbuhan yang paling tinggi yakni  $1,457 \text{ jam}^{-1}$ , dengan waktu generasi (penggandaan) 28,54 menit dan total bakteri setelah dua jam sebesar  $1,84 \times 10^8$  CFU/ml atau terjadi peningkatan

mendekati dua *log cycle*. Ini berarti selama fase eksponensial *Lactobacillus bulgaricus* dapat menggunakan secara optimal homo-GalOS konsentrasi 40% (w/v) untuk pertumbuhannya. Pada konsentrasi yang sama pula, waktu penggandaan sel lebih cepat dibanding lainnya.

Penambahan Homo-GalOS dalam substrat galaktosa dapat meningkatkan pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus* yang dengan meningkatnya total mikroba dan disertai penurunan pH selama waktu inkubasi 24 jam. Peningkatan pertumbuhan mikroba dapat optimal jika mikroba dapat menggunakan secara optimal Homo-GalOS yang ditambahkan. Konsentrasi Homo-GalOS yang terlalu tinggi mengakibatkan kejenuhan substrat yang dapat menyebabkan terganggunya aktivitas dan metabolisme karena mikroba tidak dapat menggunakannya secara optimal sehingga kurang dapat meningkatkan pertumbuhan mikroba.

Dari hasil penelitian pendahuluan diperoleh suatu pola pertumbuhan yang dikehendaki dengan adanya penambahan substrat homo-GalOS pada media pertumbuhan bakteri asam laktat. Pola pertumbuhan yang dimaksud adalah terjadinya peningkatan pertumbuhan bakteri asam laktat yang diindikasikan oleh terjadinya penurunan pH dan peningkatan jumlah total mikroba pada waktu yang sama selama masa inkubasi. Peningkatan total mikroba ini terutama terjadi pada fase stationer yakni sekitar jam ke-3 sampai jam ke-24. Pola ini selanjutnya dapat digunakan sebagai dasar bagi pengujian hetero-GalOS pada bakteri asam laktat.

#### **4.2 Penelitian Utama (Pengujian Hetero-Galaktooligosakarida)**

Penambahan substrat dengan kombinasi galaktosa dan oligosakarida lainnya (Hetero-GalOS) juga ditujukan sebagai tambahan substrat bagi metabolisme bakteri asam laktat, baik pada *Lactobacillus sp.* maupun *Streptococcus sp.* Menurut Salminen (1998), kombinasi substrat dapat diterapkan untuk meningkatkan pertumbuhan *Lactobacili* dan *Bifidobacteria*.

Dalam pengujian hetero-GalOS ini digunakan substrat campuran donor dan aseptor. Sebagai substrat donor digunakan galaktosa sedang aseptor digunakan beberapa jenis gula yang digunakan dalam kehidupan sehari-hari,

baik monosakarida seperti glukosa, manosa dan laktosa maupun disakarida seperti maltosa, sukrosa dan trehalosa. Glukosa, laktosa, dan sukrosa merupakan jenis gula yang umum dan sudah dikenal dalam kehidupan sehari-hari. Sedangkan manosa merupakan komponen utama manno-oligosakarida yang merupakan senyawa antiinfeksi (*antiinfective agent*) (Ofek dan Sharon, 1990). Malto-oligosakarida merupakan pemanis berskala rendah yang banyak digunakan pada makanan diet. Trehalosa merupakan pemanis tingkat rendah sekaligus sebagai senyawa pengawet makanan (*food preservative agent*) (Portmann dan Birch, 1995; Crowe *et al.*, 1996).

#### A. Pengujian Hetero-GalOS pada *Lactobacillus bulgaricus*

*Lactobacillus bulgaricus* merupakan probiotik yang banyak digunakan dalam produk olahan susu terutama yoghurt dan sebagai pembangkit asam untuk koagulasi kasein pada keju Jerman (Schlegel, 1994). Hasil pengujian hetero-GalOS pada *Lactobacillus bulgaricus* dapat dilihat pada **Tabel 10**.

**Tabel 10.** Data Pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus* pada Substrat Hetero-GalOS

| Jenis GalOS            | Pertumbuhan |        | pH    |        | Total mikroba (CFU/ml) |                    | Δ log |
|------------------------|-------------|--------|-------|--------|------------------------|--------------------|-------|
|                        | 3 jam       | 24 jam | 3 jam | 24 jam | 3 jam                  | 24 jam             |       |
| Galaktosil - Laktosa   | +           | +      | 5,59  | 5,59   | $8,18 \times 10^8$     | $7,92 \times 10^8$ | -     |
| Galaktosil - Glukosa   | +           | ++     | 5,55  | 4,95   | $1,02 \times 10^9$     | $2,12 \times 10^9$ | 0,318 |
| Galaktosil - Manosa    | +           | +      | 5,45  | 5,32   | $1,80 \times 10^9$     | $1,72 \times 10^9$ | -     |
| Galaktosil - Maltosa   | +           | +      | 5,52  | 5,66   | $1,55 \times 10^9$     | $2,17 \times 10^9$ | 0,146 |
| Galaktosil - Sukrosa   | +           | ++     | 5,47  | 5,40   | $1,29 \times 10^9$     | $2,47 \times 10^9$ | 0,282 |
| Galaktosil - Trehalosa | +           | ++     | 5,38  | 5,56   | $1,15 \times 10^9$     | $2,21 \times 10^9$ | 0,284 |

Pada **Tabel 10**, semua jenis hetero-GalOS dapat difermentasi oleh *Lactobacillus bulgaricus* dan menunjukkan pola pertumbuhan yang dikehendaki yakni penurunan pH yang disertai peningkatan total mikroba pada waktu yang sama. Hetero-GalOS dengan kombinasi galaktosil-glukosa menunjukkan peningkatan pertumbuhan yang paling baik selama masa inkubasi, dimana terjadi

peningkatan total mikroba paling signifikan dari  $1,02 \times 10^9$  CFU/ml menjadi  $2,12 \times 10^9$  CFU/ml dan penurunan pH yang paling signifikan dari 5,55 menjadi 4,95.

Pada penambahan hetero-GalOS dengan aseptor laktosa dan mannososa pada jam ke-24 menunjukkan penurunan jumlah total mikroba. Hal ini mungkin disebabkan selama masa kurun waktu jam ke-3 sampai jam ke-24 terbentuk senyawa antimikroba (bakteriosin atau nisin) yang dapat menyebabkan kematian bagi spesies ini. Selain itu, kombinasi substrat tersebut tidak dapat difermentasi secara optimal oleh *Lactobacillus bulgaricus*, terlihat dengan penambahan jumlah total mikroba yang relatif lebih lambat atau kecil.

### B. Pengujian Hetero-GalOS pada *Lactobacillus casei*

*Lactobacillus casei* merupakan probiotik yang juga banyak digunakan pada produk susu dan hasil olahannya. Hasil pengujian hetero-GalOS pada *Lactobacillus casei* dapat dilihat pada Tabel 11.

**Tabel 11.** Data pertumbuhan *Lactobacillus casei* pada Substrat Hetero-GalOS

| Jenis GalOS            | Pertumbuhan |        | pH    |        | Total mikroba (CFU/ml) |                    | $\Delta \log$ |
|------------------------|-------------|--------|-------|--------|------------------------|--------------------|---------------|
|                        | 3 jam       | 24 jam | 3 jam | 24 jam | 3 jam                  | 24 jam             |               |
| Galaktosil - Laktosa   | +           | +++    | 5,47  | 4,67   | $7,64 \times 10^7$     | $2,01 \times 10^8$ | 0,420         |
| Galaktosil - Glukosa   | +           | ++++   | 5,49  | 4,33   | $5,99 \times 10^7$     | $2,41 \times 10^8$ | 0,604         |
| Galaktosil - Manosa    | +           | ++     | 5,30  | 4,31   | $1,38 \times 10^8$     | $2,69 \times 10^8$ | 0,289         |
| Galaktosil - Maltosa   | +           | ++     | 5,32  | 4,62   | $1,77 \times 10^8$     | $2,97 \times 10^8$ | 0,225         |
| Galaktosil - Sukrosa   | +           | ++     | 5,37  | 4,83   | $1,44 \times 10^8$     | $2,69 \times 10^8$ | 0,271         |
| Galaktosil - Trehalosa | +           | ++     | 5,24  | 4,67   | $1,52 \times 10^8$     | $2,51 \times 10^8$ | 0,218         |

*Lactobacillus casei* juga menunjukkan respon yang positif dengan adanya penambahan hetero-GalOS. Hal ini ditunjukkan oleh kemampuan spesies ini untuk memfermentasi semua jenis hetero-GalOS dengan kemiripan indikasi yaitu terjadinya penurunan pH dan peningkatan total mikroba pada waktu yang sama.

Kombinasi galaktosil-glukosa merupakan substrat yang paling optimal difermentasi oleh *Lactobacillus casei*, dimana terjadi penurunan pH yang paling

signifikan yakni dari 5,49 menjadi 4,33 yang disertai peningkatan total mikroba paling tinggi dari  $5,99 \times 10^7$  CFU/ml menjadi  $2,41 \times 10^8$  CFU/ml.

### C. Pengujian Hetero-GalOS pada *Lactobacillus lactis*

Hasil pengujian hetero-GalOS pada *Lactobacillus lactis* dapat dilihat pada Tabel 12. Semua kombinasi hetero-GalOS pada umumnya dapat meningkatkan jumlah total mikroba *Lactobacillus lactis* selama masa inkubasi. Peningkatan total mikroba tersebut juga disertai dengan penurunan pH dari jam ke-3 ke jam ke-24, kecuali pada kombinasi galaktosa-maltosa dan galaktosil-trehalosa, pH pada jam ke-24 justru meningkat. Hal ini mungkin dapat disebabkan adanya produk metabolisme selain asam laktat yang tidak mengakibatkan penurunan pH atau substrat jenis ini hanya dapat digunakan untuk meningkatkan pertumbuhannya saja.

**Tabel 12.** Data pertumbuhan *Lactobacillus lactis* pada Substrat Hetero-GalOS

| Jenis GalOS           | Pertumbuhan |        | pH    |        | Total mikroba (CFU/ml) |                    | $\Delta \log$ |
|-----------------------|-------------|--------|-------|--------|------------------------|--------------------|---------------|
|                       | 3 jam       | 24 jam | 3 jam | 24 jam | 3 jam                  | 24 jam             |               |
| Galaktosil-Laktosa    | +           | +      | 5,87  | 5,56   | $3,20 \times 10^7$     | $4,06 \times 10^7$ | 0,103         |
| Galaktosil-Glukosa    | +           | ++++   | 5,58  | 4,79   | $1,16 \times 10^7$     | $4,46 \times 10^7$ | 0,584         |
| Galaktosil-Manosa     | +           | ++     | 5,45  | 5,02   | $1,80 \times 10^7$     | $3,77 \times 10^7$ | 0,321         |
| Galaktosil-Maltosa    | +           | +      | 5,42  | 5,58   | $2,47 \times 10^7$     | $4,04 \times 10^7$ | 0,214         |
| Galaktosil-Sukrosa    | +           | +++    | 5,49  | 5,32   | $2,26 \times 10^7$     | $5,47 \times 10^7$ | 0,384         |
| Galaktosil -Trehalosa | +           | +++    | 5,35  | 5,54   | $2,26 \times 10^7$     | $3,99 \times 10^7$ | 0,247         |

Peningkatan pertumbuhan *Lactobacillus lactis* paling baik ditunjukkan oleh adanya penambahan hetero-GalOS dengan kombinasi galaktosil-glukosa. Dengan adanya penambahan substrat galaktosil-glukosa terjadi peningkatan jumlah total mikroba yang paling tinggi dibanding kombinasi substrat yang lain yakni dari  $1,16 \times 10^7$  CFU/ml menjadi  $4,46 \times 10^7$  CFU/ml dan penurunan pH paling signifikan dari 5,58 menjadi 4,79.

