

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Probiotik

Bakteri probiotik merupakan mikroorganisme non patogen, yang jika dikonsumsi memberikan pengaruh positif terhadap fisiologi dan kesehatan inangnya (Triana *et al.*, 2007). Probiotik mempunyai berbagai fungsi kesehatan antara lain sebagai pencegah dan mempunyai efek melawan diare, mengurangi kejadian *lactose intolerance*, melindungi dari inflamasi/arthritis, mencegah hipertensi dan kanker serta meningkatkan system imun tubuh. Probiotik juga berfungsi untuk menyempurnakan proses pencernaan manusia dengan cara melindungi saluran pencernaan dari serangan bakteri patogen. Probiotik juga dilaporkan mampu mengatasi kejadian diare yang disebabkan oleh infeksi *Escherichia coli*.

Bakteri asam laktat yang bersifat sebagai probiotik pada pencernaan manusia merupakan mikroflora normal usus, yang terdiri dari *Bifidobacteria* dan *Lactobacillus*. Tidak semua jenis bakteri bisa digunakan sebagai probiotik. Ada beberapa persyaratan yang harus dipenuhi, diantaranya memiliki aktivitas antimikroba dan anti karsinogenik, mampu berkoloni dalam saluran pencernaan serta mampu meningkatkan penyerapan usus. Beberapa jenis probiotik yang sering digunakan adalah *Bifidobacterium brevis*, *Infantis*, *Longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, dan *Streptococcus thermophiles*. Dipasaran probiotik ini dijual dalam bentuk susu dan food supplement (O'Grady dan Gibson, 2007).

2.2 Persyaratan Bakteri Probiotik

Tidak semua jenis bakteri bisa digunakan sebagai probiotik. Ada beberapa persyaratan yang harus dipenuhi, diantaranya memiliki aktivitas antimikroba dan anti karsinogenik, mampu berkoloni dalam saluran pencernaan serta mampu meningkatkan penyerapan usus. Beberapa jenis probiotik yang sering digunakan adalah *Brevis*, *Infantis*, *Longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, dan *Streptococcus thermophiles*. Dipasaran probiotik ini dijual dalam bentuk susu dan food supplement (O'Grady dan Gibson, 2007).

Karakteristik pemilihan atau kriteria bahwa suatu bakteri itu termasuk probiotik adalah berasal dari manusia, tahan terhadap asam dan garam empedu, menempel pada sel saluran pencernaan, melakukan kolonisasi, antagonisme terhadap bakteri karsinogen dan patogen, menghasilkan senyawa antimikroba, aman digunakan pada pangan dan kesehatan, dan efek kesehatannya (Firdaus *et al.*, 2014).

Syarat probiotik adalah tidak patogen, toleran terhadap asam dan garam empedu, mempunyai kemampuan bertahan pada proses pengawetan dan dapat bertahan pada penyimpanannya serta memiliki kemampuan memberi efek kesehatan yang sudah terbukti (Shortt, 1999). *Lactobacillus* sebagai probiotik alternatif penurun kolesterol memiliki kemampuan bertahan terhadap garamempedu, kondisi asam, mampu menghambat bakteri pathogen, tahan terhadap antibiotik dan dapat mengikat kolesterol dengan menempel pada epitel dinding saluran pencernaan (Hood dan Zottola, 1998).

2.3 Deskripsi *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus merupakan bakteri asam laktat yang termasuk dalam filum firmicutes dan famili lactobacillales yang mempunyai morfologi berbentuk batang (basil). Menurut (Garrity *et al.*, 2004), klasifikasi bakteri ini adalah :

Domain	: Bacteria
Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Firmicutes
Order	: Lactobacillales
Family	: Lactobacillaceae
Genus	: Lactobacillus
Specific descriptor	: acidophilus
Scientific name	: <i>Lactobacillus acidophilus</i>



Gambar 1. *Lactobacillus acidophilus* (Prescott et al., 2002)

Lactobacillus acidophilus adalah salah satu dari delapan genera umum bakteri asam laktat. *Lactobacillus acidophilus* dapat tumbuh baik dengan oksigen ataupun tanpa oksigen, bakteri ini dapat hidup pada lingkungan yang sangat asam sekalipun, seperti pada pH 4-5 atau dibawahnya dan bakteri ini merupakan bakteri homofermentatif yaitu bakteri yang memproduksi asam laktat sebagai satu-satunya produk akhir (Triana, 2007).

