

## DAFTAR PUSTAKA

1. Yuniastuti Ari. PROBIOTIK (Dalam Perspektif Kesehatan). Vol. 53, Journal of Chemical Information and Modeling. 2019. 1689–1699 p.
2. Pato 2003. Potensi bakteri Asam Laktat yang diisolasi dari Dadih untuk Menurunkan Resiko Penyakit kanker J Natur Indones. 2004;24(1):1–8.
3. Goldin BR. Health benefits of probiotics. Br J Nutr. 1998;80(SUPPL. 2).
4. Mandal S, Puniya AK, Singh K. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus sp* NCDC-298. Int Dairy J. 2006;16(10):1190–5.
5. Setijawati D, Firdaus M, Kartikaningsih K. The Effect of *Lactobacillus Acidophilus* Microcapsule Which Encapsulated by Kappa Caragenan Toward in Vivo Functional Test. Res J Life Sci. 2014;1(1):27–36.
6. Hernández-Carranza P, López-Malo A, Jiménez-Munguía M-T. Microencapsulation Quality and Efficiency of *Lactobacillus sp* by Spray Drying Using Maltodextrin and Vegetable Extracts. J Food Res. 2013;3(1):61.
7. Cook MT, Tzortzis G, Khutoryanskiy V V., Charalampopoulos D. 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. 2013;1(1):52–60.
8. Sugita P, Sjahriza A, Lestari S. Sintesis dan Optimalisasi Gel Kitosan-Gom Guar. 2015;9(1):22–6.
9. Mekawati. 9 kitin cover.pdf. Apl Kitosan Has Transform Kitin dari Limbah Udang (*Panaeus merguensis*) untuk adsorpsi ion logam timbal. 2000;
10. Ayuningtyas I wildana. Ketahanan bakteri probiotik. 2015;
11. Pradikaningrum H. Uji Viabilitas Mikroenkapsulasi *Lactobacillus sp* menggunakan Matrik Kitosan. 2015;1–73.
12. Bella1 SS, Manoppo2 H, Undap2 SL, Tumbol2 RA, L.A. E, Ngangi2. Seleksi probiotik *Lactobacillus sp*. dari usus ikan mas (*Cyprinus carpio*) potensial untuk akuakultur. Budid Perair. 2020;3(1):30–52.
13. Simadibrata M. Probiotik-Peranannya Dalam Dunia Medis. Div Gastroenterol Dep Ilmu Penyakit Dalam Fak Kedokt Univ Indones RS Cipto Mangunkusumo Indones. 2011;
14. Bielecka M. Probiotics in food. Chem Funct Prop Food Components, Third Ed. 2006;413–26.
15. Khalisanni Khalid. An overview of lactic acid bacteria. Int J Biosci. 2011;1(3):1–13.
16. Putri YW, Putra AE, Utama BI. Identifikasi Dan Karakteristik Bakteri Asam Laktat Yang Diisolasi Dari Vagina Wanita Usia Subur. J Kesehat Andalas. 2018;7(Supplement 3):20.
17. Rokka S, Rantamäki P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: Challenges for industrial applications. Eur Food Res Technol. 2010;231(1):1–12.

18. Desai A. Strain identification and probiotics properties of *Lactobacillus sp.* Thesis PhD. 2008;1–228.
19. Gina Kholisoh. UJI VIABILITAS ENKAPSULASI *Lactobacillus sp* MENGGUNAKAN MATRIKS KAPPA KARAGENAN Terhadap Simulasi Cairan Asam Lambung. Skripsi. 2016;
20. Hammes WP, Vogel RF. The genus *Lactobacillus*. Genera Lact Acid Bact. 1995;19–54.
21. FengChen. <https://id.fengchengroup.org/enzymes-and-bio-products/probiotics/Lactobacillus-sp-1-sp.html>.
22. Risch SJ. Encapsulation: Overview of Uses and Techniques. 1995;(7):2–7.
23. Gbassi GK, Vandamme T. Probiotic encapsulation technology: From microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*. 2012;4(1):149–63.
24. Marzuki I. PELEPASAN TERKENDALI KALIUM KLORIDA DALAM MIKROSFER KITOSAN DENGAN METODE TAUTAN SILANG. *Fmipa Ui*. 2012;1–95.
25. Nurhasni H. Studi Formulasi dan Karakterisasi Sediaan Gel Bioadhesi Vagina dari Mikrokapsul Ekstrak Etanol Propolis Trigona sp. Penerapan Embellishment Sebagai Unsur Dekor Pada Busana Modestwear. 2015;d(2017):1–15.
26. Poshadri A, Kuna A. Microencapsulation Technology: a Review. 2018;(February).
27. Sarmiento B, Ribeiro A, Veiga F, Sampaio P, Neufeld R, Ferreira D. Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. *Pharm Res*. 2007;24(12):2198–206.
28. Etchepare M de A, Barin JS, Cichoski AJ, Jacob-Lopes E, Wagner R, Fries LLM, et al. Microencapsulação de probióticos utilizando alginato de sódio. *Cienc Rural*. 2015;45(7):1319–26.
29. Pratiwi R. Manfaat kitin dan Kitosan bagi kehidupan manusia. *Oseana*. 2014;XXXIX(0216–1877):35–43.
30. Raymond C R, Paul J S, Marian E Q. Handbook of Pharmaceutical Excipients. London: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association. *Rev des Nouv Technol l'Information*. 2015;E.28:257–62.
31. Zhang Y, Zhang M. Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering. *J Biomed Mater Res*. 2001;55(3):304–12.
32. Younes I, Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs*. 2015;13(3):1133–74.
33. Liaqat F, Eltem R. Chitoooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive review. *Carbohydr Polym [Internet]*. 2018;184(June 2017):243–59. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.067>
34. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *Int Dairy J*. 2003;13(1):3–13.
35. Solanki HK, Pawar DD, Shah DA, Prajapati VD, Jani GK, Mulla AM, et al. Development of microencapsulation delivery system for long-term

- preservation of probiotics as biotherapeutics agent. *Biomed Res Int*. 2013;2013.
36. Hasanah, Sulvi M. Optimasi pembuatan mikrosfer polipaduan poliasamlaktat dengan polikaprolakton. 2009.
  37. Goldstein JI, Newbury DE, Michael JR, Ritchie NWM, Scott JHJ, Joy DC. Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. 2017. 1–550 p.
  38. Reed SJB. Electron Microprobe Analysis and Scanning Electron Microscopy in Geology. *Geol Mag*. 2007;144(4):750.
  39. wordpress. teori-dasar scanning-electron-microscopy [Internet]. Available from: <https://material.wordpress.com/teori-dasar/scanning-electron-microscopy>
  40. Mulder M. Basic principles of membrane technology. 1991;
  41. Silviyah S, Widodo SC, Masruroh. Penggunaan Metode FT-IR (Fourier Transform Infra Red) untuk Mengidentifikasi Gugus Fungsi pada Proses Pembaluran Penderita Miomia. *Jur Fis FMIPA Univ Brawijaya*. 2014;2(1):1–28.
  42. Petit T, Puskar L. FTIR spectroscopy of nanodiamonds: Methods and interpretation. *Diam Relat Mater*. 2018;89(August):52–66.
  43. Sjahfirdi L, Aldi N, Maheshwari H, Astuti P. APLIKASI FOURIER TRANSFORM INFRARED (FTIR) DAN PENGAMATAN PEMBENGKAKAN GENITAL PADA SPESIES PRIMATA, LUTUNG JAWA (*Trachypithecus auratus*) UNTUK MENDETEKSI MASA SUBUR. *J Kedokt Hewan - Indones J Vet Sci*. 2015;9(2).
  44. Maylani AI, Nurfauziah A, Nida A, Ariesta AH. Isolasi Kafein ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KAFEIN DARI KOPI DENGAN INSTRUMEN SPEKTROFOTOMETER UV-Vis DAN FTIR. *Farmasi*. 2005;1–6.
  45. Bridson EY. *The Oxoid Manual 9th Edition*. 2006;377–8.
  46. Li XY, Chen XG, Sun ZW, Park HJ, Cha DS. Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus sp* ATCC 393. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2011;83(4):1479–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.053>
  47. Woraharn S, Chaiyasut C, Sirithunyalug B. Survival enhancement of probiotic *Lactobacillus plantarum* CMU-FP002 by granulation and encapsulation techniques. *African J Microbiol Res*. 2010;4(20):2086–93.
  48. Chen X-G, Zheng L, Wang Z, Lee C-Y, Park H-J. Weight Chitosan Membranes. *J Agric Food Chem*. 2002;50:5915–8.
  49. Benderska N, Chakilam S, Hugle M, Ivanovska J, Gandesiri M, Schulze-Luhrmann J, et al. Apoptosis Signalling Activated by TNF in the Lower Gastrointestinal Tract-Review. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(11):2248–58.
  50. Sandoval-Castilla O, Lobato-Calleros C, García-Galindo HS, Alvarez-Ramírez J, Vernon-Carter EJ. Textural properties of alginate-pectin beads and survivability of entrapped *Lb. sp* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Res Int* [Internet]. 2010;43(1):111–7. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.010>
51. Lee KY, Heo TR. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(2):869–73.
  52. Ardianingsih R, Kumoro AC. Analisis Viskositas Slurry Propelan Untuk Akurasi Karakterisasi Rheologi Berbasis Perekat Hidroxy Terminated Polybutadiene Dengan Plasticizer Dioctyl Adipate. *Teknik.* 2019;40(3):154.
  53. SILVY F. PENGARUH PENAMBAHAN ISOMALT DAN LAMA PENYIMPANAN TERHADAP KETAHANAN *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 TERIMOBIL DALAM GEL ALGINAT PADA ASAM LAMBUNG DAN GARAM EMPEDU SECARA IN VITRO. PROGRAM STUDI TEKNOLOGI PANGAN FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN UNIVERSITAS KATOLIK WIDYA MANDALA SURABAYA SURABAYA; 2014.
  54. Chan ES, Wong SL, Lee PP, Lee JS, Ti TB, Zhang Z, et al. Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2011;83(1):225–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.044>
  55. Chandramouli V, Kailasapathy K, Peiris P, Jones M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *J Microbiol Methods.* 2004;56(1):27–35.
  56. Mokarram RR, Mortazavi SA, Najafi MBH, Shahidi F. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Res Int.* 2009;
  57. Adhikari K, Mustapha A, Grün IU, Fernando L. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *J Dairy Sci.* 2000;
  58. Ayumi D, Sumaiyah S, Masfria M. Pembuatan Dan Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Etanol Daun Ekor Naga (*Rhaphidophora pinnata* (L.f.) Schott) Menggunakan Metode Gelasi Ionik. *Talent Conf Ser Trop Med.* 2018;
  59. Heidebach T, Först P, Kulozik U. Influence of *spn*-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *J Food Eng.* 2010;
  60. Lucinda-Silva RM, Salgado HRN, Evangelista RC. Alginate-chitosan systems: In vitro controlled release of triamcinolone and in vivo gastrointestinal transit. *Carbohydr Polym.* 2010;
  61. Hovgaard L, Brøndsted H. Current applications of polysaccharides in colon targeting. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1996;
  62. KETAHANAN *Lactobacillus* sp. ISOLAT SUSU KUDA SUMBAWA TERHADAP pH RENDAH DAN ASAM DEOKSIKOLAT SERTA KEMAMPUANNYA MENTRANSFORMASI ASAM KOLAT MENJADI ASAM DEOKSIKOLAT. *J Biol.* 2015;
  63. Calinescu C, Mateescu MA. Carboxymethyl high amylose starch: Chitosan self-stabilized matrix for probiotic colon delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;

