

# Enkapsulasi Probiotik *Lactobacillus* sp. Menggunakan Biopolimer Alginat dan Kitosan dengan Metode Satu Tahap

Tazkia Nur Hidayah<sup>1\*</sup>, Djaenudin<sup>2</sup>, Novriyanti Lubis<sup>3</sup>

<sup>1,3</sup>Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Garut, Garut.

<sup>2</sup>Loka Penelitian Teknologi Bersih, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia

\*Koresponden email: tazkianurhidayah2603@gmail.com

Diterima: 27 Februari 2021

Disetujui: 15 Maret 2021

## Abstract

*Lactobacillus* sp are gram-positive bacteria that cannot survive in acidic conditions, such as stomach acid conditions (pH 1.5- pH 2.5) so that a carrier is needed so that *Lactobacillus* sp can survive when colonizing the intestine. One way to protect *Lactobacillus* sp in acidic conditions is by encapsulation. The core material used for *Lactobacillus* encapsulation uses a mixture of Na-alginate and chitosan. The mixture formed then becomes microcapsules using an electrospinning device. One of the components of the electrospinning device is a syringe that provides pressure to form droplets that fall into a solution of CaCl<sub>2</sub> and chitosan with a concentration of 1.2%; 1.6% and 2%. *Lactobacillus* sp. The encapsulated viability was tested for viability in simulated gastric acid (0.2% NaCl pH 1.2 and pH 3) for 1 minute, 60 minutes, and 120 minutes using the Total Plate Count (TPC) method. After the viability test was carried out, it was found that *Lactobacillus* sp. encapsulation results with a 2% chitosan matrix with the number of colonies in the simulated gastric acid pH 3 for 1 minute is 4x10<sup>9</sup> cfu / g, for 60 minutes 3x10<sup>9</sup> cfu / g and for 120 minutes is 1x9 cfu /g.

**Keywords:** encapsulation, chitosan, *lactobacillus* sp., Na-Alginate, electrospinning

## Abstrak

*Lactobacillus* sp. merupakan bakteri gram positif yang tidak dapat bertahan hidup dalam kondisi asam, seperti kondisi asam lambung (pH 1,5- pH 2,5) sehingga diperlukan zat pembawa agar *Lactobacillus* sp. dapat bertahan hidup ketika berkoloni di usus. Salah satu cara untuk melindungi *Lactobacillus* sp. dalam keadaan asam dengan melakukan enkapsulasi. Bahan inti yang digunakan untuk enkapsulasi *Lactobacillus* menggunakan bahan campuran Na-alginat dan kitosan. Campuran yang terbentuk tersebut selanjutnya menjadi mikrokapsul menggunakan alat *elektrospinning*. Salah satu komponen alat *elektrospinning* yaitu jarum suntik yang memberikan tekanan sebagai pembentuk tetesan yang jatuh ke dalam larutan CaCl<sub>2</sub> dan kitosan dengan konsentrasi 1,2%; 1,6% dan 2%. *Lactobacillus* sp. yang telah terenkapsulasi diuji viabilitas dalam simulasi cairan asam lambung (0,2% NaCl pH 1,2 dan pH 3) selama 1 menit, 60 menit, dan 120 menit dengan metode TPC (*Total Plate Count*). Setelah dilakukan uji viabilitas didapatkan *Lactobacillus* sp. Hasil enkapsulasi dengan matriks kitosan 2% dengan jumlah koloni pada simulasi cairan asam lambung pH 3 selama 1 menit adalah 4x10<sup>9</sup> cfu/g, selama 60 menit 3x10<sup>9</sup> cfu/g dan selama 120 menit adalah 1x9 cfu/g.

**Kata kunci:** enkapsulasi, kitosan, *lactobacillus* sp., Na-Alginat, elektrospinning

## 1. Pendahuluan

Salah satu bentuk pengembangan makanan fungsional berbasis produk susu adalah *yogurt* probiotik atau sering disebut *Bio-yogurt*. Menurut FAO/WHO probiotik adalah mikroorganisme non-patogenik yang dapat memberikan efek menguntungkan apabila dikonsumsi dalam jumlah tertentu, seperti dapat menjaga keseimbangan mikroba usus, dan dapat meningkatkan resisten terhadap penyakit infeksi salah satunya diare [1]. Golongan mikroba yang menguntungkan adalah BAL (Bakteri Asam Laktat). BAL dikelompokkan menjadi beberapa genus diantaranya *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, dan *Lactobacillus* [2].

*Lactobacillus* sp. merupakan genus dari *Lactobacillus* yang memiliki manfaat diantaranya dapat menstimulasi sistem imun pada usus, mengurangi keparahan pada saat diare, dan memiliki sifat anti mikroba [3]. *Lactobacillus* sp. tidak dapat bertahan hidup dalam kondisi asam, seperti pada kondisi asam di lambung (pH 1,5-2,5) dan pada suhu yang tinggi dalam proses pengolahan [4]. Sehingga

diperlukan penambahan zat pembawa agar probiotik *Lactobacillus* sp. dapat bertahan hidup ketika melewati usus dan dapat berkoloni di usus [5].

Namun penggunaan probiotik dalam bahan pangan memiliki beberapa permasalahan diantaranya dapat menurunkan viabilitas bakteri sehingga jumlahnya tidak mencukupi ketika sampai di usus menurut FAO/WHO nilai minimum yang harus dipenuhi sekitar  $10^6$ - $10^7$  CFU (*Colony Forming Units*)/gram bakteri dalam sediaan probiotik yang dapat berkoloni di usus sehingga dapat memberikan manfaat [6]. Salah satu cara untuk mencegah kerusakan dan berkurangnya viabilitas bakteri asam laktat di dalam usus dengan memberikan perlindungan melalui proses enkapsulasi [7]. Enkapsulasi adalah suatu proses pembungkusan (*coating*) bahan inti yang bertujuan untuk meningkatkan viabilitas dan melindungi bahan inti dari kondisi yang merugikan. Bahan inti yang digunakan dalam proses enkapsulasi adalah bakteri probiotik dan polimer yang digunakan dalam proses enkapsulasi adalah Na-Alginat dan Kitosan [8].

Alginat merupakan polisakarida yang diekstrak dari rumput laut yang menjadi salah satu biopolimer yang paling umum digunakan dalam proses enkapsulasi probiotik [9]. Keuntungan dari alginat diantaranya tidak toksik dan dapat membentuk matriks gel untuk menangkap mikroba dalam larutan  $\text{CaCl}_2$  [10]. Mikrokapsul alginat berbentuk *porous*, sehingga zat aktif didalamnya dapat mengalami kebocoran (*leakage*). Untuk mencegah keluarnya zat aktif dalam mikrokapsul alginat maka dapat disalut menggunakan lapisan luar yang tidak mengandung zat aktif [11]. Salah satu polimer alami yang dapat menjadi penyalut dalam mikrokapsul alginat adalah kitosan. Kitosan merupakan jenis polimer alami yang dihasilkan dari proses deasetilasi kitin, bersumber dari cangkang hewan vertebrata [12].

Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan pembuatan enkapsulasi probiotik *Lactobacillus* sp. menggunakan biopolimer Alginat 1% dan matriks Kitosan dengan konsentrasi 1,2%, 1,6%, dan 2% terhadap waktu dalam simulasi cairan asam lambung dengan metode satu tahap (pencampuran langsung antara  $\text{CaCl}_2$  dan Kitosan). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui viabilitas, morfologi, bentuk dimensi *Lactobacillus* sp. yang telah menggunakan campuran biopolimer Alginat dan Kitosan pada simulasi cairan asam lambung dengan menggunakan SEM (*Scanning Electron Microscopy*), dan mengetahui gugus fungsi yang terkandung dalam enkapsulasi menggunakan FTIR.

