

# PENGARUH KONSENTRASI INULIN TERHADAP VIABILITAS BAKTERI ASAM LAKTAT

OKTIFADILSA SAREBA

N111 04 055



No. Pendaftaran	24-3-10
Nama	Sareba
Tempat	Makassar
Waktu	2010
No. Inventaris	50
Kelembagaan	SER-FID

SAR  
P

PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2010

**PENGARUH KONSENTRASI INULIN TERHADAP  
VIABILITAS BAKTERI ASAM LAKTAT**

**SKRIPSI**

**untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi  
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana**

**OKTIFADILSA SAREBA  
N11104055**

**JURUSAN FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2010**

**PENGARUH KONSENTRASI INULIN TERHADAP VIABILITAS  
BAKTERI ASAM LAKTAT**

**OKTIFADILSA SAREBA**

**N11104055**

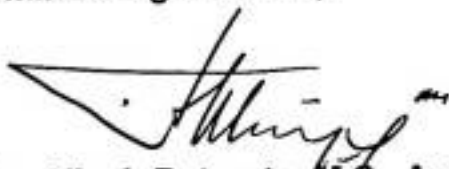
**Disetujui oleh :**

**Pembimbing Utama,**




**Dra. Hj. Sartini, M.Si, Apt.  
Nip.19611111 198703 2 001**

**Pembimbing Pertama,**



**Dra. Aliyah Putranto, M.S., Apt.  
Nip. 19570704 198603 2 002**

**Pembimbing Kedua,**



**Dra. Sukati Kadis, M.S., Apt  
Nip. 130446089**

**Pada tanggal, Maret 2010**

## ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian pengujian pengaruh konsentrasi inulin terhadap viabilitas bakteri asam laktat (BAL). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan membandingkan pengaruh penambahan beberapa konsentrasi inulin terhadap viabilitas BAL dalam media Man Rogosa and Sharpe Broth (MRSB). BAL yang digunakan adalah *Lactobacillus Casei* Shirota yang diremajakan di dalam media Man Rogosa and Sharpe Agar (MRSA) dan diinkubasi selama 1x24 jam. Hasil peremajaan bakteri diperbanyak di dalam media MRSB dan diinkubasi pada suhu 37°, kemudian ditambahkan inulin dengan variasi konsentrasi 0,1%, 1%, dan 10% dan diinkubasi 1x24 jam. Pengujian dilakukan setelah masing-masing konsentrasi diencerkan dan diuji pada media MRSA dengan metode tuang. Pengamatan dilakukan setelah inkubasi selama 2 hari. Hasilnya menunjukkan bahwa tanpa penambahan inulin jumlah koloni  $3,3 \times 10^9$ , sedangkan penambahan inulin 0,1%, 1%, dan 10% dapat mempengaruhi kelangsungan hidup BAL khususnya *Lactobacillus Casei* Shirota dengan rata-rata jumlah koloni  $5,9 \times 10^{10}$ ;  $6,8 \times 10^{10}$ ; dan  $3,7 \times 10^{10}$ . Dari hasil analisis statistika dengan menggunakan metode Beda Nyata Jarak Duncan (BNJD) terlihat bahwa penambahan inulin dengan variasi konsentrasi mempengaruhi jumlah *Lactobacillus casei* Shirota.

## ABSTRACT

A research of influence test for inulin concentration with *Lactobacillus Acid Bacteria* (LAB) viability had investigated. The aim of this research was to determine and compare viability of LAB as the effect of adding inulin concentration into MRSB media. *Lactobacillus casei* Shirota was renewed in MRSB media and then was incubated for 24 hours. The result of renewed was increased in MRSB media and was incubated at 37°C, and then was added with concentrate of inulin 0.1%, 1%, and 10% and then was incubated for 24 hours. Each of those concentrate was diluted and tested in MRSA media by using pour plate methode. The observation was done after incubated for 2 days. The result show that addition of inulin colony number  $3.3 \times 10^9$ , while addition of inulin 0.1%, 1%, and 10% can affect viability of LAB especially *Lactobacillus casei* Shirota, the average of colony number  $5.9 \times 10^{10}$ ;  $6.8 \times 10^{10}$ ; and  $3.7 \times 10^{10}$ . result of statistically analysis using BNJD method show that addition of inulin with concentration variety affect number of *Lactobacillus casei* Shirota

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis haturkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Kuasa dan Maha Penyayang karena berkat izin-Nya jualah sehingga penulis berhasil menyelesaikan skripsi ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada Jurusan Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini banyak hambatan yang dihadapi, namun dengan segala daya dan upaya serta bantuan yang tak terhitung dari berbagai pihak akhirnya skripsi ini dapat penulis selesaikan.

Untuk itu dengan segala kerendahan dan ketulusan hati penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu Dra. Sartini, M.Si. Apt selaku Pembimbing Utama, Ibu Dra. Aliyah Putranto, M.S., Apt selaku pembimbing Pertama, dan Ibu Dra. Sukati Kadis, M.Si., Apt selaku Pembimbing Kedua yang telah meluangkan waktu selama ini untuk memberi petunjuk, membagi ilmu dan menyumbangkan pikiran serta tenaga dalam membimbing penulis selama melakukan penelitian hingga selesainya skripsi ini.

Pada kesempatan ini pula, penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin beserta staf.
2. Bapak dan Ibu Dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin

3. Bapak Drs. Abd. Muzakkir Rewa, M.Si., Apt selaku Penasehat Akademik penulis
4. Kepada Laboran mikrobiologi Kak Haslia S.Si dan Kak Dewi Primayanti atas bantuan selama penulis melakukan penelitian.
5. Kepada sahabat-sahabatku Almustikah, Endang S. Fadirubun, dan Nur Ilma atas segala bantuan dan perhatiannya kepada penulis
6. Rekan-rekan mahasiswa Farmasi yang tidak dapat disebutkan satu per satu atas sumbangan tenaga dan pikirannya.

Secara khusus ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya penulis haturkan kepada Ibunda Dina Pagalla dan Ayahanda Lukas Sampe yang telah membesarkan, mendidik, mendoakan, membiayai dan memberikan dorongan serta doa restunya sehingga penulis dapat menyelesaikan studi. Terima kasih juga penulis haturkan kepada saudara-saudaraku Prilka Sareba Pagalla dan Sri San Yuni.

Akhirnya kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan baik tenaga maupun pikiran, penulis mendoakan semoga Tuhan Yang Maha Kuasa senantiasa memberkahinya. Semoga skripsi yang sederhana ini dapat bermanfaat bagi keilmuan farmasi pada khususnya dan masyarakat luas pada umumnya.