#### D. Pengujian Hetero-GalOS pada *Lactobacillus plantarum*

*Lactobacillus plantarum* merupakan probiotik yang banyak digunakan pada produk fermentasi sayur seperti sauerkraut (Buckle, 1997). Hasil pengujian hetero-GalOS pada *Lactobacillus plantarum* dapat dilihat pada **Tabel 13**.

Semua jenis hetero-GalOS dapat meningkatkan pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* dari jam ke-3 sampai jam ke-24, kecuali kombinasi galaktosil-mannosa pada jam ke-24 tidak menunjukkan peningkatan pertumbuhan. Pada hetero-GalOS dengan aseptor mannososa walau terjadi penurunan pH namun tidak disertai peningkatan total mikroba pada jam ke-24. Hal ini mungkin disebabkan adanya produksi metabolit sekunder yang bersifat antimikroba bagi spesies ini selama kurun waktu dari jam ke-3 ke jam ke-24.

**Tabel 13.** Data pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* pada Substrat Hetero-GalOS

| Jenis GalOS          | Pertumbuhan |        | pH    |        | Total mikroba (CFU/ml) |                    | $\Delta \log$ |
|----------------------|-------------|--------|-------|--------|------------------------|--------------------|---------------|
|                      | 3 jam       | 24 jam | 3 jam | 24 jam | 3 jam                  | 24 jam             |               |
| Galaktosil-Laktosa   | +           | +++++  | 5,61  | 4,97   | $2,23 \times 10^7$     | $1,17 \times 10^8$ | 0,719         |
| Galaktosil-Glukosa   | +           | +++    | 5,59  | 4,29   | $3,96 \times 10^7$     | $1,12 \times 10^8$ | 0,452         |
| Galaktosil-Manosa    | +           | +      | 5,46  | 5,01   | $6,87 \times 10^7$     | $6,81 \times 10^7$ | -             |
| Galaktosil-Maltosa   | +           | +      | 5,42  | 4,98   | $9,31 \times 10^7$     | $1,16 \times 10^8$ | 0,095         |
| Galaktosil-Sukrosa   | +           | ++     | 5,48  | 4,84   | $5,21 \times 10^7$     | $1,22 \times 10^8$ | 0,369         |
| Galaktosil-Trehalosa | +           | ++     | 5,41  | 5,09   | $6,30 \times 10^7$     | $1,01 \times 10^8$ | 0,205         |

Peningkatan pertumbuhan paling baik terjadi pada penambahan hetero-GalOS dengan kombinasi galaktosil-laktosa dengan peningkatan total mikroba paling tinggi dari  $2,23 \times 10^7$  CFU/ml menjadi  $1,17 \times 10^8$  CFU/ml atau terjadi peningkatan pertumbuhan pada jam ke-24 menjadi lima kali pertumbuhan pada jam ke-3 dengan penurunan pH dari 5,61 menjadi 4,97.

### E. Pengujian Hetero-GalOS pada *Lactobacillus rhamnosus*

Hasil pengujian hetero-GalOS pada *Lactobacillus rhamnosus* dapat dilihat pada Tabel 14.

**Tabel 14.** Data pertumbuhan *Lactobacillus rhamnosus*

| Jenis GalOS            | Pertumbuhan |        | pH    |        | Total mikroba (CFU/ml) |                    | $\Delta \log$ |
|------------------------|-------------|--------|-------|--------|------------------------|--------------------|---------------|
|                        | 3 jam       | 24 jam | 3 jam | 24 jam | 3 jam                  | 24 jam             |               |
| Galaktosil - Laktosa   | +           | ++     | 5,76  | 5,33   | $6,14 \times 10^7$     | $1,36 \times 10^8$ | 0,345         |
| Galaktosil - Glukosa   | +           | ++++   | 5,58  | 4,46   | $4,72 \times 10^7$     | $1,68 \times 10^8$ | 0,551         |
| Galaktosil - Manosa    | +           | +      | 5,44  | 4,67   | $1,61 \times 10^8$     | $1,57 \times 10^8$ | -             |
| Galaktosil - Maltosa   | +           | +      | 5,60  | 5,47   | $1,61 \times 10^8$     | $1,03 \times 10^8$ | -             |
| Galaktosil - Sukrosa   | +           | ++     | 5,50  | 5,19   | $1,03 \times 10^8$     | $1,69 \times 10^8$ | 0,215         |
| Galaktosil - Trehalosa | +           | +      | 5,39  | 5,47   | $1,11 \times 10^8$     | $1,10 \times 10^8$ | -             |

Pada Tabel 14, menunjukkan jenis hetero-GalOS yang dapat difermentasi secara optimal oleh *Lactobacillus rhamnosus* adalah kombinasi galaktosil-laktosa, galaktosil-glukosa dan galaktosil-sukrosa. Pada penambahan ketiga jenis hetero-GalOS tersebut *Lactobacillus rhamnosus* menunjukkan pola pertumbuhan yang dikehendaki yakni peningkatan total mikroba yang juga disertai dengan penurunan pH selama masa inkubasi. Peningkatan pertumbuhan paling baik ditunjukkan oleh kombinasi galaktosil-glukosa, dimana terjadi peningkatan total mikroba paling signifikan dari  $4,72 \times 10^7$  CFU/ml menjadi  $1,68 \times 10^8$  CFU/ml dan penurunan pH yang paling signifikan dari 5,58 menjadi 4,46.

Sedang kombinasi galaktosil-mannosa, galaktosil-maltosa dan galaktosil trehalosa pada jam ke-24 menunjukkan penurunan jumlah total mikroba. Hal ini dapat dimungkinkan terbentuknya metabolit sekunder yang dapat bersifat antimikroba bagi spesies ini atau terbatasnya kemampuan spesies dalam memanfaatkan ketiga jenis substrat tersebut untuk meningkatkan pertumbuhannya.

### F. Pengujian Hetero-GalOS pada *Streptococcus thermophilus*

*Streptococcus thermophilus* merupakan probiotik yang juga banyak terdapat pada produk susu dan hasil olahannya. Probiotik ini terutama terdapat pada produk yoghurt bersama *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei* atau *Lactobacillus acidophilus*. Pada produk yoghurt-*Streptococcus thermophilus* berfungsi untuk memfermentasi laktosa menjadi asam laktat yang dapat menciptakan kondisi yang menguntungkan bagi *Lactobacillus sp.* yang mulai berkembang bila pH telah menurun sampai kira-kira 4,5 (Buckle, 1997). Hasil pengujian prebiotik hetero-GalOS pada *Streptococcus thermophilus* dapat dilihat pada Tabel 15.

Dari Tabel 15 menunjukkan bahwa hampir semua jenis hetero-GalOS dapat difermentasi dengan baik oleh *Streptococcus thermophilus* yang ditandai dengan meningkatnya total mikroba selama masa inkubasi dan disertai dengan penurunan pH dari jam ke-3 ke jam ke-24, kecuali pada hetero-GalOS dengan aseptor trehalosa pada jam ke-24 tidak terjadi penurunan pH.

**Tabel 15.** Data pertumbuhan *Streptococcus thermophilus* pada Substrat Hetero-GalOS

| Jenis GalOS            | Pertumbuhan |        | pH    |        | Total mikroba (CFU/ml) |                    | $\Delta \log$ |
|------------------------|-------------|--------|-------|--------|------------------------|--------------------|---------------|
|                        | 3 jam       | 24 jam | 3 jam | 24 jam | 3 jam                  | 24 jam             |               |
| Galaktosil - Laktosa   | +           | +++    | 5,62  | 5,44   | $3,40 \times 10^7$     | $1,06 \times 10^8$ | 0,482         |
| Galaktosil - Glukosa   | +           | ++++   | 5,58  | 4,79   | $2,54 \times 10^7$     | $9,86 \times 10^7$ | 0,589         |
| Galaktosil - Manosa    | +           | ++     | 5,46  | 5,27   | $3,99 \times 10^7$     | $7,37 \times 10^7$ | 0,266         |
| Galaktosil - Maltosa   | +           | +      | 5,93  | 5,89   | $6,41 \times 10^7$     | $8,82 \times 10^7$ | 0,139         |
| Galaktosil - Sukrosa   | +           | +++    | 5,51  | 5,35   | $4,53 \times 10^7$     | $1,14 \times 10^8$ | 0,401         |
| Galaktosil - Trehalosa | +           | +++    | 5,39  | 5,46   | $4,75 \times 10^7$     | $1,48 \times 10^8$ | 0,494         |

Peningkatan pertumbuhan paling baik terjadi pada penambahan hetero-GalOS dengan kombinasi substrat galaktosil-glukosa, dimana terjadi penurunan pH yang paling signifikan dari 5,58 menjadi 4,79 dan peningkatan jumlah total mikroba paling signifikan dari  $2,54 \times 10^7$  CFU/ml menjadi  $9,86 \times 10^7$  CFU/ml.

Dari **Tabel 10 - 15**, terlihat bahwa penambahan berbagai jenis hetero-GalOS pada media MRS-Broth dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri asam laktat, yang ditandai dengan terjadinya penurunan pH dan peningkatan total mikroba pada waktu yang sama selama masa inkubasi. Hal ini merupakan pola pertumbuhan yang dikehendaki dari suatu prebiotik sebagai pemacu pertumbuhan probiotik.

Terjadinya penurunan pH selama waktu inkubasi 24 jam ini disebabkan adanya metabolisme dari substrat yang telah dihidrolisa. Substrat hetero-GalOS dihidrolisa oleh  $\beta$ -galaktosidase menjadi gula-gula yang lebih sederhana (monosakarida) yang mengandung galaktosa. Galaktosa yang dihasilkan ini kemudian dimetabolisme lebih lanjut untuk menghasilkan asam laktat. Dengan penambahan hetero-GalOS, substrat yang akan dimetabolisme jumlahnya akan bertambah dan dapat meningkatkan asam laktat yang dihasilkan sehingga penurunan pH selama waktu inkubasi lebih signifikan. Pada waktu yang sama juga terjadi peningkatan total mikroba.

Hetero-GalOS merupakan substrat yang mengandung disakarida dan trisakarida yang mengandung galaktosa. Bakteri asam laktat baik *Lactobacillus sp.* maupun *Streptococcus sp.* dapat menggunakan substrat ini tanpa adaptasi terlebih dahulu sehingga akan memperpendek fase lag (Nuraida, 1996). Sehingga penambahan hetero-GalOS pada media pertumbuhan bakteri asam laktat dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri tersebut. Dengan demikian hetero-GalOS dapat menjalankan fungsinya sebagai pemacu pertumbuhan (*growth promotor*).

