PENGARUH PENAMBAHAN ISOMALT DAN LAMA PENYIMPANAN TERHADAP KETAHANAN *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 TERIMOBIL DALAM GEL ALGINAT PADA ASAM LAMBUNG DAN GARAM EMPEDU SECARA IN VITRO

SKRIPSI

OLEH :

SILVY FLORENZA

NRP 6103010078

PROGRAM STUDI TEKNOLOGI PANGAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS KATOLIK WIDYA MANDALA SURABAYA
SURABAYA

2014

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH

Demi perkembangan ilmu pengetahuan, saya sebagai mahasiswa Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya:

Nama : Silvy Florenza

NRP : 6103010078

Menyetujui skripsi saya yang berjudul :

"Pengaruh Penambahan Isomalt dan Lama Penyimpanan Terhadap Ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil dalam Gel Alginat pada Asam Lambung dan Garam Empedu Secara In Vitro"

Untuk dipublikasikan di internet atau media lain (*Digital Library* Perpustakaan Unika Widya Mandala Surabaya) untuk kepentingan akademik sebatas sesuai dengan undang-undang Hak Cipta.

Demikian pernyataan persetujuan publikasi karya ilmiah ini saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, Maret 2014

Yang menyatakan,

Silvy Florenza

LEMBAR PENGESAHAN

Skripsi dengan judul "**Pengaruh Penambahan Isomalt dan Lama Penyimpanan Terhadap Ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil dalam Gel Alginat pada Asam Lambung dan Garam Empedu Secara In Vitro**" yang diajukan oleh Silvy Florenza (6103010078) telah diujikan pada tanggal 18 Maret 2014 dan dinyatakan lulus oleh Tim Penguji.

Ketua Tim Penguji,

Netty Kusumawati, S.TP., M.Si
Tanggal :

Mengetahui,
Fakultas Teknologi Pertanian
Dekan

Ir. Adrianus Rulianto Utomo, MP
Tanggal :

LEMBAR PERSETUJUAN

Skripsi dengan judul " **Pengaruh Penambahan Isomalt dan Lama Penyimpanan Terhadap Ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil dalam Gel Alginat pada Asam Lambung dan Garam Empedu Secara In Vitro**", yang ditulis oleh Silvy Florenza (6103010078), telah diujikan dan disetujui oleh Dosen Pembimbing.

Dosen Pembimbing II,	Dosen Pembimbing I,
Ir.Ira Nugerahani, M.Si.	Netty Kusumawati, S.TP., M.Si.
Tanggal:	Tanggal:

LEMBAR PERNYATAAN
KEASLIAN KARYA ILMIAH

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Skripsi saya yang berjudul:

"Pengaruh Penambahan Isomalt dan Lama Penyimpanan Terhadap Ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil dalam Gel Alginat pada Asam Lambung dan Garam Empedu Secara In Vitro"

adalah hasil karya saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara nyata tertulis, diacu dalam makalah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila karya saya merupakan plagiarisme, maka saya bersedia dikenai sanksi berupa pembatalan kelulusan atau pencabutan gelar, sesuai dengan peraturan yang berlaku UU RI No.22 Tahun 2003 tentang Sistem Pendidikan Nasional Pasal 25 ayat 2, dan Peraturan Akademik Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya Pasal 30 ayat 1 (e) Tahun 2012.

Surabaya, Maret 2014

Silvy Florenza

Silvy Florenza. NRP. 6103010078. **Pengaruh Penambahan Isomalt Dan Lama Penyimpanan Terhadap Ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil dalam Gel Alginat pada Asam Lambung dan Garam Empedu Secara In Vitro.**

Di bawah bimbingan:
1. Netty Kusumawati, STP., M.Si.
2. Ir. Ira Nugerahani, M.Si.

ABSTRAK

Isomalt secara perlahan dan sebagian dicerna dan diserap dalam saluran pencernaan bagian atas, dan terbukti sebagai prebiotik karena dapat digunakan untuk pertumbuhan dan menstimulasi *lactobacteria*. Isomalt yang dikombinasikan dengan gel alginat dapat meningkatkan kekuatan matriks gel penjerat dalam melindungi sel. Sel *L. acidophillus* FNCC 0051 merupakan probiotik yang dikombinasikan dengan isomalt yang berperan sebagai prebiotik. Kombinasi keduanya dapat disebut sinbiotik. Probiotik kebanyakan tidak dapat dimanfaatkan oleh tubuh karena sebelum mencapai usus sudah mati akibat kondisi asam (pH=2) dalam lambung dan garam empedu. Salah satu cara meningkatkan ketahanan probiotik dengan mengimobilisasi sel. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh penambahan isomalt dan lama penyimpanan serta interaksinya terhadap ketahanan sel *L. acidophillus* FNCC 0051 terimobil dalam gel alginat pada asam lambung dan garam empedu secara in vitro.

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok Faktorial terdiri dari dua faktor dengan pengulangan tiga kali. Konsentrasi isomalt (1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%), dan lama penyimpanan hari ke-0 dan 21. Parameter yang diuji yaitu ketahanan sel terimobil pada asam lambung dan garam empedu secara in vitro. Pengujian diameter dan tekstur *beads* digunakan sebagai data pendukung. Data dianalisa dengan uji ANAVA pada α=5%, dilanjutkan dengan uji DMRT untuk menentukan perlakuan mana yang berbeda nyata. Berdasarkan hasil uji, perbedaan konsentrasi isomalt berpengaruh nyata terhadap ketahanan sel *L. acidophillus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung dan garam empedu. Peningkatan konsentrasi isomalt hingga 3% meningkatkan ketahanan sel pada asam lambung dan garam empedu tetapi pada konsentrasi diatas 3% ketahanan sel semakin menurun. Penurunan jumlah sel terimobil pada berbagai konsentrasi isomalt setelah kontak dengan asam lambung dan garam empedu berturut-turut 0,9380-1,0957 log cfu/gram dan 0,3299-0,4596 log cfu/gram. Perlakuan lama penyimpanan berpengaruh nyata terhadap ketahanan sel *L.acidophillus* FNCC 0051 terimobil pada garam empedu. Penyimpanan selama 21 hari menyebabkan sel lebih tahan jika dikontakkan dengan garam empedu jika dibandingkan dengan yang tidak disimpan. Penurunan jumlah sel terimobil selama penyimpanan setelah dikontakkan dengan garam empedu secara in vitro sebesar 0,3887 log cfu/gram dan yang tidak disimpan sebesar 0,4069 log cfu/gram. Nilai diameter *beads* pada hari ke-0 dan 21 adalah 3,40 mm dan 3,58 mm. Konsentrasi isomalt tidak berpengaruh nyata pada *hardness* dan *cohesiveness* tetapi berpengaruh nyata *springiness.* Nilai *springiness* meningkat dengan penambahan isomalt hingga 3% tetapi penambahan isomalt diatas 3% menyebabkan penurunan nilai *springiness.*

Kata Kunci: isomalt, sinbiotik, ketahanan, lama penyimpanan

Silvy Florenza. NRP. 6103010078. **Effect of Addition Isomalt and Storage Time Againts Survival of *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Immobilized in Alginate Gel on Gatric Acid and Bile Salts In Vitro.**
Advisory Committee:
1. Netty Kusumawati, STP., M.Si.
2. Ir. Ira Nugerahani, M.Si.

ABSTRACT

Isomalt is slowly and partially digested and absorbed in the upper gastrointestinal tract and its proved as prebiotic because it can be used for growth and stimulate lactobacteria. Isomalt is combined with alginate gel can increase the strength of entrapped gel in protecting cells. *L. acidophillus* FNCC 0051 is probiotics which combined with isomalt as prebiotics. The combination of both can be called synbiotic. The majority of probiotics can not be utilized by the body because before reaching the intestine is dead because of the acidic conditions (pH=2) and bile salts. One way to improve the survival of probiotics is through immobilization cell. The purpose of this study to determine the effect of addition isomalt and storage time and their interactions of survival of *L. acidophillus* FNCC 0051 immobilized in alginate gel on gastric acid and bile salts in vitro.

The experimental design used a randomized block design factorial design consisting of two factors with three replications. Concentration of isomalt (1%, 2%, 3%, 4%, and 5%), and storage time (0 and 21 days). The parameters observed are survival of immobile cell in gastric acid and bile salts in vitro. diameter and texture of beads (supporting data). Data were analyzed by ANOVA test at α=5%, and continued to test Real Difference Distance Duncan (Duncan's Multiple Range Test) to determine the level of treatment that provides a real difference. Differences in the concentration of isomalt significantly affect survival of *L.acidophillus* FNCC 0051 on gastric acid and bile salts. Increased concentrations of isomalt up to 3% increase cell survival in gastric acid and bile salts but at concentrations of isomalt above 3% decreased cell survival. The decrease of cell number immobilized at various concentrations of isomalt after exposure to gastric acid and bile salts from 0,9380 to 1,0957 log cfu/g and 0,3299 to 0,4596 log cfu/g respectively. Storage time significantly affect survival of *L. acidophillus* FNCC 0051 immobilized on bile salts. Storage time for 21 days led to the cells more resistant when in contact with bile salts when compared with those not stored. The decrease of cell number immobilized during storage time after contacted with bile salts in vitro by 0,3887 log cfu/g and are not stored by 0,4069 log cfu/g. Value of diameter beads on day 0 and 21 are 3,40 mm and 3,58 mm. Concentration of isomalt had no significant effect on the hardness and cohesiveness but significant effect springiness. The value of springiness increased with the addition of isomalt up to 3% but the addition of over 3% led decreased value of springiness.
Keywords : isomalt, synbiotic, survival, storage time

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yesus Kristus, karena atas berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan makalah Skripsi yang berjudul **"Pengaruh Penambahan Isomalt dan Lama Penyimpanan terhadap Ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil dalam Gel Alginat pada Asam Lambung dan Garam Empedu Secara In Vitro"**, yang merupakan salah satu syarat akademis untuk dapat menyelesaikan Program Sarjana di Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Program Penelitian Desentralisasi 2014 yang telah membiayai penelitian ini.
2. Netty Kusumawati, S.TP, M. Si. dan Ir. Ira Nugerahani, M. Si. selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan banyak waktu, pikiran, dan tenaga dalam membimbing penulis sejak awal hingga terselesaikannya penulisan ilmiah ini.
3. Semua pihak yang telah membantu penulis baik secara langsung maupun tidak langsung sehingga penulisan ilmiah ini dapat terselesaikan dengan baik**.**

Penulis juga menyadari bahwa penulisan ilmiah ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran dari pihak pembaca. Akhir kata, semoga penulisan ilmiah ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Surabaya, 25 Maret 2014

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

ABSTRAK i

ABSTRACT ii

KATA PENGANTAR iii

DAFTAR ISI iv

DAFTAR GAMBAR vii

DAFTAR TABEL viii

DAFTAR LAMPIRAN x

BAB I. PENDAHULUAN 1
1.1. Latar Belakang 1
1.2. Rumusan Masalah 6
1.3. Tujuan Penelitian 6

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA 7
2.1. Probiotik 7
2.2. Bakteri Asam Laktat 9
2.2.1. *Lactobacillus acidophilus* 10
2.2.1.1. *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 10
2.2.1.2. Ketahanan Bakteri Terhadap Asam 13
2.2.1.3. Ketahanan Bakteri Terhadap Garam Empedu 17
2.3. Prebiotik 20
2.3.1. Fruktooligosakarida 22
2.3.2. Galaktooligosakarida 23
2.3.3. Polyol 24
2.3.3.1. Isomalt 25
2.4. Sinbiotik 28
2.5. Imobilisasi 28
2.5.1.Metode Imobilisasi 29
2.5.1.1.Teknik Ekstruksi 29
2.5.2. Aplikasi dan Keuntungan dari Mikroenkapsulasi Probiotik 30
2.5.2.1. Produksi Kultur Starter 30
2.5.2.2. Ketahanan Probiotik Dalam Saluran Pencernaan 30
2.5.3. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Efektivitas Mikroenkapsulasi Probiotik 31

2.5.3.1. Karakteristik Kapsul 31
2.5.3.2. Lapisan Pelindung Kapsul 32
2.5.3.3. Konsentrasi Larutan Pembuatan Kapsul dan Diameter Manik-Manik 32
2.5.3.4. Kondisi Lingkungan 33
2.5.3.5. Jumlah Sel Bakteri Terjerst dalam Kapsul..... 33
2.5.3.6. Kondisi Proses Pembuatan Manik-Manik 33
2.6. Bahan Pengkapsul..... 34
2.6.1. Alginat 34
2.6.1.1. Na-Alginat 35
2.6.1.1.1. Kalsium Alginat..... 36
2.6.1.2. Alginat dan Kombinasinya 39
2.6.1.2.1. Alginat-Pati..... 39
2.6.1.2.2. Alginat-Kitosan 40
2.6.1.2.3. Alginat-Asam Poliamino 41
2.7. Perubahan Selama Penyimpanan 41

BAB III. HIPOTESA..... 43

BAB IV. BAHAN DAN METODE PENELITIAN 44
4.1. Bahan untuk Proses 44
4.1.2. Bahan untuk Analisa..... 44
4.2. Alat 45
4.2.1. Alat untuk Proses..... 45
4.2.2. Alat untuk Analisa 45
4.3. Waktu dan Tempat Penelitian 46
4.3.1. Waktu Penelitian 46
4.3.2. Tempat Penelitian 46
4.4. Rancangan Penelitian 46
4.5. Pelaksanaan Penelitian 47
4.5.1. Peremajaan Kultur Stok *L.acidophilus* FNCC 0051..... 47
4.5.2. Pembuatan Kultur Starter *L.acidophilus* FNCC 0051 pada Media MRS *Broth* 49
4.5.3. Pembuatan Sel Imobil 50
4.6. Pengamatan dan Pengujian 52
4.6.1. Pengujian Ketahanan terhadap Asam Lambung 52
4.6.2. Pengujian Ketahanan terhadap Garam Empedu 53
4.6.3. Pengujian Tekstur 54
4.6.4. Pengujian Diameter *Beads*..... 55

BAB V. PEMBAHASAN 56
5.1.Pengaruh Penambahan Isomalt dan Lama Penyimpanan terhadap Ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Asam Lambung 57

5.2.Pengaruh Penambahan Isomalt dan Lama Penyimpanan terhadap Ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Garam Empedu 63
5.3.Diameter *Beads* 70
5.4.Tekstur *Beads* 72
5.4.1. *Hardness* 73
5.4.2. *Cohesiveness* 75
5.4.3. *Springiness* 76

BAB VI. PENUTUP 78
6.1.Kesimpulan 78
6.2.Saran 78

DAFTAR PUSTAKA 79

LAMPIRAN 101

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1. Sel Bakteri *Lactobacillus acidophilus* 11
Gambar 2.2. Struktur FOS 23
Gambar 2.3. Struktur GOS 26
Gambar 2.4. Tahapan Proses Pembuatan Isomalt 24
Gambar 2.5. Diagram Alir Enkapsulasi Bakteri dengan Teknik Ekstruksi 29
Gambar 2.6. Diagram Struktur Molekul Natrium Alginat 36
Gambar 2.7. Ikatan antara Ca^{2+} dengan Alginat 36
Gambar 4.1. Diagram Alir Peremajaan Kultur Stok *L.acidophilus* FNCC 0051 48
Gambar 4.2. Diagram Alir Pembuatan Kultur Starter *L.acidophilus* FNCC 0051 49
Gambar 4.3. Diagram Alir Pembuatan Sel Imobil dalam Na-Alginat .. 50
Gambar 4.4. Diagram Alir Pengujian Tekstur *Beads* 54
Gambar 4.5. Diagram Alir Pengujian Diameter *Beads* 55
Gambar 5.1. Histogram Pengaruh Konsentrasi Isomalt terhadap Ketahanan Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Asam Lambung 58
Gambar 5.2. Histogram Pengaruh Lama Penyimpanan terhadap Ketahanan Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Asam Lambung 62
Gambar 5.3. Histogram Pengaruh Konsentrasi Isomalt terhadap Ketahanan Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Garam Empedu 64

Gambar 5.4. Histogram Pengaruh Lama Penyimpanan terhadap Ketahanan Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Garam Empedu 67
Gambar 5.5. Histogram Pengaruh Lama Penyimpanan terhadap Diameter *Beads* Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil 71
Gambar 5.6. Histogram Pengaruh Konsentrasi Isomalt terhadap *Hardness Beads* Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil 74
Gambar 5.7. Histogram Pengaruh Konsentrasi Isomalt terhadap *Cohesiveness Beads* Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil 76
Gambar 5.8. Histogram Pengaruh Konsentrasi Isomalt terhadap S*pringiness Beads* Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil 77

.

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1. Efek Probiotik terhadap Kesehatan 8

Tabel 2.2. Karakteristik Sel Bakteri *Lactobacillus acidophilus* 12

Tabel 2.3. Sifat Fisikokimia Sukrosa dan Isomalt 27

Tabel 4.1. Rancangan Penelitian Kombinasi Perlakuan Konsentrasi Isomalt dan Lama Penyimpanan 47

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran A. Spesifikasi Bahan Penelitian 101
Lampiran B. Spesifikasi dan Proses Sterilisasi Cup 109
Lampiran C. Cara Kerja Tekstur Analyzer 110
Lampiran D. Skema Kerja Uji Total Sel *L. acidophilus* FNCC 0051 Terimobil 111
Lampiran E. Skema Kerja Uji Total Sel *L. acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Asam Lambung 113
Lampiran F. Skema Kerja Uji Total Sel *L. acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Garam Empedu 0% 115
Lampiran G. Skema Kerja Uji Total Sel *L. acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Garam Empedu 1% 117
Lampiran H. Hasil Angka Lempeng Total Sel Imobil 119
Lampiran I. Penurunan Ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil Pada Asam Lambung 128
Lampiran J. Penurunan Ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil Pada Garam Empedu 130
Lampiran K. Hasil pengujian Diameter *Beads* 132
Lampiran L. Ketahanan Sel Imobil Selama Penyimpanan 136
Lampiran M. Hasil Pengujian Tekstur 139
Lampiran N. Foto *Beads* yang Terbentuk 147
Lampiran O. Grafik Pengujian Tekstur 148

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Lactobacillus acidophilus merupakan bakteri probiotik yang dapat diartikan sebagai mikroba yang dapat memberikan efek menguntungkan bagi tubuh inang yang mengkonsumsinya dengan cara menyokong keseimbangan mikroba di dalam saluran pencernaan (Adhikari, Mustapha, Grun, dan Fernando, 2000). Law (1997), menyatakan tentang bakteri yang paling banyak mendapat perhatian mengenai resistensinya terhadap garam empedu adalah jumlah strain *L. acidophilus* dan beberapa *Bifidobacteria*. Salah satu syarat dikatakan sebagai bakteri probiotik adalah ketika bakteri ini mampu bertahan melewati saluran pencernaan dan berkembang biak dalam saluran pencernaan, tahan terhadap cairan lambung dan cairan empedu, dan mampu menempel pada sel epitel usus manusia (Gilliland, 1989). *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 yang digunakan dalam penelitian ini merupakan bakteri probiotik (Harti dkk, 2012). Penelitian Yeo Siok *et al.*, (2010) menyatakan bahwa terjadi kenaikan yang signifikan pada pertumbuhan *L.acidophilus* FTDC 8033 dan *Lactobacillus* sp. FTDC 2113 pada susu kedelai yang disuplementasi dengan FOS. Pertumbuhan probiotik melebihi 7 log cfu/mL. Ini membuktikan bahwa penambahan prebiotik secara signifikan membantu pertumbuhan probiotik.

Prebiotik pada umumnya merupakan karbohidrat dengan bobot molekul rendah yang tidak dapat diserap, tidak dapat dicerna dan berbentuk oligosakarida atau serat pangan (Silalahi dan Hutagalung, 2002). Probiotik dan prebiotik dapat dikombinasikan dalam suatu produk dan disebut dengan sinbiotik. Sinbiotik merupakan gabungan dari prebiotik dan probiotik yang masing-masing komponennya dapat memberikan keuntungan bagi

kesehatan manusia jika dikonsumsi (Crittenden, 1999). Keuntungannya adalah meningkatkan daya tahan hidup bakteri probiotik karena substrat yang spesifik telah tersedia untuk fermentasi, sehingga meningkatkan kesehatan dan aktivitas mikroorganisme dalam saluran pencernaan (Macfarlane dan Cummings, 2006). Sinbiotik biasa dimasukkan dalam produk *carrier* agar dapat masuk ke dalam saluran pencernaan, tetapi kebanyakan probiotik yang sudah dibawa masuk oleh *carrier* tidak dapat dimanfaatkan oleh tubuh dikarenakan probiotik tersebut sebelum mencapai usus sudah mati akibat kondisi asam lambung yang terlalu asam (pH=2) dan garam empedu. Salah satu cara untuk meningkatkan ketahanan probiotik ini adalah dengan cara imobilisasi sel.

Imobilisasi sel adalah suatu proses untuk menghentikan pergerakan dari molekul sel dengan menahannya pada suatu matriks. Matriks yang digunakan adalah Na-alginat karena natrium memiliki sifat inert dan isotonis dengan sel sehingga tidak akan menyebabkan lisis pada sel yang diperangkap. Penelitian yang dilakukan oleh Kailasapathy dan Iyer (2005), menunjukkan bahwa teknik imobilisasi sel dapat meningkatkan ketahanan sel yang terimobil selama berada di dalam *carrier* yogurt dan tiruan dari kondisi asam pencernaan dan garam empedu. Selain itu, imobilisasi probiotik telah banyak dilakukan untuk meningkatkan ketahanan sel probiotik selama penyimpanan.

Semakin lama penyimpanan maka jumlah sel yang lepas dari *beads* juga semakin meningkat. Peningkatan jumlah sel yang lepas dapat disebabkan karena gel dari *beads* yang terbentuk dipengaruhi oleh adanya ion kalsium yang kekokohannya akan menurun apabila berada pada kondisi dimana terdapat agen pengkelat atau ion monovalen yang mengabsorb ion kalsium seperti asetat, laktat dan fosfat (Roy *et al*., 1987; Smidsrod and SkjakBraek, 1990; Ellenton, 1998).

Imobilisasi sel yang hanya menggunakan gel alginat masih dapat menyebabkan lepasnya sel dari dalam matriks pelindung. Penambahan karbohidrat yang dikombinasikan dengan alginat dapat meningkatkan kekuatan matriks penjerat dalam melindungi sel (Monedero, dkk., 2010). Karbohidrat yang dikombinasikan dengan alginat ini dapat berfungsi sebagai prebiotik. Umumnya, golongan polyol dapat berfungsi sebagai prebiotik bagi bakteri karena tidak dapat tercerna oleh tubuh tetapi dapat dicerna oleh mikroflora sehingga mikroflora yang baik dapat tumbuh dengan optimum di usus manusia. Salah satu gula alkohol yang digunakan dalam penelitian ini adalah isomalt.

Isomalt adalah campuran dari dua disakarida alkohol gluco-gluco-manitol dan sorbitol. Isomalt merupakan pemanis buatan yang baik karena tidak meningkatkan kadar gula darah dan insulin. Tidak seperti golongan polyol lainnya, isomalt tidak menimbulkan efek laksatif bagi manusia sehingga aman bagi pencernaan manusia. Livesey (2003), menyatakan bahwa isomalt yang tidak tercerna dan digunakan untuk fermentasi mikroflora usus mendekati 90% secara in vivo. Klingeberg *et al.,* (2004) menyatakan bahwa isomalt dapat didegradasi oleh *bifidobacteria* dan digunakan untuk pertumbuhan dan multiplikasi serta dapat menstimulasi *lactobacteria*, terutama *bifidobacteria* dalam saluran pencernaan.

Peningkatan yang sangat signifikan dari *bifidobacteria* ditunjukkan dalam studi dengan 19 relawan setelah asupan 30g isomalt/hari untuk jangka waktu 28 hari, menunjukkan efek prebiotik dari isomalt secara in vivo. Selain itu, isomalt juga memiliki efek yang positif pada kesehatan usus yaitu mencegah konstipasi (Scheppach, 1991 dalam Mitchell, 2006). Isomalt mengandung energi atau kalori yang rendah. Berdasarkan The US Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB), Life

Science Research Office (LSRO), isomalt mengandung energi sebanyak 2kcal/g dan hampir 90-100% isomalt lolos dari saluran pencernaan dan difermentasi di usus besar (FASEB/LSRO, 1994 dalam Mitchell, 2006).

Pada penelitian ini, imobilisasi dilakukan pada sel bakteri *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 dengan menambahkan isomalt sebagai prebiotik dan disimpan di dalam susu UHT sebagai produk *carier* pada suhu refrigerator. Konsentrasi penambahan isomalt akan berpengaruh terhadap kerapatan dan kekokohan matriks pemerangkap sel sehingga diduga akan berpengaruh terhadap ketahanan sel selama kontak dengan asam lambung dan garam empedu. Selama 30 menit sel yang terjerat dalam matriks akan dikontakkan dengan asam lambung, lama kontak diperkirakan dari waktu kontak minuman yang lebih cepat daripada makanan dan lamanya makanan masuk hingga keluar dari lambung adalah 90 menit, sedangkan yang kontak dengan asam lambung diperkirakan hanya 30 menit.

Isomalt digunakan pada penelitian ini karena belum pernah ada penelitian tentang isomalt yang ditambahkan pada sel imobil. Selain itu menurut beberapa penelitian mengatakan bahwa isomalt sebagai prebiotik dan dapat meningkatkan kekuatan matriks penjerat bakteri. Konsentrasi isomalt yang digunakan mengacu pada kisaran penggunaan sumber prebiotik lainnya (gula alkohol) yaitu penambahan FOS 5% merupakan promoter pertumbuhan terbaik terhadap *Bifidobacteria* (Nadal *et al*., 2010). Penambahan FOS kurang dari 2.5% untuk produk sinbiotik tidak memberikan efek bifidogenik yang diharapkan karena jumlah yang tidak mencukupi setelah memasuki saluran pencernaan. Dari penelitian pendahuluan semakin bertambahnya konsentrasi isomalt *beads* yang dihasilkan makin keras, elastisitasnya *beads* semakin kecil sehingga konsentrasi diatas 5% *beads* yang dihasilkan semakin keras dan mudah retak. Oleh karena itu

konsentrasi isomalt yang digunakan dalam penelitian ini sebesar 1%, 2%, 3%, 4%, 5%.

Konsentrasi Na alginat yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2%. Hal ini juga didasarkan pada penelitian pendahuluan yang menunjukkan peningkatan ketahanan sel terimobil selama penyimpanan dengan menggunakan Na alginat 2% daripada konsentrasi Na alginat 1%, sedangkan diatas 2%, larutan alginat sudah terlalu kental sehingga tidak dapat membentuk manik-manik *beads*. Chandramouli *et al*., (2004), mengungkapkan bahwa penggunaan konsentrasi larutan alginat lebih dari 2% tidak memungkinkan untuk menghasilkan manik-manik homogen karena peningkatan viskositas larutan dan penurunan difusivitas massa.

Penurunan ketahanan probiotik dalam produk dapat terjadi selama penyimpanan karena terjadi perubahan pada matriks gel. Bakteri probiotik yang diimobilisasi memiliki ketahanan lebih tinggi dibandingkan jumlah sel bakteri probiotik tanpa imobilisasi (Kun Nan Chen *et al.*, 2005; Brachkova *et al.*, 2010; Fahimdanesh *et al.*, 2012) sehingga teknik imobilisasi memberikan keuntungan untuk mempertahankan ketahanan sel bakteri terhadap asam dan garam empedu. Berdasarkan penelitian Rodriguez-Huezo *et al.*, (2011), menyatakan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan terhadap jumlah sel terimobil selama penyimpanan 10 hari pertama tetapi semakin lama penyimpanan menunjukkan penurunan jumlah sel yang signifikan yaitu kira-kira log 4,34 pada akhir penyimpanan (25 hari) dan bahkan mencapai penurunan sebesar log 4 pada penyimpanan selama 7 minggu di dalam susu (Akhiar, 2010). Lama penyimpanan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah 0 dan 21 hari. Pemilihan lama waktu pengujian tersebut berdasarkan rata-rata umur simpan minuman probiotik pada umumnya adalah 30-60 hari (Hartati dkk, 2002). Sedangkan selisih

waktu pengujian satu dengan yang lain selama 21 hari berdasarkan pada penelitian pendahuluan, dimana selisih 14 hari belum tampak perubahan ketahanan asam lambung dan garam empedu yang nyata.

1.2. Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh penambahan isomalt terhadap ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung dan garam empedu?
2. Bagaimana pengaruh lama penyimpanan terhadap ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung dan garam empedu?
3. Bagaimana pengaruh interaksi penambahan isomalt dan lama penyimpanan terhadap ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung dan garam empedu?

1.3. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh penambahan isomalt terhadap ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung dan garam empedu.
2. Mengetahui pengaruh lama penyimpanan terhadap ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung dan garam empedu.
3. Mengetahui pengaruh interaksi penambahan isomalt dan lama penyimpanan terhadap ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung dan garam empedu.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Probiotik

Probiotik merupakan organisme hidup yang mampu memberikan efek yang menguntungkan kesehatan hostnya apabila dikonsumsi dalam jumlah yang cukup (FAO/WHO, 2001; FAO/WHO, 2002; ISAPP, 2009) dengan memperbaiki keseimbangan mikroflora intestinal pada saat masuk dalam saluran pencernaan (Shitandi *et al*., 2007; Dommels *et al*., 2009; Weichselbaum, 2009). Menurut Hoier (1992), kriteria strain mikroba probiotik adalah mampu melakukan aktivitas dalam memfermentasikan susu dan menggandakan diri lebih cepat, tahan terhadap suasana asam sehingga mampu hidup dan bertahan dalam saluran pencernaan, serta produk yang dihasilkan dapat diterima konsumen, dan mempunyai stabilitas yang tinggi selama proses fermentasi, penyimpanan dan distribusi.

Suskovic *et al.,* (2001) menegaskan agar suatu mikroorganisme diklasifikasikan sebagai probiotik, harus memenuhi beberapa persyaratan, diantaranya bersifat non patogen, viabilitas pada populasi tinggi, sekitar 10^6-10^8 cfu/ml, menghasilkan substansi anti mikrobial yang akan menghambat bakteri patogen dalam saluran pencernaan, mampu berkompetisi dengan bakteri patogen untuk membentuk koloni dalam saluran pencernaan, dan tahan terhadap enzim-enzim pencernaan dan garam-garam empedu. Beberapa bakteri yang termasuk dalam kelompok ini adalah *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Bifidus longum* dan *Bifidobacterium bifidum.* Kelompok *Lactobacilli* seperti *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus casei,* serta dari kelompok *Bifidobacterium bifidum* merupakan strain yang biasa digunakan sebagai sumber probiotik dalam pengolahan susu.

Efek probiotik terhadap kesehatan dan mekanismenya dalam tubuh disajikan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Efek Probiotik terhadap Kesehatan

Manfaat	Fungsi	Mekanisme
1. Membantu Pencernaan	a. *Irritable bowel syndrome*, mengurangi gejala saluran cerna (konstipasi, diare non patogenik, flatulensi, kram, nafas yang berbau penyebab dari gangguan pencernaan) b. Intoleran terhadap laktosa	- Perubahan populasi atau aktivitas dari mikroflora usus
2. Sebagai pertahanan tubuh	a. Alergi (eksema atopic, alergi terhadap susu, rematik arthritis)	- Pemindahan mikroba laktase ke usus halus - Translokasi, efek *barrier*
	b. Kariogenik	- Perubahan populasi, aktivitas mikroflora oral atau yang menempel pada gigi
	c. Karsinogenik, mutagenik, tumor	- Penyerapan mutagen, merangsang sistem imun, penghambatan produksi karsinogen oleh mikroflora usus
	d. Diare karena penggunaan antibiotika, diare yang disebabkan oleh Rotavirus, Kolitis yang disebabkan oleh *C.difficile*, diare nosokomial	- Kompetisi pengeluaran, - translokasi / efek *barrier*, meningkatkan respon imun
	e. Peradangan usus, Kolitis ulserasi, penyakit Crohn's	- Penurunan regulasi respon imun
	f. Pertumbuhan bakteri usus yang berlebihan	- Aktivitas antimikroba, pengeluaran kompetisi
	g. Imunomodulasi (status imun, respon, vaksin)	- Interaksi dengan sel imun untuk meningkatkan aktivitas pagositosis dari sel darah putih, meningkatkan igA setelah kontak dengan antigen. Meningkatkan

Manfaat	Fungsi	Mekanisme
		proliferasi lekosit intra epitel, regulasi Th1/Th2, induksi sitosis sitokin
3. Manfaat yang lain	a. Vaginosis, infeksi saluran kemih	- Aktivitas antipatogenik, pengeluaran kompetisi
	b. Menurunkan kolesterol darah	- Dekonjugasi garam empedu
	c. Endotoksemia dengan sirosis	- Penghambatan produksi endotoksin oleh mikroflora usus
	d. Hipertensi	- Unsur seluler atau peptida yang berasal dari aktivitas fermentasi sebagai penghambat ACE (*Angiotensin Converting Enzyme*)
	e. Batu ginjal	- Perubahan pencernaan mempengaruhi pemecahan oksalat

Sumber: Sanders (2003) dalam Toma dan Pokrotnieks (2006)

Penelitian tentang probiotik dikemukakan oleh Gilliand dan Speck (1977), yang mengatakan bahwa konsumsi produk yang berbasis probiotik akan memberikan kontribusi positif bagi kesehatan. Kontribusi tersebut berupa sifat antimutagenik, antikarsinogenik dan peningkatan sistem imun.

2.2. Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat (BAL) adalah kelompok bakteri gram positif berbentuk kokus atau batang, tidak membentuk spora, suhu optimum $\pm 40^{o}$C, pada umumnya tidak motil, bersifat anaerob, katalase negatif dan oksidase positif, dengan asam laktat sebagai produk utama fermentasi karbohidrat. Sifat-sifat khusus bakteri asam laktat adalah mampu tumbuh pada kadar gula, alkohol, dan garam yang tinggi, mampu memfermentasikan monosakarida dan disakarida (Syahrurahman, 1994).

Bakteri asam laktat yang banyak digunakan dalam dunia industri adalah spesies *Lactococcus, Enterococcus, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Leuconostoc,* dan *Lactobacillus* (Makarova *et al.,* 2006 ; O'Sullivan *et al.,* 2009). Bakteri asam laktat yang bersifat sebagai probiotik pada pencernaan manusia, merupakan mikroflora normal usus, terdiri atas *Bifidobacteria* dan *Lactobacillus acidophilus*. *Bifidobacteria* dan *Lactobacillus* merupakan konsumsi probiotik yang utama bagi manusia yang kebanyakan dikonsumsi dalam bentuk makanan berbasis susu. Total mikroba yang terdapat di saluran pencernaan diperkirakan mencapai 10^{12} sel setiap gram isi dengan total sekitar 10^{15} yang terdiri dari lebih 1000 spesies, atau diperkirakan sekitar 3000-4000 spesies. Berat mikroorganime ini mencapai 1,5 kg di dalam tubuh dan menyumbang 60% berat feses (Rahayu, 2008).

Peningkatan jumlah bakteri asam laktat di usus dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen, mengurangi infeksi dan efek antikarsinogenik. Bakteri asam laktat berarti mempunyai kemampuan untuk bertahan hidup dalam saluran pencernaan. Ketahanan bakteri asam laktat dalam saluran pencernaan bervariasi dengan pH lambung (Adolfsson *et al.,* 2004). Beberapa strain bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai agensia probiotik adalah *Lactobacillus acidophilus, L. reuteri* dan *L. casei* demikian pula strain dari *Bifidobacterium*, karena bakteri ini memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen enterik.

2.2.1. *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus merupakan bakteri berbentuk batang, termasuk famili *Lactobacillaceae* dan genus *Lactobacillus*. *Lactobacillus acidophilus* adalah bakteri gram positif, bersifat mesofilik, fakultatif anaerob, non motil, tidak membentuk spora, homofermentatif, berbentuk

batang, dan katalase negatif. *Lactobacillus acidophilus* merupakan mikroorganisme prokariotik bersel tunggal yang tidak memiliki inti yang berbeda. Bakteri ini biasanya dalam koloni yang berantai dengan diameter sel 0,5 hingga 0,8 mikrometer (1 µm = 10^{-6} meter) dengan panjang rantai 2 sampai 9 mm. (Tamime dan Robinson, 2008).

Gambar 2.1. Sel Bakteri *Lactobacillus acidophilus*
Sumber: www.sigmaaldrich.com

Suhu optimum pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* adalah 35-45^{0}C, tidak tumbuh pada suhu kurang dari 15^{0}C. Nilai pH optimum untuk pertumbuhannya adalah 5,5- 6,0 serta memproduksi asam laktat sebesar 0,3%–1,9%. *Lactobacillus acidophilus* mempunyai kemampuan koagregasi yang sangat baik setelah diinkubasi selama 25 jam. Koagregasi berperanan penting dalam usaha mencari bakteri probiotik yang baik karena dapat mencegah infeksi bakteri patogen (Natalia dan Priadi, 2006). Waktu transit makanan melalui perut manusia adalah sekitar 90 menit. Menurut Chou and Weimer (1999), beberapa strain *Lactobacillus acidophilus* pada pH 3,5 hanya dapat bertahan dalam jangka waktu yang pendek, hal ini dapat dilihat dari pertumbuhannya yang sedikit setelah diinkubasi selama 90 menit.

Lactobacillus acidophilus menunjukkan kemampuannya untuk tumbuh dengan pesat dalam media MRSB pada pH 3,5 yang mengandung

0,2% garam empedu. Isolat *Lactobacillus spp*. yang diisolasi dari berbagai pangan fermentasi asal Indonesia, dinilai dapat bertahan hidup isolasi dari berbagai pangan fermentasi asal Indonesia, dinilai dapat bertahan hidup dan resisten terhadap pH rendah (Hardiningsih *et al.,* 2005). Karakterisitik *Lactobacillus acidophilus* dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2. Karakteristik Sel Bakteri *Lactobacillus acidophilus*

Parameter	Karakteristik
Bentuk	Batang, berantai
Diameter	0,5-0,8 µm
Jenis	Gram positif, katalase negatif
Suhu Pertumbuhan	Tidak dapat tumbuh pada suhu di bawah 20^0C dan suhu di atas 48^0C. tumbuh dengan baik pada suhu 37^0C
Karakteritik	Homofermentatif
Media pertumbuhan	Tumbuh dalam media asam. Dapat tumbuh pada kondisi garam empedu (NaCl 2%) tetapi tidak dapat tumbuh pada NaCl 4%
Sumber asam yang dihasilkan	Amygdalin, selobiosa, salisin dan sukrosa.

Sumber : Wheater, 1955

2.2.1.1. *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051

Lactobacillus acidophilus merupakan bakteri yang berciri-ciri gram positif, fermentatif, fakultatif anaerobik atau mikroaerofilik. Bakteri ini memproduksi asam laktar dan menggunakan energi dari fermentasi laktosa, glukosa dan gulan lainnya melalui metabolisme homofermentasi. Sekitar 85-90% dari gula dimanfaatkan untuk proses fermentasi dan diubah menjadi asam laktat. Menurut Cahyanti (2008) dan Yusmarini dkk. (2010), *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 merupakan bakteri probiotik. Beberapa penelitian tentang *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 yaitu mengetahui pengaruh level sukrosa terhadap pertumbuhan bakteri *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051, hasil yang diperoleh bahwa bakteri

dapat merombak komponen karbohidrat (sukrosa) yang berperan sebagai prebiotik menjadi asam laktat (Kimestri dkk, 2013). Penelitian lain menurut Mariani dan Susanti (2012), yang ingin mengetahui pengaruh suplementasi tepung terigu terhadap pertumbuhan dan laju pengasaman probiotik *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 dan hasil yang diperoleh bahwa tepung terigu yang dimanfaatkan sebagai prebiotik dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri. Penelitian tentang stabilitas bakteri *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 dalam produk pangan selama penyimpanan (Rahayu *et al.*, 2011; Murtiari, 2012; Khoiriyah dan Fatchiyah, 2013).

