

PENAMBAHAN TEPUNG UMBI DAHLIA, KEDELAI DAN BAWANG PUTIH SEBAGAI SUMBER PREBIOTIK UNTUK ENKAPSULASI PROBIOTIK

[Addition of Flours from Dahlia Tuber, Soybean and Garlic
as Prebiotic Sources for Probiotic Encapsulation]

Ngatirah* dan Maria Ulfah

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Stiper, Yogyakarta

Diterima 15 Maret 2010 / Disetujui 04 Maret 2013

ABSTRACT

The research was conducted to study the effect of addition of flours made from dahlia tuber, soybean and garlic as the sources of natural prebiotic on the encapsulation of probiotic (*Lactobacillus acidophilus* Dad 13) with carragenan and chitosan. Carragenan and chitosan are potential encapsulating agents that can protect bacterial cells from unfavorable conditions. It is hypothesized that addition of natural prebiotics from dahlia tuber, soybean and garlic can stimulate the growth of probiotic (*L. acidophilus* Dad 13) in MRS broth medium. Parameters evaluated were size and weight of capsule, number of cells in the capsule, acid and bile salt resistance of the biocapsule produced from carragenan and chitosan added with flours of dahlia tuber, soybean and garlic as the sources of natural prebiotic. The randomized complete block design was used as the experimental design with two factors. The first factor was the encapsulating agents (A1 carragenan, A2 chitosan) and second factor was the sources of natural prebiotic (P1 dahlia tuber, P2 garlic, P3 soybean). The results showed that the type of encapsulating agent had an effect on weight, diameter and number of cells in the capsule but did not affect the acid and bile salt resistance. Addition of prebiotic flour to biocapsules had an effect on weight and diameter of capsules but no effect on acid and bile salt resistance and the number of cells. Addition of flour as prebiotic source from dahlia, garlic and soybean increased the cell number by 1 log cycle. Capsules made from chitosan with the addition of prebiotic source flour were lighter, had shorter diameter and lower cell reduction by acid (4.63-5.24 log cycle) than those made with carragenan (6.93-7.19 log cycle). Based on the acid resistance, the best biocapsules was made with chitosan and dahlia prebiotic flour.

Keywords: carragenan, chitosan, *Lactobacillus acidophilus* Dad 13, natural prebiotic flour, probiotic encapsulation

ABSTRAK

Penelitian ini mempelajari pengaruh penambahan tepung sumber prebiotik dari umbi dahlia, kedelai dan bawang putih dalam proses enkapsulasi probiotik (*Lactobacillus acidophilus* Dad 13) menggunakan karagenan dan kitosan. Karagenan dan kitosan sudah diketahui sebagai bahan pengkapsul potensial yang dapat melindungi sel bakteri dari kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan. Sebagai hipotesis, penambahan prebiotik alami dari umbi dahlia, kedelai, dan bawang putih dapat menstimulasi pertumbuhan bakteri probiotik (*Lactobacillus acidophilus* Dad 13) dalam media MRS broth. Evaluasi dilakukan terhadap ukuran dan berat biokapsul, jumlah sel dalam kapsul, ketahanan sel dalam kapsul terhadap asam dan garam empedu. Penelitian ini menggunakan rancangan blok lengkap (RBL) teracak dengan dua faktor. Faktor pertama adalah jenis bahan pengkapsul (A1 karagenan, A2 kitosan) dan faktor kedua adalah penambahan tepung sumber prebiotik alami (P1 umbi dahlia, P2 bawang putih, P3 kedelai). Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis bahan pengkapsul berpengaruh terhadap berat dan diameter biokapsul serta jumlah sel dalam kapsul, namun tidak berpengaruh pada ketahanan sel terhadap asam dan garam empedu. Penambahan tepung sumber prebiotik pada biokapsul berpengaruh terhadap berat dan diameter biokapsul namun tidak berpengaruh pada ketahanan sel terhadap asam dan garam empedu serta jumlah sel dalam kapsul. Penambahan tepung sumber prebiotik dari umbi dahlia, bawang putih, dan kedelai dapat meningkatkan jumlah sel sampai 1 siklus log. Karakteristik biokapsul kitosan dengan penambahan tepung sumber prebiotik mempunyai berat dan ukuran diameter yang lebih kecil dibanding karagenan, dan memiliki jumlah penurunan sel terhadap asam yang lebih rendah (4.63-5.24 siklus log) dibanding karagenan (6.93-7.19 siklus log). Berdasarkan ketahanan sel terhadap asam maka biokapsul terbaik diperoleh pada biokapsul yang dibuat dari kitosan dengan penambahan tepung prebiotik dari umbi dahlia.

Kata kunci: enkapsulasi probiotik, karagenan, kitosan, *Lactobacillus acidophilus* Dad 13, tepung sumber prebiotik alami

PENDAHULUAN

Probiotik merupakan suplemen mikroba hidup yang dapat memberikan efek menguntungkan bagi inang/tubuh dengan cara memperbaiki keseimbangan mikroflora usus (Patel dan Goyal, 2012). *Lactobacillus acidophilus* Dad 13 merupakan

salah satu bakteri asam laktat yang diisolasi dari dadih dan berpotensi sebagai bakteri probiotik penurun kolesterol. Bakteri tersebut mempunyai kemampuan dalam mengasimilasi kolesterol (3.77%) dan mendekongugasi garam empedu/*bile salt* (3.98%) secara *in vitro* serta tahan terhadap garam empedu dan pH rendah (Ngatirah *et al.* 2000). Bakteri tersebut juga pernah digunakan dalam suplementasi produk yoghurt (Lestari *et al.* 2003).