Untuk mengetahui spesies bakteri asam laktat baik *Lactobacillus sp.* maupun *Streptococcus sp.* yang pertumbuhannya dapat meningkat secara optimal dengan adanya penambahan beberapa jenis hetero-GalOS pada media pertumbuhannya dapat dilihat pada **Tabel 16**.

Pada **Tabel 16**, menunjukkan bahwa substrat galaktosil-laktosa dapat difermentasi secara optimal oleh *Lactobacillus plantarum*, dimana terjadi peningkatan total mikroba yang paling signifikan dibanding bakteri asam laktat lainnya yakni dari  $2,23 \times 10^7$  CFU/ml menjadi  $1,17 \times 10^8$  CFU/ml atau terjadi peningkatan jumlah total mikroba pada jam ke-24 menjadi lima kali dari jumlah

Tabel 16. Data Pertumbuhan *Lactobacillus* sp. dan *Streptococcus* sp.

| Jenis GalOS                   | Pertumbuhan |        | pH    |        | Total Mikroba      |                    | Δ log |
|-------------------------------|-------------|--------|-------|--------|--------------------|--------------------|-------|
|                               | 3 jam       | 24 jam | 3 jam | 24 jam | 3 jam              | 24 jam             |       |
| <b>Galaktosil - Laktosa</b>   |             |        |       |        |                    |                    |       |
| <i>L. bulgaricus</i>          | +           | +      | 5,59  | 5,59   | $8,18 \times 10^8$ | $7,92 \times 10^8$ | -     |
| <i>L. casei</i>               | +           | +++    | 5,47  | 4,67   | $7,64 \times 10^7$ | $2,01 \times 10^8$ | 0,420 |
| <i>L. lactis</i>              | +           | +      | 5,87  | 5,56   | $3,20 \times 10^7$ | $4,06 \times 10^7$ | 0,103 |
| <i>L. plantarum</i>           | +           | +++++  | 5,61  | 4,97   | $2,23 \times 10^7$ | $1,17 \times 10^8$ | 0,719 |
| <i>L. rhamnosus</i>           | +           | ++     | 5,76  | 5,33   | $6,14 \times 10^7$ | $1,36 \times 10^8$ | 0,345 |
| <i>S. thermophilus</i>        | +           | +++    | 5,62  | 5,44   | $3,49 \times 10^7$ | $1,06 \times 10^8$ | 0,482 |
| <b>Galaktosil - Glukosa</b>   |             |        |       |        |                    |                    |       |
| <i>L. bulgaricus</i>          | +           | ++     | 5,55  | 4,95   | $1,02 \times 10^9$ | $2,12 \times 10^9$ | 0,317 |
| <i>L. casei</i>               | +           | ++++   | 5,49  | 4,33   | $5,99 \times 10^7$ | $2,41 \times 10^8$ | 0,604 |
| <i>L. lactis</i>              | +           | ++++   | 5,58  | 4,79   | $1,16 \times 10^7$ | $4,46 \times 10^7$ | 0,584 |
| <i>L. plantarum</i>           | +           | +++    | 5,59  | 4,29   | $3,96 \times 10^7$ | $1,12 \times 10^8$ | 0,452 |
| <i>L. rhamnosus</i>           | +           | ++++   | 5,58  | 4,46   | $4,72 \times 10^7$ | $1,68 \times 10^8$ | 0,551 |
| <i>S. thermophilus</i>        | +           | ++++   | 5,58  | 4,79   | $2,54 \times 10^7$ | $9,86 \times 10^7$ | 0,589 |
| <b>Galaktosil - Mannosa</b>   |             |        |       |        |                    |                    |       |
| <i>L. bulgaricus</i>          | +           | +      | 5,45  | 5,32   | $1,80 \times 10^9$ | $1,72 \times 10^9$ | -     |
| <i>L. casei</i>               | +           | ++     | 5,30  | 4,31   | $1,38 \times 10^8$ | $2,69 \times 10^8$ | 0,289 |
| <i>L. lactis</i>              | +           | ++     | 5,45  | 5,02   | $1,80 \times 10^7$ | $3,77 \times 10^7$ | 0,321 |
| <i>L. plantarum</i>           | +           | +      | 5,46  | 5,01   | $6,87 \times 10^7$ | $6,81 \times 10^7$ | -     |
| <i>L. rhamnosus</i>           | +           | +      | 5,44  | 4,67   | $1,61 \times 10^8$ | $1,57 \times 10^8$ | -     |
| <i>S. thermophilus</i>        | +           | ++     | 5,46  | 5,27   | $3,99 \times 10^7$ | $7,37 \times 10^7$ | 0,266 |
| <b>Galaktosil - Maltosa</b>   |             |        |       |        |                    |                    |       |
| <i>L. bulgaricus</i>          | +           | +      | 5,52  | 5,66   | $1,55 \times 10^9$ | $2,17 \times 10^9$ | 0,146 |
| <i>L. casei</i>               | +           | ++     | 5,32  | 4,62   | $1,77 \times 10^8$ | $2,97 \times 10^8$ | 0,225 |
| <i>L. lactis</i>              | +           | ++     | 5,42  | 5,58   | $2,47 \times 10^7$ | $4,04 \times 10^7$ | 0,214 |
| <i>L. plantarum</i>           | +           | +      | 5,42  | 4,98   | $9,31 \times 10^7$ | $1,16 \times 10^8$ | 0,095 |
| <i>L. rhamnosus</i>           | +           | +      | 5,60  | 5,47   | $1,61 \times 10^8$ | $1,03 \times 10^8$ | -     |
| <i>S. thermophilus</i>        | +           | +      | 5,93  | 5,89   | $6,41 \times 10^7$ | $8,82 \times 10^7$ | 0,139 |
| <b>Galaktosil - Sukrosa</b>   |             |        |       |        |                    |                    |       |
| <i>L. bulgaricus</i>          | +           | ++     | 5,47  | 5,40   | $1,29 \times 10^9$ | $2,47 \times 10^9$ | 0,282 |
| <i>L. casei</i>               | +           | ++     | 5,37  | 4,83   | $1,44 \times 10^8$ | $2,69 \times 10^8$ | 0,271 |
| <i>L. lactis</i>              | +           | ++     | 5,49  | 5,32   | $2,26 \times 10^7$ | $5,47 \times 10^7$ | 0,384 |
| <i>L. plantarum</i>           | +           | ++     | 5,48  | 4,84   | $5,21 \times 10^7$ | $1,22 \times 10^8$ | 0,369 |
| <i>L. rhamnosus</i>           | +           | ++     | 5,50  | 5,19   | $1,03 \times 10^8$ | $1,69 \times 10^8$ | 0,215 |
| <i>S. thermophilus</i>        | +           | +++    | 5,51  | 5,35   | $4,53 \times 10^7$ | $1,14 \times 10^8$ | 0,401 |
| <b>Galaktosil - Trehalosa</b> |             |        |       |        |                    |                    |       |
| <i>L. bulgaricus</i>          | +           | ++     | 5,38  | 5,56   | $1,15 \times 10^9$ | $2,21 \times 10^9$ | 0,284 |
| <i>L. casei</i>               | +           | ++     | 5,24  | 4,67   | $1,52 \times 10^8$ | $2,51 \times 10^8$ | 0,218 |
| <i>L. lactis</i>              | +           | ++     | 5,35  | 5,54   | $2,26 \times 10^7$ | $3,99 \times 10^7$ | 0,247 |
| <i>L. plantarum</i>           | +           | ++     | 5,41  | 5,09   | $6,30 \times 10^7$ | $1,01 \times 10^8$ | 0,205 |
| <i>L. rhamnosus</i>           | +           | +      | 5,39  | 5,47   | $1,11 \times 10^8$ | $1,10 \times 10^8$ | -     |
| <i>S. thermophilus</i>        | +           | +++    | 5,39  | 5,46   | $4,75 \times 10^7$ | $1,48 \times 10^8$ | 0,494 |

total mikroba pada jam ke-3. *Lactobacillus casei* menunjukkan peningkatan pertumbuhan yang paling tinggi pada penambahan substrat galaktosil-glukosa dan galaktosil-maltosa. Sedangkan galaktosil-mannosa dapat memberikan peningkatan pertumbuhan yang paling tinggi pada *Lactobacillus lactis*, yakni dari  $1,80 \times 10^7$  CFU/ml menjadi  $3,77 \times 10^7$  CFU/ml. Kombinasi substrat galaktosil-sukrosa dan galaktosil-trehalosa dapat meningkatkan pertumbuhan *Streptococcus termophilus* yang paling optimum dibanding bakteri asam laktat lainnya. Umumnya peningkatan jumlah total mikroba akan disertai oleh penurunan pH dalam waktu yang sama. Namun pada penambahan galaktosil-trehalosa pada media pertumbuhan *Streptococcus termophilus* menunjukkan peningkatan pH pada jam ke-24. Hal ini dapat disebabkan adanya produksi metabolit lainnya yang bukan berupa asam laktat atau juga prebiotik jenis ini hanya dapat digunakan untuk meningkatkan pertumbuhannya saja.

Hasil pengujian hetero-GalOS pada *Lactobacillus sp.* maupun *Streptococcus sp.* menunjukkan bahwa kombinasi jenis oligosakarida yang sama sebagai substrat belum tentu dapat memberikan pengaruh yang sama bagi semua jenis bakteri asam laktat (**Tabel 16**). Hal ini disebabkan karena setiap bakteri memiliki kemampuan yang spesifik dan selektif dalam memilih sustrat yang diperlukan oleh proses metabolismenya. Pernyataan serupa seperti telah dikemukakan oleh Roberfroid (1995) dan Salminen (1998) bahwa komponen prebiotik dapat digunakan untuk memodifikasi koloni mikroflora manusia secara selektif, yang dapat mempengaruhi *Lactobacili* dan *Bifidobacteria* dan fungsi metabolismenya.

