

## Kesan Penggunaan Inulin dan Coklat Berinulin Terhadap Pertumbuhan *in vitro* Bifidobakteria

(Effects of Inulin and Inulin Containing Chocolate on  
*in vitro* Growth of Bifidobacteria)

NORHAYATI HUSSAIN\*, MUHAMMAD ANAS OTHAMAN & MOHD KHAN AYOB

### ABSTRAK

Coklat adalah salah satu daripada makanan pembekal tenaga segera dan mempunyai kandungan antioksidan yang tinggi. Dalam kajian ini, fungsi coklat telah ditingkatkan dengan menjadikannya sebagai pembawa bahan prebiotik melalui penukaran keseluruhan kandungan gula dengan inulin. Ujian awal telah dilakukan untuk memilih kepekatan atau dos inulin yang paling sesuai sebagai sumber karbon untuk merangsang pertumbuhan bifidobakteria dalam fermentasi kultur kelompok selama 24 jam dengan menilai kesannya terhadap perubahan kepekatan sel. Ujian dilakukan terhadap 4 strain bifidobakteria iaitu *Bifidobacterium longum* BB536, *B. breve* ATCC 15700, *B. infantis* ATCC 15697 dan *B. pseudocatenulatum* G4. Keputusan menunjukkan kesemua strain bifidobakteria mampu menggunakan inulin sebagai sumber karbon pada kepekatan 2, 5, 10 hinggalah 15 g/L inulin. Manakala kepekatan 5 g/L inulin dilihat mampu digunakan secara optimum (tiada perbezaan signifikan pada  $p > 0.05$ ) oleh keempat-empat spesies bifidobakteria tersebut. Inulin pada kepekatan 5 g/L telah digunakan untuk menghasilkan produk coklat susu (MC-1) dan coklat gelap (DC-2) berinulin, yang seterusnya dinilai kemampuan produk merangsang pertumbuhan spesies bifidobakteria berkenaan secara *in vitro*. Didapati wujud korelasi negatif yang signifikan ( $p < 0.01$ ) antara pertambahan bilangan bifidobakteria dan pH untuk setiap kultur tulen *B. pseudocatenulatum* G4, *B. infantis*, *B. Breve* (masing-masing  $r = -0.97$ ) dan *B. longum* BB536 ( $r = -0.95$ ). Inulin dengan kepekatan 5 g/L telah digunakan sebagai ramuan produk coklat berinulin atau prebiotik. Ia didapati dapat meningkatkan pertumbuhan keempat-empat spesies bifidobakteria berkenaan dengan lebih berkesan berbanding penggunaan inulin sahaja sebagai sumber karbon.

Kata kunci: Bifidobakteria; coklat gelap berinulin; coklat susu berinulin; fermentasi; inulin

### ABSTRACT

Chocolate is one of the food products that acts as an instant energy source with high antioxidant content. In this study, the function of the chocolate has been enhanced as prebiotic carrier by replacing the whole sugar content with inulin. Preliminary studies were carried out to select a suitable concentration or dosage of inulin as a carbon source in stimulating the bifidobacteria growth in batch culture fermentation and to determine its effect on pH changes of the bacterial growth. Tests conducted on 4 strains of bifidobacteria showed that *Bifidobacterium longum* BB536, *B. breve* ATCC 15700, *B. infantis* ATCC 15697 and *B. pseudocatenulatum* G4 were able to use inulin as a carbon source at 2, 5, 10 and 15 g/L doses and the fermentation ended in 24 h. The four strains of bifidobacteria also showed their ability to use inulin at an optimum concentration of 5 g/L, better than other concentration used (no significant different at  $p > 0.05$ ). Inulin at 5 g/L concentration was used in producing milk (MC-1) and dark (DC-2) chocolate containing inulin which were then tested for their capability in stimulating the *in vitro* growth of bifidobacteria. There was significantly negative correlation between increment in number of microorganism and pH for every pure culture *B. pseudocatenulatum* G4 ( $r = -0.97$ ), *B. infantis* ( $r = -0.97$ ), *B. breve* ( $r = -0.97$ ) and *B. longum* BB536 ( $r = -0.95$ ) used in this study. The dose of 5 g/L inulin added into both type of prebiotic chocolate showed better growth performance by the four strains of bifidobacteria compared to the use of inulin alone as a carbon source.

Keywords: Bifidobacteria; dark chocolate containing inulin; fermentation; inulin; milk chocolate containing inulin

### PENDAHULUAN

Terdapat kira-kira 30 spesies *Bifidobacterium* yang telah dikenal pasti dan dahulunya turut dikenali sebagai *Bacillus bifidus communis*. Bifidobakteria mempunyai ciri-ciri anaerobik, gram positif, berbentuk rod pleomorfik dan tidak berspora (Ishibashi et al. 1997). Bifidobakteria

juga merupakan salah satu daripada spesies mikroflora usus manusia yang dapat memberikan kebaikan kepada kesihatan manusia apabila ditingkatkan bilangannya dengan kehadiran prebiotik (Gibson 1998). Prebiotik seperti inulin dilaporkan boleh digunakan atau difermentasikan secara selektif oleh bifidobakteria dan telah dibuktikan melalui

kajian *in vitro* menggunakan kaedah kultur tulen (Wada 1990).

Laporan oleh Roberfroid et al. (1998) turut menyebut tentang adanya rangsangan pertumbuhan bakteria oleh inulin secara selektif melalui fermentasi kelompok atau selanjara menggunakan medium khusus mahupun medium najis manusia. Kaedah fermentasi kultur kelompok (*in vitro*) turut digunakan sebagai prosedur penyaringan awal yang paling mudah dan cepat (24 ke 48 jam) untuk membuat ujian perbandingan ke atas kesan penggunaan inulin dan oligofruktosa sebagai prebiotik (Wang & Gibson 1993).