2.2.1.2. Ketahanan Bakteri Terhadap Asam

BAL yang digunakan sebagai kultur probiotik pada umumnya diberikan melalui sistem pangan sehingga BAL tersebut harus melalui saluran pencernaan manusia termasuk segala kondisi yang menekan sepanjang saluran pencernaan. Salah satu kondisi yang menekan adalah pH lambung yang sangat rendah. Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mengetahui ketahanan mikroba probiotik terhadap asam lambung yaitu dengan cara melakukan pengujian secara ‘in vitro’ dengan menggunakan HCl sebagai model cairan lambung (Chou and Weimer, 1999).

Menurut Poedjiadi (1994), lambung dan getah lambung mengandung komponen-komponen sebagai berikut: 1) musin/lendir yang berguna untuk melindungi dinding lambung dari pengaruh asam lambung, 2) asam lambung (HCl) yang berguna untuk membunuh kuman/bakteri yang tidak tahan asam, 3) enzim pepsinogen yang diaktifkan oleh HCl menjadi pepsin, 4) enzim protenin yang diaktifkan oleh HCl menjadi renin.

Asam lambung (HCl) dihasilkan oleh sel-sel parietal yang menyebabkan cairan dalam lambung bersifat asam dengan pH antara 1,0-2,0. Kondisi lambung yang asam terutama disebabkan oleh asam lambung (HCl), yang berguna untuk membunuh kuman/ bakteri yang tidak tahan

asam, membantu pencernaan protein dan menyediakan kondisi asam yang diperlukan untuk mengaktifkan enzim pepsinogen dan protenin (Poedjiadi, 1994). Kondisi keasaman lambung antara pH 1 sampai 3 (Corzo and Gililand, 1999). Dalam keadaan kosong lambung mencapai kondisi sangat asam yaitu pH 1,5 (Kallasapathy and Rybka, 1997). Dalam lambung makanan yang masuk akan mengalami pencernaan kimiawi oleh asam lambung dan secara fisik oleh adanya gerak peristaltis lambung.

Menurut Oh, *et al*. (2000), dan van de Gutche *et al* (2002), toleransi BAL terhadap keasaman tergantung dari:

1. Enzim K+ATP-ase

   K+ATP-ase dapat mengubah ion H+ menjadi ion K+ sehingga pH eksternal mengalami peningkatan.

2. Komposisi membran sitoplasma

   Membran sitoplasma yang mengandung asam-asam lemak jenuh tunggal permeabilitasnya terhadap proton lebih kecil sehingga sel lebih tahan terhadap asam. Komposisi membran sitoplasma ini dipengaruhi oleh jenis bakteri, tipe media pertumbuhan dan kondisi inkubasinya.

BAL merupakan mikroorganisme fermentatif yang mampu tumbuh pada kisaran pH yang luas. Di antara genus-genus BAL , spesies-spesies dalam genus *Lactobacillus* memiliki ketahanan yang baik dalam kondisi asam. Pertahanan utama sel bakteri dari lingkungan asam adalah membran seluler yang terdiri atas struktur sel bakteri dari lingkungan asam adalah membran seluler yang terdiri atas struktur lemak dua lapis. Paparan sel bakteri dalam lingkungan yang sangat asam dapat menyebabkan kerusakan pada membran sel tersebut dan keluarnya komponen-komponen intraseluler yang mengakibatkan kematian sel. Bakteri yang toleran terhadap asam, membran selnya lebih tahan terhadap kebocoran akibat pH yang rendah dibanding dengan tahan asam (Bender dan Marquis, 1987).

Menurut Bender dan Marquis (1987), bakteri gram positif dinding selnya terdiri dari 90% peptidoglikan, yang merupakan suatu lapisan yang tersusun atas rantai glikan (dibentuk dari dua derivatif gula yaitu N-asetilglukosamin dan asam N-asetilmuramat) yang dihubungkan dengan asam-asam amino (L-alanin, D-asam glutamat, D-alanin, asam meso-diamino pimelat) melalui ikatan silang peptida. HCl adalah asam kuat yang mudah terdisosiasi di luar sel menghasilkan proton. Asam ini dapat memutuskan ikatan silang peptida pada peptidoglikan sehingga dinding sel menjadi rapuh dan rusak, selanjutnya juga mengakibatkan kerusakan membran dan mendenaturasi enzim-enzim serta inti sel sehingga terjadi kematian sel bakteri.

Toleransi BAL yang cukup tinggi terhadap asam juga disebabkan kemampuannya untuk mempertahankan pH sitoplasma lebih alkali daripada pH ekstraseluler (Siegumffeld *et al*., 2000), sehingga tidak terjadi gradien proton yang besar. Bagi BAL gradien proton yang besar tidak menguntungkan karena translokasi proton menggunakan banyak energi (Kobayashi, 1985) dan bakteri anaerobik mendapatkan energi dari metabolisme gula yang jauh lebih kecil dibandingkan dengan bakteri aerobik. Selain itu gradien proton yang besar mengakibatkan akumulasi anion asam organik dalam sitosol yang bersifat toksik bagi sel tersebut (Russel, 1992).

Berrada *et al*., (1991) yang dikutip oleh Chou dan Weimer (1999), menyatakan bahwa waktu yang diperlukan mulai saat bakteri masuk sampai keluar dari lambung sekitar 90 menit. Jadi isolat yang diseleksi untuk digunakan sebagai probiotik harus mampu bertahan dalam keadaan asam lambung selama sedikitnya 90 menit. BAL adalah mikroorganisme fermentatif yang dapat hidup pada kisaran pH yang luas. Pertahanan utama sel bakteri dari lingkungannya adalah membran seluler yang terdiri atas

struktur lemak dua lapis. Bila sel bakteri terpapar pada kondisi yang sangat asam, maka membran sel dapat mengalami kerusakan dan berakibat hilangnya komponen-komponen intraseluler, seperti Mg, K, dan lemak dari sel. Biasanya kerusakan ini menyebabkan kematian pada sel. Kondisi ini dapat dideteksi dengan cara mengukur konsentrasi komponen intraseluler yang keluar dari dalam sel. Bakteri yang toleran terhadap asam, membran selnya lebih tahan terhadap kebocoran akibat pH rendah dibandingkan dengan yang tidak tahan asam.

Toleransi BAL yang cukup tinggi terhadap asam juga disebabkan oleh kemampuannya untuk mempertahankan pH sitoplasma lebih basa daripada pH ekstraseluler. Menurut Siegumfeldt *et al.,* (2000), pada BAL terjadi perubahan dinamis pH intraseluler seiring dengan terjadinya penurunan pH ekstraseluler sehingga tidak terjadi gradien proton yang besar. Bagi BAL gradien proton yang besar tidak menguntungkan sebab translokasi proton menggunakan banyak energi. Selain itu gradien proton yang besar mengakibatkan akumulasi anion, asam organik dalam sitosol yang bersifat toksik bagi sel tersebut. BAL tidak hanya tumbuh dengan lambat pada pH rendah, tapi kerusakan akibat asam dan hilangnya viabilitas juga dapat terjadi pada sel bakteri yang terpapar pada pH rendah.

Tiap galur memiliki ketahanan yang berbeda terhadap asam atau pH rendah. Contohnya *Lactobacillus* lebih toleran terhadap pH rendah daripada *laktokoki* dan *streptokoki.* Zavaglia *et al*., (1998) telah menguji ketahanan isolat klinis *Bifidobacteria* bila terpapar pada pH 3,0 selama 1 jam. Hasilnya menunjukkan bahwa sebanyak 11 dari 25 isolat klinis *Bifidobacteria* berhasil hidup dalam kondisi pH rendah, dengan ketahanan lebih besar dari 1%. Jacobsen *et al.,* (1999) menguji ketahanan 47 isolat BAL dari berbagai sumber pada pH 2,5. Dari 47 isolat tersebut hanya 29 isolat yang mampu bertahan pada pH 2,5 dan tidak ada satupun yang

mampu tumbuh setelah inkubasi 4 jam. Sedangkan Chou dan Weimer (1999), menyeleksi 7 isolat *Lactobacillus acidophilus* dan hasilnya menunjukkan bahwa semua isolat tahan terhadap pH 3,5 selama 90 menit.

2.2.1.3. Ketahanan Bakteri Terhadap Garam Empedu

Usus halus terdiri atas 3 bagian yaitu usus 12 jari (duodenum), usus tengah (jejunum), dan usus penyerapan (ileum). Dua organ tubuh yang mempunyai peranan penting dalam proses pencernaan makanan dalam usus adalah pankreas dan usus. Kedua oragan tersebut memproduksi cairan yang bersifat basa. Usus halus memiliki hormon sekretin yang berfungsi untuk memacu kelenjar pankreas mensekresikan getah pankreas, hormon kolesistokinin yang berfungsi untuk memacu empedu mengeluarkan cairan empedu dan getah usus, cairan empedu, dan garam empedu yang berfungsi untuk menurunkan tegangan butir lemak sehingga dapat diemulsikan untuk pencernaan selanjutnya. Getah pankreas mengandung beberapa komponen, antara lain: lipase, amilopsin, disakarase, tripsinogen, dan peptidase. Getah usus mengandung enterokinase, sakarase, dan laktase (Poedjiadi, 1994).

Cairan empedu merupakan cairan berwarna kekuningan yang terdiri dari garam empedu, pigmen empedu, dan sejumlah xenobiotik terdetoksifikasi. Cairan empedu disintesa oleh hati dari kolestrol dan disimpan pada kantung empedu. *Chyme (*makanan yang telah dicerna di lambung) yang masuk ke usus halus akan menstimulasi dinding usus mensekresikan hormon kolesistokinin yang berfungsi untuk memacu kantung empedu mengeluarkan cairan emoedu. Cairan empedu mengandung garam empedu yang berfungsi untuk menurunkan tegangan permukaan butir lemak sehingga dapat diemulsikan pada pencernaan selanjutnya (Poedjiadi, 1994).

Sistem pencernaan memiliki konsentrasi garam empedu yang sangat bervariasi. Kecepatan sekresi garam empedu dan konsentrasi bervariasi

tergantung jenis makanan yang dikonsumsi. Konsentrasi garam empedu berkisar antara 0,5% sampai 2% pada satu jam pertama proses pencernaaan dan akan menurun pada satu jam berikutnya (Kallasapathy dan Rybka, 1997).

Garam empedu merupakan faktor tekanan yang paling ekstrim selama BAL melewati usus halus. Garam empedu dapat bersifat senyawa aktif permukaan sehingga dapat menembus dan bereaksi dengan sisi membran sitoplasma sel mikroba yang berssifat lipofilik. Hal ini dapat mengakibatkan perubahan dan kerusakan struktur membran sel (Noh and Gilliland, 1993 dan Oh *et al.*, 2000).

Lactobacillus adalah mikroflora normal yang terdapat di dalam saluran pencernaan manusia dan mempunyai ketahanan yang bervariasi terhadap garam empedu. Ketahanan isolat klinis BAL terhadap garam empedu juga merupakan syarat penting untuk probiotik. Seperti halnya ketahanan terhadap asam, menurut Zavaglia *et al*., (1998) dan Jacobsen *et al*., (1999), semua mikroba yang berhasil hidup setelah ditumbuhkan dalam MRSA yang ditambah 0,3% oxgal, dinyatakan bersifat tahan terhadap garam empedu.

Konsentrasi garam empedu sebesar 0,3% merupakan konsentrasi yang kritikal, nilai yang cukup tinggi untuk menyeleksi isolat yang resisten terhadap garam empedu. Asam empedu disintesa dalam hati dari kolesterol, menghasilkan senyawa asam empedu primer. Asam empedu ini berkonjugasi dengan glisin atau taurin dan disekresikan ke dalam kantung empedu sebagai asam empedu terkonjugasi. Asam empedu di dalam kantung empedu dilepaskan ke dalam lumen *duodenum* dalam bentuk misel dengan asam lemak dan gliserol yang dihasilkan oleh pencernaan lipase pankreatik.

Laktobasili yang paling bersifat resisten terhadap garam empedu terdapat pada bagian atas usus halus (*jejunum*). Hal ini juga dilaporkan oleh Ray (1996) dan Drouault *et al.,* (1999), bahwa jumlah BAL yang terdapat di *jejunum* lebih rendah dibanding *ileum, caecum* dan *colon*. Hal ini disebabkan konsentrasi garam empedu pada bagian *jejunum* paling tinggi daripada *ileum*, karena lokasinya paling dekat bila garam empedu masuk ke dalam saluran usus. Menurut Smet *et al*., (1995), beberapa *Lactobacillus* mempunyai enzim *bile salt hydrolase* dengan aktivitas untuk menghidrolisa garam empedu.

Enzim *bile salt hydrolase* mampu mengubah kemampuan fisika-kimia yang dimiliki oleh garam empedu, sehingga tidak bersifat racun bagi BAL. Semakin tinggi konsentrasi garam empedu, maka jumlah sel *Lactobacillus* yang mati juga akan meningkat (Ngatirah *et al*., 2000; Kusumawati, 2002). Hal ini disebabkan karena peningkatan aktivitas enzim *β-galaktosidase* terhadap garam empedu, sehingga meningkatkan permeabilitas membran sel. Bila permeabilitas membran sel meningkat maka banyak materi intraseluler yang keluar dari dalam sel. Bila hal ini berlangsung terus-menerus akan menyebabkan lisis sel bakteri.

Studi secara *in vitro* terhadap ketahanan probiotik terhadap garam empedu dapat dibagi menjadi dua tipe yaitu studi terhadap kemampuan hidup dan pertumbuhannya. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Lankaputhra dan Shah (1995) dalam Bezkorovainy (2001), menggunakan beberapa galur *Lactobacillus* yang diberi perlakuan garam empedu dengan konsentrasi 0-1,5% selama kurang dari sama dengan 3 jam. Ketahanan hidup mikroba ini bervariasi untuk masing-masing galur dan tergantung konsentrasi garam empedu dan waktu kontaknya. Pengujian ketahanan mikroba probiotik terhadap garam empedu dapat dilakukan menggunakan *oxgall* sebagai model cairan empedu (Chou and Weimer, 1999).

Kusumawati (2002), melaporkan bahwa isolat BAL yang diisolasi dari makanan fermentasi asal Indonesia menunjukkan perbedaan ketahanan untuk tumbuh pada lingkungan yang mengandung garam empedu 1% dan 5%, dimana perbedaan tersebut bersifat beragam untuk masing-masing galur. Pada konsentrasi 1%, *Lactobacillus acidophilus* FNCC 116 memiliki selisih log yang terkecil yaitu 0,73 unit log/ml dan pada konsentrasi 5% *Lactobacillus plantarum* To22 memiliki selisih log yang terkecil yaitu 0,68 unit log/ml, dimana hasil tersebut tidak berbeda nyata dengan beberapa galur yang lain.

2.3. Prebiotik

Prebiotik adalah bahan pangan yang tidak tercerna oleh saluran pencernaan manusia yang mampu memacu pertumbuhan probiotik karena sifat spesifiknya yang hanya mampu difermentasi oleh probiotik (Gibson dan Fuller, 1998). Kemampuan ini berdasarkan pada kandungan SDF (*soluble dietary fiber*) seperti pada beberapa oligosakarida. Oligosakarida yang tidak tercerna seperti rafinosa, frukto-oligosakarida (FOS), galaktosillaktosa, isomaltooligosakarida atau transgalakto-siloligosakarida (TOS) yang telah diketahui dapat meningkatkan jumlah *bifidobacteria indigenous* dan bakteri asam laktat lainnya.

Prebiotik akan berfungsi jika tahan terhadap kondisi percernaan sebelum mencapai kolon dan usus besar. Penggunaan prebiotik ditujukan untuk menstimulir pertumbuhan bifidobakteria dan laktobasili, maka pengujian yang dilakukan secara langsung ditujukan terhadap kelompok bakteri tersebut. Oligosakarida dengan berat molekul rendah banyak menjadi perhatian dalam pengembangan senyawa prebiotik. Oligosakarida ini tidak dicerna dalam usus halus sehingga dapat mencapai kolon dan menjadi substrat bagi bakteri yang menguntungkan.

International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) menyebutkan tiga kriteria untuk prebiotik, yaitu:

(1) Resisten terhadap degradasi oleh asam lambung, enzim pencernaan atau hidrolisis

(2) Dapat difermentasi oleh mikroorganisme dalam saluran pencernaan

(3) Menstimulir secara selektif pertumbuhan dan aktivitas mikroorganisme yang menguntungkan dalam saluran pencernaan.

Menurut FAO (2007), prebiotik yang umumnya digunakan adalah inulin, fruktooligosakarida (FOS), galaktooligosakarida (GOS), kedelai oligosakarida, xilooligosakarida, pyrodextrins, isomaltooligosakarida dan laktulosa. Berdasarkan data terbaru FAO untuk prebiotik tahun 2007, terdapat berbagai senyawa prebiotik baru yang muncul, salah satunya adalah gula alkohol (polyol). Gula alkohol tidak dapat diserap secara sempurna oleh tubuh (Evans *et al.,* 1998; Fernandez *et al.,* 1991; Langkilde *et al.,* 1994) sehingga dapat digunakan untuk malaabsorbsi dan fermentasi oleh mikroflora usus (Macfarlane *et al.,* 2008; Rumessen and Hoyer, 1998; Saunders and Wiggins, 1981).

Oligosakarida yang telah banyak digunakan sebagai prebiotik dan memenuhi persyaratan di atas adalah GOS (Galaktooligosakarida, termasuk juga transGOS) dan FOS (Fruktooligosakarida, termasuk inulin). FOS atau inulin merupakan fruktan dengan derajat polimerisasi antara 2 sampai 70. FOS diperoleh antara lain dengan cara esktraksi bahan tanaman yang mengandung inulin dengan air panas atau dengan polimerisasi monomer fruktosa secara enzimatis, sedangkan GOS dibuat dengan transgalaktosilasi laktosa secara enzimatis.

Penelitian-penelitian untuk memperoleh prebiotik telah banyak dilakukan. Beberapa senyawa yang telah menunjukkan potensinya sebagai prebiotik antara lain polidekstrosa, oligosakarida kedelai, isomalto-

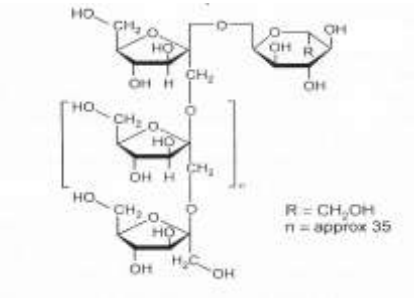
oligosakarida, xilo-oligosakaroda, palatinosa, gentio-oligosakarida dan gula alkohol seperti laktitol, sorbitol dan maltitol. Enzim yang dihasilkan bakteri di dalam kolon *misalnya ß-fructosidase* dan *ß-galaktosidase* menghidrolisis prebiotik. Hasil akhir dari fermentasi oleh bakteri menguntungkan adalah asam lemak rantai pendek, yaitu asam asetat, propionat dan butirat. Senyawa-senyawa ini menurunkan pH intraluminal dan secara langsung menghambat pertumbuhan mikroorganisme berbahaya, sementara menstimulir pertumbuhan bifidobakteria. Beberapa faktor mempengaruhi efektifitas oligosakarida pada kolon, antara lain jenis oligosakaridanya, dosis, durasi konsumsi, tempat di mana fermentasi terjadi dan komposisi awal mikroorganisme pada saluran pencernaan.

Hasil-hasil penelitian menunjukkan bahwa FOS (Fruktooligosakarida) dengan dosis 5-8 gram/hari atau GOS (Galakto Oligosakarida) memberikan efek prebiotik pada orang dewasa. Fortifikasi susu formula dengan campuran GOS dan FOS juga meningkatkan absorpsi kalsium. Pemberian makanan sapihan yang difortifikasi dengan oligofruktosa dengan dosis 4.5 g/hari selama 6 minggu menunjukkan peningkatan jumlah bifidobakteria pada feses dan menurunkan Clostridia serta melunakkan feses dan mengurangi resiko penyakit saluran pencernaan (Scholtens *et al.,* 2006).

2.3.1. Fruktooligosakarida

Fruktooligosakarida (FOS) merupakan jenis oligosakarida yang tidak dapat dicerna yang tersusun atas glukosil-(fruktosil)n-1-fruktosa (GFn) dan (fruktosil)m-1-fruktosa (Fm). FOS difermentasi secara selektif oleh sebagian besar BAL galur *bifidobacteria*. Konsumsi FOS 4-20 g/hari secara selektif mampu menstimulasi pertumbuhan *bifidobakteria* pada manusia (Salminen *et al.,* 2004). FOS dalam sistem pencernaan manusia tidak mengalami perubahan signifikan karena struktur spesifik (ikatan β(2-1))

yang dimilikinya tidak dapat dihidrolisis oleh enzim pencernaan manusia. Senyawa ini akan sampai ke dalam usus besar dan difermentasi oleh mikroba (Franck, 2000).



Gambar 2.2. Struktur FOS
Sumber : Roberfroid. 2008

Sama halnya dengan inulin, FOS sebagai hidrosilat inulin menunjukkan efek peningkatan proliferasi bifidobakteri pada kolon yang diikuti dengan penurunan jumlah bakteroid dan klostridia pada feses (Hidaka *et al.,* 1990; Gibson *et al.,* 1995 dalam Salminen *et al.,* 1998).

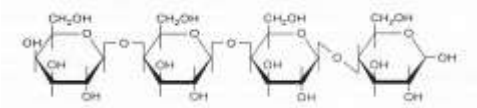
Penelitian Gmeiner *et al.,* (2000) menunjukkan bahwa penambahan prebiotik FOS dapat meningkatkan poliferasi sel *Lactobacillus acidophilus* secara *in vitro*.

2.3.2. Galaktooligosakarida

Galaktooligosakarida (GOS) merupakan salah satu oligosakarida yang mampu menstimulasi proliferasi bifidobakteri. GOS disintesis dari laktosa melalui transfer glikosil dari satu atau lebih unit D-galaktosil menjadi unit D-galaktosa dengan memanfaatkan enzim β-D-*galaktosidase* sebagai katalis (Mahoney,1998 dalam Villaluenga *et al.,* 2008).

Molekul GOS (sebagai contoh, Gal (β 1-4) Gal (β1-4) Glc) merupakan hasil sintesis yang memanfaatkan aktivitas enzim

β-*galaktosidase* dari laktosa yang dikenal dengan istilah reaksi *transgalaktosilasi*. β–*galaktosidase* adalah kelompok enzim hidrolitik dan telah banyak digunakan oleh industri produk olahan susu untuk menghidrolisis laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Beberapa penelitian lain yang telah dilakukan menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang positif antara pemberian GOS pada diet dengan peningkatan jumlah bifidobakteri dan laktobasili pada feses sukarelawan. Dosis yang dibutuhkan agar dapat memberikan efek yang signifikan adalah 10 g/hari (Ito *et al.,* 1990 dalam Salminen *et al.,* 1998).



Gambar 2.3. Struktur GOS
Sumber : Roberfroid, 2008

2.3.3. *Polyol* (Gula Alkohol)

Gula alkohol merupakan monosakarida atau disakarida yang memiliki banyak gugus hidroksil. Gula alkohol terdapat di alam, tapi lebih banyak produk hidrogenasi dari mono-disakarida. Gula jenis ini tidak mengandung grup karbonil pereduksi sehingga kurang reaktif (Prangdimurti *et al.,* 2007). Sebagian besar digunakan sebagai pemanis dan memiliki beberapa efek kesehatan (rendah kalori, rendah glisemik, rendah insulinemic, antikariogenik, dan prebiotik).

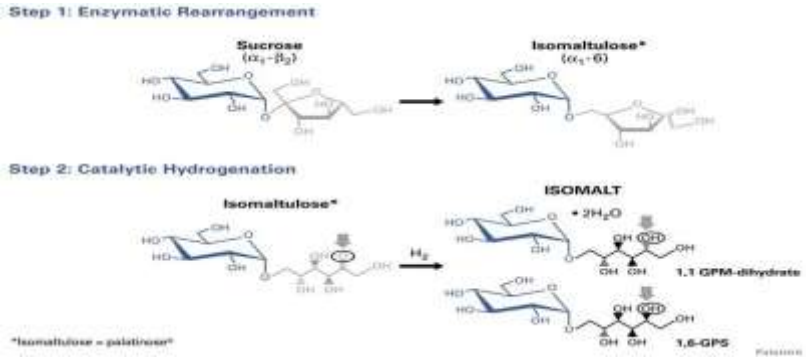
Gula alkohol diklasifikasikan berdasarkan jumlah unit sakarida yang terdapat dalam molekul. Sorbitol, mannitol dan xylitol adalah monosakarida turunan glukosa, mannose dan xylosa. Maltitol dan laktitol adalah disakarida turunan dari hidrogenasi maltose dan laktosa. Isomalt (juga dikenal sebagai palatinit) adalah campuran 1:1 α-D-glocopyranosyl-[1-6-]-D-sorbitol (GPS) dan α-D-glocopyranosyl-[1-6]-D-mannitol(GPM).

Penelitian Alexandra *et al.,* (2007), penggunaan laktitol sebagai prebiotik meningkatkan jumlah koloni bakteri *Bifidobacterium* (dari 8,5 ke 8,9 log10) dan *Lactobacillus* (dari 6,3 ke 7,0 log10) dan mengurangi jumlah bakteri patogen seperti *Clostridium* (dari 5,9 ke 4,7 log10), *Bacteroides* (dari 10,3 ke 8,8 log10) dan *coliforms* (dari 6,6 ke 5,6 log10). Suskovic *et al.,* (2001) Cummings *et al.,* (2001), dan Monedero *et al.,* (2010) menyatakan polyol dapat berfungsi sebagai prebiotik yang efektif untuk pertumbuhan bakteri asam laktat. Mozzi *et al*., (2001) menunjukkan bahwa gula alkohol dapat digunakan sebagai prebiotik.

2.3.3.1. Isomalt

Isomalt adalah salah satu jenis gula lakohol yang diturunkan dari sukrosa dan dapat digunakan untuk menggantikan gula. Seperti gula, isomat mempunyai banyak fungsi dalam suatu produk, memungkinkan pengembangan *confectionery* berkualitas dengan karakteristik nutrisi/fungsi yang spesifik misalnya produk *sugar free*, produk *reduced calorie*, dan tidak menyebabkan kerusakan gigi seperti yang dikemukakan oleh Sentko dan Ettle yang disitasi oleh Mitchell (2006).

Isomalt adalah campuran dari polyol 1-*O*-α-D-*glucopyranosyl*-D-*mannitol* dan 6-O-α-D-*glucopyranosyl*-D-*sorbitol*. Ini adalah satu-satunya pengganti gula yang berasal eksklusif dari gula bit. Isomalt diproduksi dari dua tahapan proses, yang pertama adalah pengaturan ulang sukrosa secara enzimatis (2-*O*-α-D-*glucopyranosil*-D-*fructofuranose*) ke isomaltulosa dan tahap yang kedua berupa hidrogenasi katalitik isomaltulosa menjadi isomalt (Gambar 2.3.). Menurut Sentko dan Ettle dalam Mitchell (2006), tahap pertama, rantai α-(1-2) glikosidik antara molekul glukosa dan fruktosa dikonversi kembali dengan biokatalisator pada rantau α-(1-6). Hasilnya adalah isomaltulosa yang masih merupakan kombinasi glukosa-fruktosa.



Gambar 2.3. Tahapan Proses Pembuatan Isomalt
Sumber: Gee *et al.* (1991)

Rantai α-(1-6) lebih stabil deibandingkan dengan rantai α-(1-2) pada sukrosa. Tahap kedua, hidrogen ditambahkan pada bagian fruktosa dalam isomaltulosa. Hasilnya adalah kombinasi 2 disakarida alkohol, 6-O-α-D-*glucopyranosyl*-D-*sorbitol* (*1,6-GPS*) dan 1-*O*-α-D-*glucopyranosyl*-D-*mannitol dehydrate* (*1,1-GPM*). Nama umum kombinasi disakarida alkohol tersebut adalah isomalt. Isomalt tersedia pada berbagai varians dan tipe yang berbeda tergantung pada aplikasinya yaitu isomalt ST, isomalt GS, isomalt DC, dan isomalt LM.

Menurut Nabors dan Gelardi (1991), isomalt memiliki karakteristik berasa manis tanpa adanya *aftertaste*, dapat bertindak sebagai *bulking agent*, memiliki karakteristik serupa sukrosa, bersifat optis aktif, sangat stabik terhadap hidrolisis enzimatik dan kimia dan tidak mudah mengalami fermentasi *yeast* dan mikroorganisme yang lain. Menurut Strater dan Irwin dalam Nabors dan Gelardi (1991), GPS dan GPM mempunyai sifat yang sangat stabil. Jika substansi kristal tersebut dipanaskan diatas titik leleh atau larutan tersebut dipanaskan diatas titik didih, tidak ada perubahan struktur molekul dari gula alkohol tersebut. GPS dan GPM tidak bereaksi dengan bahan-bahan lain seperti asam amino yang dapat menyebabkan terjadinya

reaksi Maillard. Menurut Sentko dan Ettle dalam Mitchell (2006), isomalt tidak mengalami hidrolisa asam dan enzim karena rantai glikosidik pada dua isomer isomalt berada pada posisi 1,1 dan 1,6 memiliki energi peruraian yang rendah dibandingkan rantai hidroksil glikosida antara dua monosakarida yang ditemukan dalam sukrosa. Perbedaan sifat fisikokimia sukrosa dan isomalt dapat dilihat pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3. Sifat Fisikokimia Sukrosa dan Isomalt

Sifat Fisikokimia	**Sukrosa**	**Isomalt**
Berat molekul	342	355
Kemanisan	1,0	0,5
Panas larutan (kal/g suhu 25^0C)	-4,3	-9,4
Kelarutan suhu 20^0C (% DS)	67	25
Kelarutan suhu 50^0C (% DS)	72	45
Titik leleh (^{0}C)	184	145-150
Higroskopisitas/ERH (*Equilibrium Ratio Humidity*) 20^0C kondisi buruk	84	88

Sumber: Zumbe dkk (2001)

Menurut Sentko dan Ettle dalam Mitchell (2006), kelarutan isomalt pada suhu 20^0C - 80^0C cenderung lebih rendah dibandingkan kelarutan sukrosa sedangkan pada suhu 100^0C kelarutan isomalt sama dengan sukrosa. Isomalt dicirikan rendah energi, non kariogenik (Gehring&Karle, 1981) dan glikemik rendah (Petzoldt *et al.,* 1982; Gee *et al.,* 1991; Hutter *et al.,*1993). Bagian isomalt yang tidak tercerna dan tidak terserap akan mencapai usus besar dan difermentasi oleh mikroflora usus (Bar, 1990). Berdasarkan berbagai penelitian pada hewan dan manusia, Livesey (2003) menyatakan bahwa isomalt yang tidak tercerna dan digunakan untuk fermentasi mikroflora usus mendekati 90%. Klingeberg *et al.* (2004) menyatakan bahwa isomalt dapat didegradasi oleh *bifidobacteria* dan digunakan untuk pertumbuhan dan multiplikasi serta dapat menstimulasi *lactobacteria*, terutama *bifidobacteria* dalam saluran pencernaan. Gostner *et*

al. (2006) melakukan eksperimen *in vitro* dengan membandingkan penggunaan sukrosa dan isomalt yang berhubungan dengan banyaknya strain *bifidobacteria* yang hidup dalam usus manusia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa proporsi jumlah sel *bifidobacteria* dengan prebiotik isomalt lebih besar 47% daripada dengan sukrosa.

2.4. Sinbiotik

Sinbiotik adalah kombinasi probiotik dan prebiotik dengan komposisi seimbang, yang bersinergi untuk terapi nutrisi dan menjaga kesehatan pencernaan. Hasil penelitian Maduningsih (2008), menunjukkan bahwa berdasarkan jumlah *L. acidophilus* dan *B. longum* di dalam kolon dan kemampuan menghambat pertumbuhan *E. coli*, mengkonsumsi yogurt sinbiotik secara nyata mempengaruhi populasi bakteri probiotik *L. acidophilus* dan *B. longum* di dalam saluran pencernaan.

2.5. Imobilisasi

Imobilisasi adalah teknik memerangkap (*entrapment*) suatu bahan atau inti dalam sebuah matriks. Teknik imobilisasi atau *entrapment* tersebut kemudian berkembang menjadi enkapsulasi sel (mikroenkapsulasi). Teknik enkapsulasi memiliki kemampuan untuk menstabilkan sel, serta meningkatkan viabilitas selama produksi, penyimpanan, dan penanganan. Penelitian yang dilakukan oleh Kim *et al.,* (1996) menunjukkan bahwa lingkungan yang telah diimmobilisasi tersebut dapat melindungi sel *Lactobacillus* dan *Bifidobacteria* dari hidrasi dan lyophilisasi.

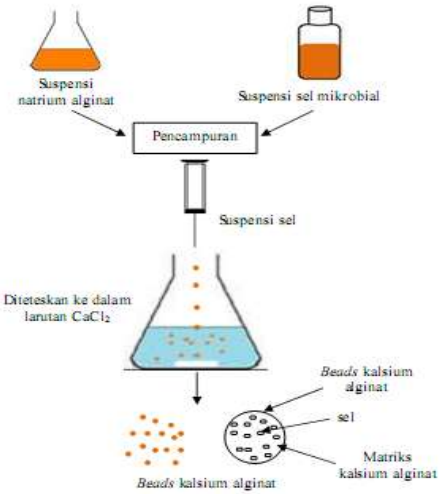
Imobilisasi membantu memisahkan material inti dengan lingkungannya hingga material tersebut terlepas (*release*) ke lingkungan. Material inti yang dilindungi disebut *core* dan struktur yang dibentuk oleh bahan pelindung yang menyelimuti inti disebut sebagai matriks, dinding, membran, atau kapsul (Kailasapathy, 2002, Krasaekoopt *et al.*, 2003). Enkapsulasi probiotik atau teknik imobilisasi sel telah banyak dilakukan

untuk meningkatkan ketahanan atau viabilitas sel probiotik selama proses pembuatan produk dan penyimpanan (Homayouni *et al.*, 2008a, Capela *et al.*, 2006; Krasaekoopt *et al.*, 2006). Teknik imobilisasi dapat meningkatkan ketahanan selama didalam jalur pencernaan (pH rendah dan cairan empedu) (Sultana *et al.*, 2000, Picot dan Lacroix 2004, Mandal *et al.*, 2006, Castilla *et al.*, 2010).

2.5.1. Metode Imobilisasi

Metode imobilisasi untuk penjeratan bakteri probiotik dapat dibagi menjadi dua bagian, yaitu imobilisasi atau penjeratan probiotik di dalam larutan bahan penjerat dan pengeringan larutan bahan penjerat untuk mendapatkan bubuk atau granula sel (Mortazavian *et al.*, 2007). Tahapan penjeratan probiotik dapat dilakukan dengan dua teknik, yaitu ekstrusi dan emulsi (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

2.5.1.1. Teknik Ekstruksi



Gambar 2.5. Diagram Alir Enkapsulasi Bakteri dengan Teknik Ekstrusi
Sumber : Krasaekoopt *et al*. (2003)

Teknik ekstrusi dilakukan dengan cara menambahkan mikroorganisme probiotik ke dalam larutan hidrokoloid natrium alginat, kemudian diteteskan ke dalam larutan pengeras ($CaCl_2$) menggunakan *syringe* sehingga terbentuk *beads*. Ukuran dan bentuk *beads* yang dihasilkan bergantung pada diameter jarum dan jarak tetes jarum dengan larutan $CaCl_2$ (Krasaekoopt *et al.* 2003)

2.5.2. Aplikasi dan Keuntungan dari Mikroenkapsulasi Probiotik

Aplikasi dan keuntungan dari enkapsulasi probiotik dapat dilihat dari berbagai sudut pandang yang meliputi produksi kultur starter, produksi produk pangan dari aspek viabilitas sel bakteri dalam produk, sifat sensoris, imobilisasi sel bakteri dalam produk, viabilitas sel probiotik dalam saluran pencernaan, dan penggunaan alat fermentasi.

2.5.2.1. Produksi Kultur Starter

Mikroenkapsulasi dapat digunakan secara efisien untuk persiapan bakteri kultur starter dengan viabilitas yang lebih tinggi. Picot dan Lacroix (2003), mengenkapsulasi sel-sel starter dengan menggunakan whey proteinnya fragmen dalam media lemak susu. Dengan menerapkan metode ini, produksi bubuk kultur starter dengan kerusakan panas menjadi minimal selama *spray drying* tercapai.

2.5.2.2. Ketahanan Probiotik Dalam Saluran Pencernaan

Mikroenkapsulasi dapat meningkatkan efisiensi ketahanan probiotik melalui kondisi asam, enzimatik, dan garam empedu dalam saluran pencernaan. Percobaan dari Lee and Heo (2000), menunjukkan bahwa ketahanan *B. longum* yang terenkapsulasi dengan kalsium alginat dalam kondisi asam lambung (pH 1,5) meningkat. Percobaan menunjukkan bahwa ion kalsium klorida yang melapisi kapsul natrium alginat meningkatkan ketahanan *L. acidophilus* dari kondisi asam lambung (pH 2) dan garam empedu (1%) (Chandramouli *et al*., 2004). Kondisi simulasi lambung (pH

1,5) menyebabkan penurunan jumlah sel bakteri *B. infantice* dari $1{,}23 \times 10^9$ hingga <10 cfu/ ml setelah 30 menit). Namun, ketahanan sel bakteri setelah dijerat dengan metode mikroenkapsulasi pada kondisi yang sama, penurunan jumlah sel bakteri tidak melebihi 0,67% (Sun dan Griffiths, 2000).

2.5.3. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Efektivitas Mikroenkapsulasi Probiotik

Parameter-parameter yang digunakan untuk mengevaluasi efektivitas proses enkapsulasi bakteri probiotik, seperti ketahanan sel bakteri dalam kondisi lingkungan asam lambung, kemampuan sel bakteri terlepas dalam saluran pencernaan dan kemampuan pemulihan sel, serta waktu pengerasan (waktu yang dibutuhkan untuk membentuk formasi kapsul). Faktor-faktor yang mempengaruhi parameter-parameter tersebut adalah karakteristik kapsul, lapisan pelindung dari kapsul, kosentrasi larutan pembuatan kapsul, diameter manik-manik, kondisi lingkungan, jumlah bakteri dalam kapsul, modifikasi material dalam kapsul, kondisi proses pengolahan, dan faktor lain-lain.

2.5.3.1. Karakteristik Kapsul

Penggunaan pati resisten sebagai bahan kapsul membuat manik-manik tahan terhadap pencernaan enzimatik (Dimantov *et al*., 2003). Tujuan yang diharapkan adalah sel probiotik dapat mencapai saluran pencernaan. Apabila manik-manik diharapkan mencapai usus besar, adalah lebih baik kapsul penjerat toleran terhadap enzim pankreas dan pH usus kecil (tapi tidak dalam usus besar). Dalam hal ini, ketika manik-manik terbuka di usus kecil, pelepasan sel bakteri terjerat diharapkan terjadi pada usus besar. Umumnya, semua kapsul harus tahan terhadap kondisi asam lambung (Sun dan Griffiths, 2000; Mortazavian *et al.*, 2006).

