

PENGARUH PENYIMPANAN TERHADAP VIABILITAS BAKTERI *Lactobacillus bulgaricus* DAN *Streptococcus thermophilus* DALAM BIOKAPSUL ALGINAT

(STORAGE EFFECT ON VIABILITY OF *Lactobacillus bulgaricus* DAN *Streptococcus thermophilus* IN ALGINIC BIOCAPSULE)

Oleh :

Ngatirah¹) dan Maria Ulfah¹

¹ Staf Pengajar Jurusan THP, Fak Tekn Pertanian INSTIPER

ABSTRAK

*Attention to probiotic food has been increasing. Yogurt is a of probiotic food that was containing *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. Survival of the probiotic in yoghurt has been shown to be a problem, due to environmental factors such as pH of stomach and bile salt. Their intolerance to the environment lower their viability. However, microencapsulation techniques could provide protection to acid sensitive and thus increase their survival rate during the shelf life of the yoghurt and their passage through the gastrointestinal tract. Sodium alginate has been most widely used as an microencapsulation vehicle. This research was to study the effect of microencapsulation on cell viability during storage time, and the effect of storage time on low pH and bile salt tolerance. The result showed that storage time effect the weight and size of alginate beads. Longer storage time tended to decrease in cell viability though it was not significant and did not effect of low pH and bile salt tolerance.*

Keywords : Sodium Alginat, Encapsulation, Probiotic, Yoghurt, Storage time

PENDAHULUAN

Perhatian terhadap makanan kesehatan cenderung meningkat dengan semakin meningkatnya jumlah penduduk usia lanjut. Di Indonesia sendiri, produk-produk makanan kesehatan sudah mulai dikenal pada awal tahun 90-an. Perkembangan makanan kesehatan tersebut sebenarnya diawali oleh adanya kecenderungan meningkatnya penyakit-penyakit degeneratif seperti darah tinggi, stroke, kanker, diabetes dan kardiovaskuler. Kecenderungan lain yaitu adanya pergeseran gaya hidup yang menuntut kesadaran akan makanan yang lezat, bergizi dan dapat menyehatkan tubuh.

Berbagai penelitian telah banyak dilakukan untuk mengungkap manfaat probiotik tersebut seperti dirangkum oleh Sanders (2000), diantaranya adalah dapat

menyeimbangkan mikroflora usus, mencegah penyakit-penyakit pada saluran pencernaan, menurunkan kolesterol, meningkatkan sistem, kekebalan tubuh, mengatasi lactose intolerance, mencegah kanker usus dan lain-lain.

Salah satu produk probiotik yang banyak dikembangkan adalah yogurt yang mengandung bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*. Salah satu definisi probiotik yaitu mikrobia hidup yang dikonsumsi dan selanjutnya dapat memberikan efek yang menguntungkan. Agar fungsi probiotik dalam yogurt tersebut dapat tercapai maka bakteri yogurt harus dapat sampai kedalam saluran pencernaan dalam keadaan hidup. Untuk itu bakteri yogurt harus mempunyai viabilitas atau ketahanan hidup yang tinggi, baik itu selama fermentasi, selama penyimpanan maupun selama memasuki

saluran pencernaan. Yang menjadi hambatan selama ini adalah adanya factor-faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi atau menurunkan viabilitas bakteri yogurt tersebut, misalnya suhu penyimpanan, dan kondisi saluran pencernaan yaitu adanya garam empedu, pH lambung yang terlalu ekstrim (pH 1,5) dan kondisi lingkungan tersebut dapat menyebabkan sel bakteri probiotik kehilangan ketahanan hidupnya. Untuk mengatasi hal tersebut diperlukan suatu cara yang dapat melindungi sel dari pengaruh langsung factor lingkungan. Salah satu cara yang dapat dilakukan yaitu dengan menggunakan teknik enkapsulasi sel atau imobilisasi sel. Dari berbagai penelitian, bahan-bahan yang dapat digunakan sebagai bahan enkapsulasi adalah karagenan (Adhikari, *et.al.*, 2003), Gum acasia (Desmon, *et.al.*, 2002), alginate (Champagne *et.al.*, 2000; Grosso and Favoro-Trindade, 2004; Harris, 2003; Lee and Heo, 2000), chitosan (Tien *et.al.*, 2004), tepung terigu dan pollard (widodo, dkk., 2003) serta sesame oil (Hou, *et.al.*, 2003).