*Korespondensi Penulis:
E-mail: ngatirah@yahoo.com; Telp.: 081215722323

Persyaratan mikrobia untuk dikategorikan sebagai probiotik adalah mampu mencapai usus dalam keadaan hidup. Faktor-faktor lingkungan yang dapat menurunkan viabilitas sel antara lain: adanya pengaruh suhu ekstrim selama proses pengolahan dan penyimpanan, adanya pengaruh pH lambung yang sangat ekstrim yaitu sekitar pH 1.5 serta adanya pengaruh garam empedu (*bile salt*). Oleh karena itu, diperlukan suatu upaya untuk melindungi sel probiotik dari pengaruh faktor lingkungan yang sangat ekstrim. Salah satu cara yang dapat ditempuh adalah melindungi sel dengan semacam kapsul atau menggunakan teknik enkapsulasi (Petrovic *et al.* 2007; Akhlar, 2010; Islam *et al.* 2010; Burgain *et al.* 2011; Gbassi dan Vandamme, 2012). Dari berbagai penelitian, bahan-bahan yang dapat digunakan sebagai bahan enkapsulasi adalah karagenan (Tsen *et al.* 2004), *resistant starch* (Shafiei *et al.* 2012), alginat (Grosso dan Favaro-Trindade, 2004), kitosan (Le-Tien *et al.* 2004; Chavarri *et al.* 2010; Ivanovska *et al.* 2012), tepung terigu dan *pollard* (Widodo *et al.* 2003) serta *sesame oil* (Hou *et al.* 2003). Bahan-bahan tersebut mempunyai sifat-sifat yang berbeda satu sama lain, sehingga akan memberikan kekuatan gel yang berbeda-beda yang akan berpengaruh pada fleksibilitas biokapsul. Untuk meningkatkan fleksibilitas biokapsul, maka beberapa jenis bahan pengkapsul sering digunakan secara bersamaan seperti yang telah diteliti oleh Ouyang *et al.* (2004) menggunakan kombinasi bahan pengkapsul dari alginat dan pektin, maupun Chavarri *et al.* (2010) menggunakan kombinasi kitosan dan alginat.

Hasil penelitian Ngatirah dan Ulfah (2006), menunjukkan bahwa sel bakteri yoghurt (*L. bulgaricus* dan *S. thermophilus*) yang dienkapsulasi dengan alginat maupun kitosan mempunyai viabilitas maupun ketahanan terhadap pH lambung (pH 1.5) yang masih rendah. Oleh karena itu perlu dilakukan usaha untuk memperbaiki atau meningkatkan ketahanan dan viabilitas terhadap pH dan pengaruh ekstrim yang lain, antara lain dengan melakukan ko-enkapsulasi probiotik dengan menambahkan senyawa prebiotik. Menurut Roberfroid (2007), Prebiotik didefinisikan sebagai bahan pangan yang dapat difermentasi secara selektif untuk memberikan perubahan spesifik baik komposisi dan atau aktivitas mikroflora pada saluran pencernaan yang dapat memberikan manfaat bagi kesehatan inang. Beberapa senyawa yang termasuk prebiotik antara lain inulin, fruktooligosakarida (FOS), galaktooligosakarida (GOS), xilo-oligosakarida (XOS), isomaltoligosakarida (IMO), laktulosa dan *resistant starch* (Cho dan Finocchiaro, 2010; Patel dan Goyal, 2012). Penambahan prebiotik dapat menstimulasi pertumbuhan bakteri probiotik ketika sudah dikonsumsi (Anal dan Singh, 2007; Mortazavian *et al.* 2007). Prebiotik juga dapat memperbaiki viabilitas organisme probiotik pada yoghurt, penambahan prebiotik FOS (raftilose® P95) sebanyak 1.5% pada yoghurt dapat memperbaiki viabilitas probiotik sebanyak 1.42 log selama empat minggu penyimpanan pada suhu 4°C (Capela *et al.* 2006). Jumlah sel *Lactobacillus spp.* akan meningkat secara nyata dengan penambahan prebiotik Hi-maize™ 1% (And dan Kailasapathy, 2005). Menurut Vidhyalakshmi *et al.* (2009), penambahan prebiotik inulin pada yoghurt dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri asam laktat dan ketika digunakan dalam proses mikroenkapsulasi mampu meningkatkan ketahanan mikroba.

Ivanovska *et al.* (2012), mendapatkan bahwa metode mikroenkapsulasi sinbiotik dengan kombinasi alginat, FOS dan kitosan lebih efektif dalam melindungi sel *L. casei* dari pengaruh lingkungan yang ekstrim dan mampu menghasilkan viabilitas sel pada simulasi pH kolon sebesar 8.31 ± 0.14 log CFU/g.

Menurut Chen *et al.* (2005), penambahan prebiotik pada proses mikroenkapsulasi probiotik dapat meningkatkan viabilitas probiotik. Dalam proses enkapsulasi penambahan prebiotik bertujuan untuk memperbaiki porositas matriks biokapsul sehingga dapat meningkatkan kekukuhan gel. Inkorporasi prebiotik dalam kapsul alginat mampu memberikan sinergi dalam melindungi sel probiotik selama proses pengolahan pangan dan dalam saluran pencernaan. Penggunaan 1% sodium alginat yang dicampur dengan 1% peptida dan 3% FOS mampu menghasilkan ketahanan sel probiotik yang paling tinggi (Chen *et al.* 2005). And dan Kailasapathy (2005), juga menemukan bahwa penambahan pati Hi-Maize™ dengan konsentrasi 1% (b/v) pada proses enkapsulasi *L. acidophilus* CSCC 2400 atau CSCC 2409 menggunakan alginat, kitosan dan *poly-L-lysine*, mampu melindungi sel terhadap pengaruh pH 2.0 dan mampu meningkatkan jumlah sel secara nyata. Hal itu disebabkan oleh pati Hi-Maize™ yang mampu masuk ke dalam matriks kapsul dan menutupi pori-pori kapsul sehingga mencegah terjadinya difusi asam ke dalam kapsul. Menurut Mortazavian *et al.* (2007), pati HACS (*high-amylose corn starch*) dapat melapisi atau memperbaiki pembentukan dinding kapsul alginat.

Sebenarnya prebiotik secara alami terdapat pada beberapa jenis tanaman misalnya inulin pada umbi dahlia (Bernal *et al.* 2005; Glibowski dan Bukowska, 2011), FOS pada bawang merah, bawang putih dan asparagus (Gibson dan Rastall, 2006), rafinosa dan stakiosa pada kedelai oligosakarida pada ubi jalar (Moongngam *et al.* 2011) dan laktulosa pada susu. Jumlah dan jenisnya tergantung pada varietas tanaman. Hasil penelitian Moongngam *et al.* (2011) menunjukkan bahwa bawang putih mengandung inulin paling tinggi (41.72%) diikuti oleh bawang merah (33.22%) dan hanya sedikit inulin yang terdapat pada ubi jalar, lobak putih, singkong dan *yam bean* (berkisar antara 0.42-2.14%), sementara pada beras tidak ditemukan adanya inulin dan FOS.