2.5.3.2. Lapisan Pelindung dari Kapsul

Pelapisan kapsul adalah cara yang efisien untuk meningkatkan karakteristik fisikokimia kapsul. Pelapisan kalsium klorida pada kapsul alginat, terutama pada alginat dengan konsentrasi tinggi membuat manik-manik yang kuat dengan stratifikasi yang baik (Chandramouli *et al*., 2004).

2.5.3.3. Konsentrasi Larutan Pembuatan Kapsul dan Diameter Manik-manik

Konsentrasi dari larutan pembuatan kapsul solusi dan diameter manik-manik merupakan faktor penting dalam efektivitas enkapsulasi. Sejalan dengan meningkatnya diameter manik-manik, efek perlindungan manik-manik melawan kondisi lingkungan yang buruk meningkat (Truelstrup-Hansen *et al*., 2002). Hal ini telah terbukti baik dalam produk dan kondisi tubuh (Lee dan Heo, 2000; Chandramouli *et al*, 2004;. Sheu dan Marshall, 1993). Sultana *et al*., (2000) menemukan bahwa kapsul alginat dengan diameter kisaran 0,5-1.0 mm meningkatkan viabilitas *Bifidobacteria* dalam yogurt secara signifikan dengan pH normal selama penyimpanan dalam suhu 3-7^{0}C.

Peningkatan diameter manik-manik dapat mempengaruhi sifat sensoris produk. Semakin meningkatnya diameter kapsul menyebabkan penurunan daya cerna oleh enzim pankreas. Peningkatan diameter manik-manik harus diperhatikan terutama ketika pati resisten digunakan untuk formasi kapsul formasi karena pati resistan merupakan komponen yang tahan terhadap enzim pankreas (Dimantov *et al*., 2003).

Penelitian yang relevan dengan konsentrasi pembuatan kapsul mengungkapkan bahwa dengan meningkatkan konsentrasi larutan alginat dari 0,75% menjadi 1,8% memiliki efek nyata pada ketahanan *Lactobacillus acidophilus* dalam kondisi asam lambung simulasi. Namun, konsentrasi

larutan alginat lebih besar 2% tidak memungkinkan untuk menghasilkan bola dan manik-manik homogen karena peningkatan viskositas larutan dan penurunan difusivitas massa (Chandramouli *et al*., 2004).

2.5.3.4. Kondisi Lingkungan

Kondisi lingkungan merupakan faktor yang mempengaruhi efektivitas enkapsulasi bakteri probiotik. Kapsul lebih toleransi pada kondisi lingkungan dengan keasaman rendah seperti *yoghurt* dibandingkan kondisi lingkungan dengan keasaman tinggi, seperti asam lambung (Sultana *et al*., 2000; Truelstrup-Hansen *et al*., 2002). Cui *et al.,* (2000), menyatakan bahwa kapsul alginat dengan diameter rata-rata 100 µm efektif untuk melindungi sel bakteri dalam produk fermentasi tetapi tidak pada lingkungan asam lambung.

2.5.3.5. Jumlah Sel Bakteri Terjerat dalam Kapsul

Efisiensi kuantitatif enkapsulasi ditentukan dari konsentrasi sel mikroba yang terjerat di setiap manik. Hal yang harus diperhatikan adalah sel bakteri yang terjerat dalam satu manik lebih dari batas khusus menyebabkan pelunakan struktur kapsul dan mempengaruhi *moutfell* karena adanya peningkatan diameter manik-manik.

2.5.3.6. Kondisi Proses Pembuatan Manik-Manik

Kondisi faktor proses selama proses mikroenkapsulasi seperti *freezing* (*cryogenic freezing* dan *freeze freezing*), *spray drying*, *micronization*, dan kondisi penyimpanan diatur untuk menghindari kerusakan manik-manik. Faktor seperti proses pencampuran selama mikroenkapsulasi perlu diperhatikan proporsi pencampuran dan tekanan mekanis yang digunakan untuk mencampur karena dapat menyebabkan keretakan pada manik-manik.

2.6. Bahan Pengkapsul

Enkapsulasi probiotik biasa dilakukan dalam sistem polimer yang bersifat lembut dan tidak beracun (*food grade*) (Anal dan Singh, 2007). Polimer yang biasa digunakan dalam proses enkapsulasi bakteri probiotik adalah polisakarida yang diekstrak dari rumput laut (karagenan dan alginat), tumbuhan (pati dan turunannya, gum arab), atau bakteri (gellan dan xanthan), dan protein hewan (kasein, whey, skim, gelatin) (Rokka dan Rantamäki, 2010).

Biopolimer yang paling sering digunakan untuk enkapsulasi bakteri probiotik adalah alginat. Keuntungan penggunaan alginat sebagai bahan pengkapsul adalah tidak toksik, membentuk matriks secara lembut dengan CaCl2 yang dapat menjerap material sensitif seperti sel bakteri probiotik, serta sel dapat release (Kailasapthy, 2002).

2.6.1. Alginat

Alginat adalah heteropolisakarida linier yang diekstrak dari berbagai jenis ganggang, dengan dua unit struktural yang terdiri dari D-manuronat dan L-guluronat. Kalsium alginat telah banyak digunakan untuk enkapsulasi bakteri probiotik, terutama dalam kisaran konsentrasi 0,5-4% (Sheu dan Marshall, 1991; Sheu dan Marshall, 1993; Truelstrup-Hansen *et al*., 2002; Kim *et al.*, 1996;. Jankowski *et al*., 1997;. Khalil dan Mansour, 1998; Kebary *et al.*, 1998; Lee dan Heo,2000; Shah dan Rarula, 2000; Sultana *et al.*, 2000.; Truelstrup-Hansen, 2002; Krasaekoopt *et al*., 2004).

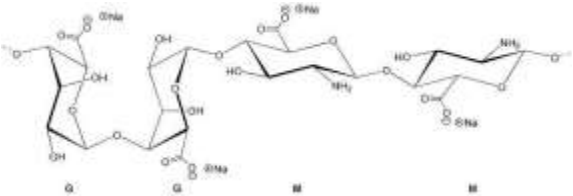
Alginat tergolong salah satu contoh hidrokoloid alami. Alginat merupakan kopolimer rantai lurus dari residu asam β-(1-4)-D-manuronat (M) dan asam α-(1-4)-L-guloronat (G) yang membentuk homopolimer M atau G dan blok heteropolimer MG (Cardenas *et al*., 2003). Struktur molekul alginat dapat dilihat pada Gambar 2.6. Alginat telah digunakan secara luas untuk enkapsulasi probiotik skala laboratorium (Rokka dan

Rantamaki, 2010). Garam alginat larut dalam air, tetapi mengendap dan membentuk gel pada pH lebih rendah dari tiga. Alginat dapat membentuk gel (formasi *egg-box*), film, manik (*beads*), pelet, mikropartikel, dan nano partikel (Sarmento *et al*., 2007).

2.6.1.1. Na-Alginat

Viskositas Na-alginat dikelompokkan kedalam lima kelompok, yaitu ekstra tinggi 100 cps, tinggi 500 cps, medium 300 cps, ekstra rendah 20-30 cps. Pengukuran dilakukan terhadap 1% larutan alginat pada suhu 20^{o}C. Menurut Khazaeli *et al.*, (2008), faktor-faktor fisika yang mempengaruhi sifat-sifat larutan alginat adalah suhu, konsentrasi, dan ukuran polimer. Karakeristik fisik garam alginat yaitu berupa tepung atau serat, berwarna putih sampai dengan kekuningan, hampir tidak berbau, dan berasa. Sedangkan faktor-faktor kimia yang berpengaruh adalah pH dan adanya pengikat logam, serta garam monovalen dan kation polivalen.

Asam alginat tidak larut dalam air dingin, namun sedikit larut dalam air panas, larut dalam alkohol, eter dan gliserol. Garam-garam (K, Na, NH_4^+, dn Ca^{2+}) dan propilen glikol alginat larut dalam air dingin maupun panas, tapi garam kalsiumnya tidak dapat larut dalam kondisi pH > 7. Larutan garam alginat yang larut dalam air akan membentuk gel pada larutan asam atau karena adanya ion kalsium dan kation logam polivalen lainnya (Khazaeli *et al.*, 2008). Pada konsentrasi tertentu larutan alginat akan menjadi gel bila asam atau logam-logam polivalen ditambahkan pada natrium, kalium atau amonium alginat. Adapun struktur kimia Na-alginat dapat dilihat pada Gambar 2.6.

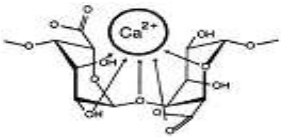


Gambar 2.6. Struktur Molekul Natrium Alginat
Sumber : Nussinovitch (1997)

2.6.1.1.1. Kalsium Alginat

Kemampuan alginat membentuk gel secara reaksi dengan garam kalsium merupakan sifat yang penting. Biasanya sebagai sumber kalsium adalah kalsium karbonat, kalsium sulfat, dan kalsium klorida. Larutan natrium alginat 1-12 % akan menjadi keras seperti gel oleh penambahan kalsium atau ion-ion bervalensi 2 (Ba^{2+}, Pb^{2+}, dan Sr^{2+}). Semakin tinggi konsentrasi alginat dan derajat polimerisasinya, semakin kuat gel yang terbentuk. Kekuatan gel dapat dikontrol atau diatur sehingga dapat dihasilkan gel yang lunak atau lembut, yang elastis, yang keras ataupun yang kaku (Khazaeli *et al.*, 2008).

Penambahan kation divalen (misalnya Ca^{2+}) yang berfungsi sebagai penaut silang antar molekul alginat, akan menyebabkan terjadinya gelatinisasi yang akan membentuk gel matriks kalsium alginat. Kapsul kalsium alginat sangat berpori yang memungkinkan air dapat berdifusi keluar masuk matriks (Rokka dan Rantamäki, 2010). Ikatan yang terbentuk antara Ca^{2+} dengan alginat dapat dilihat pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7. Ikatan antara Ca^{2+} dengan Alginat
Sumber: blog.khymos.org dalam Ari *et al.*, (2010)

Penambahan kation bivalen (misalnya Ca^{2+}) akan menyebabkan terjadinya peningkatan viskositas, pembentukan gel atau pengendapan. Kation bivalen tersebut akan berkompetisi dengan gugus hidroksil dalam proses hidrasi (pengikatan air) yang akan menyebabkan penurunan kelarutan hidrokoloid dan membentuk struktur gel (King, 1982 dalam Ari *et al.,* 2010). Pembentukan gel alginat terjadi karena adanya pertukaran ion Na^{+} dengan kation kalsium yang akan mengikat molekul-molekul alginat yang panjang dan membentuk gel yang tidak larut dalam air. Kemampuan dari ion-ion logam bivalen berikatan dengan alginat tergantung pada jumlah relatif dari unit asam D-manuronat dan L-guluronat dalam alginat. Kapsul kalsium alginat sangat berpori yang memungkinkan air dapat berdifusi keluar masuk matriks (Rokka dan Rantamaki, 2010).

Butiran gel Ca-alginat tidak jenuh adalah gel alginat yang masih mengandung natrium alginat, sedangkan gel alginat jenuh adalah gel alginat yang tidak lagi mengandung natrium alginat (semua natrium alginat bereaksi dengan kalsium klorida). Seperti hidrokoloid lainnya, alginat mengandung air sekitar 85% dan rentan terhadap distorsi yang disebabkan oleh pengembangan yang terkait dengan imbibisi (penyerapan air) atau pengerutan yang terkait dengan sineresis (penguapan air).

Matriks gel alginat mengelilingi sel-sel bakteri dengan diameter 1-3 nm dan ukuran pori-pori yang terbentuk pada permukaan manik-manik alginat tidak melebihi 7 nm (Klien *et al*., 1983). Kapsul alginat memiliki beberapa keuntungan sebagai berikut.

1. Mudah membentuk matriks gel sekitar sel bakteri
2. Kapsul alginat tidak beracun bagi tubuh
3. Murah
4. Kondisi proses persiapan Na-alginat yang sederhana ringan memungkinkan produksi manik-manik berisi sel bakteri tidak

mengalami perubahan sifat biologis tetapi memberi sel bakteri perlindungan dengan matriks hidrogel yang lembut dari faktor lingkungan.

5. Penanganan yang sederhana dan mudah.
6. Kapsul alginat dapat mencapai usus dan melepaskan sel bakteri yang terjerat. (Klien *et al.*, 1983; Tanaka *et al.*, 1984; Martinsen *et al.*, 1989; Prevost dan Divies, 1992; Dimantov *et al.*, 2003; Chandramouli *et al.*, 2004; Gouin, 2004).

Manik-manik alginat ini pun memiliki kelemahan. Beberapa kelemahan manik-manik alginat adalah sebagai berikut.

1. Kapsul alginat yang dapat pecah serta kehilangan stabilitas mekanisnya dalam kondisi lingkungan yang asam (Eikmeier dan Rehm, 1987; Roy *et al.*, 1987; Audet *et al.*, 1988; Ellenton, 1998).
2. Gel alginat terbentuk dengan adanya ion kalsium, integritas gel menurun ketika ion monovalen atau agen pengkelat seperti fosfat, laktat dan sitrat menyerap ion kalsium (Roy *et al.*, 1987; Smidsrod dan Skjak-Braek, 1990; Ellenton, 1998).
3. Kesulitan dalam aplikasi skala industri karena membutuhkan biaya tinggi dan sulit dibuat dalam skala besar karena struktur mudah rentak dan membentuk pori-pori pada permukaan kapsul (Gouin, 2004).
4. Laju difusi cairan di sekitar kapsul yang tinggi sehingga mengurangi kemampuan kapsul untuk melindungi dari kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan (Gouin, 2004).

Kelemahan dari penggunaan alginat ini dapat diatasi dengan pencampuran alginat dengan senyawa polimer lainnya, lapisan senyawa lain pada kapsul dan modifikasi struktural alginat dengan menggunakan berbagai aditif (Krasaekoopt *et al*., 2003). Penggunaan alginat sebagai bahan enkapsulasi sering dikombinasikan dengan bahan lainnya,

diantaranya dengan penambahan prebiotik (Sultana *et al*., 2000; Homayouni *et al*., 2008), terigu dan polard (Widodo *et al*., 2003) sebagai bahan pengisi (*filler*), *chitosan* sebagai *coating* (Krasaekoopt *et al*., 2004), dan pektin untuk membentuk kompleks alginat-pektin yang lebih kuat (Castilla *et al*., 2010). Penelitian Ki Yong Lee and Tae-Ryeon Heo (1999), menyatakan bahwa imobilisasi sel menggunakan Ca-Alginat dapat membantu mempertahankan atau meningkatkan ketahanan sel dari *Bifidobacterium longum* pada simulasi kondisi asam dan garam empedu saluran pencernaan.

2.6.1.2. Alginat dan Kombinasinya

2.6.1.2.1. Alginat-Pati

Perpaduan Na-alginat dengan pati menunjukkan bahwa efektivitas enkapsulasi sel bakteri terutama bakteri asam laktat meningkat dengan metode ini (Jankowski *et al.*, 1997; Sultana *et al.*, 2000; Sun dan Griffiths, 2000; Truelstrup-Hansen *et al.*, 2002; Krasaekoopt *et al.*, 2003). Salah satu perpaduan yang dapat meningkatkan kemampuan matriks gel alginat adalah mencampurkan alginat dengan pati. Campuran alginat-pati memberikan keuntungan dari perlindungan bagi sel bakteri dan difusi mikronutrien dan metabolit melalui kapsul, baik di dalam maupun di luar sel bakteri yang terperangkap sehingga manik-manik akan berisi sel-sel bakteri yang aktif secara metabolik (Jankowski *et al*., 1997). Kalsium alginat dicampur dengan pati *Hi-maite* pati menghasilkan kapsul dengan viabilitas sel tinggi karena struktur kapsul terintegrasi baik dan adanya efek prebiotik dari senyawa pati (Sultana *et al*., 2000).

Pati telah digunakan sebagai bahan untuk lapisan kapsul alginat. Pati jagung tinggi amilosa (HACS) dapat diterapkan untuk meningkatkan fungsi kapsul atau formasi *shell* (Dimantov *et al*., 2003). Pati resisten (RS) tidak terdegradasi oleh amilase pankreas dan memasuki usus dalam bentuk tidak tercerna. Spesifikasi ini memberikan karakteristik manik-manik yang baik

dengan melepaskan sel-sel bakteri baik di usus besar dan memiliki fungsi sebagai prebiotik karena pati resisten ini dapat digunakan oleh bakteri probiotik dalam usus (Kritchevsky, 1995; Muir *et al.*, 1995; Phillips *et al.*, 1995; Silvester *et al.*,1995; Haralampu, 2000; Thompson, 2000). Fermentasi pati oleh mikroorganisme seperti *Bifidobacteria, Lactobacilli, Streptococci* dan *Entrobacteriaceae* mampu melawan pH usus yang rendah melalui pembentukan asam-asam lemak rantai pendek (Macfarlane dan Gummings, 1991; Kleessen *et al.*, 1997; Le Blay *et al*, 1999).

2.6.1.2.2. Alginat-Kitosan

Kitosan merupakan polisakarida linear dengan muatan negatif yang timbul dari gugus amina yang diperoleh dari deasetilasi kitin. Kitosan larut pada pH <6 dan seperti alginat, membuat struktur gel dengan gelasi ionotropik. Chitosan dapat berpolimerisasi dengan membentuk ikatan silang dengan adanya anion dan polyanion (Klien *et al.,* 1983). Pembentukan lapisan di sekitar kapsul alginat telah diverifikasi untuk jauh meningkatkan karakteristik fisikokimia kapsul.

Penelitian mikroenkapsulasi dengan alginat-kitosan yang telah dilakukan menunjukkan bahwa pembentukan lapisan semipermeabel dari polimer kitosan (sebagai senyawa polikationik) di sekitar kapsul alginat (yang memiliki ion negatif), manik-manik dengan peningkatan stabilitas fisik dan kimia dapat diproduksi. Struktur alginat-kitosan dapat mencegah terjadinya pengkelatan oleh ion kalsium. manik-manik alginat-kitosan yang terbentuk memiliki struktur yang lebih padat dan lebih kuat dibandingkan dengan manik-manik kalsium alginat saja, sehingga menghidari pecahnya manik-manik dan pelepasan sel dari manik-manik (Smidsrod dan Skjak-Braek, 1990, Zhou *et al*, 1998; Krasaekoopt *et al*, 2003).

Kitosan dengan berat molekul rendah dapat berdifusi lebih cepat ke dalam matriks alginat dibandingkan dengan polimer dengan berat

molekul besar, sehingga dapat membentuk kapsul dengan kepadatan dan kekuatan yang lebih tinggi. Pelapisan kapsul alginat dengan kitosan dilakukan dengan meneteskan kultur cair bakteri yang telah berada dalam larutan Na-alginat ke dalam campuran kitosan-kalsium klorida. Kehadiran ion kalsium diperlukan untuk melapisi lapisan yang terbentuk (Krasaekoopt *et al.,* 2003).

2.6.1.2.3. Alginat-Asam Poliamino

Asam Poliamino seperti poli-L-lisin (PLL) umumnya berasal dari polimer poli-kationik dapat dilapiskan pada kapsul Na-alginat. Polimer ini dapat membentuk kompleks yang kuat dengan matriks Na-alginat sehingga meningkatkan stabilitas fisik dan kimia kapsul (Smidsrod dan Skjak-Braek, 1990; Champagne *et al.,* 1992a, Larisch *et al.,* 1994). Ikatan silang pada matriks alginat yang diproduksi pada pH rendah diterapkan untuk enkapsulasi probiotik enkapsulasi. Matriks alginat-asam poliamino memiliki kepadatan dan kekuatan matriks yang lebih tinggi dibandingkan dengan matriks alginat saja. Matriks alginat-asam poliamino tetap berhasil melepaskan sel bakteri ke dalamusus (Marx, 1989).

2.7 Perubahan selama Penyimpanan

Berdasarkan penelitian Erma, U. (2002), penyimpanan selama 28 hari berpengaruh terhadap jumlah sel yang diimobil. Secara umum, semakin lama penyimpanan maka jumlah sel yang diimo bil juga semakin menurun. Penurunan jumlah sel yang terimobil disebabkan karena gel dari *beads* yang terbentuk dipengaruhi oleh adanya ion kalsium yang kekokohannya akan menurun apabila berada pada kondisi dimana terdapat agen pengkelat atau ion monovalen yang mengabsorb ion kalsium seperti asetat, laktat dan fosfat (Roy *et al*., 1987; Smidsrod and Skjak-Braek,1990; Ellenton, 1998).

Selama penyimpanan terjadi pemutusan Ca-alginat, sehingga matriks sel imobil menjadi longgar dan sari buah nanas yang pHnya menurun dapat

masuk dan kontak dengan sel imobil. Masuknya sari buah nanas tersebut memungkinkan sel terimobil beradaptasi dengan pH rendah, hal ini tampak dari ketahanan sel imobil yang meningkat seiring dengan lama waktu penyimpanan (Dewi, 2005).

Matriks Ca-alginat tidak stabil apabila disimpan dalam waktu lama dengan pH dibawah 4, karena akan terjadi pengendapan asam alginat dan hidrolisa pada polimer alginat (Mc.Neely and Pettit, 1973). Hal tersebut mengakibatkan efek perlindungan Ca-alginat berkurang dan sel terimobil akan kontak dengan sari buah nanas yang memiliki pH rendah (3,34-3,72).

BAB III
HIPOTESA

1. Ada pengaruh penambahan isomalt terhadap ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung dan garam empedu.
2. Ada pengaruh lama penyimpanan terhadap ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung dan garam empedu.
3. Ada interaksi penambahan isomalt dan lama penyimpanan terhadap ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung dan garam empedu.

BAB IV
BAHAN DAN METODE PENELITIAN

4.1. Bahan untuk Proses

Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan sel imobil adalah kultur bakteri *L. acidophilus* FNCC 0051 diperoleh dari Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, Na-alginat murni (merk "Zigma A2033-100G"), larutan $CaCl_2$ 1%, isomalt, larutan NaCl 0,85% (merk "Riedel-de Haën 31434"), *oxgall* (merk "Pronadisa Cat. 1612.00"), larutan HCl 37% (merk "MERCK 1.00317") diperoleh dari Laboratorium Analisa Pangan, Fakultas Teknologi Pangan, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, larutan Na-sitrat 0,1 M teknis dan susu UHT (*Ultra High Temperature*) "Ultra Milk" yang dibeli di supermarket "Alfaexpress".

4.1.2. Bahan untuk Analisa

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah MRS *Broth* (merk "Pronadisa Cat. 1215.00"), Agar "*Bacto Agar*"(merk "MERCK 214010"), Pepton *from meat* (merk "Merck 1.07224"). Spesifikasi MRS *Broth*, Agar "*Bacto Agar*", dan Pepton *from meat* terdapat pada Lampiran 1. Bahan pembantu yang digunakan untuk analisa adalah akuades, alkohol 96%, larutan Crystal Violet modifikasi Hucker, larutan iodin, larutan alkohol aseton, larutan Safranin Gram Stain, minyak immerse, kertas lensa sumbat kapas, aluminium foil, kertas coklat dan korek api.

4.2. Alat

4.2.1. Alat untuk Proses

Alat yang digunakan pada pembuatan sel imobil adalah syrink (merk “Termuno”), spuit injeksi (merk “Terumo Needle” single use (1,20x38mm)), *water jug* 1000mL, bunsen, kakitiga, kassa asbes, penangas air, enkast, batang pengaduk, *beaker glass* 600 mL (merk “Schott Duran”), *beaker glass* 250 mL (merk “Schott Duran”), *beaker glass* 100 mL (merk “Schott Duran”), gelas ukur 100 mL (merk ”RRC), pipet ukur steril 1 mL (merk ”HBG”), pipet ukur steril 5 mL (merk ”HBG”), pipet ukur steril 10 mL (merk ”HBG”), erlenmeyer 250 mL (merk “Schott Duran”), *cup* plastik 45mL (merk “Lion Star”) yang terbuat dari plastik jenis *Polyprophylene* (PP) yang disterilkan terlebih dahulu dengan sinar UV selama 2 jam, autoklaf (merk “Geared Gauge” dan “All American” Model no. 25 X), inkubator (merk “WTC Binder”), oven (merk “WTC Binder”), *laminar flow* “Telstar AV-100”, timbangan digital (merk “Mettler Toledo”), lemari es “Rotary Compressor Mitsubishi” .

4.2.2. Alat untuk Analisa

Alat-alat yang digunakan untuk analisa adalah pH meter (merk “Trans Instrument” TI-2100), sendok porselen, sendok plastik, cawan petri, pipet tetes, erlenmeyer 250mL (merk “Schott Duran”), pipet ukur steril 1 mL (merk ”HBG”), pipet ukur steril 5 mL (merk ”HBG”), pipet ukur steril 10 mL (merk ”HBG”), gelas ukur 100mL (merk “Pyrex”), timbangan digital merk “Mettler Toledo GB 1302”, mikroskop “Nikon”, tabung reaksi dan rak tabung reaksi, mikrometer sekrup dan tekstur analyzer (merk “Stable Micro Systems Texturometer model TA-XT2i”).

4.3. Waktu dan Tempat Penelitian

4.3.1. Waktu Penelitian

Penelitian pendahuluan dilaksanakan pada bulan Juni 2013 sampai dengan September 2013. Penelitian utama dilaksanakan pada bulan Desember sampai dengan Januari 2013.

4.3.2. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Industri Pangan, Laboratorium Teknologi Pengolahan Pangan, dan Laboratorium Penelitian Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

4.4. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah RAK dengan dua faktor, yaitu konsentrasi Isomalt (I_1, I_2, I_3, I_4, dan I_5) dan lama penyimpanan (hari ke-0 dan ke-21) dengan model matematis $Yijk = \mu + \alpha i + \beta j(i) + Kk + \varepsilon ijk$. Taraf-taraf tersebut terdapat 10 kombinasi perlakuan dengan 3 kali pengulangan sehingga diperoleh total 30 unit eksperimen. 10 Kombinasi perlakuan tersebut dapat dilihat pada tabel 4.1. Parameter yang diuji meliputi ketahanan sel imobil, diameter, tekstur.

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan dan pengujian dianalisa secara statistik menggunakan uji ANOVA (Analysis of Varians) pada $\alpha = 5\%$, untuk mengetahui apakah perlakuan memberikan pengaruh nyata terhadap parameter pengujian. Apabila hasil uji ANOVA menunjukkan ada perbedaan nyata, maka dilanjutkan dengan uji pembedaan untuk menentukan taraf perlakuan yang memberikan perbedaan yang nyata. Uji pembedaan dilakukan

dengan Uji Beda Jarak Nyata Duncan (Duncan's Multiple Range Test/DMRT) dengan $\alpha = 5\%$.

Tabel 4.1. Rancangan Penelitian Kombinasi Perlakuan Konsentrasi Isomalt (I) dan Lama Penyimpanan (L)

Perlakuan		Konsentrasi Isomalt (I)				
		I_1	I_2	I_3	I_4	I_5
Lama penyimpanan (L)	L_1	$L_1 I_1(1)$ $L_1 I_1(2)$ $L_1 I_1(3)$	$L_1 I_2(1)$ $L_1 I_2(2)$ $L_1 I_2(3)$	$L_1 I_3(1)$ $L_1 I_3(2)$ $L_1 I_3(3)$	$L_1 I_4(1)$ $L_1 I_4(2)$ $L_1 I_4(3)$	$L_1 I_5(1)$ $L_1 I_5(2)$ $L_1 I_5(3)$
	L_2	$L_2 I_1(1)$ $L_2 I_1(2)$ $L_2 I_1(3)$	$L_2 I_2(1)$ $L_2 I_2(2)$ $L_2 I_2(3)$	$L_2 I_3(1)$ $L_2 I_3(2)$ $L_2 I_3(3)$	$L_2 I_4(1)$ $L_2 I_4(2)$ $L_2 I_4(3)$	$L_2 I_5(1)$ $L_2 I_5(2)$ $L_2 I_5(3)$

Keterangan:

L_1 : Lama Penyimpanan 0 hari

L_2 : Lama Penyimpanan 21 hari

I_1 : Larutan Isomalt 1%

I_2 : Larutan Isomalt 2%

I_3 : Larutan Isomalt 3%

I_4 : Larutan Isomalt 4%

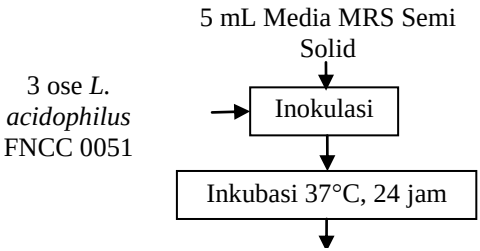
I_5 : Larutan Isomalt 5%

4.5. Pelaksanaan Penelitian

4.5.1 Peremajaan Kultur Stok *L. acidophilus* FNCC 0051

3 ose kultur *L. acidophilus* FNCC 0051 ditumbuhkan pada media MRS Semi Solid dan diinkubasi pada suhu 37^{o}C selama 24 jam. Peremajaan dilakukan setiap minggu dengan tujuan agar persediaan kultur selalu dalam kondisi sehat/optimal. Skema kerja

peremajaan kultur stok *L. acidophilus* FNCC 0051 terdapat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1. Diagram Alir Peremajaan Kultur Stok *L. acidophilus* FNCC 0051
Sumber: Fardiaz (1989)

Penjelasan proses:

1. Inokulasi

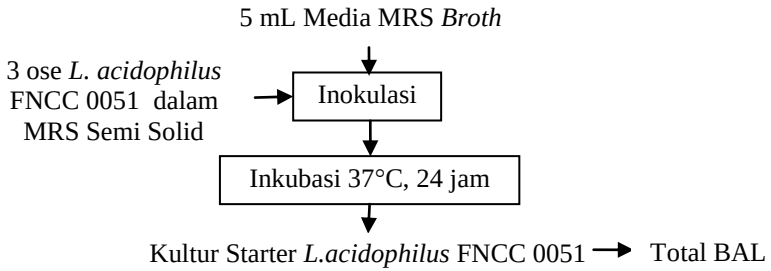
   Tahapan ini bertujuan untuk memindahkan sel *Lactobacillus acidophillus* FNCC 0051 sebanyak 3 ose ke dalam media de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) *Broth* secara aseptis.

2. Inkubasi

   Tahapan ini bertujuan untuk memberi kesempatan bagi sel *Lactobacillus acidophillus* FNCC 0051 untuk memetabolisme nutrisi pada media MRS Agar. Proses ini dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam karena pada suhu dan waktu tersebut merupakan suhu dan waktu yang optimal bagi pertumbuhan bakteri asam laktat (Hui, 1992).

4.5.2 Pembuatan Kultur Starter *L. acidophilus* FNCC 0051 pada Media MRS *Broth*

Tahapan pembuatan kultur *starter L. acidophilus* FNCC 0051 dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2. Diagram Alir Pembuatan Kultur Starter *L. acidophilus* FNCC 0051
Sumber: Fardiaz (1989)

Penjelasan proses:

1. Inokulasi Starter

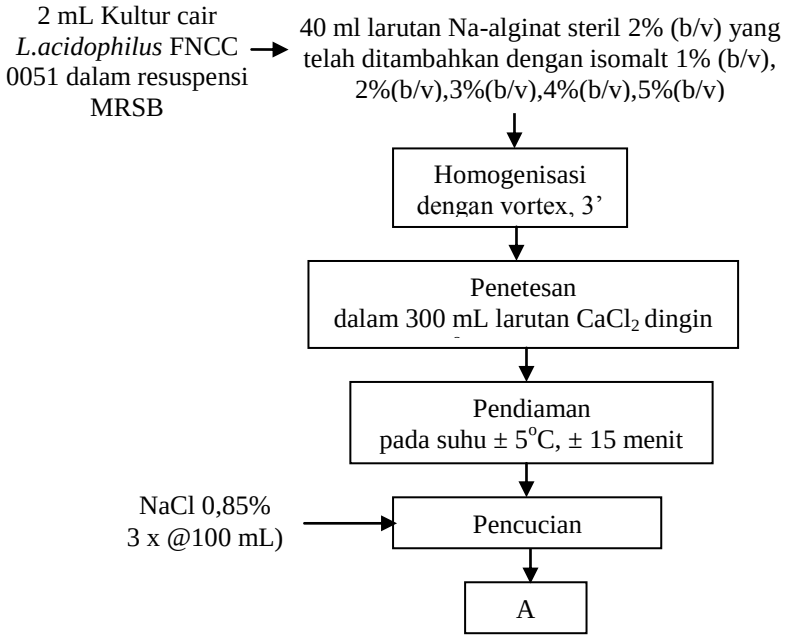
   Tahapan ini bertujuan untuk memindahkan 3 (tiga) ose starter sel *Lactobacillus acidophillus* FNCC 0051 ke dalam media de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) *Broth* secara aseptis.

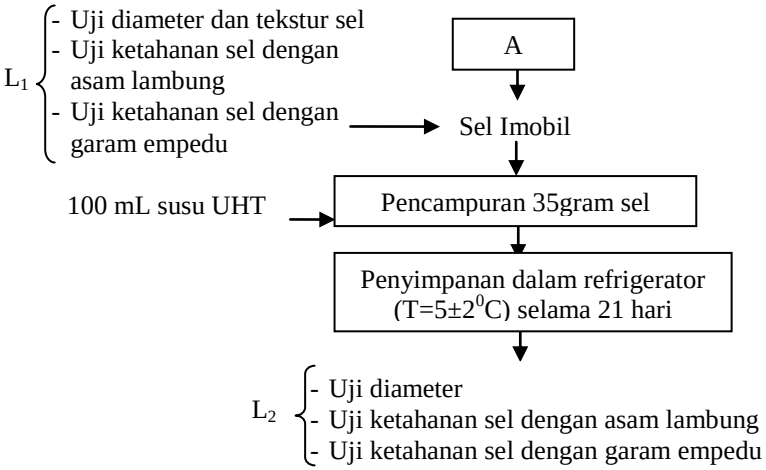
2. Inkubasi

   Tahapan ini bertujuan untuk memberi kesempatan bagi sel *Lactobacillus acidophillus* FNCC 0051 untuk memetabolisme nutrisi pada media MRS *Broth*. Proses ini dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam karena pada suhu dan waktu tersebut merupakan suhu dan waktu yang optimal bagi pertumbuhan BAL (Hui, 1992).

4.5.3 Pembuatan Sel Imobil

Kultur *L. acidophilus* FNCC 0051 dan isomalt dimasukkan ke dalam larutan Na alginat dan dihomogenkan agar tercampur merata. Campuran tersebut dimasukkan dalam syrink dan diteteskan dalam larutan $CaCl_2$ 1% dingin (4-7^{0}C) untuk mempercepat pembentukan gel Ca-alginat. Manik-manik yang terbentuk didiamkan selama ± 15 menit untuk memperkokoh struktur gel sehingga manik-manik tidak mudah berubah bentuk. Manik-manik tersebut dicuci dengan larutan garam NaCl 0,85% sebanyak 3 kali. Fungsi larutan NaCl 0,85% (larutan garam fisiologis) adalah untuk menghilangkan sel-sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 yang berada di permukaan sel imobil.





Gambar 4.3. Diagram Alir Pembuatan Sel Imobil dalam Na alginat
Sumber : Sheu and Marshall (1993); Lee and Heo (2000); Klinkenberg (2001)

Penjelasan proses:

1. Homogenisasi

   Tahapan ini bertujuan agar bakteri dan isomalt tercampur merata didalam larutan Na-alginat.

2. Penetasan Campuran Na-alginat pada $CaCl_2$

   Tahapan ini bertujuan untuk penaut silang antar molekul alginat yang menyebabkan terjadinya gelatinisasi dan akan membentuk gel matriks kalsium alginat.

3. Pendiaman

   Tahapan ini bertujuan untuk memberikan waktu kontak pada alginat dan kation Ca^{2+} membentuk gel matriks kalsium alginat.

4. Pencucian

   Tahapan ini bertujuan untuk menghilangkan sisa-sisa $CaCl_2$ yang masih menempel pada *beads* dan menghilangkan sel-sel yang berada dipermukaan *beads*.

5. Sel Imobil

   Sel imobil terbentuk dan dilakukan pengujian ALT, diameter dan tekstur *beads* pada hari ke-0 sebelum dikontakkan dengan susu UHT.

6. Pencampuran

   Pencampuran 35 gram sel imobil ke dalam 100 mL susu UHT.

7. Penyimpanan

   Tahapan ini bertujuan untuk memberikan waktu bagi perlakuan lama penyimpanan selama 21 hari dan suhu refrigerator ditujukan untuk meminimalkan adanya kontaminasi dengan lingkungan sekitar.

4.6. Pengamatan dan Pengujian

4.6.1. Pengujian Ketahanan Sel Terimobil pada Asam Lambung (Lee and Heo, 2000, dengan modifikasi)

a. Sel imobil (3 gram) dimasukkan dalam media MRS *Broth* yang telah diatur pada pH 2,5 (HCl 0,08 M) kemudian diinkubasi pada suhu 37^0C selama 30 menit (*modifikasi).

b. 3 gram sel imobil yang telah dikondisikan pada pH 2,5 diambil dengan menggunakan sendok porselen steril secara aseptis kemudian dilarutkan dalam 27 mL larutan Na-sitrat 0,1 M steril pada suhu kamar dan dikocok sampai sel imobil terlarut semua (kurang lebih 10 menit). Setelah itu, dilakukan seri pengenceran,

penuangan MRS Agar yang telah dicairkan, dilanjutkan dengan inkubasi 37^0C selama 48 jam dan perhitungan koloni yang tumbuh. Prosedur pengenceran dapat dilihat pada Lampiran E.

c. Jumlah sel yang tahan dinyatakan sebagai ALT BAL (sel/gram). Ketahanan *Lactobacillus acidophilus FNCC* 0051 terimobil terhadap asam lambung diperoleh dengan menggunakan rumus :
Ketahanan asam lambung = log (ALT tabung a)–(ALT tabung b)
Diasumsikan semakin kecil selisih log, semakin besar ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terhadap asam lambung.