*[Handwritten signature]*  
12/11/2011

## DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK .....	iv
ABSTRACT .....	v
UCAPAN TERIMA KASIH .....	vi
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xii
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....	4
II.1 Uraian Probiotik .....	4
II.1.1 Uraian Bakteri Asam Laktat .....	7
II.1.2 Metabolisme Asam Laktat .....	9
II.1.3 Uraian <i>Lactobacillus casei</i> Shirota .....	11
II.2 Uraian Prebiotik .....	12
II.3 Inulin .....	14
II.4 Cara Perhitungan Jumlah Bakteri .....	16
BAB III. PELAKSANAAN PENELITIAN .....	20
III.1 Alat dan Bahan .....	20
III.2 Metode Kerja .....	20
III.2.1 Sterilisasi Alat .....	20



III.2.2 Pembuatan Media MRS Broth .....	20
III.2.3 Peremajaan Mikroba Uji .....	21
III.2.4 Perbanyak Mikroba Uji .....	21
III.2.5 Penambahan Inulin .....	21
III.2.6 Perhitungan ALT Bakteri Asam Laktat .....	21
III.2.7 Pengamatan dan Pengumpulan Data .....	22
III.2.8 Pengolahan Data .....	22
III.2.9 Pembahasan Hasil .....	22
III.2.10 Pengambilan Kesimpulan .....	22
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	23
IV.1 Hasil Penelitian .....	23
IV.2 Pembahasan .....	23
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN .....	26
V.1 Kesimpulan .....	26
V.2 Saran .....	25
DAFTAR PUSTAKA .....	27
LAMPIRAN .....	30

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Tipe-tipe Produk Probiotik dan Bakteri Probiotik yang Digunakan .....	6
2. Data Pengujian ALT Bakteri Asam Laktat .....	32
3. Nilai ALT Bakteri Masing-masing Sampel.....	33
4. Hasil Perhitungan Statistik dengan Metode RAL .....	34
5. Tabel Anava.....	35

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Tipe-tipe Produk Probiotik dan Bakteri Probiotik yang Digunakan .....	6
2. Data Pengujian ALT Bakteri Asam Laktat .....	32
3. Nilai ALT Bakteri Masing-masing Sampel.....	33
4. Hasil Perhitungan Statistik dengan Metode RAL .....	34
5. Tabel Anava.....	35

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Reaksi Aktiviasi Glukosa .....	10
2. Struktur Kimia Inulin .....	15
3. Foto Pertumbuhan Bakteri <i>Lactobacillus casei</i> Shirota .....	39

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja .....	30
2. Komposisi Medium .....	31
3. Perhitungan Statistik Jumlah Koloni Bakteri Asam laktat .....	32

# BAB I

## PENDAHULUAN

Bakteri pertama kali ditemukan oleh Anthony Van Leuwenhoek tahun 1674. Bakteri berasal dari bahasa latin "bacterium" merupakan kelompok raksasa dari organisme hidup. Tidak semua bakteri bersifat patogen, namun ada juga bakteri yang menguntungkan, salah satunya adalah probiotik. Probiotik terdiri atas mikroba hidup yang jika diinginkan efek tertentu, maka harus dikonsumsi dalam keadaan hidup dan tetap hidup sampai mencapai saluran usus. Mikroba hidup itu mampu memberikan pengaruh positif dengan cara memperbaiki sifat-sifat yang dimiliki mikroba alami yang tinggal di dalam tubuh manusia (1).

Bakteri asam laktat (BAL) secara alami terdapat dalam saluran pencernaan manusia dan hewan. Tidak semua bakteri asam laktat bersifat probiotik, dan hanya jenis bakteri asam laktat tertentu yang mencapai saluran pencernaan. Bakteri asam laktat merupakan bakteri gram positif, bentuk kokkus atau batang yang tidak berspora, dengan asam laktat sebagai produk utama fermentasi karbohidrat. Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan kelangsungan hidup bakteri asam laktat sangat beragam, namun komposisi kimia dan kandungan nutrisi pada media sangat berpengaruh (1,2).

Bakteri asam laktat telah diketahui mempunyai peranan penting dalam menjaga fungsi fisiologis dan kesehatan manusia, yaitu berfungsi menjaga sistem kekebalan tubuh, sehingga untuk menjaga sistem

kekebalan tubuh tersebut kita harus mengkonsumsi probiotik guna menunjang metabolisme tubuh (1).

Viabilitas bakteri probiotik penting agar dapat beradesi atau melekat pada sel epithelia, yang selanjutnya berkolonisasi sehingga dapat berkompetensi dengan berbagai bakteri patogen dan menstimulir sistem imun. Hasil penelitian menunjukkan ada beberapa manfaat probiotik dalam tubuh, diantaranya mencegah terjadinya kanker, memproduksi berbagai vitamin, meningkatkan sistem imun (1, 3)

Prebiotik adalah sumber makanan yang tidak tercerna yang mampu meningkatkan/memberi makan probiotik dalam tubuh. Yang tergolong prebiotik adalah oligosakarida dalam ASI, soy bean, oat, serta inulin yang banyak terkandung dalam Articoke. Selain prebiotik alami, sekarang banyak produk makanan yang mengandung probiotik dan diperkaya dengan prebiotik, yakni makanan yang mengandung fructooligosakarida (FOS), xylooligosakarida (XOS), dan galactooligosakarida (GOS). Jadi prinsip pemberian prebiotik yaitu memberi makanan bagi tumbuh suburnya probiotik yang memang ada dalam tubuh manusia (1)

Inulin adalah salah satu prebiotik, merupakan senyawa karbohidrat yang banyak terdapat pada bagian tanaman, dan termasuk dalam golongan karbohidrat tipe fruktan. Digunakan sebagai pengganti gula, pengganti lemak dan pada berbagai produk makanan termasuk makanan rendah lemak berguna untuk meningkatkan rasa. Inulin ternyata mampu menurunkan tingkat kolesterol pada penderita diabetes, mampu menunda

pengosongan lambung dan atau waktu transit pada usus kecil, serta mencegah terjadinya osteoporosis (4, 5).

Dari uraian di atas, diketahui bahwa prebiotik merupakan substrat yang dapat meningkatkan jumlah dan daya tahan hidup mikroflora probiotik dalam usus. Hal ini sangat baik dan menguntungkan tubuh. Namun permasalahannya adalah apakah dengan penambahan inulin sebagai prebiotik dapat mempengaruhi viabilitas bakteri asam laktat ?

Berdasarkan hal tersebut, maka telah dilakukan pengujian viabilitas bakteri asam laktat dengan penambahan berbagai konsentrasi inulin, yaitu 0,1%, 1%, dan 10%. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat sejauh mana kelangsungan hidup dari bakteri asam laktat setelah dilakukan penambahan berbagai konsentrasi inulin dengan menggunakan media MRS Broth (Man Rogosa and Sharpe Broth).



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### II.1 Uraian Probiotik

Definisi menurut Gibson and Robertfroid (1995) probiotik adalah pangan/suplemen pangan yang berisi mikroba hidup yang memberi efek yang menguntungkan (kesehatan) saluran pencernaan. Mikroflora yang digolongkan sebagai probiotik adalah terutama yang memproduksi asam laktat, misalnya *Lactobacilli* dan *Bifidobacteria* (6,7).