Karakteristik *Lactobacillus acidophilus* tidak tumbuh pada suhu 15°C, optimum pertumbuhan pada suhu 35-38°C dan pH optimum 5,5-6,0. *Lactobacillus*

acidophilus banyak ditemukan pada bagian akhir usus kecil dan bagian awal usus besar. Bakteri tersebut dapat memproduksi asam organik, hidrogen peroksida dan antibiotik untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen atau bakteri pembusuk, hal ini menunjukkan bahwa sifat antimikroba bakteri gram positif lebih kuat daripada bakteri gram negatif dalam menghambat bakteri patogen. *Lactobacillus acidophilus* dalam saluran pencernaan dapat juga menghambat pertumbuhan bakteri patogen atau pembusuk yang menyebabkan gangguan pada usus, diare dan gangguan pencernaan serta berperan dalam menjaga kesehatan (Kanbe, 1992).

Bakteri ini memiliki kriteria sebagai probiotik saluran pencernaan penurun atau anti kolesterol. Isolat tersebut memiliki keunggulan dalam hal kemampuan hidupnya pada pH rendah, toleransi terhadap garam empedu, dan menghasilkan asam-asam organik penurun kolesterol (Napitupulu *et al.*, 2003), sebagaimana disyaratkan Hood dan Zottola (1998). Di samping itu hasil uji *in vivo* juga menunjukkan bahwa pemberian suspensi probiotik *Lactobacillus* sp pada tikus dapat menurunkan kolesterol pada hari ke-28 (Kurniawati, 2003). *Lactobacillus* yang dicekokkan pada tikus berfungsi menurunkan kadar LDL dan mempertahankan kadar HDL (*high density of lipoprotein*), dalam darah (Yulinery *et al.*, 2004). Syarat probiotik lain adalah mempunyai kemampuan bertahan pada proses pengawetan dan dapat bertahan pada penyimpanan (Shortt, 1999).

2.4 Deskripsi *Bifidobacterium bifidum*

Bifidobacterium bifidum merupakan bakteri salah satu jenis bakteri asam laktat yang tergolong sebagai bakteri probiotik karena mampu memberikan efek yang positif bagi kesehatan manusia. Menurut Garrity *et al.*, (2004), *Bifidobacterium bifidum* diklasifikasikan sebagai berikut :

Domain	: Bacteria
Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Actinobacteria
Subclass	: Actinobacteridae
Order	: Bifidobacteriales
Family	: Bifidobacteriaceae
Genus	: Bifidobacterium
Specific descriptor	: bifidum
Scientific name	: <i>Bifidobacterium bifidum</i>



Gambar 2. *Bifidobacterium bifidum* (Prescott et al., 2002)

Karakteristik umum dari *Bifidobacterium* antara lain bersifat Gram positif, tidak membentuk spora, non motil, katalase negatif dan anaerobik, mempunyai pertumbuhan 36-38 μm , temperature optimum pertumbuhannya 36-38 $^{\circ}\text{C}$, pH optimum pertumbuhan sebesar 6,5 , bersifat heterofermentatif, memfermentasi laktosa untuk menghasilkan asam laktat dan asam asetat tanpa menghasilkan CO₂.

2.5 Mikroenkapsulasi

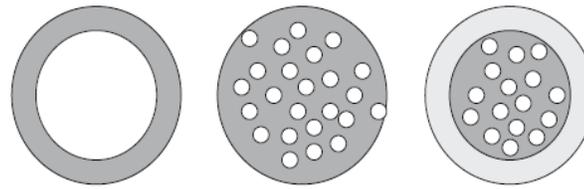
Mikroenkapsulasi adalah proses atau teknik untuk menyalut inti yang berupa suatu senyawa aktif baik itu padat, cair, gas, ataupun sel dengan suatu bahan pelindung tertentu yang dapat mengurangi kerusakan senyawa aktif tersebut.

Enkapsulasi dapat menghasilkan partikel dengan diameter beberapa nm sampai beberapa μm (Barbosa, 2005).