Alginat merupakan salah satu bahan pembentuk kapsul yang cukup murah, tidak toksik, dan lazim dipergunakan sebagai makanan. Penelitian ini mengkaji mengenai pengaruh penyimpanan terhadap viabilitas sel dan selama berada dalam kondisi ekstrim (pH rendah dan garam empedu). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh enkapsulasi terhadap viabilitas sel bakteri yogurt selama penyimpanan dan mengetahui ketahanan sel bakteri yogurt yang dienkapsulasi terhadap pengaruh pH rendah dan garam empedu.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan alat

Strain yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri yogurt *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus*, yang diperoleh dari Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) UGM. Media yang digunakan yaitu MRS agar dan MRS broth (Oxoid).

Alat yang digunakan antara lain : syringe, gelas piala, erlenmeyer, enkas, vortek, inkubator, autoklaf, petridish dan alat gelas yang lain.

Rancangan percobaan

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan petak terbagi, dengan:

Petak utama : jenis bakteri probiotik (B), terdiri atas dua aras (B1: *L. bulgaricus* dan B2: *S. thermophilus*)

Petak bagian: Lama waktu penyimpanan (L), terdiri atas tiga aras (L1 : 0 minggu, L2 : 2 minggu dan L3 : 4 minggu)

Data hasil penelitian dilakukan uji keragaman dan jika ada beda nyata dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan pada jenjang nyata 5 %.

Pelaksanaan

Penelitian mengacu pada metode enkapsulasi yang dilakukan oleh Tien *et.al.*, (2004); Onsoyen (1999) dan Sheu and Marshall (1993). Proses enkapsulasi dimulai dengan menumbuhkan bakteri *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* secara terpisah kedalam 9 ml media MRS broth yang diinkubasi 24 jam pada 30-37 °C, dipanen dan disentrifuse (3000 g x 10 menit), lalu diresuspensikan kedalam 1 ml akuades steril. Kemudian dicampur dengan 49 ml larutan 3,5% kemudian dihomogenkan. Selanjutnya dimasukan ke dalam syringe dan diteteskan kedalam larutan 4% CaCl₂ dan dibiarkan selama 30 menit sambil distirer dengan kecepatan lambat. Setelah terbentuk kapsul kemudian diiamkan selama 15 menit, kemudian kapsul diambil dan dikeringanginkan, kemudian biokapsul dibagi menjadi tiga bagian dan masing-masing kemudian disimpan dalam kulkas selama 4 minggu (suhu 4-5°C) dan setiap dua minggu sekali dilakukan analisis seperti pada penelitian tahap I.

untuk analisis/pengujian selanjutnya. Analisis biokapsul yang dilakukan meliputi :

- a. Analisis kapsul

- Biokapsul yang telah kering selanjutnya diamati warna, ukuran diameter, rerata berat serta jumlah sel per kapsul.
- b. Pengujian ketahanan sel dalam kapsul terhadap pH rendah (Lee and Heo, 2000)
Biokapsul diinkubasikan kedalam media MRS broth yang telah diatur pH-nya 1,5 kemudian diinkubasi selama 4 jam. Selanjutnya jumlah sel dihitung dengan metode plate count.
 - c. Pengujian ketahanan sel dalam kapsul terhadap garam empedu (Lee and Heo, 2000)
Biokapsul diinkubasikan kedalam media MRS broth yang telah diatur pH-nya 5,5 dan disuplementasi dengan garam empedu 1,2% kemudian diinkubasi

- selama 4 jam. Selanjutnya jumlah sel dihitung dengan metode plate count
- d. Pengujian viabilitas sel selama penyimpanan pada suhu 4-5 °C (Widodo, dkk, 2003)
Biokapsul disimpan pada suhu 4-5 °C selama 4 minggu, setelah itu diuji jumlah selnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sifat Fisik Biokapsul selama Penyimpanan

Pengaruh lama penyimpanan terhadap diameter biokapsul dengan bahan sodium alginate 3,5% dan khitosan 4,5% terdapat pada Tabel 1.