Konsep probiotik dikembangkan dari sebuah teori autointoksikasi yang dikemukakan oleh seorang ilmuwan Rusia penerima Nobel Biologi tahun 1908 yaitu Elie Metchnikoff. Menurutnya, secara perlahan pembusukan (putrefeksi) oleh bakteri dalam usus besar menghasilkan senyawa-senyawa beracun yang memasuki peredaran darah, yang disebut sebagai proses "autointoksikasi". Proses inilah yang menyebabkan penuaan dan beberapa penyakit-penyakit degeneratif. Bakteri yang ikut dikonsumsi bersama produk tersebut dan kemudian mampu tinggal di usus berpengaruh positif terhadap mikroflora di kolon dengan cara menurunkan efek toksik dari mikroorganisme yang merugikan di kolon (6).

Prinsip dasar kerja probiotik adalah pemanfaatan kemampuan organisme dalam memecah atau menguraikan rantai panjang karbohidrat, protein dan lemak yang menyusun pakan yang diberikan (8).

Pakan yang mengandung probiotik terbukti efektif dalam mencegah berbagai penyakit, seperti tukak lambung, diare, intoleransi

terhadap laktosa, alergi makanan dan juga kanker saluran pencernaan. Disamping senyawa metabolit yang dihasilkan, bakteri asam laktat sendiri juga memegang peranan dalam meningkatkan kesehatan, terutama dinding sel bakteri asam laktat diketahui dapat mengikat senyawa mutagen dan karsinogen pemicu kanker dan juga dapat menyerap kolesterol, yaitu membran selnya (2).

Senyawa-senyawa racun yang dihasilkan dari metabolisme protein dan lemak, serta hasil pemecahan enzim tertentu menjadi semakin berkurang bila bakteri probiotik mulai menjalankan peranannya dalam meningkatkan kesehatan. Berbagai senyawa hasil metabolismenya, seperti asam laktat,  $H_2O_2$ , bakteriosin yang bersifat antimikroba dan berbagai enzim yang dimilikinya seperti laktase (membantu mengatasi intoleransi terhadap laktosa) serta *bile salt hydrolase* (membantu menurunkan kolesterol) serta adanya aktivitas antikarsinogenik dan stimulasi imun sistem (9).

Cara meningkatkan aktivitas probiotik adalah dengan mengatur kondisi sedemikian rupa, sehingga mikroba yang bermanfaat mampu bertahan hidup selama melewati saluran pencernaan. Tempat yang paling sulit dilalui adalah lambung karena derajat keasaman yang tinggi, adanya asam empedu, dan kompetisi dengan mikroba dalam kolon. Maka, perlu dipilih mikroba yang paling toleran terhadap asam dan memiliki kemampuan untuk membentuk koloni dalam saluran pencernaan (10).



Pemakaian probiotik sudah banyak dilakukan terutama dinegara-negara maju. Puslit Bioteknologi LIPI telah mengembangkan program penelitian dan pengembangan sejak 4 tahun yang lalu. Pada saat ini telah berhasil dikumpulkan sejumlah bakteri asam laktat dan siap dimitrakan untuk dikembangkan menjadi probiotik skala komersial (11).

Tabel 1. Tipe-tipe produk probiotik dan bakteri probiotik yang digunakan(6)

Probiotik	Bakteri (yang umumnya digunakan)
Produk-produk susu fermentasi (yogurt, <i>buttermilk</i> , susu asidofilus, dan lain-lain)	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> ; <i>Streptomyces thermophilus</i> ; <i>Lactobacillus acidophilus</i> ; <i>Lactobacillus casei</i> ; <i>Bifidobacteria</i> ; <i>Lactobacillus reuteri</i>
Pangan yang disuplementasi (susu pasteurisasi, minuman-minuman)	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> ; <i>Streptomyces thermophilus</i> ; <i>Lactobacillus acidophilus</i> ; <i>Bifidobacteria</i> ; <i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Pharmaceuticals</i> (tablet, kapsul, granula)	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> ; <i>Lactobacillus acidophilus</i> ; <i>Bifidobacteria spp.</i>
Produk-produk <i>health food</i> (cairan, kapsul, bubuk)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ; <i>Bifidobacteria spp.</i> ; <i>Lactobacillus spp.</i>

Agar suatu mikroorganisme menjadi probiotik yang efektif dalam memberi efek kesehatan, maka disyaratkan (6).

1. Berasal dari manusia (*human origin*), stabil terhadap asam maupun cairan empedu.
2. Dapat menempel pada sel intestin manusia, dan memproduksi senyawa antimikroba.
3. Dapat melawan bakteri patogenik dan karsinogenik, dan telah teruji secara klinis aman dikonsumsi.
4. Tetap hidup selama pengolahan dan penyimpanan.

#### II.1.1 Bakteri Asam Laktat (BAL)

Istilah bakteri asam laktat (BAL) mulanya ditujukan hanya untuk sekelompok bakteri yang menyebabkan keasaman pada susu (*milk-souring organisms*). Secara umum bakteri asam laktat didefinisikan sebagai suatu kelompok bakteri gram positif, tidak menghasilkan spora, berbentuk bulat atau batang yang memproduksi asam laktat sebagai produk akhir metabolik utama selama fermentasi karbohidrat (2,12).

BAL dan Bifidobakteria termasuk dalam kelompok bakteri "baik" bagi manusia, dan umumnya memenuhi status GRAS (*Generally Recognized As Safe*), yaitu aman bagi manusia. Kelompok bakteri ini tidak membusukkan protein dan dapat dimetabolisme dengan berbagai jenis karbohidrat secara fermentasi menjadi asam laktat sehingga disebut BAL (2).

BAL merupakan bakteri gram positif, katalase negatif, tidak membentuk spora, tidak mempunyai cytochrome, aerotoleran, anaerobik hingga mikroaerofilik, membutuhkan nutrisi yang kompleks seperti asam-asam amino, vitamin (B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> dan biotin), purine, dan pyrimidin (2).

Secara fisiologis dan berdasarkan aktivitas metabolismenya, BAL dikelompokkan ke dalam dua subgroup yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. BAL homofermentatif melibatkan jalur Embden Meyerhoff yaitu, glikolisis menghasilkan asam laktat, 2 mol ATP dari 1 molekul glukosa/heksosa dalam kondisi normal. Tidak menghasilkan biomassa sel dua kali lebih banyak daripada bakteri asam laktat heterofermentatif (2).

Secara umum BAL homofermentatif digunakan dalam fermentasi susu menjadi yogurt dan juga untuk menghasilkan asam laktat sebagai asidulan dalam industri makanan dan industri polilaktat yaitu, suatu industri polimer atau plastik ramah lingkungan (2).

Sedangkan BAL heterofermentatif selain menghasilkan asam laktat juga menghasilkan etanol, CO<sub>2</sub>, asam asetat, senyawa citarasa, mannitol, serta 1 mol ATP dari heksosa dan tidak mempunyai enzim aldolase. Bakter asam laktat heterofermentatif banyak dimanfaatkan dalam industri susu untuk menghasilkan keju, dan senyawa flavour, senyawa citarasa maupun pengental yaitu eksopolisakarida (2).

