

KAJIAN ISOLAT BAKTERI ASAM LAKTAT DALAM MENURUNKAN KOLESTEROL SECARA IN VITRO DENGAN KEBERADAAN OLIGOSAKARIDA

A Study In Vitro of Lactic Acid Bacteria (LAB) Isolates on Cholesterol Lowering Ability in The Presence of Oligosaccharides

Yati Maryati^{1,2}, Lilis Nuraida^{3,4}, Ratih Dewanti-Hariyadi^{3,4}

¹Program Studi Ilmu Pangan, Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Jl. Raya Darmaga, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

²Pusat Penelitian Kimia, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Kawasan PUSPIPTEK Serpong, Tangerang Selatan, Banten 15314

³Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

⁴South East Asian Food and Agriculture Science and Technology Center Jl. Puspa No. 1, Gedung SEAFast Center, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

Email: maryati97@yahoo.com; lilis@seafast.org

ABSTRAK

Penelitian ini mengevaluasi lima isolat bakteri asam laktat (BAL) dari sumber yang berbeda, yaitu *Lactobacillus fermentum* S21209 dan *Lactobacillus plantarum* 1-S27202 dari tempe, *Lactobacillus rhamnosus* R23 dan *Pediococcus pentosaceus* 1-A38 dari ASI dan isolat komersial *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 dari pencernaan manusia dalam kemampuannya menurunkan kolesterol secara *in vitro* dan kemampuannya memetabolisme senyawa oligosakarida prebiotik. Pengaruh senyawa oligosakarida terhadap kemampuan isolat BAL terpilih untuk menurunkan kolesterol juga dievaluasi. Pengujian dilakukan pada media berbasis MRS dengan atau tanpa oligosakarida terdiri dari galaktooligosakarida (GOS), fruktooligosakarida (FOS), inulin, hidrolisat inulin atau kombinasi oligosakarida sebagai prebiotik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua isolat mampu menurunkan kolesterol, dan penurunan kolesterol tertinggi ditunjukkan oleh isolat *L. acidophilus* FNCC0051 dan *L. rhamnosus* R23. Penurunan kolesterol diduga terjadi melalui dua cara yang berbeda. Mekanisme penurunan kolesterol oleh isolat *P. pentosaceus* 1-A38 melibatkan asimilasi kolesterol, sedangkan pada keempat isolat lainnya kemungkinan melibatkan pengikatan kolesterol pada permukaan sel. Selain itu, isolat BAL juga memiliki kemampuan yang berbeda dalam memanfaatkan oligosakarida prebiotik, terlihat pada penurunan total gula dalam medium. Metabolisme senyawa oligosakarida oleh *L. acidophilus* FNCC0051 dan *L. rhamnosus* R23 menghasilkan beberapa asam organik termasuk SCFA dengan proporsi terbesar asam laktat diikuti oleh asam asetat. Selain itu, proporsi asam propionat dan butirir dipengaruhi oleh jenis isolat dan sumber karbon. *L. acidophilus* FNCC 0051 mampu menurunkan kolesterol dalam media berbasis MRS dengan keberadaan oligosakarida baik tunggal maupun kombinasi sebagai sumber karbon dan melibatkan mekanisme baik asimilasi dan pengikatan kolesterol pada permukaan sel.

Kata kunci: Bakteri asam laktat (BAL), oligosakarida, sinbiotik, penurunan kolesterol, prebiotik

ABSTRACT

This work evaluated the abilities of five isolates of lactic acid bacteria (LAB) from different sources, i.e. *Lactobacillus fermentum* S21209 and *Lactobacillus plantarum* 1-S27202 from tempe, *Lactobacillus rhamnosus* R23 and *Pediococcus pentosaceus* 1-A38 from human breast milk and a commercially available human isolates *Lactobacillus acidophilus* FNCC0051 in lowering cholesterol by *in vitro* and metabolizing the prebiotic oligosaccharide compounds. The effects of oligosaccharide compounds on the performance of the LAB isolates in lowering cholesterol were also evaluated. The tests were done in MRS based medium *in vitro* with or without oligosaccharides i.e. galactooligosaccharides (GOS), fructooligosaccharides (FOS), inulin, hydrolyzed inulin or combination of oligosaccharides as prebiotics. The results revealed that all isolates were able to reduce cholesterol in the medium, and the highest cholesterol reduction was observed for *L. acidophilus* FNCC0051 and *L. rhamnosus* R23. There are two different mechanism in the lowering

of cholesterol; cholesterol assimilation and cholesterol binding on the cell surface. For the case of *P. pentosaceus* 1-A38, it involves the assimilation, while the other four isolates may involve cholesterol binding on the cell surface. In addition, the tested LAB's has different ability to use prebiotics, as shown by the reduction of total sugar in the medium. Oligosaccharides metabolism by *L. acidophilus* FNCC0051 and *L. rhamnosus* R23 resulted in several organic acid and SCFA with lactic acid produced as the largest proportion followed by acetic acid. Furthermore, the proportion of propionic and butyric acids were influenced by the type of isolates and carbon source. *L. acidophilus* FNCC 0051 was able to reduce cholesterol in the MRS based medium with oligosaccharides and their combination as carbon source and cholesterol reducing ability seems to involve both assimilation and cholesterol binding on the cell surface.

Keywords: Lactic acid bacteria (LAB), oligosaccharides, synbiotic, cholesterol reduction, prebiotics

PENDAHULUAN

Saat ini pengembangan pangan fungsional berbasis probiotik dan prebiotik dengan fungsi hipokolesterolemik terus dikembangkan. Kondisi hiperkolesterolemia dapat meningkatkan risiko terhadap penyakit jantung koroner (kardiosvaskular). WHO (2011) memperkirakan bahwa pada tahun 2030, penyakit kardiosvaskular mempengaruhi sekitar 23,6 juta orang di seluruh dunia. Hal ini terjadi sebagai akibat pola dan gaya hidup masyarakat modern melalui perubahan konsumsi makanan sehari-hari tanpa pengaturan pola makan dan mengontrol asupan zat gizi secara seimbang sesuai dengan kebutuhan. Penelitian telah menunjukkan bahwa dengan berkurangnya 1% kolesterol dalam darah dapat mengurangi risiko penyakit jantung koroner sebesar 2-3% (Manson dkk., 1992). Bakteri probiotik memiliki pengaruh positif terhadap kesehatan, salah satunya adalah dalam menurunkan kolesterol (Sudha dkk., 2009; Liong dan Shah, 2005a; Zhuang dkk., 2012). Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa beberapa mekanisme probiotik dalam memberikan efek hipokolesterolemia meliputi dekonjugasi enzimatis asam empedu oleh aktivitas hidrolase garam empedu (*bile salt hydrolase*) probiotik, asimilasi kolesterol probiotik, ko-presipitasi kolesterol dengan dekonjugasi empedu, pengikatan kolesterol ke dalam dinding sel probiotik, penggabungan (inkorporasi) kolesterol ke dalam membran sel probiotik selama pertumbuhan, konversi kolesterol menjadi coprostanol, dan produksi asam lemak rantai pendek (SCFA) dari hasil fermentasi oleh probiotik dengan keberadaan prebiotik (Ooi dan Liong, 2010). Kemampuan bakteri probiotik untuk mendekongugasi garam empedu merupakan aspek penting bagi bakteri tersebut untuk dapat bertahan terhadap garam empedu dalam saluran pencernaan. Jenis bakteri yang umum digunakan sebagai probiotik adalah bakteri asam laktat (BAL).