DAFTAR PUSTAKA

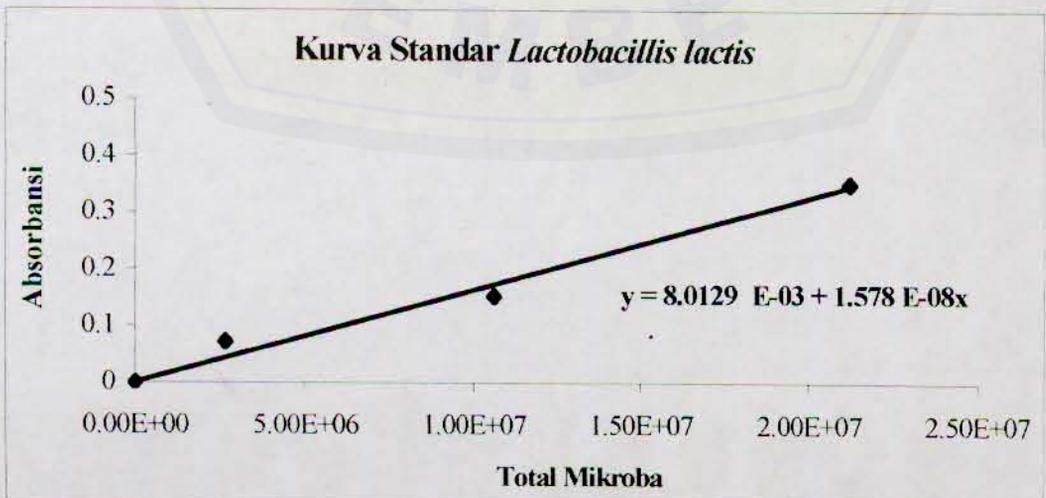
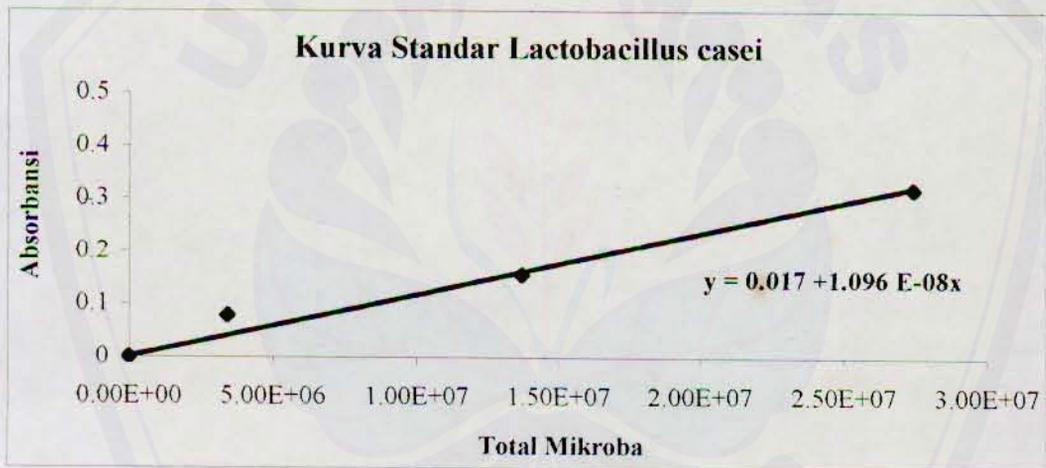
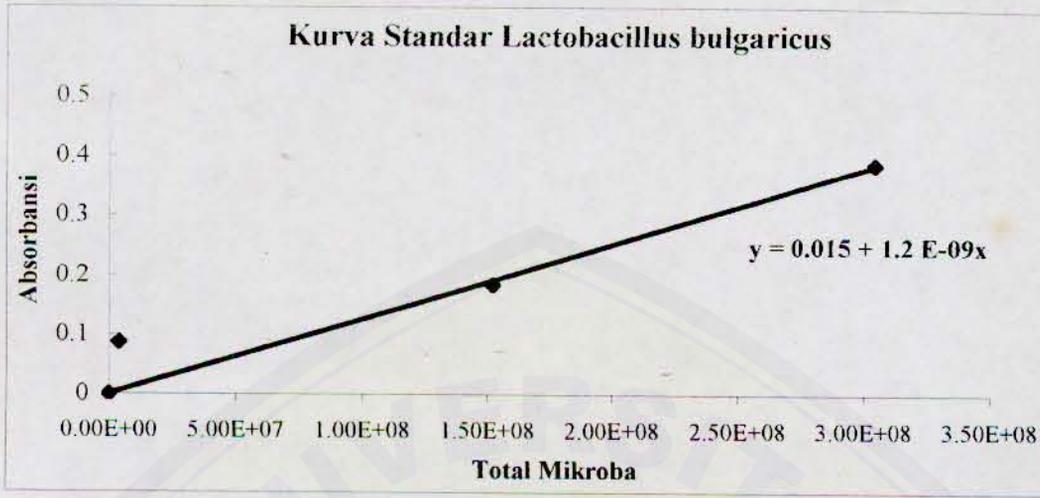
- Agus, 2001. **Konsep Prebiotik dalam Makanan Bayi dan Balita**. Jakarta : Kompas (8 April 2001).
- Anonim. 2001. **Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Pengolahan I**. Jember : Fakultas Teknologi Pertanian.
- Astawan, M. 2003. **Pangan Fungsional untuk Kesehatan yang Optimal**. <http://www.kompas.com>
- Axelsson, L. 1998. **Lactic Acid Bacteria : Classification and Physiology..** Matforks, Norwegian Food Research Institute, As, Norway.
- Bengmark S. 1996. **Econutrition and Health Maintenance: A New Concept To Prevent Inflammation, Ulceration and Sepsis**. Clin Nutr 16:1-10.
- Berger, J.L., Lee, B.H., dan Lacroix, C. 1995. **Oligosaccharide Synthesis by Free and Immobilised  $\beta$ -Galactosidase from *Thermus aquaticus* YT-1**. Biotechnology Letters, 17, 1077-1080.
- Broste, P. 1999. **Food Engineering International**. Denmark (broste @ Broste.com).
- Buckle, K.A. et al. 1987. **Ilmu Pangan**. Jakarta : Penerbit Universitas Indonesia.
- Cichoke, A. 2000. **Probiotics Balance Digestion and Improve Overall Health**. Nutrition Science News. 26: 2-4
- Collins, Gibson GR. 1999. **Prebiotic, Probiotic and Synbiotic : Approachesfor Mudulating The Microbial Ecology of Gut**. Am J Clin Nutr 69(5):1052S-1057S.
- Crowe, L.M., Reid, D.S., dan Crowe, J.H. 1996. **Is Trehalose Special for Preserving Dry Materials ?**. Biophysical Journal, 71, 2087-2093.
- El Khadem, H.S. 1988. **Carbohydrate Chemistry, Monosaccharides and Their Oligomers**. San Diego: Academic Press. pp 1 – 253.
- Fardiaz, S. 1992. **Mikrobiologi Pangan I**. Jakarta : PT Gramedia.
- Frazier , WC and Weshoff, DC. 1988. **Food Microbiology**. Edisi Keempat. Singapore: McGraw Hill Book Co.
- Fuller, R. 1991. **Probiotics in Human Medicine**. Gut. 32, 439-442.

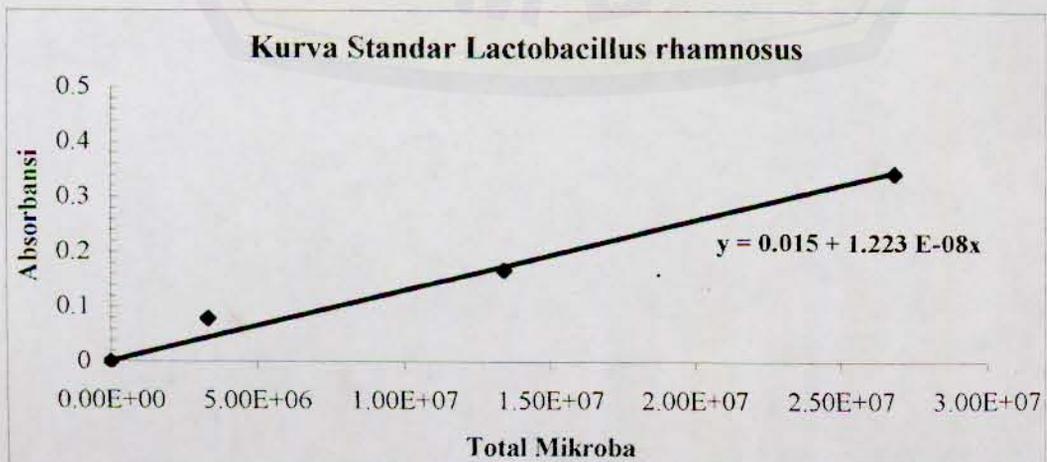
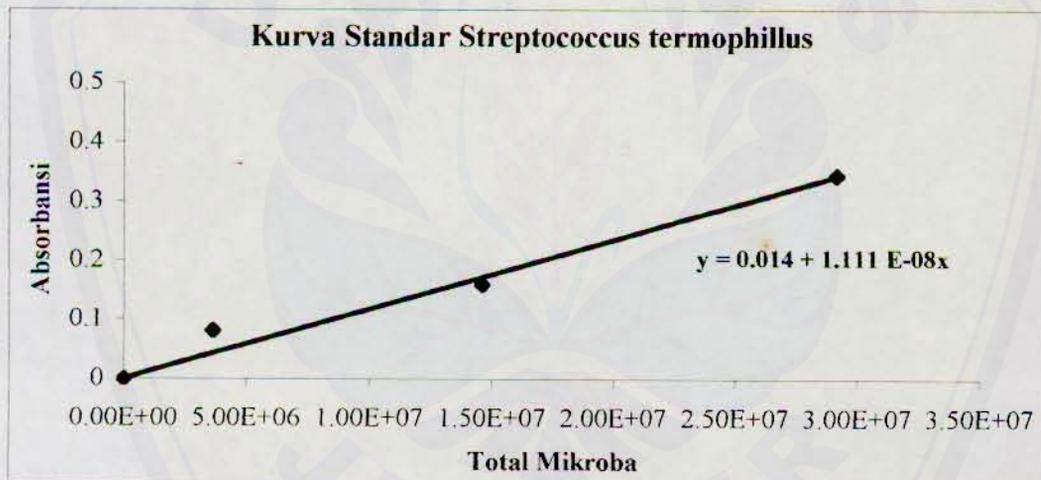
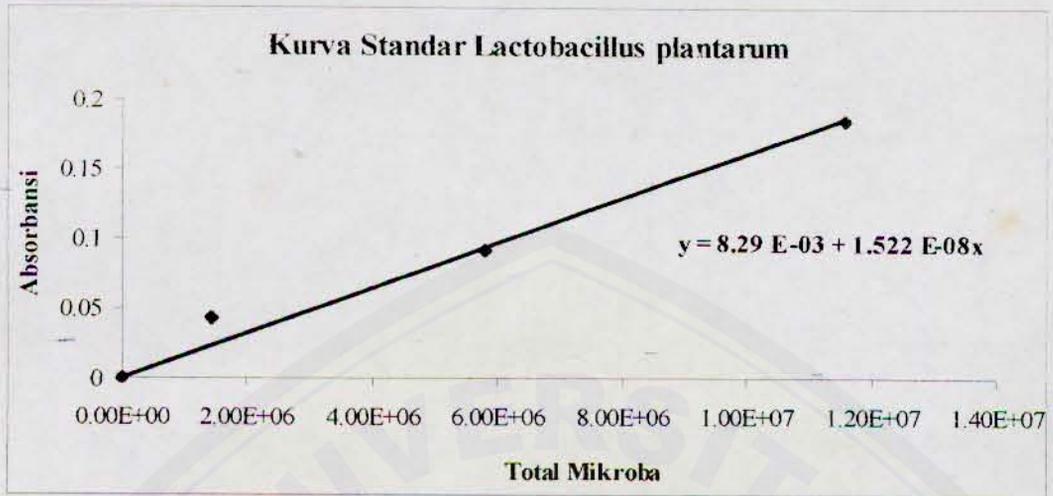
- , 1997. **Probiotic 2 : Application and Practical Aspects**. London : Chapman & Hall.
- Gibson, GR. dan Robertfoid, M.B. 1995. **Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota : Introducing the Concept of Prebiotics**. J. Nutr., 125, 1401-12.
- Gibson GR. 1998. **Dietary Modulation of The Human Colonic Microbiota : Introduction of Prebiotics**. J Nutr 125(6):1401-12.
- Gnoth MJ, Kunz C, Kinne-Saffran E Rudoff S. 2000: **Human Milk Oligosaccharides : Are minimally digested in vitro?**. J Nutr 130(12):3014-3020.
- Goldberg, I. 1994. **Functional Food**. New York : Chapman & Hall.
- Grizard D, Barthomeof C. 1999. **Non-Digestible Oligosaccharides Used as Prebiotic Agents : Mode of Production and Beneficial Effects on Animal and Humen Health**. Reprod Nutr Dev 39(6-6):563-88.
- Ito, M, Deguchi, Y, Miyamori, A. Matsumoto, K. Kikuchi, H. Matsumoto, K. Kobayashi, Y. Yajima, T. Kan, T. 1990. **Effects of Administration of Galactooligosaccharide on Human Faecal Microflora, Stool Weight and Abdominal Sensation**. Microbial. Ecol. Health Dis. 3:285-292.
- Iwasaki, K. Nakajima, M. dan Nakano, S. 1996. **Galacto-oligosaccharides Production from Lactose by an Enzymic Batch Reaction Using  $\beta$ -Galactosidase**. Process Biochemistry. 31 (1) : 69 – 76.
- Kandler, O. 1983. **Carbohydrate Metabolism in Lactic Acid Bacteria**. *Antonie van Leeuwenhoek*; 49:209-224.
- , 1984. **Current Taxonomy of Lactobacilli**. Dev. Ind. Microbiol., 54:3053-3056.
- Kandler, O and Weiss, N. 1986. **Regular, Non Sporing Gram Positive Rods**. Dalam *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2 (P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt, eds.). Baltimore : Williams and Wilkins, pp. 1208-1234.
- Kaplan, H dan Hutkins, R.W. 2000. **"Fermentation of Fructooligosaccharide by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria"**. Dalam *Applied and Environmental Microbiology*. (Juni, 2000). P. 2682-2684. American Society for Microbiology.
- Kun, L.Y. 2002. **Mencari Antikanker dan Antikolesterol dari Bakteri Probiotik**. Jakarta : Harian Kompas (edisi 22 Desember 2002).