BAL memerlukan nutrisi yang sangat kompleks, oleh karena itu habitat umumnya kaya nutrisi. Secara alami BAL terdapat dalam saluran

pencernaan manusia dan hewan, dalam makanan fermentasi seperti yakult, yogurth, keju, berbagai produk salami, pikel buah dan sayuran. Bakteri asam laktat juga dapat diisolasi dari berbagai makanan diantaranya kecap ikan, asinan kubis (sauerkraut), acar ketimun, bekasam, growol, gatot, tempoyak, dan tape ketan (2).

Beberapa persyaratan agar BAL dapat diklasifikasikan sebagai probiotik adalah (2) :

1. Stabil terhadap asam (terutama asam lambung) dan garam empedu
2. Mampu bertahan hidup selama berada pada bagian atas usus kecil
3. Dapat memproduksi senyawa antimikroba
4. Mampu menempel dan mengkolonisasi sel manusia
5. Tumbuh baik dan berkembang dalam saluran pencernaan
6. Aman digunakan oleh manusia
7. Mampu membentuk lingkungan mikroflora yang normal dan seimbang.

Beberapa jenis BAL yang sering digunakan sebagai probiotik adalah *Lactobacillus* dan *Bifidobacteria* (2).

### **II.1.2. Metabolisme Bakteri Asam Laktat**

Berbagai monosakarida dimetabolisme oleh BAL menjadi glukosa-6-fosfat atau fruktosa-6-fosfat dan kemudian terjadi metabolisme melalui jalur EMP. BAL homofermentatif menggunakan jalur EMP untuk menghasilkan piruvat untuk kemudian direduksi menjadi asam laktat

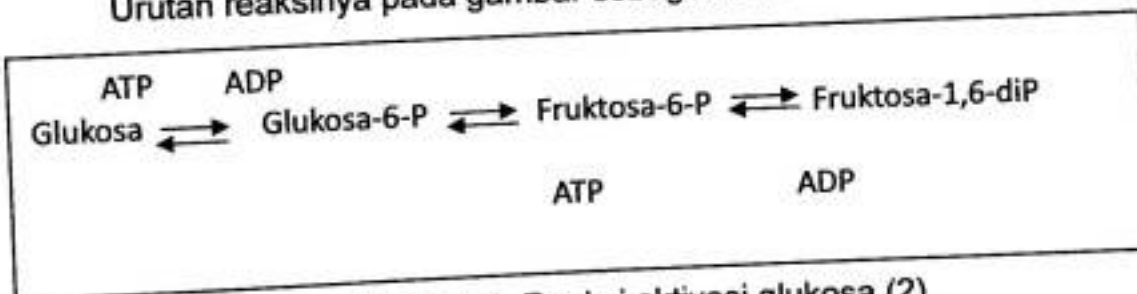
dehidrogenase menggunakan kelebihan NADH (2)

Jalur EMP terbagi menjadi tiga tahapan, yaitu (2):

### 1. Aktivasi glukosa

Sebagaimana diketahui, glukosa merupakan molekul yang relatif stabil, sehingga untuk mendegradasinya perlu ditambahkan fosfat energi tinggi agar tidak stabil. Pada tahap awal fosfat disumbangkan dari ATP atau fosfofenol piruvat pada glukosa sehingga terbentuk glukosa-6-fosfat, untuk selanjutnya diisomerisasikan menjadi fruktosa-6-fosfat, dan fosfat kedua ditambahkan sehingga terbentuk fruktosa-1,6-bifosfat, yang lebih mudah diuraikan dibandingkan glukosa.

Urutan reaksinya pada gambar sebagai berikut :



Gambar 1. Reaksi aktivasi glukosa (2)

### 2. Penguraian glukosa

Fruktosa-1,6- bifosfat selanjutnya diurai oleh enzim fruktosa bifosfat aldolase menjadi 2 senyawa berkarbon 3, yaitu gliseraldehida 3 fosfat (GAP) dan dihidroksiasetonfosfat (DAP). Ini merupakan tahap penting dalam jalur *Embden-Meyerhof-Parnas* (EMP), yaitu mengubah glukosa yang berkarbon 6 menjadi 2 molekul senyawa berkarbon 3 yang menjadi cikal bakal piruvat

### 3. Ekstraksi energi

Pada tahap reaksi selanjutnya, DAP diubah menjadi GAP, yang akan berperan pada jalur EMP selanjutnya. Fosfat anorganik ditambahkan pada GAP untuk membentuk 1,3-bifosfoglisarat (BPG).

Berbagai jenis senyawa metabolit dihasilkan oleh bakteri asam laktat, baik berupa senyawa metabolit primer, seperti asam laktat, asam asetat, hydrogen peroksida, maupun metabolit sekunder misalnya, bakteriosin, senyawa flavor, maupun EPS (eksopolisakarida) (2).

#### II.1.3 Uraian *Lactobacillus casei* Shirota

*Lactobacillus casei* Shirota (LcS) telah ditemukan sejak tahun 1891 oleh Freunderick dan starin Shirota yang diisolasi pada tahun 1930 oleh Minotu Shirota, peneliti dari Universitas Kyoto, Jepang adalah paling unggul diantara 300 starin lain yang diteliti (13).

LcS adalah bakteri Gram (+), fakultatif anaerob, berbentuk batang tunggal atau berantai dengan ukuran panjang 2-4 mikron dan lebar 0,6-0,7 mikron, tidak membentuk endospora, flagella, atau kapsul (13).

LcS tumbuh dengan baik pada media MRS (Rogosa's) maupun dalam media Tomato Juice. LcS membutuhkan nutrisi khusus untuk pertumbuhan normalnya meliputi 12 asam amino, 4 vitamin, urasil, dan salah satu basa purin. Kultur tersebut dapat memproduksi asam laktat, sejumlah kecil asam asetat, asam sitrat, asam suksinat, asam malat, asam butirat, dan asam formiat, serta senyawa menguap, seperti



asetaldehida, diasetil, dan aseton (14).

LcS termasuk dalam golongan bakteri probiotik, yaitu bakteri hidup yang memberi efek menguntungkan pada induk semang dengan meningkatkan keseimbangan mikroflora dalam saluran pencernaan. Toleransi LcS terhadap asam lambung dan cairan empedu telah dibandingkan dengan strain *Lactobacillus* dan *Streptococcus* yang lain. Ketahanan LcS dalam asam lambung adalah yang tertinggi diantara strain-strain lain yang diteliti. LcS dapat bertahan dalam keasaman paling rendah hingga pH 2,7 selama paling kurang 3 jam (15, 16).

## II.2 Uraian Prebiotik

Prebiotik merupakan kelompok oligosakarida seperti rafinosa, stakhios, agalacto-oligosakarida, frukto-oligosakarida, frukto-oligosakarida, inulin, serta beberapa jenis peptida dari protein yang tidak dapat dicerna, sehingga mencapai usus (17).