Produk pangan fungsional probiotik dapat ditingkatkan fungsinya dengan penambahan prebiotik menjadi produk sinbiotik. Prebiotik merupakan senyawa nutrisi yang dikelompokkan berdasarkan pada kemampuan untuk mendorong pertumbuhan bakteri usus tertentu yang

menguntungkan (probiotik). Menurut Roberfroid (2007) bahwa prebiotik merupakan "bahan pangan yang tidak dapat dicerna (*indigestible*) oleh usus yang secara selektif merangsang pertumbuhan dan aktivitas mikroflora dalam saluran pencernaan (kolon) sehingga meningkatkan kesehatan dan kesejahteraan inangnya". Prebiotik harus memenuhi kriteria sebagai berikut: 1) tidak dihidrolisis atau diabsorpsi oleh sistem pencernaan bagian atas, 2) difermentasi pada usus besar hanya oleh bakteri yang bermanfaat bagi kesehatan, 3) mampu mengatur komposisi mikroflora pada usus besar menuju komposisi yang ideal bagi kesehatan, dengan cara meningkatkan jumlah bakteri yang menguntungkan dan mereduksi jumlah bakteri patogen (Kolida, 2007). Peningkatan jumlah bakteri menguntungkan dalam kolon memerlukan suatu sumber karbohidrat yang tidak dapat tercerna, sehingga dapat dijadikan substrat untuk pertumbuhan bakteri probiotik dalam kolon. Prebiotik sebagian besar adalah serat makanan, seperti oligosakarida, namun tidak seluruh serat makanan merupakan prebiotik.

Penelitian Hernandez dkk. (2012) telah menunjukkan bahwa karbohidrat prebiotik dapat meningkatkan kelangsungan hidup bakteri menguntungkan selama terpapar kondisi lambung. Beberapa serat makanan, khususnya serat larut, menunjukkan aktivitas prebiotik. Kelompok prebiotik antara lain: prebiotik berjenis inulin seperti FOS (fruktooligosakarida) dan galaktooligosakarida (GOS) (Roberfroid, 2007; Kelly, 2009). Karbohidrat lainnya yang berpotensi sebagai prebiotik yaitu laktulosa, laktosukrosa, oligosakarida kedelai, isomaltooligosakarida, palatinosa, xylooligosakarida, dan glukooligosakarida (Manning dan Gibson, 2004).

Inulin dan FOS merupakan fruktan yang memiliki struktur spesifik (ikatan β (2-1)) tidak dapat terhidrolisis oleh enzim pencernaan manusia, dan senyawa ini akan sampai ke usus besar dan difermentasi oleh mikroba (Franck, 2000). Perbedaan potensi prebiotik antara fruktan yang berbeda tercermin terhadap interaksinya dengan epitel usus besar atau dengan organisme inang (Hughes dkk., 2001). Hal ini menunjukkan bahwa campuran oligo- dan/atau polisakarida yang terdiri dari unit fruktosa dengan konfigurasi β -pada

anomeric C₂ pada inulin menyebabkan tipe fruktan tahan terhadap hidrolisis oleh enzim pencernaan usus manusia, karena memiliki kekhususan pada ikatan α -glikosidik (Roberfroid, 2007). Prebiotik akan dimetabolisme oleh probiotik di dalam kolon dan menghasilkan *Short Chain Fatty Acid* (SCFA), yang berkontribusi terhadap salah satunya hipokolesterolemia, melalui dua mekanisme, yaitu penurunan penyerapan kolesterol disertai peningkatan ekskresi kolesterol melalui feses, dan produksi asam lemak rantai pendek (SCFA) yang difermentasi secara selektif oleh mikroflora bakteri usus (Arjmandi dkk., 1992). Rossi dkk. (2005) menemukan bahwa butirir merupakan produk fermentasi utama dari inulin, sedangkan asetat diproduksi dari fruktooligosakarida. Efek hipokolesterolemik dari prebiotik terutama disebabkan SCFA. Butirir diketahui menghambat sintesis kolesterol hati dan menyediakan sumber energi bagi sel-sel epitel usus manusia, sedangkan propionat dapat menghambat sintesis asam lemak dalam hati, sehingga menurunkan tingkat sekresi triasilgliserol. Propionat yang juga terlibat dalam pengendalian sintesis kolesterol di hati dan mengurangi laju sintesis kolesterol yang dapat menyebabkan penurunan kadar kolesterol (Trautwein dkk., 1998). Efek prebiotik bersifat spesifik terhadap jenis probiotik tertentu. Ukuran molekul, komposisi gula penyusun dan struktur ikatan prebiotik akan menentukan jenis probiotik yang dapat memetabolismenya terkait dengan enzim yang disekresikan oleh probiotik tersebut.

Kombinasi antara prebiotik dan probiotik (sinbiotik) dalam studi *in vivo* telah menunjukkan bahwa konsentrasi total serum lipid, triasilgliserol dan total kolesterol yang berkurang secara signifikan pada tikus diberikan diet sinbiotik dibandingkan dengan diet probiotik atau prebiotik (Umeki dkk., 2004). Selain itu Pereira dan Gibson (2002) melaporkan bahwa prebiotik juga dapat menurunkan total kolesterol dan kadar kolesterol LDL (*low-density lipoprotein*). Namun sebagian besar penelitian sinbiotik ditunjukkan dalam studi *in vivo* masih kurang begitu dipahami, oleh karena itu perlu adanya kajian secara *in vitro* sebagai dasar untuk memperjelas interaksi yang terjadi dan penentuan kombinasi efektif antara prebiotik dan probiotik dalam memberikan efek penurunan kolesterol.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi isolat BAL yang berpotensi sebagai probiotik dalam menurunkan kolesterol dan memetabolisme oligosakarida serta mengevaluasi pengaruh senyawa oligosakarida terhadap kemampuan isolat BAL dalam mereduksi kolesterol secara *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Bahan utama oligosakarida yang digunakan dalam penelitian ini adalah Inulin komersial ORAFIT[®], FOS dari

ORAFIT[®], GOS komersial dari JINAO[®] (Anhui China), dan hidrolisat inulin (Laboratorium Puslit Kimia-LIPI). Bakteri Asam Laktat (BAL) yaitu, isolat BAL lokal yang bersumber dari ASI (*Pediococcus pentosaceus* 1-A38, *Lactobacillus rhamnosus* R23) dan isolat BAL lokal dari tempe (*Lactobacillus plantarum* 1-S27202, *L. fermentum* S21209) yang diperoleh dari Laboratorium Seafast Center IPB, dan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 merupakan isolat dari pencernaan manusia, diperoleh dari UGM.