- Kunz, C dan Rudloff, S. 1996. **Strukturelle und Funktionelle Aspekte von Oligosacchariden in Fraumilch**. Z Emanrungswiss 35:22-31
- Macfarlane dan Cummings. 1999. **Biomedical Journal : "Probiotics and Prebiotics : can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health ? "**. <http://www.bmj.com>.
- McCracken VJ, Gaskin HR. 1999. **Probiotics and the Immune System**. Horizon Scientific Press. <http://horizonpress.com/hsp/pro.html> 16 November 1999.
- Metchnikoff, E. 1908. **The Prolongation of Life**. New York : G.P. Putnam's Sons.
- Muchtadi, D. 1996. **Makanan Fungsional : Pengendalian dan Perancangannya**. Kursus Singkat Makanan Fungsional. Yogyakarta, 8 – 9 Juli 1996.
- Nakano, H. Hamayasu, K. Fujita, K. Hara, K. Ohi, M. Yashizumi, H. dan Kitahata, S. 1995. **Synthesis of 2-Deoxy Glucooligosaccharides through Condensation of 2-Deoxy-D-glucose by Glucoamylase and  $\alpha$ -Glucosidase**, Biosci. Biotech. Biochem. 59, 1732-1736.
- Nienaber. 1996. **Regulation and Industrial Prospect at Functional Food**. Dalam Muchtadi, D. **Makanan Fungsional : Pengendalian dan Perancangannya**. Kursus Singkat Makanan Fungsional. Yogyakarta, 8 – 9 Juli 1996.
- Nuraida, L. 1996. **Bifidobakteria dan Oligosakarida dalam Minuman dan Makanan Fungsional**. Kursus Singkat Makanan Fungsional. Yogyakarta, 8 – 9 Juli 1996.
- Ofek, I. Dan Sharon, N. 1990. **Adhesins as Lectins : Specificity and Role in Infection**. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 151, 91-113.
- Page, DS. 1989. **Prinsip-prinsip Biokimia**. Jakarta : Penerbit Erlangga.
- Pelczar, M.J. dan E. C.S. Chan. 1986. **Dasar - Dasar Mikrobiologi**. Jakarta : Penerbit Universitas Indonesia.
- Potter, D. 1990. **Functional Foods - a major opportunity for the dairy industry ?**. *Dairy Ind. Int.* 55:32-33.
- Portmann, M-O, dan Birch, G. 1995. **Sweet Taste and Solution Properties of  $\alpha$ , $\alpha$ -Trehalose**. *J. Sci. Food Agric.*, 69, 275-281.
- Prangdimurti, E. 2001. **Probiotik dan Efek Perlindungannya Terhadap Kanker Kolon**. (<http://www.kompas.com>)

- Rastall, R.A. 1999. **Introduction to Enzyme Technology Hand Out**. Inggris.
- , 2000. **Second Generation Prebiotics**. Division of Food Microbial Science. Reading, (<http://www.fst.rdg.ac.uk/prebiotics.htm>).
- Rastall, R.A. Aclard, M.W. dan Bucke, C. 1991. **Synthesis of Oligosaccharides by Glucoamylase in Reverse**. *Biotechnology Letters*. 13, 501-504.
- Roberts, dkk. 1995. **Introduction to Biocatalysis Using Enzymes and Microorganism**. USA : Cambridge University.
- Salminen, S and von Wright, A. 1998. **Lactic Acid Bacteria : Microbiology and Fungsional Aspect**. Edisi Kedua. New York : Marcel Dekker Inc.
- Sanders, M.E., Kondo, J.K., and Wilrett, D.L. 1991. **Application of Lactic Acid Bacteria**. Dalam *Biotechnology and Food Ingredients*. I. Golberg and R. Williams., eds. Pp 4333-459. New York : Van Nostrand Reinhold.
- Schlegel, H.G. 1994. **Mikrobiologi Umum**. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press.
- Sibuea, P. 2002. **Probiotik : Hidup Sehat Bersama Bakteri ..!**. Jakarta : Harian Kompas (edisi 23 Oktober 2002).
- Silalahi, J. 2001. **Manfaat dan Khasiat Probiotik untuk Mencegah Penyakit**. Jakarta : Harian Kompas (edisi 2 September 2001).
- Sudarmadji, S. dkk. 1995. **Analisis Bahan Makanan dan Pertanian**. Yogyakarta: Liberty.
- Suriawiria, U. 1985. **Pengantar Mikrobiologi Umum**. Bandung : Penerbit Angkasa.
- Suwasono, S., Utami, T., Indrati, R., dan Ani, E.R. 2001. **Sintesa Galaktooligosakarida Secara enzimatik dengan  $\beta$ -Galaktosidase dari *Aspergillus oryzae***. Dalam: B. Widianarko (Ed). *Mikrobiologi dan Bioteknologi Pangan*. Himpunan Makalah Seminar Nasional Teknologi Pangan, 112-128.
- Wasposito, I.S. 2001. **"Efek Probiotik, Prebiotik dan Synbiotik bagi Kesehatan"**. Jakarta : Harian Kompas (edisi 30 September 2001).
- Winarno, F.G. 1986. **Enzim Pangan**. Bogor : Pusat Pengembangan Teknologi Pangan - Institut Pertanian Bogor.