4.6.2. Pengujian Ketahanan Sel Terimobil pada Garam Empedu (Lee and Heo, 2000, dengan modifikasi)

a. Sel imobil (3 gram) yang telah dikondisikan pada pH 2,5 selama 30 menit (*modifikasi) dimasukkan dalam media yang telah ditambah dengan *oxgall* (garam empedu) sebanyak 1% (b/v) kemudian diinkubasi 37^0C selama 3 jam (*modifikasi).

b. Sebanyak 3 gram sel imobil yang telah dikondisikan pada konsentrasi *oxgall* 1% diambil dengan menggunakan sendok porselen steril secara aseptis. Kemudian, sel imobil tersebut dilarutkan dalam 27 mL larutan Na-sitrat 0,1 M steril pada suhu kamar dan dikocok sampai terlarut semua (kurang lebih 10 menit). Setelah itu, dilakukan seri pengenceran, penuangan MRS agar yang telah dicairkan, dan dilanjutkan dengan inkubasi 37^0C selama 48 jam untuk perhitungan koloni yang tumbuh. Prosedur pengenceran dapat dilihat pada Lampiran G.

c. Sebagai kontrol, dilakukan prosedur seperti di atas tetapi dalam media MRS-*Broth* tanpa penambahan *oxgall.*

d. Ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil terhadap garam empedu dinyatakan sebagai ketahanan relatif yang diperoleh dengan:

Ketahanan relatif terhadap garam empedu = log (ALT tabung c – ALT tabung b) – log (ALT tabung d – ALT tabung b)

Diasumsikan semakin kecil selisih log, semakin besar ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terhadap *oxgall.*

4.6.3. Pengujian Tekstur (Data Pendukung)

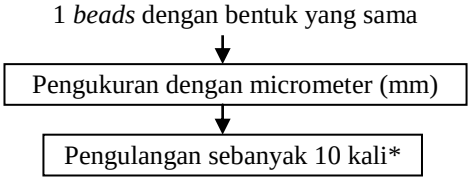
Gambar 4.4. Diagram Alir Pengujian Tekstur *Beads*
Sumber : Rodriguez-Huezo *et al*., (2011) dengan modifikasi

Keterangan :

Karakteristik	Definisi Sensorial	Definisi Instrumental
Kekerasan	Gaya yang diberikan hingga terjadi perubahan bentuk (deformasi) pada objek	
Springiness	Panjang dari kompresi kedua dari puncak	
Kohesivitas	Kekuatan dari ikatan-ikatan yang berada di dalam objek yang menuyusun bentuk objek	

Sumber: DeMan (1985); Rosenthal (1999)

4.6.4. Pengujian Diameter *Beads* (Data Pendukung)



Gambar 4.5. Diagram Alir Pengujian Diameter *Beads*
Sumber : Rodriguez-Huezo *et al*., (2011) *dengan modifikasi

BAB V
PEMBAHASAN

Suatu mikroorganisme diklasifikasikan sebagai probiotik, harus memenuhi beberapa persyaratan, diantaranya bersifat non patogen, ketahanan pada populasi tinggi, sekitar 10^6-10^8 cfu/ml, menghasilkan substansi anti mikrobial yang akan menghambat bakteri patogen dalam saluran pencernaan, mampu berkompetisi dengan bakteri patogen untuk membentuk koloni dalam saluran pencernaan, mempunyai stabilitas yang tinggi selama proses fermentasi, penyimpanan, distribusi dan tahan terhadap enzim-enzim pencernaan dan garam-garam empedu. Salah satu kelompok *Lactobacilli* seperti *Lactobacillus acidophilus* adalah strain yang biasa digunakan sebagai sumber probiotik dalam pengolahan susu.

Perlakuan imobilisasi menggunakan Na-alginat dengan konsentrasi 2%, bertujuan untuk membatasi kontak antara sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 dengan lingkungan seperti asam lambung dan garam empedu dalam tubuh manusia. Pengujian ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil terhadap asam lambung dilakukan secara in vitro, dengan menggunakan HCl sebagai model cairan lambung, dimana media pertumbuhan untuk BAL (MRS *Broth*) ditambah dengan HCl hingga mencapai pH 2,5 dengan waktu kontak 30 menit. Pengujian ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil terhadap garam empedu juga dilakukan secara in-vitro dengan menambahkan *oxgall* dalam media pertumbuhan (MRS *Broth*) sebanyak 1%.

Parameter-parameter yang diamati untuk mengetahui ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terhadap asam lambung dan garam empedu meliputi total BAL dengan metode ALT dari hasil perhitungan total

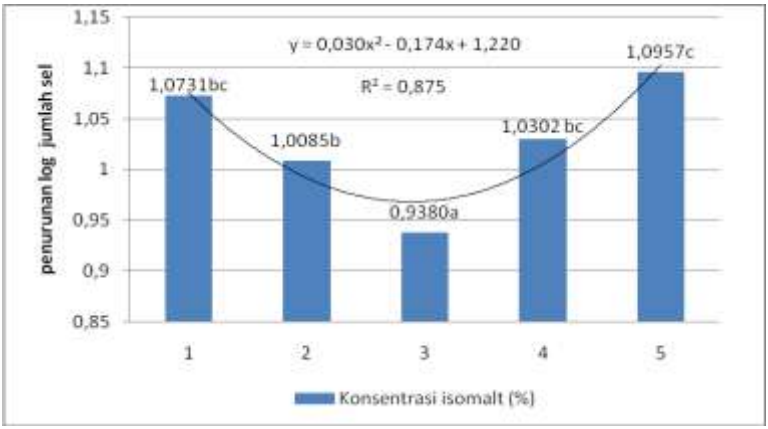
bakteri *L. acidophillus* FNCC 0051 terimobil, diameter *beads* dan tekstur *bead* (data pendukung). Dari hasil uji ALT dapat dihitung jumlah penurunan koloni yang bertahan, yang dinyatakan sebagai log cfu/gram. Pengamatan diameter dan tekstur *beads* diharapkan dapat membantu menunjukkan pengaruh asam lambung dan garam empedu terhadap sifat internal sel, karena ada kemungkinan semakin lamanya penyimpanan *beads* semakin membesar dan lebih rapuh teksturnya yang mengakibatkan sel-sel bakteri yang terjerat didalam matriks terlepas ke dalam *carrier*

5.1. Pengaruh Penambahan Isomalt dan Lama Penyimpanan terhadap Ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Asam Lambung

Penelitian ini menggunakan model perlakuan yang mendekati kondisi saluran pencernaan manusia sebenarnya dengan mengkondisikan pada pH 2,5 selama 30 menit, yang mewakili kondisi di lambung. Hasil ANAVA (Lampiran I, Tabel I.2.) pada taraf α= 5% menunjukkan bahwa faktor perlakuan perbedaan konsentrasi isomalt memiliki pengaruh yang nyata terhadap ketahanan sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 namun faktor perlakuan lama penyimpanan serta interaksi antara kedua faktor perlakuan tidak berbeda nyata terhadap ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung. Hasil uji DMRT dan histrogram pengaruh perbedaan konsentrasi isomalt terhadap ketahanan bakteri *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung dapat dilihat pada Gambar 5.1.

Jumlah bakteri *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 awal berkisar 1,9 x 10^{11} cfu/gram dan jumlah bakteri sel terimobil berkisar 1,1 x 10^{9}-5,4 x 10^{9} cfu/gram**.** Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah sel hidup di dalam matriks Ca alginat-isomalt yang kontak dengan HCl pH 2,5 pada

semua kombinasi perlakuan berkisar antara $8{,}8.10^7$-$2{,}3.10^9$ cfu/gram *beads* (Lampiran H, Tabel H.3). Semakin kecil selisih log, semakin besar ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051. Hasil penelitian yang tampak dari Gambar 5.1., secara umum tampak bahwa semakin besar konsentrasi isomalt, ketahanan sel semakin meningkat sampai konsentrasi tertentu (3%).



Gambar 5.1. Histogram Pengaruh Konsentrasi Isomalt terhadap Ketahanan Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Asam Lambung

Keterangan : notasi yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata pada uji DMRT dengan $\alpha = 0{,}05$

Pada Gambar 5.1. peningkatan ketahanan sel hingga konsentrasi isomalt 3% dikarenakan isomalt berfungsi sebagai bahan pengisi (*filler*) (Bolhuis *et al.*, 2009) dapat memberikan kekokohan pada *beads* yang terbentuk dengan cara mengisi kekosongan rongga pada kapsul kalsium alginat karena kapsul kalsium alginat sangat berpori yang memungkinkan cairan media dapat berdifusi keluar masuk matriks (Rokka dan Rantamäki, 2010; Gouin, 2004) dengan adanya isomalt ketahanan sel tinggi dan tidak terganggu dengan kondisi lingkungan seperti kondisi asam. Matriks gel yang terbentuk dari Na alginat dan $CaCl_2$ ini memiliki struktur gel yang mudah pecah dan

permukaan gel yang berporus. Penambahan prebiotik isomalt bertujuan untuk meningkatkan kemampuan perlindungan bagi sel-sel bakteri dengan mengisi rongga-rongga matriks gel Ca alginat sehingga menghasilkan matriks gel yang lebih rapat yang mengandung sel-sel bakteri yang aktif bermetabolisme (Jankowski *et al.*, 1997). Namun, matriks alginat yang telah ditambahkan prebiotik masih memiliki pori-pori yang memungkinkan untuk terjadinya difusi nutrient dan metabolit keluar dan masuk dalam *beads* (Gautier *et al.*, 2011).

Penelitian Yeo Siok *et al.,* (2010) menyatakan bahwa terjadi kenaikan yang signifikan pada pertumbuhan *L.acidophilus* FTDC 8033 dan *Lactobacillus* sp. FTDC 2113 pada susu kedelai yang disuplementasi dengan FOS. Pertumbuhan probiotik melebihi 7 log cfu/mL. Ini membuktikan bahwa penambahan prebiotik secara signifikan membantu pertumbuhan probiotik. Chen Kun-Nan *et al.,* (2005) menyimpulkan bahwa *co-enkapsulasi* menaikkan ketahanan hidup bakteri probiotik aktif. Prebiotik menyediakan sumber karbohidrat dan alginat menyediakan lapisan pelindung untuk probiotik pada mikrokapsul (Ann *et al.,* 2007).

Selain itu, *carier* yang digunakan sebagai *delivery system* untuk dapat sampai ke dalam usus adalah susu. Susu memiliki pH sekitar 6,5-6,6 (Muchtadi dan Sugiyono, 1992) yang berada pada kisaran pH optimal untuk pertumbuhan bakteri asam laktat. Menurut Sardjono dan Wibowo (1988), pH optimal untuk pertumbuhan bakteri asam laktat adalah antara 5,6-6,5; sedangkan kisaran pH untuk ketahanan sel *Lactobacillus sp.* adalah 3,8-7,2 sehingga memungkinkan pertumbuhan di dalam *beads*

Sel terimobil yang kontak dengan asam dibandingkan dengan sel terimobil yang tidak kontak dengan lingkungan terlihat bahwa terjadi penurunan ketahanan yang kecil. Hal ini dikarenakan tidak banyak sel yang lepas dari *beads* sehingga sel yang lolos ke lingkungan dan sel yang mati

lebih sedikit karena yang kontak dengan lingkungan asam juga sedikit. BAL mampu beradaptasi pada pH 2,5 karena memiliki sistem regulasi pada pH internal sel (pHi). Toleransi BAL terhadap asam cukup tinggi disebabkan kemampuannya mempertahankan pH sitoplasma lebih basa daripada pH ekstraseluler (Hutkins dan Nannen, 1993). Hal ini dapat dicapai dengan sintesis enzim-enzim baru dan mengeluarkan proton (H^+) dari dalam sel yang pengeluarannya terjadi melalui proses hidrolisis ATP (H^+-ATPase). Casiano-Colon dan Marquis (1998) berpendapat bahwa BAL bertahan dari kerusakan asam karena adanya enzim histidin dekarboksilase dan enzim arginin deiminasi.

Mekanisme bakteri untuk mengatur pH internalnya adalah melalui translokasi proton oleh enzim ATP-ase, Enzim yang terikat pada membran sel bertindak sebagai pompa yang akan memindahkan ion dan reaksinya bersifat *reversible.* Enzim tersebut juga akan mengkatalisis gerakan proton menyeberangi membran sel sebagai akibat dari hidrolisis dan sintesis ATP. BAL untuk mempertahankan pH sitoplasma supaya lebih basa sel harus memiliki *barrier* terhadap aliran proton, *barrier* ini umumnya adalah membran sitoplasma. Membran sitoplasma bakteri terdiri atas 2 lapis fosfolipid (*lipid bilayer*) yang pada masing-masing permukaan lapisan tersebut melekat pada protein dan glikoprotein. *Lipid bilayer* bersifat semipermeabel yang akan membatasi gerakan senyawa yang keluar masuk antara sitoplasma dengan lingkungan luar.

Konsentrasi alginat yang digunakan sebesar 2% merupakan konsentrasi yang digunakan untuk menjerat sel bakteri. Chandramouli *et al.*,(2004), mengungkapkan bahwa penggunaan konsentrasi larutan alginat lebih dari 2% tidak memungkinkan untuk menghasilkan manik-manik homogen karena peningkatan viskositas larutan dan penurunan difusivitas massa. Penambahan karbohidrat seperti isomalt yang dikombinasikan

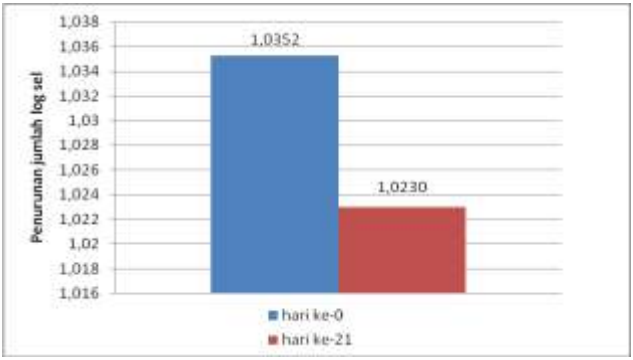
dengan alginat dapat meningkatkan kekuatan matriks penjerat dalam melindungi sel (Monedero, dkk., 2010). Hal ini membuat laju difusi rendah dan kontak media *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil semakin sedikit. Kontak yang lebih sedikit dengan lingkungan memberikan efek negatif yang lebih kecil pada sel, sehingga setelah dikontakkan selama 30 menit sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil yang masih hidup sampai log 8. Hasil penelitian tersebut juga didukung oleh penelitian Lee and Heo (1999), yang menguji ketahanan *Bifidobacterium longum* yang dipaparkan pada larutan NaCl yang ditambah dengan asam lambung hingga pH 1,55 setelah inkubasi 30 menit mengalami penurunan sebesar 6 siklus log/ml, sedangkan sel yang terimobil dengan matriks Ca-alginat lebih banyak yang bertahan dibandingkan dengan sel bebas.

Perlakuan isomalt diatas 3% menunjukkan jumlah penurunan sel semakin besar. Penurunan ketahanan sel ini disebabkan karena adanya keterbatasan air yang tersedia untuk pembentukan gel *beads*. *Beads* yang terbentuk dibuat dari Na-alginat murni merk Zigma A 2033-100G. Alginat ini termasuk tipe alginat yang memiliki viskositas medium dengan panjang rantai 80000-120000 Dalton. Perbandingan unit M dan unit G pada alginat merk Zigma A 2033-100G sebesar 69:31 (Gautier *et al.,* 2011). Unit M (manuronat) membentuk gel yang lunak dan elastis pada *beads* sedangkan unit G (guluronat), membentuk karakteristik gel *beads* yang kokoh.

Semakin bertambahnya jumlah isomalt yang ditambahkan pada alginat membuat matriks gel semakin menurun elastisitasnya, karena isomalt memiliki gugus hidrofilik bebas yang menyerap air sehingga mengganggu pembentukan gel oleh kalsium alginat (terjadi kompetisi antara isomalt dengan kalsium alginat) sehingga gel yang terbentuk tidak elastis (rapuh) dan jumlah sel yang terperangkap menurun. Kompetisi antara alginat dengan isomalt dalam menyerap air dipengaruhi oleh unit M

(manuronat) yang merupakan komposisi terbesar didalam alginat yang membentuk karakteristik gel yang lunak dan elastis pada *beads*. Semakin sedikitnya jumlah air membuat unit M (manuronat) sedikit mengikat air hal ini mengakibatkan berkurangnya sifat elastis gel *beads. Beads* yang dihasilkan kokoh namun sifat elastisnya menurun. Hal ini sesuai dengan uji *springiness* yang menunjukkan dengan bertambahnya konsentrasi isomalt maka *beads* yang terbentuk sifat elastisnya semakin berkurang. Hal ini mengakibatkan jumlah sel menurun dan sel kontak dengan lingkungan asam

Berdasarkan Hasil ANAVA (Lampiran I, Tabel I.2.) pada taraf α= 5% menunjukkan bahwa faktor perlakuan lama penyimpanan tidak memiliki pengaruh yang nyata terhadap ketahanan sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung. Nilai ALT sel terimobil yang dihasilkan pada perlakuan lama penyimpanan hari ke-0 berkisar antara 8,8 x 10^7 - 3.3 x 10^8 cfu/gram sedangkan pada hari ke-21 berkisar antara 1,1.10^8-2,3.10^9 cfu/gram (Lampiran H).



Gambar 5.2. Histogram Pengaruh Lama Penyimpanan terhadap Ketahanan Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Asam Lambung

Keterangan : notasi yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata pada uji DMRT dengan α = 0,05

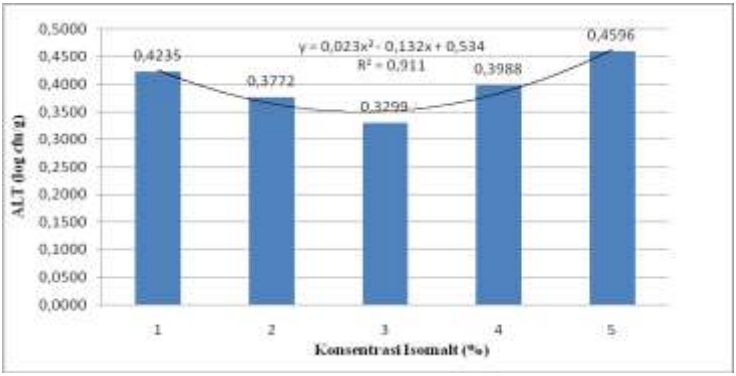
Peningkatan jumlah sel bakteri sebesar 0,0122 cfu/gram sel. Menurut Koo *et al.,* (2001), probiotik yang akan menjadi produk fermentasi adalah kemampuannya untuk bertahan hidup selama penyimpanan. Secara unum produk fermentasi yang mengandung probiotik harus disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4^0C. Banyak penelitian menunjukkan bahwa tingkat kelangsungan hidup lebih tinggi dari bakteri asam laktat diperoleh pada suhu penyimpanan yang lebih rendah (Gilliland and Lara, 1988; Foschino *et al.,* 1996). Hal ini dikarenakan selama penyimpanan isomalt dengan baik mengisi kekosongan rongga matriks Na alginat sehingga ketahanan sel tidak berbeda nyata dari hari ke-0. Interaksi antara kedua perlakuan juga tidak menimbulkan pengaruh yang beda nyata. Hal ini dapat terjadi karena perlakuan lama penyimpanan tidak menyebabkan perubahan pertumbuhan bakteri yang hidup secara nyata seiring dengan bertambahnya konsentrasi isomalt sebagai prebiotik.

5.2. Pengaruh Penambahan Isomalt dan Lama Penyimpanan terhadap Ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Garam Empedu

Pengaruh garam empedu pada penelitian diperoleh dengan menambahkan *oxgall* (garam empedu) dalam media pertumbuhan (MRS *Broth)* sebanyak 1%. Pengujian dilakukan dengan cara memasukan *beads* ke dalam MRS *Broth* dengan pH 2,5 kemudian diambil dan dimasukkan ke dalam MRS *Broth* + *oxgall* 0% (kontrol) dan MRS *Broth* + *oxgall* 1%, dengan inkubasi 37^0 C, 3 jam. Hasil ANAVA (Lampiran J, Tabel J.2.) pada taraf α= 5% menunjukkan bahwa faktor perlakuan perbedaan konsentrasi isomalt dan lama penyimpanan memiliki pengaruh yang nyata terhadap ketahanan sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil namun interaksi antara kedua faktor tidak berpengaruh nyata. Hasil uji DMRT dan

histrogram pengaruh perbedaan konsentrasi isomalt terhadap ketahanan bakteri *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada garam empedu dapat dilihat pada Gambar 5.3. Ketahanan jumlah sel dinyatakan dengan semakin kecil selisih log maka semakin besar ketahanan sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil.

Peningkatan ketahanan disebabkan isomalt yang berfungsi sebagai bahan pengisi (*filler*) (Bolhuis *et al.,* 2009) dapat memberikan kekokohan pada *beads* yang terbentuk dengan cara mengisi kekosongan rongga pada kapsul kalsium alginat karena kapsul kalsium alginat sangat berpori yang memungkinkan air dapat berdifusi keluar masuk matriks (Rokka dan Rantamäki,2010; Gouin, 2004).



Gambar 5.3. Histogram Pengaruh Konsentrasi Isomalt terhadap Ketahanan Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Garam Empedu

Keterangan : notasi yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata pada uji DMRT dengan $\alpha = 0,05$

Matriks gel yang terbentuk dari Na alginat dan $CaCl_2$ ini memiliki struktur gel yang mudah pecah. Penambahan isomalt bertujuan meningkatkan kemampuan perlindungan bagi sel-sel bakteri dengan mengisi rongga-rongga matriks gel Ca alginat sehingga menghasilkan

matriks gel yang lebih rapat yang mengandung sel-sel bakteri yang aktif bermetabolisme (Jankowski *et al.*, 1997). Menurut Sultana *et al*., (2000) dalam penelitiannya melakukan enkapsulasi *Bifidobacterium* dan *Lb. casei* dengan teknik emulsi menggunakan alginat 2%, $CaCl_2$ 0,1 M, dan dengan perlakuan khusus berupa penambahan prebiotik pati jagung (Hi-maize, Starch Australia Ltd) sebagai *filler* sebanyak 0 – 4%. Penambahan *filler* (Hi-maize) meningkatkan rendemen dan jumlah *Lb*. *Casei* yang terenkapsulasi dalam *beads*. Namun, *filler* yang terlalu banyak (4%) akan menurunkan rendemen *beads*.

Pada usus kecil manusia, enzim pada mukosa usus menghidrolisis isomalt secara lambat, sedangkan pada usus besar isomalt benar-benar difermentasi oleh mikroflora menghasilkan asam lemak rantai pendek, CO_2, CH_4, dan H_2 (Mitchel, 2006). SCFA (*Short Chain Fatty Acids*) diserap, meningkatkan penyerapan air dan garam, dan digunakan sebagai sumber energi oleh inangnya. Asam butirat juga merupakan sumber utama energi dari sel-sel epitel yang melapisi usus besar dan dapat mempengaruhi pertumbuhan sel dan diferensiasi. Gas-gas hidrogen, metana, dan karbon dioksida juga diproduksi dan dapat memberikan kontribusi pada keseimbangan mikrobiota (Binns, 2013). Ini membuktikan bahwa penambahan prebiotik isomalt secara signifikan membantu pertumbuhan probiotik.

Penambahan isomalt diatas 3% menurunkan ketahanan sel terhadap garam empedu hal ini dikarenakan adanya keterbatasan air yang tersedia untuk pembentukan gel. Dengan bertambahnya isomalt maka kemampuannya untuk menyerap air lebih banyak karena isomalt memiliki gugus hidrofilik bebas yang dapat menyerap air dan dapat mengganggu pembentukan gel oleh kalsium alginat (terjadi kompetisi antara isomalt dengan kalsium alginat). Hal ini akan menyebabkan gel yang terbentuk

tidak kokoh sehingga terjadi penurunan jumlah sel yang terperangkap dibuktikan dengan uji tekstur bahwa dengan bertambahnya konsentrasi isomalt maka *beads* yang terbentuk rapuh (mudah pecah) yang sesuai dengan uji *springiness* menunjukkan bahwa *beads* yang terbentuk tidak mampu kembali ke bentuk awal setelah diberi tekanan (tidak dapat mempertahankan keelastisannya). Elastisitas yang menurun membuat jumlah sel didalam *beads* semakin menurun dan mengakibatkan sel bakteri kontak dengan lingkungan.

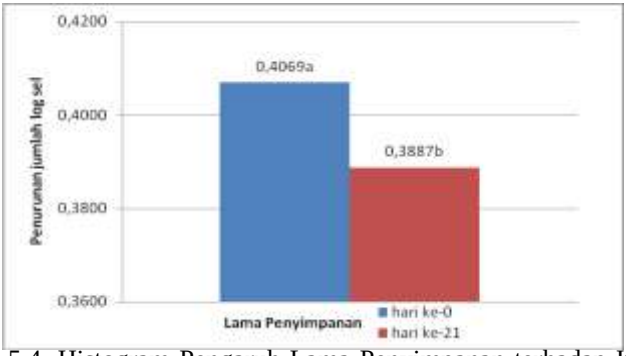
Pada lingkungan dengan perlakuan *oxgall* 0% mengalami peningkatan ALT yang lebih besar daripada *beads* yang kontak dengan *oxgall* 1%, karena garam empedu bersifat menghambat pertumbuhan (Tuomola, 2001). Semakin tinggi konsentrasi garam empedu, maka jumlah sel *Lactobacillus* yang mati juga akan meningkat. Hal ini disebabkan peningkatan aktivitas enzim β-galaktosidase (enzim intraseluler dari bakteri) terhadap garam empedu, sehingga meningkatkan permeabilitas membran sel. Bila permeabilitas sel meningkat maka banyak materi intraseluler yang keluar dari dalam sel. Bila hal ini berlangsung terus menerus akan menyebabkan lisis bakteri.

Pengaruh garam empedu terhadap pertumbuhan bakteri dapat ditentukan oleh konsentrasi dan lama kontak (waktu inkubasi) bakteri tersebut dalam medium yang mengandung garam empedu (Bezkorovainy, 2001). Salah satu mekanisme pertahanan bakteri terhadap garam empedu dikemukakan oleh Moser dan Savage (2001), bahwa bakteri dapat bertahan terhadap garam empedu karena memiliki kemampuan mendekonjugasi garam empedu.

Proses dekonjugasi terjadi karena bakteri memproduksi enzim *Bile Salt Hydrolase* (BSH). Manfaat BSH yang diproduksi oleh bakteri merupakan mekanisme pertahanan melawan keasaman intraseluler yang

disebabkan oleh garam empedu terkonjugasi. Garam empedu terkonjugasi mengandung gugus karboksil pada asam aminonya. Gugus karboksil merupakan sumber ion hidrogen. Ikatan kovalen antara oksigen dan hidrogen sangat polar sehingga hidrogen cenderung terurai menjadi ion H^+, dengan terakumulasinya ion H^+ dari garam empedu terkonjugasi menyebabkan pH menurun (lebih asam) sehingga mengganggu kestabilan gradien proton/ pompa proton dalam membran sel. Enzim BSH akan mengubah garam empedu terkonjugasi menjadi garam empedu terdekonjugasi yang dapat mengurangi penurunan pH (De Smet *et al.*, 1995). Produksi BSH oleh bakteri pada lingkungan bergaram empedu dapat membantu bakteri tersebut untuk bertahan terhadap tekanan garam empedu.

Berdasarkan Hasil ANAVA (Lampiran J, Tabel J.2.) pada taraf α= 5% menunjukkan bahwa faktor perlakuan lama penyimpanan memiliki pengaruh nyata terhadap ketahanan sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada garam empedu. Histrogram pengaruh lama penyimpanan terhadap ketahanan bakteri *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada garam empedu dapat dilihat pada Gambar 5.4.



Gambar 5.4. Histogram Pengaruh Lama Penyimpanan terhadap Ketahanan Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Garam Empedu

Keterangan : notasi yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata pada uji DMRT dengan α = 0,05

Semakin lama penyimpanan menunjukkan peningkatan ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terdapat pada Gambar 5.4. Selama penyimpanan *beads* dimasukkan ke dalam *carrier* susu UHT yang disimpan pada suhu 5 ± 2^0C. Selama penyimpanan dapat terjadi pertumbuhan sel bakteri dalam *beads* (Klikenberg *et al.,* 2001). Menurut Banwart (1981), suhu optimum pertumbuhan *Lactobacillus* adalah 30-40^{0}C dan kisaran suhu untuk ketahanan hidup *Lactobacillus* adalah 5-53^{0}C. Hal ini yang memungkinkan terjadinya pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil yang disimpan pada suhu 5 ± 2^0C dalam substrat kaya nutrisi.

Susu memiliki pH sekitar 6,5-6,6 (Muchtadi dan Sugiyono, 1992) yang berada pada kisaran pH optimal untuk pertumbuhan bakteri asam laktat. Menurut Sardjono dan Wibowo (1988), kisaran pH untuk ketahanan sel *Lactobacillus sp.* adalah 3,8-7,2 sehingga memungkinkan bakteri hidup dan berkembang pada pH yang optimum. Penelitian Chen *et al.,* (2005), menunjukkan bahwa ketahanan sel bakteri *Lactobacillus acidophilus dan Lactobacillus casei* yang terenkapsulasi dengan Ca alginat dan ditambahkan prebiotik FOS dan peptida yang disimpan dalam media susu mengalami peningkatan ketahanan sel bakteri pada penyimpanan hari keempat.

Selain itu naiknya ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil selama penyimpanan karena adanya penambahan prebiotik isomalt. Isomalt memiliki kandungan SDF. Menurut Holzaspfel dan Schillinger (2001) dan Niness (1999), kandungan serat kasar khususnya SDF merupakan komponen penciri utama bahan prebiotik. Kandungan SDF sebesar 0.5% mampu meningkatkan ketahanan probiotik. Isomalt dimanfaatkan oleh bakteri probiotik sebagai prebiotik. Hal ini didukung oleh pernyataan Buchanan dan Gibbons (1975), yang mengemukakan bahwa *Lactobacillus acidophilus* memperlihatkan reaksi positif dengan reaksi 90% terhadap karbohidrat amigdalia, selobiosa, fruktosa, galaktosa,

glukosa (asam), laktosa, maltosa, mannosa, salisin, sukrosa, trehalosa, dan askulin.

Menurut Ray (2001), ketahanan sel terhadap garam empedu sangat tergantung pada individu sel. Hal ini dikarenakan sel yang kontak dengan MRS *Broth* yang ditambah dengan *oxgall* 1% merupakan kondisi menekan (bersifat sub-letal), sel mengalami kerusakan. Sel yang mengalami *injury*, sebagian lapisan protein permukaan hilang dan terjadi perubahan struktural pada lapisan lipopolisakarida dan lapisan ini akan kehilangan kemampuan untuk melindungi sel dari senyawa kimia di sekelilingnya. Perubahan lapisan lipopolisakarida dikarenakan hilangnya kation divalen yang diperlukan untuk stabilitas lipopolisakarida, selain itu dapat juga terjadi kerusakan DNA. Sel yang mengalami *injury* dapat membentuk koloni setelah sel membenahi kerusakannya seperti ATP, ARN, ADN, dan mukopeptida, dan dinding sel kembali mencegah masuknya senyawa yang merugikan sel serta membran sitoplasma memperoleh sifat permeabelnya kembali (Ray,2001). Saat bakteri mengalami lingkungan yang buruk (*stress adaptation)* seperti kontak dengan suhu rendah (*chilling*) bakteri akan menghasilkan *shock proteins* atau *strees proteins. Shock proteins* akan menyediakan perlindungan pada DNA dan beberapa enzim yang mengalami stress. Pembentukan protein ini merupakan respon sel dari induksi gen-gen oleh faktor tekanan. Hal ini yang mengakibatkan penurunan jumlah sel bakteri semakin kecil selama penyimpanan. Selain itu bakteri dapat bertahan terhadap garam empedu karena memiliki kemampuan mendekonjugasi garam empedu.

Proses dekonjugasi ini terjadi karena bakteri memproduksi enzim *Bile Salt Hydrolase* (BSH) yang dapat menghidrolisis atau memutuskan ikatan C-24 N-acyl amida yang terbentuk di antara asam empedu dan asam amino pada garam empedu terkonjugasi. Proses dari dekonjugasi

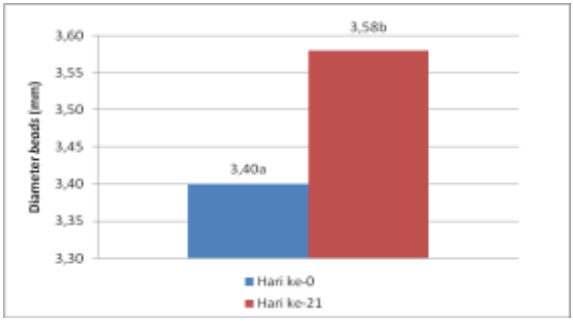
menghasilkan garam empedu terdekonjugasi (*Unconjugated Bile Salt*) yang memiliki tingkat solubilitas/ kelarutannya di dalam pH fisiologis lebih rendah, sehingga garam empedu terdekonjugasi lebih hidrofobik, kurang ionik dan secara pasif dapat langsung diabsorpsi oleh mukosa usus kembali ke hati melalui peredaran darah. Garam empedu terdekonjugasi memiliki kemampuan antimikrobia yang rendah, sehingga tidak terlalu membahayakan kehidupan bakteri.

Menurut Noh dan Gilliland (1993), *Lactobacillus acidophilus* memiliki ketahanan terhadap garam empedu, sebab pada sel yang diinkubasi pada media yang mengandung *oxgall* masih terjadi pertumbuhan dan tidak terjadi lisis. Penelitian lain menurut Lankaputhra and Shah (1995), menyatakan bahwa diantara 6 strain dari *lactobacili*, dua strain (*L. acidophilus* 2404 dan 2415) menunjukkan ketahanan terbaik pada konsentrasi empedu (1–1,5%). Holcomb *et al.,* (1991), menyatakan bahwa keduanya *L. acidophilus* dan *Bifidobacterium* memiliki kemampuan bertahan dan tumbuh pada "frozen yoghurt" setelah pendinginan dan keduanya ditemukan bertumbuh sampai 0,45% garam empedu

5.3. Diameter *Beads*

Pengaruh konsentrasi isomalt, lama penyimpanan, dan interaksi keduanya terhadap diameter *beads* sel bakteri *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil diukur dengan *micrometer* dengan pengambilan sampel secara acak sebanyak 5% dari total *beads* (±10 *beads)* pada berbagai macam konsentrasi isomalt dan berbagai lama penyimpanan dan dinyatakan ke dalam satuan mm.

Berdasarkan analisis sidik ragam, perbedaan konsentrasi isomalt tidak berpengaruh nyata pada (α = 0,05) terhadap diameter *beads.* Sedangkan pengaruh lama penyimpanan terhadap diameter *beads* memberikan pengaruh nyata (Lampiran K). Interaksi antara konsentrasi isomalt dan lama penyimpanan tidak berpengaruh nyata. Hasil uji DMRT dan histogram pengaruh lama penyimpanan terhadap ukuran diameter *beads* sel bakteri *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil dapat dilihat pada Gambar 5.5. Perhitungan uji ANAVA dan uji beda nyata dapat dilihat pada Lampiran K, Tabel K.2



Gambar 5.5. Histogram Pengaruh Lama Penyimpanan terhadap Diameter *Beads* Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil
Keterangan : notasi yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata pada uji DMRT dengan α = 0,05

Perbedaan konsentrasi isomalt tidak memberikan pengaruh nyata pada ukuran diameter *beads.* Hasil yang sama juga didapatkan pada penelitian Adrianto dkk. (2011), yang menyatakan bahwa konsentrasi filler tidak berpengaruh terhadap ukuran *beads.*

Matriks gel yang terbentuk dari Na alginat dan $CaCl_2$ memiliki struktur *beads* yang mudah pecah dan permukaan *beads* yang berporus. Penambahan prebiotik isomalt bertujuan untuk meningkatkan kemampuan perlindungan bagi sel-sel bakteri dengan mengisi rongga-rongga matriks gel

Ca alginat sehingga menghasilkan matriks gel yang lebih rapat dan mengandung sel-sel bakteri yang aktif bermetabolisme (Jankowski *et al.*, 1997). Namun matriks alginat isomalt yang terbentuk masih memiliki pori-pori yang memungkinkan terjadinya difusi nutrien dan metabolit ke dalam dan ke luar *beads* yang dapat menyebabkan perubahan struktur gel matriks menjadi lebih renggang dengan ukuran pori-pori *beads* membesar. Alginat mengandung air sebesar 85% dan rentan terhadap distorsi yang disebabkan oleh pengembangan terkait dengan imbibisi (penyerapan air) atau pengerutan yang terkait dengan sineresis (penguapan air). Rokka dan Rantamaki (2010), mengatakan bahwa matriks gel alginat memiliki daya elastisitas gel cukup tinggi sehingga memungkinkan terjadinya pengembangan terkait dengan imbibisi (penyerapan air) yang dapat menyebabkan pembesaran diameter *beads* dengan pelonggaran matriks gel. Hal ini membuat semakin lama disimpan diameter *beads* semakin membesar tampak pada Gambar 5.2.

5.4. Tekstur *Beads*

Metode pengukuran tekstur *beads* menggunakan *Texture profile analyzer* (TPA) dilakukan dengan menggunakan probe dengan gaya 8 gram dan jarak 1 mm yang akan melakukan kompresi sebesar 30% sebanyak 10x terhadap sampel yang dianalogikan sebagai gerakan mulut pada saat mengunyah atau menggigit makanan. Menurut Larmond (1976), analisis menggunakan TPA merupakan analisis multipoint karena hanya dengan sekali analisis akan didapatkan nilai beberapa parameter tekstur. Parameter tekstur yang diukur menggunakan TPA yaitu *hardness, cohessivness,* dan *springiness.*

Karakteristik matriks *beads* Ca alginat ditentukan oleh jenis dan komposisi biopolimer yang digunakan. Menurut Castilla *et al.*, (2010),

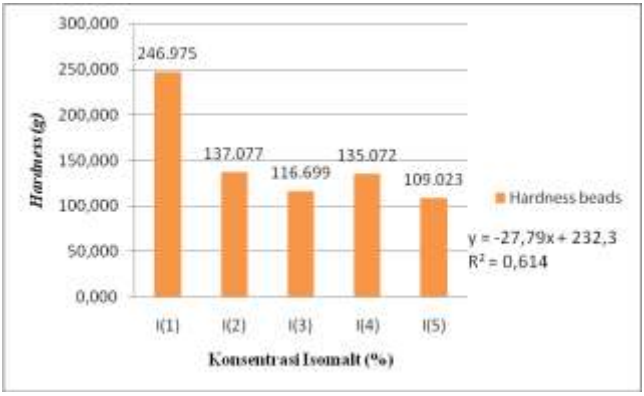
komposisi biopolimer yang digunakan dalam proses enkapsulasi akan mempengaruhi karakteristik *beads* yang dihasilkan. Selain itu,komposisi biopolimer juga akan memperngaruhi ketahanan probiotik, komposisi yang digunakan adalah isomalt. Gel Ca alginat terbentuk setelah Na alginat diteteskan ke dalam $CaCl_2$ karena ikatan silang yang terbentuk antara anion karboksilat (COO^-) dari monomer alginat dan kation divalen (Ca^{2+}) (McNeely dan Pettit, 1973).

Sultana *et al.,* (2000) dalam penelitiannya menyatakan bahwa prebiotik pati mengisi rongga-rongga matriks alginat dan membantu untuk memperkokoh struktur *beads.* Penelitian lain menurut Iyer C *et al.,* (2005), yang menggunakan prebiotik inulin, oligofruktosa, dan pati jagung tinggi amilosa (HACS) mengatakan bahwa prebiotik dapat meningkatkan fungsi *beads* atau formasi *shell* (Dimantov *et al.,* 2003). Selama penyimpanan, matriks gel akan semakin melunak oleh karena itu tidak dimungkinkan dilakukan pengujian terhadap tekstur (Krasaekoopt *et al.,* 2003).