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh penambahan tepung sumber prebiotik dari umbi dahlia, kedelai, dan bawang putih pada proses enkapsulasi *Lactobacillus acidophilus* Dad 13 menggunakan karagenan dan kitosan, mengetahui karakteristik biokapsul yang dihasilkan dan mengetahui viabilitas biokapsul yang dihasilkan terhadap pengaruh pH rendah dan garam empedu.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi tepung sumber prebiotik yang diperoleh dari umbi dahlia, kedelai, dan bawang putih, etanol, media MRS *broth* (Merck) dan MRS *agar* (Merck), kitosan, karagenan, kalsium klorida, garam fisiologis, asam asetat, *sodium tri poliphosphat* (STPP), KCl serta isolat *Lactobacillus acidophilus* Dad 13 yang merupakan koleksi FNCC PAU Pangan dan Gizi UGM.

Rancangan percobaan

Penelitian ini menggunakan rancangan blok lengkap dengan dua faktor, faktor pertama adalah jenis bahan pengkapsul (A1 kitosan, A2 karagenan), faktor kedua adalah penambahan tepung sumber prebiotik dari berbagai sumber (P1 umbi dahlia, P2 bawang putih, P3 kedelai) dengan 2 kali ulangan. Data hasil pengamatan diolah dengan analisis keragaman (ANAKA), dan bila hasilnya menunjukkan pengaruh nyata maka dilakukan uji jarak berganda Duncan.

Pembuatan biokapsul

Pembuatan biokapsul menggunakan karagenan dan kitosan dengan penambahan tepung sumber prebiotik mengacu pada metode Le-Tien *et al.* (2004) yang dimodifikasi. Seratus (100) μ l kultur cair bakteri *L. acidophilus* Dad 13 berumur 24 jam dalam media MRS broth, ditumbuhkan ke dalam 10 ml Media MRS broth steril kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Kultur cair kemudian disentrifugasi pada 3500 x g selama 15 menit untuk memperoleh *pellet*. Kemudian 10 g *pellet* dilarutkan ke dalam 100 ml akuades steril dan digojog sampai homogen (konsentrasi 10%). Selanjutnya disiapkan 100 ml larutan pengkapsul (A1 kitosan dan A2 karagenan) dengan konsentrasi 3.5% (untuk karagenan sebanyak 3.5 g dilarutkan dalam 100 ml akuades dan untuk kitosan sebanyak 3.5 g dilarutkan dalam 100 ml asam asetat 2%) dan kemudian ditambahkan tepung sumber prebiotik (P1 umbi dahlia, P2 bawang putih, P3 kedelai) dengan konsentrasi 1.5% b/v. Larutan kemudian dikocok hingga homogen dan disterilkan menggunakan otoklaf pada suhu 121°C selama 10 menit. Selanjutnya dicampurkan suspensi kultur dengan larutan pengkapsul dengan perbandingan 1:4 (sebanyak 10 ml suspensi kultur ditambahkan 40 ml larutan pengkapsul) dan dihomogenisasi kemudian dimasukkan ke dalam *syringe* bervolume 50 ml. Campuran tersebut selanjutnya diteteskan ke dalam larutan pengeras dengan konsentrasi tertentu yang steril (jika bahannya kitosan digunakan larutan STPP 4% dan jika bahannya karagenan digunakan larutan KCl 4%) sambil digojog dan dibiarkan kurang lebih 15 menit hingga terbentuk kapsul. Setelah kapsul terbentuk kemudian disimpan di dalam kulkas.

Analisis berat biokapsul

Sepuluh butir biokapsul diambil secara acak kemudian ditimbang satu persatu menggunakan timbangan/neraca (merk Sartorius TE214S), selanjutnya dihitung rata-ratanya (Le-Tien *et al.* 2004).

Analisis diameter biokapsul

Analisis diameter biokapsul dilakukan dengan mengacu pada metode Le-Tien *et al.* (2004). Biokapsul diambil sebanyak 10 buah secara acak kemudian diukur diameternya menggunakan jangka sorong. Diameter yang diperoleh dari ke sepuluh biokapsul selanjutnya dihitung rata-ratanya.

Analisis jumlah sel dalam biokapsul

Untuk perhitungan jumlah sel dalam biokapsul terlebih dahulu dilakukan pelarutan biokapsul dengan mengacu pada metode Le-Tien *et al.* (2004). Sebanyak 1 g biokapsul (sekitar 15 butir) dimasukkan dalam larutan *buffer phosphate* 0.1 M pH

7 steril (untuk biokapsul karagenan) atau larutan garam fisiologis steril (untuk biokapsul kitosan) dan selanjutnya digojog dengan vortek selama 30 menit sampai larut. Selanjutnya dibuat seri pengenceran untuk perhitungan jumlah sel dengan metode agar tuang menggunakan media MRS agar.

Analisis ketahanan sel terhadap pH rendah (pH 1.5)

Analisis ketahanan sel dalam kapsul terhadap pH rendah dilakukan dengan mengacu metode Le-Tien *et al.* (2004). Pertama-tama disiapkan larutan HCl steril dengan pH 1.5 dalam erlenmeyer untuk masing-masing sampel, kemudian dimasukkan 1 g biokapsul (sekitar 15 butir) dan dibiarkan/diinkubasi selama \pm 3 jam. Kemudian diambil biokapsulnya dan dicuci dalam aquades steril kemudian dilarutkan dalam 9 ml larutan pelarut biokapsul (larutan *buffer phosphate* 0.1 M pH 7 steril untuk biokapsul karagenan atau larutan garam fisiologis steril untuk biokapsul kitosan) dan selanjutnya dibuat seri pengenceran sampai 10^2 kemudian dihitung jumlah selnya menggunakan metode agar tuang menggunakan media MRS agar.

Analisis ketahanan sel dalam kapsul terhadap garam empedu

Analisis ketahanan sel dalam kapsul terhadap garam empedu mengacu pada metode Le-Tien *et al.* (2004) yaitu dimasukkan biokapsul sebanyak 1 g (sekitar 15 butir) ke dalam larutan *bile salt* steril sebanyak 25 ml dengan konsentrasi 1.2%, kemudian dibiarkan/diinkubasi selama \pm 3 jam. Setelah itu biokapsul diambil dan dicuci dengan aquades steril, lalu dilarutkan ke dalam 9 ml larutan pelarut biokapsul (larutan *buffer phosphate* 0.1 M pH 7 steril untuk biokapsul karagenan atau larutan garam fisiologis steril untuk biokapsul kitosan) dan selanjutnya dibuat seri pengenceran hingga pengenceran 10^6 dan dihitung jumlah selnya menggunakan metode agar tuang menggunakan media MRS agar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Diameter biokapsul

Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa ada perbedaan yang nyata antara diameter biokapsul yang berbahan karagenan dengan biokapsul kitosan, sedangkan penambahan tepung sumber prebiotik tidak menghasilkan perbedaan yang nyata terhadap diameter pada masing-masing biokapsul. Diameter biokapsul kitosan lebih kecil dibandingkan biokapsul karagenan, diduga disebabkan oleh adanya perbedaan sifat antara kitosan dan karagenan dalam membentuk gel/kapsul.