Evaluasi Isolat BAL dalam Menurunkan Kolesterol secara *In Vitro*

Evaluasi isolat BAL dalam menurunkan kolesterol dilakukan dalam medium MRSB berisi 0,30% *oxbile* dan 80 μ g/mL larutan kolesterol larut air. Sebelumnya larutan kolesterol larut air (10mg/mL) yang telah disterilisasi dengan membran filter *cellulose acetat* 0,22 μ m dipersiapkan. Kedalam medium MRSB yang telah ditambahkan 0,3% *oxbile* diinokulasikan sebesar 1% v/v kultur isolat BAL, berumur 24 jam dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Liong dan Shah, 2005a; Zhang dkk., 2007). Total BAL dihitung dengan *Standar Plate Count* (SPC) (BAM, 2001), kultur disentrifugasi 10.000g selama 10 menit pada suhu 4°C dan dilakukan pengukuran kadar kolesterol pada medium (supernatan) atau pada sel pelet dengan menggunakan metode kalorimetri (Gilliland dkk., 1985). Sel pelet dicuci sebanyak 2 (dua) kali dengan larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) dan di-resuspensikan ke dalam air destilat sejumlah volume yang sama dengan media awal. Penurunan konsentrasi kolesterol pada media ditentukan berdasarkan selisih antara konsentrasi kolesterol yang ditambahkan di awal sebelum masa inkubasi dengan konsentrasi kolesterol yang tersisa pada media (supernatan). Konsentrasi kolesterol yang terikat pada sel dengan mengukur kadar kolesterol dari sel pelet yang telah di-resuspensi dengan air destilat.

Evaluasi Kemampuan Isolat BAL untuk Tumbuh pada Oligosakarida

Evaluasi kemampuan isolat BAL untuk memetabolisme oligosakarida dilakukan pada medium berbasis MRS dengan mengganti glukosa dengan oligosakarida (Zhang dkk., 2007). Isolat BAL diinokulasikan sebesar 1% v/v, ke dalam 10 mL media berbasis MRS yang mengandung 5% b/v oligosakarida selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Semua percobaan diulang sebanyak tiga kali. Kemampuan pertumbuhan bakteri ditentukan berdasarkan *optical density* pada 620 nm (OD₆₂₀) menggunakan spektrofotometer. Pengukuran pH dan total gula dilakukan pada 0 dan 24 jam. Pengukuran gula dilakukan dengan metode fenol sulfat (Dubois dkk., 1956). Selain itu, terhadap supernatan *L.*

acidophilus dan *L. Rhamnosus* dilakukan pengukuran profil asam organik termasuk SCFA (*Short Chain Fatty Acid*) menggunakan *high performance liquid chromatography* (HPLC) (Dubey dan Mistry, 1996), dengan detektor refractive index, kolom Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) dan suhu utama dipertahankan pada 65°C, sedangkan fase gerak 0,009 mol/L H₂SO₄ dengan laju alir 0,6 ml/menit.

Evaluasi Kemampuan Isolat BAL Terpilih untuk Menurunkan Kolesterol dengan Keberadaan Oligosakarida

Evaluasi kemampuan isolat BAL terpilih untuk menurunkan kolesterol dengan keberadaan oligosakarida dilakukan pada media berbasis MRS dengan berbagai oligosakarida tunggal (5% GOS, 5% FOS, 5% inulin dan 5% hidrolisat inulin) dan kombinasi sumber karbon (5% FOS+ 5% GOS, 5% FOS + 5% inulin, 5% FOS + 5% bk. hidrolisat inulin, 5% GOS + 5% inulin, 5% GOS + 5% bk. hidrolisat inulin, 5% inulin + 5% bk. hidrolisat inulin), sebagai kontrol digunakan media berbasis MRS tanpa gula dan dengan glukosa. Inkubasi kultur dan analisis kadar kolesterol serta profil asam organik (asam laktat) termasuk SCFA (asam asetat, butirrat dan propionat) dilakukan seperti di atas.

Analisis Data

Data yang diperoleh dari tiga kali ulangan dihitung rata-rata dan standar deviasinya serta diolah secara statistik dengan analisis varian dan uji HSD (*Honestly Significant Difference*) Tukey menggunakan Minitab *Statistical Software, Release 16 for Windows* dengan nilai signifikansi ($p < 0,05$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Evaluasi Isolat BAL dalam Menurunkan Kolesterol secara *In Vitro*

Hasil evaluasi menunjukkan bahwa kelima isolat bakteri asam laktat (BAL) dari berbagai sumber yang berbeda dalam kemampuannya menurunkan kolesterol, ditunjukkan pada Tabel 1. Hasil pengujian menunjukkan bahwa semua isolat memiliki kemampuan untuk menurunkan kolesterol di dalam media. Penurunan kolesterol dari semua isolat di dalam media MRSB tanpa glukosa menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata antar isolat yang diujikan ($p > 0,05$), sedangkan di dalam media yang mengandung glukosa (supernatan) maupun pada sel pelet terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).

Kemampuan menurunkan kolesterol bervariasi antar isolat. Penurunan kolesterol terbesar pada media diperoleh pada isolat *L. acidophilus* FNCC0051 dan *L. rhamnosus* R23, masing-masing sebesar $20,56 \pm 0,39 \mu\text{g/mL}$ dan $14,83 \pm 5,01 \mu\text{g/mL}$. Keempat isolat BAL (*L. fermentum* S21209, *L. plantarum* 1-S27202, *L. acidophilus* FNCC0051, *L. rhamnosus* R23) penurunan kolesterol pada media berkorelasi dengan pengikatan pada sel pelet. Namun untuk *P. Pentosaceus* 1-A38 penurunan kolesterol tidak berkorelasi dengan pengikatan pada sel pelet. Mekanisme pada keempat isolat untuk menurunkan kolesetrol adalah dengan pengikatan pada permukaan sel, sementara untuk *P. pentosaceus* 1-A38 dengan mekanisme lainnya misalnya asimilasi. Penurunan dan pengikatan kolesterol terbesar terjadi pada isolat *Lactobacillus acidophilus* FNCC0051. Kemampuan menurunkan kolesterol terbesar dan pengikatan kolesterol terbesar ditunjukkan oleh BAL yang diisolasi dari

Tabel 1. Penurunan kolesterol ($\mu\text{g/mL}$) oleh isolat BAL dalam media MRS dan sel pelet dengan dan tanpa gula (glukosa)