## 2. Metode Penelitian

### Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioproses dan Laboratorium Nanoteknologi yang bertempat di Gedung Loka Penelitian Teknologi Bersih (LPTB), Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) pada tanggal 8 Februari 2020 – 27 Agustus 2020. Pada penelitian ini terdapat berbagai rangkaian proses, yaitu proses enkapsulasi, proses peredaman mikrokapsul yang mengandung probiotik tanpa simulasi larutan asam lambung dan dalam simulasi larutan asam lambung, dan proses pengukuran viabilitas probiotik yang telah terenkapsulasi. Uraian metode yang digunakan sebagai berikut:

### Prosedur Kerja

#### 1. Preparasi Bakteri *Lactobacillus* sp.

Peremajaan bakteri *Lactobacillus* sp. pada media Agar dilakukan dengan cara menggoreskan satu hingga dua bulatan ose yang telah mengandung bakteri *Lactobacillus* sp. secara zigzag pada media MRS Agar miring di dalam tabung reaksi steril. Kemudian tabung media ditutup menggunakan kapas. Diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 48 jam didapatkan kultur *stock* [13].

#### 2. Preparasi proses Enkapsulasi

##### - Pembuatan Suspensi Bakteri

Sebanyak 1-2 bulatan ose kultur *stock Lactobacillus* sp. dimasukkan ke dalam 50 mL MRS Broth, lalu diinkubasi selama 24 jam pada *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm dengan suhu  $30$ - $37^\circ\text{C}$  [14].

##### - Pembuatan Larutan Kitosan

Pembuatan larutan kitosan dibuat dalam tiga konsentrasi, yaitu konsentrasi 1,2%, 1,6%, dan 2% dalam 100 mL asam asetat 1% [16].

##### - Pembuatan Larutan Natrium Alginat

Sebanyak 0,1 gram natrium alginat ditimbang kemudian dilarutkan dengan aquadest yang telah dihangatkan pada suhu  $60^\circ\text{C}$  sebanyak 100 mL [14].

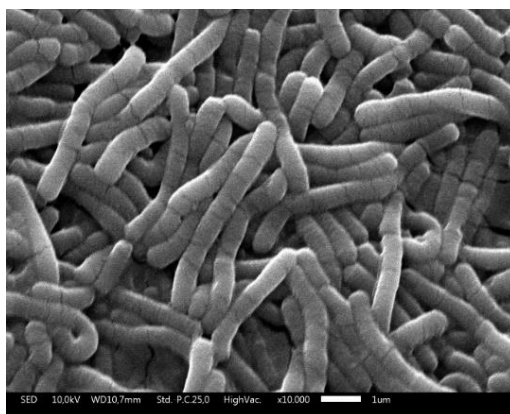
- *Pembuatan Larutan CaCl<sub>2</sub> 0,1M*  
Sebanyak 32 gram CaCl<sub>2</sub> ditimbang kemudian dilarutkan dengan aquadest sebanyak 1 L, setelah larut sempurna kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit [14].
- 3. Proses Enkapsulasi  
Proses enkapsulasi dilakukan dengan metode ekstrusi menggunakan diameter nozzle 29,70 mm dengan Q = 1 mL/menit dan V = 0 kV. Diperoleh hasil enkapsulasi berupa mikrokapsul dan ditampung dengan wadah berisi 125 mL larutan CaCl<sub>2</sub> 0,1 M dan larutan kitosan dengan variasi konsentrasi 1,2%, 1,6%, 2% sebanyak 50 mL, kemudian diaduk selama 30 menit, jarak antara ujung eksuder dengan larutan ± 6 cm [14].
- 4. Perhitungan *Lactobacillus* sp. yang terenkapsulasi  
Diambil pada setiap seri pengenceran 1000 µL dan di pipet ke dalam cawan petri lalu dituangkan MRS Agar ke dalam cawan petri tersebut lalu inkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C [17].
- 5. Peredaman mikrokapsul mengandung probiotik dalam simulasi larutan asam lambung sebanyak 0,2 gram NaCl dilarutkan di dalam 100 mL aquadest, kemudian diasamkan dengan HCl 0,5 M hingga pH 1,5 (20 tetes) lalu pipet 9 mL larutan dan disimpan ke dalam tabung ulir.
- 6. Uji Viabilitas Probiotik Hasil Enkapsulasi  
Manik hasil enkapsulasi ditimbang sebanyak 1 gram dalam *Laminar Air Flow* (LAF) lalu direndam dalam larutan Na sitrat 1% sebanyak 9 mL dalam gelas kimia 30 mL dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama ± 2 jam pada suhu kamar [19]. Pada setiap pengenceran, diambil 1 mL larutan dan dimasukkan ke dalam cawan petri, pada tahap ini dilakukan secara triplo. Setelah itu, tuangkan MRS Agar sebanyak 20 mL ke dalam masing-masing cawan petri yang sudah berisi campuran larutan mikrokapsul dan pepton 0,1%. Selanjutnya, tahap inkubasi, cawan petri yang berisi media dan bakteri diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 48 jam. Kemudian dihitung jumlah koloni yang tumbuh dengan prinsip metode TPC [15].
- 7. Morfologi mikrokapsul diketahui dengan pengujian *Scanning Electron Microscrophi* (SEM) dan gugus fungsi yang terkandung dalam mikrokapsul diketahui dengan pengujian FTIR

### 3. Hasil dan Pembahasan

Bakteri *Lactobacillus* sp. merupakan genus terbesar dalam bakteri asam laktat. Termasuk ke dalam bakteri gram positif yang tumbuh pada pH 4,5-8,5, katalase negatif, anaerobik fakultatif, dan heterofermentatif fakultatif terdapat dalam *yoghurt*, keju, dan produk olahan susu lainnya. Memiliki karakteristik diantaranya, berbentuk batang dengan panjang 2-4 µm dengan lebar 0,7-1,1 µm, dan tidak berspora. *Lactobacillus* sp. mengalami pertumbuhan pada suhu 30-37°C [20].

*Lactobacillus* sp. tidak bersifat patogen dalam tubuh *host* yang sehat dan dianggap penting untuk mempertahankan kesehatan saluran cerna. Namun, bakteri ini tidak tahan dalam keadaan asam lambung, sementara bakteri memberikan manfaat saat mencapai usus dan berkoloni di usus dengan mengandung ± 10<sup>-6</sup>-10<sup>-7</sup> CFU/g. Maka dilakukan teknik enkapsulasi agar bakteri dapat melewati lambung sehingga bermanfaat dalam usus [6][7].

**Gambar 1** merupakan hasil SEM dari probiotik *Lactobacillus* sp yang belum mengalami proses enkapsulasi dan proses peredaman dalam cairan simulasi asam lambung, menunjukkan bahwa *Lactobacillus* sp memiliki bentuk batang dengan ujung persegi cenderung membentuk rantai. Ketika *Lactobacillus* sp. dienkapsulasi, harus dipastikan dua kondisi agar enkapsulasi berjalan dengan optimal. Yang pertama, lapisan pelindung probiotik dapat mempertahankan kelangsungan hidup bakteri dalam simulasi cairan asam lambung, dan yang kedua probiotik yang terbungkus dapat dilepaskan pada saat simulasi cairan usus [21]. Enkapsulasi bertujuan untuk menstabilkan sel, untuk meningkatkan kelangsungan dan stabilitas zat aktif selama di produksi, penyimpanan dan penanganan [21]. Dalam enkapsulasi yang telah dilakukan menggunakan metode ekstrusi. Metode ini dipilih karena menggunakan alat yang sederhana berupa jarum suntik dan untuk menghindari suhu ekstrim saat proses enkapsulasi yang dapat menyebabkan berkurangnya jumlah dan viabilitas bakteri probiotik [22].