Roberfroid et al. (1998) turut menyebut bahawa panjang rantai (DP) inulin antara 2-60 DP, membolehkan inulin difermentasikan sepenuhnya dengan lebih perlahan hingga ke bahagian terakhir usus besar. Perbezaan kadar fermentasi ini telah menarik minat ramai penyelidik untuk menguji kesan fisiologi apabila gentian diet atau prebiotik digunakan. Oleh itu, keberkesanan prebiotik sebagai bahan yang boleh difermentasikan oleh bakteria secara memilih adalah amat penting untuk dibuktikan (Gibson & Fuller 2000).

Walau bagaimanapun, Roberfroid (2007) pula menyebut bahawa keberkesanan sesuatu prebiotik terhadap peningkatan bilangan bifidobakteria tidak hanya disebabkan oleh kesan dos semata-mata. Palframan et al. (2002) turut mengandaikan bahawa bukan sahaja dos prebiotik memberi kesan terhadap komposisi bakteria bifidobakteria, laktobasili dan bakteroid tetapi pH turut memainkan peranan tersebut apabila 5 jenis prebiotik komersil (fruktooligosakarida, inulin, galaktooligosakarida, isomaltooligosakarida dan laktulosa) dikaji secara *in vitro*. Inulin dikatakan dapat menggalakkan pertumbuhan bifidobakteria apabila diberikan kepekatan 2% (w/v) yang bersamaan dengan 8 g sehari pada pH 6.8. Kajian Wang dan Gibson (1993) pula menyatakan penggunaan najis manusia sebagai medium fermentasi anaerobik kelompok yang ditambah 7 g/L fruktosa, kanji, inulin atau oligofruktosa telah menunjukkan peningkatan bilangan bifidobakteria yang signifikan di akhir fermentasi yang berlangsung selama 12 jam.

Oleh itu, kajian ini dilakukan bertujuan untuk memilih kesesuaian kepekatan atau dos inulin yang diperlukan, disamping menentukan keupayaan coklat prebiotik (coklat susu dan coklat gelap) pada kepekatan inulin tertentu untuk merangsang pertumbuhan bifidobakteria secara *in vitro* serta kesannya terhadap perubahan pH medium pertumbuhan mikrob berkenaan.

## BAHAN DAN KAEDAH

### SUMBER KARBON DAN REKA BENTUK KAJIAN

Coklat susu dan coklat gelap yang mengandungi prebiotik disediakan oleh Lembaga Koko Malaysia manakala inulin diperoleh dari Sensus, Netherland dan glukosa dari Univar, Ajax Chemical, Australia. Sebagai ujian saringan awal, 4 tahap kepekatan inulin yang berbeza (2 g/L, 5 g/L, 10 g/L & 15 g/L) telah dipilih untuk dicampurkan bersama-sama medium Triptone Peptone Yis (TPY) sebagai sumber karbon atau nutrien (menggantikan glukosa) dengan menggunakan sistem fermentasi kultur kelompok. Kepekatan sel dalam sampel diukur dengan menggunakan kaedah spektrofotometer pada kadar serapan 650 nm. Manakala dalam ujian susulan, coklat susu dan coklat gelap yang mengandungi inulin pada kepekatan terpilih (hasil terbaik daripada ujian saringan awal di atas) dan inulin tulen turut dicampurkan secara berasingan ke dalam medium TPY (menggantikan glukosa) untuk diuji keupayaan masing-masing dalam meningkatkan pertumbuhan bifidobakteria. Manakala glukosa dengan kepekatan 5 g/L medium digunakan sebagai kawalan. Dalam kajian susulan ini, kadar pertumbuhan sel telah dinilai dengan kaedah pembentukan unit koloni. pH sampel juga direkodkan. Kesemua perlakuan dilakukan secara duplikasi.

### MIKROORGANISMA

Di dalam kajian ini, 4 jenis strain bifidobakteria (Jadual 1) telah digunakan untuk mengenal pasti corak pertumbuhan yang bakal terhasil setelah didedahkan kepada sumber karbon atau nutrien yang berbeza.

Bifidobakteria yang digunakan dalam kajian ini diperoleh daripada beberapa sumber. Tiga daripadanya adalah daripada sumber komersial (*Bifidobacterium longum* BB536, *B. breve* ATCC 15700 dan *B. infantis* ATCC 15697) manakala *B. pseudocatenulatum* G4 diperoleh daripada proses pemencilan tempatan iaitu daripada sumber najis bayi yang hanya minum susu ibu. Strain tersebut menjalani beberapa ujian pencirian seperti pengesanan aspek keselamatannya (Kabeir et al. 2007), aktiviti antibakteria, ciri-ciri perlekatan pada sel manusia (Shuhaimi et al. 1999) dan tahan pada keadaan berasid tinggi dan juga asid hempedu (Mariam et al. 2004).

JADUAL 1. Senarai bakteria yang digunakan

Strain Bakteria	Kod	Sumber
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> G4	G4	Pemencilan Tempatan, Universiti Putra Malaysia
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536	BB	Morinaga Milk Industry, Japan
<i>Bifidobacterium breve</i>	Breve	American Type Culture Collection (ATCC 15700)
<i>Bifidobacterium infantis</i>	Infantis	American Type Culture Collection (ATCC 15697)

PENYEDIAAN MEDIUM FERMENTASI KULTUR KELOMPOK DAN INOKULUM

Medium triptone peptone yeast (TPY) (Scardovi 1986) digunakan sebagai medium asas fermentasi kelompok. Komposisi medium TPY ditunjukkan dalam Jadual 2.