Komponen yang bersifat peka seperti mikroorganisme dapat dienkapsulasi untuk meningkatkan viabilitas dan umur simpannya. Enkapsulasi probiotik biasanya dilakukan dalam sistem polimer yang bersifat lembut dan tidak beracun (*food grade*). Polimer yang biasanya digunakan dalam proses enkapsulasi bakteri probiotik adalah polisakarida yang diekstrak dari rumput laut (Karagean dan alginat), tumbuhan (pati dan turunannya, gum arab), atau bakteri (gellan dan xanthan), dan protein hewan (kasein, whey, skim dan gelatin) (Pasifico *et al.*, 2001).

Berdasarkan ukuran partikelnya produk enkapsulasi dapat dibagi menjadi makrokapsul (ukuran partikel $>5000 \mu\text{m}$), mikrokapsul (ukuran partikel $1,0-5000 \mu\text{m}$) dan nanokapsul (jika ukuran partikel $<1,0 \mu\text{m}$). Produk enkapsulasi bisa berbentuk bola, persegi panjang atau tak beraturan. Dua jenis struktur utamanya adalah satu inti (*single core*) dan banyak inti (*multiple core*) pada bagian dindingnya (Jafari *et al.*, 2008).

Enkapsulasi membantu memisahkan material inti dengan lingkungannya hingga material tersebut terlepas (*release*) ke lingkungan. Material inti yang dilindungi disebut bahan inti (*core*), agen aktif, isi, fasa internal, atau fase *payload*. Substansi yang menyelimuti disebut lapisan, membran, *shell*, bahan pembawa, bahan dinding, fase eksternal atau matriks dan struktur yang dibentuk oleh bahan pelindung yang menyelimuti inti disebut sebagai dinding membran atau kapsul. Bahan yang digunakan untuk mengenkapsulasi produk makanan harus memiliki mutu yang bagus dan mampu melindungi zat aktif di dalamnya (Zuidam dan Nedovic, 2010). Gambar morfologi mikrokapsul dapat dilihat pada Gambar 3.



Mononuklear

Polinuklear

Matrik

Gambar 3. Morfologi Mikrokapsul (Zuidam dan Nedovic, 2010)

2.6 Metode Pembuatan Mikrokapsul

Menurut Jafari *et al.*, (2008), terdapat beberapa teknik yang digunakan untuk proses enkapsulasi, antara lain dengan menggunakan proses fisik, kimia atau kombinasi teknik fisik dan kimia. Pertimbangan dalam pemilihan teknik yang akan digunakan adalah sensitivitas bahan inti, sifat fisiko-kimia bahan inti dan pelapis, ukuran kapsul yang diinginkan, target produk untuk aplikasinya, mekanisme pelepasan bahan inti dan biaya. Teknik yang digunakan untuk enkapsulasi dapat dikelompokkan sebagai berikut:

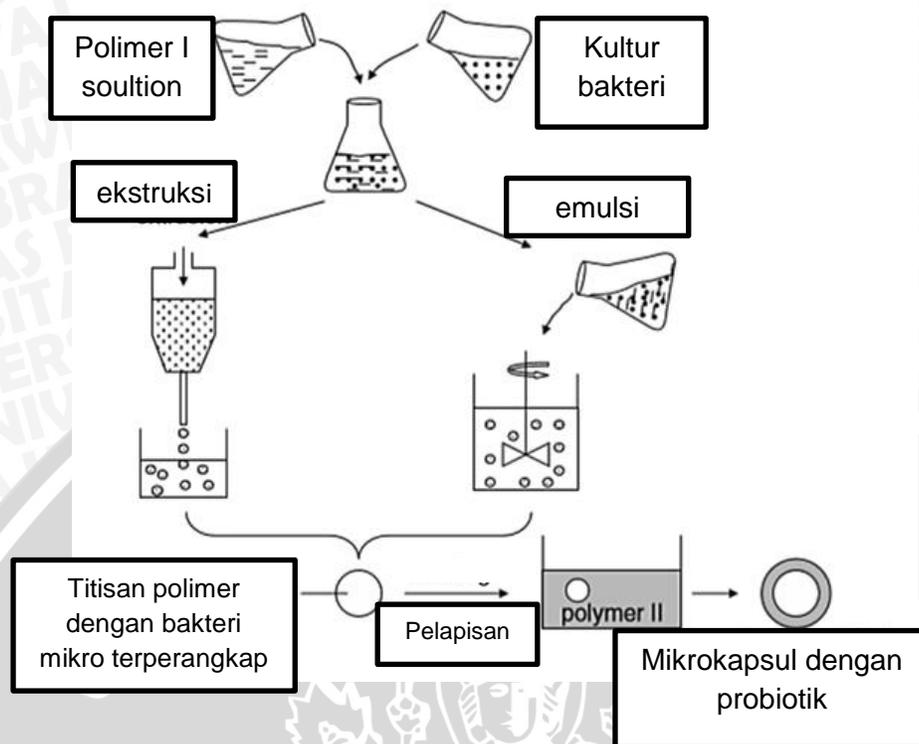
- Metode fisika, yang meliputi *spray drying*, *spray cooling and chilling*, *fluidized bed coating*, *freeze drying* dan *co-crystalization*.
- Metode kimia, yang meliputi *molekuler inclusion* dan *interfacial polymerization*.
- Metode *physicochemical* antara lain *coacervation*, *organic phase* dan *liposome entrapment*.