Lampiran 1 . Kurva Standar Total Mikroba





Lampiran 2. Data Pengamatan *Lactobacillus bulgaricus* pada Pengujian Homo-GalOS

| GalOS (%) | jam ke - | pH   |      |           | OD    |       |           | total mikroba |          |           | pertumbuhan |      |           |
|-----------|----------|------|------|-----------|-------|-------|-----------|---------------|----------|-----------|-------------|------|-----------|
|           |          | 1    | 2    | Rata-rata | 1     | 2     | Rata-rata | 1             | 2        | Rata-rata | 1           | 2    | Rata-rata |
| 0         | 0        |      |      |           | 0.010 | 0.010 | 0.010     | 1.00E+06      | 1.00E+06 | 1.00E+07  | +           | +    | +         |
|           | 0.5      | 6.39 | 6.71 | 6.55      | 0.072 | 0.051 | 0.062     | 4.73E+07      | 3.00E+07 | 3.91E+07  | ++          | ++   | ++        |
|           | 1        | 6.32 | 6.54 | 6.43      | 0.133 | 0.092 | 0.113     | 9.71E+07      | 6.36E+07 | 8.12E+07  | +++         | +++  | +++       |
|           | 1.5      | 6.28 | 6.44 | 6.36      | 0.191 | 0.132 | 0.163     | 1.45E+08      | 9.67E+07 | 1.22E+08  | +++         | +++  | +++       |
|           | 2        | 6.25 | 6.37 | 6.31      | 0.247 | 0.171 | 0.211     | 1.92E+08      | 1.29E+08 | 1.62E+08  | +++         | +++  | +++       |
|           | 4        | 6.32 | 6.19 | 6.26      | 0.576 | 0.417 | 0.497     | 4.64E+08      | 3.32E+08 | 3.98E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
|           | 6        | 6.06 | 6.03 | 6.05      | 0.627 | 0.597 | 0.612     | 5.06E+08      | 4.81E+08 | 4.93E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
|           | 9        | 5.97 | 6.14 | 6.06      | 0.897 | 0.651 | 0.774     | 7.29E+08      | 5.26E+08 | 6.27E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
|           | 18       | 6.00 | 5.96 | 5.98      | 0.750 | 0.687 | 0.719     | 6.07E+08      | 5.55E+08 | 5.81E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
|           | 24       | 6.10 | 5.73 | 5.92      | 0.885 | 1.377 | 1.131     | 7.19E+08      | 1.13E+09 | 9.22E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
| 20        | 0        |      |      |           | 0.010 | 0.010 | 0.010     | 1.00E+07      | 1.00E+07 | 1.00E+07  | +           | +    | +         |
|           | 0.5      | 6.80 | 6.73 | 6.77      | 0.076 | 0.060 | 0.068     | 5.05E+07      | 3.74E+07 | 4.39E+07  | ++          | ++   | ++        |
|           | 1        | 6.57 | 6.53 | 6.55      | 0.140 | 0.109 | 0.125     | 1.03E+08      | 7.80E+07 | 9.06E+07  | +++         | +++  | +++       |
|           | 1.5      | 6.45 | 6.41 | 6.43      | 0.201 | 0.157 | 0.179     | 1.54E+08      | 1.18E+08 | 1.36E+08  | +++         | +++  | +++       |
|           | 2        | 6.36 | 6.33 | 6.34      | 0.260 | 0.204 | 0.232     | 2.03E+08      | 1.57E+08 | 1.80E+08  | +++         | +++  | +++       |
|           | 4        | 6.26 | 6.21 | 6.24      | 0.507 | 0.495 | 0.501     | 4.07E+08      | 3.97E+08 | 4.02E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
|           | 6        | 6.06 | 6.04 | 6.05      | 0.561 | 0.558 | 0.560     | 4.51E+08      | 4.49E+08 | 4.50E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
|           | 9        | 5.92 | 6.02 | 5.97      | 0.816 | 0.627 | 0.722     | 6.62E+08      | 5.06E+08 | 5.84E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
|           | 18       | 5.61 | 5.64 | 5.63      | 0.936 | 1.020 | 0.978     | 7.61E+08      | 8.31E+08 | 7.96E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
|           | 24       | 5.69 | 5.69 | 5.69      | 0.630 | 1.239 | 0.935     | 5.08E+08      | 1.01E+09 | 7.60E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
| 30        | 0        |      |      |           | 0.010 | 0.010 | 0.010     | 1.00E+07      | 1.00E+07 | 1.00E+07  | +           | +    | +         |
|           | 0.5      | 6.62 | 6.73 | 6.67      | 0.055 | 0.074 | 0.065     | 3.27E+07      | 4.91E+07 | 4.09E+07  | ++          | ++   | ++        |
|           | 1        | 6.47 | 6.52 | 6.49      | 0.098 | 0.137 | 0.117     | 6.85E+07      | 1.01E+08 | 8.46E+07  | +++         | +++  | +++       |
|           | 1.5      | 6.38 | 6.40 | 6.39      | 0.140 | 0.197 | 0.169     | 1.03E+08      | 1.51E+08 | 1.27E+08  | +++         | +++  | +++       |
|           | 2        | 6.32 | 6.32 | 6.32      | 0.181 | 0.256 | 0.218     | 1.37E+08      | 1.99E+08 | 1.68E+08  | +++         | +++  | +++       |
|           | 4        | 6.25 | 6.19 | 6.22      | 0.486 | 0.495 | 0.491     | 3.89E+08      | 3.97E+08 | 3.93E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
|           | 6        | 6.06 | 6.01 | 6.04      | 0.501 | 0.612 | 0.557     | 4.02E+08      | 4.93E+08 | 4.48E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
|           | 9        | 6.00 | 5.93 | 5.97      | 0.537 | 0.915 | 0.726     | 4.31E+08      | 7.44E+08 | 5.88E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
|           | 18       | 5.98 | 5.66 | 5.82      | 0.561 | 0.936 | 0.749     | 4.51E+08      | 7.61E+08 | 6.06E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
|           | 24       | 5.72 | 5.67 | 5.70      | 0.798 | 0.903 | 0.851     | 6.47E+08      | 7.34E+08 | 6.90E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
| 40        | 0        |      |      |           | 0.010 | 0.010 | 0.010     | 1.00E+07      | 1.00E+07 | 1.00E+07  | +           | +    | +         |
|           | 0.5      | 6.72 | 6.76 | 6.74      | 0.079 | 0.057 | 0.068     | 5.30E+07      | 3.51E+07 | 4.40E+07  | ++          | ++   | ++        |
|           | 1        | 6.51 | 6.54 | 6.53      | 0.146 | 0.104 | 0.125     | 1.08E+08      | 7.33E+07 | 9.07E+07  | +++         | +++  | +++       |
|           | 1.5      | 6.40 | 6.41 | 6.41      | 0.210 | 0.149 | 0.179     | 1.61E+08      | 1.11E+08 | 1.36E+08  | +++         | +++  | +++       |
|           | 2        | 6.31 | 6.33 | 6.32      | 0.272 | 0.193 | 0.232     | 2.12E+08      | 1.47E+08 | 1.80E+08  | +++         | +++  | +++       |
|           | 4        | 6.26 | 6.15 | 6.21      | 0.507 | 0.480 | 0.494     | 4.07E+08      | 3.84E+08 | 3.95E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
|           | 6        | 5.99 | 6.03 | 6.01      | 0.564 | 0.513 | 0.539     | 4.54E+08      | 4.12E+08 | 4.33E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
|           | 9        | 5.85 | 6.01 | 5.93      | 0.933 | 0.468 | 0.701     | 7.59E+08      | 3.74E+08 | 5.67E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
|           | 18       | 5.64 | 5.57 | 5.61      | 0.921 | 0.975 | 0.948     | 7.49E+08      | 7.93E+08 | 7.71E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
|           | 24       | 5.71 | 5.63 | 5.67      | 0.609 | 0.954 | 0.782     | 4.91E+08      | 7.76E+08 | 6.33E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
| 50        | 0        |      |      |           | 0.010 | 0.010 | 0.010     | 1.00E+07      | 1.00E+07 | 1.00E+07  | +           | +    | +         |
|           | 0.5      | 6.50 | 6.75 | 6.62      | 0.061 | 0.070 | 0.066     | 3.83E+07      | 4.57E+07 | 4.20E+07  | ++          | ++   | ++        |
|           | 1        | 6.38 | 6.53 | 6.45      | 0.111 | 0.129 | 0.120     | 7.93E+07      | 9.40E+07 | 8.66E+07  | +++         | +++  | +++       |
|           | 1.5      | 6.31 | 6.41 | 6.36      | 0.159 | 0.185 | 0.172     | 1.19E+08      | 1.41E+08 | 1.30E+08  | +++         | +++  | +++       |
|           | 2        | 6.26 | 6.32 | 6.29      | 0.205 | 0.239 | 0.222     | 1.57E+08      | 1.85E+08 | 1.71E+08  | +++         | +++  | +++       |
|           | 4        | 6.21 | 6.15 | 6.18      | 0.516 | 0.546 | 0.531     | 4.14E+08      | 4.39E+08 | 4.26E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
|           | 6        | 6.02 | 6.03 | 6.03      | 0.477 | 0.531 | 0.504     | 3.82E+08      | 4.26E+08 | 4.04E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
|           | 9        | 6.00 | 6.01 | 6.01      | 0.591 | 0.675 | 0.633     | 4.76E+08      | 5.45E+08 | 5.11E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
|           | 18       | 5.94 | 5.62 | 5.78      | 0.693 | 0.984 | 0.839     | 5.60E+08      | 8.01E+08 | 6.81E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |
|           | 24       | 5.80 | 5.60 | 5.70      | 0.609 | 0.636 | 0.623     | 4.91E+08      | 5.13E+08 | 5.02E+08  | ++++        | ++++ | ++++      |

### Lampiran 3. Data Pengamatan *Lactobacillus sp.* dan *Streptococcus sp.* Pada Pengujian Hetero-GalOS

#### 1. *Lactobacillus bulgaricus*

| Jenis GalOS               | waktu inkubasi 3 jam |   |   |           |      |      |                 |           |       |               |       |           |          |          |          |
|---------------------------|----------------------|---|---|-----------|------|------|-----------------|-----------|-------|---------------|-------|-----------|----------|----------|----------|
|                           | pertumbuhan          |   |   | pH        |      |      | OD (absorbansi) |           |       | total mikroba |       |           |          |          |          |
|                           | 1                    | 2 | 3 | rata-rata | 1    | 2    | 3               | rata-rata | 1     | 2             | 3     | rata-rata |          |          |          |
| 1. Galaktosil - Laktosa   | +                    | + | + | 5.57      | 5.62 | 5.57 | 5.59            | 0.654     | 0.651 | 0.606         | 0.637 | 5.28E+08  | 5.26E+08 | 4.88E+08 | 5.14E+08 |
| 2. Galaktosil - Glukosa   | +                    | + | + | 5.51      | 5.59 | 5.56 | 5.55            | 1.116     | 1.254 | 0.789         | 1.053 | 9.10E+08  | 1.02E+09 | 6.40E+08 | 8.58E+08 |
| 3. Galaktosil - Manosa    | +                    | + | + | 5.44      | 5.43 | 5.48 | 5.45            | 1.695     | 1.602 | 1.512         | 1.603 | 1.39E+09  | 1.31E+09 | 1.24E+09 | 1.31E+09 |
| 4. Galaktosil - Maltosa   | +                    | + | + | 5.54      | 5.54 | 5.48 | 5.52            | 1.560     | 1.446 | 1.761         | 1.589 | 1.28E+09  | 1.18E+09 | 1.44E+09 | 1.30E+09 |
| 5. Galaktosil - Sukrosa   | +                    | + | + | 5.52      | 5.45 | 5.44 | 5.47            | 1.371     | 1.278 | 1.320         | 1.323 | 1.12E+09  | 1.04E+09 | 1.08E+09 | 1.08E+09 |
| 6. Galaktosil - Trehalosa | +                    | + | + | 5.36      | 5.40 | 5.37 | 5.38            | 0.768     | 0.879 | 1.908         | 1.185 | 6.22E+08  | 7.14E+08 | 1.56E+09 | 9.67E+08 |

| Jenis GalOS               | waktu inkubasi 24 jam |     |    |           |      |      |                 |           |       |               |       |           |          |          |          |
|---------------------------|-----------------------|-----|----|-----------|------|------|-----------------|-----------|-------|---------------|-------|-----------|----------|----------|----------|
|                           | pertumbuhan           |     |    | pH        |      |      | OD (absorbansi) |           |       | total mikroba |       |           |          |          |          |
|                           | 1                     | 2   | 3  | rata-rata | 1    | 2    | 3               | rata-rata | 1     | 2             | 3     | rata-rata |          |          |          |
| 1. Galaktosil - Laktosa   | +                     | +   | +  | 5.55      | 5.59 | 5.63 | 5.59            | 0.846     | 0.786 | 0.852         | 0.828 | 6.87E+08  | 6.37E+08 | 6.92E+08 | 6.72E+08 |
| 2. Galaktosil - Glukosa   | ++                    | ++  | ++ | 4.98      | 5.00 | 4.88 | 4.95            | 2.112     | 2.460 | 1.881         | 2.151 | 1.73E+09  | 2.02E+09 | 1.54E+09 | 1.77E+09 |
| 3. Galaktosil - Manosa    | +                     | +   | +  | 5.31      | 5.38 | 5.27 | 5.32            | 1.833     | 1.935 | 2.196         | 1.988 | 1.50E+09  | 1.59E+09 | 1.80E+09 | 1.63E+09 |
| 4. Galaktosil - Maltosa   | +                     | +   | +  | 5.61      | 5.82 | 5.54 | 5.66            | 2.028     | 2.316 | 2.280         | 2.208 | 1.66E+09  | 1.90E+09 | 1.87E+09 | 1.81E+09 |
| 5. Galaktosil - Sukrosa   | ++                    | ++  | ++ | 5.38      | 5.58 | 5.24 | 5.40            | 2.532     | 2.538 | 2.442         | 2.504 | 2.08E+09  | 2.09E+09 | 2.01E+09 | 2.06E+09 |
| 6. Galaktosil - Trehalosa | +++                   | +++ | +  | 5.61      | 5.53 | 5.54 | 5.56            | 2.019     | 2.688 | 2.028         | 2.245 | 1.66E+09  | 2.21E+09 | 1.66E+09 | 1.84E+09 |