5.4.1. *Hardness*

Hardness adalah gaya yang diberikan hingga terjadi perubahan bentuk (deformasi) pada objek (DeMan, 1985 ; Rosenthal, 1999). Semakin tinggi nilai *hardness* maka semakin besar gaya (g) yang dibutuhkan untuk menekan produk sehingga semakin keras produk itu. Pengukuran *hardness* pada *beads* yang terbentuk bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi isomalt terhadap *hardness beads* sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil. Berdasarkan hasil analisis sidik ragam, perbedaan konsentrasi isomalt tidak berpengaruh (pada $\alpha = 0{,}05$) terhadap *hardness* pada *beads* yang terbentuk. Hasil uji DMRT dan histogram pengaruh konsentrasi isomalt terhadap *hardness beads* sel *Lactobacillus acidophilus*

FNCC 0051 terimobil dapat dilihat pada Gambar 5.6. Perhitungan uji ANAVA dapat dilihat pada Lampiran M, Tabel M.2.



Gambar 5.6. Histogram Pengaruh Konsentrasi Isomalt terhadap *Hardness Beads* Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil

Hardness beads yang terukur dari konsentrasi isomalt 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5% adalah 246,98 g, 137,08 g, 116,70 g, 135,07 g, 109,02 g. Perlakuan konsentrasi isomalt tidak memberikan pengaruh nyata terhadap *hardness beads* ditunjukkan dengan nilai koefisien determinasi yang tidak mendekati satu (R^2 =0,614). Hal ini menandakan bahwa tidak ada hubungan yang erat antara konsentrasi isomalt dengan *hardness*. Semakin besar konsentrasi isomalt tidak mempengaruhi *hardness beads* yang terbentuk. Karakteristik *beads* ditentukan oleh jenis dan komposisi biopolimer yang digunakan. Menurut Sheu and Marshall (1993), konsentrasi Na alginat akan mempengaruhi struktur *beads* yang dihasilkan. Semakin besar konsentrasi yang digunakan maka semakin tinggi *hardness* yang dihasilkan.

Isomalt yang merupakan gula alkohol yang memiliki viskositas besar sehingga larutan isomalt akan mengisi rongga-rongga matriks kemudian akan memadat dan memberikan tekstur *beads* yang kokoh. Pengikatan air isomalt yang rendah menyebabkan air yang dapat diikat oleh isomalt sedikit sehingga semakin banyak cairan yang akan diperangkap kalsium alginat.

Konsentrasi alginat 2% merupakan konsentrasi yang sangat viskus dan tinggi sehingga jumlah sisi yang berikatan dengan ion Ca^{2+} semakin banyak sehingga banyak gel padat hasil ikatan silang yang terbentuk (Chandramouli *et al.*, 2004).

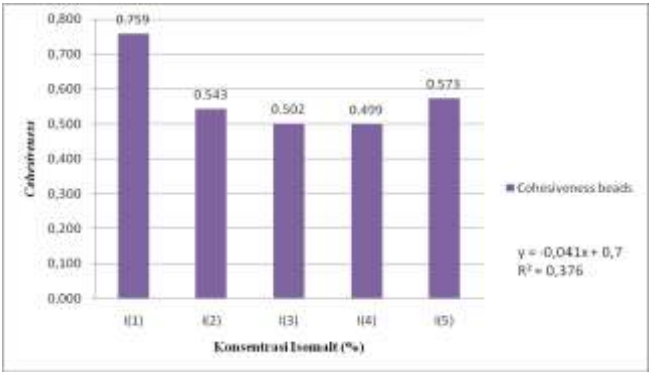
Konsentrasi isomalt 1% menunjukkan nilai *hardness* paling tinggi dikarenakan *beads* pada konsentrasi ini dicampur dengan isomalt dalam jumlah yang paling sedikit daripada konsentrasi isomalt 5%, yang berarti banyaknya ion Ca^{2+} yang banyak berikatan dengan alginat sehingga membentuk tekstur yang keras daripada konsentrasi isomalt 5%.

5.4.2. *Cohesiveness*

Cohesiveness adalah hubungan kekuatan antar bahan yang saling berinteraksi atau kekompakan antar bahan (DeMan, 1997). Semakin besar *cohesiveness beads* maka *beads* semakin kokoh. Berdasarkan hasil analisis sidik ragam, perbedaan konsentrasi isomalt tidak berpengaruh (pada α = 0,05) terhadap *cohesiveness* pada *beads* yang terbentuk. Hasil uji DMRT dan histogram pengaruh konsentrasi isomalt terhadap *cohesiveness beads* sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil dapat dilihat pada Gambar 5.8. Perhitungan uji ANAVA dapat dilihat pada Lampiran M, Tabel M.7.

Cohesiveness dari berbagai konsentrasi isomalt 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5% adalah 0,759, 0,543, 0,502, 0,499, dan 0,573. Hasil ANOVA pada α = 5% (Lampiran M) perlakuan konsentrasi isomalt tidak memberikan pengaruh nyata terhadap *cohesiveness beads* ditunjukkan dengan nilai koefisien determinasi yang tidak mendekati satu (R^2 =0,376). Hal ini menandakan bahwa tidak ada hubungan yang erat antara konsentrasi isomalt dengan *cohesiveness*. Semakin besar konsentrasi isomalt tidak mempengaruhi *cohesiveness beads* yang terbentuk. Dengan perbandingan unit M yang lebih banyak (mempengaruhi keelastisan gel) daripada unit G

pada Na alginat yang digunakan dalam penelitian ini menyebabkan kemampuan gel untuk menahan tekanan kedua setelah diberikan tekanan pertama tidak maksimal karena gel *beads* yang terbentuk rapuh



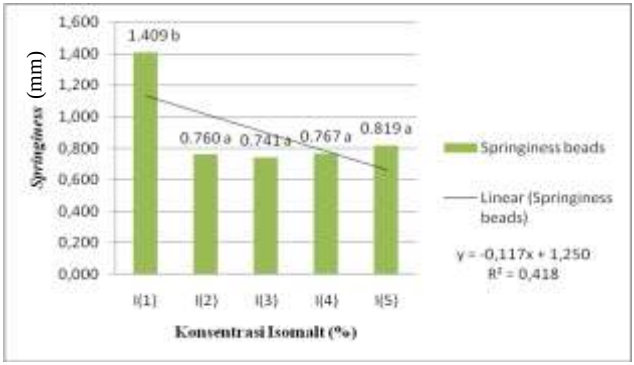
Gambar 5.7. Histogram Pengaruh Konsentrasi Isomalt terhadap *Cohesiveness Beads* Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil

5.4.3. *Springiness*

Springiness adalah laju bahan yang dideformasi kembali ke kondisi asal setelah gaya mendeformasi ditiadakan (DeMan, 1997). Semakin besar *springiness beads* maka *beads* semakin elastis. Berdasarkan hasil analisis sidik ragam, perbedaan konsentrasi isomalt tidak berpengaruh (pada α = 0,05) terhadap *springiness* pada *beads* yang terbentuk. Hasil uji DMRT dan histogram pengaruh konsentrasi isomalt terhadap *springiness beads* sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil dapat dilihat pada Gambar 5.9. Perhitungan uji ANAVA dapat dilihat pada Lampiran M, Tabel M.5.

Springiness dari berbagai konsentrasi isomalt 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5% berturut-turut adalah 1,409, 0,760, 0,741, 0,767, 0,819. Gambar 5.9. menunjukkan bahwa *springiness beads* yang terbentuk semakin menurun seiring dengan bertambahnya konsentrasi isomalt. Perlakuan konsentrasi isomalt 1% merupakan perlakuan yang memberikan pengaruh nyata

terhadap *springiness beads* yang terbentuk. Dengan bertambahnya isomalt maka kemampuannya untuk menyerap air lebih banyak karena isomalt memiliki gugus hidrofilik bebas dimana dapat menyerap air yang dapat mengganggu pembentukan gel oleh alginat (terjadi kompetisi antara isomalt dengan alginat). Fraksi dalam alginat yang banyak mempengaruhi elastisitas gel adalah unit M. Perbandingan unit M dan unit G pada alginat merk Zigma A2033-100G yang digunakan dalam penelitian ini sebesar 69:31 (Gautier *et al.*, 2011). Karena unit M lebih besar rasionya maka dengan adanya keterbatasan air untuk pembentukan gel sangat berpengaruh pada karakteristik gel terutama pada sifat elastisitas gel yang dihasilkan



Gambar 5.8. Histogram Pengaruh Konsentrasi Isomalt terhadap S*pringiness Beads* Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil

BAB VI
PENUTUP

6.1. Kesimpulan

1. Perlakuan perbedaan konsentrasi isomalt berpengaruh nyata terhadap ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung tetapi perlakuan lama penyimpanan dan interaksi kedua perlakuan tersebut tidak nyata.
2. Perlakuan perbedaan konsentrasi isomalt dan lama penyimpanan berpengaruh nyata terhadap ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada garam empedu tetapi tidak terdapat interaksi diantara kedua perlakuan tersebut.
3. Konsentrasi isomalt 3% merupakan konsentrasi terbaik yang dapat mempertahankan ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung dan garam empedu.
4. Ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada garam empedu makin meningkat seiring lamanya penyimpanan pada hari ke-21.
5. Tekstur *beads* yang dihasilkan memiliki nilai *hardness, cohesiveness,* dan *springiness* berkisar antara 109,023 g - 246,975 g; 0,499 - 0,759; 0,741 mm - 1,409 mm.

6.2.Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang ketahanan sel imobil secara in vivo.

DAFTAR PUSTAKA

Adhikari, K., A. Mustapha, I.U. Grun, and L. Fernando. 2000. Viability of Microencapsulated *Bifidobacteria* in Set Yoghurt During Refrigerated Storage. *J. Dairy Sci*. 83:1946-1951.

Adolfsson, O., S.N. Meydani, and R.M. Russell. 2004. Yogurt and Gut Function. *Am. J. Clin Nutr*, 80:245–256.

Adrianto, A., Ari., M. Rahayuningsih, S. Yuliani. 2011. *Encapsulation of Lactobacillus casei Using Extrusion Technique As Starter Culture for Production of Dadih from Cow Milk.* http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/51162 (15 Januari 2014).

Akhiar, N.S.A.M. 2010. Enhancement of Probiotics Survival by Microencapsulation with Alginate and Prebiotics. Michigan. *MMG 445 Basis Biotechnology* 6:13-18.

Alexandra, Drakoularakou, O. Hasselwander, M. Edinburgh and A.C. Ouwehand. 2007. Lactitol, an Emerging Prebiotic: Functional Properties with a Focus on Digestive Health. USA. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods* 3(7):73-82.

Amir, M., S.H. Razavi, M.R. Ehsani, and S. Sohrabvandi. 2007. Principles and Methods of Microencapsulation of Probiotic Microorganisms. *Ir. J. Biotec,* 5:1.

Anal, A.K. and H. Singh. 2007. Recent Advances in Microen-Capsulation of Probiotics for Industrial Applications and Targeted Delivery. *Trends Food Sci Technol,* 18: 240-251.

Anggarini, W. 2011. *Effect Of Indigenous Probiotic in Synbiotic Yoghurt Toward Histological Profile And Imunoglobulin A (Iga) Content in Small Intestine of Mice*. IPB.

Anjani, K., C. Iyer, and K. Kailasapathy. 2004. Survival of Co-Encapsulated Complementary Probiotics and Prebiotics in Yoghurt. *Milchwissenschaft,* 59 (7–8):396–399.

Ann E.Y., Y. Kim, S. Oh, J.Y. Imm, D.J. Park, K.S. Han, dan S.H. Kim. 2007. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with Prebiotic Substrates Using a Hybridisation System. *Int. J. Food Sci. Technol*, 42: 411–419.

Anomynous. 2007. Bab 2 Tinjauan Pustaka. http://repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/16857/4/Chapter%20II.pdf. (24 November 2013)

Audet, P., C. Paguin, and C. Lacroix. 1988. Immobilized Growing Lactic Acid Bacteria with K-Carrageenan-Locust Bean Gum Gel. *Appl Microbio and Biotechnol*. 29(1):11-18.

Banwart, G. J. 1981. *Basic Food Microbiolgy*. Abridged Ed. Westport: AVI Publishing Company, Inc.

Bar, A. 1990. *Factorial Calculation Model for the Estimation of the Physiological Caloric Value of Polyols in Caloric Evaluation of Carbohydrates*. [N Hosoya, editor]. Tokyo: Research Foundation for Sugar Metabolism. pp. 209-257.

Bender, G.R. and R.E. Marquis. 1987. Membrane ATPases and Acid Tolerance of Actinomyces Viscosus and *Lactobacillus casei. Appl. Environment Microbiology*. 53:2124-2218.

Bernardeau, M., J.P. Vernoux, D.S. Henri, and M. Guéguen. 2008. Safety Assessment of Dairy Microorganisms: The *Lactobacillus Genus. Int J. Food Microbiol*, 126:278-285.

Berrada, N., J.F. Lemeland, G. Laroch, P. Thouvenot, and M. Piaia. 1991. *Bifidobacterium* from Fermented Milks: Survival during Gastric Transit. *J. Dairy Sci*. 74:409–413.

Betsi G.I., E. Papadavid, and M.E. Falagas. 2008. Probiotics for the Treatment or Prevention of Atopic Dermatitis: a Review of The Evidence from Randomized Controlled Trials, *Am. J. Clin Dermatol*. 9(2):93-103.

Bezkorovainy**,** A**.** 2001**.** Probiotics: Determinants of Survival and Growth in the Gut. *Am J Clin Nutr*. 73(2 Suppl):399S-405S.

Binns, C. 2013. Probiotics, Prebiotics and The Gut Microbiata. *Int. Life Sci. Inst.* 32

Boehm, G., and B. Stahl. 2003. Oligosaccharides, (dalam *Functional Dairy Products*, T. Mattila-Sandholm and M. Saarela, Ed.). Woodhead Publishing, Cambridge, United Kingdom. p. 203-243.

Bolhuis, G.K, E.G. Rexwinkel, and K. Zuurman. 2009. Poliols as Filler Binders for Disintegrating Tablets Prepared by Direct Compaction. Netherlands. *Drug Dev Ind Pharm*. 35(6):671-7

Cahoney. 2013. *Lactobacillus achidophilus*. Retrieved available at : http://cahoney-lacidophilus.pbworks.com/w/page/6327467/Structure. [1 September 2013]

Cahyanti, A.N. 2008. Kajian Pertumbuhan Probiotik *Lactobacillus acidophilus* dan Kandungan Asam Lemak Dalam Susu Kambing Fermentasi Selama Penyimpanan. *Jurnal Teknologi Pangan dan Hasil pertanian* 5(2): 72-81.

Capela, P., T. K. C. Hay, and N.P. Shah. 2006. Effect of Cryoprotectants, Prebiotics and Microencapsulation on Survival of Probiotic Organisms in Yoghurt and Freeze–Dried Yoghurt. *Food Res. Int*, 39(2):203–211.

Cardenas, A., W.A. Monal, F.M. Goycoolea, I.H. Ciapara, and C. Peniche. 2003. Diffusion Through Membranes of The Polyelec-Trolyte Complex of Chitosan and Alginate. *Macromol. Biosci.* 3:535-539.

Casiano, C. A., and R.E. Marquis. 1998. Role of The Arginine Deiminase System In Protecting Oral Bacteria and an Enzymatic Basis for Acid Tolerance. *Appl Environ Microbiol*. 54(6):1318–1324

Castilla, O.S., C.L. Calleros, H.S.G. Galindo, J.A. Ramrez and E.J.V. Carter. 2010. Textural Properties Alginate-Pectin Beads and Survivability of Entrapped *Lactobacillus Casei* in Simulated Gastrointestinal Conditions and Yoghurt. *Food Res. Int.*, 43:111-117.

Champagne, C.P., C. Gaudy, D. Poncelet, and R.J. Neufeld. 1992a. *Lactococcus Lactis* Release from Alginate Beads. *Appl. Environ. Microbiol*, 58:1429-1434.

Champagne, C.P., N. Morin, R. Couture, C. Gagnon, P. Jelen, and C. Lacroix. 1992b. The Potential of Immobilized Cell Technology to Produce Freeze-Dried, Phage-Protectd Cultures of *Lactococcus Latis*. *Food Res. Int*, 25:419-427.

Chandramouli, V., K. Kailasapathy, P. Peiris and M.Jones. 2004. An Improved Method of Microencapsulation and Its Evaluation to Protect *Lactobacillus spp*. In Simulated Gastric Condition. *J. of Microbiol Methods* 56:27–35.

Chen, Y.S., F. Yanagida, and T. Shinohara. 2005. Optimization of Incorporated Prebiotics as Coating Materials for Probiotic Microencapsulation. Taiwan. *J. Of Food Sci*. 70(5):261-266.

Chou, L.S. and B. Weimer. 1999. Isolation and Characterization of Acid and Bile Tolerant Isolates from Strains of *Lactobacillus acidophilus*., *J. Dairy Sci*. 62:23-31.

Claesson, M.J., D.V. Sinderen and P.W. O'Toole. 2007. The Genus *Lactobacillus*– A Genomic Basis for Understanding Its Diversity. *FEMS Microbiol. Lett.* 269:22-28.

Collado, M.C., E. Isolauri, S. Salmien and Y. Sanz. 2009. The Impact of Probiotic on Gut Health. *Curr Drug Metab.* 10(1):68-78.

Corzo, G., and S.E. Gililand. 1999. Measurement of Bile Salt Hydrolize Activity from Strains of *L. acidophilus*. *J. Dairy Sci*. 82:23-31

Cui, J.H., J.S. Goh, P.H. Kim, S.H. Choi, and B.J. Lee. 2000. Survival and Stability of *Bifidobacteria* Located in Alginate Poly-L-Lysine Micropartcles. *Int J. Pharm*, 210:51-59

Cummings J.H., G.T. Macfarlane and H.N. Englyst. 2001. Prebiotic Digestion and Fermentation. *Am. J. Clin. Nutr* 73:415S–420S.

Dave, R.I. and N.P. Shah. 1997. Viability of Yoghurt and Probiotic Bacteria in Yoghurts Made From Commercial Starters Cultures. *Int. Dairy. J.* 7:31-41.

de Moreno, A. de LeBlanc, G.C. Maldonado, S. Chaves, and G. Perdigó. 2005. Oral administration of *L. casei* CRL 431 Increases Immunity in Bronchus and Mammary Glands. *Europ J Inflamm*. 3(1):23–28.

De Smet, I., L.V. Hoorde, L.M.V. Woestyne, M.H. Christianens, W. Verstraete. 1995. Significance of Bile Salt Hydrolytic Activities of *Lactobacilli*. *J. Appl Bacteriol*. 79:292-301.

de Vrese, M. and B. Offick. 2010. Probitics and Prebiotics Effect on Diarrhea, (dalam *Bioactive Foods in Promoting Health : Probiotics and Prebiotics*, Ronald Ross Watson and Victor R. Preedy, Eds.),. Elsevier Applied Science: Oxford.

Dewanti, T. 2006. *Pangan Fungsional: Makanan untuk Kesehatan*. Malang : Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Brawijaya.

Dimantov, A., M. Greenberg, E. Kesselman and Shimoni. 2003. Study of High Amylase Corn Starch as Food Grade Enteric Coating in A Microcapsule Model Systems. *Innov. Food Sci. Eng. Technol*. 5:93-100.

Dommels, Y.E.M., R.A. Kemperman, Y.E.M.P. Zebregs and R.B. Draaisma. 2009. Survival of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and *Lactobacilus rhamnosus* GG in the Human gastrointestinal Tract with Daily Consumption of A Low-Fat Probiotic Spread. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(19):6198-204.

Drouault, S., G. Gorthier, S.D. Ehrlich and P. Renault. 1999. Survival, Physiology and Lysis of *Lactococcus lactis* in The Digestive Tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4881-4886.

Du Toit M, C.M. Franz, L.M. Dicks, U. Schillinger, P. Harberer, B. Warlies, F. Ahrens, W.H. Holzapfel. 1998. Characterisation and Selection of Probiotic *Lactobacilli* for a Preliminary Minipig Feeding Trial and Their Effect on Serum Cholesterol Levels, Faeces pH, and Faeces Moisture Content. *Int J Food Microbiol*. 40:93-104.

Eckles, C.H., W.B. Comb and H. Macy. 1951. *Milk and Milk Product*. 4th Edition. New York: Mc Graw-Hill Book Company, Inc.

Effendi, H.M.S. 2009. *Teknologi Pengolahan dan Pengawetan Pangan*. Bandung: Alfabeta.

Eikmeier, H. and H.J. Rehm. 1987. Stability of Calcium-Alginate During Citric Acid Production of Immobilized *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 26:105-111.

Elkins, C.A., S.A. Moser, D.C. Savage. 2001. Genes Encoding Bile Salt Hydrolases and Conjugated Bile Salt Transporters In *Lactobacillus* Johnsonii 100-100 and Other *Lactobacillus* Species. *Microbiology*. 147:3403-12.

Ellenton, J.C. 1998. *Encapsulation Bifidobacteria*. Master thesis. University of Guelph.

Evans, P.R., C. Piesse, Y.T. Bak, and J.E. Kellow. 1998. Fructose-Sorbitol Malabsorption and Symptom Provocation in Irritable Bowel Syndrome: Relationship to Enteric Hypersensitivity and Dysmotility. *Scand. J. Gastroenterol* 33:1158–1163.

Fahimdanesh, M., N. Mohammadi, H. Ahari, M.A.K. Zanjani, F.Z. Hargalani and K. Behrouznasab. 2012. Effect of Microencapsulation plus Resistant Starch on Survival of *Lactobacillus Casei* and *Bifidobacterium Bifidum* in Mayonnaise Sauce. *Afr. J.Microbiol. Res.* 6:6853-6858.

FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, 2000. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London.

FAO/WHO. 2001. *Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.* Amerian Cordoba Park Hotel, Cordoba, Argentina.

FAO/WHO. 2002. *Guidelines For The Evaluation Of Probiotics In Food. Report Of A Joint FAO/WHO Working Group On Drafting Guidelines For The Evaluation Of Probiotics In Food.* London Ontario, Canada: World Health Oraganization.

FAO/WHO. 2007. *FAO Technical Meeting on Prebiotics.* Italy.

Fardiaz, S. 1989. *Mikrobiologi Pangan: Penuntun Praktek Laboratorium*. Bogor: IPB Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi.

Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka.

Fuller, F.R. 1992. Probiotics: the Scientific Basis. London: Chapman & Halluller.

Fernandez, B.F., M.E. Pardo, P. Humbert, R. Leon, J.M. Lovet and M.A. Gassull. 1991. Role of Fructose-Sorbitol Malabsorption in the Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 101: 1453–1454.

Fooks, L.J., R. Fuller, and G.R. Gibson. 1999. Prebiotics, Probiotics and Human Gut Microbiology. *Int. Dairy J*, 9:53-61.

Franck, A. 2000. Prebiotics and Calcium Absorption In Functional Foods, (F Angus and C Miller, editors). Surrey: Leatherhead Publishing. 108–113.

Gautier, A., B. Carpentier, M. Dufresne, Q. Vu Dinh, P. Paullier and C. Legallais. 2011. Impact of Alginate Type and Bead Diameter On Mass Transfers and The Metabolic Activities of Encapsulated C3a Cells In Bioartificial Liver Applications.*European Cells and Materials* 21: 94-106.

Gee, J.M., D. Cooke, S. Gorick, G.M. Wortley, R.H. Greenwood, A. Zumbe and I.T. Johnson. 1991. Effects of Conventional Sucrose-Based, Fructose-Based and Isomalt-Based Chocolates on Post Prandial Metabolism in Non-Insulin Dependent Diabetics. *Eur. J. Clin. Nutr.* 45:561–566.

Gehring, F. and Karle, E.J. 1981. Sweetening Agent, Palatinit Under Specific Consideration As to Microbiological and Caries-Prophylactic Aspects. *Z Ernahrungswiss* 20:96–106.

Gibson, G.R. and Fuller, R. 1998. Probiotics And Prebiotics: Microbes On The Menu. Carbohydrates 9:1–3.

Gilliland, S.E. and Speck, M.L. 1977. Instability of *Lactobacillus acidophilus* in Yoghurt. *J. Dairy Sci*., 60:1394 -1397.

Gilliland, S.E. 1989. *Acidophilus* Milk Products; A Review of Potential Benefits to Consumers, *J. Dairy Sci*. 72:2483-94.

Gmeiner, M., W. Kneifel, K.D. Kulbe, R. Wouters, P. De Boever, L. Nollet, and W. Verstraete. 2000. Influence of a Synbiotic Mixture Consisting of *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and A Fructooligosaccharide Preparation on The Microbial Ecology Sustained in a Simulation of The Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME reactor). *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 53:219-223.

Gostner, A., M. Blaut, V. Schaffer, G. Kozianowski, S. Theis, M. Klingeberg, Y. Dombrowski, D. Martin, S. Ehrhardt, D. Taras, A. Schwiertz, B. Kleessen, H. Lu¨hrs, J. Schauber, D. Dorbath, T. Menzel and W. Scheppach. 2006. Effect of Isomalt Consumption on Faecal Microflora and Colonic Metabolism in Healthy Volunteers. Brit, *J. Nutr*, 95(1):40–50.

Gouin, S. 2004. Microencapsulation-Industrial Appraisal of Existing Technologies and Trend. *Trends Food Sci Technol*. 15:330-347.

Hartati, S., E. Harmayani, E.S. Rahayu, dan T. Utami. 2002. Viabilitas dan Stabilitas *Lactobacillus plantarum* Mut7 FNCC 250 yang Disuplementasikan dalam Sari Buah Pepaya-Nanas selama Penyimpanan. *Dalam Seminar Nasional dan Pertemuan Tahunan Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia* (PATPI): 133-138.

Harti, A.S., R.A. Samsumaharto, Hosea. 2012. Efek Penambahan Chito-Oligosakarida sebagai Prebiotik terhadap Pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 secara *In Vitro*. *Jurnal Biomedika.* 5(1).

Haralampu, S.G. 2000. Resistant starch – a review of The Physical Properties and Biological Impact of RS3. *Carboh. Polym*. 41:285–292.

Hardiningsih, R., R.N.R. Napitupulu dan T. Yulinery. 2006. Isolasi dan Uji Resistensi Beberapa Isolat *Lactobacillus* pada pH Rendah. *Biodiversitas*, 7(1):15-17.

Hidaka, H, T. Eida, and T. Takizawa. 1986. Effects of Fructooligosaccharides on Intestinal Flora and Human Health. Bifidobact *Microfl* 5:37–50.

Hill, M.J. 1995. Role of Gut Bacteria In Human Toxicology and Pharmacology. Taylor and Francis, New York. pp.131-142.

Hoier, E. 1992. Use Probiotic Starter Culture In Dairy Products. *J. Food Australia*. 9(44): 418-420

Holcomb, J.E., J.F. Frank, and J.U. Mcgregor. 1991. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in Soft-Serve Frozen Yogurt. *Cult. Dairy Prod. J*. 26(3):4-5

Holzaspfel, W.H. and U. Schillinger, 2001. Introduction to Pre- and Probiotics. *Food Research International* 35: 109-16.

Homayouni, A., A. Azizi, M.R. Ehsani, M.S. Yarmand, and S.H. Razavi. 2008. Effect of Microencapsulation and Resistant Starch on The Probiotic Survival and Sensory Properties of Synbiotic Ice Cream. *Food Chem*, 111(1): 50–55.

Hoover, D.G. 1993. *Bifidobacteria* : Activity and Potential Benefits, *J. Food Technol*. 43 (6):120 - 124.

Hui, Y.H. (Ed). 1992. *Encyclopedia of Food Science and Technologi*. Canada: John Wiley and Sons, Inc

Hutkins, E.W. and N.L. Nannen. 1993. pH Homeostasis in Lactic Acid Bacteria. *J. Dairy Sci.* 76: 2354-2365.

Hutter, R. ,F. Boswart, and K. Irsigler. 1993. Insulin Verbrauch Von Typ-I-Diabetikern nach Oraler Gabe Von Isomalt. *Akt Ernahr* 18:149–154.

Indriati, M. 2009. Karakteristik Mikrobiologis Kultur Starter Bakteri Indigenous Dadih Susu Kerbau dengan Sinbiotik Terenkapsulasi dalam Bentuk Granul, *Skripsi S-1*. Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.

ISAPP. 2009. Clarification of the Definition of a Probiotic. Retrieved Available at: www.isapp.net. (21 Juni 2013).

Jacobsen, C.N., N.V. Rosenfeldt, A.E. Hayford, P.L. Moller, K.F. Michaelsen, A. Paerregaard, B. Sandstrom, M. Tvede, and M. Jakobsen. 1999. Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven

Strains of *Lactobacillus spp.* by In Vitro Techniques and Evaluation of The Colonization Ability of Five Selected Strains In Humans. *Appl. Environ. Microbiol*. 65: 4949-4956

Jankowski, T., M. Zielinska, and Wysakowska. 1997. Encapsulation of Lactic and Bacteria with Alginate/Starch Capsules. *Biotechnol Technol*. 11:31-34

Jvo, S**.** 2013. *Microbiology Focus Edition 1.1*. http://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/articles/microbiology-focus/lactobacilli.html (8 Desember 2013).

Kailasapathy, K. 2002. Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. Current Issues in Intestinal

Kallasapathy, K and S. Rybka. 1997. *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.: Their Therapeutic Potential and Survival in Yogurt. *The Australian J. Dairy Technol*. 52:28-35

Kearney, L., M. Upton, and A. Loughlin. 1990. Enhancing The Viability of *Lactobacillus Plantarum* Inoculum by Immobilizing The Cells in Calcium-Alginate Beads Incorporating Cryoprotectants. *Appl Environ Microbiol.* 56: 3112-3116

Kebary, K.M.K., S.A. Hussein and R.M. Badawi. 1998. Improving Viability of *Bifidobacterium* and Their Effect on Frozen Ice Milk. *J. Dairy Sci.* 26:319-337.

Khalil, A.H. and E.H. Mansour. 1998. Alginate Encapsulated *Bifidobacteria* Survival in Mayonnaise. *J. Food Sci*. 63:702-705.

Khazaeli, P., A. Pardakhty and F. Hassanzadeh. 2008. Formulation of Ibuprofen Beads by Ionotropic Gelation. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 7(3):163-170.

Khoiriyah, L.K. dan Fatchiyah. 2013. Karakter Biokimia dan Profil Protein Yoghurt Kambing PE Difermentasi Bakteri Asam Laktat (BAL). *J. Exp. Life Sci. Vol.* 3(1): 2338-1655.

Kim, K.I., Y.J. Baek, and Y.H. Yoon. 1996. Effects of Rehydration Media and Immobilisation in Calcium-Alginate on the Survival of

Lactobacillus Casei and Bifidobacterium Bifidum. *J. Dairy Sci*. 18:193-198.

Kimestri, A.B., F. Maruddin, Hajrahwati. 2013. Pengaruh Sukrosa terhadap Jumlah Bakteri dan Karakteristik Kimia pada Whey Kerbau Fermentasi. *Jurnal Hasil Penelitian*

King, A.H. 1995. Encapsulation of Food Ingredients: A Review of Available Technology, Focussing on Hydrocolloids, (dalam *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*, ACS Symposium Series 590, Ed. oleh Sara J. Risch and Gary A. Reineccius). *American Chemical Society*, Washington DC.pp: 26-39.

Klaenhammer, T. R., R. Barrangou, B.L. Buck, P.M.A. Azcarate, and E. Altermann. 2005. Genomic features of Lactic Acid Bacteria effecting Bioprocessing and Health. *FEMS Microbiol Rev* 29:393-409.

Kleessen, B., G. Stoof, J. Proll, D. Schmied, J. Noack and M. Blaut. 1997. Feeding Resistant Starch Affects Fecal and Microflora and Short Chain Fatty Acid in Rats. *J Animal Sci*. 75:2453-2462.

Klien, J., J. Stock and K.D. Vorlop. 1983. Pore Size and Properties of Spherical Calcium Alginate Biocatalysts. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol*. 18:86-91.

Klinkenberg, G., Lystad, K.Q., Levine, D.W. and Dyrset, N. 2001. Cell Release from Alginate-Immobilized *Lactococcus Lactis Sp*. Lactis In Chitosan and Alginate Coated Beads. *J. Dairy Sci*. 84:1118–1127.

Kobayashi, H. 1985. A-proton-translocating ATPase regulates pH of the Bacterial. *J. Biologic Chem*. 260:72-76

Krasaekoopt, W., Bhesh, Bhandari and H. Deeth. 2003. Evaluation of Encapsulation Techniques of Probiotics for Yoghurt. *Int. Dairy J.*, 13(1):3–13.

Krasaekoopt, W., Bhesh, Bhandari and H. Deeth. 2004. The Influence of Coating Materials on Some Properties of Alginate Beads and Survivability of Microencapsulated Probiotic Bacteria. *Int. Dairy J*, 14(8):737–743.

Kritchevsky, D. 1995. Epidemiology of Fiber, Resistant Starch and Colorectal Cancer. *Eur J. Cancer Prev*. 4: 345-352.

Kusumawati, N. 2002. Seleksi Bakteri Asam Laktat Indigenus sebagai Galur Probiotik dengan Kemampuan Mempertahankan Keseimbangan Mikroflora Usus Feses dan Mereduksi Kolesterol Serum Darah Tikus. *Tesis*. Program Studi Ilmu Pangan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Lacroix, C., C. Paquin and J.P. Arnaud. 1990. Batch Fermentation with Entrapped Cells of *Lactobacillus casei*: Optimization The Rheological Properties of The Entrapment Gel Matrix. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 403-408.

Langkilde, A.M., H. Andersson, T.F. Schweizer and P. Wursch. 1994. Digestion and Absorption of Sorbitol, Maltitol and Isomalt from The Small Bowel. A Study In Ileostomy Subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 48: 768–775.

Lankaputhra, W.E.V. and N.P. Shah. 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* in the Presence of Acid and Bile Salts. *Cult. Dairy Prod. J*. 30:2-7

Larisch, B.C, D. Poncelet, C.P. Champagne and R.J. Neufeld. 1994. Microencapsulation of *Lactococcus lactis subsp*. Creamoris. *J Microencap.* 11: 189-195.

Larmond, E. 1976. The Texture Profile. In: "Rheology and Texture in Food Quality", (Eds.): de Man, J. M., Voisey, P. W., Rasper, V. F. and Stanley D. W.. AVI Publishing, Westport, *Ireland*, PP. 546-553,

Laroia, S. and Martin, J.H. 1991. Effect of pH on Survival of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* In Frozen Fermented Dairy Desserts. *Cult. Dairy Prod. J.*, 26: 13-21.

Le Blay, G., C. Michel, H.M. Blottiere and C. Cherbut. 1999. Enhancement of Butyrate Production in The Rat Caecocolonic Tract by Long-Term Ingestion O Resistant Potato Starch. *Brit. J. Nut.* 82:419-426.

Lee, K.I. and T.R. Heo. 2000. Survival of *Bifidobacterium Longum* Immobilized in Calcium Alginate Beads in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution. *Appl. Environ. Microbiol*. 66: 869-973.

Lian, W.C, H.C. Hsio, and C.C. Chou. 2003. Viability of Microencapsulated *Bifidobacteria* in Simulated Gastric Juice and Bile Solution. *Int. J. Food Microbiol* 86:293-301.

Liong, M.T. 2008. Roles of Probiotics and Prebiotics in Colon Cancer Prevention: Postulated Mechanisms and In-vivo Evidence. *Int. J. Mol. Sci.* 9(5):854-863.

Lisal, J.S. 2005. Konsep Probiotik dan Prebiotik untuk Modulasi Mikrobiota Usus Besar. *Medical Nusantara* 26 : 256-262.

Liu, J.R., B. Yu, F.H. Liu, K.J. Cheng, and X. Zhao. 2005. Expression Rumen Microbial Fibrolytic Enzyme Genes in Probiotic *Lactobacillus Reuteri*. *Appl and Environmental Microbiology*, 71:6769–6775.

Livesey, G. 2003. Health Potential of Polyols As Sugar Replacers, with Emphasis on Low Glycaemic Properties. *Nutr Res* Rev 16:163–191.

Lye, H.S., G. Rusul and M.T. Liong, 2010. Removal of Cholesterol by *Lactobacilli* via Incorporation and Conversion to Coprostanol. *J. Dairy Sci*. 93:1383-1392.

Macfarlane, G.T. and J.H. Gummings. 1991. The Colonic Flora, Fermention and Large Bowel Digestive Function. In SF Phillips, JH Pemberton and RG Shorter (Eds.). *The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease*. New York: Raven Press.

Macfarlane G., H. Steed, and S. Macfarlane. 2008. Bacterial Metabolism and Health Related Effects of Galactooligosaccharides and other Prebiotics. *J. Appl. Microbiol.* 104: 305–344.

Maduningsih, G.L. 2008. Stabilitas Bakteri Probiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacterium longum dalam* Yogurt Susu Kambing di dalam Saluran Pencernaan Tikus. *[Skripsi]*. Program

Studi Teknologi Hasil Ternak, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Mahoney, J.E. 1998. Immobility and Falls. *Clin Geriatr Med*. 14(4):699-726.

Makarova, K., A. Slesarev, Y. Wolf, A. Sorokin, B. Mirkin, E. Koonin, A. Pavlov, N. Pavlova, V. Karamychev, N. Polouchine, V. Shakhova, I. Grigoriev, Y. Lou, D. Rohksar, S. Lucas, K. Huang, D. M. Goodstein, T. Hawkins, V. Plengvidhya, D. Welker, J. Hughes, Y. Goh, A. Benson, K. Baldwin, J.-H. Lee, I. Díaz-Muñiz, B. Dosti, V. Smeianov, W. Wechter, R. Barabote, G. Lorca, E. Altermann, R. Barrangou, B. Ganesan, Y. Xie, H. Rawsthorne, D. Tamir, C. Parker, F. Breidt, J. Broadbent, R. Hutkins, D. O'Sullivan, J. Steele, G. Unlu, M. Saier, T. Klaenhammer, P. Richardson,S. Kozyavkin, B. Weimer, and D. Mills. 2006. Comparative Genomics of The Lactic Acid Bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 103(42):15611–15616

Mandal, S., A.K. Puniya, and Singh, K. 2006. Effect of Alginate Concentration on Survival of Encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *Int Dairy J.* 16:1190-1195.

Mariani E. dan H. Susanti. 2012. Pengaruh Suplementasi Tepung Terigu terhadap Pertumbuhan dan Laju Pengasaman Probiotik *Lactobacillus acidophilus. J. Teknol dan Industri Pertanian Indonesia*, 4:3

Martinsen, A., B.C. Skjak and Smidsrod. 1989. Alginate as Immobilization Material: 1. Correlation Between Chemical And Physical Properties of Alginate Gel Beads. *Biotechnol Bioeng.* 33:79-89.

Martinez, V.C., C.A. Cardelle, N. Corzo, A. Olano, and M. Villamiel. 2008. Enzymatic Synthesis and Identification of Two Trisaccharides Produced from Lactulose by Transgalactosylation. *Food Chemistry*. 107:258-264.

Marx, J.L. 1989. *Arevolution in Biotechnology*. Cambridge: Cambridge University.

Mc Neely, W.H and D.J. Petitt. 1973. *Algin Industrial Gum Polysacharides and Their Derivates*. New York: Academic Press.

Meydani, S.N. and W.K. Ha. 2000. Immunologic Effects of Yoghurt. *Am. J. Clin. Nutr*. 71(4):861-72.

Mitchell, H. 2006. *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*. UK: Blackwell Publishing Ltd.

Möller, C and M. de Verse. 2004. Review: Probiotic Effects of Selected Acid Bacteria. *Milchwissenschaft*. 59:597-600.

Monedero, V., G.P. Martines, and M. Yebra. 2010. Perspectives of Engineering Lactic Acid Bacteria for Biotechnological Polyol Production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86: 1003–1015.