64. Caly DL, D'Inca R, Auclair E, Drider D. Alternatives to antibiotics to prevent necrotic enteritis in broiler chickens: A microbiologist's perspective. *Frontiers in Microbiology*. 2015.
65. PENYALUTAN BAKTERI ASAM LAKTAT MENGGUNAKAN NANOPARTIKEL KITOSAN. *PHARMACON*. 2019;
66. Adawiyah SR, Hafsan, Nur F, Mustami MH. Ketahanan Bakteri Asam Laktat Asal Dangke Terhadap Garam Empedu Sebagai Kandidat Probiotik. *Pros Semin Nas Mikrobiol Kesehat dan Lingkungan*. 2015;164–73.
67. Khosravi Zanjani MA, Tarzi BG, Sharifan A, Mohammadi N. Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastrointestinal condition. *Iran J Pharm Res*. 2014;13(3):843–52.
68. Harjuni F, Nursyirwani, Mulyadi A. Tolerance Of Probiotic Bacterial Candidate From Kakap Putih On pH And Bile Salt. 2016; Available from: <https://media.neliti.com/media/publications/187209-ID-none.pdf>
69. Herawati E, Aditiawati P. Uji Ketahanan terhadap pH Asam dan Garam Empedu pada Bakteri Indigenus Buah Kawista ( *Feronia limonia* ) sebagai Kandidat Bakteri Probiotik Abstrak. 2001;113–7.
70. Sunaryanto R, Marwoto B. Isolasi, Identifikasi, Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Dari Dadih Susu Kerbau. *J Sains dan Teknol Indones*. 2013;14(3):228–33.
71. Utami F. Pengaruh Suhu Terhadap Daya Tahan Hidup Bakteri pada Sediaan Probiotik [Internet]. Repository UINHJ. 2015. Available from: <http://repository.uinjkt.ac.id/dspace/handle/123456789/26436>
72. Danah I, Akhdiat T, Sumarni S. LAMA PENYIMPANAN PADA SUHU RENDAH TERHADAP JUMLAH BAKTERI DAN pH SUSU HASIL PASTEURISASI DALAM KEMASAN. *Compos J Ilmu Pertan*. 2019;1(1):49–54.
73. Ayuti SR, Nurliana N, Yurliasni Y, Sugito S, Darmawi D. Dinamika Pertumbuhan *Lactobacillus sp* dan Karakteristik Susu Fermentasi Berdasarkan Suhu dan Lama Penyimpanan. *J Agripet*. 2016;16(1):23.
74. Setiawati AE, Yunianta. KAJIAN ANALISIS SUHU DAN LAMA PENYIMPANAN TERHADAP KARAKTERISTIK KADAR ALKOHOL KEFIR SUSU SAPI Study of Temperature Analysis and Storage towards Alcohol Level in Cow Milk Kefir. *J Pangan dan Agroindustri Vol6*. 2018;6(4):77–86.

## LAMPIRAN 1

### ALUR PENELITIAN

#### 1. Proses Enkapsulasi Metode Ekstrusi

##### 1.1 Pemuatan suspensi bakteri *Lactobacillus sp*

###### Bakteri

- 1-2 ose bakteri *Lactobacillus sp* dimasukkan ke dalam 50 mL MRS Broth
- Diinkubasi dalam *saker incubator* selama 48 jam dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 37°C

##### 1.2 Pembuatan MRS Broth

###### MRS Broth

- Ditimbang 5,2 gr padatan MRS Broth
- Dimasukkan ke dalam gelas kimia 250 mL

###### Gelas kimia

- Dilarutkan MRS Broth dengan 100 mL aquadest
- Aduk dengan menggunakan *magnetic stirer* dan dipanaskan sampai mendidih.
- Setelah mendidih masukkan ke dalam labu erlenmeyer 250 mL.

###### Gelas kimia

- Ditutup mulut labu erlenmeyer kemudian disterilkan pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit

##### 1.3 Pembuatan larutan Kitosan (0,2%; 0,6%; 1% dan 2% (b/v))

###### Kitosan 0,2%; 0,6%; 1% dan 2%

- Ditimbang 0,2 g; 0,6 g; 1g; dan 2g kitosan
- Dimasukkan masing-masing padatan ke dalam labu erlenmeyer 250 mL
- Dilarutkan dengan 100 mL larutan asam asetat 1%
- Diaduk menggunakan *magnetic stirer* sampai larut.
- Setelah larut, atur pH larutan kitosan mencapai pH 6 dengan penambahan larutan NaOH 1M

## LAMPIRAN 1

### (LANJUTAN)

#### 1.4 Pembuatan larutan Na-Alginat 1%

Na-Alginat 1%

- Ditimbang 1 g padatan Na-Alginat
- Dimasukkan padatan Na-Alginat ke dalam gelas kimia 250 mL

Gelas kimia

- Dilarutkan Na-Alginat dengan 100 mL aquadest yang telah dihangatkan
- Diaduk menggunakan *magnetic stirer* dan dihangatkan pada suhu 60°C
- Setelah larut dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 250 mL

Erlenmeyer 250 mL

- Ditutup labu erlenmeyer kemudian disterilkan pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit

#### 1.5 Pembuatan larutan CaCl<sub>2</sub> 0,1M

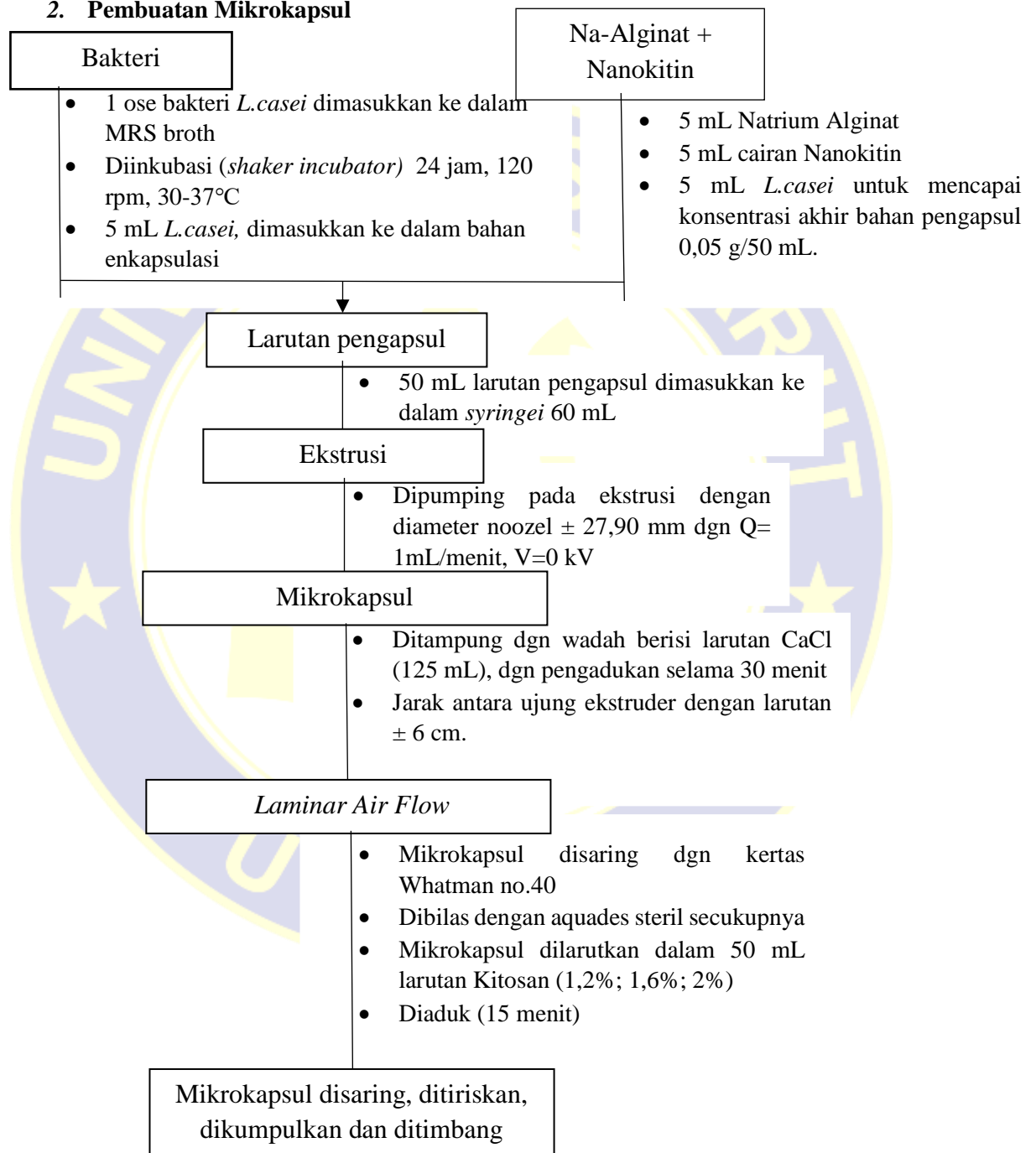
CaCl<sub>2</sub> 0,1 M

- Ditimbang 16 g CaCl<sub>2</sub>
- Dilarutkan dengan aquadest 500 mL dalam gelas kimia
- Dimasukkan larutan ke dalam dua labu erlenmeyer, masing-masing berisi 250 mL larutan CaCl<sub>2</sub>
- Ditutup mulut labu erlenmeyer, kemudian disterilkan pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit

## LAMPIRAN 1

### (LANJUTAN)

#### 2. Pembuatan Mikro kapsul



## LAMPIRAN 1

### (LANJUTAN)

#### 3. Proses Perendaman Mikrokapsul Dalam Simulasi Asam Lambung & Simulasi Usus Garam Empedu

##### 1.1 Pembuatan larutan pH 1,2

NaCl

- Ditimbang 0,2 g NaCl
- Dimasukkan NaCl ke dalam gelas kimia 250 mL
- Dilarutkan dengan 100 mL aquadest
- Setelah larut, atur pH larutan dengan bantuan HCl sampai pH 1,2
- Dipipet 9 mL larutan pH 1,2 ke dalam tabung reaksi
- Disterilkan pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit

##### 1.2 Pembuatan larutan pH 3

NaCl

- Ditimbang 0,2 g NaCl
- Dimasukkan NaCl ke dalam gelas kimia 250 mL
- Dilarutkan dengan 100 mL aquadest
- Setelah larut, atur pH larutan dengan bantuan HCl sampai pH 3
- Dipipet 9 mL larutan pH 1,2 ke dalam tabung reaksi
- Disterilkan pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit

##### 1.3 Pembuatan larutan Na-Sitrat 1%

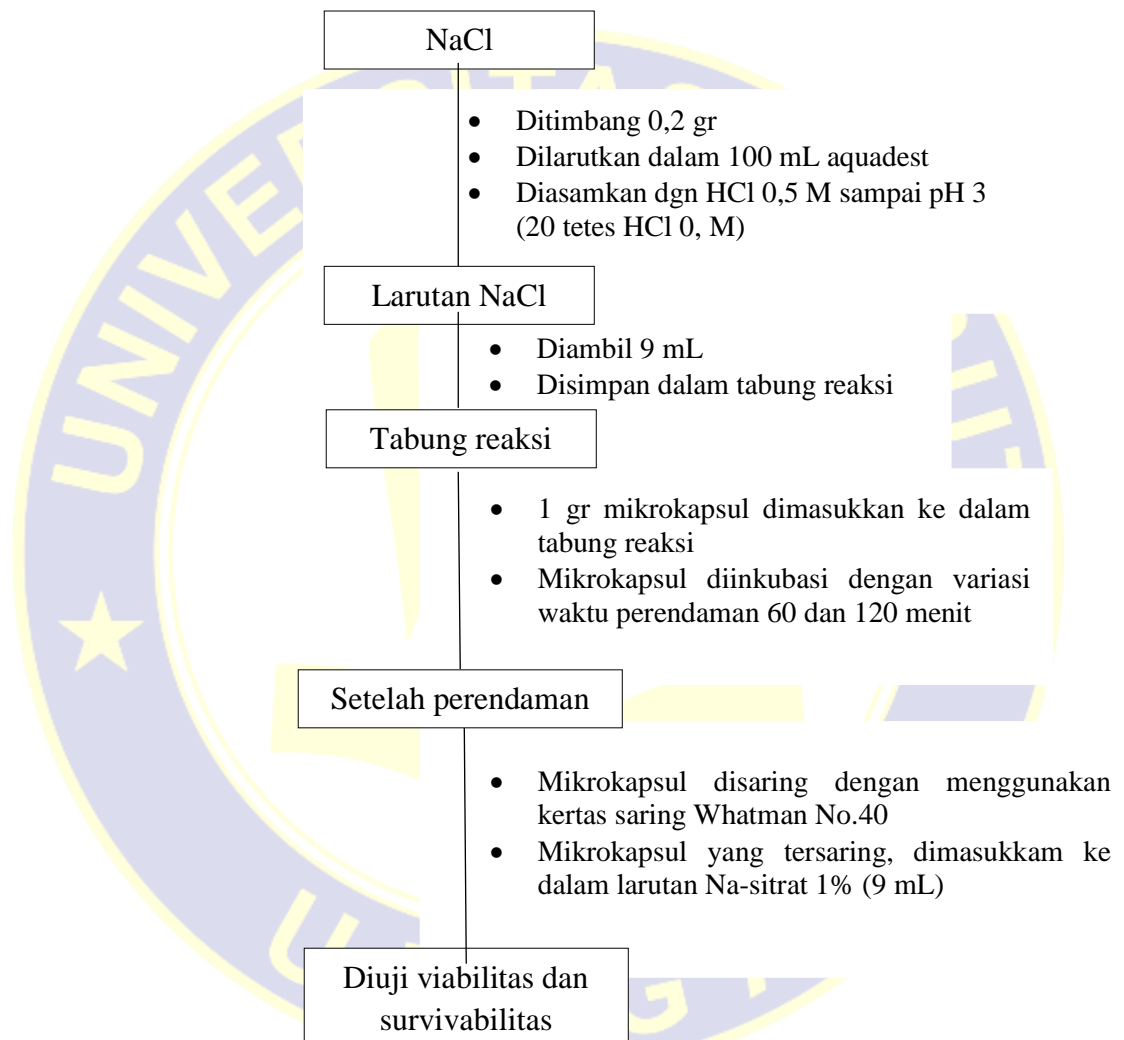
Na-sitrat 1%

- Ditimbang 1 g Na-Sitrat
- Dimasukkan NaCl ke dalam labu erlenmeyer 250 mL
- Dilarutkan dengan 100 mL aquadest
- Disterilkan pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit

## LAMPIRAN 1

### (LANJUTAN)

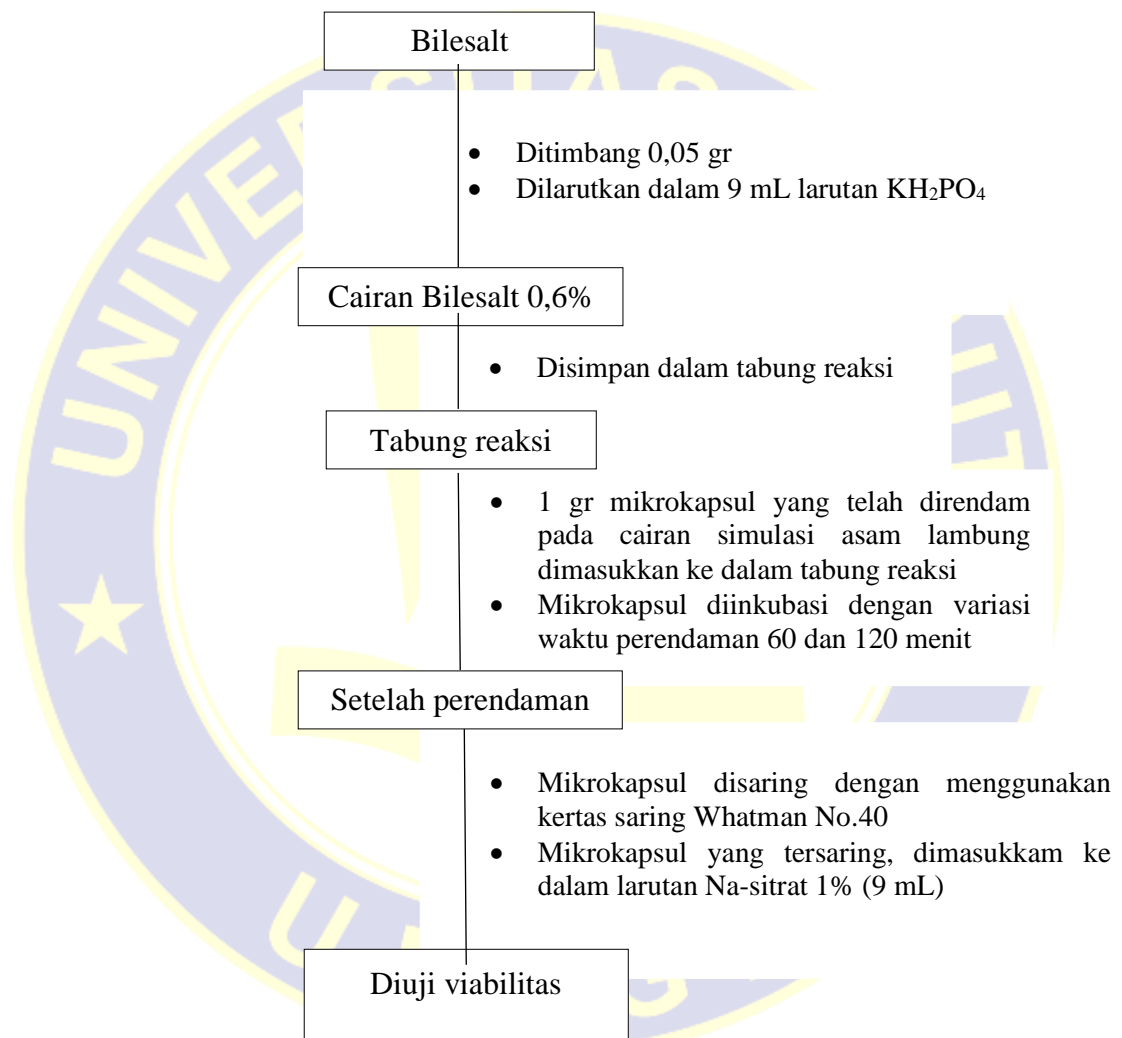
#### 1.4 Proses Simulasi Asam Lambung



## LAMPIRAN 1

### (LANJUTAN)

#### 1.5 Proses Simulasi Usus Garam Empedu



## LAMPIRAN 1

### (LANJUTAN)

#### i. Proses Pengukuran Viabilitas Probiotik

##### 3.1 Pembuatan larutan Buffered Peptone Water 0,1%

Peptone 0,1%

- Ditimbang 0,1 g Peptone
- Dimasukkan ke dalam gelas kimia 250 mL
- Dilarutkan dengan 100 mL aquadest
- Dipipet 9 mL ke dalam tabung reaksi kemudian tutup
- Disterilkan pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit

##### 3.2 Pembuatan MRS Agar

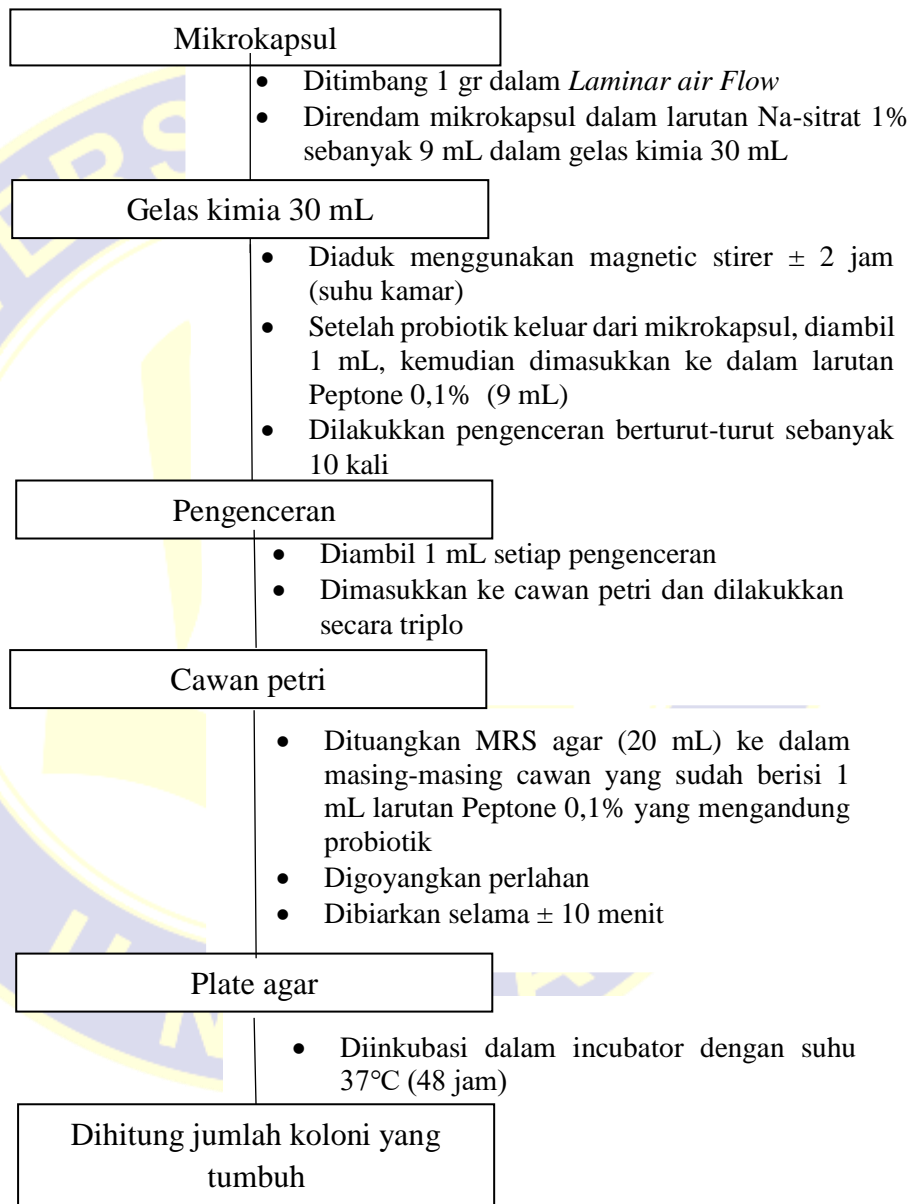
MRS Agar

- Ditimbang 62g MRS Agar
- Dimasukkan ke dalam gelas kimia 1000 mL
- Dilarutkan dengan 1000 mL aquadest
- Diaduk dengan *magnetic stirrer* dan panaskan sampai mendidih
- Dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 500 mL, dengan masing-masing labu berisi 300 mL agar
- Disterilkan pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit

## LAMPIRAN 1

### (LANJUTAN)

#### 3.3 Proses Pengukuran Viabilitas Probiotik



## LAMPIRAN 2

### DATA PENGAMATAN

#### Pengamatan Hasil TPC (Total Plate Count)

**Tabel V.4**  
Jumlah Koloni Bakteri pada Variasi Kitosan 2% pH 3

Pengenceran / Konsentrasi	Broth <i>L.sp</i>	Na-Sitrat	Broth			Beads		
			1'	60'	120'	1'	60'	120'
10 <sup>1</sup>	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
10 <sup>2</sup>	∞	∞	∞	∞	215	∞	∞	∞
10 <sup>3</sup>	∞	∞	∞	340	33	∞	∞	317
10 <sup>4</sup>	∞	239	∞	55	2	294	34	44
10 <sup>5</sup>	∞	52	∞	4	-	65	22	12
10 <sup>6</sup>	298	9	267	-	-	60	7	-
10 <sup>7</sup>	64	5	75	-	-	1	5	-
10 <sup>8</sup>	7	2	7	-	-	3	-	-
10 <sup>9</sup>	0	-	0	-	-	-	-	-
10 <sup>10</sup>	4	-	0	-	-	-	-	-
Setelah dikalikan pengenceran	4 x 10 <sup>10</sup>	2 x 10 <sup>8</sup>	7 x 10 <sup>8</sup>	4 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>4</sup>	3 x 10 <sup>8</sup>	5 x 10 <sup>7</sup>	12 x 10 <sup>5</sup>

**Tabel V.5**  
Jumlah Koloni Bakteri pada Variasi Kitosan 2% pH 1,2

Pengenceran/ Konsentrasi	Broth <i>L.sp</i>	Na-Sitrat	Broth			Beads		
			1'	60'	120'	1'	60'	120'
10 <sup>1</sup>	∞	∞	0	0	0	∞	∞	71
10 <sup>2</sup>	∞	∞	0	0	0	∞	∞	19
10 <sup>3</sup>	∞	∞	0	0	0	120	∞	12
10 <sup>4</sup>	∞	239	0	0	0	16	42	4
10 <sup>5</sup>	∞	52	0	0	0	15	21	2
10 <sup>6</sup>	298	9	0	0	0	7	-	-
10 <sup>7</sup>	64	5	0	0	0	6	-	-
10 <sup>8</sup>	7	2	0	0	0	0	-	-
10 <sup>9</sup>	0	-	0	0	0	-	-	-
10 <sup>10</sup>	4	-	0	0	0	-	-	-
Setelah dikalikan pengenceran	4 x 10 <sup>10</sup>	2 x 10 <sup>8</sup>	0	0	0	6 x 10 <sup>7</sup>	21 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>5</sup>

## LAMPIRAN 2

### (LANJUTAN)

**Tabel V.4**  
Jumlah Koloni Bakteri pada Variasi Kitosan 1% pH 3

Pengenceran/ Konsentrasi	Broth <i>L.sp</i>	Na- Sitrat	Broth			Beads		
			1'	60'	120'	1'	60'	120'
10 <sup>1</sup>	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
10 <sup>2</sup>	∞	∞	∞	∞	215	∞	∞	∞
10 <sup>3</sup>	∞	∞	∞	340	33	205	∞	∞
10 <sup>4</sup>	∞	315	∞	55	2	20	179	230
10 <sup>5</sup>	∞	221	∞	4	-	2	40	0
10 <sup>6</sup>	298	15	267	-	-	9	2	-
10 <sup>7</sup>	64	1	75	-	-	24	1,5	-
10 <sup>8</sup>	7	1	7	-	-	9	0	-
10 <sup>9</sup>	0	-	0	-	-	0	-	-
10 <sup>10</sup>	4	-	0	-	-	-	-	-
Setelah dikalikan pengenceran	4 x 10 <sup>10</sup>	1 x 10 <sup>8</sup>	7 x 10 <sup>8</sup>	4 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>4</sup>	9 x 10 <sup>8</sup>	1,5 x 10 <sup>7</sup>	230 x 10 <sup>4</sup>

**Tabel V.5**  
Jumlah Koloni Bakteri pada Variasi Kitosan 1% pH 1,2

Pengenceran/ Konsentrasi	Broth <i>L.sp</i>	Na- Sitrat	Broth			Beads		
			1'	60'	120'	1'	60'	120'
10 <sup>1</sup>	∞	∞	0	0	0	∞	267	∞
10 <sup>2</sup>	∞	∞	0	0	0	∞	125	59
10 <sup>3</sup>	∞	∞	0	0	0	253	13	6
10 <sup>4</sup>	∞	315	0	0	0	35	11	0
10 <sup>5</sup>	∞	221	0	0	0	12	7	0
10 <sup>6</sup>	298	15	0	0	0	21	-	-
10 <sup>7</sup>	64	1	0	0	0	3	-	-
10 <sup>8</sup>	7	1	0	0	0	0	-	-
10 <sup>9</sup>	0	-	0	0	0	-	-	-
10 <sup>10</sup>	4	-	0	0	0	-	-	-
Setelah dikalikan pengenceran	4 x 10 <sup>10</sup>	1 x 10 <sup>8</sup>	0	0	0	3 x 10 <sup>7</sup>	7 x 10 <sup>5</sup>	12 x 10 <sup>3</sup>