Menurut Honary *et al.* (2009), berat molekul mempengaruhi ukuran mikropartikel kitosan. Semakin tinggi berat molekul kitosan akan menghasilkan ukuran mikropartikel yang semakin kecil. Berat molekul akan berpengaruh terhadap sifat mekanik dari gel yang terbentuk, makin besar berat molekulnya akan menghasilkan ikatan yang lebih kuat sehingga ukuran partikelnya menjadi lebih kecil. Selain itu, kekuatan ionik dari polimer juga berpengaruh dalam pembentukan gel/kapsul. Menurut Islam *et al.* (2010), kekuatan ikatan dalam kapsul tergantung dari kation dan sifat polimer. Kitosan merupakan polikationik sehingga ketika bertemu dengan larutan yang mengandung

polianionik seperti STPP maka akan berikatan secara ionik dan membentuk gel yang kuat, akibatnya diameter kapsul yang terbentuk lebih kecil. Hal itu didukung oleh pendapat Aranaz *et al.* (2009), bahwa sifat-sifat kitosan berhubungan dengan adanya gugus-gugus amin, asetil dan hidroksil. Adanya gugus tersebut menyebabkan kitosan mempunyai reaktivitas kimia yang tinggi dan penyumbang sifat polielektrolit kation. Di lain pihak karagenan lebih bersifat hidrofilik, dengan adanya gugus hidroksil dan gugus sulfat di sepanjang rantai polimer sehingga molekul air akan mudah terjerap/terimobilisasi masuk ke dalam struktur gel, yang mengakibatkan diameter kapsul yang lebih besar. Chan *et al.* (2011), menyatakan bahwa semakin banyak air yang terperangkap di dalam gel akan menyebabkan penurunan kekuatan mekanik sehingga gel yang dihasilkan menjadi lebih lunak. Menurut William dan Harper (2010), karagenan lebih bersifat hidrofilik karena adanya gugus 2-sulfat. Adanya gugus sulfat di sepanjang rantai polimer karagenan menyebabkan rantai molekul menegang dan karena sifat hidrofiliknya, polimer tersebut dikelilingi oleh molekul air yang terimobilisasi dan larutan menjadi kental. Adanya penambahan tepung sumber prebiotik juga menyebabkan pembentukan gel pada karagenan menjadi lebih besar dan lunak. Diduga hal itu karena adanya penurunan kekuatan ionik dalam membentuk matriks gel. Menurut Janaswamy dan Chandrasekaran (2002) serta Kara *et al.* (2006), kombinasi karagenan dengan bahan lain misalnya *locust bean gum* dapat menyebabkan gel karagenan menjadi rapuh dan lunak.

Tabel 1. Diameter (mm) biokapsul *Lactobacillus acidophilus* Dad 13 dengan berbagai jenis bahan pengkapsul dan penambahan tepung sumber prebiotik

Tepung Sumber Prebiotik (P) dengan Konsentrasi 1.5% b/v	Diameter Biokapsul (mm) dengan Jenis Bahan Pengkapsul (A) dengan Konsentrasi 3.5% b/v	
	A1 (Kitosan)	A2 (Karagenan)
P1 (umbi dahlia)	2.98 ± 0.29 ^b	3.74 ± 0.33 ^a
P2 (bawang putih)	2.64 ± 0.28 ^c	3.79 ± 0.38 ^a
P3 (kedelai)	2.87 ± 0.27 ^b	3.76 ± 0.29 ^a

Keterangan: Rata-rata perlakuan yang diikuti dengan huruf yang berbeda pada kolom maupun baris menunjukkan adanya beda nyata pada uji jarak berganda Duncan pada tingkat kepercayaan 5%

Berat biokapsul

Berat biokapsul berbahan kitosan berbeda nyata dengan biokapsul berbahan karagenan (Table 2). Biokapsul dari kitosan mempunyai berat yang lebih rendah dibandingkan karagenan. Hal itu disebabkan oleh diameter biokapsul kitosan yang lebih kecil dibandingkan biokapsul karagenan, sehingga jika diasumsikan bobot jenisnya sama maka diameter yang lebih kecil akan menghasilkan berat biokapsul yang lebih kecil. Hal itu didukung dengan data rata-rata diameter (Tabel 1), yang menunjukkan bahwa pada biokapsul yang berbahan kitosan diameternya lebih kecil (rata-rata 2.73 mm) dibandingkan biokapsul yang berbahan karagenan (rata-rata 3.76 mm). Pada Tabel 2 juga terlihat bahwa penambahan tepung sumber prebiotik tidak menghasilkan perbedaan berat biokapsul. Hal itu diduga karena tepung prebiotik yang ada dalam tanaman umbi dahlia, bawang putih maupun kedelai sangat kecil sehingga tidak berpengaruh nyata terhadap penambahan berat biokapsul. Biokapsul dengan penambahan tepung sumber prebiotik dari

bawang putih mempunyai berat yang sedikit lebih rendah namun tidak berbeda nyata dengan data yang lain. Hal itu disebabkan oleh diameter biokapsul dengan penambahan tepung sumber prebiotik bawang putih lebih kecil, sehingga hal itu tidak berpengaruh pada berat biokapsul.

Tabel 2. Berat (mg/biokapsul) biokapsul *Lactobacillus acidophilus* Dad 13 dengan berbagai jenis bahan pengkapsul dan penambahan tepung sumber prebiotik

Tepung Sumber Prebiotik (P) dengan Konsentrasi 1.5% b/v	Berat (mg/biokapsul) Biokapsul dengan Jenis Bahan Pengkapsul (A) dengan Konsentrasi 3.5% b/v	
	A1 (Kitosan)	A2 (Karagenan)
P1 (umbi dahlia)	2.9 ± 0.57 ^b	5.6 ± 1.17 ^a
P2 (bawang putih)	2.6 ± 0.39 ^b	5.2 ± 0.65 ^a
P3 (kedelai)	2.7 ± 0.48 ^b	5.6 ± 0.69 ^a

Keterangan: Rata-rata perlakuan yang diikuti dengan huruf yang berbeda pada kolom maupun baris menunjukkan adanya beda nyata pada uji jarak berganda Duncan pada tingkat kepercayaan 5%