**Gambar 1.** Hasil SEM *Lactobacillus* sp. dengan perbesaran 10000x  
Sumber: Data penelitian, 2020

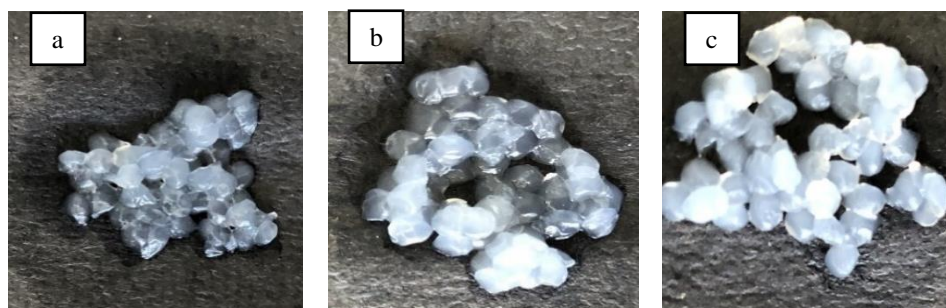
Proses enkapsulasi yang dilakukan terhadap bakteri probiotik kali ini menggunakan biopolimer alginat 1% dan kitosan dengan variasi 1,2%; 1,6%; dan 2% [23]. Alat yang digunakan dalam proses enkapsulasi yaitu *electrospinning* dengan proses *electrohydrodynamic*. *Electrohydrodynamic* merupakan proses dari *electrospraying* yang mudah, fleksibel. Prinsip dari alat tersebut adalah larutan polimer disemprotkan dengan mengaplikasikan potensial listrik dengan tegangan tinggi untuk memperoleh partikel dengan ukuran mikron, submikron atau rentang nano [24]. Tegangan listrik pada alat *electrospinning* berfungsi untuk menarik tetesan dari ujung *needle* menuju larutan  $\text{CaCl}_2$ . Voltase yang digunakan pada proses enkapsulasi yaitu 0 kV tetesan yang keluar memakan waktu yang lama sesuai dengan settingan pada laju alir 1 mL/ menit dalam volume 50 mL sehingga waktu yang dibutuhkan untuk proses pembuatan mikrokapsul selama 50 menit sementara diameter *noozel* yang digunakan  $\pm 0,394$  mm.

Mikrokapsul yang telah terbentuk dimasukkan ke dalam plastik *zipper* dan disimpan di dalam lemari pendingin dengan suhu  $4^{\circ}\text{C}$  dengan alasan penggunaan suhu yang rendah dapat menyebabkan penurunan tingkat reaksi kimia yang merugikan, seperti oksidasi asam lemak [25]. Mikrokapsul yang terbentuk bulatan gel terjadi karena peredaman tetesan dari alginat ke dalam larutan  $\text{CaCl}_2$  dan kitosan. Ion kalsium dalam  $\text{CaCl}_2$  akan mengikat silang polimer dan menggantikan ion natrium dalam polimer alginat, ion kalsium menempelkan satu sama lain pada banyak titik dalam polimer. Proses ini disebut dengan tautan silang dan menghasilkan bentuk bulat yang tidak larut air. Setiap ion kalsium dapat berkaitan dengan dua rantai polimer alginat [26].

**Tabel 1.** Pemeriksaan organoleptik enkapsulasi *Lactobacillus* sp. menggunakan variasi konsentrasi matriks kitosan

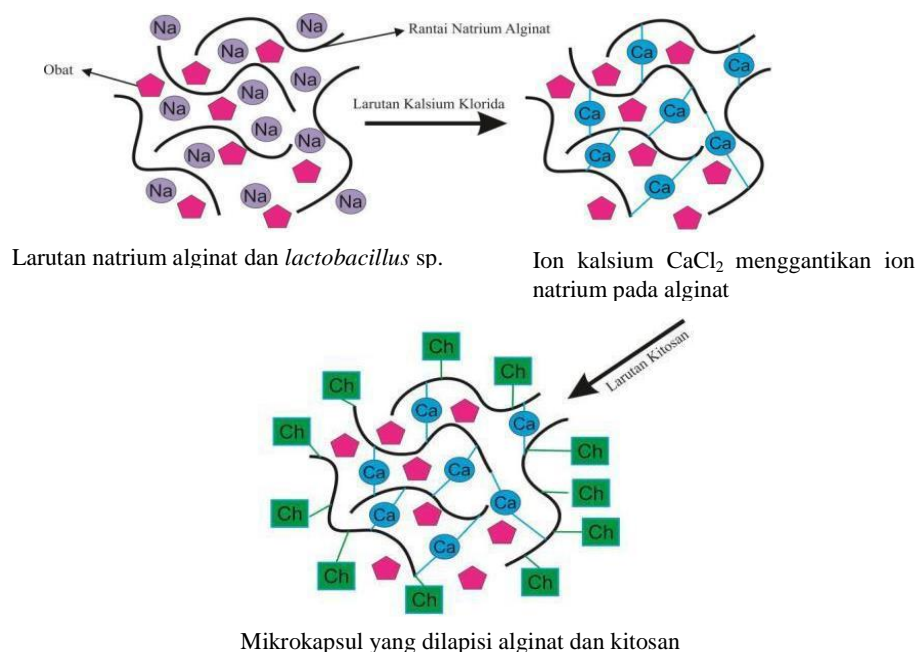
| Konsentrasi Kitosan | Organoleptis   |       |              | Jumlah mikrokapsul |
|---------------------|----------------|-------|--------------|--------------------|
|                     | Bentuk         | Warna | Bau          |                    |
| 1,2%                | Bulat sempurna | Putih | Tidak berbau | 37,3 g.            |
| 1,6%                | Bulat sempurna | Putih | Tidak berbau | 33,4 g.            |
| 2%                  | Bulat sempurna | Putih | Tidak berbau | 25,8 g.            |

Sumber: Data penelitian, 2020



**Gambar 2.** (a) Kitosan 1,2%, (b) Kitosan 1,6%, (c) Kitosan 2%  
Sumber: Data penelitian, 2020.

**Gambar 2** menunjukkan bahwa organoleptis dari enkapsulasi probiotik *Lactobacillus* sp yang dihasilkan dengan metode 1 tahap (larutan  $\text{CaCl}_2$  bersamaan dengan larutan kitosan) memiliki bentuk bulat dengan permukaan yang halus, berwarna putih, dan tidak berbau. Mikro kapsul yang dihasilkan dari setiap konsentrasi kitosan berbeda-beda, diantaranya kitosan 1,2% menghasilkan mikro kapsul sebanyak 37,3 g, kitosan 1,6% menghasilkan mikro kapsul sebanyak 33,4 g, dan kitosan 2% menghasilkan mikro kapsul sebanyak 25,8 g. Konsentrasi kitosan yang semakin kecil menyebabkan mikro kapsul yang dihasilkan semakin banyak, hal ini disebabkan karena kitosan 1,2% memiliki larutan yang tidak terlalu kental dibandingkan kitosan 1,6% dan 2%. Karakteristik mikro kapsul yang dihasilkan ditentukan oleh jenis dan komposisi biopolimer yang digunakan dalam proses enkapsulasi dan akan mempengaruhi diameter serta bentuk mikro kapsul yang dihasilkan. Komposisi biopolimer juga mempengaruhi viabilitas probiotik yang dienkapsulasi.



**Gambar 3.** Reaksi pembentukan mikro kapsul

Sumber: Data penelitian, 2020.