Morelli, L, D. Zonenschain, M.L. Callegari, E. Grossi, F. Maisano, and M. Fusillo. 2003. Assessment of a New Synbiotic Preparation in Healthy Volunteers: Survival, Persistence of Probiotic Strains and Its Effect on the Indigenous Flora, *J. Nutr.* 2:11.

Mortazavian A, S.H. Razavi, M.R. Ehsani and S. Sohrabvandi. 2007. Principles and Methods of Microencapsulation of Probiotic Microorganisms, Ir. *J. Biotech*. 5(1):1-18.

Moser S.A and D.C. Savage. 2001. Genes Encoding Bile Salt Hydrolases and Conjugated Bile Salt Transporters In *Lactobacillus Johnsonii* 100-100 and Other *Lactobacillus* Species**.** *Microbiology*.147:3403.

Mozzi, F., G. Rollan, G.S. Giori and G.F.G. Valdez. 2001. Effect of Galactose and Glucose on The Exopolysaccharide Production and The Activities of Biosynthetic Enzymes in *Lactobacillus casei* CRL 87. *J. Appl. Microbiol.* 91:160-7.

Muchtadi, T.R. dan Sugiono. 1992. *Ilmu Pengetahuan Bahan Pangan*. Bogor: Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Institut Pertanian Bogor.

Muir, J.G., Z.X. Lu, G.P. Young, D.C. Smith, G.R. Dollier and D. O'DeaK. 1995. Resistant Starch in The Diet Increase Breathe Hydrogen and Serum Acetate in Human Subjects. *American J. Clin. Nutr*. 61:792-799.

Murtiari, E. 2012. Total Probiotik Susu Kambing Fermentasi Menggunakan Starter Probiotik *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Selama

Inkubasi. Semarang. *Jurnal Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian Vol.* 7(1) : 28-37.

Nabors, L.O. and R.C. Gelardi. 1991. *Alternative Sweeteners*, 2 ed. New York: Marcel Dekker, Inc., p.194.

Naidu, A.S. and R.A. Clemens. 2000. Probiotics. In: Naidu A.S. (ed.) *Natural Food Antimicrobial Systems.* Florida: CRC Press.

Natalia, L. dan A. Priadi. 2006. Sifat *Lactobacilli* yang Diisolasi dari Usus Ayam sebagai Probiotik. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. Balai Penelitian Veteriner, Bogor.

Nazzaro, F., F. Fratianni, R. Coppola, A. Sada and P. Orlando. 2009. Fermentative Ability of Alginate-Prebiotic Encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and Survival under Simulated Gastrointestinal Conditions. *J. Funct. Foods.* 1(3):319-323.

Ngatirah, A., E.S. Harmayani dan T. Utami. 2000. Seleksi Bakteri Asam Laktat Sebagai Agensia Probiotik yang Berpotensi Menurunkan Kolesterol. *Pros. Seminar Nas. Industri Pangan*. PATPI (II):63-70.

Niness, K. 1999. Breakfast Foods and The Health Benefits of Inulin and Oligofructose. *Cereal Foods Worlds* 43(1):79-81.

Noh, D.O., S.H. Kim and S.E. Gilliland. 1997. Incorporation of Cholesterol into The Celluler Membrane of *Lactobacillus acidophillus* ATCC 4321. *J. Dairy Sci.* 80 (12) : 3107-3113.

Nussinovitch, A. 1997. *Hydrocolloid Aplication. Gum Technology in The Food and Other Industries*. an Inprint of Chapman and Hall. Londonweinheim-New York-Tokyomelbourne-Madras. P247-264.

Oh, S, S.H. Kim, R.W. Worobo. Characterization and Purification of a Bacteriocin Produced by a Potential Probiotic Culture, *L. acidophilus* 30 SC. *J. Dairy Sci.* 83:2747-2754.

O'Sullivan, O., J. O'Callaghan, A. S. Vegas, O. McAuliffe, L. Slattery, P. Kaleta, M. Callanan, G. F. Fitzgerald, R. P. Ross, and T. Beresford. 2009. Comparative Genomics of Lactic Acid Bacteria Reveals A Niche-Specific Gene Set. *BMC Microbiol*. 9:1471-2180.

Pelczar, M.J. dan E.C.S. Chan. 1988. Dasar-Dasar Mikrobiologi Terjemahan: Universitas Indonesia Press, Jakarta.

Petzoldt, R., P. Lauer, M. Spengler and K. Schoffling. 1982. Palatinite in Type II Diabetics. Effect on Blood Glucose, Serum-insulin, C-Peptide and Free Fatty Acids. *Dtsch. Med. Wochenschr* 107:1910–1913.

Phillips, J., J.G. Muir, A. Birkett, Z.X. Lu, G.P. Jones, K. O'Dea and G.P. Young. 1995. Effect of Resistant Starch on Fecal Bulk and Fermentation-Dependent Events in Human. *American J. Clin. Nut.* 62:121-130.

Picot, A. and Lacroix, C. 2004. Encapsulation of Bifidobacteria in Whey Protein-Based Microcapsules and Survival in Stimulated Gastrointestinal Conditions and in Yoghurt. *Int. Dairy J*, 14(6):505–515.

Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: UI-Press.

Prangdimurti, E., Palupi, N.S. and Zakaria, F.R. 2007. *Metode Evaluasi Nilai Biologis Karbohidrat dan Lemak*. http://xa.yimg.com/kq/groups/20875559/932235840/name/modul12.pdf (24 Oktober 2013)

Prévost, H. and Diviès, C. 1992. Cream Fermentations by a Mixed Culture of *Lactococci* Entrapped in Two- Layer Calcium Alginate Gel Beads. *Biotechnol*. Lett. 14:583-588.

Rahayu, E. S. 2008. *Probiotic for Digestive Health. Food Review-Referensi industri dan teknologi pangan Indonesia*. Retrieved Available at: http://www.food review.biz/login/preview.php?view&id=55932. (2 September 2013).

Rahayu, W.P., F. Kusnandar, and W.E. Prayitno. 2011. Stability of Viable Counts of Lactic Acid Bacteria during Storage of Goat Milk Soft Cheese. Bogor. *Microbiol.* Vol. 5(4) : 149-153.

Ray, B. 1996. *Fundamental Food Microbiology*. Boca Raton, FL: CRC Press.

Ray, B. 2001. *Fundamental Food Microbiology*. 2nd ed. New York: CRC Press.

Ridlon, J.M., D.J. Kang, P.B. Hylemon. 2005. Bile Salt Biotransformations by Human Intestinal Bacteria. *J. Lipid Res*. 47(2) : 241-59.

Roberfroid, M. 2008. *Handbook of Prebiotics*. Boca Raton, FL: CRC Press.

Rokka, S. and P. Rantamaki. 2010. Protecting Probiotic Bacteria by Microencapsulation: Challenges for Industrial Applications. *Eur. Food Res.Technol.* 231:1-12.

Roy, D., J. Goulet. and A. Leduy. 1987. Continues Production of Lactic Acid from Whey Permeate by Free and Calcium-Alginate Entrapped *Lactobacillus helveticus*. *J. Dairy Sci.* 70:506-513.

Rumessen J.J., H.E. Gudmand. 1998. Fructans of Chicory: Intestinal Transport and Fermentation of Different Chain Lengths and Relation to Fructose and Sorbitol Malabsorption. *Am J. Clin. Nutr*. 68:357–364.

Russel, J.B. 1992. Another Explanation for the Toxicity of Fermentation Acids at Low pH: Anion Accumulation versus Uncoupling. *J. Apply. Bacteriology*. 73:363-370

Sanders, M.E. 2003. Probiotics: Considerations for Human Health. *Nutr*. Rev. 61:91-99.

Salminen, S. and A.V. Wright. 1993. *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker Inc. pp. 200-201.

Sardjono, D., Wiyono, dan D. Wibowo. 1988. *Mikrobiologi Pengolahan Pangan.* Yogyakarta: Proyek Peningkatan/Pengembangan Perguruan Tinggi Universitas Gadjah Mada.

Sarmento, B., A. Ribeiro, F. Veiga, P. Sampaio, R. Neufeld, and D. Ferreira. 2007. Alginate or Chitosan Nanoparticles are Effective for Oral Insulin Delivery. *Pharmaceutical research* 24(12):2198-2206.

Saunders, D.R. and H.S. Wiggins. 1981. Conservation of Mannitol, Lactulose, and Raffinose by the Human Colon. *Am. J. Physiol.* 241:G397–G402.

Scholtens, P.A., P. Alliet, M. Raes, M.S. Alles, H. Kroes, G. Boehm, L.M.J. Knol, and Y. Vandenplas. 2006. Fecal Secretory Immunoglobulin a is Increased in Healthy Infants who Receive a Formula with Short-Chain Galacto-Oligosaccharides and Long-Chain Fructo-Oligosaccharides. *J Nutr.* 138:1141–1147.

Shah, N.P. and R.R. Ravula. 2000. Microencapsulation of Probiotic Bacteria and Their Survival in Frozen Fermented Dairy Desserts. *Aust. J. Dairy Technol.* 55:139-144.

Shariff, Z.M., J.T. Bond and N.E. Johnson. 2007. Nutrition and Educational Achievement of Urban Primary Schoolchildren in Malaysia. Asia Pac. *J. Clin. Nutr*. 9:264-273.

Sheu, T.Y., R.T. Marshall, and H. Heymann. 1993. Improving Survival of Culture Bacteria in Frozen Dessert by Microentrapment. *J. Dairy Sci.* 76:1902-1907

Shitandi, A., M. Alfred and M. Symon. 2007. Probiotic Characteristic of *Lactococcus* Strain From Local Fermented Amaranthus Hybrydus and Solanum Nigrum. *African Crop Science Confrence Proceedings* 8:1809-1812.

Siegumfeldt, H., K.B. Rechinger, and M. Jakobsen. 2000. Dynamic Changes of Intracellular pH in Individual Lactic Acid Bacterium Cells in Response to a Rapid Drop in Extracellular pH. *Appl. Environ.Microb* 66:2330–2335.

Silvester, K.R., H.N. Englyst, and J.H. Gummings. 1995. Recovery of Starch From Whole Diets Containing Resistant Starch Measured in Vitro and Fermentation of Effluent. *American J. Clin. Nut.* 62: 403-411.

Smidsrod, O. and G. Skjakbraek. 1990. Alginate for Cell Immobilization. *Trends in Food Sci Technol.* 8:71-75.

Soesilo, D., E.S. Rinna, dan D. Indeswati. 2005. *Peranan Sorbitol Dalam Mempertahankan Kestabilan pH Saliva Pada Proses Pencegahan Karies.*

Sujaya, I.N., N.M.U. Dwipayanti, N.L.P. Suariani, N.P. Widarini, K.A. Nocianitri, dan N.W. Nursini. 2008. Potensi *Lactobacillus Spp*. Isolat Susu Kuda Sumbawa sebagai Probiotik. *J. Vet*. 9(1):33-40.

Sultana, K., G. Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris, and K. Kailasapathy. 2000. Encapsulation of Probiotics Bacteria with Alginate-Starch and Evaluation of Survival in Simulated Gastro Intestinal Condition and in Yogurt, *Int J. Food Microbio.* 62:47-55.

Sumo, U.F., B. Sumantri, dan A. Subono. 1993. Prinsip Bioteknologi. Jakarta : PT. Gramedia Pustaka Utama.

Sun, W. and M.W. Griffiths. 2000. Survival of *Bifidobacteria* in Yogurt and Simulate Gastric Juice Following Immobilization In Gellanxanthan Beads. *Int. J. Food Microbiol.* 61:17-25.

Suskovic, J., K. Blazenka, G. Jadranka, and M. Srecko. 2001. Role of Lactic Acid Bacteria and *Bifidobacteria* in Synbiotic Effect. *Food Technol. Biotech*, 39:227-235.

Sudhana, J.W., E. Astoeti, dan B.S. Trengono. 2007. The Effect Of Xylitol Chewing Gum on Plaque pH. *Majalah Ilmiah Kedokteran Gigi*. 22(2):41-45.

Syahrurachman, R., dan Agus. 1994. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Binarupa Aksara.

Tanaka, H., M. Masatose, I.A. Veleky. 1984. Diffusion Characteristics of Substrates in Calcium-alginate Beads. *Biotechnol Bioeng.* 26: 53-58.

Tamime, A.Y., dan R.K. Robinson. 2007. *Tamime and Robinson's Yogurt Science and Technology* (*third edition*). Cambridge England: Woodhead Publishing Limited.

Thompson, D.B. 2000. Strategies for The Manufacture of Resistant Starch. *Trends in Food Sci. Technol*. 11:245-253.

Toma, M.M and J. Pokrotnieks. 2006. Probiotics as Functional Food: Microbiological and Medical Aspects. *Acta Universitatis Latviensis* (710): 117-129.

Truelstrup-Hansen, L., P.M. Allan-Wojtas, Y.L. Jin and A.T. Paulson. 2002. Survival of Free and Calcium-Alginate Microencapsulated *Bifidobacterium spp*. in Simulated Gastro-Intestinal Conditions. *Food Microbiol.* 19:35-45.

Tuomola, E., R. Cristtenden., M. Playne., E. Isolauri., and S. Salminen. 2001. Quality Assurance Criteria for Probiotic Bacteria. *Am. J. Clin. Nutr*. 73(2):393s-398s.

Yeo, S.K. and M.T. Liong. 2010. Effect of Prebiotics on Viability and Growth Characteristics of Probiotics In Soymilk. *J. Sci. Fd. Agric*

Yusmarini, R., T. Indrati, Utami, dan Y. Marsono. 2010. Aktivitas Proteolitik Bakteri Asam Laktat Dalam Fermentasi Susu Kedelai. Riau. *J. Teknol. dan Industri Pangan* Vol. 21(2).

van de Gutche, M.P. Serror, C. Chervaux, T. Smokvina, S.D. Ehrlich, E. Maguin. 2002. Stress Responses in Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leuwenhock*. 82: 187-216

Vitali, B., M. Ndagijimana, F. Cruciani, P. Carnevali, M. Candela, M.E. Guerzoni, and P. Brigidi. 2010. Impact of a Synbiotic Food on The Gut Microbial Ecology and Metabolic Profiles, *BMC Microbiology*. 10:4.

Weichselbaum, E. 2009. Probiotics and Health: A Review of The Evidence. *Nutrition Bulletin* 34: 340–73.

Widodo, S., Soeparno dan E. Wahyuni. 2003. Bioenkapsulasi Probiotik (*Lactobacillus Casei*) dengan Pollard dan Tepung Terigu serta Pengaruhnya terhadap Viabilitas dan Laju Pengasaman, *J.Tek. dan Industri Pangan* 14:98-106.

Widodo, W. 2002. *Bioteknologi Fermentasi Susu*. Malang : Pusat Pengembangan Bioteknologi Universitas Muhammadiyah http://wahyuwidodo.staff.umm.ac.id/files/2010/01/FERMENTASISUSU.pdf (2 Agustus 2013).

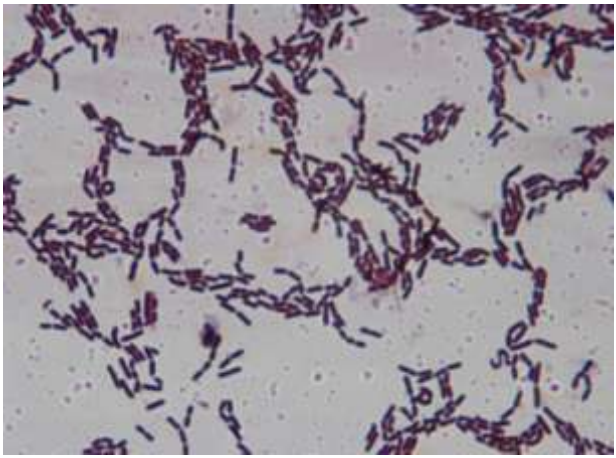
Zavaglia, A.G., G. Kociubinski, P. Perez, and G. De Antoni. 1998. Isolation and Characterization of *Bifidobacterium* Strains for Probiotic Formulation. *J. Food Protect*. 61:865-873.

Zhou, Y,. E. Martins, A. Groboilloot, C.P. Champagne, dan R.J. Neufeld. 1998. Spectrophotometric Quantification of Lactic Acid Bacteria in Alginate and Control of Cell Release with Chitosan Coating. *J Appl Microbiol.* 84: 342-348.

LAMPIRAN A
SPESIFIKASI BAHAN PENELITIAN

1. Kultur Bakteri *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051

Lactobacillus acidophilus FNCC 0051 yang digunakan dalam pembuatan sel imobil (diamati dengan pengecatan gram) dapat dilihat pada Gambar 1.



Lactobacillus acidophilus FNCC 0051

Ciri Mikroskopis :

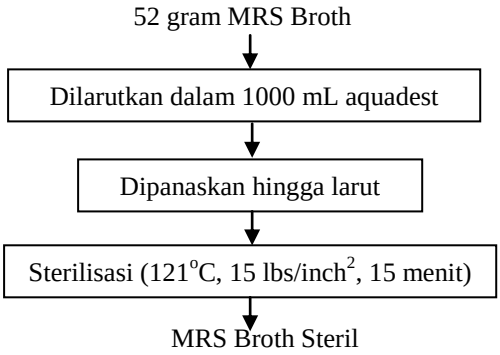
1. Bentuk : batang
2. Warna : Ungu
3. Gram : Positif
4. Susunan sel : Berantai

2. Media MRS Broth (Pronadisa Cat. 1215.00)

Komposisi :

Bacteriological peptone	:	10 gram/liter
Meat extract	:	8 gram/liter
Yeast extract	:	4 gram/liter
Dextrose	:	20 gram/liter
Tween 80	:	1 gram/liter
Dipotassium phosphate	:	2 gram/liter
Sodium acetate	:	5 gram/liter
Amonium citrate	:	2 gram/liter
Magnesium sulfate	:	0,20 gram/liter
Manganese sulfate	:	0,05 gram/liter

Cara pembuatan :



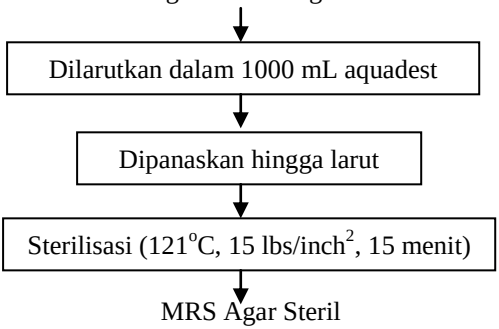
3. Media de an, Rogosa, Sharpe bouillon (MRS Agar)

Komposisi :

Bacteriological peptone	:	10 gram/liter
Meat extract	:	8 gram/liter
Yeast extract	:	4 gram/liter
Dextrose	:	20 gram/liter
Tween 80	:	1 gram/liter

Dipotassium phosphate	:	2 gram/liter
Sodium acetate	:	5 gram/liter
Amonium citrate	:	2 gram/liter
Magnesium sulfate	:	0,20 gram/liter
Manganese sulfate	:	0,05 gram/liter
Bacteriological agar	:	15 gram/liter

Cara pembuatan :



4. Spesifikasi Agar "*Bacto Agar*" Merk " MERCK 214010"

Specifications	
Ash	*3,6%*
Clarity 1,5% Soln	*4,3 NTU*
Loss on Drying	*17,3%*
pH	*6,5*
Gel Strength	*600 g/cm2*
Gelation Point	*350C*
Melting Point	*880C*
Inorganics (%)	
Calcium	*0,179*
Chloride	*0,021*
Cobalt	*<0,001*
Copper	*<0,001*
Iron	*0,002*
Magnesium	*0,068*
Nitrate	*<0,005*

Phosphate	*<0,001*
Sodium	*0,837*
Sulphate	*1,778*
Sulphur	*0,841*
Zinc	*<0,001*

Untuk perhitungan total *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 digunakan agar-agar 1,2% (b/v) dan untuk menumbuhkan kultur *stock Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 digunakan agar 0,9% (b/v) (semi solid).

Cara pembuatan:

MRS *Broth* dan agar-agar 1,2% (b/v) dan 0,9% (b/v)

↓

Dilarutkan dalam aquadest

↓

Dipanaskan hingga mendidih dan jernih

↓

Sterilisasi (121^oC, 15 $lbs/inch^2$, 15

↓

MRS Semi Solid

5. Spesifikasi Susu UHT *Full Cream* "Ultra Milk" Ultra Jaya

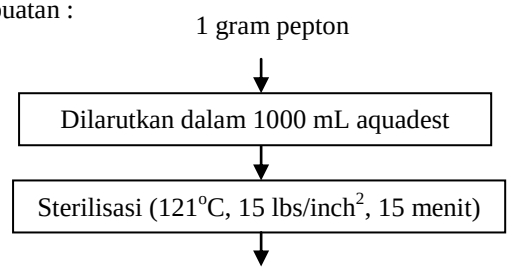
Takaran saji 1 kotak (200 mL) Jumlah sajian per kemasan: 1		
Komponen	Satuan	Jumlah (per 200 mL)
Lemak total	g	6
Lemak jenuh	g	3
Kolesterol	mg	15
Protein	g	6
Karbohidrat total	g	10
Gula	g	0
Natrium	mg	40
Kalium	mg	390

6. Media Air Pepton 0,1% (dari *meat peptic digested)*

Spesifikasi Pepton *from Meat* Merk "MERCK 1.07224.1000"

Komponen	Jumlah (g/L)
Amino nitrogen (as N)	3.0-5.0%
Appearance	*Light brownish-yellow granulate*
Expiration date	*Exp 60 months from mfg date*
Loss on drying (105°C)	6.0% *max*
Nitrite (NO2)	*Passes test*
pH (5%, water)	6.5-7.5
Suitability for microbiology	*Passes test*
Sulfated ash (800°C)	15.0% *max*
Test date	*Per Merck CofA*
Total nitrogen (N)	11.0-14.0%

Cara pembuatan :

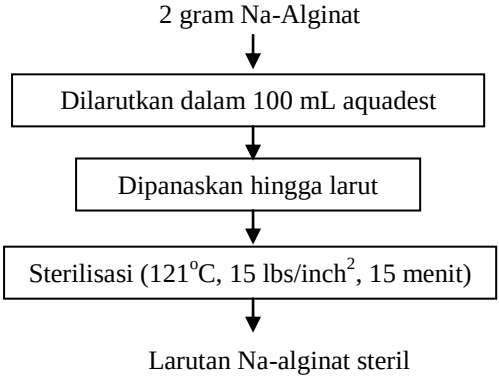


7. Larutan Natrium Alginat 2% (b/b)

Komposisi:

Appearance (Color)	*: White to Beige and Faint Brown to Brown*
Appearance (Form)	*: Powder*
Solubility (Color)	*: Faint Yellow to Yellow*
Solubility (Turbidity)	*: Slightly Hazy to Very Hazy 100mg plus 10mL of water*
Brookfield Viscosity	*: ≥2000 cps 2% in water at 25°C*
Recommended Retest Period	*: 2 years*

Cara pembuatan :

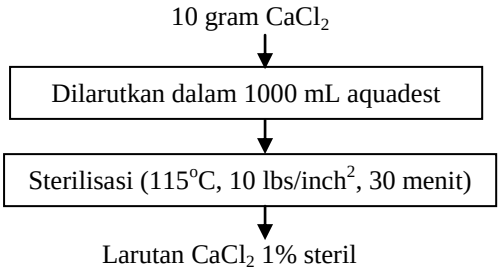


8. Larutan $CaCl_2$ 1% Teknis

Komposisi:

Content ($CaCl_2$)	*: min 77%*
NaCl	*: max 3,2%*
$MgCl_2$	*: max 0,3%*
Water insoluble matter	*: max 0,12%*
pH value	*: 7,0-9,0*
$CaSO_4$	*: max 0,3%*
$Ca(OH)_2$	*: max 0,2%*
Fe	*: max 0,0015%*
Arsenic (As)	*: max 0,0001%*
Heavy Metals (Pb)	*: max 0,0001%*

Cara pembuatan :

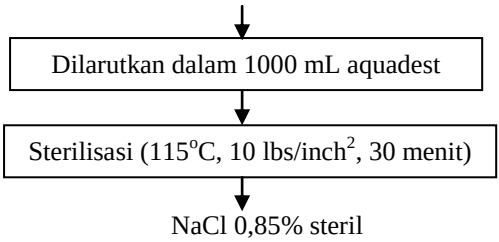


9. Larutan NaCl 0,85 %

Komposisi:

Assay	*: min 99,8%*
Loss on Drying (130^oC)	*: max 0,2*
pH (5%, 20^oC)	*: 5-8*
As max 0,00005%	
Fe max 0,0001%	
Ba max 0,001%	
K max 0,005%	
Ca max 0,002%	
Mg max 0,0005%	
Heavy metals (as Pb)	*: max 0,0003%*
Bromide (Br)	*: max 0,005%*
Iodide (I)	*: max 0,001%*
Potassium hexacyanoferrate (II)	
($K_4[Fe(CN)_6]$)	*: max 0,0001%*
Phosphate (PO_4)	*: max 0,0005%*
Sulfate (SO_4)	*: max 0,001%*
Total N	*: max 0,001%*

Cara pembuatan : 8,5 gram NaCl



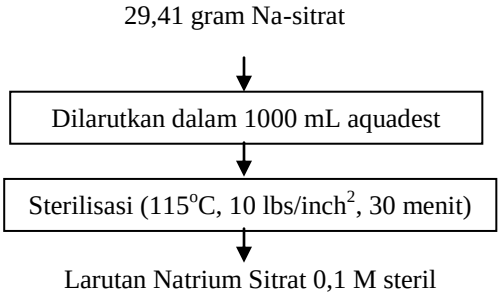
10. Larutan Natrium Sitrat 0,1 M

Character:

Colourless or white crystalline granule or crystalline powder
Odorless
Tastes salty and cool
Soluble in water
Difficulty in ethanol and slightly deliquescent in moist air
pH value is 7.6-8.6 in 5% aqueous solution
May lose crystal water (heated to 150^oC)
Quality Index:

Appearance : *White Powder*
Content : *≥ 99,0-100,5%*
Heavy Metals (As, Pb) : *≤ 0,001%*
Pb : *≤ 0,0002%*
As : *≤ 0,0001%*
Loss on Drying : *10,0-13,0%*
Cl : *≤ 0,005%*
Sulphate Salt : *≤ 0,01%*
Oxalate Salt : *≤ 0,01%*
Alkalinity : *Pass test*
Readily Carbonisable Substances: 1,0
Light transmittance : *95,0%*
Water insoluble : *Pass test*
Pyrogens : -

Cara pembuatan :

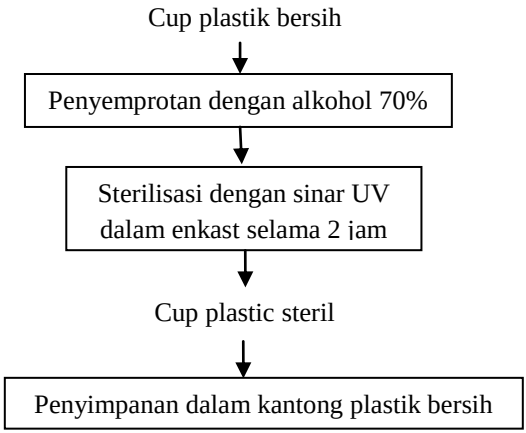


11. Spesifikasi Reagen Kimia

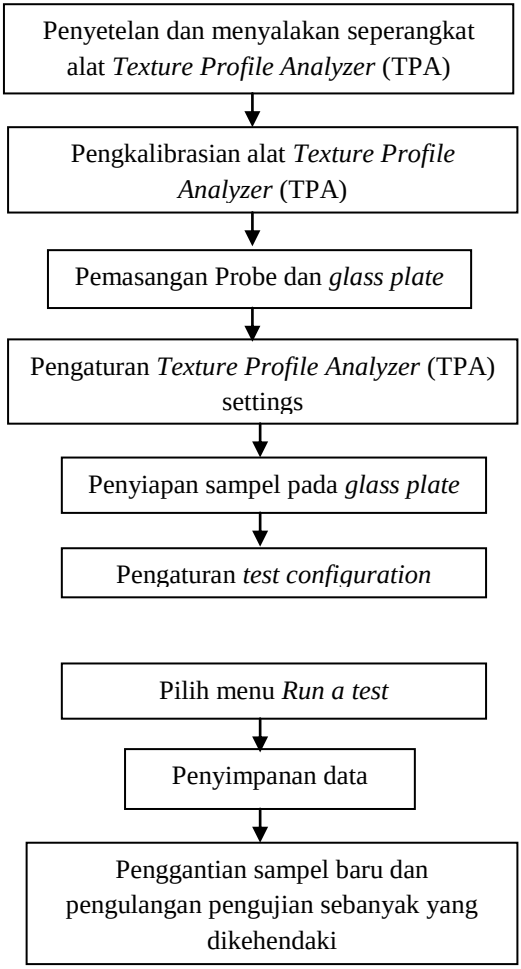
Nama reagen	Jenis	Konsentrasi	Merk
HCl	p.a	37%	MERCK KGaA

LAMPIRAN B
SPESIFIKASI DAN PROSES STERILISASI CUP

1. Spesifikasi cup yang digunakan adalah :
   a. Merek : Lionstar
   b. Produsen : PT. Cahaya Perdana Plastics, Jakarta, Indonesia.
   c. Kapasitas : 45 mL
   d. Bahan : Polipropilen
   e. Ukuran : 25 (D) x 30 (t) mm

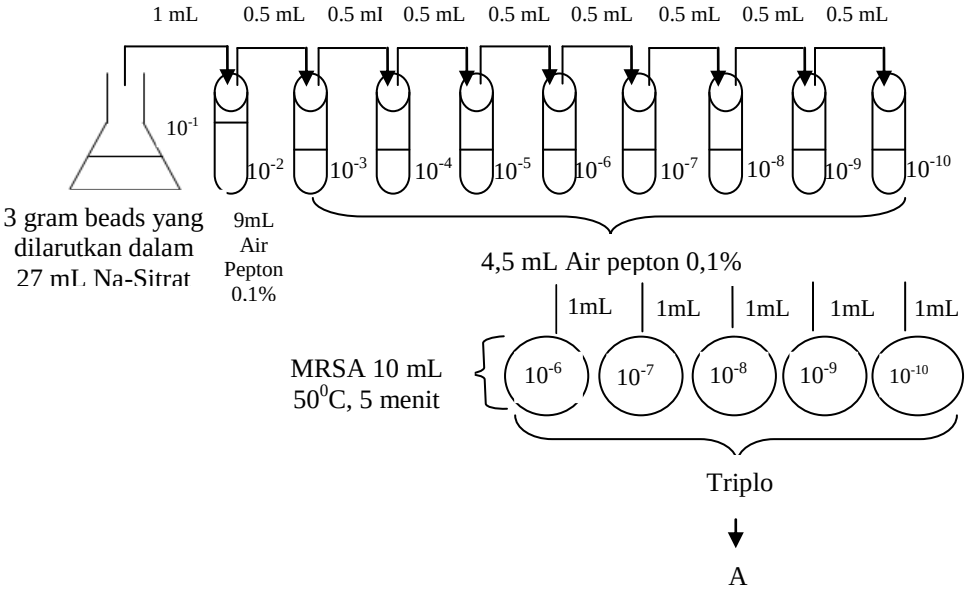


LAMPIRAN C
CARA KERJA TEKSTUR ANALYZER



LAMPIRAN D

SKEMA KERJA UJI TOTAL SEL *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* FNCC 0051 TERIMOBIL



A

↓

dihomogenkan

↓

rotasi angka 8

↓

dibiarkan memadat

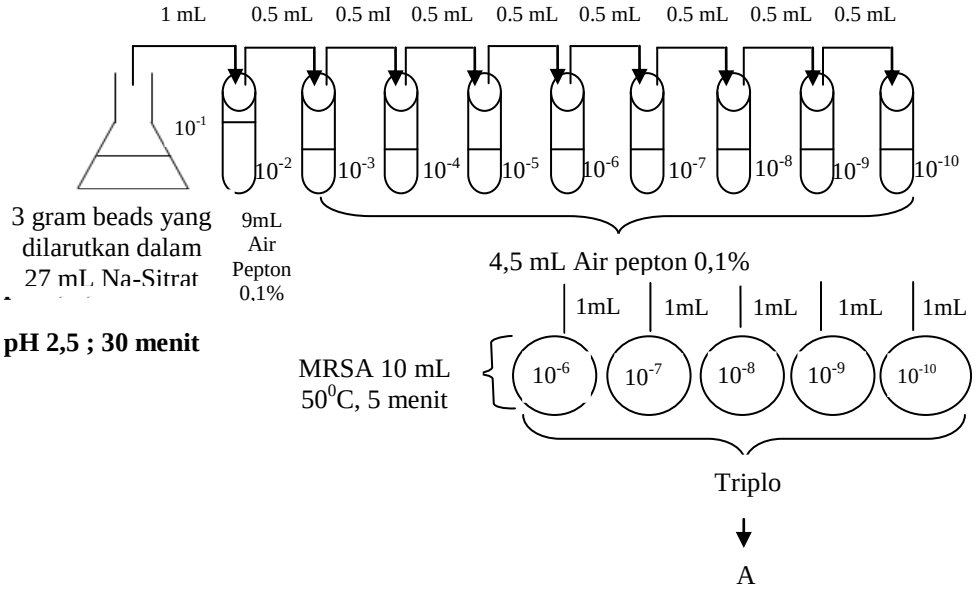
↓

inkubasi 37^0C, 48 jam

↓

Hitung ALT

LAMPIRAN E
SKEMA KERJA UJI TOTAL SEL *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* FNCC 0051 TERIMOBIL PADA ASAM LAMBUNG



A

↓

dihomogenkan

↓

rotasi angka 8

↓

dibiarkan memadat

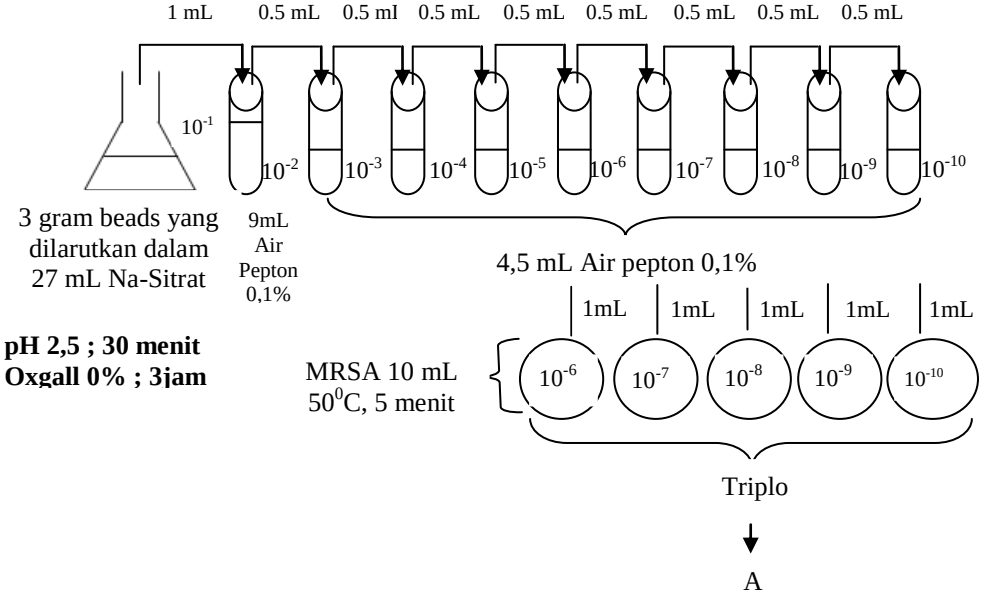
↓

inkubasi 37^0C, 48 jam

↓

Hitung ALT

LAMPIRAN F
SKEMA KERJA UJI TOTAL SEL *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* FNCC 0051 TERIMOBIL PADA GARAM EMPEDU 0%



A

↓

dihomogenkan

↓

rotasi angka 8

↓

dibiarkan memadat

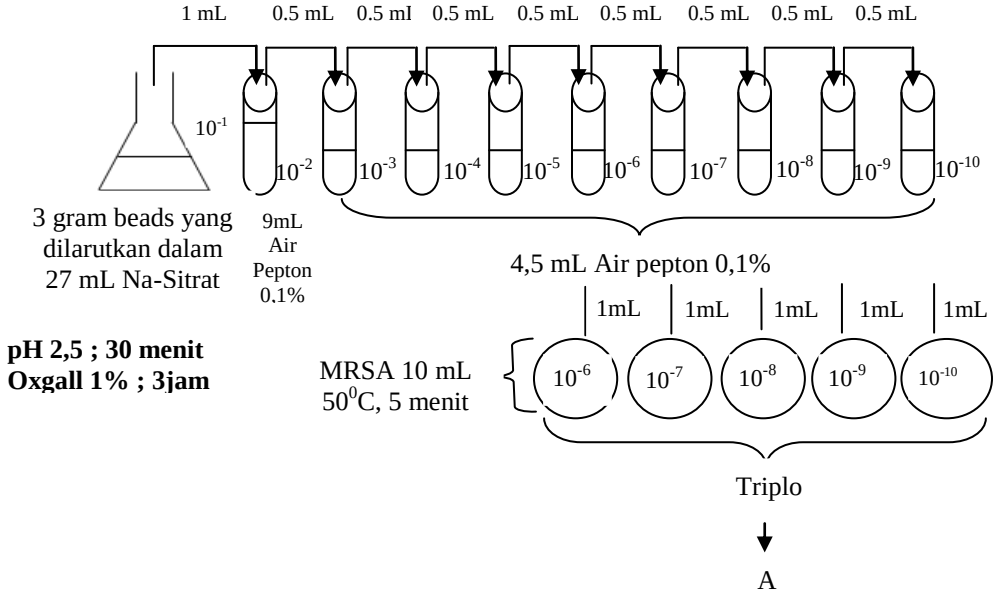
↓

inkubasi 37^0C, 48 jam

↓

Hitung ALT

LAMPIRAN G
SKEMA KERJA UJI TOTAL SEL *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* FNCC 0051 TERIMOBIL PADA GARAM EMPEDU 1%



A

↓

dihomogenkan

↓

rotasi angka 8

↓

dibiarkan memadat

↓

inkubasi 37^0C, 48 jam

↓

Hitung ALT

LAMPIRAN H
HASIL ANGKA LEMPENG TOTAL SEL IMOBIL

Sel awal Ulangan 1

Ulangan ke-	10^6	10^7	10^8	10^9	10^{10}	ALT cfu/gr	Rerata
1	TBUD	TBUD	TBUD	210	19	$2{,}1 \times 10^{11}$	$1{,}8 \times 10^{11}$
2	TBUD	TBUD	TBUD	152	35	$1{,}5 \times 10^{11}$	
3	TBUD	TBUD	TBUD	187	28	$1{,}9 \times 10^{11}$	

Sel awal Ulangan 2

Ulangan ke-	10^6	10^7	10^8	10^9	10^{10}	ALT cfu/gr	Rerata
1	TBUD	TBUD	TBUD	178	21	$1{,}8 \times 10^{11}$	$1{,}9 \times 10^{11}$
2	TBUD	TBUD	TBUD	191	43	$1{,}9 \times 10^{11}$	
3	TBUD	TBUD	TBUD	204	14	$2{,}0 \times 10^{11}$	