Jumlah sel

Hasil analisis jumlah sel pada biokapsul *Lactobacillus acidophilus* Dad 13 (CFU/g) dengan berbagai jenis bahan pengkapsul dan penambahan tepung sumber prebiotik dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Jumlah sel (CFU/g) dalam biokapsul *Lactobacillus acidophilus* Dad 13 dengan berbagai jenis bahan pengkapsul dan penambahan tepung sumber prebiotik

Tepung Sumber Prebiotik (P) dengan Konsentrasi 1.5% b/v	Jenis Bahan Pengkapsul (A) dengan Konsentrasi 3.5% b/v	
	A1 (Kitosan)	A2 (Karagenan)
P1 (umbi dahlia)	9.2 x 10 ^{6b}	1.4 x 10 ^{9a}
P2 (bawang putih)	6.0 x 10 ^{6b}	1.6 x 10 ^{9a}
P3 (kedelai)	1.7 x 10 ^{7b}	1.7 x 10 ^{9a}

Keterangan: Rata-rata perlakuan yang diikuti dengan huruf yang berbeda pada kolom maupun baris menunjukkan adanya beda nyata pada uji jarak berganda Duncan pada tingkat kepercayaan 5%

Penambahan tepung sumber prebiotik tidak berpengaruh nyata terhadap jumlah sel dalam biokapsul. Diduga senyawa prebiotik yang ada pada tepung sumber prebiotik (inulin pada umbi dahlia, FOS pada bawang putih, dan rafinosa atau stakiosa pada kedelai) tidak begitu banyak berperan dalam peningkatan jumlah sel karena diperkirakan jumlahnya dalam matriks kapsul hanya sedikit. Dari Tabel 3 juga diketahui bahwa jumlah sel dalam kelompok bahan pengkapsul karagenan secara nyata lebih tinggi dibanding biokapsul kitosan. Biokapsul dengan bahan karagenan mempunyai jumlah sel yang lebih tinggi 2 siklus log dibanding biokapsul kitosan (jumlah sel pada biokapsul kitosan rata-rata 1.1 x 10⁷ CFU/g sedangkan pada biokapsul karagenan rata-rata 1.6 x 10⁹ CFU/g). Diduga hal itu disebabkan struktur gel/kapsul karagenan yang terbentuk lebih lunak, sehingga larutan air yang di dalamnya mengandung biomassa sel lebih mudah terjerap masuk ke dalam gel dan mudah dilarutkan kembali. Sedangkan kitosan hanya dapat larut dengan baik pada larutan asam asetat encer, dan akibat adanya penambahan larutan kultur dalam air steril menyebabkan homogenitasnya berkurang sehingga berpengaruh pada jumlah sel yang dapat terjerap dalam kapsul. Menurut Aranaz *et al.* (2009), banyaknya muatan positif pada kitosan menyebab-

kan sel terikat lebih kuat pada matriks kapsul, sehingga ketika dilakukan pelarutan kembali jumlah sel yang terdeteksi lebih sedikit. Menurut Aranaz *et al.* (2009), kitosan tidak dapat larut dalam larutan netral dan basa tetapi hanya larut dalam larutan asam. Larutan asam yang dapat melarutkan kitosan yaitu asam formiat, asam asetat, asam laktat dan asam glutamat. Apabila dilarutkan dalam campuran asam dan air, kitosan akan mengalami protonasi dan akan terjadi muatan positif. Jika dalam larutan ditambahkan partikel yang membawa muatan negatif maka akan terjadi koagulasi/gel. Selain itu ada kemungkinan, tekstur biokapsul dengan bahan kitosan yang lebih keras, menyebabkan saat dilarutkan kembali dengan garam fisiologis steril tidak larut secara sempurna, sehingga jumlah sel yang terhitung lebih rendah.

Biokapsul yang berbahan baku karagenan mempunyai berat dan diameter yang lebih besar sehingga menyebabkan jumlah sel yang terjepit dalam kapsul lebih banyak dibandingkan biokapsul yang berbahan baku kitosan, seperti terlihat pada Tabel 3. Jumlah sel pada biokapsul kitosan 1.1×10^7 CFU/g sedangkan pada biokapsul karagenan 1.6×10^9 CFU/g. Menurut Mortazavian *et al.* (2007), biokapsul yang mempunyai berat dan diameter lebih besar akan mampu menjerap sel mikroba lebih banyak, namun juga dapat menyebabkan struktur biokapsul menjadi lembek. Selain itu, diameter biokapsul yang lebih besar kurang baik apabila diaplikasikan ke produk tertentu seperti yoghurt karena ketika di mulut akan terasa seperti berpasir (*sandy*).

Viabilitas/ketahanan sel pada pH rendah (pH 1.5)

Viabilitas sel pada biokapsul *Lactobacillus acidophilus* Dad 13 (CFU/g) dengan berbagai jenis bahan pengkapsul dan penambahan prebiotik dari berbagai sumber setelah perlakuan pH rendah dapat dilihat pada Tabel 4. Berdasarkan Tabel 4 diketahui bahwa penurunan jumlah sel karena pH rendah pada biokapsul karagenan lebih tinggi dibanding kitosan.

Sel dalam biokapsul kitosan dengan penambahan tepung sumber prebiotik mengalami penurunan viabilitas sekitar 4-5 log CFU/g. Sedangkan sel dalam biokapsul karagenan mengalami penurunan viabilitas yang lebih tinggi yaitu sekitar 6-7 log CFU/g. Jumlah penurunan ketahanan terhadap pH rendah yang terjadi pada sel dalam biokapsul karagenan, hampir sama

dengan penurunan ketahanan pada sel bebas yaitu sekitar 7 log CFU/g (jumlah sel bebas yang tidak dilindungi) sebelum perlakuan pH rendah adalah 5.4×10^8 CFU/g dan setelah perlakuan pH rendah menurun menjadi 5.8×10^1 CFU/g. Diduga hal tersebut disebabkan oleh struktur kapsul yang terbentuk pada karagenan lebih lunak dibanding kitosan, sehingga asam akan lebih mudah masuk ke dalam struktur kapsul dan menyebabkan kematian sel. Menurut Muthukumarasamy *et al.* (2006), viabilitas sel karena pH rendah dipengaruhi oleh jenis polimer dan tipe struktur jaringan kapsul yang terbentuk sedangkan ukuran kapsul tidak begitu berpengaruh dalam melindungi sel terhadap asam.

Dari Tabel 4 juga diketahui bahwa penambahan tepung sumber prebiotik dari umbi dahlia pada biokapsul kitosan maupun karagenan menghasilkan penurunan jumlah sel paling kecil (4.63 log CFU/g pada kitosan dan 6.93 log CFU/g pada karagenan). Diduga hal itu terjadi karena pada umbi dahlia terdapat senyawa prebiotik inulin yang lebih tinggi (13%) dibanding sumber prebiotik yang lain dan dapat masuk ke dalam matriks kapsul serta menutupi pori-pori kapsul sehingga dapat menahan laju difusi asam.