**Gambar 3** menunjukan reaksi pembentukan mikro kapsul yang berbentuk bulat, tautan silang ini menghasilkan padatan gel yang bersifat fleksibel dan lunak. Semakin lama perendaman maka akan menyebabkan lebih banyak ikatan silang ion kalsium dengan polimer alginat dan menghasilkan tekstur semakin padat. Kitosan digunakan sebagai penambahan lapisan pelindung pada permukaan mikro kapsul sehingga meningkatkan kekuatan dan kestabilan mikro kapsul. Peningkatan stabilitas dan perlindungan yang efisien pada mikro kapsul disebabkan adanya interaksi ionik yang kuat antara alginat dengan kitosan. Ketika mikro kapsul disalut menggunakan kitosan akan menghasilkan kompleks elektrolit. Kompleks polielektrolit merupakan kompleks asosiasi yang terbentuk antara polianion dengan muatan yang berlawanan karena adanya interaksi elektrostatik antara polianion bermuatan tersebut. Muatan negatif gugus asam karboksilat dari alginat akan berikatan dengan muatan positif gugus amino dari kitosan secara ionik [27].

Pelapisan mikro kapsul menggunakan alginat dan kitosan dapat mengurangi porositas alginat, mengurangi kebocoran ketika mengenkapsulasi bakteri, dan akan stabil pada beberapa rentang pH. Pencampuran kitosan dengan  $\text{CaCl}_2$  mengakibatkan mikro kapsul yang terbentuk menjadi lebih banyak dibandingkan dengan menggunakan metode yang tidak dimodifikasi dikarenakan larutan  $\text{CaCl}_2$  langsung bercampur dengan larutan kitosan. Untuk mengetahui keberhasilan dari pembuatan enkapsulasi probiotik *Lactobacillus* sp. menggunakan metode 1 tahap (larutan  $\text{CaCl}_2$  dicampurkan dengan larutan kitosan) maka dilakukan uji viabilitas dengan metode TPC (*Total Plate Count*). Metode ini digunakan untuk menghitung jumlah bakteri pada sampel yang akan diuji [28].

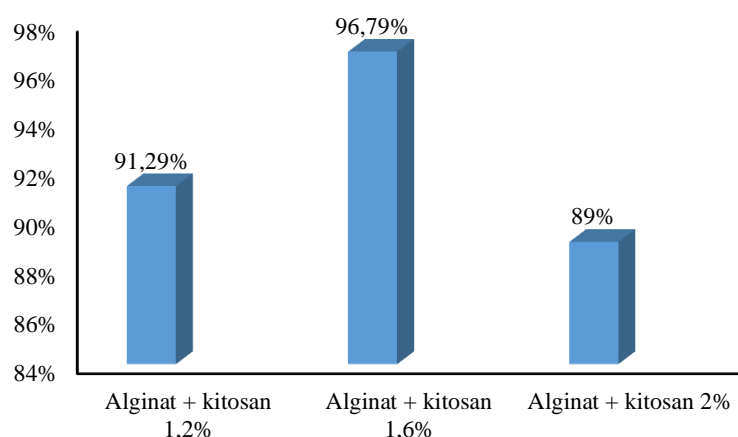
Larutan yang digunakan untuk pengenceran yaitu larutan Pepton 0,1% yang berfungsi sebagai sumber nitrogen pada media pembiakan mikroorganisme untuk tumbuh. Sedangkan natrium sitrat yang digunakan untuk merendam mikrokapsul berfungsi untuk membuka penyalutan bakteri, sehingga dapat dijadikan sebagai pembuktian apakah adanya penyalutan dapat memperlambat atau dapat mempertahankan jumlah koloni bakteri yang seharusnya tetap saat berada dalam kondisi ekstrim.

**Tabel 2.** Hasil perhitungan *Lactobacillus* sp. hasil enkapsulasi matrik Kitosan

| Konsentrasi Kitosan | <i>Free cell Lactobacillus</i> sp.<br>(cfu/mL) | <i>Lactobacillus</i> sp. hasil enkapsulasi<br>(cfu/g) |
|---------------------|--|---|
| 1,2%                | $5 \times 10^{10}$                             | $5,6 \times 10^9$                                     |
| 1,6%                | $5 \times 10^{10}$                             | $3 \times 10^{10}$                                    |
| 2%                  | $5 \times 10^{10}$                             | $7 \times 10^{10}$                                    |

Sumber: Data penelitian, 2020.

**Gambar 4** menunjukkan konsentrasi kitosan 1,6% memiliki nilai persentase *yield* yang tinggi dibandingkan dengan kitosan (1,2%). Maka dapat dikatakan bahwa konsentrasi kitosan 1,6% yang paling optimum karena memiliki % *yield* yang tinggi, semakin tinggi % *yield* maka semakin tinggi juga jumlah sel bakteri yang bertahan dan terenkapsulasi.



**Gambar 4.** Grafik nilai persen yield dari berbagai variasi konsentrasi enkapsulasi *Lactobacillus* sp.

Sumber: Data penelitian, 2020.

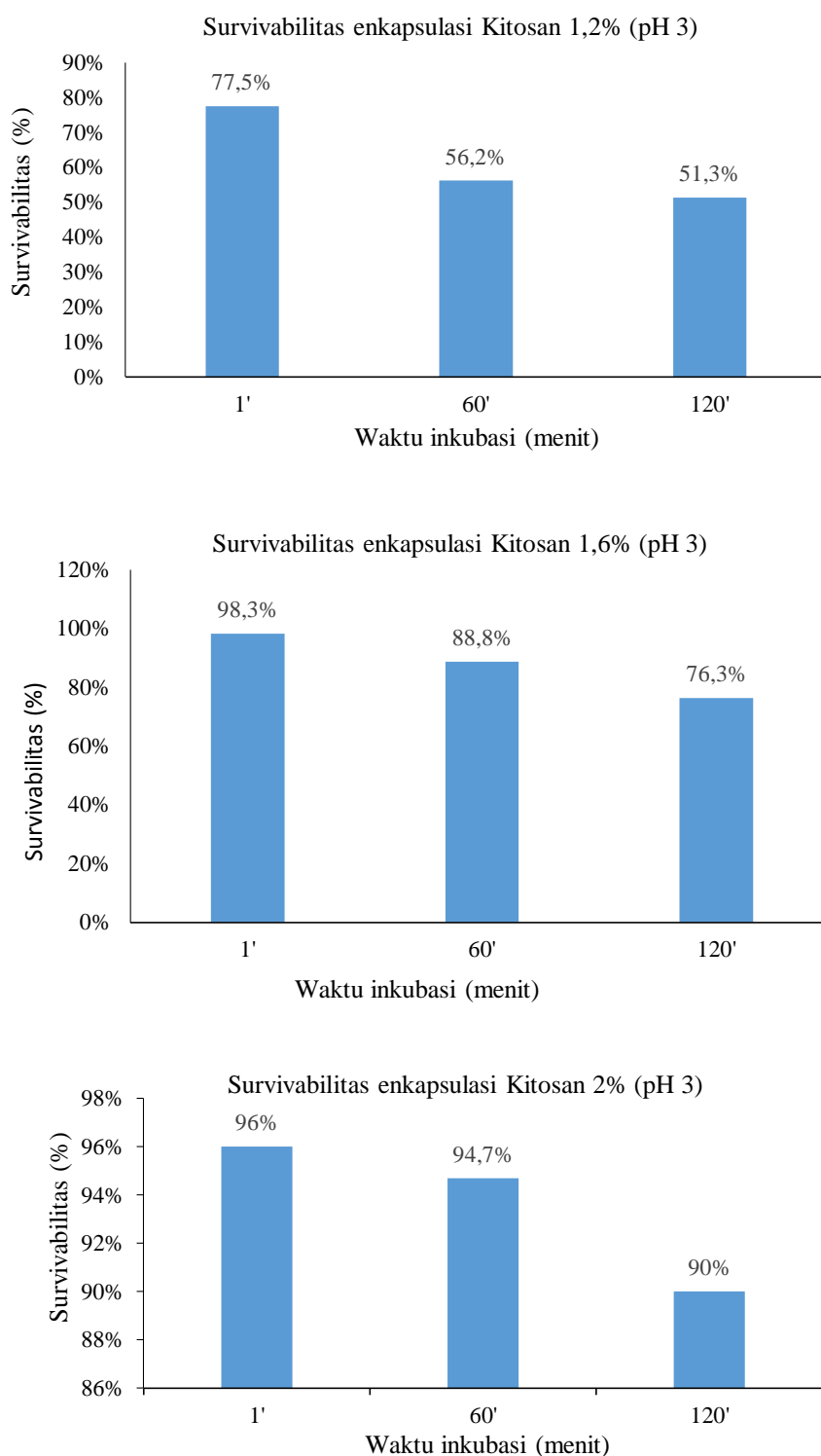
Pengujian viabilitas mikrokapsul hasil enkapsulasi dengan matrik kitosan dalam simulasi cairan asam lambung dan usus halus dilakukan variasi terhadap waktu dan konsentrasi cairan asam lambung. Waktu inkubasi mikrokapsul di dalam simulasi cairan asam lambung berlangsung selama 1, 60, dan 120 menit. Sementara, pH yang digunakan untuk simulasi cairan asam lambung yaitu pH 1,2 dan pH 3. Setelah mikrokapsul melalui proses inkubasi selama 1, 60, dan 120 menit pada larutan simulasi pH 1,2 dan pH 3, mikrokapsul direndam dalam larutan pepton sebagai sumber nitrogen untuk bakteri, selanjutnya direndam kembali dalam simulasi larutan garam empedu sambil di *stirrer* sampai hancur, dan disuspensikan ke dalam larutan pepton 0,1% dan dilakukan pengenceran bertingkat.