Sel awal Ulangan 3

Ulangan ke-	10^6	10^7	10^8	10^9	10^{10}	ALT cfu/gr	Rerata
1	TBUD	TBUD	TBUD	164	20	$1{,}6 \times 10^{11}$	$1{,}9 \times 10^{11}$
2	TBUD	TBUD	TBUD	175	26	$1{,}8 \times 10^{11}$	
3	TBUD	TBUD	TBUD	225	51	$2{,}3 \times 10^{11}$	

Hasil Pengujian Total Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil

Konsentrasi Isomalt (%)	Lama Penyimpanan (hari ke-)	Ulangan ke-	Pengenceran ALT					ALT (cfu/g)	Rerata ALT (cfu/g)
			10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}		
1	0	1	TBUD	145	76	1	0	$1,5 \times 10^{9}$	$1,5 \times 10^{9}$
		2	TBUD	152	52	6	1	$1,5 \times 10^{9}$	
		3	TBUD	138	72	10	0	$1,4 \times 10^{9}$	
	21	1	TBUD	173	80	29	1	$1,7 \times 10^{9}$	$1,8 \times 10^{9}$
		2	TBUD	180	63	14	2	$1,8 \times 10^{9}$	
		3	TBUD	184	85	20	1	$1,8 \times 10^{9}$	
2	0	1	TBUD	223	84	13	1	$2,2 \times 10^{9}$	$2,4 \times 10^{9}$
		2	TBUD	235	99	13	1	$2,4 \times 10^{9}$	
		3	TBUD	253	100	13	0	$2,5 \times 10^{9}$	
	21	1	TBUD	231	90	21	0	$2,3 \times 10^{9}$	$2,5 \times 10^{9}$
		2	TBUD	248	112	25	4	$2,5 \times 10^{9}$	
		3	TBUD	265	128	29	2	$2,7 \times 10^{9}$	
3	0	1	TBUD	298	96	14	1	$3,0 \times 10^{9}$	$2,9 \times 10^{9}$
		2	TBUD	288	123	8	1	$2,9 \times 10^{9}$	
		3	TBUD	290	187	20	1	$2,9 \times 10^{9}$	
	21	1	TBUD	TBUD	112	20	0	$1,1 \times 10^{10}$	$5,4 \times 10^{9}$
		2	TBUD	TBUD	34	4	1	$3,4 \times 10^{9}$	
		3	TBUD	182	39	24	1	$1,8 \times 10^{9}$	

Konsentrasi Isomalt (%)	Lama Penyimpanan (hari ke-)	Ulangan ke-	Pengenceran ALT					ALT (cfu/g)	Rerata ALT (cfu/g)
			10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}		
4	0	1	TBUD	201	109	19	2	$2,0 \times 10^{9}$	$2,0 \times 10^{9}$
		2	TBUD	167	78	11	0	$1,7 \times 10^{9}$	
		3	TBUD	226	70	8	2	$2,3 \times 10^{9}$	
	21	1	TBUD	221	98	24	2	$2,2 \times 10^{9}$	$2,3 \times 10^{9}$
		2	TBUD	230	87	12	3	$2,3 \times 10^{9}$	
		3	TBUD	249	78	24	1	$2,5 \times 10^{9}$	
5	0	1	TBUD	110	50	2	2	$1,1 \times 10^{9}$	$1,1 \times 10^{9}$
		2	TBUD	123	62	6	2	$1,2 \times 10^{9}$	
		3	TBUD	107	68	9	2	$1,1 \times 10^{9}$	
	21	1	TBUD	126	64	21	2	$1,3 \times 10^{9}$	$1,2 \times 10^{9}$
		2	TBUD	134	76	10	0	$1,3 \times 10^{9}$	
		3	TBUD	141	79	17	0	$1,4 \times 10^{9}$	

Hasil Pengujian Total Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil terhadap Asam Lambung

Konsentrasi Isomalt (%)	Lama Penyimpanan (hari ke-)	Ulangan ke-	Pengenceran ALT					ALT (cfu/g)	Rerata ALT (cfu/g)
			10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}		
1	0	1	117	13	2	1	0	$1,2 \times 10^{8}$	$1,2 \times 10^{8}$
		2	130	20	1	0	0	$1,3 \times 10^{8}$	
		3	115	17	1	1	0	$1,2 \times 10^{8}$	
	21	1	151	18	0	0	0	$1,5 \times 10^{8}$	$1,5 \times 10^{8}$
		2	149	26	2	1	0	$1,5 \times 10^{8}$	
		3	148	24	4	0	0	$1,5 \times 10^{8}$	
2	0	1	231	15	2	0	0	$2,3 \times 10^{8}$	$2,3 \times 10^{8}$
		2	220	19	2	0	0	$2,2 \times 10^{8}$	
		3	237	10	1	1	0	$2,4 \times 10^{8}$	
	21	1	245	17	0	0	0	$2,5 \times 10^{8}$	$2,5 \times 10^{8}$
		2	238	27	2	1	0	$2,4 \times 10^{8}$	
		3	250	34	4	1	0	$2,5 \times 10^{8}$	
3	0	1	263	48	3	2	0	$3,7 \times 10^{8}$	$3,3 \times 10^{8}$
		2	271	32	5	1	0	$3,0 \times 10^{8}$	
		3	270	38	1	0	0	$3,3 \times 10^{8}$	
	21	1	TBUD	101	18	2	0	$1,0 \times 10^{9}$	$2,3 \times 10^{9}$
		2	283	43	5	1	1	$3,9 \times 10^{8}$	
		3	264	30	3	1	0	$2,8 \times 10^{8}$	

Konsentrasi Isomalt (%)	Lama Penyimpanan (hari ke-)	Ulangan ke-	Pengenceran ALT					ALT (cfu/g)	Rerata ALT (cfu/g)
			10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}		
4	0	1	177	20	8	1	0	$1,8 \times 10^{8}$	$1,8 \times 10^{8}$
		2	186	21	2	1	0	$1,9 \times 10^{8}$	
		3	179	27	1	1	0	$1,8 \times 10^{8}$	
	21	1	202	29	5	1	1	$2,0 \times 10^{8}$	$2,1 \times 10^{8}$
		2	210	25	10	3	0	$2,1 \times 10^{8}$	
		3	227	25	7	1	0	$2,3 \times 10^{8}$	
5	0	1	85	14	4	0	0	$8,5 \times 10^{7}$	$8,8 \times 10^{7}$
		2	93	10	6	2	1	$9,3 \times 10^{7}$	
		3	87	18	4	1	0	$8,7 \times 10^{7}$	
	21	1	108	15	1	0	0	$1,1 \times 10^{8}$	$1,1 \times 10^{8}$
		2	105	22	2	0	0	$1,1 \times 10^{8}$	
		3	112	17	1	0	0	$1,1 \times 10^{8}$	

Hasil Pengujian Total Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil terhadap Garam Empedu

Konsentrasi Isomalt (%)	Lama Penyimpanan (hari ke-)	Ulangan ke-	Pengenceran ALT					ALT (cfu/g)	Rerata ALT (cfu/g)
			10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}		
1	0	1	TBUD	125	6	0	0	$1,3 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$
		2	TBUD	119	10	2	1	$1,2 \times 10^9$	
		3	TBUD	118	22	9	0	$1,2 \times 10^9$	
	21	1	TBUD	133	14	3	1	$1,3 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$
		2	TBUD	124	20	2	0	$1,2 \times 10^9$	
		3	TBUD	129	13	3	1	$1,3 \times 10^9$	
2	0	1	TBUD	134	17	7	1	$1,3 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$
		2	TBUD	142	25	10	1	$1,4 \times 10^9$	
		3	TBUD	147	21	10	0	$1,5 \times 10^9$	
	21	1	TBUD	150	14	4	0	$1,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$
		2	TBUD	148	29	3	1	$1,5 \times 10^9$	
		3	TBUD	157	14	6	2	$1,6 \times 10^9$	
3	0	1	TBUD	198	8	1	1	$2,0 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$
		2	TBUD	204	20	11	1	$2,0 \times 10^9$	
		3	TBUD	196	20	6	1	$2,0 \times 10^9$	
	21	1	TBUD	201	21	8	0	$2,0 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$
		2	TBUD	214	24	5	1	$2,1 \times 10^9$	
		3	TBUD	229	28	4	1	$2,3 \times 10^9$	

Konsentrasi Isomalt (%)	Lama Penyimpanan (hari ke-)	Ulangan ke-	Pengenceran ALT					ALT (cfu/g)	Rerata ALT (cfu/g)
			10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}		
4	0	1	TBUD	140	19	3	2	$1,4 \times 10^{9}$	$1,5 \times 10^{9}$
		2	TBUD	150	11	5	0	$1,5 \times 10^{9}$	
		3	TBUD	152	8	1	0	$1,5 \times 10^{9}$	
	21	1	TBUD	168	24	6	2	$1,7 \times 10^{9}$	$1,7 \times 10^{9}$
		2	TBUD	166	12	3	0	$1,7 \times 10^{9}$	
		3	TBUD	165	24	5	1	$1,7 \times 10^{9}$	
5	0	1	TBUD	132	20	0	0	$1,3 \times 10^{9}$	$1,3 \times 10^{9}$
		2	TBUD	128	6	2	1	$1,3 \times 10^{9}$	
		3	TBUD	140	9	1	1	$1,4 \times 10^{9}$	
	21	1	TBUD	147	21	4	2	$1,5 \times 10^{9}$	$1,5 \times 10^{9}$
		2	TBUD	139	10	1	0	$1,4 \times 10^{9}$	
		3	TBUD	145	18	7	0	$1,5 \times 10^{9}$	

Hasil Pengujian Total Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil terhadap Garam Empedu 1%

Konsentrasi Isomalt (%)	Lama Penyimpanan (hari ke-)	Ulangan ke-	Pengenceran ALT					ALT (cfu/g)	Rerata ALT (cfu/g)
			10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}		
1	0	1	TBUD	55	7	0	0	$5,5 \times 10^{8}$	$5,3 \times 10^{8}$
		2	TBUD	53	12	2	1	$5,3 \times 10^{8}$	
		3	TBUD	51	18	9	0	$5,1 \times 10^{8}$	
	21	1	TBUD	60	14	3	1	$6,0 \times 10^{8}$	$5,8 \times 10^{8}$
		2	TBUD	57	20	3	0	$5,7 \times 10^{8}$	
		3	TBUD	58	13	3	1	$5,8 \times 10^{8}$	
2	0	1	TBUD	68	14	7	0	$6,8 \times 10^{8}$	$7,2 \times 10^{8}$
		2	TBUD	72	20	5	1	$7,2 \times 10^{8}$	
		3	TBUD	75	21	10	1	$7,5 \times 10^{8}$	
	21	1	TBUD	77	14	4	0	$7,7 \times 10^{8}$	$7,7 \times 10^{8}$
		2	TBUD	76	29	2	0	$7,6 \times 10^{8}$	
		3	TBUD	79	14	6	2	$7,9 \times 10^{8}$	
3	0	1	TBUD	109	8	1	1	$1,1 \times 10^{9}$	$1,1 \times 10^{9}$
		2	TBUD	106	20	12	1	$1,1 \times 10^{9}$	
		3	TBUD	105	20	6	1	$1,1 \times 10^{9}$	
	21	1	TBUD	146	29	8	0	$1,5 \times 10^{9}$	$1,3 \times 10^{9}$
		2	TBUD	118	21	5	1	$1,2 \times 10^{9}$	
		3	TBUD	123	28	4	1	$1,2 \times 10^{9}$	

Konsentrasi Isomalt (%)	Lama Penyimpanan (hari ke-)	Ulangan ke-	Pengenceran ALT					ALT (cfu/g)	Rerata ALT (cfu/g)
			10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}		
4	0	1	TBUD	65	19	3	2	$6,5 \times 10^8$	$6,8 \times 10^8$
		2	TBUD	68	11	5	1	$6,8 \times 10^8$	
		3	TBUD	72	8	1	0	$7,2 \times 10^8$	
	21	1	TBUD	82	24	6	2	$8,2 \times 10^8$	$8,3 \times 10^8$
		2	TBUD	86	18	4	0	$8,6 \times 10^8$	
		3	TBUD	80	28	5	1	$8,0 \times 10^8$	
5	0	1	TBUD	50	20	0	0	$5,0 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$
		2	TBUD	49	6	2	1	$4,9 \times 10^8$	
		3	TBUD	54	12	1	1	$5,4 \times 10^8$	
	21	1	TBUD	63	21	3	0	$6,3 \times 10^8$	$5,9 \times 10^8$
		2	TBUD	56	13	1	0	$5,6 \times 10^8$	
		3	TBUD	59	18	7	0	$5,9 \times 10^8$	

LAMPIRAN I
PENURUNAN KETAHANAN *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* FNCC 0051 TERIMOBIL PADA ASAM LAMBUNG

			Konsentrasi Isomalt (I)				
			I_1	I_2	I_3	I_4	I_5
L_1	Ul	1	1,0969	0,9807	0,9089	1,0457	1,112
		2	1,0622	1,0378	0,9853	0,9516	1,1107
		3	1,0669	1,0177	0,9439	1,1064	1,1019
	Rata		1,0753 ± 0,0188	1,0121 ± 0,0290	0,9460 ± 0,0382	1,0346 ± 0,0780	1,1082 ± 0,0055
L_2	Ul	1	1,0543	0,9638	1,0414	1,0414	1,0725
		2	1,0792	1,0177	0,9404	1,0000	1,0725
		3	1,0792	1,0335	0,8081	1,0362	1,1047
	Rata		1,0709 ± 0,0144	1,0050 ± 0,0365	0,9300 ± 0,1170	1,0259 ± 0,0226	1,0832 ± 0,0186

*) Diasumsikan semakin kecil selisih log, semakin besar ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terhadap asam lambung.

Keterangan :
I1 : Konsentrasi Isomalt 1%
I2 : Konsentrasi Isomalt 2%
I3 : Konsentrasi Isomalt 3%
I4 : Konsentrasi Isomalt 4%
I5 : Konsentrasi Isomalt 5%
L1 : Lama Penyimpanan Hari ke-0
L2 : Lama Penyimpanan Hari ke-21
Ul : Ulangan ke-

Contoh perhitungan ketahanan terhadap asam :

Ketahanan asam lambung = log (ALT sel imobil) – log (ALT sel imobil kontak dengan asam lambung)

$= \log (1{,}5 \times 10^9) - \log (1{,}2 \times 10^8)$

= 1,0969

ANOVA Ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Asam Lambung

Sumber Variasi	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F Hitung	F Tabel
Perlakuan	9	32,061912	3,562435		
Kelompok	2	0,000190	0,00009	0,03	
Konsentrasi Isomalt (I)	4	0,090590	0,022650	8,23*	2,93
Lama Penyimpanan (L)	1	0,00112	0,00112	0,41	4,41
IL	4	0,00042	0,0001	0,04	2,93
Galat	18	0,04952	0,00275		
Total	29	0,141840			

Tanda * menunjukkan ada beda nyata karena Fhitung > Ftabel (α=5%)

Kesimpulan :

1. Faktor I :
   F hitung I > F tabel, ada pengaruh konsentrasi isomalt terhadap ketahanan sel *L.acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung.
2. Faktor L :
   F hitung L < F tabel, tidak ada pengaruh lama penyimpanan terhadap ketahanan sel *L.acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung.
3. Interaksi Faktor A dan B :
   F hitung IL < F tabel, tidak ada pengaruh interaksi konsentrasi isomalt dengan lama penyimpanan terhadap ketahanan sel *L.acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung.

Hasil Uji DMRT Sel Imobil terhadap Asam Lambung

Perlakuan	N	Subset			Notasi
		1	2	3	
3	6	0,9380			a
2	6		1,0085		b
4	6		1,0302	1,0302	bc
1	6		1,0731	1,0731	bc
5	6			1,0957	c
Sig.		1,000	,057	,054	

Keterangan :

*) Huruf yang berbeda menunjukkan ada beda nyata antar perlakuan.

LAMPIRAN J
PENURUNAN KETAHANAN *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* FNCC 0051 TERIMOBIL PADA GARAM EMPEDU

			Konsentrasi Isomalt (I)				
			I_1	I_2	I_3	I_4	I_5
L_1	Ul	1	0,4384	0,3762	0,3489	0,4143	0,4665
		2	0,4273	0,3729	0,3274	0,4271	0,4829
		3	0,4424	0,3928	0,3362	0,3882	0,4622
	Rata		0,4360 ±0,0078	0,3806 ± 0,0107	0,3375 ±0,0108	0,4099 ±0,0198	0,4705 ± 0,0109
L_2	Ul	1	0,4075	0,3726	0,301	0,3837	0,427
		2	0,3979	0,3844	0,3245	0,368	0,4574
		3	0,4272	0,3645	0,3416	0,4114	0,4618
	Rata		0,4109 ±0,0149	0,3738 ± 0,0100	0,3224 ±0,0204	0,3877 ±0,0220	0,4487 ±0,0189

*) Diasumsikan semakin kecil selisih log, semakin besar ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terhadap *oxgall.*

Keterangan :
I1 : Konsentrasi Isomalt 1%
I2 : Konsentrasi Isomalt 2%
I3 : Konsentrasi Isomalt 3%
I4 : Konsentrasi Isomalt 4%
I5 : Konsentrasi Isomalt 5%
L1 : Lama Penyimpanan Hari ke-0
L2 : Lama Penyimpanan Hari ke-21
Ul : Ulangan ke-

Contoh perhitungan ketahanan terhadap garam empedu :
Ketahanan relatif terhadap garam empedu

= log (ALT sel imobil kontak *oxgall* 0% – ALT sel imobil kontak HCl) – log (ALT sel imobil kontak *oxgall* 1% – ALT sel imobil kontak HCl)

= log ($1,2 \times 10^9 - 1,2 \times 10^8$) – log ($5,3 \times 10^8 - 1,2 \times 10^8$)

= 0,4384

ANOVA Ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil terhadap Garam Empedu

Sumber Variasi	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F Hitung	F tabel
Perlakuan	9	4,86164	0,54018		
Kelompok	2	0,00044	0,00022	0,90	
Konsentrasi Isomalt (I)	4	0,05707	0,01427	59,25*	2,93
Lama Penyimpanan (L)	1	0,00249	0,00249	10,33*	4,41
IL (interaksi)	4	0,00032	0,00008	0,34	2,93
Galat	18	0,00433	0,00024		
Total	29	0,06465			

Tanda * menunjukkan ada beda nyata karena Fhitung > Ftabel (α=5%)

Kesimpulan :

1. Faktor I :
   F hitung I > F tabel, ada pengaruh konsentrasi isomalt terhadap viabilitas sel *L.acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada garam empedu.
2. Faktor L :
   F hitung L > F tabel, ada pengaruh lama penyimpanan terhadap viabilitas sel *L.acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada garam empedu.
3. Interaksi Faktor A dan B :
   F hitung IL < F tabel, tidak ada pengaruh interaksi konsentrasi isomalt dengan lama penyimpanan terhadap viabilitas sel *L.acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada garam empedu.

Tabel J.3. Hasil Uji DMRT Sel Imobil terhadap Garam Empedu

Perlakuan	N	Subset					Notasi
		1	2	3	4	5	
P3	6	0,3299					a
P2	6		0,3772				b
P4	6			0,3988			c
P1	6				0,4235		d
P5	6					0,4596	e
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	

Keterangan :

*) Huruf yang berbeda menunjukkan ada beda nyata antar perlakuan.

LAMPIRAN K
HASIL PENGUJIAN DIAMETER *BEADS*

Hasil Pengujian Diameter *Beads* hari ke-0

Sampling	1%	2%	3%	4%	5%
1	3.25	2.75	3.32	3.20	3.22
2	3.04	3.20	3.28	3.95	3.19
3	3.05	3.23	3.46	3.33	3.31
4	3.10	3.23	3.35	3.19	3.28
5	3.10	3.13	3.19	3.15	3.31
6	3.51	3.10	3.19	3.33	3.17
7	3.16	2.73	3.20	3.08	3.26
8	3.30	3.08	3.11	3.54	3.26
9	3.05	3.01	3.30	3.31	3.56
10	3.25	3.08	3.38	3.13	3.57
Rerata	3.18	3.05	3.28	3.32	3.31

Sampling	1%	2%	3%	4%	5%
1	3.46	3.63	3.90	3.18	3.39
2	3.06	3.36	3.20	3.20	3.55
3	3.36	3.50	3.18	3.25	3.12
4	3.24	3.89	3.45	3.25	3.15
5	3.21	3.87	3.12	3.43	3.25
6	3.43	3.51	3.20	3.20	3.29
7	3.16	3.28	3.97	3.35	3.23
8	3.28	3.37	3.35	3.25	3.27
9	3.16	3.06	3.35	3.85	3.46
10	3.23	3.20	3.32	3.14	3.28
Rerata	3.26	3.47	3.40	3.31	3.30

Sampling	1%	2%	3%	4%	5%
1	3.23	3.56	4.21	3.01	3.71
2	3.56	3.61	3.94	3.21	3.62
3	3.64	3.71	4.13	3.30	3.76
4	3.61	3.61	4.01	3.35	3.52
5	3.24	3.39	3.73	3.88	3.30
6	3.66	3.42	3.94	3.70	3.59
7	3.52	3.70	3.84	3.50	3.74
8	3.53	3.77	4.16	3.23	3.66
9	3.66	3.51	3.80	3.60	3.36
10	3.70	3.33	4.09	3.62	3.78
Rerata	3.54	3.56	3.99	3.44	3.60

Ulangan	1%	2%	3%	4%	5%
1	3.18	3.05	3.28	3.32	3.31
2	3.26	3.47	3.40	3.31	3.30
3	3.54	3.56	3.99	3.44	3.60
Rerata	3.33±0.19	3.36±0.27	3.56±0.38	3.36±0.07	3.40±0.17

Hasil Pengujian Diameter *Beads* hari ke-21
Ulangan 1

Sampling	1%	2%	3%	4%	5%
1	3.98	3.92	3.79	3.66	3.84
2	3.59	3.62	3.83	3.79	3.75
3	3.71	3.78	3.59	3.97	4.18
4	3.84	3.54	3.73	3.83	4.24
5	3.43	4.13	3.83	3.79	4.22
6	3.86	3.82	3.82	3.81	3.68
7	3.78	3.76	3.82	4.13	3.81
8	3.65	3.52	3.84	3.93	3.72
9	3.66	3.76	3.40	3.91	3.88

Sampling	1%	2%	3%	4%	5%
10	3.43	3.34	3.84	3.86	3.65
Rerata	3.69	3.72	3.75	3.87	3.90

Sampling	1%	2%	3%	4%	5%
1	2.74	3.44	3.26	3.69	3.76
2	3.44	3.24	3.40	3.26	3.71
3	2.73	3.45	3.55	3.26	3.72
4	2.98	3.73	3.30	3.87	4.01
5	2.66	3.15	3.93	3.18	3.77
6	2.56	3.22	3.68	3.22	3.40
7	3.07	3.54	3.93	3.38	3.83
8	3.24	3.84	3.57	3.58	3.65
9	3.20	3.60	3.26	3.24	3.66
10	3.41	3.17	3.10	3.32	3.85
Rerata	3.00	3.44	3.50	3.40	3.74

Sampling	1%	2%	3%	4%	5%
1	3.50	3.24	4.07	3.59	3.54
2	3.52	3.13	3.94	3.55	3.16
3	3.27	3.23	3.68	3.60	3.65
4	3.37	3.21	3.88	3.20	3.94
5	3.55	3.41	3.78	3.65	3.57
6	3.54	3.37	4.07	3.27	3.31
7	3.84	3.23	4.34	3.14	3.55
8	3.38	3.69	3.89	3.67	3.62
9	3.35	3.54	3.81	3.88	3.38
10	3.28	3.50	3.95	3.08	3.35
Rerata	3.46	3.36	3.94	3.46	3.51

Ulangan	1%	2%	3%	4%	5%
1	3.69	3.72	3.75	3.87	3.90
2	3.00	3.44	3.50	3.40	3.74
3	3.46	3.36	3.94	3.46	3.51
Rerata	3.38±0.35	3.51±0.19	3.73±0.22	3.58±0.26	3.72±0.20

ANOVA Diameter *Beads*

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	9	0.6043	0.0671		
Kelompok	2	0.2116	0.1058	1.9271	
A (Konsentrasi Isomalt)	4	0.3023	0.0756	1.3770	2.93
B (Lama Penyimpanan)	1	0.2484	0.2484	4.5246*	4.41
AB (Interaksi)	4	0.0536	0.0134	0.2441	2.93
Galat	18	0.9889	0.0549		
Total	29	1.8048			

Kesimpulan :

1. Faktor A :
   F hitung A < F tabel, tidak ada pengaruh konsentrasi isomalt terhadap diameter *beads* sel *L.acidophilus* FNCC 0051 terimobil.
2. Faktor B :
   F hitung B > F tabel, ada pengaruh lama penyimpanan terhadap diameter *beads* sel *L.acidophilus* FNCC 0051 terimobil.
3. Interaksi Faktor A dan B :
   F hitung AB < F tabel, tidak ada pengaruh interaksi konsentrasi isomalt dengan lama penyimpanan terhadap diameter *beads* sel *L.acidophilus* FNCC 0051 terimobil.

Hasil Uji Beda Nyata Diameter *Beads*

Perlakuan	μ	Notasi
H_0	3.40	a
H_{21}	3.58	b

LAMPIRAN L
KETAHANAN *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* FNCC 0051 TERIMOBIL SELAMA PENYIMPANAN

Hari ke-	Konsentrasi Isomalt				
	I1	I2	I3	I4	I5
H0	9.1761	9.3424	9.4771	9.3010	9.0414
	9.1761	9.3802	9.4624	9.2304	9.0792
	9.1461	9.3979	9.4624	9.3617	9.0414
Rerata	9.1661 ± 0.0173	9.3735 ± 0.0284	9.4673 ± 0.0085	9.2977 ± 0.0657	9.0540 ± 0.0218

Hari ke-	Konsentrasi Isomalt				
	I1	I2	I3	I4	I5
H21	9.2304	9.3617	10.0414	9.3424	9.1139
	9.2553	9.3979	9.5315	9.3617	9.1139
	9.2553	9.4314	9.2553	9.3979	9.1461
Rerata	9.2470 ± 0.0144	9.3970 ± 0.0349	9.6094 ± 0.3988	9.3673 ± 0.0282	9.1246 ± 0.0186

ANOVA Sel Imobil Selama Penyimpanan

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	9	0.7620	0.0847		
Kelompok	2	0.0162	0.0081	0.4561	
A (Konsentrasi Isomalt)	4	0.7063	0.1766	9.9641*	2.93
B (Lama Penyimpanan)	1	0.0449	0.0449	2.5324	4.41
AB (Interaksi)	4	0.0108	0.0027	0.1526	2.93
Galat	18	0.3190	0.0177		
Total	29	1.0971			

Kesimpulan :

1. Faktor A :
   F hitung A > F tabel, ada pengaruh konsentrasi isomalt terhadap viabilitas sel *L.acidophilus* FNCC 0051 terimobil.
2. Faktor B :
   F hitung B < F tabel, tidak ada pengaruh lama penyimpanan terhadap viabilitas sel *L.acidophilus* FNCC 0051 terimobil.
3. Interaksi Faktor A dan B :
   F hitung AB < F tabel, tidak ada pengaruh interaksi konsentrasi isomalt dengan lama penyimpanan terhadap viabilitas sel *L.acidophilus* FNCC 0051 terimobil.

Hasil UJI DMRT Sel Imobil Selama Penyimpanan

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05				Notasi
		1	2	3	4	
P5	6	9.0893				a
P1	6	9.2066	9.2066			ab
P4	6		9.3325	9.3325		bc
P2	6			9.3853	9.3853	cd
P3	6				9.5384	d
Sig.		.145	.119	.501	.062	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample size = 6.000.
Keterangan :
*) Huruf yang berbeda menunjukkan ada beda nyata antar perlakuan.

Hasil Selisih Pengujian Viabilitas Sel Imobil dari Hari ke-21 ke Hari ke-0 Hari ke-0

Ulangan	Konsentrasi Isomalt				
	I1	I2	I3	I4	I5
1	9.1761	9.3424	9.4771	9.3010	9.0414
2	9.1761	9.3802	9.4624	9.2304	9.0792
3	9.1461	9.3979	9.4624	9.3617	9.0414

Hari ke-21

Ulangan	Konsentrasi Isomalt				
	I1	I2	I3	I4	I5
1	9.2304	9.3617	10.0414	9.3424	9.1139
2	9.2553	9.3979	9.5315	9.3617	9.1139
3	9.2553	9.4314	9.2553	9.3979	9.1461

Selisih

Ulangan	Konsentrasi Isomalt				
	I1	I2	I3	I4	I5
1	0.0543	0.0193	0.5643	0.0414	0.0725
2	0.0792	0.0177	0.0691	0.1313	0.0347
3	0.1092	0.0335	0.2071	0.0362	0.1047

Hipotesis:

H0= Tidak terdapat pengaruh konsentrasi isomalt terhadap selisih viabilitas sel *L.acidophilus* FNCC 0051 terimobil selama 21 hari penyimpanan.

H1= Terdapat pengaruh konsentrasi isomalt terhadap selisih viabilitas sel *L.acidophilus* FNCC 0051 terimobil selama 21 hari penyimpanan.

ANOVA Sel Imobil selama Penyimpanan

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	0.1210	0.0303	2.16	3.48
Galat	10	0.1404	0.0140		
Total	14	0.2614			

Kesimpulan:

F hitung < F tabel sehingga H0 diterima → Tidak terdapat pengaruh konsentrasi isomalt terhadap selisih viabilitas sel *L.acidophilus* FNCC 0051 terimobil selama 21 hari penyimpanan.

LAMPIRAN M
HASIL PENGUJIAN TEKSTUR

Hasil Pengujian *Hardness* ulangan 1

Sampling	Konsentrasi Isomalt				
	1%	2%	3%	4%	5%
1	164.015	117.977	105.353	119.501	80.865
2	171.198	119.61	27.862	110.685	111.338
3	121.895	22.202	29.821	136.044	131.146
4	178.925	25.467	23.944	118.957	144.533
5	189.482	171.96	154.655	96.537	144.316
6	61.274	242.811	113.08	128.208	149.757
7	76.729	31.236	132.67	142.901	118.739
8	70.525	120.154	151.716	121.569	26.447
9	159.008	129.623	182.19	132.561	140.615
10	158.138	184.911	127.337	119.175	101.543
Rerata	135.119 ± 48.673	116.595 ± 73.301	104.863 ± 57.839	122.614 ± 13.252	114.930 ± 38.111

Hardness ulangan 2

Sampling	Konsentrasi Isomalt				
	1%	2%	3%	4%	5%
1	328.015	141.153	156.607	21.875	92.071
2	80.099	121.564	113.837	221.035	129.617
3	331.28	121.564	75.42	148.989	93.703
4	490.499	19.916	142.894	138.106	128.747
5	344.231	139.63	106.11	227.129	84.452
6	334.11	145.289	150.295	71.066	129.508
7	313.323	99.798	117.21	132.12	103.389
8	471.998	21.875	130.488	138.215	110.789

Sampling	Konsentrasi Isomalt				
	1%	2%	3%	4%	5%
9	506.933	216.137	148.662	131.141	109.592
10	428.139	141.48	157.478	188.277	88.044
Rerata	362.863 ± 124.282	116.841 ± 58.817	129.900 ± 26.592	141.795 ± 62.708	106.991 ± 17.615

Hardness ulangan 3

Sampling	Konsentrasi Isomalt				
	1%	2%	3%	4%	5%
1	175.303	169.101	106.314	78.892	103.484
2	265.947	156.587	117.304	149.187	108.707
3	228.405	192.278	109.904	128.621	104.028
4	250.495	192.714	116.651	134.497	110.449
5	176.718	191.299	109.034	134.497	102.287
6	178.241	155.281	106.205	162.68	101.743
7	349.736	152.343	141.352	155.063	101.743
8	298.266	190.211	110.449	166.815	116.433
9	289.234	188.687	120.133	140.155	99.023
10	217.089	189.449	115.998	157.675	103.593
Rerata	242.943 ± 58.899	177.795 ± 17.331	115.334 ± 10.348	140.808 ± 25.331	105.149 ± 5.201

HASIL UJI ANOVA

Hipotesis:

H0= Tidak terdapat pengaruh konsentrasi isomalt terhadap *hardness* pada *beads* yang terbentuk.

H1= Terdapat pengaruh konsentrasi isomalt terhadap *hardness* pada *beads* yang terbentuk.

Ulangan	Konsentrasi Isomalt				
	1%	2%	3%	4%	5%
1	135.119	116.595	104.863	122.614	114.930
2	362.863	116.841	129.900	141.795	106.991
3	242.943	177.795	115.334	140.808	105.149
Rerata	246.975	137.077	116.699	135.072	109.023

ANOVA *Hardness* Sel Imobil

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	37730.1667	9432.5417	3.49	3.84
Kelompok	2	7398.5682	3699.2841		
Galat	8	21649.9979	2706.2497		
Total	14	66778,7328			

Kesimpulan:
F hitung < F tabel sehingga H0 diterima → Tidak terdapat pengaruh konsentrasi isomalt terhadap *hardness* pada *beads* yang terbentuk.

Pengujian *Cohesiveness* Sel Imobil ulangan 1

Sampling	Konsentrasi Isomalt				
	1%	2%	3%	4%	5%
1	0.568	0.568	0.573	0.564	0.636
2	0.568	0.569	0.539	0.562	0.588
3	0.598	0.479	0.619	0.542	0.547
4	0.556	0.754	0.776	0.554	0.535
5	0.547	0.515	0.525	0.596	0.529
6	0.194	0.484	0.570	0.557	0.520
7	0.607	0.753	0.539	0.541	0.557
8	0.615	0.583	0.528	0.569	0.752
9	0.568	0.573	0.459	0.538	0.535
10	0.563	0.513	0.552	0.563	0.600
Rerata	0.538 ± 0.123	0.579 ± 0.099	0.568 ± 0.084	0.559 ± 0.017	0.580 ± 0.071

Cohesiveness ulangan 2

Sampling	Konsentrasi Isomalt				
	1%	2%	3%	4%	5%
1	0.313	0.517	0.380	0.668	0.569
2	0.501	0.548	0.333	0.364	0.541
3	0.415	0.522	0.550	0.489	0.581
4	0.289	0.600	0.398	0.517	0.532
5	0.351	0.446	0.519	0.416	0.598
6	0.323	0.510	0.283	0.561	0.538
7	0.433	0.554	0.511	0.379	0.563
8	0.379	0.573	0.458	0.501	0.563
9	0.295	0.464	0.472	0.507	0.566
10	0.315	0.516	0.491	0.281	0.600
Rerata	0.361 ± 0.070	0.525 ± 0.047	0.440 ± 0.087	0.468 ± 0.111	0.565 ± 0.024

Cohesiveness ulangan 3

Sampling	Konsentrasi Isomalt				
	1%	2%	3%	4%	5%
1	0.548	0.526	0.519	0.561	0.563
2	0.497	0.544	0.570	0.489	0.566
3	0.520	0.516	0.519	0.557	0.563
4	0.514	0.509	0.511	0.538	0.563
5	0.549	0.508	0.519	0.542	0.600
6	0.548	0.550	0.519	0.281	0.600
7	0.468	0.546	0.398	0.489	0.600
8	0.490	0.518	0.570	0.364	0.557
9	0.497	0.522	0.511	0.501	0.569
10	0.521	0.503	0.333	0.364	0.563
Rerata	0.515 ± 0.028	0.524 ± 0.017	0.497 ± 0.074	0.469 ± 0.097	0.574 ± 0.018

HASIL UJI ANOVA

Hipotesis:

H0= Tidak terdapat pengaruh konsentrasi isomalt terhadap *cohesiveness* pada *beads* yang terbentuk.

H1= Terdapat pengaruh konsentrasi isomalt terhadap *cohesiveness* pada *beads* yang terbentuk.

Ulangan	Konsentrasi Isomalt				
	1%	2%	3%	4%	5%
1	0.979	0.579	0.568	0.559	0.580
2	0.361	0.525	0.440	0.468	0.565
3	0.937	0.524	0.497	0.469	0.574
Rerata	0.759	0.543	0.502	0.499	0.573

ANOVA C*ohesiveness* Sel Imobil

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	0.1383	0.0346	1.66	3.84
Kelompok	2	0.0868	0.0434		
Galat	8	0.1675	0.0209		
Total	14	0.3926			

Kesimpulan:

F hitung < F tabel sehingga H0 diterima → Tidak terdapat pengaruh konsentrasi isomalt terhadap *cohesiveness* pada *beads* yang terbentuk.

Hasil Pengujian *Springiness* ulangan 1

Sampling	Konsentrasi Isomalt				
	1%	2%	3%	4%	5%
1	0.853	0.808	0.818	0.815	0.913
2	0.895	0.813	0.668	0.796	0.868
3	0.828	0.653	0.676	0.736	0.860
4	0.810	0.601	0.651	0.83	0.808
5	0.833	0.796	0.766	0.878	0.751
6	0.805	0.693	0.721	0.848	0.686
7	0.873	0.718	0.796	0.833	0.718
8	0.918	0.858	0.786	0.93	0.623
9	0.878	0.903	0.791	0.778	0.766
10	0.853	0.761	0.756	0.805	0.883
Rerata	0.855 ± 0.037	0.760 ± 0.094	0.743 ± 0.060	0.825 ± 0.054	0.788 ± 0.095

Springiness ulangan 2

Sampling	Konsentrasi Isomalt				
	1%	2%	3%	4%	5%
1	0.706	0.865	0.641	0.531	0.865
2	0.808	0.828	0.728	0.651	0.835
3	0.678	0.825	0.718	0.766	0.820
4	0.646	0.526	0.691	0.83	0.766
5	0.691	0.693	0.796	0.758	0.800
6	0.696	0.711	0.618	0.796	0.818
7	0.706	0.791	0.746	0.766	0.818
8	0.766	0.464	0.788	0.723	0.895
9	0.611	0.688	0.736	0.696	0.828
10	0.623	0.723	0.81	0.768	0.865
Rerata	0.693 ± 0.061	0.711 ± 0.130	0.727 ± 0.064	0.729 ± 0.086	0.831 ± 0.037

Springiness ulangan 3

Sampling	Konsentrasi Isomalt				
	1%	2%	3%	4%	5%
1	0.783	0.823	0.796	0.796	0.818
2	0.766	0.855	0.721	0.766	0.828
3	0.815	0.86	0.796	0.848	0.818
4	0.763	0.763	0.746	0.778	0.895
5	0.875	0.716	0.796	0.736	0.865
6	0.825	0.878	0.796	0.768	0.883
7	0.716	0.803	0.691	0.766	0.883
8	0.706	0.815	0.721	0.651	0.718
9	0.728	0.798	0.746	0.723	0.865
10	0.793	0.768	0.728	0.651	0.818
Rerata	0.777 ± 0.053	0.808 ± 0.050	0.754 ± 0.039	0.748 ± 0.061	0.839 ± 0.052

HASIL UJI ANOVA

Hipotesis:

H0= Tidak terdapat pengaruh konsentrasi isomalt terhadap *springiness* pada *beads* yang terbentuk.

H1= Terdapat pengaruh konsentrasi isomalt terhadap *springiness* pada *beads* yang terbentuk.