Tabel 1. Perubahan diameter biokapsul dengan bahan Na alginate 3,5% selama penyimpanan (mm)

Jenis Bakteri Probiotik	Lama Penyimpanan			Rerata
	0 minggu	2 minggu	4 minggu	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	3,44	3,25	3,11	3,27 ^{tn}
<i>Streptococcus thermophilus</i>	3,49	3,37	3,24	3,37 ^{tn}
Rerata	3,47 ^a	3,31 ^b	3,18 ^c	

Keterangan : Huruf yang sama pada kolom atau baris yang berbeda menunjukkan tidak beda nyata antar perlakuan dengan uji Jarak Berganda Duncan pada jenjang 5%

Dari Tabel 1. dapat diketahui jenis bakteri tidak berpengaruh terhadap diameter biokapsul alginat. Hal itu disebabkan karena lubang syringe yang digunakan sama, selain itu juga biomassa sel yang digunakan relative sama sehingga tidak berpengaruh terhadap diameter biokapsul. Hal itu didukung oleh data pada Tabel 2 dan 3 yang menunjukkan bahwa jumlah sel dalam kapsul tidak terpengaruh oleh jenis bakteri.

Lama penyimpanan berpengaruh terhadap diameter biokapsul baik pada alginat

maupun khitosan. Makin lama waktu penyimpanan diameter kapsul menurun. Hal itu diduga disebabkan karena selama penyimpanan terjadi pengkerutan kapsul karena adanya sedikit kehilangan air.

Pengaruh lama penyimpanan terhadap berat biokapsul dengan bahan sodium alginate 3,5% terdapat pada Tabel 2.

Tabel 2. Perubahan berat biokapsul dengan bahan sodium alginat 3,5% selama penyimpanan (gram)

Jenis Bakteri Probiotik	Lama Penyimpanan			Rerata
	0 minggu	2 minggu	4 minggu	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	0,04	0,03	0,03	0,033 ^{tn}
<i>Streptococcus thermophilus</i>	0,04	0,04	0,03	0,037 ^{tn}
Rerata	0,04 ^a	0,035 ^{ab}	0,03 ^b	

Keterangan : Huruf yang sama pada kolom atau baris yang berbeda menunjukkan tidak beda nyata antar perlakuan dengan uji Jarak Berganda Duncan pada jenjang 5%

Dari Tabel 2. dapat dilihat bahwa jenis bakteri tidak berpengaruh terhadap berat biokapsul alginat. Hal itu disebabkan karena lubang syringe yang digunakan sama dan biomassa sel yang dicampurkan relative hanya sedikit sehingga tidak berpengaruh terhadap berat kapsul. Pada biokapsul alginat, lama penyimpanan berpengaruh terhadap berat kapsul, hal itu diduga karena selama penyimpanan terjadi kehilangan air karena penguapan sehingga susut bobotnya

berkurang. Hal itu didukung dengan data diameter yang menunjukkan adanya beda nyata selama penyimpanan (Tabel 1).

Jumlah Sel dalam Kapsul Selama Penyimpanan

Perubahan jumlah sel dalam kapsul dengan bahan sodium alginate 3,5% dan khitosan 4,5% selama penyimpanan terdapat pada Tabel 3.