**Tabel 3.** Jumlah koloni bakteri pada *free cell* dan koloni bakteri setelah proses enkapsulasi diinkubasi dalam simulasi cairan asam lambung

| Konsentrasi Kitosan | pH 3                      |                 |                 |                     |                 |                 | pH 1,2                    |     |      |                     |     |      |
|---------------------|---------------------------|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----|------|---------------------|-----|------|
|                     | <i>Free cell</i> (cfu/mL) |                 |                 | Mikrokapsul (cfu/g) |                 |                 | <i>Free cell</i> (cfu/mL) |     |      | Mikrokapsul (cfu/g) |     |      |
|                     | 1'                        | 60'             | 120'            | 1'                  | 60'             | 120'            | 1'                        | 60' | 120' | 1'                  | 60' | 120' |
| 1,2%                | $7 \times 10^9$           | $1 \times 10^6$ | $2 \times 10^5$ | $3,6 \times 10^7$   | $3 \times 10^5$ | $1 \times 10^5$ | 0                         | 0   | 0    | 0                   | 0   | 0    |
| 1,6%                | $7 \times 10^9$           | $1 \times 10^6$ | $2 \times 10^5$ | $2 \times 10^{10}$  | $2 \times 10^9$ | $1 \times 10^8$ | 0                         | 0   | 0    | 0                   | 0   | 0    |
| 2%                  | $7 \times 10^9$           | $1 \times 10^6$ | $2 \times 10^5$ | $4 \times 10^9$     | $3 \times 10^9$ | $1 \times 10^9$ | 0                         | 0   | 0    | 0                   | 0   | 0    |

Sumber: Data penelitian, 2020.

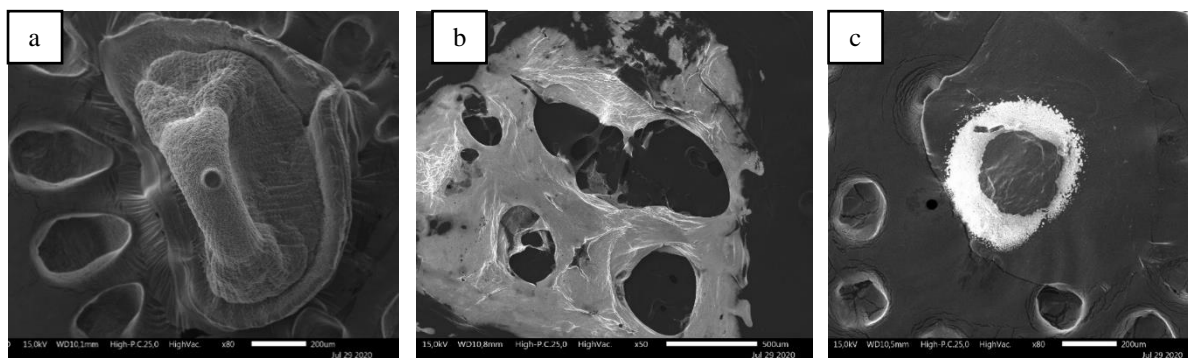
**Gambar 5** menunjukkan bahwa survivabilitas dari variasi konsentrasi kitosan 2% merupakan konsentrasi yang paling optimum karena pada proses perendaman enkapsulasi dalam simulasi asam lambung pada waktu 120 menit masih tidak terjadi penurunan yang signifikan dan masih dalam range 90%, hal tersebut sesuai dengan tujuan dilakukannya enkapsulasi untuk melindungi bakteri dari faktor-faktor lingkungan yang berbahaya bagi bakteri [6].



**Gambar 5.** Grafik survivabilitas dari variasi konsentrasi enkapsulasi *Lactobacillus* sp.  
Sumber: Data penelitian, 2020.

Setelah pengujian didapati bahwa mikrokapsul hanya tumbuh dalam simulasi cairan asam lambung pH 3, sedangkan pada pH 1,2 tidak terjadi pertumbuhan bakteri sama sekali. Lamanya waktu inkubasi yang dilakukan dalam simulasi cairan asam lambung pH 3 memiliki hasil penurunan yang tidak signifikan atau sangat kecil. Namun, pada konsentrasi kitosan 1,2% dengan nilai koloni pada waktu 120 menit yaitu  $1 \times 10^5$  tidak memenuhi range standar nilai minimum oleh FAO yaitu  $10^6$ - $10^7$  cfu (*colony forming units*) hal ini disebabkan karena konsentrasi kitosan 1,2% tidak optimum dalam perlindungan enkapsulasi [6].

Pengujian *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dilakukan untuk mengetahui bentuk dan morfologi dari *Lactobacillus* sp. hasil enkapsulasi tanpa simulasi cairan asam lambung sebagai kontrol dibandingkan dengan hasil enkapsulasi yang telah direndam dalam simulasi cairan asam lambung pada pH 1,2 dan 3 dengan waktu inkubasi 120 menit. Uji foto SEM dilakukan pada konsentrasi 2% yang merupakan konsentrasi optimum karena penurunan viabilitas yang terjadi sangat sedikit.



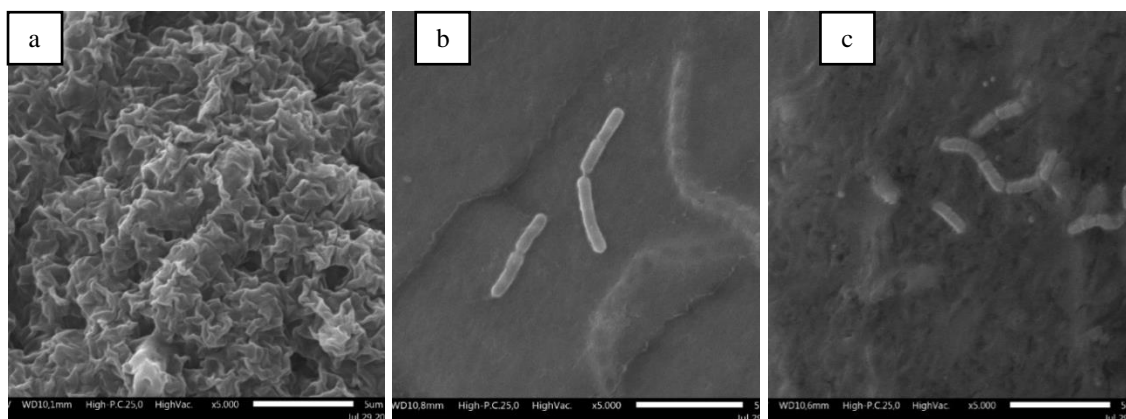
**Gambar 6.** Uji Foto SEM mikrokapsul hasil enkapsulasi pada pembesaran 80x dan 50x  
Sumber: Penelitian, 2020.