2.6.1 Metode Gel Partikel

Proses enkapsulasi dapat dilakukan dengan beberapa metode antara lain metode pengeringan semprot, fluid bed coating, spray chilling, melt injection, melt extrusion, emulsification, pengeringan beku dan vakum, dan metode pembentukan manik-manik (Zuadiam dan Nedovic, 2010). Metode pengeringan beku dan vakum

tergolong dalam metode yang memerlukan biaya tinggi. Teknik enkapsulasi untuk bakteri asam laktat dapat dilakukan dengan mudah, murah, dan tidak toksik, yaitu menggunakan enkapsulan karaginan. Proses enkapsulasi probiotik menggunakan karaginan dapat dilakukan dengan teknik ekstruksi atau dengan teknik emulsi yang akan membentuk gel hidrokoloid yang berbentuk manik-manik. Diantara kedua teknik tersebut, ekstruksi merupakan teknik yang lebih sederhana dan membutuhkan biaya yang lebih rendah (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

Gel partikel merupakan salah satu metode dalam pembuatan lapisan luar untuk melindungi bakteri didalamnya. Metode yang sering digunakan dalam proses pembuatan mikrokapsul bakteri probiotik disebut dengan metode gel partikel yaitu gabungan antara metode ekstruksi dengan metode emulsifikasi. Caranya adalah mencampur kultur bakteri probiotik dengan larutan polimer (bahan pengkapsulat) kemudian dilewatkan jarum untuk diekstraksi dengan menggunakan jarum-jarum dengan diameter lubang 0,3 – 3 mm kedalam larutan penjendal (pembentuk gel) sehingga akan menghasilkan butiran-butiran mikrokapsul dengan diameter sesuai dengan ukuran lubang jarum yang digunakan. Teknologi ini memiliki kelebihan yaitu murah harganya, tidak perlu peralatan mahal, dan mudah penanganannya (Manojlovic *et al.*, 2010). Proses mikroenkapsulasi dengan metode gel partikel secara lengkap dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Mikroenkapsulasi metode gel partikel (Manojlovic *et al.*, 2010)

Teknik ekstruksi (*dropping method*) ini dilakukan dengan prinsip melewati larutan enkapsulan (yang didalamnya sudah terdapat komponen yang dienkapsulasi) melewati suatu lubang kecil sehingga membentuk tetesan. Tetesan yang terbentuk dijatuhkan ke dalam larutan KCl steril 3,9 M.

2.7 *Foam-mat drying*

Pengeringan busa (*foam-mat drying*) merupakan cara pengeringan bahan berbentuk cair yang sebelumnya dijadikan busa terlebih dahulu dengan menambahkan zat pembusa atau pembuih. *Foam-mat drying* berguna untuk memproduksi produk-produk kering dari bahan cair yang peka terhadap panas atau mengandung kadar gula tinggi yang menyebabkan lengket bila dikeringkan dengan cara pengeringan semprot. Konsentrasi busa yang semakin banyak akan

meningkatkan luas permukaan dan memberi struktur berpori pada bahan sehingga akan meningkatkan kecepatan pengeringan (Zubaedah *et al.*, 2003).