JADUAL 2. Komposisi medium TPY tanpa sumber karbon

Bahan	Jenama	Kepekatan
Soya peptone	Oxoid, England	5 g/L
Triptone	Oxoid, England	10 g/L
Ekstrak yis	Bacto™, France	2.5 g/L
Magnesium klorida	Merck, Germany	0.5 g/L
Kalium hidrogen fosfat	Merck, Germany	2 g/L
L-cystein HCl	Merck, Germany	0.5 g/L
Tween 80	Merck, Germany	1 mL/L
Zink sulfat	Merck, Germany	0.25 g/L
Kalsium klorida	Merck, Germany	0.15 g/L
Ferik klorida	Merck, Germany	0.01 g/L

Medium tersebut dihasilkan dengan mencampurkan kesemua komponen dan sumber karbon terpilih menggunakan air ternyah ion pada keadaan aseptik dan dihomogenkan menggunakan pengacau bermagnet selama 10 min. Kemudian, medium dilaraskan ke pH 6.8 sebelum dimasukkan ke dalam kelalang bioreaktor. Setiap kelalang ditambahkan 665 mL medium dan disterilkan bersama menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 min (pensterilan *in situ*).

Inokulum daripada 1 mL stok gliserol bakteria telah disediakan bagi tujuan fermentasi kelompok. Stok bakteria dicairkan terlebih dahulu pada suhu bilik sebelum diempar pada kelajuan 1300 rpm selama 2 min. Larutan supernatan dibuang dan digantikan dengan 1 mL medium TPY yang steril. Pelet yang terhasil kemudiannya dipindahkan ke dalam 9 mL medium TPY yang steril dalam botol universal.

Kultur dieram pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudiannya, kultur tersebut disubkultur sebanyak 2 kali di dalam 10 mL medium TPY sebelum dipindahkan ke dalam 200 mL medium TPY. Selepas 12 jam penderaman pada suhu 37°C (penghasilan kira-kira  $10^8$  cfu/mL kepekatan awal biojisim yang paling optimum), 35 mL kultur dimasukkan ke dalam tiub emparan. Setelah diempar, supernatan yang terbentuk dibuang terlebih dahulu dan diganti dengan 35 mL medium TPY yg baru (mengelakkan bias pada kandungan medium dan pH setelah fermentasi dimulakan) dan seterusnya divorteks. Akhir sekali, 35 mL kultur tersebut dimasukkan ke dalam picagari steril secara aseptik dan bersedia untuk disuntik ke dalam kelalang bioreaktor.

PENGAWALAN BIOREAKTOR DAN KEADAAN FERMENTASI

Kelalang bioreaktor model BIOSTAT® Q (B.Braun Biotech International, Melsungen, Germany), berkapasiti 1 L, dwi lapisan, multi-sistem dan mudah diautoklaf dilengkapi

dengan sistem kawalan dalaman DCU-3 telah digunakan dalam kajian ini dengan isi padu kerja sebanyak 700 mL. Penutup kelalang yang diperbuat daripada keluli kalis karat terdiri daripada 8 bahagian laluan iaitu untuk aliran masuk dan aliran keluar medium, pengawal pH (asid dan alkali), elektrod suhu, fasa persampelan cecair, inokulasi dan penyingkiran ruang tutupan. Klip dipasangkan pada setiap laluan supaya kelalang tidak dimasuki udara sewaktu pensterilan dijalankan dan kesemua penapis membran dibaluti dengan kertas aluminium.

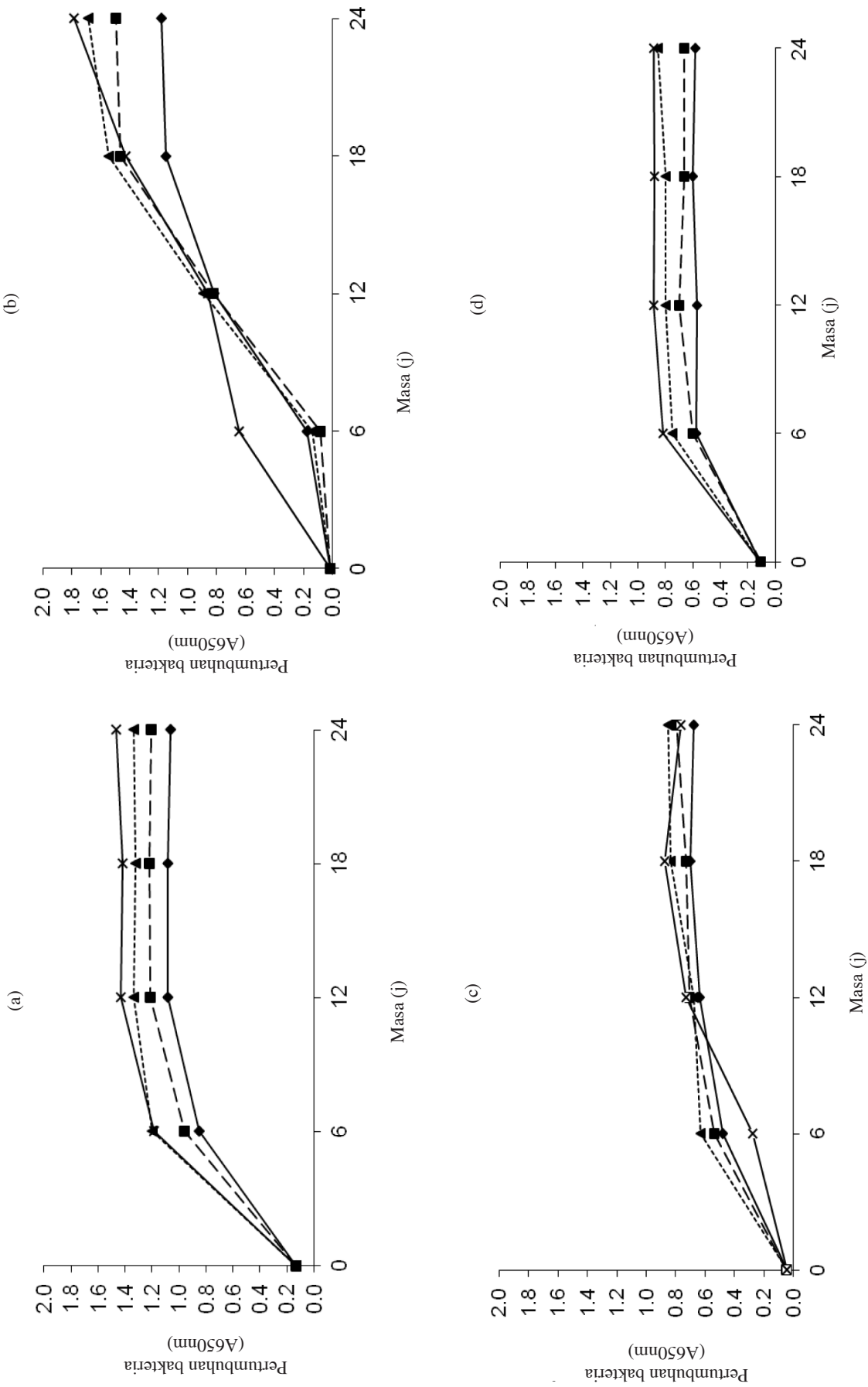
Selepas selesai pensterilan, kesemua kelalang dikawal suhunya pada 37°C dan gas nitrogen bebas oksigen (OFN) dimasukkan selama 15 min agar keadaan anaerobik di dalam kelalang dan media dapat diwujudkan. Kelajuan pengacau ditetapkan pada 150 rpm. Apabila suhu telah mencapai 37°C, inokulum disuntik masuk, maka fermentasi bermula. pH tidak dikawal sewaktu eksperimen ini berjalan. Ruang atas di dalam kelalang dipenuhi dengan gas OFN sepanjang fermentasi berlangsung agar keadaan anaerobik dapat dikekalkan. Sebanyak 10-20 mL sampel diambil setiap 6 jam bagi setiap kelalang. Proses fermentasi ini dihentikan selepas 24 jam.