## LAMPIRAN 2

### (LANJUTAN)

**Tabel V.4**  
Jumlah Koloni Bakteri pada Variasi Kitosan 0,6% pH 3

Pengenceran/ Konsentrasi	Broth <i>L.sp</i>	Na- Sitrat	Broth			Beads		
			1'	60'	120'	1'	60'	120'
10 <sup>1</sup>	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	134
10 <sup>2</sup>	∞	∞	∞	∞	215	∞	∞	82
10 <sup>3</sup>	∞	∞	∞	340	33	∞	∞	1.6
10 <sup>4</sup>	∞	97	∞	55	2	117	264	0
10 <sup>5</sup>	∞	23	∞	4	-	51	27	0
10 <sup>6</sup>	298	12	267	-	-	5	6	0
10 <sup>7</sup>	64	4.3	75	-	-	1	0	0
10 <sup>8</sup>	7	3.3	7	-	-	0	0	0
10 <sup>9</sup>	0	0	0	-	-	0	0	0
10 <sup>10</sup>	4	0	0	-	-	0	0	0
Setelah dikalikan pengenceran	4 x 10 <sup>10</sup>	3.3 x 10 <sup>8</sup>	7 x 10 <sup>8</sup>	4 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>4</sup>	1 x 10 <sup>7</sup>	6 x 10 <sup>6</sup>	1.6 x 10 <sup>3</sup>

**Tabel V.5**  
Jumlah Koloni Bakteri pada Variasi Kitosan 0,6% pH 1,2

Pengenceran/ Konsentrasi	Broth <i>L.sp</i>	Na- Sitrat	Broth			Beads		
			1'	60'	120'	1'	60'	120'
10 <sup>1</sup>	∞	∞	0	0	0	∞	∞	134
10 <sup>2</sup>	∞	∞	0	0	0	∞	∞	82
10 <sup>3</sup>	∞	∞	0	0	0	∞	0	1.6
10 <sup>4</sup>	∞	97	0	0	0	49	4.6	0
10 <sup>5</sup>	∞	23	0	0	0	16	0.3	0
10 <sup>6</sup>	298	12	0	0	0	4.3	0	0
10 <sup>7</sup>	64	4.3	0	0	0	0.3	0	0
10 <sup>8</sup>	7	3.3	0	0	0	0	0	0
10 <sup>9</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>10</sup>	4	0	0	0	0	0	0	0
Setelah dikalikan pengenceran	4 x 10 <sup>10</sup>	3.3 x 10 <sup>8</sup>	0	0	0	2.6 x 10 <sup>7</sup>	0.3 x 10 <sup>5</sup>	1.6 x 10 <sup>3</sup>

## LAMPIRAN 2

### (LANJUTAN)

**Tabel V.4**  
Jumlah Koloni Bakteri pada Variasi Kitosan 0,2% pH 3

Pengenceran/ Konsentrasi	Broth <i>L.sp</i>	Na- Sitrat	Broth			Beads		
			1'	60'	120'	1'	60'	120'
10 <sup>1</sup>	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
10 <sup>2</sup>	∞	∞	∞	∞	215	∞	∞	∞
10 <sup>3</sup>	∞	∞	∞	340	33	∞	207	190.6
10 <sup>4</sup>	∞	∞	∞	55	2	229	72	40.3
10 <sup>5</sup>	∞	91	∞	4	-	96	39	4
10 <sup>6</sup>	464	84	267	-	-	7	3.6	0
10 <sup>7</sup>	67	71	75	-	-	48	0.6	0
10 <sup>8</sup>	7.3	17.6	7	-	-	3	0	0
10 <sup>9</sup>	1	4	0	-	-	1	0	0
10 <sup>10</sup>	0	3	0	-	-	0	0	0
10 <sup>11</sup>	1	0	0	0	0	0	0	0
Setelah dikalikan pengenceran	1 x 10 <sup>11</sup>	3 x 10 <sup>10</sup>	7 x 10 <sup>8</sup>	4 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>4</sup>	1 x 10 <sup>8</sup>	0,6 x 10 <sup>7</sup>	4 x 10 <sup>5</sup>

**Tabel V.5**  
Jumlah Koloni Bakteri pada Variasi Kitosan 0,2% pH 1,2

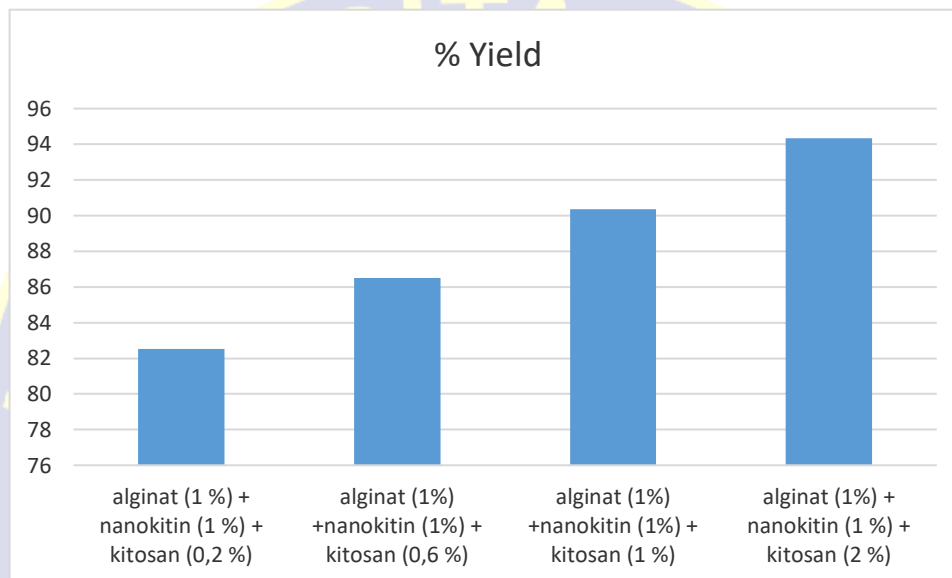
Pengenceran/ Konsentrasi	Broth <i>L.sp</i>	Na- Sitrat	Broth			Beads		
			1'	60'	120'	1'	60'	120'
10 <sup>1</sup>	∞	∞	0	0	0	∞	27	12
10 <sup>2</sup>	∞	∞	0	0	0	∞	24	2
10 <sup>3</sup>	∞	∞	0	0	0	61	7	0
10 <sup>4</sup>	∞	∞	0	0	0	48	6	0
10 <sup>5</sup>	∞	91	0	0	0	43	2	0
10 <sup>6</sup>	464	84	0	0	0	13	0.3	0
10 <sup>7</sup>	67	71	0	0	0	2.6	0	0
10 <sup>8</sup>	7.3	17.6	0	0	0	0	0	0
10 <sup>9</sup>	1	4	0	0	0	0	0	0
10 <sup>10</sup>	0	3	0	0	0	0	0	0
10 <sup>11</sup>	1	0	0	0	0	0	0	0
Setelah dikalikan pengenceran	1 x 10 <sup>11</sup>	3 x 10 <sup>10</sup>	0	0	0	2.6 x 10 <sup>7</sup>	0.3 x 10 <sup>6</sup>	2 x 10 <sup>2</sup>

## LAMPIRAN 3

### PERHITUNGAN

#### I. Grafik Yeald dan Survivabilitas Hasil Enkapsulasi

##### 1. Grafik Yield



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

Perhitungan nilai Yield:

$$\% \text{ Yield} = \frac{(\log A)}{(\log B)} \times 100$$

Dimana : A = *Lactobacillus sp* yang telah dienkapsulasi (cfu)

B = *Free cell Lactobacillus sp* (cfu)

Contoh:

% Yield dari enkapsulasi Alginat 1% + Kitin 1% + Kitosan 2%

Karna A dan B memiliki satuan yang berbeda, maka disamakan terlebih dahulu satuannya

### LAMPIRAN 3

#### (LANJUTAN)

##### a. Viability *Lactobacillus sp* yang terenkapsulasi

$$\begin{aligned} \text{Viability (cfu)} &= \log \text{ jumlah bakteri} \times \text{banyaknya beads yang diperoleh} \\ &= \log (2 \times 10^8) \text{ cfu/g} \times 22,9 \text{ g} \\ &= \log 45,8 \times 10^8 \text{ cfu} \end{aligned}$$

##### b. Viability *free cell Lactobacillus sp*

$$\begin{aligned} \text{Viability (cfu)} &= \log \text{ jumlah bakteri} \times \text{jumlah suspensi untuk membuat beads} \\ &= \log (4 \times 10^{10}) \text{ cfu/mL} \times 5 \text{ mL} \\ &= 2 \times 10^{11} \text{ cfu} \end{aligned}$$

Setelah itu, kemudian dihitung nilai % yield

$$\% \text{ Yield} = \frac{(\log A)}{(\log B)} \times 100$$

$$\% \text{ Yield} = \frac{(\log \text{ alginat } 1\% + \text{ Kitin } 1\% + \text{ kitosan } 2\%) \times 100}{\text{Log free cell } L.sp}$$

$$\% \text{ Yield} = \frac{(\log 45,8 \times 10^8) \text{ CFU} \times 100}{(\log 2 \times 10^{11}) \text{ CFU}}$$