Viabilitas/ketahanan sel terhadap garam empedu

Hasil analisis viabilitas sel dalam biokapsul *Lactobacillus acidophilus* Dad 13 dengan berbagai jenis bahan pengkapsul dan penambahan tepung sumber prebiotik dari berbagai tanaman terhadap garam empedu dapat dilihat pada Tabel 5. Berdasarkan Tabel 5 dapat dilihat bahwa penambahan tepung sumber prebiotik dari kedelai pada biokapsul karagenan menghasilkan penurunan jumlah sel yang paling kecil (0.23 log CFU/g). Diduga hal itu disebabkan karena tepung sumber prebiotik dari kedelai lebih banyak mengandung pati dibanding dengan tepung sumber prebiotik yang lain. Menurut And dan Kailasapathy (2005), molekul pati mampu masuk ke dalam matriks kapsul dan menutupi pori-pori kapsul sehingga menghambat terjadinya difusi asam maupun garam empedu ke dalam kapsul. Hal itu juga didukung oleh Muthukumarasamy *et al.* (2006) yang mendapatkan bahwa penambahan pati pada alginat dalam proses enkapsulasi dapat melindungi sel *Lactobacillus reuteri* lebih baik dibanding *xanthan-gellan* maupun karagenan-locust bean gum.

Tabel 4. Viabilitas sel (CFU/g) dalam biokapsul *Lactobacillus acidophilus* Dad 13 dengan berbagai jenis bahan pengkapsul dan penambahan tepung sumber prebiotik setelah perlakuan pada pH rendah

Tepung Sumber Prebiotik (P) dengan Konsentrasi 1.5% b/v	Viabilitas Sel (CFU/g) dalam Biokapsul dengan Jenis Bahan Pengkapsul (A) dengan Konsentrasi 3.5% b/v					
	A1 (Kitosan)			A2 (Karagenan)		
	Jumlah Sel Awal (CFU/g)	Viabilitas pada pH Rendah (CFU/g)	Penurunan Jumlah Sel karena pH Rendah (log CFU/g)	Jumlah Sel Awal (CFU/g)	Viabilitas pada pH Rendah (CFU/g)	Penurunan Jumlah Sel karena pH Rendah (log CFU/g)
P1 (umbi dahlia)	9.2×10^6	2.2×10^{2a}	4.63 ^a	1.4×10^9	1.7×10^{2a}	6.93 ^d
P2 (bawang putih)	6.0×10^6	1.3×10^{2a}	4.67 ^a	1.6×10^9	7.8×10^{1a}	7.31 ^e
P3 (kedelai)	1.7×10^7	6.8×10^{1a}	5.24 ^b	1.7×10^9	1.1×10^{2a}	7.19 ^e
Tanpa penambahan tepung sumber prebiotik	4.0×10^7	8.2×10^{1a}	5.69 ^c	2.1×10^7	4.8×10^{2a}	4.65 ^a

Keterangan: Rata-rata perlakuan yang diikuti dengan huruf yang berbeda pada kolom maupun baris menunjukkan adanya beda nyata pada uji jarak berganda Duncan pada tingkat kepercayaan 5%. Jumlah sel yang tidak dilindungi (sel bebas) sebelum perlakuan pH rendah adalah 5.4×10^8 CFU/g sedangkan setelah perlakuan pH rendah jumlahnya menjadi 5.8×10^1 CFU/g

Biokapsul terbaik

Dilihat dari penurunan jumlah sel karena pH rendah (Tabel 4), dapat diketahui bahwa biokapsul kitosan dengan penambahan tepung sumber prebiotik dari umbi dahlia mengalami penurunan jumlah sel yang paling sedikit (4.63 log CFU/g) dan tidak berbeda nyata dengan penambahan tepung sumber prebiotik dari bawang putih (4.67 log CFU/g). Penambahan tepung sumber prebiotik pada karagenan menyebabkan menurunnya ketahanan sel terhadap pH rendah (penurunan jumlah sel sekitar 6-7 log CFU/g) dibanding tanpa penambahan tepung sumber prebiotik (penurunan jumlah sel 4.65 log CFU/g). Diduga hal ini disebabkan karena penambahan tepung sumber prebiotik pada biokapsul karagenan dapat merubah struktur matriks biokapsul menjadi lebih lunak sehingga tidak dapat menahan difusi asam. Berdasarkan Tabel 5 juga terlihat bahwa penurunan jumlah sel terhadap garam empedu pada biokapsul kitosan maupun karagenan dengan penambahan tepung sumber prebiotik lebih rendah (rata-rata kurang dari 1 siklus log).

Dilihat dari viabilitas sel terhadap garam empedu, biokapsul karagenan yang dibuat dengan penambahan tepung sumber prebiotik dari kedelai mempunyai ketahanan sel terhadap garam empedu yang paling tinggi (penurunan jumlah sel terhadap garam empedu paling kecil yaitu 0.23 log CFU/g). Diduga, hal tersebut disebabkan karena adanya peranan dari tepung sumber prebiotik kedelai yang di dalamnya mengandung pati yang lebih tinggi. Menurut And dan Kailasapathy (2005), molekul pati mampu masuk ke dalam matriks kapsul dan menutupi pori-pori kapsul sehingga menghambat terjadinya difusi asam maupun garam empedu ke dalam kapsul. Menurut Mortazavian *et al.* (2007), pati juga dapat melapisi atau memperbaiki pembentukan dinding kapsul.

Diduga senyawa prebiotik yang ada pada tepung sumber prebiotik (inulin pada umbi dahlia, FOS pada bawang putih dan rafinosa atau stakhiosa pada kedelai) tidak begitu banyak berperan dalam penelitian ini diperkirakan karena jumlahnya dalam matriks kapsul hanya sedikit. Menurut Gibson dan Rastall (2006), bawang putih mengandung FOS sekitar 16% (16 g/100 g bahan), umbi dahlia mengandung inulin 13% (13 g/100 g bahan) dan kedelai mengandung rafinosa dan stakhiosa sekitar 5% (5 g/100 g bahan). Berdasarkan hal tersebut, diperkirakan

bahwa dalam 1.5% (1.5 g/100 ml larutan pengkapsul) tepung sumber prebiotik yang ditambahkan, untuk 100 ml larutan pengkapsul hanya terdapat 0.24 g FOS dari tepung sumber prebiotik bawang putih, 0.195 g inulin dari tepung sumber prebiotik umbi dahlia, dan 0.075 g rafinosa/stakhiosa dari tepung sumber prebiotik kedelai. Apabila jumlah senyawa prebiotik yang ditambahkan mencukupi (1-3% b/v), penambahan prebiotik dalam proses enkapsulasi dapat berperan memperbaiki porositas matriks biokapsul sehingga dapat memperkuat kekakuan gel (Anal dan Singh, 2007; Mortazavian *et al.* 2007).