Tabel 3. Perubahan Jumlah sel dalam biokapsul dengan bahan sodium alginate 3,5% selama penyimpanan (CFU/g)

Jenis Bakteri Probiotik	Lama Penyimpanan			Rerata
	0 minggu	2 minggu	4 minggu	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	$9,80 \times 10^9$	$1,11 \times 10^9$	$5,48 \times 10^7$	$36,6 \times 10^8$ ^{tn}
<i>Streptococcus thermophilus</i>	$2,26 \times 10^9$	$2,95 \times 10^8$	$2,75 \times 10^8$	$9,43 \times 10^8$ ^{tn}
Rerata	$60,3 \times 10^8$ ^{tn}	$7,03 \times 10^8$ ^{tn}	$1,65 \times 10^8$ ^{tn}	

Keterangan : tn (tidak berbeda nyata)

Jumlah sel bebas untuk *Lactobacillus bulgaricus* pada minggu ke-0 $3,63 \times 10^9$ CFU/ml dan pada minggu ke-4 $14,45 \times 10^7$ CFU/ml sedangkan *Streptococcus thermophilus* $3,54 \times 10^9$ CFU/ml dan pada minggu ke-4 $20,83 \times 10^7$ CFU/ml

Dari Tabel 3. diketahui bahwa jenis bakteri tidak berpengaruh terhadap jumlah sel dalam kapsul, hal itu disebabkan karena kedua jenis bakteri tersebut termasuk dalam kelompok bakteri asam laktat yang mempunyai kecepatan pertumbuhan relatif sama, sehingga jumlah sel yang dihasilkan relatif sama.

Lama penyimpanan juga tidak berpengaruh terhadap jumlah sel dalam kapsul, hal itu diduga karena kapsul mampu melindungi sel dari pengaruh faktor luar yang dapat mengakibatkan penurunan viabilitas. Meskipun demikian, jumlah sel selama

penyimpanan cenderung mengalami penurunan, walaupun secara statistik tidak berbeda nyata. Penurunan tersebut diduga disebabkan karena selama penyimpanan sel terjebak dalam suatu lingkungan yang kondisinya minimal dan sel terikat kuat dalam molekul biokapsul. Namun demikian penurunan yang terjadi tidak nyata dan kurang dari 1 log cycle, sedangkan pada sel bebas penurunan yang terjadi lebih dari dua log cycle. Hasil yang sama juga didapatkan oleh Widodo dkk. (2003), bahwa viabilitas probiotik dalam biokapsul alginat maupun alginat dengan

penambahan filler pollard maupun tepung terigu, yang disimpan pada suhu dingin (4-5°C) selama 4 minggu mengalami penurunan. Hal itu juga didukung oleh Grosso dan Trindade (2004) bahwa selama penyimpanan 14 hari pada suhu dingin sel imobil *L. acidophilus* hanya mengalami penurunan 1 log cycle. Penelitian Chen *et.al.*, (2005) juga menunjukkan hal yang sama yaitu terjadi penurunan viabilitas dengan semakin lamanya periode penyimpanan. Setelah penyimpan 8

minggu jumlah probiotik yang masih dapat bertahan sekitar 10^5 - 10^6 CFU/g.

Ketahanan Biokapsul terhadap pH rendah selama Penyimpanan

Perubahan ketahanan sel dalam kapsul terhadap pH rendah dengan bahan sodium alginate 3,5% dan khitosan 4,5% selama penyimpanan terdapat pada Tabel 4.

Tabel 4. Perubahan Ketahanan sel dalam biokapsul dengan bahan sodium alginat 3,5% terhadap pH rendah selama penyimpanan (CFU/g)

Jenis Bakteri Probiotik	Lama Penyimpanan			Rerata
	0 minggu	2 minggu	4 minggu	
<i>L. bulgaricus</i>	$2,61 \times 10^2$	$4,45 \times 10^2$	$1,04 \times 10^3$	$5,82 \times 10^2$ tn
<i>S. thermophilus</i>	$4,61 \times 10^2$	$3,67 \times 10^2$	$8,93 \times 10^2$	$5,74 \times 10^2$ tn
Rerata	$3,61 \times 10^2$ tn	$4,06 \times 10^2$ tn	$9,67 \times 10^2$ tn	