Isolat BAL	Penurunan kolesterol didalam media (supernatan) ($\mu\text{g/mL}$)		Pengikatan kolesterol ($\mu\text{g/mL}$) pada sel pelet	Total BAL dalam media + gula (glukosa) (log cfu/mL
	Tanpa gula	+ Gula (glukosa)		
Media tanpa BAL	$0,37 \pm 3,75^a$	$4,83 \pm 4,48^c$	$0,42 \pm 0,19^c$	(-)* ^d
<i>L. fermentum</i> S21209	$3,50 \pm 0,87^a$	$12,44 \pm 0,96^{bc}$	$13,44 \pm 1,26^b$	$9,74 \pm 0,53^b$
<i>L. plantarum</i> 1-S27202	$1,50 \pm 0,50^a$	$10,00 \pm 0,88^{bc}$	$11,22 \pm 2,12^b$	$10,40 \pm 0,08^{ab}$
<i>L. acidophilus</i> FNCC 0051	$5,50 \pm 1,32^a$	$20,56 \pm 0,39^a$	$19,89 \pm 2,59^a$	$10,99 \pm 0,01^a$
<i>P. pentosaceus</i> 1-A38	$2,11 \pm 1,26^a$	$10,33 \pm 1,55^{bc}$	$1,11 \pm 1,07^c$	$8,91 \pm 0,15^c$
<i>L. rhamnosus</i> R23	$4,83 \pm 4,01^a$	$14,83 \pm 5,01^{ab}$	$13,39 \pm 2,08^b$	$10,52 \pm 0,25^a$

Nilai rata-rata (n = 3) ± standar deviasi dengan perbedaan huruf pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$). Konsentrasi kolesterol yang ditambahkan pada setiap perlakuan 80-100 $\mu\text{g/mL}$. *) limit deteksi ($< 1 \times 10^{-1} \text{cfu/mL}$)

manusia yaitu *Lactobacillus acidophilus* FNCC0051 dan *L. rhamnosus* R23. Kemampuan menurunkan kolesterol pada kedua isolat ini berkorelasi dengan jumlah sel yang masing-masing mencapai sebesar 10,99 log cfu/ml dan 10,52 log cfu/ml.

Hasil di atas sesuai dengan Gilliland dkk. (1985) menunjukkan bahwa kemampuan mengasimilasi kolesterol dari media bervariasi secara signifikan diantara strain bakteri yang berbeda. Percobaan *in vitro* yang dilakukan Liong dan Shah (2005b) menunjukkan bahwa kolesterol yang dapat dihilangkan dari media oleh isolat BAL tidak hanya melalui asimilasi selama pertumbuhan, tetapi juga melalui pengikatan kolesterol ke permukaan sel bakteri, hal ini merupakan fenomena fisik yang berhubungan dengan dinding sel bakteri (Kimoto dkk., 2002). Perbedaan jumlah kolesterol yang terikat pada sel disebabkan oleh sifat kimia dan adanya struktur peptidoglikan pada dinding sel bakteri yang memiliki berbagai komposisi asam amino di tiap jenis bakteri, sehingga komponen inilah yang kemungkinan berperan dalam pengikatan kolesterol ke dinding sel (Usman dan Hosono, 1999; Ziarno dkk., 2010). Mekanisme lain dalam mereduksi kolesterol dari media adalah dipengaruhi oleh kemampuan isolat BAL tersebut dengan mengkonjugasikan garam empedu (Ahn dkk., 2003; Liong dan Shah, 2005a; Al-Saleh dkk., 2006). Proses dekonjugasi terjadi karena aktivitas enzim *Bile Salt Hydrolase*. Pada penelitian ini penurunan kolesterol oleh *P. pentosaceus* I-A38 diduga melibatkan mekanisme asimilasi kolesterol.

Evaluasi Kemampuan Isolat BAL untuk Tumbuh pada Senyawa Oligosakarida

Pertumbuhan isolat BAL dalam memetabolisme senyawa oligosakarida ditunjukkan dalam tingkat populasi isolat BAL yang dinyatakan dengan nilai OD₆₂₀, nilai total gula yang dikonsumsi setelah inkubasi pada suhu 37°C selama

24 jam, seperti terlihat pada Tabel 2 dan Tabel 3. Berdasarkan perubahan nilai OD₆₂₀ kelima isolat menunjukkan kemampuan tumbuh pada oligosakarida yang berbeda nyata (p<0.05), dimana isolat *L. fermentum* S21209, *L. acidophilus* FNCC0051, *P. pentosaceus* I-A38 dan *L. rhamnosus* R23 memiliki kemampuan pertumbuhan terbaik pada media hidrolisat inulin, sedangkan isolat *L. plantarum* 1-S27202 pada media mengandung GOS.

Pemanfaatan oligosakarida prebiotik oleh bakteri probiotik tergantung spesies. Secara umum, spesies *Lactobacillus* berkemampuan memfermentasi sebagian besar prebiotik, sesuai dengan laporan yang telah banyak diteliti (Zhang dkk., 2007). Kemampuan setiap isolat dalam memproduksi enzim yang dapat menghidrolisis oligosakarida merupakan faktor yang mempengaruhi efektivitas dari prebiotik. Adanya tingkat pertumbuhan menunjukkan bahwa isolat-isolat yang diujikan kemungkinan mampu memproduksi enzim, dengan adanya peran dari enzim β-fruktosidase dalam menghidrolisis FOS (Saulnier dkk., 2007) dan enzim β-galaktosidase yang berperan dalam pemecahan GOS (Nuraida dkk., 2011).

Kemampuan BAL untuk menggunakan oligosakarida selain dipengaruhi oleh strain juga dipengaruhi oleh derajat polimerisasi (DP). Derajat polimerisasi yang rendah akan lebih mudah dimetabolisme oleh isolat bakteri asam laktat. FOS dan GOS memiliki DP yang rendah yaitu masing-masing DP 2-7 dan DP 2-8 sehingga mendukung pertumbuhan isolat *L. rhamnosus* R23, sedangkan pada isolat *L. acidophilus* FNCC 0051 mampu memanfaatkan inulin dengan DP yang tinggi (DP 2-60) dan hidrolisat inulin dalam rentang derajat polimerisasi yang rendah DP 2-7 (Susilowati dkk., 2013). Kemampuan isolat BAL untuk tumbuh pada oligosakarida juga ditunjukkan dengan nilai pH yang menurun dari pH 6,5 sampai kisaran pH 6,22 – 3,67, penurunan total gula yang dikonsumsi isolat BAL (Tabel 3), dan analisis terhadap

Tabel 2. Perubahan (Δ) nilai OD₆₂₀ setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam pada medium yang mengandung oligosakarida