Keterangan: a) Mikrokapsul tanpa diinkubasi dalam simulasi cairan asam lambung, b) Mikrokapsul diinkubasi 120 menit dalam simulasi cairan asam lambung pH 3, dan c) Mikrokapsul diinkubasi 120 menit dalam simulasi cairan asam lambung pH 1,2.

Berdasarkan **Gambar 6** dari hasil analisa SEM diketahui bahwa ukuran mikrokapsul *Lactobacillus* sp dengan kitosan 2% memiliki ukuran yang berbeda-beda, untuk mikrokapsul tanpa simulasi cairan asam lambung dengan pembesaran 80x memiliki diameter 818,8µm, sementara untuk simulasi cairan asam lambung pada pH 3 dengan pembesaran 50x memiliki diameter 297,4 µm, dan untuk simulasi cairan asam lambung pada pH 1,2 dengan pembesaran 50x memiliki diameter 406-550 µm. Hasil SEM pada pH 1,2 menunjukkan mikrokapsul sudah tidak berbentuk, ini disebabkan karena semakin tinggi asam maka mikrokapsul akan semakin larut. Ukuran mikrokapsul yang lebih besar (2-4 mm) dengan teknik ekstrusi pada penelitian Muthukumarasamy dkk (2006), dapat lebih melindungi bakteri *Lactobacillus reuteri* dibandingkan dengan ukuran mikrokapsul 20-1000 µm.

Hasil SEM pada diameter mikrokapsul tidak sesuai dengan teori, mungkin hal ini disebabkan adanya pengaruh pencampuran  $\text{CaCl}_2$  dengan kitosan 2% yang menyebabkan diameternya kecil. Sedangkan bila diamati pada perbesaran yang lebih besar yaitu pada 5000x yang terlihat pada **Gambar 7** bahwa bahan pengapsul mengalami pengerutan diakibatkan oleh simulasi cairan asam lambung, sehingga muncul ikatan hidrogen yang lebih kuat dan struktur dari bahan pengapsul menjadi lebih rapat. Pada mikrokapsul tanpa simulasi cairan asam lambung masih terdapat rongga, sementara pada simulasi cairan asam lambung pH 3 mikrokapsul sudah mulai tidak melindungi lagi, dan pada simulasi cairan asam lambung pada pH 1,2 mikrokapsul sudah tidak melindungi lagi hal ini disebabkan karena waktu inkubasi yang lama dan pH yang tinggi menyebabkan mikrokapsul tidak stabil lagi. Hal ini sesuai dengan uji viabilitas bakteri hasil enkapsulasi pada simulasi cairan asam lambung dengan pH 1,2 bahwa tidak didapati pertumbuhan koloni bakteri pada media MRS Agar karena bakteri sudah dalam keadaan bebas tidak ada lapisan yang melindunginya dari paparan kondisi ekstrim.

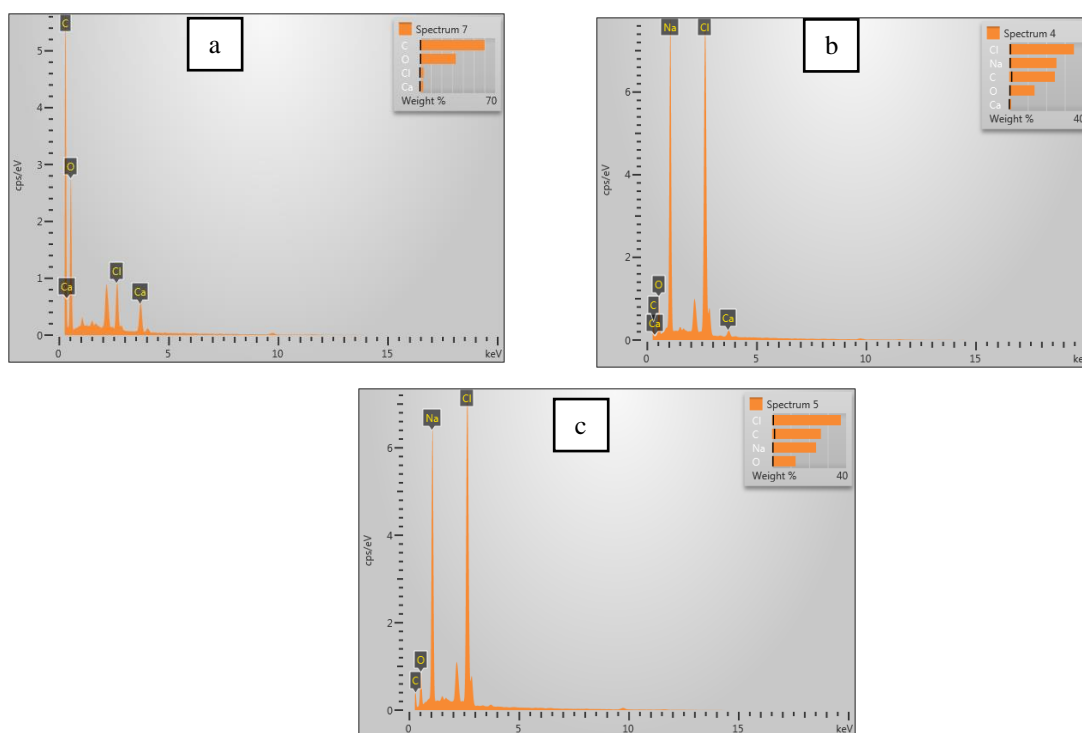




**Gambar 7.** Uji foto SEM mikrokapsul hasil enkapsulasi pada pembesaran 5000x

Sumber: Data penelitian, 2020.

Keterangan: a) Mikrokapsul tanpa diinkubasi dalam simulasi cairan asam lambung, b) Mikrokapsul diinkubasi 120 menit dalam simulasi cairan asam lambung pH 3, dan c) Mikrokapsul diinkubasi 120 menit dalam simulasi cairan asam lambung pH 1,2.



**Gambar 8.** Spektrum EDS enkapsulasi

Sumber: Data penelitian, 2020.