2. *Lactobacillus casei*

| Jenis GalOS               | waktu inkubasi 3 jam |   |   |           |      |      |                 |           |       |               |       |           |          |          |          |
|---------------------------|----------------------|---|---|-----------|------|------|-----------------|-----------|-------|---------------|-------|-----------|----------|----------|----------|
|                           | pertumbuhan          |   |   | pH        |      |      | OD (absorbansi) |           |       | total mikroba |       |           |          |          |          |
|                           | 1                    | 2 | 3 | rata-rata | 1    | 2    | 3               | rata-rata | 1     | 2             | 3     | rata-rata |          |          |          |
| 1. Galaktosil - Laktosa   | +                    | + | + | 5.46      | 5.53 | 5.43 | 5.47            | 0.777     | 0.789 | 0.777         | 0.781 | 6.93E+07  | 7.04E+07 | 6.93E+07 | 6.97E+07 |
| 2. Galaktosil - Glukosa   | +                    | + | + | 5.48      | 5.55 | 5.43 | 5.49            | 0.405     | 0.879 | 0.564         | 0.616 | 3.54E+07  | 7.86E+07 | 4.99E+07 | 5.47E+07 |
| 3. Galaktosil - Manosa    | +                    | + | + | 5.28      | 5.31 | 5.31 | 5.30            | 1.731     | 1.290 | 1.155         | 1.392 | 1.56E+08  | 1.16E+08 | 1.04E+08 | 1.25E+08 |
| 4. Galaktosil - Maltosa   | +                    | + | + | 5.34      | 5.29 | 5.33 | 5.32            | 1.647     | 1.848 | 1.863         | 1.786 | 1.49E+08  | 1.67E+08 | 1.68E+08 | 1.61E+08 |
| 5. Galaktosil - Sukrosa   | +                    | + | + | 5.42      | 5.36 | 5.32 | 5.37            | 1.296     | 1.392 | 1.674         | 1.454 | 1.17E+08  | 1.25E+08 | 1.51E+08 | 1.31E+08 |
| 6. Galaktosil - Trehalosa | +                    | + | + | 5.19      | 5.27 | 5.27 | 5.24            | 1.488     | 1.578 | 1.548         | 1.538 | 1.β4E+08  | 1.42E+08 | 1.40E+08 | 1.39E+08 |

| Jenis GalOS               | waktu inkubasi 24 jam |     |      |           |      |      |                 |           |       |               |       |           |          |          |          |
|---------------------------|-----------------------|-----|------|-----------|------|------|-----------------|-----------|-------|---------------|-------|-----------|----------|----------|----------|
|                           | pertumbuhan           |     |      | pH        |      |      | OD (absorbansi) |           |       | total mikroba |       |           |          |          |          |
|                           | 1                     | 2   | 3    | rata-rata | 1    | 2    | 3               | rata-rata | 1     | 2             | 3     | rata-rata |          |          |          |
| 1. Galaktosil - Laktosa   | +                     | +++ | +++  | 4.71      | 4.71 | 4.59 | 4.67            | 0.843     | 2.550 | 2.682         | 2.025 | 7.54E+07  | 2.31E+08 | 2.43E+08 | 1.83E+08 |
| 2. Galaktosil - Glukosa   | +++++                 | +++ | ++++ | 4.49      | 4.40 | 4.10 | 4.33            | 2.274     | 2.292 | 2.724         | 2.430 | 2.06E+08  | 2.08E+08 | 2.47E+08 | 2.20E+08 |
| 3. Galaktosil - Manosa    | ++                    | ++  | ++   | 4.33      | 4.30 | 4.29 | 4.31            | 2.850     | 2.418 | 2.850         | 2.706 | 2.58E+08  | 2.19E+08 | 2.58E+08 | 2.45E+08 |
| 4. Galaktosil - Maltosa   | ++                    | ++  | ++   | 4.63      | 4.59 | 4.65 | 4.62            | 3.012     | 2.964 | 2.982         | 2.986 | 2.73E+08  | 2.69E+08 | 2.71E+08 | 2.71E+08 |
| 5. Galaktosil - Sukrosa   | ++                    | ++  | +    | 4.78      | 4.84 | 4.87 | 4.83            | 2.802     | 2.826 | 2.478         | 2.702 | 2.54E+08  | 2.56E+08 | 2.25E+08 | 2.45E+08 |
| 6. Galaktosil - Trehalosa | ++                    | ++  | ++   | 4.68      | 4.68 | 4.64 | 4.67            | 2.580     | 2.532 | 2.466         | 2.526 | 2.34E+08  | 2.29E+08 | 2.23E+08 | 2.29E+08 |

3. *Lactobacillus lactis*

| Jenis Hetero-GalOS       | waktu inkubasi 3 jam |   |   |           |      |      |                 |           |       |               |       |           |          |          |          |
|--------------------------|----------------------|---|---|-----------|------|------|-----------------|-----------|-------|---------------|-------|-----------|----------|----------|----------|
|                          | pertumbuhan          |   |   | pH        |      |      | OD (absorbansi) |           |       | total mikroba |       |           |          |          |          |
|                          | 1                    | 2 | 3 | rata-rata | 1    | 2    | 3               | rata-rata | 1     | 2             | 3     | rata-rata |          |          |          |
| 1. Galaktosa - Laktosa   | +                    | + | + | 5.90      | 5.87 | 5.84 | 5.87            | 0.633     | 0.639 | 0.672         | 0.648 | 3.96E+07  | 4.06E+07 | 4.21E+07 | 4.05E+07 |
| 2. Galaktosa - Glukosa   | +                    | + | + | 5.56      | 5.58 | 5.60 | 5.58            | 0.255     | 0.246 | 0.219         | 0.240 | 1.56E+07  | 1.51E+07 | 1.34E+07 | 1.47E+07 |
| 3. Galaktosa - Manosa    | +                    | + | + | 5.41      | 5.48 | 5.46 | 5.45            | 0.369     | 0.351 | 0.384         | 0.368 | 2.29E+07  | 2.17E+07 | 2.38E+07 | 2.28E+07 |
| 4. Galaktosa - Maltosa   | +                    | + | + | 5.41      | 5.39 | 5.46 | 5.42            | 0.609     | 0.663 | 0.234         | 0.502 | 3.81E+07  | 4.15E+07 | 1.43E+07 | 3.13E+07 |
| 5. Galaktosa - Sukrosa   | +                    | + | + | 5.53      | 5.48 | 5.47 | 5.49            | 0.480     | 0.483 | 0.417         | 0.460 | 2.99E+07  | 3.01E+07 | 2.59E+07 | 2.86E+07 |
| 6. Galaktosa - Trehalosa | +                    | + | + | 5.36      | 5.37 | 5.33 | 5.35            | 0.405     | 0.471 | 0.507         | 0.461 | 2.52E+07  | 2.93E+07 | 3.16E+07 | 2.87E+07 |

| Jenis Hetero-GalOS       | waktu inkubasi 24 jam |     |      |           |      |      |                 |           |       |               |       |           |          |          |          |
|--------------------------|-----------------------|-----|------|-----------|------|------|-----------------|-----------|-------|---------------|-------|-----------|----------|----------|----------|
|                          | pertumbuhan           |     |      | pH        |      |      | OD (absorbansi) |           |       | total mikroba |       |           |          |          |          |
|                          | 1                     | 2   | 3    | rata-rata | 1    | 2    | 3               | rata-rata | 1     | 2             | 3     | rata-rata |          |          |          |
| 1. Galaktosa - Laktosa   | +                     | +   | +    | 5.62      | 5.55 | 5.51 | 5.56            | 0.810     | 0.810 | 0.840         | 0.820 | 5.08E+07  | 5.08E+07 | 5.27E+07 | 5.14E+07 |
| 2. Galaktosa - Glukosa   | ++++                  | +++ | ++++ | 4.82      | 4.78 | 4.78 | 4.79            | 0.930     | 0.738 | 1.032         | 0.900 | 5.84E+07  | 4.63E+07 | 6.49E+07 | 5.65E+07 |
| 3. Galaktosa - Manosa    | ++                    | +++ | ++   | 5.05      | 4.96 | 5.06 | 5.02            | 0.744     | 0.891 | 0.654         | 0.763 | 4.66E+07  | 5.59E+07 | 4.09E+07 | 4.78E+07 |
| 4. Galaktosa - Maltosa   | +                     | +   | +++  | 5.55      | 5.60 | 5.60 | 5.58            | 0.771     | 0.840 | 0.840         | 0.817 | 4.83E+07  | 5.27E+07 | 5.27E+07 | 5.13E+07 |
| 5. Galaktosa - Sukrosa   | ++                    | ++  | ++   | 5.28      | 5.33 | 5.34 | 5.32            | 1.182     | 1.101 | 1.023         | 1.102 | 7.44E+07  | 6.93E+07 | 6.43E+07 | 6.93E+07 |
| 6. Galaktosa - Trehalosa | ++                    | ++  | +    | 5.52      | 5.52 | 5.57 | 5.54            | 0.909     | 0.984 | 0.525         | 0.806 | 5.71E+07  | 6.18E+07 | 3.28E+07 | 5.06E+07 |

4. *Lactobacillus plantarum*

| Jenis GalOS               | waktu inkubasi 3 jam |   |   |           |      |      |                 |           |       |               |       |           |          |          |          |
|---------------------------|----------------------|---|---|-----------|------|------|-----------------|-----------|-------|---------------|-------|-----------|----------|----------|----------|
|                           | pertumbuhan          |   |   | pH        |      |      | OD (absorbansi) |           |       | total mikroba |       |           |          |          |          |
|                           | 1                    | 2 | 3 | rata-rata | 1    | 2    | 3               | rata-rata | 1     | 2             | 3     | rata-rata |          |          |          |
| 1. Galaktosil - Laktosa   | +                    | + | + | 5.61      | 5.62 | 5.61 | 5.61            | 0.417     | 0.474 | 0.474         | 0.455 | 2.69E+07  | 3.06E+07 | 3.06E+07 | 2.94E+07 |
| 2. Galaktosil - Glukosa   | +                    | + | + | 5.61      | 5.58 | 5.59 | 5.59            | 0.384     | 0.972 | 1.047         | 0.801 | 2.47E+07  | 6.33E+07 | 6.82E+07 | 5.21E+07 |
| 3. Galaktosil - Manosa    | +                    | + | + | 5.52      | 5.44 | 5.43 | 5.46            | 0.939     | 1.734 | 1.473         | 1.382 | 6.12E+07  | 1.13E+08 | 9.62E+07 | 9.03E+07 |
| 4. Galaktosil - Maltosa   | +                    | + | + | 5.42      | 5.41 | 5.42 | 5.42            | 1.947     | 1.470 | 2.196         | 1.871 | 1.27E+08  | 9.60E+07 | 1.44E+08 | 1.22E+08 |
| 5. Galaktosil - Sukrosa   | +                    | + | + | 5.49      | 5.47 | 5.48 | 5.48            | 1.107     | 0.960 | 1.086         | 1.051 | 7.22E+07  | 6.25E+07 | 7.08E+07 | 6.85E+07 |
| 6. Galaktosil - Trehalosa | +                    | + | + | 5.40      | 5.44 | 5.39 | 5.41            | 1.467     | 1.080 | 1.257         | 1.268 | 9.58E+07  | 7.04E+07 | 8.20E+07 | 8.28E+07 |

| Jenis GalOS              | waktu inkubasi 24 jam |       |       |           |      |      |                 |           |       |               |       |           |          |          |          |
|--------------------------|-----------------------|-------|-------|-----------|------|------|-----------------|-----------|-------|---------------|-------|-----------|----------|----------|----------|
|                          | pertumbuhan           |       |       | pH        |      |      | OD (absorbansi) |           |       | total mikroba |       |           |          |          |          |
|                          | 1                     | 2     | 3     | rata-rata | 1    | 2    | 3               | rata-rata | 1     | 2             | 3     | rata-rata |          |          |          |
| 1. Galaktosa - Laktosa   | +++++                 | +++++ | +++++ | 5.01      | 4.95 | 4.94 | 4.97            | 2.352     | 2.322 | 2.382         | 2.352 | 1.54E+08  | 1.52E+08 | 1.56E+08 | 1.54E+08 |
| 2. Galaktosa - Glukosa   | +++++                 | ++    | ++    | 4.32      | 4.22 | 4.34 | 4.29            | 1.797     | 2.400 | 2.532         | 2.243 | 1.18E+08  | 1.57E+08 | 1.66E+08 | 1.47E+08 |
| 3. Galaktosa - Manosa    | +                     | +     | ++    | 5.32      | 5.36 | 4.36 | 5.01            | 0.840     | 1.425 | 2.268         | 1.511 | 5.46E+07  | 9.31E+07 | 1.48E+08 | 9.87E+07 |
| 4. Galaktosa - Maltosa   | +                     | ++    | +     | 4.94      | 5.02 | 4.99 | 4.98            | 2.196     | 2.700 | 2.070         | 2.322 | 1.44E+08  | 1.77E+08 | 1.35E+08 | 1.52E+08 |
| 5. Galaktosa - Sukrosa   | ++                    | ++    | ++    | 4.85      | 4.84 | 4.84 | 4.84            | 2.586     | 2.358 | 2.382         | 2.442 | 1.69E+08  | 1.54E+08 | 1.56E+08 | 1.60E+08 |
| 6. Galaktosa - Trehalosa | +                     | ++    | ++    | 5.09      | 5.04 | 5.13 | 5.09            | 2.124     | 1.983 | 1.965         | 2.024 | 1.39E+08  | 1.30E+08 | 1.29E+08 | 1.32E+08 |