Sumber karbon/ oligosakarida	ΔPerubahan nilai OD ₆₂₀				
	<i>L.fermentum</i> S21209	<i>L.plantarum</i> 1-S27202	<i>L.acidophilus</i> FNCC0051	<i>P.pentosaceus</i> I-A38	<i>L.rhamnosus</i> R23
Tanpa gula	0,22±0,05 ^{abE}	0,29±0,02 ^{aE}	0,29±0,02 ^{aD}	0,12±0,01 ^{bC}	0,26±0,06 ^{aC}
Glukosa*)	2,21±0,04 ^{bC}	3,90±0,05 ^{abC}	4,83±0,15 ^{abC}	1,72±0,05 ^{cB}	4,21±0,02 ^{aA}
GOS	3,71±0,09 ^{bB}	6,73±0,38 ^{aA}	3,20±0,44 ^{bCD}	0,33±0,07 ^{cC}	0,70±0,10 ^{cB}
FOS	0,29±0,01 ^{dE}	1,27±0,01 ^{bE}	4,18±0,10 ^{aC}	0,82±0,22 ^{cC}	0,58±0,06 ^{cdB}
Inulin	0,53±0,03 ^{cD}	2,50±0,10 ^{bD}	5,14±0,86 ^{aB}	1,04±0,29 ^{cB}	0,82±0,08 ^{cB}
Hidrolisat inulin	3,95±0,06 ^{cdA}	4,75±0,12 ^{bcB}	7,85±0,33 ^{aA}	6,28±1,17 ^{abA}	3,12±0,51 ^{dA}

Nilai rata-rata perubahan OD₆₂₀ (inkubasi 0 - 24 jam) (n=3) ± standar deviasi dengan huruf kecil yang berbeda pada baris yang sama terdapat perbedaan secara signifikan (P < 0,05). Nilai rata-rata dengan huruf besar pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nilai rata-rata yang signifikan (P < 0,05). *) Non prebiotik

Tabel 3. Total gula yang dikonsumsi oleh BAL setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam pada medium yang mengandung oligosakarida

Sumber karbon/ oligosakarida	Konsentrasi total gula dikonsumsi (g/L)				
	<i>L.fermentum</i> S21209	<i>L.plantarum</i> 1-S27202	<i>L.acidophilus</i> FNCC 0051	<i>P.pentosaceus</i> 1-A38	<i>L.rhamnosus</i> R23
Tanpa gula	0,11±0,34 ^{bd}	2,68±0,17 ^{ad}	0,30±0,38 ^{bd}	0,74±0,33 ^{bc}	0,24±0,53 ^{bd}
Glukosa	20,13±5,34 ^{bb}	28,34±2,24 ^{bc}	67,22±0,23 ^{aa}	61,75±1,67 ^{aa}	62,23±0,87 ^{aa}
GOS	17,00±4,18 ^{ac}	32,00±1,14 ^{ab}	24,86±2,80 ^{ac}	27,33±4,79 ^{ab}	48,86±0,98 ^{ca}
FOS	63,47±1,6 ^{ba}	63,06±1,41 ^{ba}	98,06±12,66 ^{aa}	21,94±10,22 ^{cb}	32,85±2,84 ^{ab}
Inulin	34,78±5,33 ^{ab}	21,23±3,99 ^{ac}	30,11±2,10 ^{ab}	37,23±9,03 ^{ab}	13,70±3,25 ^{ac}
Hidrolisat inulin	20,52±7,43 ^{bb}	25,08±1,84 ^{bc}	79,67±1,08 ^{aa}	61,47±1,52 ^{aa}	34,22±4,70 ^{bb}

Nilai rata-rata pH (24 jam) (n=3) ± standar deviasi dengan huruf kecil yang berbeda pada baris yang sama terdapat perbedaan secara signifikan (P <0,05). Nilai rata-rata dengan huruf besar pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nilai rata-rata yang signifikan (P <0,05)

komposisi asam organik (SCFA) oleh isolat *L. acidophilus* FNCC 0051 dan *L. rhamnosus* R23 dalam memetabolisme oligosakarida (Tabel 4).

Penurunan total gula yang dikonsumsi oleh isolat BAL selama inkubasi menunjukkan perbedaan yang nyata (p<0,05) pada keseluruhan media mengandung oligosakarida. Hal tersebut mengindikasikan bahwa oligosakarida prebiotik sebagai sumber karbon tunggal yang terdapat didalam media dapat dimanfaatkan oleh BAL untuk pertumbuhannya. Begitupula pada penurunan nilai pH mengindikasikan bahwa isolat BAL dapat memetabolisme sumber nutrisi yang tersedia dan menghasilkan asam laktat. *L. fermentum* S21209, *L. plantarum* 1-S27202 lebih mudah memetabolisme senyawa FOS, *L. acidophilus* FNCC 0051 lebih mudah memetabolisme senyawa FOS dan hidrolisat inulin. Sementara *P. pentosaceus* 1-A38 berkemampuan memetabolisme senyawa hidrolisat inulin dan *L. rhamnosus* R23 lebih memetabolisme senyawa GOS. Berdasarkan data pada Tabel 3, terlihat bahwa

keseluruhan isolat BAL lebih memanfaatkan media yang mengandung oligosakarida dengan panjang rantai lebih rendah yaitu FOS, GOS, dan hidrolisat inulin dibandingkan dengan inulin yang memiliki rantai lebih panjang.

Analisis asam organik termasuk SCFA terhadap supernatan isolat *L. acidophilus* FNCC0051 dan *L. rhamnosus* R23 menunjukkan bahwa asam laktat, asetat, propionat dan butirir dihasilkan oleh kedua isolat, dengan proporsi yang berbeda nyata (p<0,05) antar sumber karbon dan jenis isolat, seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4.

Asam laktat merupakan porsi terbesar dihasilkan oleh kedua isolat, diikuti dengan asam asetat. Proporsi asam butirir dan asam propionat dipengaruhi oleh jenis isolat dan jenis sumber karbon, namun demikian jumlah asam propionat yang dihasilkan oleh *L. acidophilus* FNCC 0051 dan *L. Rhamnosus* R23 tidak berbeda nyata (p>0,05) antar jenis sumber karbon. Beberapa penelitian menunjukkan profil asam lemak rantai pendek (SCFA) bergantung pada sifat fisikokimia substrat

Tabel 4. Komposisi asam organik dan SCFA yang dihasilkan oleh (*L.acidophilus* FNCC 0051 dan *L. rhamnosus* R23 dalam memetabolisme oligosakarida

Sumber karbon/ oligosakarida	Persentase masing-masing asam organik dan SCFA dari total asam (%)							
	<i>L. acidophilus</i> FNCC 0051				<i>L. rhamnosus</i> R23			
	Asam laktat	Asam asetat	Asam propionat	Asam butirir	Asam laktat	Asam asetat	Asam propionat	Asam butirir
Glukosa	80,5	1,5	1,7	16,3	78,1	12,1	1,2	8,6
GOS	74,4	20,2	4,0	1,3	73,9	15,6	1,9	8,6
FOS	83,9	13,3	2,0	0,9	59,9	34,4	3,8	1,9
Inulin	64,2	31,1	2,1	2,5	83,0	14,1	1,8	1,1
Hidrolisat inulin	86,6	11,7	1,0	0,7	82,2	14,2	1,4	2,1

(Khan dan Edwards, 2005). Proporsi asam laktat yang tinggi pada glukosa mengindikasikan bahwa kedua bakteri tersebut termasuk kedalam kelompok bakteri homofermentatif ketika memfermentasi glukosa.