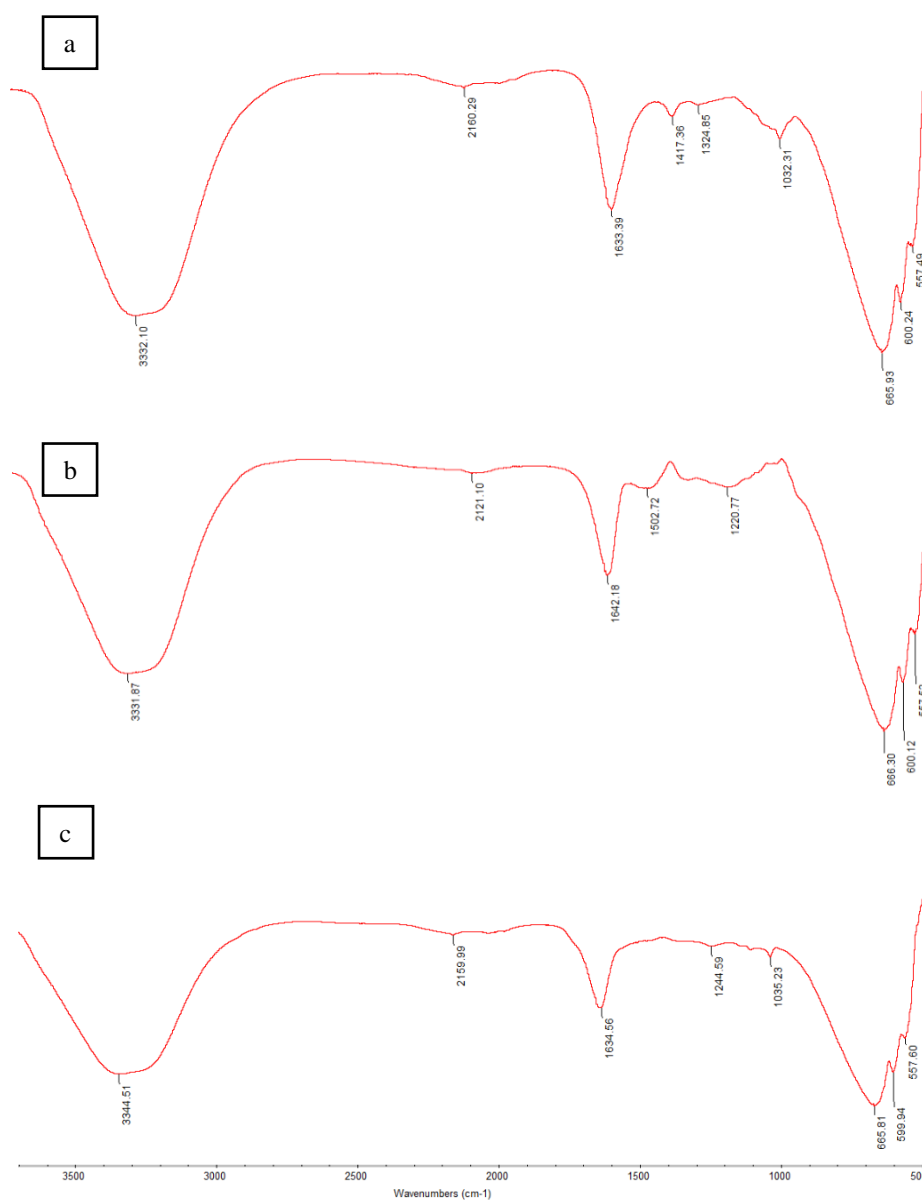
Keterangan: a) Mikrokapsul tanpa diinkubasi dalam simulasi cairan asam lambung, b) Mikrokapsul diinkubasi 120 menit dalam simulasi cairan asam lambung pH 3, dan c) Mikrokapsul diinkubasi 120 menit dalam simulasi cairan asam lambung pH 1,2.

Spektrum EDS memberikan informasi mengenai komposisi unsur-unsur yang terkandung pada enkapsulasi probiotik *Lactobacillus* sp. tanpa menggunakan simulasi cairan asam lambung dan dengan menggunakan simulasi cairan asam lambung pada pH 3 dan pH 1,2 secara kualitatif serta untuk mengetahui pola sebaran bahan yang digunakan dalam proses enkapsulasi. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan secara FTIR untuk melihat gugus fungsi pada enkapsulasi yang menggunakan biopolimer alginat dan kitosan dengan konsentrasi 2%. Rentang waktu 120 menit pada mikrokapsul tanpa menggunakan simulasi cairan asam lambung dengan menggunakan simulasi cairan asam lambung pada pH 3 dan pH 1,2. Analisis FTIR bertujuan untuk melihat apakah dalam keadaan asam mempengaruhi gugus fungsi.

**Tabel 4.** Presentasi bahan yang terkandung dalam enkapsulasi

| Element | Mikrokapsul tanpa simulasi asam lambung |           | Mikrokapsul pH 3 |           | Mikrokapsul pH 1,2 |           |
|---------|---|-----------|------------------|-----------|--------------------|-----------|
|         | Wt%                                     | Wt% Sigma | Wt%              | Wt% Sigma | Wt%                | Wt% Sigma |
| C       | 60,12                                   | 0,42      | 24,69            | 1,35      | 26,34              | 1,36      |
| O       | 33,35                                   | 0,42      | 13,69            | 0,42      | 12,70              | 0,44      |
| Na      | -                                       | -         | 25,58            | 0,50      | 23,79              | 0,48      |
| Cl      | 3,40                                    | 0,08      | 34,98            | 0,66      | 37,17              | 0,72      |
| Ca      | 3,13                                    | 0,09      | 1,07             | 0,09      | -                  | -         |
| Total   | 100                                     |           | 100              |           | 100                |           |

Sumber: Data penelitian, 2020.



**Gambar 9.** Spektrum FTIR

Sumber: Data penelitian, 2020.

Keterangan: a) Mikrokapsul tanpa diinkubasi dalam simulasi cairan asam lambung, b) Mikrokapsul diinkubasi 120 menit dalam simulasi cairan asam lambung pH 3, dan c) Mikrokapsul diinkubasi 120 menit dalam simulasi cairan asam lambung pH 1,2.

**Gambar 9** menunjukkan bahwa kitosan dan alginat mempunyai kemiripan spektra dalam analisis gugus fungsional dari IR, karena kitosan dan alginat memiliki gugus fungsi yang hampir sama. Gugus fungsional pada mikrokapsul tanpa simulasi cairan asam lambung menunjukkan keberadaan gugus  $\text{-NH}_2$  dan  $\text{-OH}$  dari kitosan ditunjukkan oleh serapan bilangan gelombang  $3332,10 \text{ cm}^{-1}$ , sementara serapan pada bilangan gelombang  $1633,39$  menunjukkan keberadaan gugus  $\text{C=O}$  dari alginat, dan keberadaan  $\text{C-O}$  ester ditunjukkan oleh bilangan gelombang  $1032,31 \text{ cm}^{-1}$ . Gugus  $\text{C-O}$  muncul pada bilangan gelombang  $1032,31 \text{ cm}^{-1}$  dengan intensitas yang rendah artinya gugus  $\text{C-O}$  dari alginat telah banyak yang berikatan dengan  $\text{Ca}^{2+}$  sebagai pengikat silang gugus  $\text{-COO}$ . Serapan pada bilangan gelombang  $1417,36 \text{ cm}^{-1}$  menunjukkan terbentuknya garam karboksilat, artinya ada interaksi gugus  $\text{-NH}_2$  kitosan dan  $\text{-COO}$  alginat yaitu interaksi kompleks polielektrolit [29]. Gugus fungsional pada mikrokapsul dengan pH 3 dan pH 1,2 hasilnya tidak terlalu jauh dengan hasil FTIR mikrokapsul tanpa simulasi cairan asam lambung.