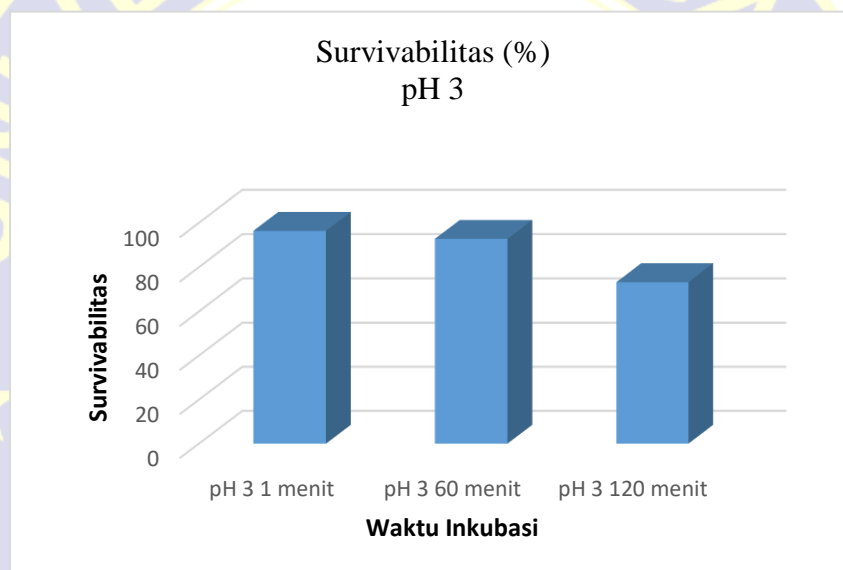
$$\% \text{ Yield} = 94,3\%$$

## LAMPIRAN 3

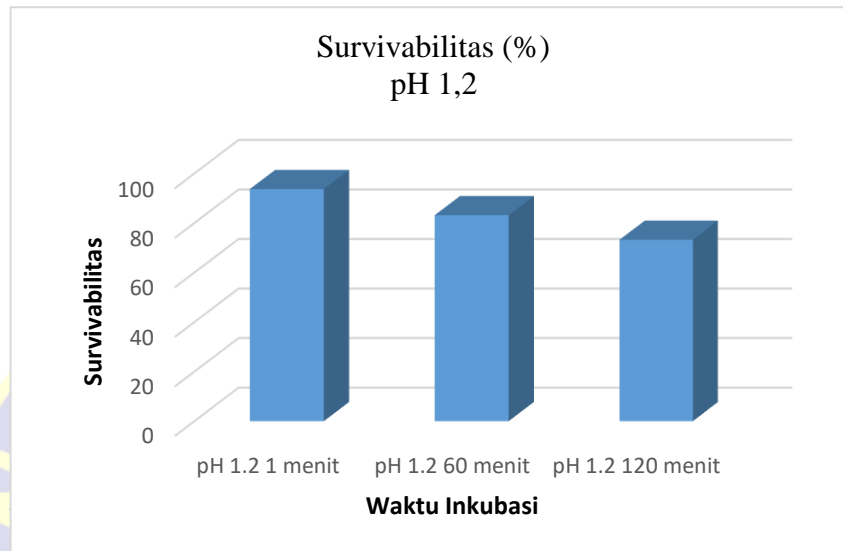
### (LANJUTAN)

#### 2. Grafik Survivabilitas

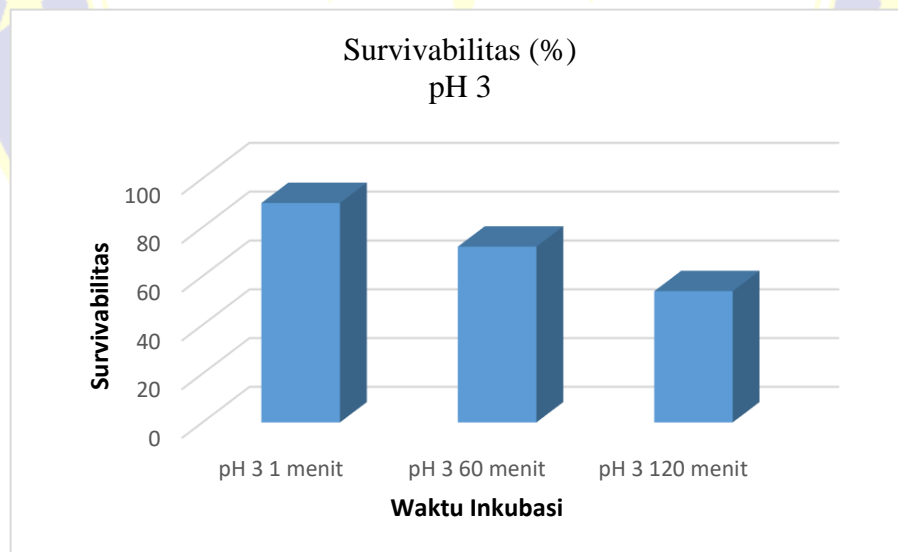
Grafik Survivabilitas pH 3 dan pH 1,2 untuk perbandingan survivabilitas enkapsulasi dengan alginat 1%+ Kitin 1% pada variasi konsentrasi kitosan 0,2%; 0,6%; 1%; dan 2%.



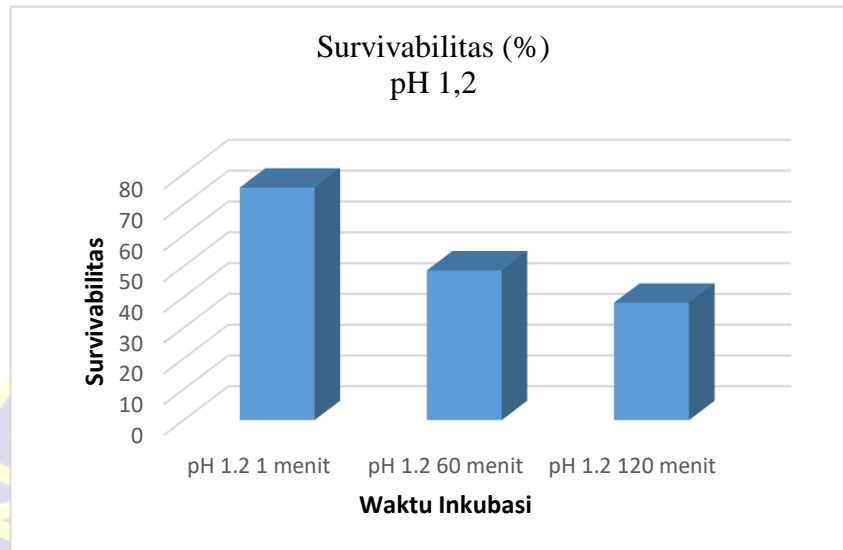
**Gambar V.7** Grafik nilai persen survivabiilitas pH 3 pada variasi konsentrasi kitosan 2% *Lactobacillus* sp

**LAMPIRAN 3****(LANJUTAN)**

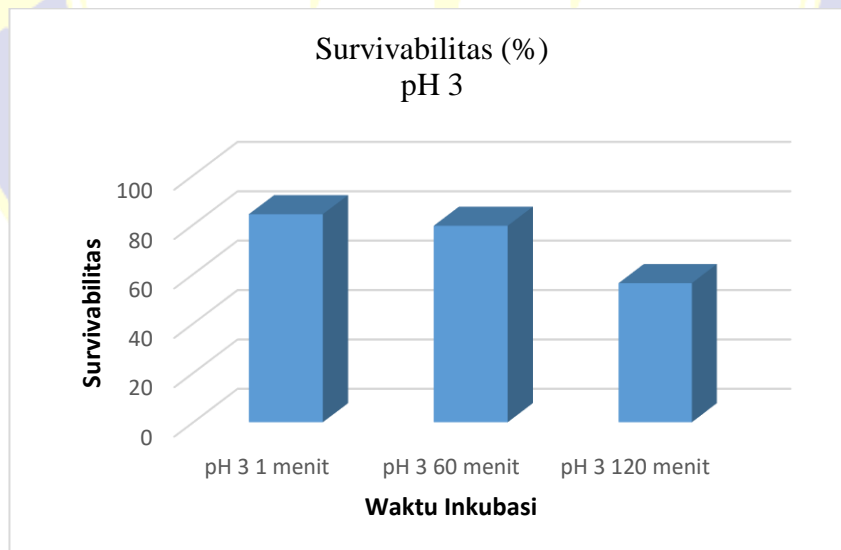
**Gambar V.8** Grafik nilai persen survivabiilitas pH 1,2 pada variasi konsentrasi kitosan 2% *Lactobacillus* sp



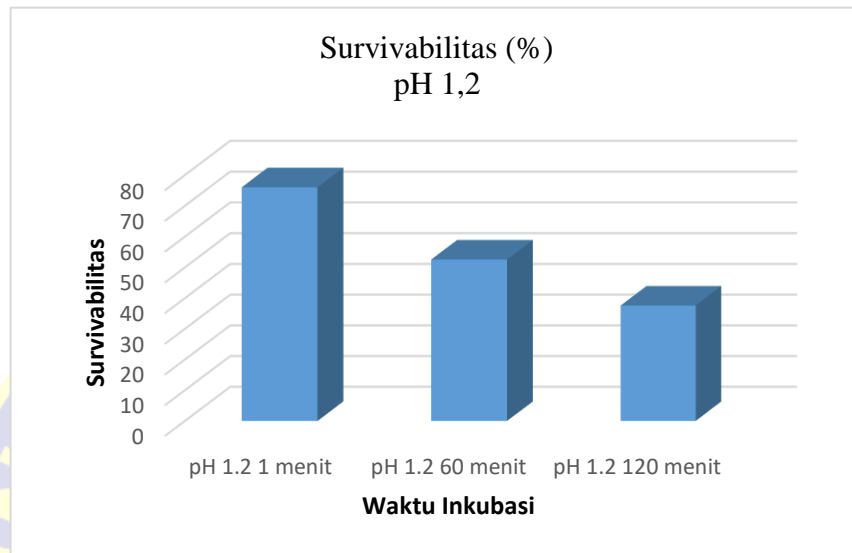
**Gambar V.7** Grafik nilai persen survivabiilitas pH 3 pada variasi konsentrasi kitosan 1% *Lactobacillus* sp