Kemampuan kedua isolat ini dalam menghasilkan SCFA dari oligosakarida akan meningkatkan manfaatnya di dalam saluran pencernaan. Efek utama dari SCFA pada fungsi kolon merupakan hasil penyerapan dan metabolisme oleh *colonocytes*, meskipun SCFA juga merupakan substrat metabolik untuk jaringan *host* lain. Produksi SCFA ditentukan oleh banyak faktor, termasuk jumlah dan jenis mikroflora yang ada dalam usus besar, sumber substrat dan waktu transit diusus (Hijova dan Chmelarova, 2007).

Evaluasi Kemampuan Isolat BAL (*L. acidophilus* FNCC0051) dalam Menurunkan Kolesterol dengan Keberadaan Oligosakarida

Pengaruh oligosakarida terhadap kemampuan isolat *L. acidophilus* FNCC 0051 dalam mereduksi kolesterol didalam media berbasis MRS ditunjukkan pada Tabel 5. Kemampuan isolat BAL *L. acidophilus* FNCC0051 untuk mereduksi kolesterol dan konsentrasi kolesterol yang diserap oleh sel dipengaruhi secara nyata ($p < 0,05$) oleh jenis sumber karbon yang ada pada medium. Pada *L. acidophilus* FNCC 0051 penurunan kolesterol pada medium yang berisi jenis sumber karbon tunggal inulin, hidrolisat inulin dan kombinasi FOS dengan GOS, FOS dengan inulin serta FOS dengan hidrolisat inulin tidak berbeda nyata dengan penurunan kolesterol pada medium dengan glukosa ($p > 0,05$).

Penurunan kolesterol pada media GOS, FOS, kombinasi FOS dengan inulin dan GOS dengan inulin menghasilkan nilai penurunan kolesterol yang lebih rendah dari pada medium yang mengandung glukosa. Adapun kemampuan menurunkan kolesterol melalui pengikatan kolesterol pada permukaan sel dipengaruhi medium pertumbuhan sel yang berisi jenis sumber karbon tunggal GOS, FOS, dan kombinasi FOS dengan inulin, FOS dengan GOS, dan FOS dengan hidrolisat inulin.

Kemampuan isolat BAL untuk tumbuh pada oligosakarida juga ditunjukkan dengan nilai pH yang menurun dari pH 6,5 sampai kisaran pH 5,65 – 4,59 dimana pertumbuhan total BAL pada medium yang berisi jenis sumber karbon tunggal dan kombinasi berbeda nyata dengan glukosa. Hasil yang diperoleh menunjukkan keberadaan oligosakarida sebagai sumber karbon dapat mendukung pertumbuhan jumlah total BAL yang lebih tinggi dibandingkan dengan pertumbuhan total BAL pada medium dengan glukosa. Total BAL tertinggi diperoleh pada media FOS, inulin dan kombinasi FOS dengan GOS masing-masing sebesar log 9,21 cfu/ml, 9.17 cfu/ml dan 9,25 cfu/ml.

Data pada Tabel 5 menunjukkan penurunan kolesterol pada medium dan adanya penempelan/pengikatan kolesterol pada sel. Mekanisme yang mungkin bekerja pada penurunan kolesterol oleh isolat tersebut adalah (1) melalui pengikatan kolesterol/perpindahan kolesterol dari medium ke dalam membran seluler selama pertumbuhan sel BAL (Noh dkk., 1997). Oleh karena lipid bakteri Gram-positif ditemukan terutama di membran sel, sehingga penurunan kolesterol dari

Tabel 5. Penurunan kolesterol pada medium, pengikatan kolesterol pada sel pelet serta pertumbuhan BAL oleh aktivitas *L. acidophilus* FNCC0051 di dalam media berbasis MRS dengan keberadaan oligosakarida

Sumber karbon (oligo-sakarida*)	Penurunan kolesterol pada medium (supernatan) (µg/mL)	Pengikatan kolesterol pada sel (µg/mL)	pH	Rata-rata total BAL (log cfu/mL)
TG	5,50±1,32 ^d	3,67±2,31 ^e	6,39±0,00 ^a	7,88±0,089 ^d
GLU	23,56±0,51 ^{abc}	26,61±1,55 ^a	4,59±0,02 ^f	8,03±0,42 ^{cd}
GOS	16,86±0,76 ^{bc}	17,00±2,78 ^{bc}	4,79±0,04 ^d	8,23±0,026 ^{bcd}
FOS	15,83±3,75 ^{cd}	12,06±1,87 ^{cd}	5,65±0,09 ^b	9,21±0,13 ^a
IN	24,44±0,51 ^{abc}	7,44±2,84 ^{de}	5,57±0,02 ^b	9,17±0,13 ^a
HI	25,00±3,91 ^{abc}	11,00±3,46 ^{cd}	4,73±0,04 ^{def}	8,10±0,26 ^{cd}
FOS+GOS	25,00±3,91 ^{abc}	17,83±2,24 ^{bc}	4,81±0,06 ^d	9,25±0,01 ^a
FOS+IN	17,67±5,84 ^{abc}	12,45±3,27 ^{cd}	5,39±0,07 ^d	9,00±0,43 ^{ab}
FOS+HI	25,15±1,73 ^{abc}	20,22±2,34 ^{ab}	4,68±0,02 ^{def}	8,49±0,43 ^{abcd}
GOS+IN	17,33±3,25 ^{bc}	6,44±0,51 ^{de}	4,82±0,02 ^c	8,39±0,51 ^{abcd}
GOS+HI	27,34±4,04 ^{ab}	9,77±1,23 ^{de}	4,63±0,06 ^{ef}	9,10±0,12 ^{ab}
INULIN+HI	29,67±5,25 ^a	9,50±1,67 ^{de}	4,75±0,07 ^{de}	8,77±0,35 ^{abc}

Keterangan :*)TG= Tanpa gula, GLU = Glukosa (Non prebiotik), FOS=fruktooligosakarida, GOS= Galaktooligosakarida, IN = Inulin, HI = Hidrolisat inulin. Nilai rata-rata (n = 3) ± standar deviasi dengan perbedaan huruf pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata (P<0,05)

media oleh isolat disebabkan adanya inkorporasi kolesterol ke dalam membran sel dan kemungkinan telah mengubah komposisi asam lemak dari sel bakteri (Kimoto, 2002); (2) asimilasi kolesterol berkaitan dengan metabolisme kolesterol untuk pertumbuhan sel. Kemampuan asimilasi kolesterol dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti jenis media, keberadaan garam empedu, fase pertumbuhan bakteri, viabilitas dan jumlah sel bakteri (Ziarno dkk., 2007).