Pengeringan busa memberikan keuntungan pada pengeringan udara, biayanya murah dan mudah dikerjakan. Susunan busa memberikan keuntungan yang khas dalam penyebaran, pengeringan, penghilangan permukaan, penghancuran dan penguapan produk. Busa adalah jalan keluar dari pilihan pengendali ketebalan. Lapisan pada pengeringan busa lebih cepat daripada cairan bukan busa pada kondisi luar yang sama. Ini karena cairan bergerak lebih mudah melalui struktur busa daripada melalui padatan lapisan pada bahan yang sama (Van Arsdel *et al.*, 1973).

2.8 Bahan Mikrokapsul

2.8.1 Kappa Karaginan

Karaginan merupakan polisakarida alami yang diperoleh dari rumput laut merah yang dapat dimakan. Kata karaginan berasal dari nama spesies rumput laut *Chondrus crispus* yang dikenal sebagai lumut Carrageen atau lumut Irlandia dalam bahasa Inggris, dikenal sebagai Carraigin di Irlandia. Karaginan digunakan dalam berbagai aplikasi komersial sebagai *gelling agent*, bahan pengental (thickening) dan bahan penstabil (*stabilizing agent*) terutama dalam produk makanan dan saus. Selain itu karaginan juga digunakan dalam dunia farmasi serta dalam aplikasi industri (Necas dan Bartosikova, 2013).

Eucheuma cottonii adalah rumput laut merah penghasil kappa karaginan yang terdiri dari D-galaktosa-4-sulfat dan 3,6-anhidro-D-galaktosa (Stanley, 1990).

Eucheuma cottonii dalam bentuk SRC (Semi Refine Caragenan) atau karaginan semi murni dapat dimanfaatkan sebagai bahan penyalut pada proses

mikroenkapsulasi. Pemanfaatan ini ditinjau dari sifatnya sebagai penggel, dengan karakteristik gel yang keras dan kokoh tetapi gampang pecah (Setijawati *et al.*, 2011).

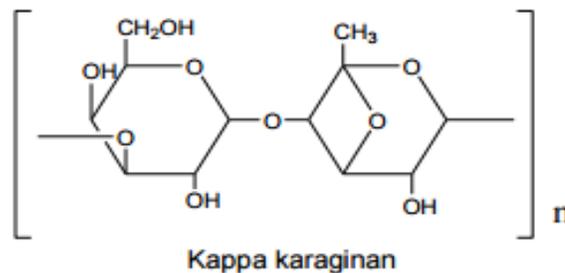
Kandungan utama dari *Eucheuma cottonii* yaitu karbohidrat (gula atau *vegetable-gum*), protein dan lemak. Protein dari beberapa jenis rumput laut memiliki kualitas lebih baik jika dibandingkan dengan protein tanaman darat *Eucheuma cottonii* memiliki kandungan vitamin seperti vitamin A, B1, B2, B6, B12 dan C serta mengandung mineral seperti fosfor, kalium, natrium, iodium, kalsium, dan zat besi (Norsanto, 2004). Komposisi bahan kimia dari rumput laut jenis *Eucheuma cottonii* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan Kimia *Eucheuma cottonii* (Rohmah, 2013)

Komposisi	Nilai
Air (%)	13,90
Protein (%)	2,69
Lemak (%)	0,37
Abu (%)	17,09
Mineral Ca (ppm)	22,39
Mineral Fe (ppm)	0,121
Mineral Cu (ppm)	2,763
Reboflavin (mg/100g)	2,7
Vitamin C (mg/100g)	12
Karagenan (%)	61,52

Kappa karaginan ditandai pada analisa dengan menggunakan spektrofotometer infra merah, gugus fungsi D-galaktosa-4-sulfat akan muncul pada panjang gelombang 840-840 cm^{-1} , gugus 3,6-anhidro-D-galaktosa akan muncul pada panjang gelombang 928-933 cm^{-1} , gugus 3,6-anhidro galaktosa-2-sulfat akan muncul pada panjang gelombang 800-805 cm^{-1} serta gugus fungsi ester sulfat akan muncul pada panjang gelombang 1220-1260 cm^{-1} (FAO, 2001).