5. *Lactobacillus rhamnosus*

| Jenis Hetero-GalOS       | waktu inkubasi 3 jam |   |   |           |      |      |                 |           |       |               |       |           |          |          |          |
|--------------------------|----------------------|---|---|-----------|------|------|-----------------|-----------|-------|---------------|-------|-----------|----------|----------|----------|
|                          | pertumbuhan          |   |   | pH        |      |      | OD (absorbansi) |           |       | total mikroba |       |           |          |          |          |
|                          | 1                    | 2 | 3 | rata-rata | 1    | 2    | 3               | rata-rata | 1     | 2             | 3     | rata-rata |          |          |          |
| 1. Galaktosa - Laktosa   | +                    | + | + | 5.85      | 5.76 | 5.66 | 5.76            | 0.762     | 0.660 | 0.465         | 0.629 | 6.11E+07  | 5.27E+07 | 3.68E+07 | 5.02E+07 |
| 2. Galaktosa - Glukosa   | +                    | + | + | 5.59      | 5.56 | 5.58 | 5.58            | 0.405     | 0.606 | 0.450         | 0.487 | 3.19E+07  | 4.83E+07 | 3.56E+07 | 3.86E+07 |
| 3. Galaktosa - Manosa    | +                    | + | + | 5.47      | 5.40 | 5.46 | 5.44            | 1.335     | 1.863 | 1.686         | 1.628 | 1.08E+08  | 1.51E+08 | 1.37E+08 | 1.32E+08 |
| 4. Galaktosa - Maltosa   | +                    | + | + | 5.98      | 5.40 | 5.43 | 5.60            | 1.494     | 1.082 | 1.311         | 1.296 | 1.21E+08  | 8.72E+07 | 1.06E+08 | 1.05E+08 |
| 5. Galaktosa - Sukrosa   | +                    | + | + | 5.50      | 5.52 | 5.49 | 5.50            | 0.549     | 0.630 | 1.953         | 1.044 | 4.37E+07  | 5.03E+07 | 1.58E+08 | 8.41E+07 |
| 6. Galaktosa - Trehalosa | +                    | + | + | 5.36      | 5.44 | 5.36 | 5.39            | 1.137     | 1.134 | 1.092         | 1.121 | 9.17E+07  | 9.15E+07 | 8.81E+07 | 9.04E+07 |

| Jenis Hetero-GalOS       | waktu inkubasi 24 jam |      |      |           |      |      |                 |           |       |               |       |           |          |          |          |
|--------------------------|-----------------------|------|------|-----------|------|------|-----------------|-----------|-------|---------------|-------|-----------|----------|----------|----------|
|                          | pertumbuhan           |      |      | pH        |      |      | OD (absorbansi) |           |       | total mikroba |       |           |          |          |          |
|                          | 1                     | 2    | 3    | rata-rata | 1    | 2    | 3               | rata-rata | 1     | 2             | 3     | rata-rata |          |          |          |
| 1. Galaktosa - Laktosa   | ++                    | ++   | +++  | 5.25      | 5.40 | 5.35 | 5.33            | 1.572     | 1.248 | 1.293         | 1.371 | 1.27E+08  | 1.01E+08 | 1.04E+08 | 1.11E+08 |
| 2. Galaktosa - Glukosa   | ++++                  | ++++ | ++++ | 4.47      | 4.52 | 4.38 | 4.46            | 1.722     | 1.653 | 1.710         | 1.695 | 1.40E+08  | 1.34E+08 | 1.39E+08 | 1.37E+08 |
| 3. Galaktosa - Manosa    | +                     | +    | +    | 4.67      | 4.59 | 4.74 | 4.67            | 1.611     | 1.710 | 1.425         | 1.582 | 1.30E+08  | 1.39E+08 | 1.15E+08 | 1.28E+08 |
| 4. Galaktosa - Maltosa   | +                     | +    | +    | 5.51      | 5.50 | 5.40 | 5.47            | 0.954     | 1.014 | 1.158         | 1.042 | 7.68E+07  | 8.17E+07 | 9.35E+07 | 8.40E+07 |
| 5. Galaktosa - Sukrosa   | +++                   | +++  | +    | 5.19      | 5.12 | 5.25 | 5.19            | 1.761     | 1.737 | 1.608         | 1.702 | 1.43E+08  | 1.41E+08 | 1.30E+08 | 1.38E+08 |
| 6. Galaktosa - Trehalosa | +                     | +    | +    | 5.44      | 5.51 | 5.46 | 5.47            | 1.107     | 1.086 | 1.146         | 1.113 | 8.93E+07  | 8.76E+07 | 9.25E+07 | 8.98E+07 |

6. *Streptococcus thermophilus*

| Jenis Hetero-GalOS       | waktu inkubasi 3 jam |   |   |           |      |      |                 |           |       |               |       |           |          |          |          |
|--------------------------|----------------------|---|---|-----------|------|------|-----------------|-----------|-------|---------------|-------|-----------|----------|----------|----------|
|                          | pertumbuhan          |   |   | pH        |      |      | OD (absorbansi) |           |       | total mikroba |       |           |          |          |          |
|                          | 1                    | 2 | 3 | rata-rata | 1    | 2    | 3               | rata-rata | 1     | 2             | 3     | rata-rata |          |          |          |
| 1. Galaktosa - Laktosa   | +                    | + | + | 5.65      | 5.61 | 5.61 | 5.62            | 0.345     | 0.357 | 0.387         | 0.363 | 2.98E+07  | 3.09E+07 | 3.36E+07 | 3.14E+07 |
| 2. Galaktosa - Glukosa   | +                    | + | + | 5.55      | 5.62 | 5.57 | 5.58            | 0.345     | 0.264 | 0.195         | 0.268 | 2.98E+07  | 2.25E+07 | 1.63E+07 | 2.29E+07 |
| 3. Galaktosa - Manosa    | +                    | + | + | 5.47      | 5.49 | 5.42 | 5.46            | 0.390     | 0.465 | 0.384         | 0.413 | 3.38E+07  | 4.06E+07 | 3.33E+07 | 3.59E+07 |
| 4. Galaktosa - Maltosa   | +                    | + | + | 5.93      | 5.93 | 5.92 | 5.93            | 0.597     | 0.651 | 0.717         | 0.655 | 5.25E+07  | 5.73E+07 | 6.33E+07 | 5.77E+07 |
| 5. Galaktosa - Sukrosa   | +                    | + | + | 5.51      | 5.51 | 5.51 | 5.51            | 0.483     | 0.471 | 0.447         | 0.467 | 4.22E+07  | 4.11E+07 | 3.90E+07 | 4.08E+07 |
| 6. Galaktosa - Trehalosa | +                    | + | + | 5.38      | 5.41 | 5.38 | 5.39            | 0.489     | 0.555 | 0.423         | 0.489 | 4.28E+07  | 4.87E+07 | 3.68E+07 | 4.28E+07 |

| Jenis Hetero-GalOS       | waktu inkubasi 24 jam |      |      |           |      |      |                 |           |       |               |       |           |          |          |          |
|--------------------------|-----------------------|------|------|-----------|------|------|-----------------|-----------|-------|---------------|-------|-----------|----------|----------|----------|
|                          | pertumbuhan           |      |      | pH        |      |      | OD (absorbansi) |           |       | total mikroba |       |           |          |          |          |
|                          | 1                     | 2    | 3    | rata-rata | 1    | 2    | 3               | rata-rata | 1     | 2             | 3     | rata-rata |          |          |          |
| 1. Galaktosa - Laktosa   | +++                   | +++  | ++   | 5.46      | 5.40 | 5.46 | 5.44            | 1.137     | 1.146 | 0.939         | 1.074 | 1.01E+08  | 1.02E+08 | 8.33E+07 | 9.54E+07 |
| 2. Galaktosa - Glukosa   | +++                   | ++++ | ++++ | 4.85      | 4.78 | 4.73 | 4.79            | 0.945     | 1.029 | 1.026         | 0.846 | 8.38E+07  | 9.14E+07 | 9.11E+07 | 7.49E+07 |
| 3. Galaktosa - Manosa    | +++                   | +    | +    | 4.96      | 5.44 | 5.40 | 5.27            | 1.134     | 0.555 | 0.564         | 0.751 | 1.01E+08  | 4.87E+07 | 4.95E+07 | 6.63E+07 |
| 4. Galaktosa - Maltosa   | ++                    | +    | +    | 5.54      | 6.58 | 5.55 | 5.89            | 0.891     | 0.867 | 0.930         | 0.896 | 7.89E+07  | 7.68E+07 | 8.24E+07 | 7.94E+07 |
| 5. Galaktosa - Sukrosa   | ++                    | +++  | +++  | 5.43      | 5.33 | 5.30 | 5.35            | 0.912     | 1.278 | 1.281         | 1.157 | 8.08E+07  | 1.14E+08 | 1.14E+08 | 1.03E+08 |
| 6. Galaktosa - Trehalosa | ++++                  | ++   | ++   | 5.45      | 5.57 | 5.36 | 5.46            | 2.586     | 0.915 | 0.996         | 1.499 | 2.62E+08  | 8.11E+07 | 8.84E+07 | 1.34E+08 |

Keterangan:

|        |  |
|--------|--|
| +      | Pertumbuhan awal                                   |
| ++     | Terjadi peningkatan pertumbuhan menjadi dua kali   |
| +++    | Terjadi peningkatan pertumbuhan menjadi tiga kali  |
| ++++   | Terjadi peningkatan pertumbuhan menjadi empat kali |
| +++++  | Terjadi peningkatan pertumbuhan menjadi lima kali  |
| ++++++ | Terjadi peningkatan pertumbuhan menjadi enam kali  |