Prebiotik merupakan nutrisi yang sesuai bagi bakteri baik, tapi tidak cocok bagi bakteri jahat, sehingga bisa meningkatkan bakteri baik dalam usus. Kombinasi probiotik dan prebiotik untuk meningkatkan kesehatan tubuh disebut synbiotik (18).

Prebiotik secara alami terdapat pada biji-bijian, sayuran, dan buah-buahan. Produk olahan kedelai seperti tempe, tahu, dan tauco, kaya akan prebiotik. Prebiotik juga dapat diperoleh dari akar tanaman *Chichorium intybus*, gandum utuh, bawang bombay, bawang putih, dan pisang (3).

Efek utama prebiotik adalah menstimulasi secara selektif pertumbuhan *bifidobacteria* dan *lactobacilli* dalam usus sehingga meningkatkan daya tahan tubuh terhadap mikroorganisme patogen. Karbohidrat prebiotik kemungkinan mempunyai efek yang tidak spesifik karena terfermentasi dalam usus besar. Karbohidrat prebiotik yang telah dievaluasi pada manusia adalah fruktan atau galaktan. Penelitian *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan bahwa prebiotik tidak dicerna oleh enzim, tetapi difermentasi oleh bakteri anaerob dalam usus besar. Belum pernah dilaporkan penemuan prebiotik karbohidrat dalam feses. Melalui fermentasi dalam usus besar, karbohidrat prebiotik menghasilkan asam lemak rantai pendek (*small chain fatty acid/SCFA*), menstimulasi pertumbuhan berbagai bakteri termasuk *lactobacilli* dan *bifidobacteria*, dan dapat menghasilkan gas. Seperti karbohidrat terfermentasi lain, prebiotik mempunyai efek laksatif (cuci perut), tetapi sulit dibuktikan karena efeknya jarang sekali dilaporkan secara klinis. Secara potensial efek utama karbohidrat prebiotik adalah untuk meningkatkan daya tahan tubuh usus terhadap mikroorganisme patogen sehingga mengurangi kekerapan diare yang dialami seseorang. Jenis prebiotik yang sering dipakai seperti FOS (fruktooligosakarida), inulin, dan GOS (galaktooligosakarida), laktulosa, laktitol. Disamping itu terdapat pula bahan lain misalnya silosa, kedelai dan mannose (19,20)

Syarat-syarat bahan makanan yang diklasifikasikan sebagai prebiotik (2,5) :

1. Tidak dihidrolisis dan tidak diserap di bagian atas traktus gastrointestinal sehingga dapat mencapai kolon tanpa mengalami perubahan struktur dan tidak diekskresikan dalam tinja.
2. Substrat selektif untuk satu atau sejumlah mikroflora komersial yang menguntungkan dalam kolon, jadi memicu pertumbuhan bakteri yang aktif melakukan metabolisme.
3. Mampu merubah mikroflora kolon menjadi komposisi yang menguntungkan kesehatan.

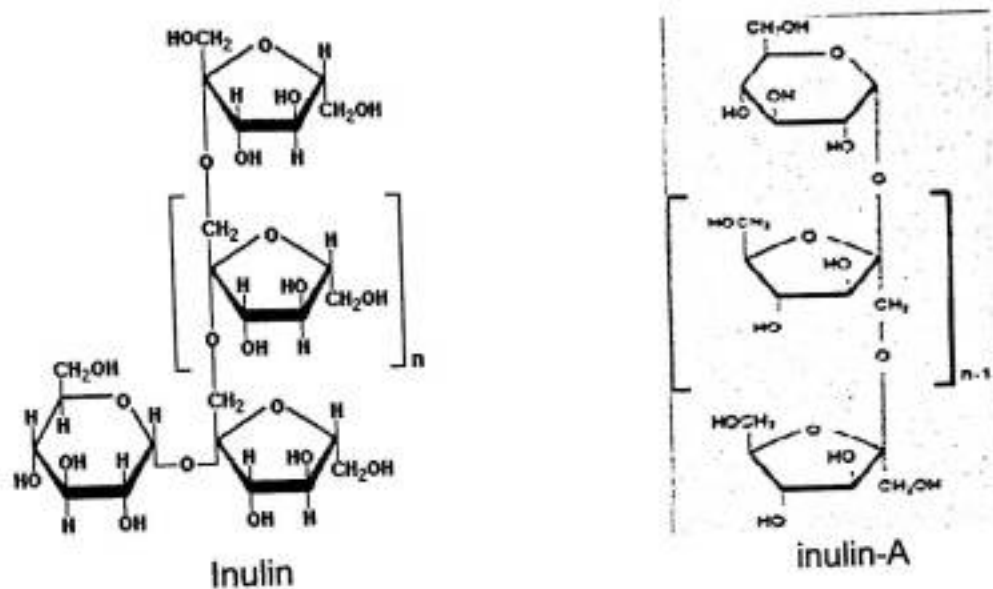
Dosis prebiotik di atas 10 gram/hari masih dalam toleransi, sedang dosis yang lebih tinggi dapat menyebabkan gangguan gastrointestinal seperti flatulasi, perut kembung, kram perut dan diare. FOS dan inulin merupakan prebiotik yang paling sering terdapat dalam makanan fungsional dan suplemen. Dosis keduanya berkisar antara 4-10 gram. Konsumsi di atas 30 gram dapat menyebabkan gangguan gastrointestinal

(5)

### II.3 Inulin

Inulin (serat yang tidak dicerna) adalah prebiotik yang membantu pertumbuhan dari bakteri baik di dalam usus. Inulin termasuk golongan karbohidrat tipe fruktan, polimer yang terdiri atas unit-unit fruktosa yang berikatan dengan 1 unit terminal glukosa. Ikatan antara unit fruktosa dalam inulin adalah ikatan  $\beta$ -(2-1) glikosida. Inulin merupakan gabungan rantai

fruktan yang panjangnya antara 2 sampai 60 unit dengan derajat polimerisasi (DP)  $\pm 9$  (4, 21,22).



Gambar 2. Struktur kimia inulin (4)

Kegunaan dari inulin adalah sebagai makanan bagi mikroorganisme menguntungkan di dalam tubuh. *Lactobacillus* dan *Bifidobacteria* dapat mencerna inulin untuk kita, lalu meningkatkannya sebanyak 5 sampai 10 kali dalam volume. Hubungan yang sinergistik ini dikembangkan dimana jumlah keseluruhan lebih besar dari jumlah per bagian. Walaupun inulin tidak dikenal secara umum sebagai makanan fungsional atau suplemen (makanan yang memberikan keuntungan kesehatan melebihi nutrisi dasar), inulin adalah bahan alami yang ditemukan dalam lebih dari 35.000 tumbuhan dan sayuran di seluruh dunia (4).