**LAMPIRAN 3****(LANJUTAN)**

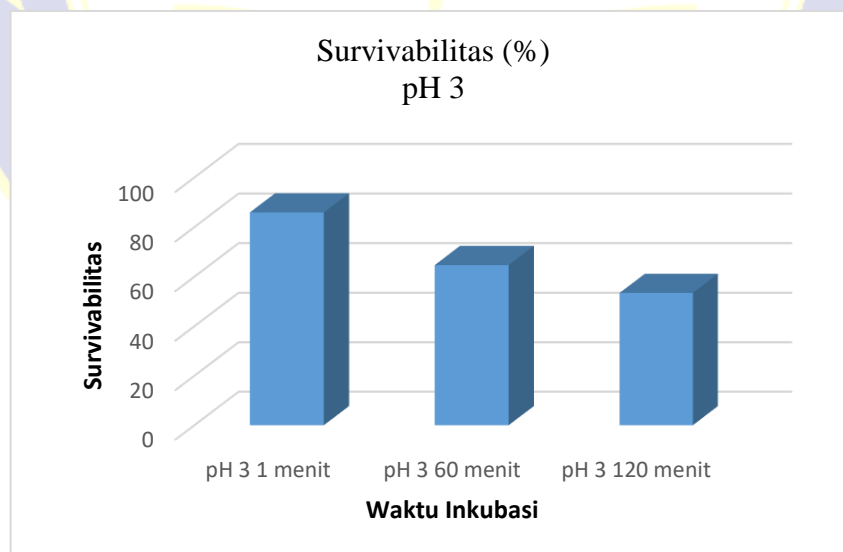
**Gambar V.8** Grafik nilai persen survivabiilitas pH 1,2 pada variasi konsentrasi kitosan 1% *Lactobacillus* sp



**Gambar V.7** Grafik nilai persen survivabiilitas pH 3 pada variasi konsentrasi kitosan 0,6% *Lactobacillus* sp

**LAMPIRAN 3****(LANJUTAN)**

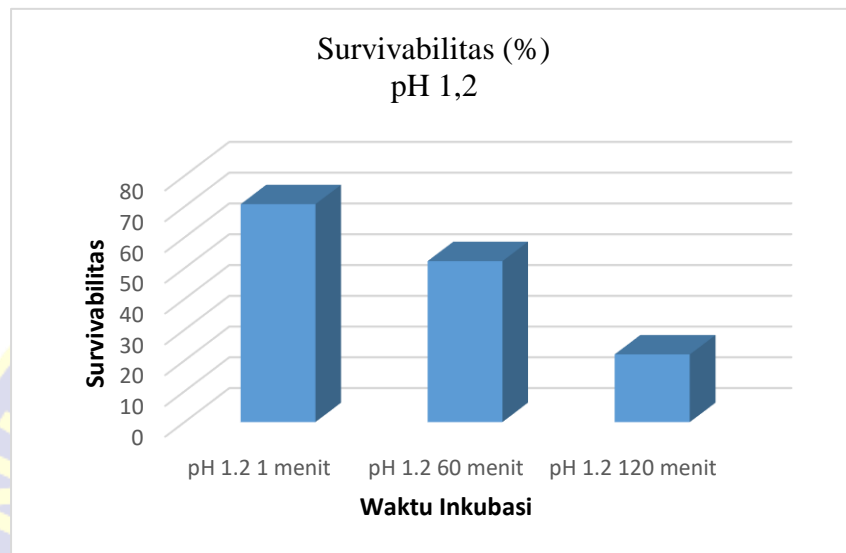
**Gambar V.8** Grafik nilai persen survivabiilitas pH 3 pada variasi konsentrasi kitosan 0,6% *Lactobacillus* sp



**Gambar V.7** Grafik nilai persen survivabiilitas pH 3 pada variasi konsentrasi kitosan 0,2% *Lactobacillus* sp

### LAMPIRAN 3

#### (LANJUTAN)



**Gambar V.8** Grafik nilai persen survivabiilitas pH 1,2 pada variasi konsentrasi kitosan 0,2% *Lactobacillus* sp

Perhitungan nilai Yield :

$$\% \text{Survivabilitas} = \frac{\log A_1}{\log A_0} \times 100$$

Dimana:

A = jumlah bakteri enkapsulasi dengan simulasi asam lambung (cfu/mL)

B = jumlah bakteri enkapsulasi tanpa simulasi asam lambung (cfu/mL)

Contoh :

Viabilitas Kitosan 2% pada pH 3 selama 1 menit

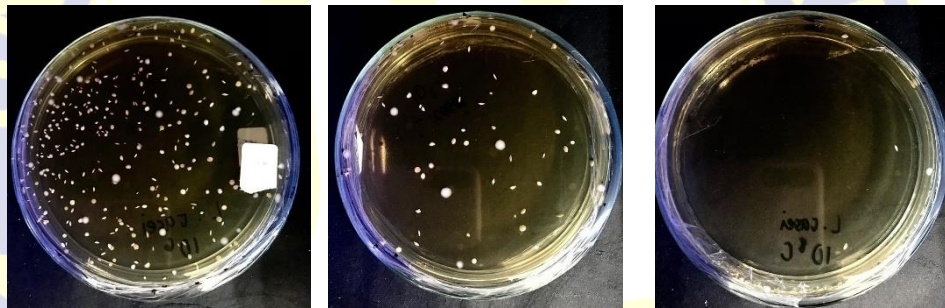
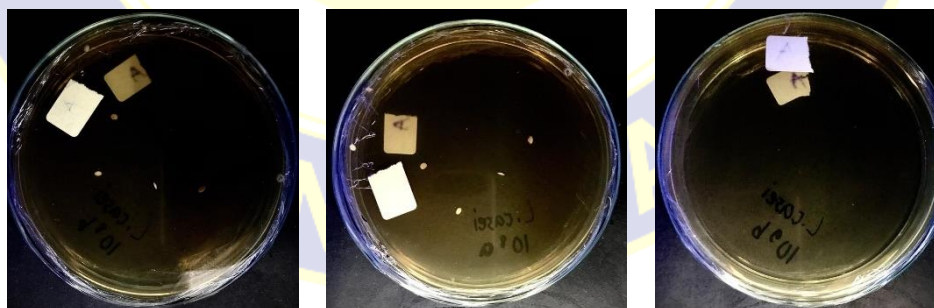
$$\% \text{Survivabilitas} = \frac{\log A_1}{\log A_0} \times 100$$

$$\% \text{Survivabilitas} = \frac{\log 2 \times 10^8}{\log 0.3 \times 10^8} \times 100$$

$$\% \text{Survivabilitas} = \frac{8 \text{ CfU/mL}}{8,3 \text{ CfU/mL}} \times 100$$

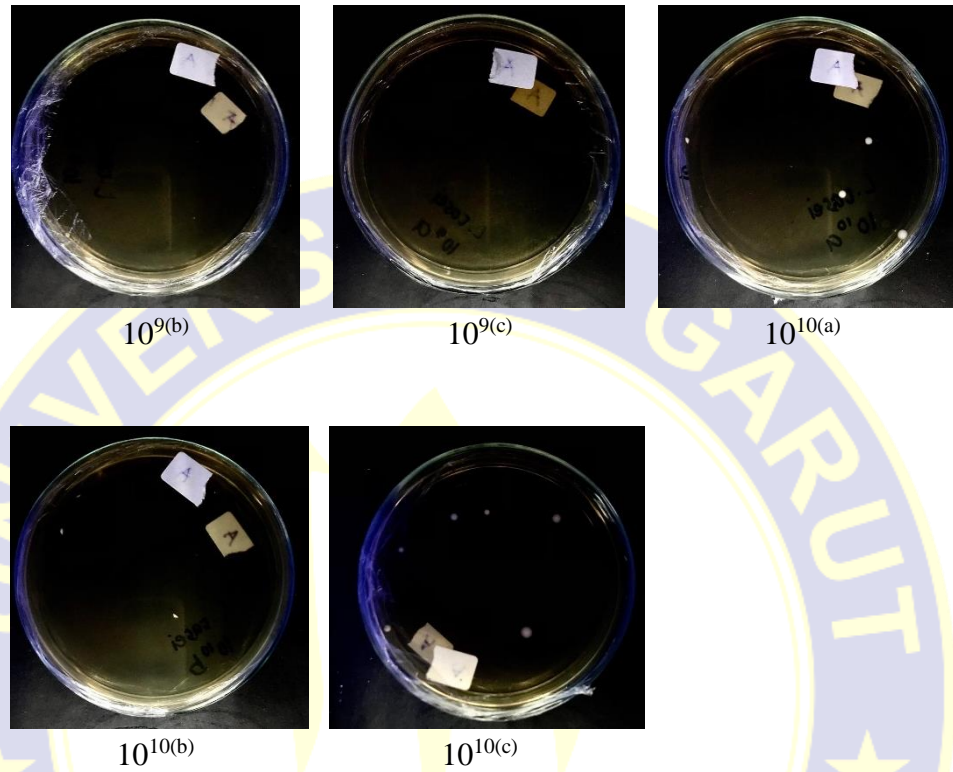
$$\% \text{Survivabilitas} = 96,37\%$$

**LAMPIRAN 4**  
**DOKUMENTASI HASIL TPC**

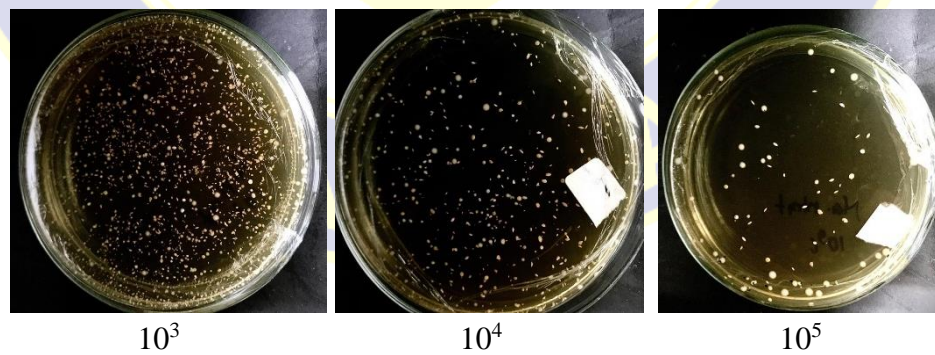
 $10^3$  $10^4$  $10^5$  $10^6$  $10^7$  $10^{8(a)}$  $10^{8(b)}$  $10^{8(c)}$  $10^{9(a)}$