Kappa karaginan akan membentuk gel dengan tekstur keras dengan adanya ion K^+ (garam kalium), akan tetapi akan membentuk gel dengan sifat rapuh dengan adanya ion kalsium (Ca^{2+}) serta akan mengalami sineresis jika membentuk gel (Hernández, 2013). Kandungan unsur-unsur yang terdapat dalam kappa karaginan antara lain Natrium (Na) sebesar 0,32%, Kalium (K) 9,1%, Kalsium (Ca) 0,88%, Magnesium (Mg) 0,18% dan kandungan Sulfur (S) sebesar 7,7% (Brenner *et al.* 2014). Struktur kimia kappa karaginan ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur Kappa Karaginan (Campo *et al.*, 2009)

2.8.2 Pati Ubi kayu

Pati merupakan derivat polisakarida yang strukturnya terdiri dari α -1,4-D-glukosa, amilosa, amilopektin, dan beberapa gugus hidroksil (Rowe *et al.*, 2009). Pati terdiri dari atom karbon, hidrogen, dan oksigen dengan perbandingan 6:10:5. Struktur pati hampir sama dengan selulosa, hanya berbeda pada ikatan glukosidanya, pati terletak pada α -1,4-D-glukosa sedangkan selulosa pada β -1,4-D-glukosa. Selain itu pati juga memiliki dua komponen utama lainnya yaitu amilosa dan amilopektin pada pati terikat pada α -1,4-D-glukosa yang masing-masing ikatan terhubung dengan α -1,6-D-glukosa. Amilosa bersifat larut dalam air dan menyebabkan viskositas pati yang cukup tinggi sedangkan amilopektin tidak larut

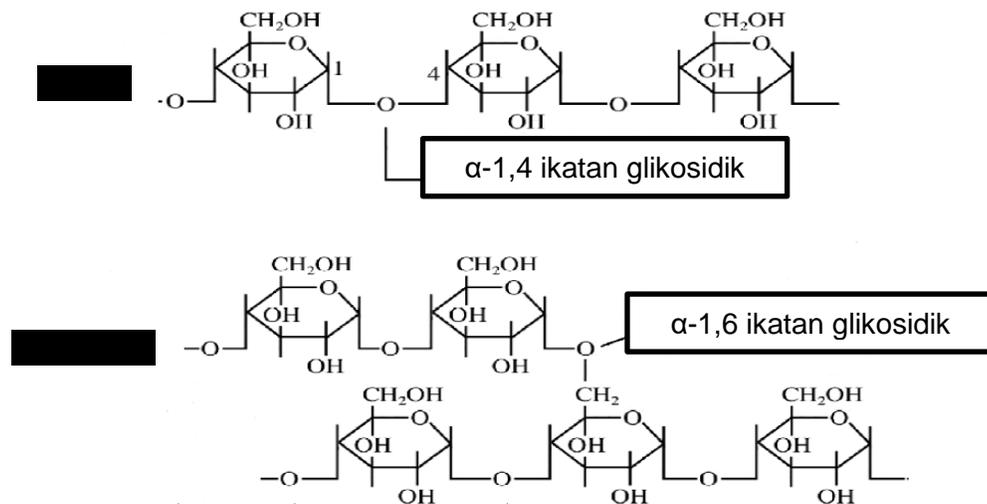
dalam air. Kedua molekul ini membentuk granul semi-kristalin pati. Jumlah dan ukuran dari kedua molekul ini berbeda tergantung pada tanaman penghasil pati.

Pati merupakan karbohidrat yang tersebar dalam tanaman terutama tanaman berklorofil. Bagi tanaman pati merupakan cadangan makanan untuk masa pertumbuhan dan pertunasan yang terdapat pada biji, batang dan pada bagian umbi tanaman. Banyaknya kandungan pati pada tanaman tergantung asal pati tersebut, misalnya pati yang berasal dari biji beras mengandung pati 50-60 %. Pati telah lama digunakan baik sebagai bahan makanan maupun *non-food* seperti perekat, dalam industri tekstil, polimer atau sebagai bahan tambahan dalam sediaan farmasi. Penggunaan pati dalam bidang farmasi sebagai formula sediaan tablet, baik sebagai bahan pengisi, penghancur maupun sebagai bahan pengikat (Tonukari, 2004).