ANALISIS STATISTIK

Semua data yang diperoleh dianalisis menggunakan program SPSS (versi 13.0) dengan ujian- *t* berpasangan dan ANOVA digunakan untuk mencari perbezaan signifikan antara kepekatan inulin, sumber karbon berbeza dan waktu persampelan yang diuji pada paras signifikan  $p < 0.05$ . Ujian Korelasi turut digunakan untuk melihat perkaitan di antara bilangan bifidobakteria dan nilai pH di dalam medium.

HASIL DAN PERBINCANGAN

Ujian awal yang telah dijalankan menunjukkan keempat-empat jenis kultur tulen bifidobakteria (Rajah 1(a)–1(d)) berupaya menggunakan inulin sebagai sumber karbon pada semua dos yang telah diuji iaitu 2, 5, 10 dan 15 g/L dan fermentasi berakhir dalam tempoh 24 jam. Dalam kajian ini, pertumbuhan kesemua bifidobakteria menunjukkan nilai  $A_{650}$  tertinggi pada kepekatan inulin 15 g/L (paras maksimum). Pertumbuhan *B. infantis* (Rajah 1(b)) didapati meningkat dengan lebih baik (maksimum) dengan nilai  $A_{650}$  mencecah 1.8 pada jam yang ke-24 dan masih belum mencapai fasa pegun (statik) berbanding penggunaan kepekatan dan bakteria lain yang diuji. *B. longum* BB536 (Rajah 1(c)) menunjukkan bacaan  $A_{650}$  sehingga 0.8 sahaja (terendah) pada kepekatan yang sama (15 g/L). Rajah 1 juga menunjukkan *B. infantis* memberikan reaksi pertumbuhan yang menggalakkan (mampu menggunakan inulin dengan berkesan sebagai sumber nutrien) walaupun pada kepekatan inulin terendah iaitu 2 g/L ( $A_{650} = 1.2$ ) pada jam yang ke-24 berbanding 3 jenis bifidobakteria yang lain. Reading et al. (1998) melaporkan bahawa bifidobakteria mampu memberi kesan bifidogenik apabila diberikan sebanyak 1, 2, 4, 6



RAJAH 1. Corak pertumbuhan (a) *B. pseudocatenulatum*, (b) *B. infantis*, (c) *B. longum* dan (d) *B. breve* dalam kaldu TPY yang mengandungi inulin pada dos berbeza iaitu 2 (-♦-), 5 (-■-), 10 (-▲-) dan 15 g/L (-x-) selama 24 jam. Kecepatan inulin ditunjukkan oleh bacaan serapan pada 650 nm

dan 8 g dos oligofruktosa harian menggunakan 50 mL medium fermentasi kelompok.

Tiada perbezaan signifikan ( $p > 0.05$ ) diperolehi apabila perbandingan nilai keserapan dibuat antara setiap kepekatan inulin yang diuji (2-15 g/L) dengan masa persampelan (0-24 jam) bagi setiap strain bifidobakteria yang diuji. Walau bagaimanapun, kepekatan 5 g/L inulin dilihat mampu digunakan secara optimum (nilai serapan di antara had tertinggi dan terendah) berbanding kepekatan lain oleh keempat-empat jenis bifidobakteria dengan nilai  $A_{650}$  terendah 0.7 (*B. breve*) dan tertinggi  $A_{650} = 1.5$  (*B. infantis*). Keputusan ini membolehkan kajian seterusnya dilakukan menggunakan inulin pada kepekatan 5 g/L dalam coklat susu dan coklat gelap bagi menghasilkan coklat prebiotik dan ini bersesuaian dengan had keperluan harian manusia (Bouhnik et al. 1999; Rao 2001) yang dijangkakan dapat menunjukkan peningkatan pertumbuhan bifidobakteria terpilih secara *in vitro* (melalui pengukuran cfu dan pH di dalam bioreaktor).