Keterangan : tn (tidak berbeda nyata)

Jumlah sel bebas untuk *L. bulgaricus* pada minggu ke-0 $1,5 \times 10^2$ CFU/ml dan pada minggu ke-4 $4,0 \times 10^1$ CFU/ml sedangkan *S. thermophilus* $2,07 \times 10^2$ CFU/ml dan pada minggu ke-4 $5,9 \times 10^1$ CFU/ml

Berdasarkan data pada Tabel 4. jenis bakteri juga tidak berpengaruh terhadap ketahanan terhadap pH rendah, namun bakteri yang tidak dikapsul (sel bebas) akan mempunyai penurunan viabilitas yang nyata. Sel yang diberi pelindung kapsul viabilitasnya turun sampai sekitar 5-6 log cycle sedangkan sel bebas dapat turun sampai 8 log cycle. Jumlah sel *Lactobacillus bulgaricus* yang masih mampu bertahan terhadap pengaruh pH rendah tidak berbeda nyata dengan *Streptococcus thermophilus*. Lama penyimpanan tidak berpengaruh terhadap daya tahan sel dalam kapsul terhadap pH. Dalam satu bulan penyimpanan daya tahan sel terhadap pH rendah tidak berbeda nyata, diduga hal itu karena masuknya asam kedalam kapsul relatif lebih lambat sehingga kontak dengan sel tidak cepat terjadi. Bila dibandingkan dengan jumlah sel awal dalam kapsul (tanpa perlakuan pH) pada akhir

penyimpanan (minggu ke-4), adanya pengaruh asam yang tinggi akan menurunkan jumlah sel sebanyak 6 log cycle.

Ketahanan Biokapsul terhadap garam empedu (bile salt) Selama Penyimpanan

Perubahan ketahanan sel dalam kapsul terhadap garam empedu dengan bahan sodium alginate 3,5% dan khitosan 4,5% selama penyimpanan terdapat pada Tabel 5.

Dari Tabel 5. dapat dilihat bahwa jenis bakteri probiotik tidak berpengaruh terhadap daya tahan sel terhadap pengaruh garam empedu. Diduga hal itu disebabkan karena kedua jenis bakteri tersebut termasuk kedalam kelompok bakteri asam laktat sehingga kedua bakteri tersebut mempunyai sifat-sifat yang hampir sama dan mampu bertahan dengan adanya pengaruh garam empedu.

Tabel 5. Perubahan Ketahanan sel dalam biokapsul dengan bahan sodium alginate 3,5% terhadap garam empedu selama penyimpanan (CFU/g)

Jenis Bakteri Probiotik	Lama Penyimpanan			Rerata
	0 minggu	2 minggu	4 minggu	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	$3,14 \times 10^6$	$6,68 \times 10^7$	$2,36 \times 10^6$	$24,1 \times 10^6$ tn
<i>Streptococcus thermophilus</i>	$3,73 \times 10^6$	$6,49 \times 10^7$	$1,28 \times 10^7$	$27,1 \times 10^6$ tn
Rerata	$3,44 \times 10^6$ tn	$65,85 \times 10^6$ tn	$7,58 \times 10^6$ tn	

Keterangan : tn (tidak berbeda nyata)

Jumlah sel bebas untuk *Lactobacillus bulgaricus* pada minggu ke-0 $2,35 \times 10^6$ CFU/ml dan pada minggu ke-4 $9,15 \times 10^4$ CFU/ml sedangkan *Streptococcus thermophilus* $5,93 \times 10^6$ CFU/ml dan pada minggu ke-4 $3,25 \times 10^4$ CFU/ml