Penambahan tepung sumber prebiotik dari bahan bawang putih menyebabkan timbulnya bau yang sangat tajam pada biokapsul yang dihasilkan sehingga apabila diaplikasikan ke produk minuman akan menimbulkan flavor yang kurang sedap.

KESIMPULAN

Jenis bahan pengkapsul berpengaruh terhadap berat, diameter, jumlah sel, dan ketahanan terhadap garam empedu, namun tidak berpengaruh pada ketahanan terhadap pH rendah. Penambahan tepung sumber prebiotik pada biokapsul berpengaruh terhadap berat dan diameter biokapsul, namun tidak berpengaruh pada jumlah sel dalam kapsul serta ketahanan terhadap pH rendah dan garam empedu. Penambahan tepung sumber prebiotik dari umbi dahlia, kedelai, dan bawang putih pada biokapsul kitosan maupun karagenan mampu meningkatkan jumlah sel dalam kapsul sebanyak satu log. Karakteristik biokapsul kitosan yang dibuat dengan penambahan tepung sumber prebiotik mempunyai berat dan diameter yang lebih kecil serta penurunan jumlah sel terhadap pH rendah lebih sedikit (antara 4.63-5.24 log CFU/g) dibanding karagenan (antara 6.93-7.19 log CFU/g). Penurunan jumlah sel biokapsul kitosan dan karagenan terhadap garam empedu keduanya kurang dari 1.5 log CFU/g. Berdasarkan penurunan jumlah sel terhadap pH rendah, biokapsul dengan penurunan jumlah sel paling sedikit dihasilkan oleh pada biokapsul kitosan dengan penambahan tepung sumber prebiotik dari umbi dahlia.

Tabel 5. Viabilitas sel (CFU/g) dalam biokapsul *Lactobacillus* Dad 13 dengan berbagai jenis bahan pengkapsul dan penambahan tepung sumber prebiotik dari berbagai tanaman setelah perlakuan pada garam empedu

Tepung Sumber Prebiotik (P) dengan Konsentrasi 1.5% b/v	Jenis Bahan Pengkapsul (A) dengan Konsentrasi 3.5% b/v					
	A1 (Kitosan)			A2 (Karagenan)		
	Jumlah Sel Awal (CFU/g)	Viabilitas pada Garam Empedu (CFU/g)	Penurunan Jumlah Sel karena Garam Empedu (log CFU/g)	Jumlah Sel Awal (CFU/g)	Viabilitas pada Garam Empedu (CFU/g)	Penurunan Jumlah Sel karena Garam Empedu (log CFU/g)
P1 (umbi dahlia)	9.2 x 10 ⁶	7.4 x 10 ^{5b}	1.09 ^a	1.4 x 10 ⁹	9.4 x 10 ^{7a}	1.18 ^b
P2 (bawang putih)	6.0 x 10 ⁶	1.7 x 10 ^{6b}	0.54 ^a	1.6 x 10 ⁹	8.5 x 10 ^{7a}	1.27 ^b
P3 (kedelai)	1.7 x 10 ⁷	1.8 x 10 ^{6b}	0.81 ^a	1.7 x 10 ⁹	9.9 x 10 ^{8a}	0.23 ^a
Tanpa penambahan tepung sumber prebiotik	4.0 x 10 ⁷	3.8 x 10 ^{5b}	2.02 ^b	2.1 x 10 ⁷	1.5 x 10 ^{6a}	1.15 ^b

Keterangan: Rata-rata perlakuan yang diikuti dengan huruf yang berbeda pada kolom maupun baris menunjukkan adanya beda nyata pada uji jarak berganda Duncan pada tingkat kepercayaan 5%. Jumlah sel yang tidak dilindungi (sel bebas) sebelum perlakuan garam empedu adalah 5.4 x 10⁸ CFU/g sedangkan setelah perlakuan garam empedu jumlah selnya menjadi 1.7 x 10⁷ CFU/g