Ulangan	Konsentrasi Isomalt				
	1%	2%	3%	4%	5%
1	1.554	0.760	0.743	0.825	0.788
2	1.260	0.711	0.727	0.729	0.831
3	1.413	0.808	0.754	0.748	0.839
Rerata	1.409	0.760	0.741	0.767	0.819

ANOVA *Springiness* Sel Imobil

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	0.9842	0.2461	53.50*	3.84
Kelompok	2	0.0183	0.0092		
Galat	8	0.0367	0.0046		
Total	14	1.0392			

Kesimpulan:

F hitung > F tabel sehingga H1 diterima → Terdapat pengaruh konsentrasi isomalt terhadap *springiness* pada *beads* yang terbentuk.

Hasil UJI DMRT *Springiness* Sel Imobil

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05		Notasi
		1	2	
P3	3	0.741		a
P2	3	0.760		a
P4	3	0.767		a
P5	3	0.819		a
P1	3		1.409	b
Sig.		0.221	1.000	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample size = 3.000.
Keterangan :
*) Huruf yang berbeda menunjukkan ada beda nyata antar perlakuan.

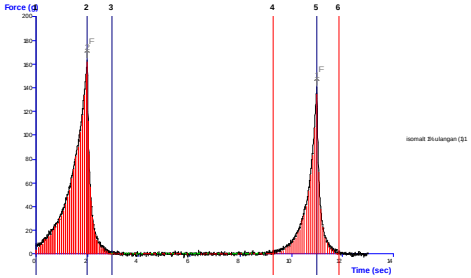
LAMPIRAN N
FOTO *BEADS* YANG TERBENTUK

HARI KE-0

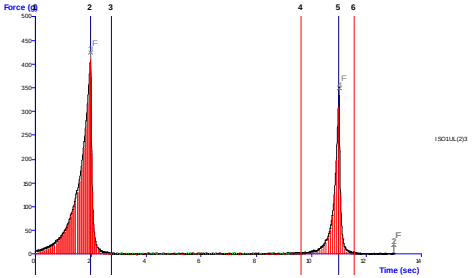
HARI KE-21

Lampiran O
GRAFIK PENGUJIAN TEKSTUR

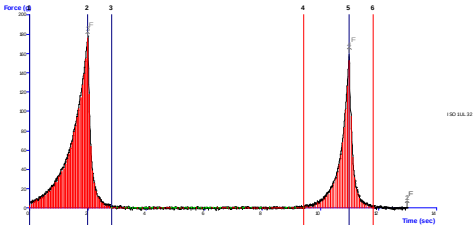
ISOMALT 1% ULANGAN 1



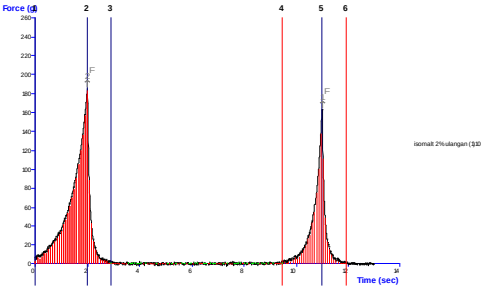
ISOMALT 1% ULANGAN 2



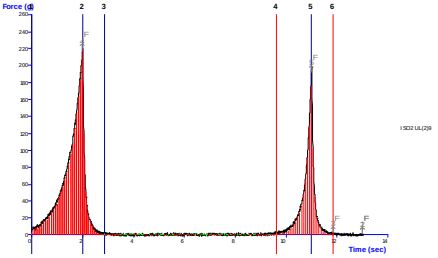
ISOMALT 1% ULANGAN 3



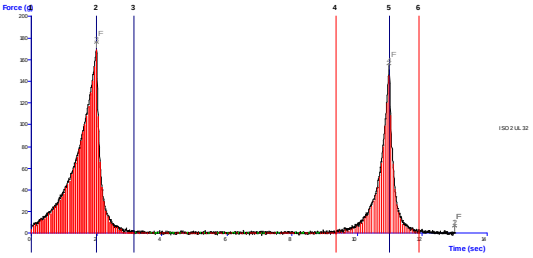
ISOMALT 2% ULANGAN 1



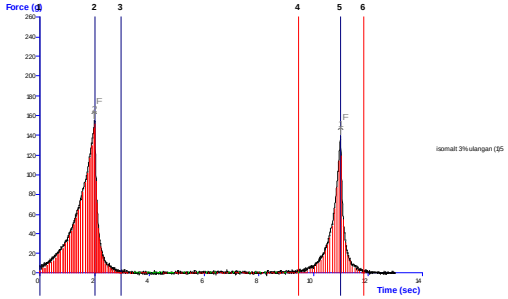
ISOMALT 2% ULANGAN 2



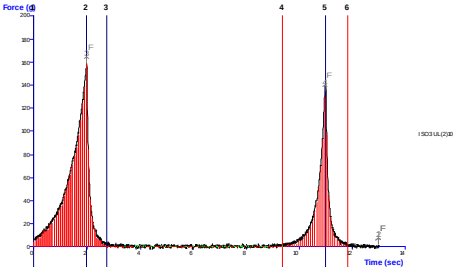
ISOMALT 2% ULANGAN 3



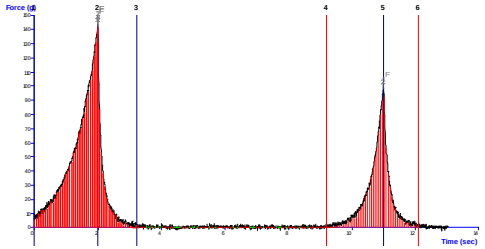
ISOMALT 3% ULANGAN 1



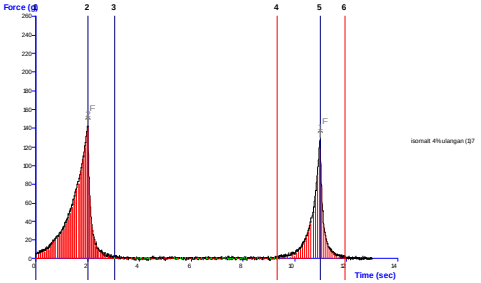
ISOMALT 3% ULANGAN 2



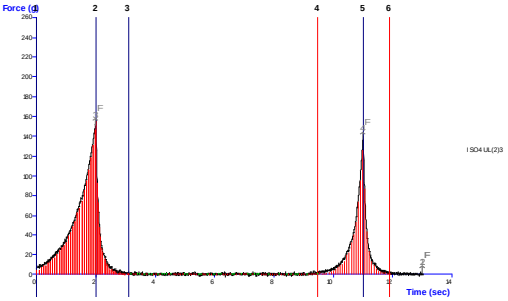
ISOMALT 3% ULANGAN 3



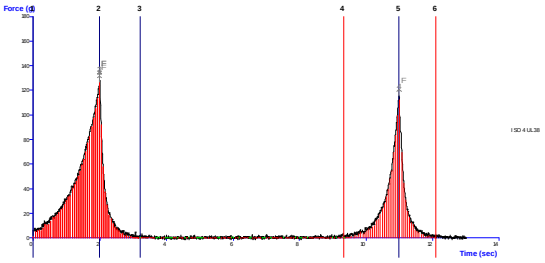
ISOMALT 4% ULANGAN 1



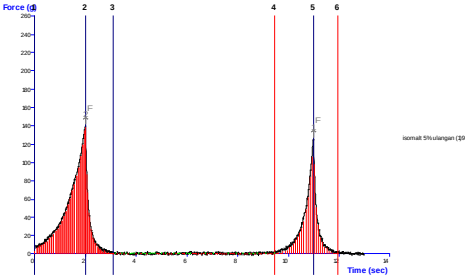
ISOMALT 4% ULANGAN 2



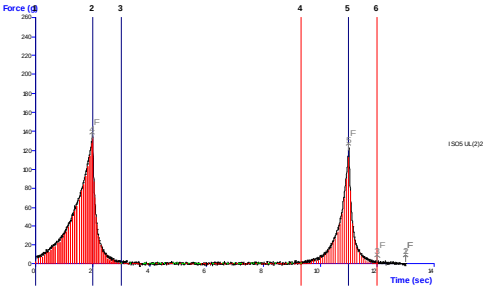
ISOMALT 4% ULANGAN 3



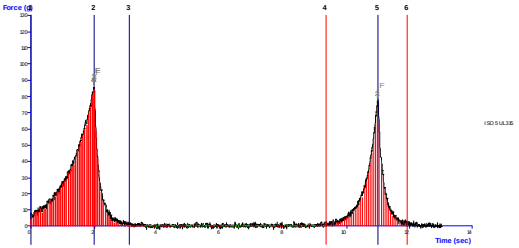
ISOMALT 5% ULANGAN 1



ISOMALT 5% ULANGAN 2



ISOMALT 5% ULANGAN 3



SURAT PERNYATAAN

Dengan ini saya yang tanda tangan dibawah ini:

Nama	: Silvy Florenza
NRP	: 6103010078
Program Studi	: Teknologi Pangan
Fakultas	: Teknologi Pertanian Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya

Menyatakan dengan sungguh-sungguh dan sebenarnya bahwa:

1. Penelitian yang berjudul **"Pengaruh Penambahan Isomalt dan Lama Penyimpanan Terhadap Ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil dalam Gel Alginat pada Asam Lambung dan Garam Empedu Secara In Vitro"** adalah merupakan bagian dari penelitian yang berjudul "PenggunaanTepung Pepaya dan Bakteri Probiotik Terimobilisasi dalam Pembuatan Produk Sinbiotik: Optimasi Formulasi, Stabilitas dalam Sistem Pangan dan Manfaatnya terhadap Kesehatan Usus" yang dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Program Penelitian Desentralisasi 2014 yang telah memberikan dana penelitian melalui Pusat Penelitian Pangan dan Gizi dengan (PPPG) *Reseacrh Project* 2014 dengan Tim Peneliti:
   Indah Kuswardani, MP.
   Netty Kusumawati, M. Si.
2. Sebagai konsenkuensi dari yang disebutkan dari poin 1 (satu) adalah semua hasil penelitian **"Penggunaan Tepung Pepaya dan Bakteri Probiotik Terimobilisasi dalam Pembuatan Produk Sinbiotik: Optimasi Formulasi, Stabilitas dalam Sistem Pangan dan Manfaatnya terhadap Kesehatan Usus"** adalah merupakan bagian dari program Pusat Penelitian Pangan dan Gizi dengan (PPPG) *Reseacrh Project 2014*.
3. Tim Peneliti berhak mempublikasikan sebagian atau keseluruhan hasil penelitian dengan memperhitungkan peran serta mahasiswa sebagai pelaksana.

Dengan pernyataan ini untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Mengetahui dan menyetujui,
Ketua Tim Peneliti

(Endang Widoeri W.)

Mahasiswa yang bersangkutan

(Silvy Florenza)

PENGARUH PENAMBAHAN ISOMALT DAN LAMA PENYIMPANAN TERHADAP KETAHANAN *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 TERIMOBIL DALAM GEL ALGINAT PADA ASAM LAMBUNG DAN GARAM EMPEDU SECARA IN VITRO

EFFECT OF ADDITION ISOMALT AND STORAGE TIME AGAINTS RESISTANCE OF *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* FNCC 0051 IMOBILIZED IN ALGINATE GEL ON GATRIC ACID AND BILE SALTS IN VITRO

Silvy Florenza[1,*], Netty Kusumawati [1,2] dan Ira Nugerahani [12]
[1]Mahasiswa Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya
[2]Staff Pengajar FTP-UKWMS
*silphy_vivi@hotmail.com

Abstract

Isomalt is slowly and partially digested and absorbed in the upper gastrointestinal tract and its proved as prebiotic because it can be used for growth and stimulate lactobacteria. Isomalt is combined with alginate gel can increase the strength of entrapped gel in protecting cells. L. acidophillus FNCC 0051 is probiotics which combined with isomalt as prebiotics. The combination of both can be called synbiotic. The majority of probiotics can not be utilized by the body because before reaching the intestine is dead because of the acidic conditions (pH=2) and bile salts. One way to improve the survival of probiotics is through immobilization cell. The purpose of this study to determine the effect of addition isomalt and storage time and their interactions of survival of L. acidophillus FNCC 0051 immobilized in alginate gel on gastric acid and bile salts in vitro.

The experimental design using a randomized block design factorial design consisting of two factors with three replications. Concentration of isomalt (1%, 2%, 3%, 4%, and 5%), and storage time (0 and 21 days). The parameters observed are survival of immobile cell in gastric acid and bile salts in vitro, diameter and texture of beads (supporter data). Data were analyzed by ANOVA test at α=5%, and continued to test Real Difference Distance Duncan (Duncan's Multiple Range Test) to determine the level of treatment that provides a real difference. Differences in the concentration of isomalt significantly affect survival of L.acidophillus FNCC 0051 on gastric acid and bile salts. Increased concentrations of isomalt up to 3% increase cell survival in gastric acid and bile salts but at concentrations of isomalt above 3% decreased cell survival. Survival of immobilized cells at various concentrations of isomalt after exposure to gastric acid and bile salts from 0,9380 to 1,0957 log cfu/g and 0,3299 to 0,4596 log cfu/g respectively. Storage time significantly affect survival of L.acidophillus FNCC 0051 immobilized on bile salts. Storage time for 21 days led to the cells more resistant when in contact with bile salts when compared with those not stored. The decrease of cell number

immobilized during storage time after contacted with bile salts in vitro by 0,3887 log cfu/g and are not stored by 0,4069 log cfu/g. Value of diameter beads on day 0 and 21 are 3,40 mm and 3,58 mm. Concentration of isomalt had no significant effect on the hardness and cohesiveness but significant effect springiness. The value of springiness increased with the addition of isomalt up to 3% but the addition of over 3% led to a decrease in cell survival.

Keywords: *isomalt, synbiotic, resistance, storage time*

Abstrak

Isomalt secara perlahan dan sebagian dicerna dan diserap dalam saluran pencernaan bagian atas, dan terbukti sebagai prebiotik karena dapat digunakan untuk pertumbuhan dan menstimulasi lactobacteria. Isomalt yang dikombinasikan dengan gel alginat dapat meningkatkan kekuatan matriks gel penjerat dalam melindungi sel. Sel L. acidophillus FNCC 0051 merupakan probiotik yang dikombinasikan dengan isomalt yang berperan sebagai prebiotik. Kombinasi keduanya dapat disebut sinbiotik. Probiotik kebanyakan tidak dapat dimanfaatkan oleh tubuh karena sebelum mencapai usus sudah mati akibat kondisi asam (pH=2) dalam lambung dan garam empedu. Salah satu cara meningkatkan ketahanan probiotik dengan mengimobilisasi sel. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh penambahan isomalt dan lama penyimpanan serta interaksinya terhadap ketahanan sel L. acidophillus FNCC 0051 terimobil dalam gel alginat pada asam lambung dan garam empedu secara in vitro.

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok Faktorial terdiri dari dua faktor dengan pengulangan tiga kali. Konsentrasi isomalt (1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%), dan lama penyimpanan hari ke-0 dan 21. Parameter yang diuji yaitu ketahanan sel terimobil pada asam lambung dan garam empedu secara in vitro serta diameter dan tekstur beads sebagai data pendukung. Data dianalisa dengan uji ANAVA pada α=5%, dan dilanjutkan dengan uji DMRT untuk menentukan perlakuan mana yang berbeda nyata. Berdasarkan hasil uji, perbedaan konsentrasi isomalt berpengaruh nyata terhadap ketahanan sel L. acidophillus FNCC 0051 terimobil pada asam lambung dan garam empedu. Peningkatan konsentrasi isomalt hingga 3% meningkatkan ketahanan sel pada asam lambung dan garam empedu tetapi pada konsentrasi diatas 3% ketahanan sel semakin menurun. Ketahanan sel terimobil pada berbagai konsentrasi isomalt setelah kontak dengan asam lambung dan garam empedu berturut-turut adalah 0,9380-1,0957 log cfu/gram dan 0,3299-0,4596 log cfu/gram. Perlakuan lama penyimpanan berpengaruh nyata terhadap ketahanan sel L.acidophillus FNCC 0051 terimobil pada garam empedu. Penyimpanan selama 21 hari menyebabkan sel lebih tahan jika dikontakkan dengan garam empedu jika dibandingkan dengan yang tidak disimpan. Penurunan jumlah sel terimobil selama penyimpanan setelah dikontakkan dengan garam empedu secara in vitro sebesar 0,3887 log cfu/gram dan yang tidak disimpan sebesar 0,4069 log cfu/gram. Nilai diameter beads

pada hari ke-0 dan 21 adalah 3,40 mm dan 3,58 mm. Konsentrasi isomalt tidak berpengaruh nyata pada hardness, cohesiveness tetapi berpengaruh nyata springiness. Nilai springiness meningkat dengan penambahan isomalt hingga 3% tetapi penambahan isomalt diatas 3% menyebabkan penurunan ketahanan sel.

Kata Kunci*: isomalt, sinbiotik, ketahanan, lama penyimpanan*

PENDAHULUAN

Imobilisasi sel adalah proses menghentikan pergerakan molekul sel dengan menahannya pada matriks. Karbohidrat yang dikombinasikan dengan alginat dapat meningkatkan kekuatan matriks penjerat dalam melindungi sel (Monedero, dkk., 2010). Isomalt adalah golongan polyol yang tidak tercerna digunakan untuk fermentasi mikroflora usus mendekati 90% dan dapat didegradasi oleh *bifidobacteria* dan digunakan untuk pertumbuhan, multiplikasi dan menstimulasi *lactobacteria* dalam pencernaan (Liversey, 2003).

Imobilisasi ini menggunakan sel *L. acidophilus* FNCC 0051 dengan menambahkan isomalt sebagai prebiotik dan disimpan di dalam susu UHT sebagai *carier* pada suhu refrigerator 5±2^{o}C. Selama 30 menit sel terimobil akan dikontakkan dengan HCl pH 2,5. Sel imobil yang telah kontak dengan HCl pH 2,5 kemudian dimasukkan ke dalam *oxgall* 0% dan 1% selama tiga jam dan dilanjutkan pengujian Total BAL. Isomalt digunakan dalam penelitian karena menurut beberapa penelitian isomalt merupakan prebiotik yang dapat meningkatkan kekuatan matriks penjerat bakteri. Hasil penelitian pendahuluan, semakin bertambahnya konsentrasi isomalt, *beads* yang dihasilkan semakin kecil elastisitasnya sehingga konsentrasi diatas 5% *beads* yang dihasilkan semakin keras dan mudah retak. Oleh karena itu konsentrasi isomalt yang digunakan 1%, 2%, 3%, 4%, 5% dan lama penyimpanan adalah 0 dan 21 hari. Pemilihan lama waktu pengujian berdasarkan rata-rata umur simpan minuman probiotik adalah 30-60 hari sedangkan selisih waktu pengujian satu dengan yang lain selama 21 hari berdasarkan pada penelitian pendahuluan, dimana selisih 14 hari belum tampak perubahan ketahanan asam lambung dan garam empedu yang nyata.

Tujuan dari penelitian mengetahui pengaruh penambahan isomalt, lama penyimpanan, dan interaksi antara kedua faktor terhadap ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung dan garam empedu. Selain itu dilakukan pengujian terhadap tekstur (*hardness, cohesiveness,* dan *springiness*) dan diameter *beads* sebagai data pendukung.

BAHAN DAN METODE

Bahan penelitian

Kultur bakteri *L. acidophilus* FNCC 0051, Na-alginat murni, larutan $CaCl_2$ 1%, isomalt, larutan NaCl 0,85%, *oxgall*, larutan HCl 37%, larutan Na-sitrat 0,1 M teknis, susu UHT "Ultra Milk", MRS *Broth*, Agar "*Bacto Agar*", Pepton *from meat* (merk "Merck 1.07224"), alkohol 96%, larutan Crystal Violet modifikasi Hucker, larutan iodin, larutan alkohol aseton, larutan Safranin Gram Stain, minyak immerse, akuades.

Pembuatan Sel Imobil (Sheu and Marshall (1993); Lee and Heo (2000); Klinkenberg (2001)

Dua mL kultur cair *L. acidophilus* FNCC 0051 dalam MRSB dimasukkan ke 40 ml larutan Na-alginat steril 2% (b/v) yang telah ditambahkan isomalt 1% (b/v), 2% (b/v), 3% (b/v), 4% (b/v), 5% (b/v), kemudian dihomogenisasi dengan vortex 3 menit. Setelah itu dilakukan penetesan ke dalam 300 mL larutan $CaCl_2$ dingin dan didiamkan pada suhu 5 ± 2^oC, ±15 menit kemudian dicuci dengan larutan NaCl 0,85% sebanyak 3x @100 mL. 30 gram *beads* dimasukkan ke dalam 100 ml susu UHT *full cream* secara aseptis dan disimpan dalam *refrigerator* (4-7^{o}C) selama 21 hari.

Pengujian Ketahanan pada Asam Lambung (Lee and Heo, 2000, dengan modifikasi)

Tiga gram sel imobil dimasukkan dalam media MRS broth yang diatur pH 2,5 (HCl 0,08 M) kemudian diinkubasi 30 menit (modifikasi), 37^0C *beads* diambil menggunakan sendok porselen steril secara aseptis, dilarutkan ke dalam 27 mL larutan Na-sitrat 0,1 M steril dan dikocok sampai terlarut semua. Setelah itu, dilakukan seri pengenceran, penuangan MRS agar, dan diinkubasi selama 37^0C, 48 jam dan dilakukan perhitungan koloni yang tumbuh. Rumus ketahanan *L. acidophilus FNCC* 0051 terimobil terhadap asam lambung (sel/gram) :

Jumlah penurunan sel = log (ALT tabung a) – (ALT tabung b)

Tabung a adalah sel imobil tanpa dikontakkan, tabung b adalah sel imobil yang dikontakkan dengan HCl pH 2,5. Tabung c adalah sel imobil yang dikontakkan dengan *oxgall* 0%. Tabung d adalah sel imobil yang dikontakkan dengan *oxgall* 1%.

Pengujian Ketahanan pada Garam Empedu (Lee and Heo, 2000, dengan modifikasi)

Tiga gram sel imobil yang telah dikontakkan dengan asam lambung dimasukkan ke MRS *Broth+oxgall* sebanyak 1% (b/v), diinkubasi 37^0C, 3 jam (modifikasi), diambil dengan sendok porselen steril secara aseptis dan dilarutkan dalam 27 mL larutan Na-sitrat 0,1 M steril pada suhu kamar. Kemudian dikocok sampai larut dan dilakukan seri pengenceran, penuangan MRS agar yang telah dicairkan, dan dilanjutkan dengan inkubasi 37^0C, 48

jam (Lee and Heo, 2000, dengan modifikasi). Sebagai kontrol, dilakukan prosedur di atas tetapi dalam media MRS-*broth* tanpa penambahan *oxgall.* Ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil terhadap garam empedu dinyatakan sebagai ketahanan relatif yang diperoleh dengan:

Jumlah penurunan sel pada garam empedu = log (ALT tabung c – ALT tabung b) – log (ALT tabung d – ALT tabung b)

Pengujian Tekstur

Satu *beads* diletakkan pada *glass plate* di bawah *probe.* Pendeteksian otomatis dengan gaya 8 gram dan jarak 1 mm kemudian dikompresi sebesar 30% dengan kecepatan 0,5mm/s^{-1}

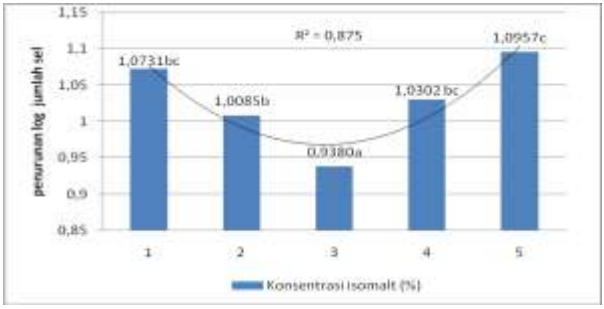
Pengujian Diameter *Beads*

Satu *beads* dengan bentuk yang sama diukur dengan micrometer (mm).

PEMBAHASAN

Pengaruh Penambahan Isomalt dan Lama Penyimpanan terhadap Ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Asam Lambung

Faktor perlakuan perbedaan konsentrasi isomalt berpengaruh nyata terhadap ketahanan sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 namun faktor perlakuan lama penyimpanan serta interaksi antara kedua faktor perlakuan tidak berbeda nyata terhadap ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung.



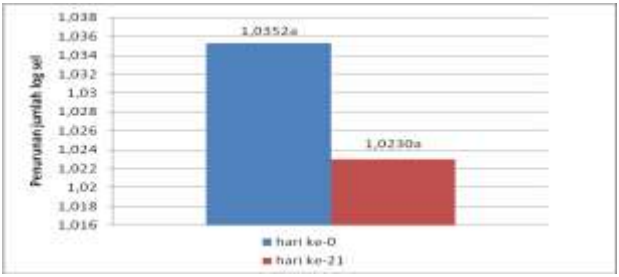
Gambar 1. Pengaruh Konsentrasi Isomalt terhadap Ketahanan Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Asam Lambung

Jumlah sel awal *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 berkisar 1,9 x 10^{11} cfu/gram dan jumlah bakteri sel terimobil berkisar 1,1 x 10^{9}-5,4 x 10^{9} cfu/gram**.** Hasil penelitian menunjukkan jumlah sel hidup terimobil yang kontak dengan HCl pH 2,5 pada semua kombinasi perlakuan berkisar antara 8,8.10^{7}-2,3.10^{9} cfu/g *beads*. Semakin kecil selisih log, semakin besar ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051. Hasil penelitian dari Gambar 1 menunjukkan bahwa seiring meningkatnya jumlah konsentrasi

isomalt sampai konsentrasi 3% cenderung terjadi peningkatan ketahanan sel *L. acidophilus* FNCC 0051 terimobil dengan pH 2,5.

Peningkatan ini terjadi karena isomalt berfungsi sebagai bahan pengisi (*filler*) (Bolhuis *et al.*, 2009) yang dapat memberikan kekokohan pada *beads* yang terbentuk dengan cara mengisi kekosongan rongga pada kapsul kalsium alginat karena kapsul kalsium alginat sangat berpori yang memungkinkan cairan dapat berdifusi keluar masuk matriks sehingga sel bakteri dapat berkembang biak, ketahanan sel tinggi, dan tidak terganggu dengan kondisi lingkungan seperti kondisi asam. Berdasarkan jumlah sel hidup yang terimobil tersebut, menunjukkan bahwa ketahanan sel *L. acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung mengalami penurunan sebesar 1 log dari jumlah sel terimobil. Pada lingkungan asam (pH = 2,5) sel akan mengalami *injury*, sebagian lapisan protein permukaan hilang dan terjadi perubahan struktural lapisan lipopolisakarida dan lapisan ini kehilangan kemampuannya sebagai pelindung dari senyawa kimia di luar sel. Perubahan lapisan lipopolisakrida ini dikarenakan hilangnya kation divalen yang diperlukan untuk stabilitas lipopolisakarida. Selain itu membran sitoplasma kehilangan permeabilitasnya, dan terjadi kerusakan DNA.

Perlakuan isomalt diatas 3% menunjukkan jumlah penurunan sel semakin besar. Penurunan ketahanan sel ini disebabkan karena adanya keterbatasan air yang tersedia untuk pembentukan gel *beads* (karena ada kompetisi antara isomalt dan alginat). *Beads* yang dihasilkan kokoh namun sifat elastisnya menurun. Hal ini sesuai dengan uji *springiness* yang menunjukkan dengan bertambahnya konsentrasi isomalt maka *beads* yang terbentuk sifat elastisnya semakin berkurang. Hal ini mengakibatkan jumlah sel menurun dan sel kontak dengan lingkungan asam



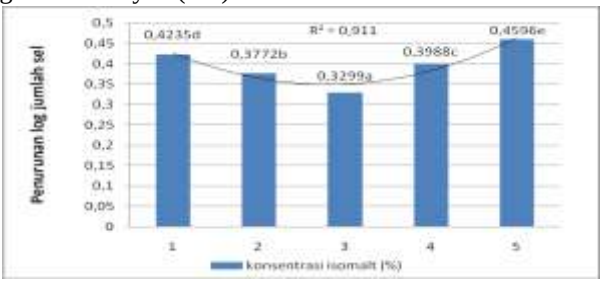
Gambar 2. Pengaruh Lama Penyimpanan terhadap Ketahanan Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Asam Lambung

Semakin lama waktu penyimpanan menunjukkan peningkatan jumlah sel (Gambar 2). Peningkatan jumlah sel bakteri dikarenakan Hal ini dikarenakan selama penyimpanan isomalt dengan baik mengisi kekosongan

rongga matriks Na alginat sehingga ketahanan sel tidak berbeda nyata dari hari ke-0. Interaksi antara kedua perlakuan juga tidak menimbulkan pengaruh yang beda nyata. Hal ini dapat terjadi karena perlakuan lama penyimpanan tidak menyebabkan perubahan pertumbuhan bakteri yang hidup secara nyata seiring dengan bertambahnya konsentrasi isomalt sebagai prebiotik.

Pengaruh Penambahan Isomalt dan Lama Penyimpanan terhadap Ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Garam Empedu

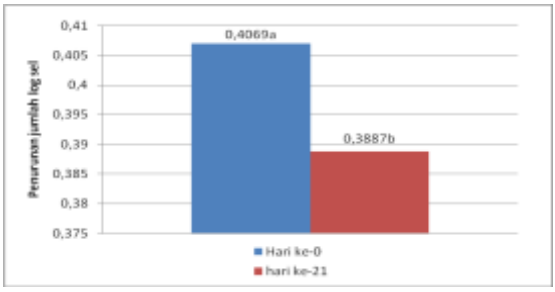
Konsentasi isomalt hingga 3% menunjukkan peningkatan ketahanan sel. Peningkatan ini terjadi karena isomalt berfungsi sebagai bahan pengisi (*filler*) yang dapat memberikan kekokohan pada *beads* yang terbentuk dengan cara mengisi kekosongan rongga pada kapsul kalsium alginat karena kapsul kalsium alginat sangat berpori yang memungkinkan air dapat berdifusi keluar masuk matriks sehingga sel bakteri dapat berkembang biak, ketahanan sel tinggi. Pada konsentrasi 4% dan 5% terjadi penurunan ketahananselyang semakin besar hal ini dikarenakan adanya keterbatasan air yang tersedia untuk pembentukan gel. Dengan bertambahnya isomalt maka kemampuannya untuk menyerap air lebih banyak karena isomalt memiliki gugus hidrofilik bebas yang dapat menyerap air dan dapat mengganggu pembentukan gel oleh kalsium alginat (terjadi kompetisi antara isomalt dengan kalsium alginat). Hal ini akan menyebabkan gel yang terbentuk tidak kokoh sehingga terjadi penurunan jumlah sel yang terperangkap dibuktikan dengan uji tekstur bahwa dengan bertambahnya konsentrasi isomalt maka *beads* yang terbentuk rapuh (mudah pecah) yang sesuai dengan uji *springiness* menunjukkan bahwa *beads* yang terbentuk tidak mampu kembali ke bentuk awal setelah diberi tekanan (tidak dapat mempertahankan keelastisannya). Menurut Sultana *et al*., (2000) dalam penelitiannya melakukan enkapsulasi *Bifidobacterium* dan *Lb. casei* menggunakan alginat 2%, dan dengan penambahan prebiotik pati jagung sebagai *filler* sebanyak 0 – 4%. Penambahan *filler* (Hi-maize) meningkatkan rendemen dan jumlah *Lb*. *Casei* yang terenkapsulasi dalam *beads*. Namun, *filler* yang terlalu banyak (4%) akan menurunkan rendemen *beads*.



Gambar 3. Pengaruh Konsentrasi Isomalt terhadap Ketahanan Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Garam Empedu

Selama penyimpanan *beads* dimasukkan ke dalam *carrier* susu UHT pada suhu 5±2^{o}C. Penggunaan suhu rendah dapat membuat sel mengalami *injury*. Sel yang mengalami *injury* dapat membentuk koloni setelah sel membenahi kerusakannya seperti ATP, ARN, ADN, dan mukopeptida, dan dinding sel kembali mencegah masuknya senyawa yang merugikan sel serta membran sitoplasma memperoleh sifat permeabelnya kembali (Ray,2001). Saat bakteri mengalami lingkungan yang buruk (*stress adaptation)* bakteri akan menghasilkan *shock proteins. Shock proteins* akan menyediakan perlindungan pada DNA dan beberapa enzim yang mengalami stress. Pembentukan protein ini merupakan respon sel dari induksi gen-gen oleh faktor tekanan. Hal ini yang mengakibatkan penurunan jumlah sel bakteri semakin kecil selama penyimpanan. Selain itu bakteri dapat bertahan terhadap garam empedu karena memiliki kemampuan mendekonjugasi garam empedu.

Menurut Du Toit *et al.*, (1998), ketahanan bakteri BAL terhadap garam empedu berkaitan dengan enzim *bile salt hydrolase* yang menghidrolisis garam empedu terkonjugasi, sehingga mengurangi efek racun bagi sel. Enzim BSH juga mampu mengubah kemampuan fisik-kimia yang ada di garam empedu, sehingga tidak beracun bagi *L. plantarum.*



Gambar 4. Pengaruh Lama Penyimpanan terhadap Ketahanan Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Terimobil pada Garam Empedu

Diameter *beads*

Selama penyimpanan, diameter *beads* semakin membesar, namun perbedaan konsentrasi isomalt tidak berpengaruh pada diameter *beads.* Menurut Adrianto dkk. (2011), konsentrasi filler tidak berpengaruh terhadap ukuran *beads*. Matriks gel yang terbentuk dari Na alginat dan $CaCl_2$ memiliki struktur *beads* yang mudah pecah dan permukaan *beads* yang

berporus. Penambahan prebiotik isomalt bertujuan untuk meningkatkan kemampuan perlindungan bagi sel-sel bakteri dengan mengisi rongga-rongga matriks gel Ca alginat sehingga menghasilkan matriks gel yang lebih rapat dan mengandung sel-sel bakteri yang aktif bermetabolisme (Jankowski *et al.*, 1997).

Matriks alginat isomalt yang terbentuk masih memiliki pori-pori yang memungkinkan terjadinya difusi nutrien dan metabolit ke dalam dan ke luar *beads* yang dapat menyebabkan perubahan struktur gel matriks menjadi lebih renggang dengan ukuran pori-pori *beads* membesar. Rokka dan Rantamaki (2010), mengatakan bahwa matriks gel alginat memiliki daya elastisitas gel cukup tinggi sehingga memungkinkan terjadinya pengembangan terkait dengan imbibisi (penyerapan air) yang dapat menyebabkan pembesaran diameter *beads* dengan pelonggaran matriks gel. Hal ini membuat semakin lama disimpan diameter *beads* semakin membesar.

Tekstur *Beads*

Perbedaan konsentrasi isomalt tidak berpengaruh nyata terhadap *hardness* dan *cohesiveness*, tetapi berpengaruh terhadap *springiness beads.* Perlakuan konsentrasi isomalt 1% merupakan perlakuan yang memberikan pengaruh nyata terhadap *springiness beads* yang terbentuk. Dengan bertambahnya isomalt maka kemampuannya untuk menyerap air lebih banyak karena isomalt memiliki gugus hidrofilik bebas dimana dapat menyerap air yang dapat mengganggu pembentukan gel oleh alginat (terjadi kompetisi antara isomalt dengan alginat). Fraksi dalam alginat yang banyak mempengaruhi elastisitas gel adalah unit M. Perbandingan unit M dan unit G pada alginat merk Zigma A2033-100G yang digunakan dalam penelitian ini sebesar 69:31 (Gautier *et al.*, 2011). Karena unit M lebih besar rasionya maka dengan adanya keterbatasan air untuk pembentukan gel sangat berpengaruh pada karakteristik gel terutama pada sifat elastisitas gel yang dihasilkan

KESIMPULAN

Perbedaan konsentrasi isomalt berpengaruh nyata terhadap ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada asam lambung dan garam empedu sedangkan perbedaan lama penyimpanan berpengaruh nyata terhadap ketahanan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terimobil pada garam empedu. Interaksi antara perbedaan konsentrasi isomalt dan lama penyimpanan tidak berpengaruh nyata. Perlakuan lama penyimpanan berpengaruh terhadap diameter *beads* dan pengujian *springiness* berpengaruh nyata seiring penambahan konsentrasi isomalt. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang ketahanan sel imobil secara in vitro.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Program Penelitian Desentralisasi 2014 yang telah membiayai penelitian ini sebagai bagian dari Hibah Bersaing yang berjudul "Penggunaan Tepung Pepaya dan Bakteri Probiotik Terimobilisasi dalam Pembuatan Produk Sinbiotik : Optimasi Formulasi, Stabilitas dalam Sistem Pangan dan Manfaatnya terhadap Kesehatan Usus".

DAFTAR PUSTAKA

Adrianto, A., M. Rahayuningsih, dan S. Yuliani. 2011. *Encapsulation of Lactobacillus casei Using Extrusion Technique As Starter Culture for Production of Dadih from Cow Milk.* http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/51162 (15 Januari 2014).

Bolhuis, G.K, E.G. Rexwinkel, and K. Zuurman. 2009. Polyols as Filler Binders for Disintegrating Tablets Prepared by Direct Compaction. Netherlands. *Drug Dev Ind Pharm*. 35)6):671-7

Du Toit, M., C.M. Franz, L.M. Dicks, U. Schillinger, P. Harberer, B. Warlies, F. Ahrens, W.H. Holzapfel. 1998. Characterisation and Selection of Probiotic *Lactobacilli* for a Preliminary Minipig Feeding Trial and Their Effect on Serum Cholesterol Levels, Faeces pH, and Faeces Moisture Content. *Int J Food Microbiol*. 40:93-104

Gautier, A., B. Carpentier, M. Dufresne, Q. Vu Dinh, P. Paullier and C. Legallais. 2011. Impact of Alginate Type and Bead Diameter On Mass Transfers and The Metabolic Activities of Encapsulated C3a Cells In Bioartificial Liver Applications.*European Cells and Materials* 21: 94-106.

Harti, A.S., R.A. Samsumaharto, Hosea. 2012. Efek Penambahan Chito-Oligosakarida sebagai Prebiotik terhadap Pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 secara *In Vitro*. *Jurnal Biomedika.* 5(1).

Jankowski, T., M. Zielinska, and Wysakowska. 1997. Encapsulation of Lactic and Bacteria with Alginate/Starch Capsules. *Biotechnol Technol*. 11:31-34

Krasaekoopt, W., Bhesh, Bhandari and H. Deeth. 2003. Evaluation of Encapsulation Techniques of Probiotics for Yoghurt. *Int. Dairy J.*, 13(1):3–13.

Lee, K.I. and T.R. Heo. 2000. Survival of *Bifidobacterium Longum* Immobilized in Calcium Alginate Beads in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution. *Appl. Environ. Microbiol*. 66: 869-973.

Livesey, G. 2003. Health Potential of Polyols As Sugar Replacers, with Emphasis on Low Glycaemic Properties. *Nutr Res* Rev 16:163–191.

Monedero V., G.P. Martines, and M. Yebra. 2010. Perspectives of Engineering Lactic Acid Bacteria for Biotechnological Polyol Production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86: 1003–1015.

Ray, B. 2001. *Fundamental Food Microbiology*.2nd ed. New York: CRC Press.

Smet, I.D., L. Van Hoorde, M.V. Woestyne, H. Christiaens and W. Verstraete. 1995. Significance of Bile Salt Hydrolytic Activities of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol*. 79: 292-301.

Sultana, K., G. Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris, and K. Kailasapathy. 2000. Encapsulation of Probiotics Bacteria with Alginate-Starch and Evaluation of Survival in Simulated Gastro Intestinal Condition and in Yogurt, *Int J. Food Microbio.* 62:47-55.