Keempat-empat jenis bifidobakteria menunjukkan pertumbuhan yang normal dan terbahagi kepada beberapa fasa: fasa lag, eksponen/log, pegun/statik dan mati/menurun (Rajah 2(a) -2(d)). Kesemua sumber karbon yang dikaji termasuklah 5 g/L glukosa, 5 g/L inulin, 5 g/L coklat susu dan 5 g/L coklat gelap prebiotik mampu digunakan oleh kesemua kultur tulen *B. pseudocatenulatum*, *B. infantis*, *B. longum* dan *B. breve* dengan menunjukkan pertumbuhan aktif sehingga ke jam-12.

Kecekapan bifidobakteria tersebut mengurai kesemua sumber karbon adalah berbeza-beza. Walau bagaimanapun, corak pertumbuhan keempat-empat jenis bifidobakteria sehingga ke jam-12 tidak menunjukkan perbezaan signifikan ( $p > 0.05$ ) dan kesemua karbon yang digunakan dapat diuraikan dengan cekap. *B. infantis* (Rajah 2(b)) menunjukkan pertumbuhan yang lebih aktif (mengurai kesemua karbon) apabila bilangan sel adalah tertinggi pada jam ke-6 ( $\log_{10}$  9.3 ke 9.8) berbanding bifidobakteria lain.

Glukosa merupakan sumber karbon yang paling mudah digunakan atau diuraikan oleh keempat-empat bifidobakteria untuk tempoh sehingga 24 jam terutamanya *B. breve* dengan menunjukkan bilangan pertumbuhan yang tertinggi ( $\log_{10}$  10.5 cfu) (Rajah 2(d)) pada jam ke-18 berbanding sumber karbon lain.

Coklat susu dan coklat gelap yang mengandungi inulin juga mampu digunakan dengan lebih baik terutamanya oleh *B. longum*, *B. breve* dan *B. infantis* jika dibandingkan dengan penggunaan inulin sahaja sebagai sumber karbon. Ini boleh dilihat pada jumlah bilangan *B. breve* yang paling tinggi ( $\log_{10}$  10.51 cfu) diikuti oleh *B. longum* (paling tinggi,  $\log_{10}$  10.03 cfu) ketika menggunakan coklat susu prebiotik pada jam ke-18 berbanding pertumbuhan dengan menggunakan inulin sahaja (*B. breve*,  $\log_{10}$  9.95 cfu dan *B. longum*,  $\log_{10}$  9.0 cfu). Coklat gelap prebiotik pula adalah antara sumber nutrien yang mudah digunakan oleh *B. breve* apabila menunjukkan pertumbuhan paling tinggi pada fasa eksponen,  $\log_{10}$  10.46 cfu, (jam ke-18) diikuti oleh *B. longum*,  $\log_{10}$  9.7.

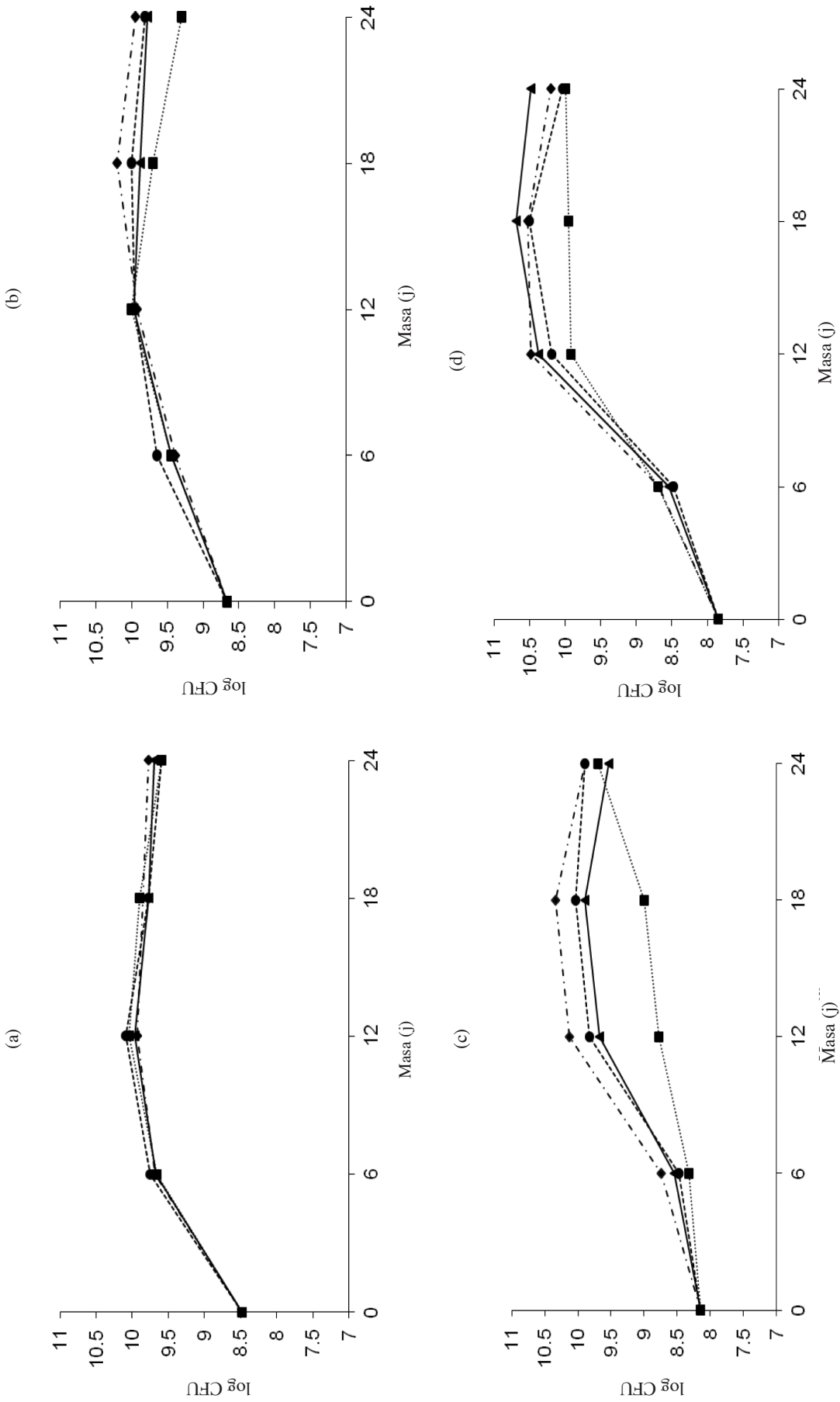
Manakala inulin adalah antara sumber nutrien yang terakhir mampu diuraikan dengan perlahan untuk membantu pertumbuhan bakteria berkenaan seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 2(c) (masih tidak mencapai fasa pegun sehingga ke akhir fermentasi) jika dibandingkan dengan coklat berinulin. Sebaliknya, pertumbuhan *B. infantis* adalah paling tinggi pada jam ke-6 dan ke-12 apabila menggunakan inulin berbanding nutrien lain (Rajah 2(b)) tetapi semakin terencat pertumbuhan (fasa mati) selepas jam ke-18 akibat kekurangan nutrien inulin. *B. pseudocatenulatum* (Rajah 2(c)) juga menunjukkan kecekapan mengurai inulin dengan agak baik selepas *B. Infantis* dalam jangka masa yang sama.