#### 4. Kesimpulan

Kitosan dengan konsentrasi 1,2%; 1,6% dan 2% dapat digunakan sebagai matriks dalam proses enkapsulasi bakteri *Lactobacillus sp* dengan nilai viabilitas pada waktu 120 menit setiap variasi konsentrasi mendapatkan masing-masing nilai  $1 \times 10^5 \text{ cfu/g}$ ;  $1 \times 10^8 \text{ cfu/g}$  dan  $1 \times 10^9 \text{ cfu/g}$ . Setelah dilakukan uji viabilitas probiotik terenkapsulasi dalam simulasi cairan asam lambung pada pH 1,2 dan pH 3 dengan waktu inkubasi 1 menit, 60 menit, dan 120 menit, didapatkan konsentrasi penyalut yang dapat mempertahankan viabilitas dalam enkapsulasi adalah kitosan 2% dengan viabilitas berturut-turut  $1 \times 10^9 \text{ cfu/g}$ ;  $4 \times 10^9 \text{ cfu/g}$ ;  $3 \times 10^9 \text{ cfu/g}$ ; dan  $1 \times 10^9 \text{ cfu/g}$ . Hasil yang diperoleh dari uji foto SEM pada mikrokapsul dengan konsentrasi kitosan 2% tanpa diinkubasi dalam larutan simulasi cairan asam lambung dan diinkubasi dalam larutan simulasi cairan asam lambung pada pH 1,2 dan pH 3 diameter yang diperoleh  $297,4 \text{ }\mu\text{m}$  sampai  $818,8 \mu\text{m}$  dengan pembesaran 50x sampai 80x. Semakin asam kondisi lingkungan maka semakin terbuka bahan pengapsul, sehingga mengakibatkan bakteri keluar dari mikrokapsul.

#### 5. Daftar Pustaka

- [1] Food and Agriculture Organisation of the United Nations and World Health Organization, *Health and Nutrition Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*, Report of a joint FAO/WHO Expert Cpncultation on Evaluation of Health and Nutrition Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. World Health Organization, 2011.
- [2] Simadibrata, Marcellus. 2011. *Probiotik-Peranannya Dalam Dunia Medis*. Jakarta : Divisi Gastroenterologi Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia RS. Cipto Mangunkusumo Indonesia.
- [3] Figueroa-Gonzales, Ivonne, G. Quijano, G. Ramirez, "Probiotics and Prebiotics-Perspective and Challenges," *J. Sci Food Agric*, Vol. 91: 1341-1348, 2011.
- [4] Mandal, S., A. K. Puniya., K. Singh, "Effect of alginate concentration on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298," *Int. Dairy J.*, 16, 1190 – 1195, 2005.
- [5] M.D. Piano, "Is microencapsulation the future of probiotic preparation? The increased efficacy of gastro-protected probiotics," *Gut Microbes*. 2:2, 120-123, 2011.
- [6] M, Firdaus, Setijawati D, Kartikaningsih, "The Effect of *Lactobacillus Acidophilus* Microcapsule Which Encapsulated by Kappa Caragenan Toward In Vivo Functional Test," *Research Journal of Life Science*, E-ISSN: 2355-9926, Vol. 1 (1), 2014. <http://rjls.ub.ac.id>
- [7] Carranza, P. Hernández, A. López-Malo, Maria-Teresa Jiménez-Munguia, "Microencapsulation Quality and Efficiency of *Lactobacillus casei* by Spray Drying Using Maltodextrin and Vegetable Extracts," *J. of Food Research*, Vol. 3 (1), ISSN 1972-0887 E-ISSN 1927-0895, 2014.
- [8] Wu, *Low Melt Encapsulation with High Laurated Canola Oil*, US Patent 6,153,326, 2000.
- [9] Rokka, Susanna, P. Rantamaki, "Protecting Probiotic Bacteria by Mircoencapsulation: Challenges of Industrial Applications," *Eur Food Res Technol*, Vol. 231:1-12, 2010.
- [10] Cook MT, "Layer-by-layer coating of alginate matrices with chitosan-alginate for the improved survival and targeted delivery of probiotic bacteria after oral administration," *J. Mater Chem*, B.1(1):52–60, 2013.

- [11] Ayuningtyas, Wildana. 2015. *Ketahanan Bakteri Probiotik Bifidobacterium longum BF-1 yang dienkapsulasi Nano Alginat terhadap Cairan Lambung dan Usus Halus Simulasi*. Bogor: Departemen Gizi Masyarakat Fakultas Ekologi Manusia Institut Pertanian Bogor.
- [12] Pradikaningrum, Henny. 2015. *Uji Viabilitas Mikroenkapsulasi Lactobacillus casei menggunakan Matrik Kitosan*. Jakarta: Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Jakarta.
- [13] Kholisoh G. 2016. Uji Viabilitas Enkapsulasi *Lactobacillus casei* Menggunakan Matriks Kappa Karagenan Uji Viabilitas Enkapsulasi *Lactobacillus casei*. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah; p. 7–8.
- [14] Li, X, Y., Chen, X, G., Cha, D, S., Park, H, J., Sun, Z, W, "Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 39," *J. of Carbohydrate Polymers*, 83: 1479-1485, 2011.
- [15] Woraharn, Sasimar, C. Chaiyasut, B. Sirithunyalug, J. Sirithunyalug, "Survival Enhancement of Probiotic *Lactobacillus plantarum* CMU-FP002 by Granulation and Encapsulation Techniques," *African J. of Microbiology Research*, Vol. 4(20) pp. 2086-2093, 18 October, 2010. ISSN 1996-0808 ©2010 Academic Journals. <http://www.academicjournals.org/ajmr>.
- [16] Marzuki, Ismail. 2012. *Pelepasan Terkendali Kalium Klorida dalam Mikrosfer Kitosan dengan Metode Tautan Silang*. Skripsi. Universitas Indonesia.
- [17] N. Benderska, S. Chakilam, M. Hugle, J. Ivanovska, M. Gandesiri, L.J. Schulze, "Apoptosis signalling activated by TNF in the lower gastrointestinal tract-riview," *Current Pgarmaceutical Biotechnology*, 2248-2258, 2012.
- [18] O. Sandoval-Castilla, C. Lobato-Calleros, H. S. Garcia-Galindo, J. Alvarez-Ramirez, E. J. Vernon-Carter, "Textural properties of alginate-pectin beads and survivability of entrapped *Lb.casei* in Simulated Gastrointestinal Conditions and In Yoghurt," *Food Research International*, vol. 43 (1), 111-117, 2010.
- [19] Benderska, N., Chakilam, S., Hugle, M., Ivanovska, J., Gandesiri, M. dan Schulze L.J. (2012). Apoptosis signalling activated by TNF in the lower gastrointestinal tract-riview. *Current Pgarmaceutical Biotechnology*. 2248-2258.
- [20] Serna-cock L, Vallejo-castillo V. 2013. Probiotic Encapsulation
- [21] Gbassi K, and Thierry Vandamme. 2012. *Probiotic Encapsulation Technology: from Microencapsulation to Release into the Gut*. ISSN 1999-4923. [www.mdpi.com/journal/pharmaceutics](http://www.mdpi.com/journal/pharmaceutics)
- [22] Heidebach, T., Petra F., Ulrich. K. 2010. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *Journal of Food Engineering*. 98, 309-316
- [23] I. Marzuki, "Pelepasan Terkendali Kalium Klorida dalam Mikrosfer Kitosan dengan Metode Tautan Silang," *Skripsi*, Universitas Indonesia, 2012
- [24] J.A. Bhushani, "Electrospinning and electro spraying techniques: Potential food based applications," *Trends Food Sci Technol* [Internet], 2016, Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.004>
- [25] T. Heidebach, F. Petra, K. Ulrich, "Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells," *J. of Food Engineering*, 98, 309-316, 2010.
- [26] L. Serna-cock, V. E. Vallejo-castillo, "Probiotic Encapsulation," *African J. of Microbiology Research*, 7(40):4743, 2013.
- [27] T. Pawestrisiwi, "Mikroenkapsulasi Double Coating Menggunakan Natrium Alginat dan Kitosan," *Skripsi*, Universitas Indonesia, Depok, 2011.
- [28] Heidebach, T., Petra F., Ulrich. K. 2010. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *Journal of Food Engineering*. 98, 309-316P.F.
- [29] Umawiranda, S. E. Cahyaningrum, "Enkapsulasi Pirazinamid Menggunakan Alginat Dan Kitosan," *J. of Chemistry*, UNESA, Vol. 3 (3), 2014.