Aplikasi pati dalam suatu produk dipengaruhi oleh kemampuannya untuk membentuk karakteristik produk akhir yang diinginkan. Perbedaan karakteristik fisiko-kimia seperti bentuk granula, rasio amilosa/ amilopektin, karakteristik molekuler pati dan keberadaan komponen lain merupakan penyebab perbedaan sifat fungsionalitas (Copeland *et al.*, 2009). Komposisi Pati dan Struktur amilosa dan amilopektin dapat dilihat pada Gambar 6 dan Tabel 2 berikut ini.

Tabel 2. Komposisi kimia pati ubi kayu (Grace, 1977)

Komposisi	% Berat
Karbohidrat	87,87
Lemak	0,51
Protein	1,60
Air	7,80
Abu	2,22



Gambar 6. Struktur molekul amilosa dan amilopektin (Rowe *et al.*, 2009)

2.9 Metode Perhitungan koloni

Metode perhitungan cawan langsung (total plate count) dengan menggunakan pengenceran bertingkat dan metode agar tuang (pour plate) serta metode tebar (spread plate). Pada metode agar tuang, sebanyak 1 mL atau 0,1 mL larutan bakteri diinokulasikan ke dalam cawan petri kosong, kemudian ditambahkan media agar cair lalu diratakan dengan cara cawan petri digerakan secara zig-zag sampai larutan bakteri menjadi tercampur dengan agar cair dan dibiarkan sampai agar membeku baru kemudian di inkubasi untuk menumbuhkan bakteri inokulan. Koloni bakteri yang bersifat aerob akan berada di atas permukaan agar, sedangkan koloni bakteri yang bersifat anaerob akan tumbuh pada dasar media agar. Koloni bakteri yang tumbuh dinyatakan dalam satuan CFU (colony forming units) dengan syarat perhitungan koloni antara 25 – 300 koloni (U.S FDA), akan tetapi para ahli biologi banyak yang menggunakan syarat perhitungan antara 30-300 koloni bakteri (Tortora *et al.*, 2014).

Metode agar tuang digunakan secara luas untuk pengkulturan bakteri dan fungsi. Sampel diencerkan secara bertingkat untuk mengurangi kepadatan populasi agar mendapatkan koloni terpisah pada saat ditanam. Sejumlah volume larutan bakteri dicampur dengan media agar cair dengan suhu sekitar 45°C, lalu dituangkan kedalam cawan petri steril dengan cepat. Cawan yang memiliki jumlah koloni antara 30 – 300 akan dihitung (Prescott *et al.*, 2002). Metode perhitungan agar tuang memiliki kelemahan yaitu sensitifitasnya rendah dikarenakan koloni bakteri yang terdapat dalam agar tidak dapat diamati tanpa menggunakan perbesaran pada saat perhitungan koloni dilakukan (Adams dan Moss, 2000).

2.10 Viabilitas Probiotik

Viabilitas umumnya dinilai sebagai CFU/g harus dipertahankan pada tingkat yang dapat memberikan efek kesehatan. Meskipun beberapa penurunan tingkat viabilitas secara umum dari waktu ke waktu, formulasi awal harus menjamin bahwa tingkat viabilitas tidak turun dibawah apa yang ditunjukkan pada standart. Jumlah minimal strain probiotik yang ada dalam produk makanan adalah sebesar 10^6 CFU/g, dengan tujuan untuk mengimbangi kemungkinan penurunan jumlah bakteri probiotik pada saat berada dalam jalur pencernaan (Shah, 2007).

Probiotik yang mencapai saluran pencernaan hingga 10^7 cfu/mL atau g akan menunjukkan efek fungsional probiotik. Mikroflora probiotik yang memproduksi asam laktat biasanya berasal dari golongan *Lactobacilli* dan *Bifidobacteria* (Setijawati *et al.*, 2011). Persyaratan jumlah minimum bakteri probiotik yang dikemukakan oleh Ooi dan Min-Tze (2010) agar mampu memberikan efek positif bagi kesehatan manusia sebesar $10^7 - 10^{11}$ CFU/g makanan.