Walaupun bagaimanapun, *B. longum* turut menunjukkan pertumbuhan yang semakin aktif (fasa eksponen) di sepanjang 0 ke 24 jam (Rajah 2(c)) tetapi mengambil masa yang lebih panjang untuk mengurai inulin (perlahan). Terdapat perbezaan bilangan mikroorganisma yang signifikan ( $p < 0.05$ ) dicerap antara jam ke-12, 18 dan 24 apabila diberikan 4 jenis sumber karbon berkenaan (Rajah 2(c)). Menurut Roberfroid et al. (1998) yang menggunakan sumber bakteria dari najis manusia untuk fermentasi inulin secara *in vitro* telah menemukan molekul dengan DP (*degree of polymerisation*) melebihi 10 DP ( $> 10$  DP) telah difermentasikan atau diuraikan dengan lebih perlahan daripada kelajuan penguraian molekul DP  $< 10$ . Berkemungkinan penemuan dalam kajian tersebut boleh dikaitkan dengan perlahannya penguraian inulin dalam kajian ini kerana inulin yang digunakan mempunyai spesifikasi purata 12 DP.

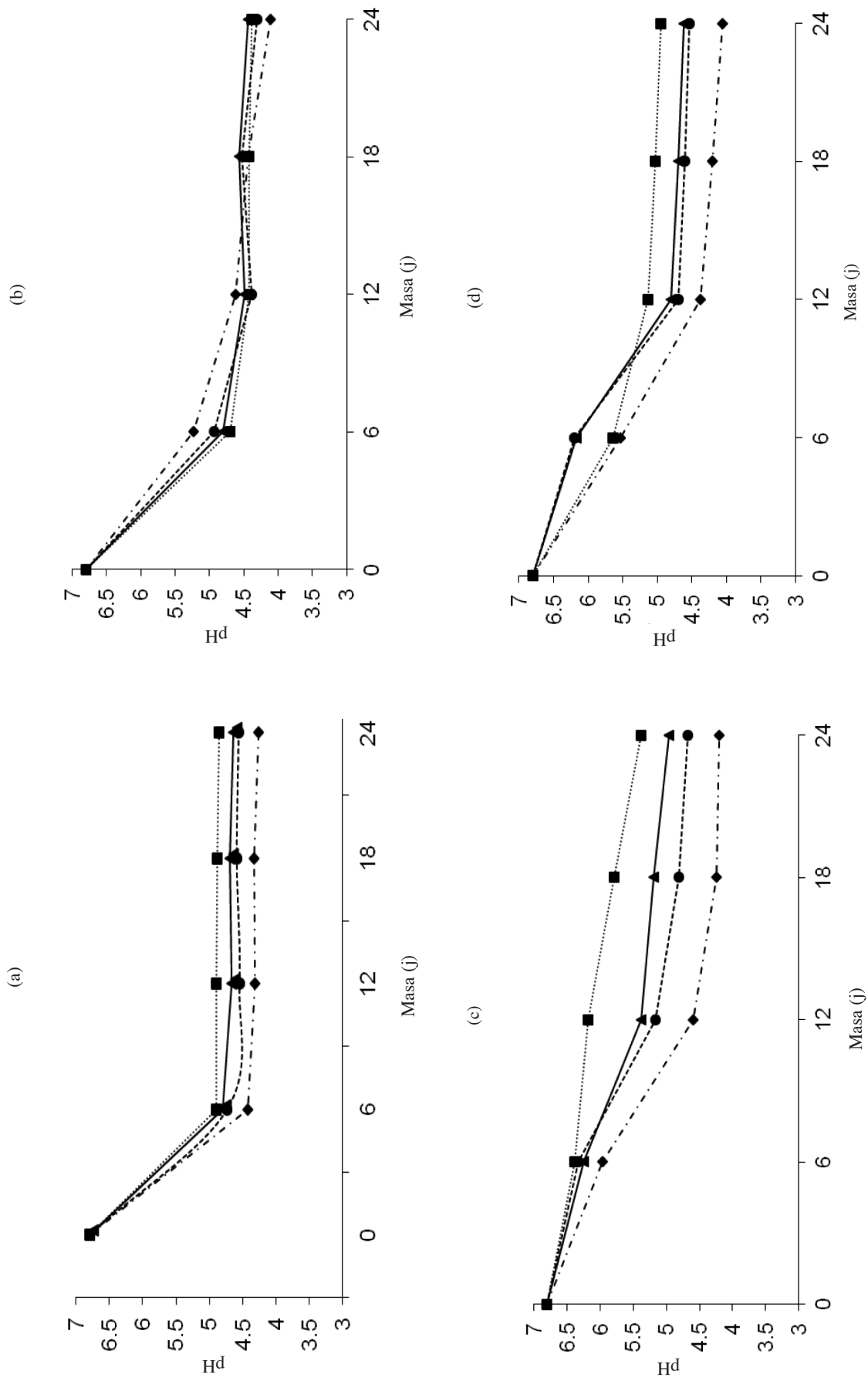
Keputusan kajian ini mencadangkan bahawa jenis inulin yang digunakan sebagai prebiotik (12 DP) memerlukan kehadiran *B. infantis* dan *B. pseudocatenulatum* sebagai probiotik yang cekap mengurai inulin dan ini mungkin sesuai untuk menghasilkan satu keadaan simbiotik. Keadaan tersebut mungkin boleh disamakan dengan keperluan kehadiran *B. breve* yang cekap (bilangan sel paling tinggi) mengurai kedua jenis coklat prebiotik susu dan gelap.