Karena inulin adalah produk tumbuhan alami yang sudah biasa dikenal manusia, risiko reaksi alergi atau ketidakcocokan akan inulin

sangatlah minimal. Secara umum, inulin dapat ditemui dalam berbagai tanaman. Namun demikian, inulin dalam jumlah yang memadai dapat ditemukan pada umbi dahlia (*Dahlia pinnata Cav.*), umbi jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*), chicory (*Chicoryum intybus, L.*), dandelion (*Taraxacum officinale Weber*), umbi yacon (*Smallanthus sanchifolius*), dan dalam jumlah kecil terdapat juga dalam bawang merah, bawang putih, asparagus, pisang, gandum, dan barley (5).

Inulin adalah serat yang bisa dilarutkan, dapat membantu mempertahankan fungsi usus yang normal, mengurangi susah buang air besar, mengurangi kolesterol dan trigliserida, dan juga membantu menormalkan tingkat gula darah. Inulin bisa menjadi pengganti lemak seperti juga pengganti gula, tetapi inulin bukanlah bahan kimia. Penelitian membuktikan bahwa nilai nutrisi dari inulin melebihi dari serat yang biasa. Inulin juga bisa menjadi peningkat kalsium. Bifidobacteria mencerna inulin menjadi asam lemak rantai pendek seperti asam propionat dan asam butirat. Asam butirat telah terbukti mempunyai kemampuan untuk mencegah kanker pada usus besar. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa inulin mencegah perubahan pra-kanker di usus. Masih banyak penelitian lain yang harus dilakukan, tetapi penelitian yang sudah ada memberikan hasil yang menjanjikan (5).

#### **II.4 Cara Perhitungan Jumlah Bakteri (23)**

Perhitungan massa sel secara langsung atau tidak langsung, banyak dilakukan untuk mengukur pertumbuhan selama proses

fermentasi. Dalam perhitungan massa sel secara tidak langsung, jumlah sel mikroorganisme dapat dihitung jika medium pertumbuhannya tidak mengganggu pengukuran.

Prinsip metode hitung cawan adalah apabila ada satu sel mikroorganisme yang masih hidup ditumbuhkan pada medium yang sesuai, maka sel tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dan dihitung dengan mata pada media yang digunakan setelah dilakukan inkubasi pada suhu dan waktu tertentu.

Metode cawan ini merupakan metode yang paling sensitif untuk menentukan jumlah mikroorganisme karena beberapa alasan :

1. Hanya sel yang masih hidup yang dapat dihitung.
2. Beberapa jenis mikroorganisme dapat dihitung sekaligus.
3. Dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi mikroorganisme, karena koloni yang terbentuk mungkin berasal dari sel yang mempunyai penampakan pertumbuhan yang spesifik.

Selain memiliki keuntungan, metode ini juga memiliki beberapa kelemahan :

1. Hasil perhitungan tidak menunjukkan jumlah sel yang sebenarnya, karena beberapa sel yang berdekatan mungkin membentuk satu koloni.
2. Medium dan kondisi inkubasi yang berbeda mungkin menghasilkan nilai yang berbeda.

3. Mikroorganisme yang ditumbuhkan harus dapat tumbuh pada medium padat dan membentuk koloni yang kompak dan jelas, tidak menyebar.
4. Memerlukan persiapan dan waktu inkubasi relatif lama, baru pertumbuhan koloni dapat dihitung.

Pada metode cawan ini, sampel yang diperkirakan mengandung mikroorganisme lebih dari 300 sel per ml atau per gram atau per  $\text{cm}^2$  (kalau pengambilan sampel diambil pada permukaan), memerlukan perlakuan pengenceran dahulu sebelum ditumbuhkan dalam medium agar dalam cawan petri. Setelah masa inkubasi, akan tumbuh koloni-koloni yang dapat dihitung. Jumlah yang terbaik adalah antara 30 sampai 300 koloni per cawan petri. Pengenceran biasanya dilakukan dengan cara decimal yaitu 1:10, 1:100, 1: 10000, dan seterusnya tergantung pada derajat kontaminasi sampel yang diperiksa, atau dapat juga dilakukan yaitu 1:100, 1:10000, 1: 1000000, dan seterusnya. Sebagai larutan pengencer dapat digunakan air steril, larutan NaCl fisiologis steril 0.9%, larutan Ringer atau larutan buffer fosfat.

Metode pengerjaan yang sering dilakukan adalah metode tuang/taburan (*pour plate*). Pada metode tuang/taburan sejumlah contoh (1 ml atau 0,1 ml) dari pengenceran yang dikehendaki diinokulasikan ke dalam cawan petri dan selanjutnya ditambahkan medium agar cair dengan suhu kurang lebih  $40-45^{\circ}\text{C}$ , sebanyak 15-20 ml. kemudian dihomogenkan,

dibiarkan sampai memadat. Selanjutnya diinkubasi pada suhu tertentu dengan cara terbalik.

Jumlah koloni dapat dihitung sebagai berikut :

1. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30-300.
2. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan satu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloninya diragukan dapat dihitung sebagai satu koloni.
3. Satu deretan rantai koloni yang terlihat sebagai satu garis tebal dihitung sebagai satu koloni.





dibiarkan sampai memadat. Selanjutnya diinkubasi pada suhu tertentu dengan cara terbalik.

Jumlah koloni dapat dihitung sebagai berikut :

1. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30-300.
2. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan satu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloninya diragukan dapat dihitung sebagai satu koloni.
3. Satu deretan rantai koloni yang terlihat sebagai satu garis tebal dihitung sebagai satu koloni.

## BAB III

### PELAKSANAAN PENELITIAN

#### II.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, botol pengencer, cawan petri, gelas Erlenmeyer, inkubator aerob, "Laminar Air Flow", lemari pendingin, oven, timbangan analitik.

Bahan-bahan yang digunakan adalah alkohol 70%, aluminium foil, aquadest, biakan murni *Lactobacillus casei* Shirota koleksi Laboratorium Mikrobiologi Farmasi, calcium carbonat ( $\text{CaCO}_3$ ), inulin, medium MRSA, medium MRSB, larutan NaCl fisiologis.

#### II.2 Metode Kerja

##### II.2.1 Sterilisasi alat (24)

Alat-alat yang digunakan dicuci dengan air dan deterjen, kemudian dibilas dengan air suling, selanjutnya dikeringkan, dibungkus dan disterilkan. Untuk alat-alat yang terbuat dari gelas disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu  $170^\circ\text{C}$  selama 2 jam. Alat-alat logam disterilkan dengan cara dipijarkan, sedangkan untuk alat-alat yang tidak tahan pada pemanasan tinggi disterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$ , tekanan 2 atm selama 15 menit.



### **II.2.2 Pembuatan media MRS Broth**

Bahan MRS Broth ditimbang sebanyak 10,4 gram, kemudian disuspensikan dengan air suling hingga 200 ml, lalu dipanaskan sampai mendidih hingga homogen. Disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 2 atm.