Profil Asam Organik

Komposisi asam organik dari berbagai oligosakarida dan kombinasinya disajikan pada Tabel 6. Jenis sumber karbon atau oligosakarida secara nyata mempengaruhi komposisi asam organik termasuk SCFA (asam asetat, asam propionat dan asam butirat) yang dihasilkan oleh isolat *L. acidophilus* FNCC0051. Proporsi tertinggi yaitu asam laktat dihasilkan oleh isolat *L. acidophilus* FNCC 0051 pada media yang berisi hidrolisat inulin, kombinasi FOS dengan GOS, FOS dengan hidrolisat inulin, GOS dengan inulin dan inulin dengan hidrolisat inulin. Namun pada media FOS dan inulin proporsi asam asetat lebih mendominasi dibandingkan asam laktat, asam propionat, dan asam butirat. Adapun pada media berisi GOS dan kombinasi GOS dengan hidrolisat inulin lebih didominasi oleh asam butirat. Pada media berisi kombinasi FOS dengan inulin oleh *L. acidophilus* FNCC 0051 proporsi asam laktat dan asam asetat jumlahnya sebanding.

Berdasarkan data yang diperoleh menunjukkan bahwa oligosakarida yang berbeda dapat menghasilkan komposisi

asam organik termasuk SCFA yang berbeda. *Yield* total asam organik menunjukkan bahwa pada media FOS, hidrolisat inulin kombinasi FOS dengan GOS dan GOS dengan inulin tidak berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan medium yang berisi glukosa, sedangkan medium lainnya menunjukkan *yield* asam organik yang lebih rendah. Hal ini berkaitan dengan kemampuan isolat *L. acidophilus* FNCC0051 dalam memetabolisme senyawa oligosakarida dipengaruhi oleh struktur dari substrat (Derajat Polimerisasi) dan enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh isolat tersebut dalam memecah oligosakarida. Enzim yang dihasilkan bersifat induktif dimana akan diproduksi ketika substrat yang sesuai berada pada lingkungan pertumbuhan BAL (Nuraida dkk., 2011). Beberapa penelitian membuktikan profil asam lemak rantai pendek (SCFA) bergantung pada fisikokimia substrat (Khan dan Edwards, 2005). Hal ini sesuai dengan pernyataan Banuelos dkk. (2008) bahwa produksi SCFA terkait dengan komposisi campuran β -(2-1) fruktan dalam oligosakarida dan berat molekul oligosakaridanya.

KESIMPULAN

Isolat BAL mampu mereduksi kolesterol secara *in vitro* dengan kemampuan yang berbeda-beda pada kisaran $10,00 \pm 0,88 \mu\text{g/ml}$ s.d $20,56 \pm 0,39 \mu\text{g/ml}$. Mekanisme yang mungkin terjadi adalah asimilasi kolesterol dan penyerapan pada permukaan sel. Isolat *L. acidophilus* FNCC0051 dan *L. rhamnosus* R23 mampu menggunakan oligosakarida untuk

Tabel 6. Persentase, konsentrasi total asam dan *yield* asam organik yang dihasilkan oleh isolate *L. acidophilus* FNCC0051 dari berbagai oligosakarida dalam medium yang mengandung kolesterol

Sumber karbon	Persentase masing-masing asam organik dari total asam (%)				Total asam (mM)	Total gula dikonsumsi (g/L)	<i>Yield</i> asam organik (mM/g)
	Asam laktat	Asam asetat	Asam propionat	Asam butirat			
GLU	65,1	31,0	1,7	2,1	219,59± 9,81 ^a	13,94±1,02 ^{cd}	15,81±1,18 ^a
GOS	7,7	12,5	5,5	74,3	7,93±2,06 ^d	8,06±3,29 ^d	1,08±0,36 ^e
FOS	37,5	53,9	3,9	4,6	119,66±0,64 ^c	13,88±5,06 ^{cd}	9,37±3,13 ^{bcd}
IN	41,7	49,9	3,4	5,0	121,88±5,73 ^c	19,61±2,01 ^{bc}	6,26±0,65 ^{cde}
HI	59,9	34,0	2,9	3,2	180,06±6,72 ^b	13,22±0,63 ^{cd}	13,64±0,67 ^{ab}
FOS+GOS	61,9	32,3	3,6	2,2	184,68±12,16 ^b	13,17±2,58 ^{cd}	14,40±2,83 ^{ab}
FOS+IN	46,2	45,5	4,7	3,7	133,22± 1,70 ^c	28,22±7,42 ^{ab}	4,99±1,55 ^{de}
FOS+HI	61,5	31,4	3,8	3,3	175,10± 3,05 ^b	14,67±3,71 ^{cd}	12,52±3,48 ^{abc}
GOS+IN	63,3	30,8	3,1	2,9	180,65± 4,98 ^b	11,83±2,92 ^{cd}	15,94±4,14 ^a
GOS+HI	5,8	13,4	0,0	80,8	8,60±1,30 ^d	19,33±4,10 ^{bc}	0,46±0,11 ^e
IN+HI	57,8	33,1	5,6	3,5	195,09±9,80 ^{ab}	32,22±4,26 ^a	6,13±0,87 ^{de}

*) TG = Tanpa gula, GLU = Glukosa (Non prebiotik), FOS = fruktooligosakarida, GOS = Galaktooligosakarida, IN = Inulin, HI = Hidrolisat inulin. Nilai rata-rata (n = 3) perbedaan huruf pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)