Kemampuan bifidobakteria memetabolisme 4 jenis nutrien yang dikaji ditunjukkan dengan peningkatan pertumbuhan dan penghasilan asid sehingga menyebabkan penurunan pH medium (Rajah 3(a) - 3(d)). Penurunan pH berlaku dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) seawal jam ke-6 sehingga jam ke-24 terutamanya seperti yang ditunjukkan *B. infantis* dalam Rajah 3(b) (penurunan pH ke paras paling hampir minimum dalam masa singkat) berbanding bifidobakteria lain yang mengambil masa lebih lama (Rajah 3(a), 3(c) dan 3(d)). Tiada perbezaan yang signifikan ( $p > 0.05$ ) dicerap bagi nilai pH di antara 4 jenis bifidobakteria dan 4 jenis sumber karbon yang dikaji.

Coklat susu dan coklat gelap prebiotik juga mampu difermentasikan oleh hampir kesemua jenis bifidobakteria dan tahan pada keadaan lebih berasid serendah pH4.5. Antara kajian awal oleh Scardovi (1986) ada menyebut bahawa bifidobakteria mampu menghasilkan asid kuat seperti asid laktik, asid asitik dan sesetengahnya ada yang mampu hidup dengan lemah atau mati pada pH4.5 - 5.0.



RAJAH 2. Corak pertumbuhan (log cfu) (a) *B. pseudocatenulatum*, (b) *B. infantis*, (c) *B. longum* dan (d) *B. breve* setelah diberikan sumber karbon berbeza i.e glukosa (-●-), inulin (-■-), inulin (-■-), coklat gelap prebiotik (-▲-) dan coklat susu prebiotik (-●-) selama 24 jam



RAJAH 3. Corak perubahan pH medium pertumbuhan yang terhasil setelah (a) *B. pseudocatenulatum*, (b) *B. infantis*, (c) *B. longum* dan (d) *B. breve* diberikan sumber karbon berbeza i.e glukosa (-♦-), inulin (-■-), cokelat gelap prebiotik (-▲-) dan cokelat susu prebiotik (-●-) selama 24 jam

Kenyataan tersebut mungkin boleh dikaitkan dengan penurunan pH yang mendadak sehingga mencapai pH di antara 4.5 dan 5.0 selaras dengan peningkatan pertumbuhan 4 jenis bifidobakteria yang bertahan di dalam medium berasid seperti kajian ini.

Scardovi (1986) turut melaporkan pertumbuhan *E. coli* dan *Clostridium perfringens* terencat sepenuhnya pada pH tersebut. Kajian lain turut melaporkan penghasilan asid laktik mampu merendahkan pH usus manakala ada juga yang mengaitkan semakin meningkatnya pertumbuhan bifidobakteria di dalam usus, semakin menurun pH usus maka mampu memberikan kesan langsung kepada sumber atau bahan yang menyebabkan kanser di dalam usus besar (Goldin & Gorbach 1980; Koo & Rao 1991).

Inulin pula merupakan sumber yang terakhir digunakan oleh *B. longum* dan pertumbuhannya masih belum mencapai fasa pegun walau di akhir jam ke-24 dengan pH minimum hanya menghampiri 5.50 (Rajah 3(c)) berbanding bakteria dan sumber karbon yang lain. Data ini adalah relevan dengan Rajah 2(c) yang menunjukkan bilangan sel *B. longum* semakin meningkat (fasa eksponen) walaupun pada kadar yang agak perlahan.

Corak pertumbuhan *B. infantis* pula boleh dikategorikan sebagai yang terbaik memandangkan *B. infantis* cepak menggunakan keempat-empat jenis karbon secara optimum (Rajah 2(b)), bilangan pertumbuhan paling tinggi pada fasa eksponen, pada jam ke-6) dan paling tahan keadaan berasid tinggi walaupun di bawah pH4.5 (Rajah 3(b)) terutamanya untuk mengurai glukosa.

Kajian oleh Rossi et al. (2005) menggunakan ujian- *t* berpasangan bagi nilai cfu dan pH menunjukkan pertumbuhan yang lebih baik dan signifikan ( $p < 0.01$ ) dengan adanya sumber karbon glukosa berbanding inulin. Kajian tersebut juga menunjukkan corak pertumbuhan yang sama (berdasarkan pengukuran  $A_{650}$ ) apabila glukosa sebagai sumber karbon mampu digunakan dengan mudah oleh kesemua 55 jenis strain bifidobakteria berbanding inulin. Hasil kajian tersebut turut melaporkan semakin tinggi bacaan  $A_{650}$  maka semakin rendah pH diperoleh walaupun tiada korelasi linear diperoleh.