Lama penyimpanan juga tidak berpengaruh terhadap daya tahan sel dalam kapsul terhadap garam empedu. Selama penyimpanan jumlah sel yang mampu bertahan terhadap pengaruh garam empedu relatif sama, sedangkan pada sel bebas selama satu bulan penyimpanan cenderung terjadi penurunan jumlah sel sebanyak satu log cycle. Diduga hal tersebut disebabkan karena kapsul dapat melindungi sel dari masuknya garam empedu, sehingga kontak dengan sel tidak cepat terjadi. Bila dibandingkan dengan jumlah sel awal pada kapsul tanpa adanya pengaruh garam empedu, dengan adanya garam empedu jumlah sel hanya turun sekitar 2 log cycle.

KESIMPULAN

Lama penyimpanan berpengaruh terhadap penurunan berat dan diameter biokapsul alginat. Makin lama penyimpanan viabilitas sel dalam biokapsul alginat cenderung turun, namun secara statistik tidak berbeda nyata. Penyimpanan selama 4 minggu, tidak berpengaruh pada ketahanan sel terhadap pH rendah dan garam empedu.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Yang telah membiayai penelitian ini melalui Proyek Penelitian Dosen Muda Tahun Anggaran 2006, serta saudara Bambang Jati Nugroho, Jumaryantro, syamsidah dan Septi Harningtyas yang telah membantu penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Adhikari K., Mustapha A., and Gruen I., 2002. Viability of encapsulated *Bifidobacteria* in set-type yoghurt. CDRF 78C-8
- Brashers, M.M. and Gilliland S.E., 1995. survival during frozen and subsequent refrigerated storage of *L. acidophilus* cells as influenced by their growth phase. J. Dairy Sci. 78: 2326-2335
- Champagne C.P., Gardner N.J, Soullignac L. and Innocent JP. 2000. the production of freeze-dried immobilized cultures of *Streptococcus thermophilus* and their acidification in milk. Journal of Applied microbiology, Vol 88 issue 1, page 124
- Desmon C., Ross RP., Callaghan E., Fitzgerald G., and Stanton, C. 2002. Improved survival of *lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray dried powders containing gum acacia. Journal of Applied

- Microbiology. Volume 93 Issue 6 page 1003
- Grooso H. and Favaro-Trindade, 2004. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized B. lactis in yoghurt. Braz.J.Microbiol.Vol 35 No. 1-2
- Harris, L., 2003. Evaluation of microentrapment as a means to enhance survival of *Bifidobacteria* in dairy Foods. CDRF All rights reserved, 97-Hal-01
- Havenaar, R. and. Huis In't Veld. J.H.J ., 1992. Probiotic: A general view, In: B.J.B. wood (Ed). The Lactic acid Bacteria. Elsevier Applied Science. London
- Hou, R., lin M., Wang M. and tzen J., 2003. Increase of viability of entrapped cells of *Lactobacillus delbruekii ssp. Bulgaricus* in Srtificial sesame oil emulsion. J. dairy Sci. 86:424-428
- Judi Rice. 2002. Probiotic and Prebiotic for healthful benefits. Food Product Design, Juli 2002
- Lee, K and Heo T. 2000. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. Applied and Environ.Microb. vol 66, No, 2
- Sanders, M., 2000. consideration for use of probiotic bacteria to modulate human health. Journal of Nutrition, 130: 384s-390s
- Sheu, T.Y., and Marshal. R.T., 1993. Microentrapment of Lactobacilli in calcium alginate gels. J. Food Sci. 54: 557-561
- Tien C., millete M., Mateescu M, and Lacroix M. 2004. Modified alginate and chitosan for lactic acid bacteri immobilization. Biotechnol.Appl.Biochem. 39, 347-354
- Widodo, Soeparno dan Endang wahyuni, 2003. Bioenkapsulasi probiotik (*Lactobacillus casei*) dengan pollard dan tepung terigu serta pengaruhnya terhadap viabilitas dan laju pengasaman. Jurnal Teknol. dan Industri Pangan, vol. XIV, No. 2