### **II.2.3 Peremajaan Mikroba Uji**

Bakteri uji berupa *L. casei* Shirota diambil 1 ose lalu diinokulasikan dengan cara digoreskan pada medium MRS Agar miring, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam.

### **II.2.4 Perbanyak Mikroba Uji**

Bakteri uji berupa *L. casei* Shirota disuspensikan dengan NaCl fisiologis sebanyak 5 ml, kemudian dimasukkan ke dalam media MRSB yang telah disterilkan. Diinkubasi 1x24 jam pada suhu 37°C.

### **II.2.5 Penambahan Inulin**

Medium MRS Broth yang telah disterilkan dimasukkan ke dalam 4 buah tabung reaksi, masing-masing sebanyak 9 ml. Tabung reaksi I tanpa penambahan inulin (kontrol). Tabung reaksi II ditambahkan inulin 0,1%, tabung reaksi III ditambahkan inulin 1%, dan tabung reaksi IV ditambahkan inulin 10%.

### **II.2.6 Perhitungan ALT Bakteri Asam Laktat**

Pada masing-masing tabung reaksi yang telah ditambahkan inulin dilakukan pengenceran dengan menggunakan NaCl fisiologis mulai dari

10<sup>-1</sup> sampai 10<sup>-10</sup>. Dari empat pengenceran terakhir diambil 1 ml, kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi medium NA dan CaCO<sub>3</sub>, diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam. Selanjutnya dilakukan perhitungan angka lempeng total (ALT) bakteri, yang kemudian dibandingkan dengan kontrol.

### **II.2.7 Pengamatan dan Pengumpulan Data**

Pengamatan dan perhitungan jumlah koloni bakteri dikumpulkan dan ditabulasi.

### **II.2.7 Pengolahan Data**

Data yang diperoleh dianalisis secara statistika dengan menggunakan uji Rancangan Acak Lengkap.

### **II.2.9 Pembahasan Hasil**

Pembahasan dilakukan berdasarkan hasil penelitian dan analisis data.

### **II.2.10 Pengambilan Kesimpulan**

Kesimpulan diambil berdasarkan hasil pembahasan.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### IV. 1 Hasil Penelitian

Dari hasil perhitungan ALT bakteri *L.casei* Shirota diperoleh nilai ALT sebagai berikut :

- |   |                        |
|---|------------------------|
| 1. Kontrol (tanpa inulin)                       | = $3,3 \times 10^9$    |
| 2. Bakteri <i>L.casei</i> Shirota + inulin 0,1% | = $5,9 \times 10^{10}$ |
| 3. Bakteri <i>L.casei</i> Shirota + inulin 1%   | = $6,8 \times 10^{10}$ |
| 4. Bakteri <i>L.casei</i> Shirota + inulin 10%  | = $3,7 \times 10^{10}$ |

#### IV.2 Pembahasan

Pada penelitian ini dilakukan pengujian pengaruh konsentrasi inulin terhadap viabilitas bakteri asam laktat (BAL). BAL yang digunakan adalah bakteri yang termasuk ke dalam golongan *Lactobacillus* yaitu *L.casei* Shirota. Bakteri ini merupakan bakteri probiotik yang mampu bertahan terhadap kondisi asam pada lambung (1).

Medium yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri *L.casei* Shirota yaitu medium MRS Broth yang merupakan medium yang baik untuk pertumbuhan bakteri *L.casei* Shirota.

Bakteri *L.casei* Shirota yang telah diperbanyak dalam media MRS Broth dibuat 4 bagian untuk 4 jenis perlakuan, yaitu penambahan inulin 0,1%, 1%, 10%, dan tanpa penambahan inulin sebagai kontrol. Kemudian dilakukan pengujian jumlah bakteri *L.casei* Shirota yang terdapat dalam

masing-masing sediaan.

Inulin merupakan jenis karbohidrat yang tidak dapat dicerna dan diserap, tapi mampu merangsang pertumbuhan dan aktivitas bakteri probiotik dalam tubuh.

Pengujian dilakukan dengan metode tuang menggunakan media MRS Broth. Setelah dilakukan pengenceran  $10^{-1}$  sampai  $10^{-10}$ , berdasarkan hasil orientasi maka diambil pengenceran  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ , dan  $10^{-10}$  untuk diuji. Hal ini dikarenakan semakin tinggi tingkat pengenceran, maka jumlah koloni dapat dihitung.

Dari hasil pengamatan yang dilakukan setelah diinkubasi 2 hari terlihat *L.casei* Shirota sebagai koloni bening, Hal ini dikarenakan karena asam laktat yang dihasilkan bereaksi dengan kalsium karbonat yang tidak larut dalam media membentuk kalsium laktat yang larut dalam air, sehingga terbentuk zona bening.

Dari hasil perhitungan nilai ALT bakteri pada tiap sampel uji diperoleh rata-rata koloni bakteri untuk kontrol  $3,3 \times 10^9$ , *L.casei* Shirota dengan penambahan inulin 0,1% sebanyak  $5,9 \times 10^{10}$ , dengan penambahan inulin 1% sebanyak  $6,8 \times 10^{10}$ , dan penambahan inulin 10% sebanyak  $3,7 \times 10^{10}$ . Di sini terlihat jumlah koloni *L.casei* Shirota dengan penambahan inulin dibandingkan dengan kontrol ternyata mengalami peningkatan pada konsentrasi 0,1% dan 1% tetapi menurun pada konsentrasi 10%. Hal ini mungkin dikarenakan kebutuhan bakteri asam laktat terhadap unsur karbon yang maksimum pada konsentrasi 1%.

Dari hasil analisis statistika menggunakan rancangan acak lengkap memperlihatkan bahwa ada pengaruh yang nyata penambahan inulin dengan variasi konsentrasi terhadap jumlah koloni *L.casei* Shirota. Penambahan inulin sebagai prebiotik ternyata mampu meningkatkan pertumbuhan *L.casei* Shirota.

Penambahan prebiotik inulin ternyata meningkatkan jumlah *L.casei* Shirota dalam media MRS Broth. Namun belum diketahui daya tahan hidup *L.casei* Shirota pada masa penyimpanan produk akhir sebelum dikonsumsi, sehingga viabilitas bakteri asam laktat khususnya *L.casei* Shirota dalam sediaan belum diketahui. Untuk itu perlu dilakukan uji lanjutan terhadap viabilitas bakteri asam laktat khususnya *L.casei* Shirota dalam sediaan obat ataupun makanan setelah dilakukan penambahan inulin sebagai prebiotik, seperti uji daya tahan hidup bakteri dalam sediaan.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### V.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pembahasan maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Dari hasil analisis statistika terlihat bahwa penambahan inulin pada media MRS Broth dapat mempengaruhi jumlah *L.casei* Shirota yaitu, pada konsentrasi 0,1% jumlah koloni  $5,9 \times 10^9$ , konsentrasi 1% jumlah koloni  $6,8 \times 10^{10}$ , dan konsentrasi 10% jumlah koloni  $3,7 \times 10^{10}$ .
2. Pertumbuhan koloni *L.casei* Shirota yang optimum terdapat pada penambahan inulin 1%.