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada: Direktorat Jenderal Dikti yang telah membiayai penelitian ini melalui proyek Hibah Bersaing dengan nomor kontrak: 166/SP2H/PP/DP2M/III/2008 tanggal 6 Maret 2008, Prof.Dr. Endang Sutriswati Rahayu dan Prof.Dr. Ani Harmayani yang telah mengizinkan penulis untuk menggunakan isolat *Lactobacillus acidophilus* Dad 13 yang merupakan kultur koleksi dari FNCC PAU Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada, dan Sdr. Predikus Dino T. yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhiar NSAM. 2010. Enhancement of probiotics survival by microencapsulation with alginate and prebiotics. *Basic Biotechnol* 6: 13-18.
- Anal AK, Singh H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Sci Tech* 18: 240-251. DOI: [10.1016/j.tifs.2007.01.004](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.004).
- And CI, Kailasapathy K. 2005. Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under *in vitro* acidic and bile salt conditions and in yoghurt. *J Food Sci* 70: M18-M23. DOI: [10.1111/j.1365-2621.2005.tb09041.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09041.x).
- Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Panos I, Miralles B, Acosta N, Galed G, Heras A. 2009. Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chem Biol* 3: 203–230. DOI: [10.2174/187231309788166415](https://doi.org/10.2174/187231309788166415).
- Bernal BH, Calle J, Duarte ED, Pinzon R, Velasques M. 2005. Inulin from tuber of *Dahlia imperialis* roetz. *Rev Col Cipuc Quim Farm* 34: 122-125.
- Burgain J, Gaiani C, Linder M, Scher J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. *J Food Eng* 104: 467-483. DOI: [10.1016/j.foodeng.2010.12.031](https://doi.org/10.1016/j.foodeng.2010.12.031).
- Capela P, Hay TKC, Shah NP. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organism in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Res Int* 39: 203-211. DOI: [10.1016/j.foodres.2005.07.007](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.07.007).
- Chan SW, Mirhosseini SH, Farah ST, Tan CP. 2011. Comparative study on physical properties of K-carrageenan extracted from *Eucheuma cottonii* in Tawau, Sabah and commercial k-carrageenan. *LSP* 18: 310-317.
- Chavarri M, Maranon I, Ares R, Ibanez FC, Marzo F, Villaran M del C. 2010. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in stimulated gastro-intestinal conditions. *Int J Food Microbiol* 142: 185-189. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.022](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.022).
- Chen KN, Chen MJ, Liu JR, Lin CW, Chiu HY. 2005. Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. *J Food Sci* 70: M260-M266. DOI: [10.1111/j.1365-2621.2005.tb09981.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09981.x).
- Cho SS, Finocchiaro ET. 2010. Handbook of Prebiotics and Probiotics Ingredients. Health Benefit and Food Application. 13-139. CRC Press, New York.
- Gbassi GK, Vandamme T. 2012. Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics* 4: 149-163. DOI: [10.3390/Pharmaceutics4010149](https://doi.org/10.3390/Pharmaceutics4010149).
- Gibson GR, Rastall RA. 2006. Prebiotic: Development and Applications. 1-28. John-Wiley & Son, New York.
- Glibowski P, Bukowska A. 2011. The effect of pH, temperature, and heating time on inulin chemical stability. *Acta Sci Pol Technol Aliment* 10: 189-196
- Grosso CRF, Favaro-Trindade CS. 2004. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt. *Braz J Microbiol* 35: 1-11. DOI: [10.1590/S1517-83822004000100025](https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000100025).
- Honary S, Maleki M, Karami M. 2009. The effect of chitosan molecular weight on the properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone. *Trop J Pham Res* 8: 53-61.
- Hou RC, Lin MY, Wang MM, Tzen JT. 2003. Increase of viability of entrapped cells of *Lactobacillus delbruekii* ssp. *Bulgaricus* in artificial sesame oil emulsion. *J Dairy Sci* 86: 424-428.
- Islam MA, Yun CH, Choi YJ, Cho CS. 2010. Microencapsulation of live probiotic bacteria. *J Microbiol Biotech* 20: 1367-1377. DOI: [10.4014/jmb.1003.03020](https://doi.org/10.4014/jmb.1003.03020).
- Ivanovska TP, Petrusevska-Toji L, Kostoska MKD, Geskovski N, Grozdanov A, Stain C, Stafilov T, Mladenovska K. 2012. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* in chitosan-Ca-alginat microparticles using spray drying method. *Maced J Chem Chem Eng* 31: 115–123.
- Janaswamy S, Chandrasekaran R. 2002. Effect of calcium ions on the organization of iota-carrageenan helices: an X-ray investigation. *Carbohydr Res* 337: 523–535. DOI: [10.1016/S0008-6215\(02\)00017-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00017-4).
- Kara S, Arda E, Kavzak B, Pekcan Ö. 2006. Phase transitions of K-carrageenan gels in various types of salts. *J Appl Polym Sci* 102: 3008–3016. DOI: [10.1002/app.24662](https://doi.org/10.1002/app.24662).
- Lestari LA, Harmayani E, Marsono Y. 2003. Supplementation of indigenous probiotic bacteria into yoghurt. *Indonesian Food and Nutrition Progress* 10: 34-39.
- Le-Tien C, Millette M, Mateescu MA, Lacroix M. 2004. Modified alginate and chitosan for lactic acid bacteria immobilization. *Biotechnol Appl Biochem* 39: 347-354.
- Moongngam A, Trachoo N, Sirigungwan N. 2011. Low molecular weight carbohydrates, prebiotic content and prebiotic activity of selected food plants in Thailand. *Adv J Food Sci Technol* 3: 269-274.
- Mortazavian A, Razavi SH, Ehsani MR, Sohrabvandi S. 2007. Principle and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian J of Biotechnol* 5: 1-18.
- Muthukumarasamy P, Allan-Wojtas P, Holley RA. 2006. Stability of *Lactobacillus reuteri* in different type of microcapsules. *J Food Sci* 71: M20-M24. DOI: [10.1111/j.1365-2621.2006.tb12395.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb12395.x).

- Ngatirah, Harmayani E, Rahayu ES, Utami T. 2000. Bakteri Asam Laktat sebagai Agensia Probiotik yang Berpotensi menurunkan Kolesterol. Proseding Seminar Nasional PATPI di Surabaya 10-11 Oktober 2000.
- Ngatirah, Ulfah M. 2006. Enkapsulasi Probiotik Menggunakan Alginat dan Khitosan untuk Meningkatkan Viabilitasnya [Laporan Dosen Muda]. Yogyakarta: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Stiper Yogyakarta.
- Ouyang W, Chen H, Jones ML, Metz T, Haque T, Martoni C, Prakash S. 2004. Artificial cell microcapsule for oral delivery a live bacterial cells for therapy: design, preparation and *in vitro* characterization. J Pharm Pharmaceut Sci 7: 315–324.
- Patel S, Goyal A. 2012. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. Biotech 2: 115-125. DOI: [10.1007/s13205-012-0044-x](https://doi.org/10.1007/s13205-012-0044-x).
- Petrovic T, Nedovic V, Brankovic SD, Bugarski B, Lacroix C. 2007. Protection of probiotic microorganism by micro-encapsulation. CI & CEQ 13: 169-174.
- Roberfroid M. 2007. Prebiotics: the concept revisited. J Nutr 137: 830S-837S.
- Shah NP. 2004. Probiotics and Prebiotics. Agrofood Industry Hi-tech. January/February
- Shafiei Y, Razavilar V, Javadi A, Mirzaei H. 2012. Survivability of free and microencapsulated *Lactobacillus plantarum* with alginat and resistant starch in simulated gastrointestinal conditions. J Food Agric Environ 10: 207-212.
- Tsen JH, Lin YP, King VAE. 2004. Fermentation of banana media by using K-carragenan immobilized *Lactobacillus acidophilus*. Int J Food Microbiol 91: 215–220. DOI: [10.1016/S0168-1605\(03\)00376-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00376-3).
- Vidhyalakshmi R, Bhakayaraj R, Subhasree RS. 2009. Encapsulation: the future of probiotics-a review. Advan Biol Res 3: 96-103.
- Widodo, Soeparno, Wahyuni E. 2003. Bioenkapsulasi probiotik (*Lactobacillus casei*) dengan *pollard* dan tepung terigu serta pengaruhnya terhadap viabilitas dan laju pengasaman. J Teknol dan Industri Pangan 14: 98-106.
- William RB, Harper AR. 2010. Carragenan. In Imerson A. (ed). Food Stabilizer, Thickener and Gelling Agent. 73-88. Wiley-Blackwell Publishing Ltd, Oxford England.