pertumbuhannya dan menghasilkan senyawa organik termasuk SCFA. Proporsi asam organik dan SCFA yang dihasilkan dari kedua isolat dipengaruhi oleh jenis oligosakarida sebagai sumber karbon. Penggunaan oligosakarida sebagai sumber karbon dan energi oleh *L. acidophilus* FNCC0051 tidak mengurangi kemampuan untuk menurunkan kolesterol. Hasil penelitian ini mengindikasikan kedua isolat ini dapat digunakan dalam pengembangan produk sinbiotik dengan menambahkan oligosakarida. Oligosakarida diharapkan dapat digunakan ketika kedua bakteri ini mencapai kolon.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Pusat Penelitian Kimia LIPI dan Kementerian Riset dan Teknologi melalui program karyasiswa pascasarjana Kemenristek yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahn, Y.T., Kim, G.B., Lim, K.S., Baek, Y.J. dan Kim, H.U. (2003). Deconjugation of bile salts by *Lactobacillus acidophilus* isolates. *International Dairy of Journal* **13**(4): 303-311.
- Al-Saleh, Metwalli A.A.M. dan Abu-Tarboush H.M. (2006). Bile salts and acid tolerance and cholesterol removal from media by some lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Saudi Society for Food and Nutrition* **1**(1): 1-17.
- Arjmandi, B.H., Craig, J., Nathani, S. dan Reeves, R.D. (1992). Soluble dietary fiber and cholesterol influence in vivo hepatic and intestinal cholesterol biosynthesis in rats. *The Journal of Nutrition* **122**: 1559-1565.
- Bacteriological Analytical Manual (BAM) (2001). Aerobic plate count. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/Laboratory/Methods/ucm063346.htm>. [14 Maret 2014].
- Banuelos, O., Layla, Corral, M., M-Ugarte, V., Adrio, J.L. dan Velasco, J. (2008). Metabolism of prebiotic products containing β (2-1) fructan mixtures by two *Lactobacillus* strains. *Anaerobe* **14**: 184-189.
- Dubey U.K. dan Mistry, V.V. (1996). Effect of bifidogenic factors on growth characteristics of bifidobacteria in infant formulas. *Journal Dairy of Science* **79**: 1156-1163.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P. dan Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical of Chemistry* **28**(3): 350-356.
- Franck dan Anne, M.E. (2000). Inulin dan Oligofruktosa. Dalam: Glen Gibson dan Fiona Angus (eds.). *Prebiotics and Probiotics*. LRFA Limited, United Kingdom.
- Gilliland, S.E., Nelson, C.R. dan Maxwell, C. (1985). Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* **49**(2): 377-381.
- Hernandez, H.O., Muthaiyan, Moreno, F.J., Montilla, A., Sanz, M.L. dan Ricke, S.C. (2012). Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. *Food Microbiology* **30**(2): 355-361
- Hijova, E. dan Chmelarova, A. (2007). Review: Short chain fatty acids and colonic health. *Bratislavske Lekarske Listy* **108**(8): 354-358.
- Hughes, R. dan Rowland, I.R. (2001). Stimulation of apoptosis by two prebiotic *chicory* fructans in the rat colon. *Carcinogenesis* **22**(1): 43-47.
- Khan, K.M. dan Edwards, C.A. (2005). In vitro fermentation characteristics of a mixture of raftilose and guar gum by human faecal bacteria. *European Journal of Nutrition* **44**: 371-376.
- Kelly, G.N.D. (2009). Inulin-type prebiotics: A REVIEW (PART 2). *Alternative Medicine Review* 2009 **14**(1): 36-55.
- Kimoto, H., Ohmomo, S. dan Okamoto, T. (2002). Cholesterol removal from media by Lactococci. *Journal of Dairy Science* **85**(12): 3182-3188.
- Kolida, S. dan Gibson, G.R. (2007). Prebiotic capacity of inulin-type fructans *Journal of Nutrition* **137**: 2503S-2506S.
- Liong, M.T. dan Shah, N.P. (2005a). Optimization of cholesterol removal, growth and fermentation patterns of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4962 in the presence of mannitol, fructooligosaccharide and inulin: a response surface methodology approach. *Applied Microbiology* **98**(5): 1115-1126.
- Liong, M.T. dan Shah, N.P. (2005b). Optimization of cholesterol removal by probiotics in the presence of prebiotics by using a response surface method. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 1745-1753.
- Manning, S. dan Gibson, R.G. (2004). Prebiotics. Best practices in research. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **18**: 287-298.

- Nuraida, L., Mardiana, N.R., Faridah, D.N. dan Hana (2011). Metabolisme prebiotik oleh kandidat probiotik isolat ASI sebagai dasar pengembangan produk sinbiotik. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* **22**(2): 156-163.
- Manson, J.E., Tosteson, H. dan Ridker, P.M. (1992). The primary prevention of myocardial infarction. *New England Journal of Medicine* **32**: 1406-1416.
- Noh, D.O, Kim, S.H. dan Gilliland, S.E. (1997). Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *Journal of Dairy Science* **80**: 3107-3113.
- Ooi, L.G. dan Liong, M.T. (2010). Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: A Review of *in vivo* and *in vitro* findings. *International Journal of Molecular Sciences* **11**: 2499-2522.
- Pereira, D.I. dan Gibson, G.R. (2002). Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 4689-4693.
- Roberfroid, M.B. (2007). Inulin-type fructans: functional food ingredients. *The Journal of Nutrition* **137**(11): 2493S-2502S.
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S. dan Matteuzzi, D. (2005). Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by Bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(10): 6150-6158.
- Saulnier, D.M.A, Molenaar, D., de Vos W.M., Gibson, G.R. dan Kolida, S. (2007). Identification of prebiotic fructooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 through Microarrays. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(6): 1753-1765.
- Sudha, M.R., Prashant, Kalpana, Sekhar, dan Kaiser. (2009). Review: probiotics as complementary therapy for hypercholesterolemia. *Biology and Medicine* **1**(4): 1-13.
- Surono, I. (2004). *Probiotik, Susu Fermentasi dan Kesehatan*. PT. Tri Cipta Karya, Jakarta.
- Susilowati, A., Lotulung, P.D. dan Pujiraharti, S. (2013). Perbedaan karakteristik oligo-fruktosa dan komposisi serat inulin dari hasil hidrolisis dan tanpa hidrolisis *Acremonium sp.-CBS₃* dari umbi dahlia merah (*dahlia spp.*) lokal untuk anti kolesterol. *Prosiding SNKTI* **1**: 20-28.
- Trautwein, E.A., Rieckhof, D. dan Erbersdobler, H.F. (1998). Dietary inulin lowers plasma cholesterol and triacylglycerol and alters biliary bile acid profile in Hamsters. *Journal of Nutrition* **128**: 1937-1943.
- Umeki, M., Oue, K., Mochizuki, S., Shirai, Y. dan Sakai, K. (2004). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* KY-3 and cellobiose as synbiotics on lipid metabolism in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **50**(5): 330-334.
- Usman, P. dan Hosono, A. (1999). Binding of cholesterol the cells and peptidoglycan of *Lactobacillus gasserii*. *Milchwissenschaft* **54**: 495-498.
- WHO (2011). Cardiovascular disease; fact sheet N°317, Geneva, Switzerland, Januari, 2011. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/print.html>. [16 Februari 2014].
- Zhang, F., Hang, X., Fan, X., Li, G. dan Yang, H. (2007). Selection and optimization procedure of synbiotic for cholesterol removal. *Anaerobe* **13**: 185-192.
- Zhuang, G., Xiao, M., Qiu-X, Zhan, F.W., Hao, Z., He-PZ. dan Wei, C. (2012). Review: Research advances with regards to clinical outcome and potential mechanisms of the cholesterol-lowering effects of probiotics. *Clinical Lipidology* **7**(5): 501-507.
- Ziarno, M., Ewa, S. dan Alvaro, A.L. (2007). Cholesterol assimilation by commercial yoghurt starter cultures. *Acta Pathologica Microbiologicaet Immunologica Alimentaria* **6**(1): 83-94.