#### V.2 Saran

1. Sebaiknya dilakukan uji lanjutan pengaruh penambahan berbagai konsentrasi inulin terhadap kelangsungan hidup BAL dalam sediaan obat dan makanan.
2. Sebaiknya dilakukan uji lanjutan dengan menggunakan konsentrasi 0,1% sampai 10%.



## DAFTAR PUSTAKA

1. Surono, I.S. *Probiotik, Susu Fermentasi dan Kesehatan*. YAPMMI. Jakarta. 2004.
2. Waspodo, I., *Efek Probiotik, Prebiotik, dan Synbiotik untuk Kesehatan*. <http://chordtunes.blogspot.com/2009/06/efek-probiotik-prebiotik-dan-synbiotik.html>. 2009. Diakses 05 Juni 2009.
3. Widowati, S., *Dahlia Bunganya Indah, Umbinya Mengandung Inulin*. <http://www.litbang.deptan.go.id/artikel/one/115/pdf/Dahlia%20Bunganya%20Indah,%20Umbinya%20Mengandung%20Inulin.pdf>. 2006. Diakses 23 Juni 2009.
4. Crow, D, *Inulin-A Comprehensive Scientific Review*. [http://members.shaw.ca/duncancrow/inulin\\_review.html](http://members.shaw.ca/duncancrow/inulin_review.html). 2000. Diakses 6 November 2009.
5. Pdrhealth. *Prebiotics*. [http://www.pdrhealth.com/drug\\_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/pre\\_0326.shtml](http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/pre_0326.shtml). 2007. Diakses 9 Mei 2009.
6. Pramungdimurti, E., *Probiotik dan Efek Perlindungannya Terhadap Kanker Kolon*. <http://4-healthyfood.blogspot.com/2008/04/probiotik-dan-efek-perlindungannya.html>. 2008. Diakses 3 Agustus 2009.
7. Purwandhani, Siti N., dkk., *Stabilitas Thermal Agensia Probiotik L. acidophilus SNP 2 Terenkapsulasi Metode Ekstrusi dan Emulsi*. <http://p3m.amikom.ac.id/p3m/84%20%20STABILITAS%20THERMAL%20%20AGENSIA%20PROBIOTIK%20%20L.%20acidophillus.pdf>. 2007. Diakses 23 November 2009.
8. Effendi Irwan, Feliatra, Suryadi Edward, *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Ikan Kerapu Macan (Ephinephelus fuscogatus) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan. Natur Indonesia*. <http://www.unri.ac.id/jurnal/JournalIndonesia/vol6%282%29/Feliatra.pdf>. 2004. Diakses 23 November 2009.
9. Yulinery Titin, Yulianto Eko, Nurhidayat Novik., *Uji Fisiologis Probiotik Lactobacillus sp. Mar 8 yang Telah Dienkapsulasi dengan Menggunakan Spray Dryer untuk Menurunkan Kolesterol*. <http://www.unsjournals.com/Biodiversitas Volume 7 No.2 Hal 118-122/D/D0702/D070205.pdf>. 2006. Diakses 23 November 2009.

10. Silalahi, J. *Makanan Fungsional untuk Kesehatan*. PT. Kanisius, Jakarta. 2006. Hal 110.
11. Wahyuni, Endang, *Probiotik dari Bakteri Asam Laktat*. [http://www.biotek.lipi.go.id/index.php?view=article&catid=51&id=40%3AProbiotik&format=pdf&option=com\\_content&Itemid=55&PHPS ESSID=48e78307766faf9a1de32f6e55d6d581](http://www.biotek.lipi.go.id/index.php?view=article&catid=51&id=40%3AProbiotik&format=pdf&option=com_content&Itemid=55&PHPS ESSID=48e78307766faf9a1de32f6e55d6d581).2003. Diakses 23 November 2009.
12. Pato, U. *Potensi Bakteri Asam Laktat yang diisolasi dari Dadih untuk Menurunkan Resiko Penyakit Kanker*. *Jurnal Natur Indonesia*. 5 (2). 2003. 162-166.
13. Heasman, Julian. *Lactobacillus Casei Strain Shirota*. (<http://www.cgstock.com/candida/shirota.html>).2001. Diakses 6 November 2009.
14. Nutracon, Yakult's Sweet Succes, [http://www.exchange.healthwell.com/ccn/FFN.backs/dec\\_01/nutrac on.cfm](http://www.exchange.healthwell.com/ccn/FFN.backs/dec_01/nutrac on.cfm).2002. Diakses 18 Oktober 2009.
15. Verbeke. K. *Effect of Lactobacillus Casei Shorita, Bifidobacterium breve, and Oligofructose-enriched inulin on colonic nitrogen-protein metabolism in healthy humans*. ([http://www.ssffmp.or.id/suplemen/cetak\\_detail.asp?mid=3&id=142308&kat\\_id=105&kat\\_id1=149&kat\\_id2=208](http://www.ssffmp.or.id/suplemen/cetak_detail.asp?mid=3&id=142308&kat_id=105&kat_id1=149&kat_id2=208)).2006. Diakses 21 Oktober 2009.
16. Restuccia C. *Lactobacillus Casei*. [http://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus\\_casei](http://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus_casei)2004. Diakses 6 November 2009
17. Ardiansyah. *Probiotik dan Prebiotik*. <http://ardiansyah.multiply.com/journal/item/22>.2007. Diakses 8 Oktober 2009.
18. Gsianturi. *Probiotik dan Prebiotik untuk Kesehatan*. <http://www.gizi.net/cgi-bin/berita/fullnews.cgi?newsid1012190510,19960>.,2002. Diakses 8 Oktober 2009.
19. Agrobio. *Probiotik Sahabat manusia*. <http://docs.google.com/gview?a=v&q=cache:mkiVvNgZVkJ:www.unsjournals.com/D/D0702/D070205.pdf+journal+probiotik+dan+bal&hl=id&gl=id>.2008. Diakses 2 Agustus 2009.

20. Bioma. *Inulin untuk Kesehatan.*  
<http://mybioma.wordpress.com/2008/06/04/inulin-untuk-kesehatan/>.2008. Diakses 26 Juni 2009.
21. Zamora, Antonio. *Carbohydrates-chemical Structure, Disaccharides Consist of Two Simple Sugar.*  
<http://www.scientificphysic.com/fitness/carbohydrates1.html>.2007.  
Diakses 11 Oktober 2009.
22. Crow, D. *Inulin References: Reversing Bowel Dysbiosis.*  
<http://members.shaw.ca/duncancrow/2008>. Diakses 23 Mei 2009.
23. Djide, N., Sartini. *Analisis Mikrobiologi Farmasi.* Laboratorium Mikrobiologi FMIPA. UNHAS. Makassar. 2005.
24. Lay, W.B. *Analisis Mikroba di Laboratorium,* PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta. 1994.