Walau bagaimanapun, hasil kajian ini menunjukkan adanya korelasi negatif yang signifikan ( $p < 0.01$ ) di antara pertambahan bilangan mikroorganisma dan pH pada setiap kultur tulen *B. pseudocatenulatum* G4 ( $r = -0.97$ ), *B. infantis* ( $r = -0.97$ ), *B. breve* ( $r = -0.97$ ) dan *B. longum* BB536 ( $r = -0.95$ ). Penemuan ini menerangkan bahawa semakin meningkatnya pertumbuhan bifidobakteria yang diuji menyebabkan nilai pH di dalam medium semakin rendah. Glukosa dilihat sangat sesuai untuk difermentasikan oleh keempat-empat bifidobakteria kerana ia mampu bertahan walaupun dalam keadaan berasid tinggi (paras paling minimum mencapai pH4.2). Keputusan yang hampir serupa juga dilaporkan oleh Rossi et al. (2005).

#### KESIMPULAN

Kajian ini menunjukkan kepekatan inulin pada 2 g, 5 g, 10 g dan 15 g inulin/L medium adalah sesuai untuk

meningkatkan pertumbuhan kultur tulen bifidobakteria. Inulin yang digunakan di dalam kedua-dua jenis coklat prebiotik pada kepekatan 5 g/L dilihat mampu untuk membantu pertumbuhan bifidobakteria dan mempunyai kadar pertumbuhan yang lebih baik berbanding dengan penggunaan inulin sahaja. Keputusan ini diharapkan dapat memberikan kesan positif ke atas ujian seterusnya iaitu secara *in vivo* (tikus).

#### PENGHARGAAN

Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi (MOSTI) penaja projek dan penulisan ini di bawah gran IRPA (03-04-07-10002-EAR) dan Puan Wan Aidah dan Puan Rasma, Lembaga Koko Malaysia, Bangi yang telah memberikan bantuan teknikal.

#### RUJUKAN

- Bouhnik, Y., Vahedi, K., Achour, L., Attar, A., Salfati, J., Polchart, P., Marteau, P., Flourie, B., Bornet, F. & Rambaud, J.C. 1999. Short chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. *The Journal of Nutrition* 129: 113-116.
- Gibson, G.R. 1998. Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics. *British Journal of Nutrition* 80 (Suppl.): S209-S212.
- Gibson, G.R. & Fuller, R. 2000. Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *The Journal of Nutrition* 130: 391S-395S.
- Goldin, B.R. & Gorbach, S.L 1980. Effect of Lactobacillus acidophilus dietary supplements on 1,2 dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats. *Journal of the National Cancer Institute* 64: 263-265.
- Ishibashi, N., Yaeshima, T. & Hayasawa, H. 1997. Bifidobacteria: Their significance in human intestinal health. *Malaysian Journal of Nutrition* 3: 149-159.
- Koo, M. & Rao, V. 1991. Long term effect of bifidobacteria and Neosugar on precursor lesions of colonic cancer in mice. *Nutrition Cancer* 16: 249-257.
- Mariam, R.S., Yap, K.W., Lim, L.C., Muhammad, K., Shuhaimi, M., Sipat, A., Ali, A.M., Nur-Atiqah, N.A. & Yazid, A.M. 2004. Strain differences in deconjugation of bile acids in *Bifidobacterium pseudocatenulatum* isolates. *J. Bioscience Microflora*. 23(2): 93-98.
- Palframan, R.J., Gibson, G.R. & Rastall, R.A. 2002. Effect of pH and dose on the growth of gut bacteria on prebiotic carbohydrates *in vitro*. *Anaerobe* 8: 287-292.
- Rao, V. 2001. The prebiotic properties of oligofructose at low intake levels. *Nutrition Research*. 21: 843-848.
- Reading, S., Aramendi, S., Gibson, G. & McCartney, A. 1998. An *in vitro* investigation of the minimum fructo-oligosaccharide dose affording a prebiotic effect. *European Symposium on Functional Properties of Non-Digestible Carbohydrates*, 5-7 March, Lisbon, Portugal.
- Roberfroid, M.B., Van Loo, J.A.E. & Gibson, G.R. 1998. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *Journal Nutrition* 128: 11-19.
- Roberfroid M.B. 2007. Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal of Nutrition* 137(3): 830S-837S.



- Rossi, M., Corradini, C., Alberto, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zaroni, S. & Matteuzi, D. 2005. Fermentation of fructooligosaccharide and inulin by Bifidobacteria: a Comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 71(10): 6150-6158.
- Scardovi, V. 1986. Genus Bifidobacterium. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkin. 2: 1418-1434.
- Shuhaimi, M., Yazid, A.M., Ali, A.M., Ghazali, M.H., Zaitun, H. & Atiqah, N.A. 1999. Antibacterial activity, antimicrobial susceptibility and adherence properties of *Bifidobacterium infantis* G4. *Pakistan J. Biol. Sci.* 2: 1231-1235.
- Wada, K. 1990. *In vitro* fermentability of oligofructose and inulin by some species of human intestinal flora. Technical report by Calpis Intestinal Flora Laboratory, ORAFTI, Aandorenstraat 1-B3300 Tienen, Belgium.
- Wang, X. & Gibson, G.R. 1993. Effect of *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *Journal Applied Bacteriology* 75: 373-380.
- Muhammad Anas Othaman  
Biotechnology Research Centre  
Malaysian Agricultural Research and Development Institute  
43400 Serdang, Selangor  
Malaysia
- Mohd Khan Ayob  
Faculty of Science and Technology  
Universiti Kebangsaan Malaysia  
43600 UKM Bangi, Selangor  
Malaysia
- \*Pengarang untuk surat-menyurat; email: yati@food.upm.edu.my
- Diserahkan: 25 Januari 2012  
Diterima: 15 Jun 2012

Norhayati Hussain\*  
Faculty of Food Science & Technology  
Department of Food Technology  
Universiti Putra Malaysia  
43400 Serdang, Selangor  
Malaysia