## LAMPIRAN 4

## (LANJUTAN)

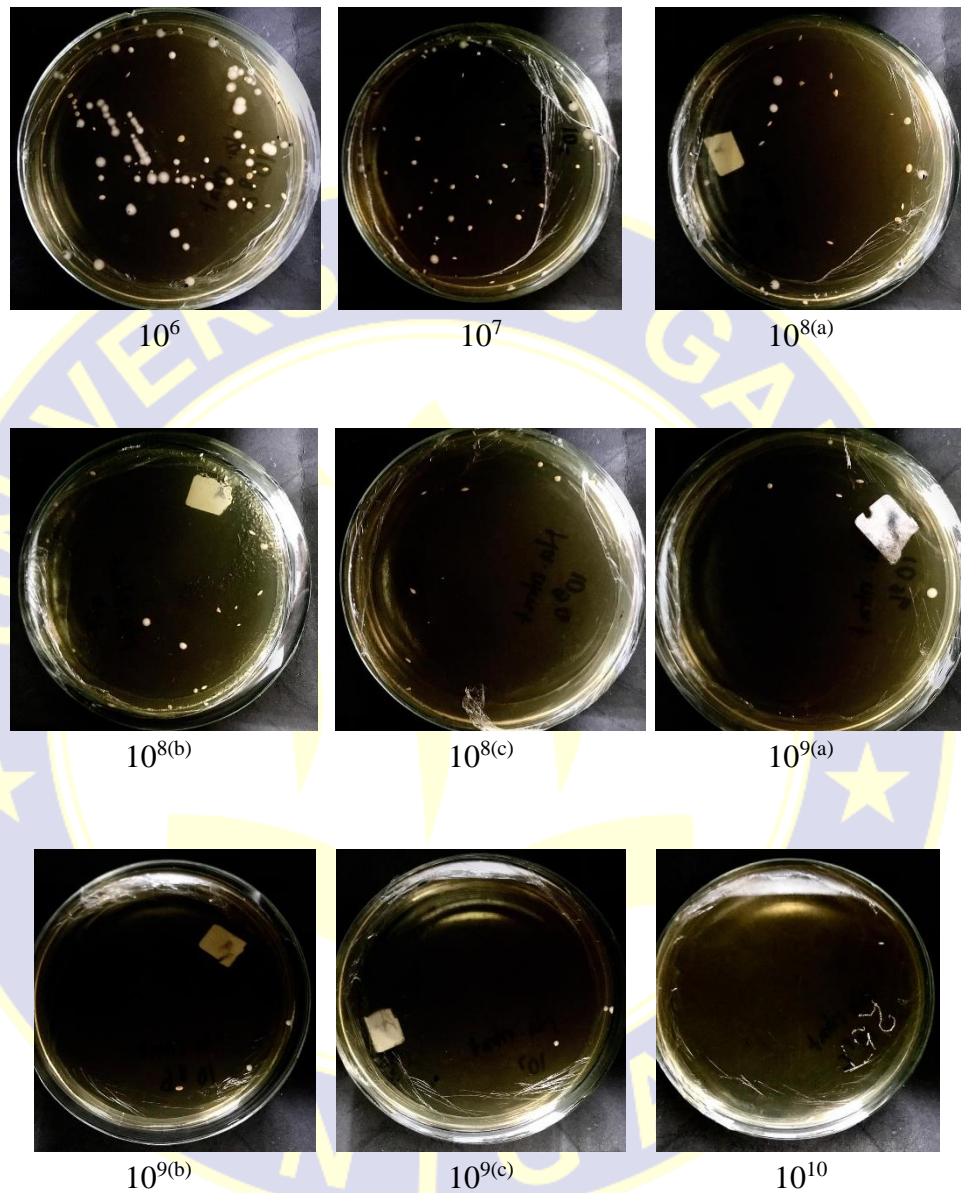


**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. sebelum dilakukan enkapsulasi

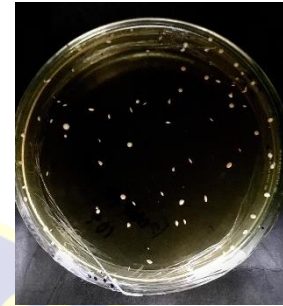
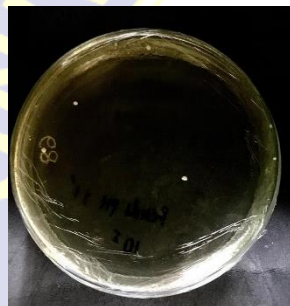
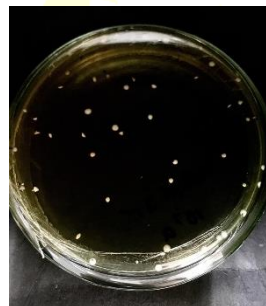
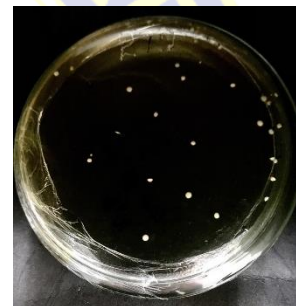
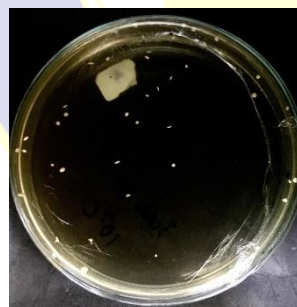
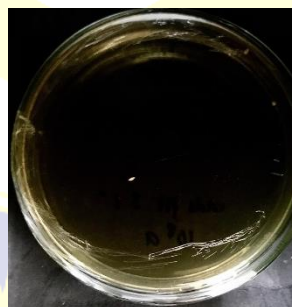
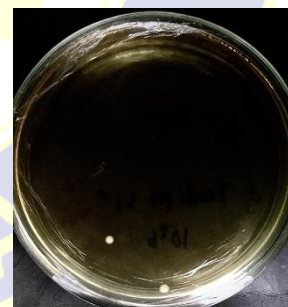


## LAMPIRAN 4

## (LANJUTAN)

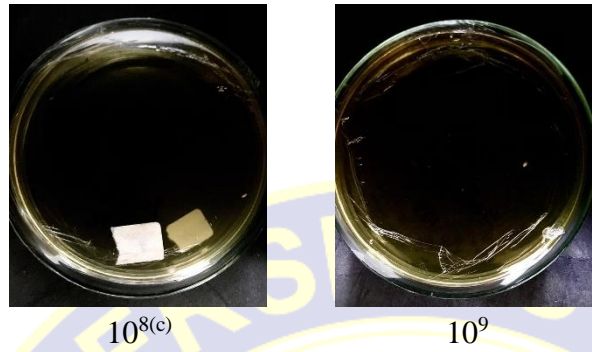


**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus Sp* setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 0,2%.

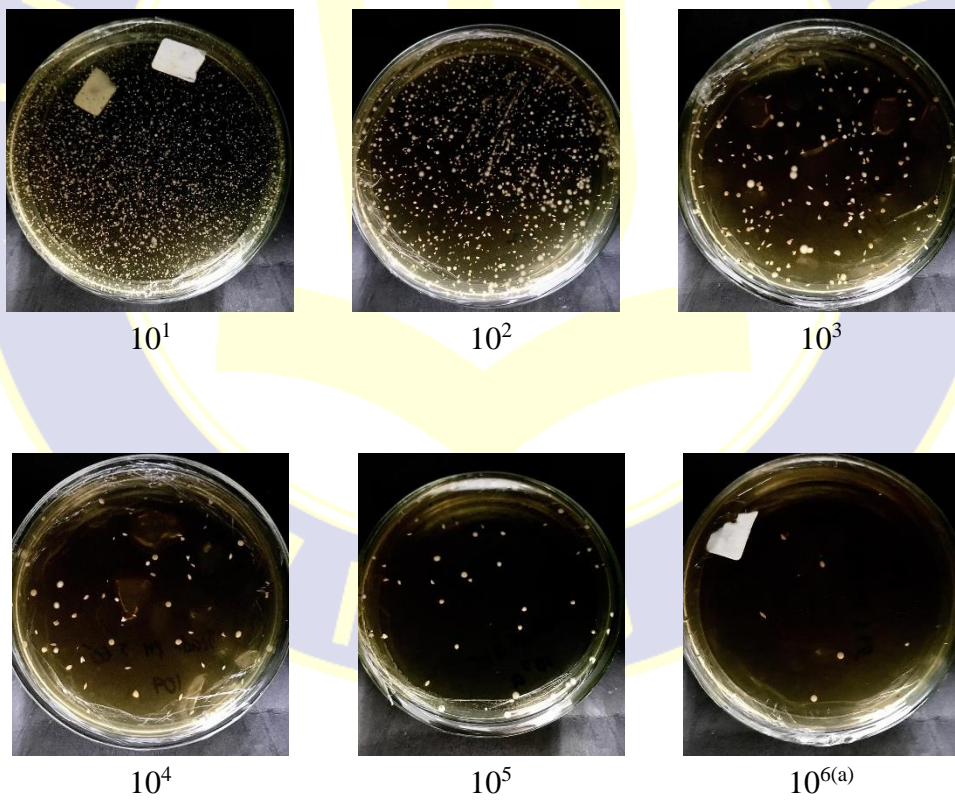
**LAMPIRAN 4****(LANJUTAN)** $10^3$  $10^4$  $10^5$  $10^6$  $10^{7(a)}$  $10^{7(b)}$  $10^{7(c)}$  $10^{8(a)}$  $10^{8(b)}$

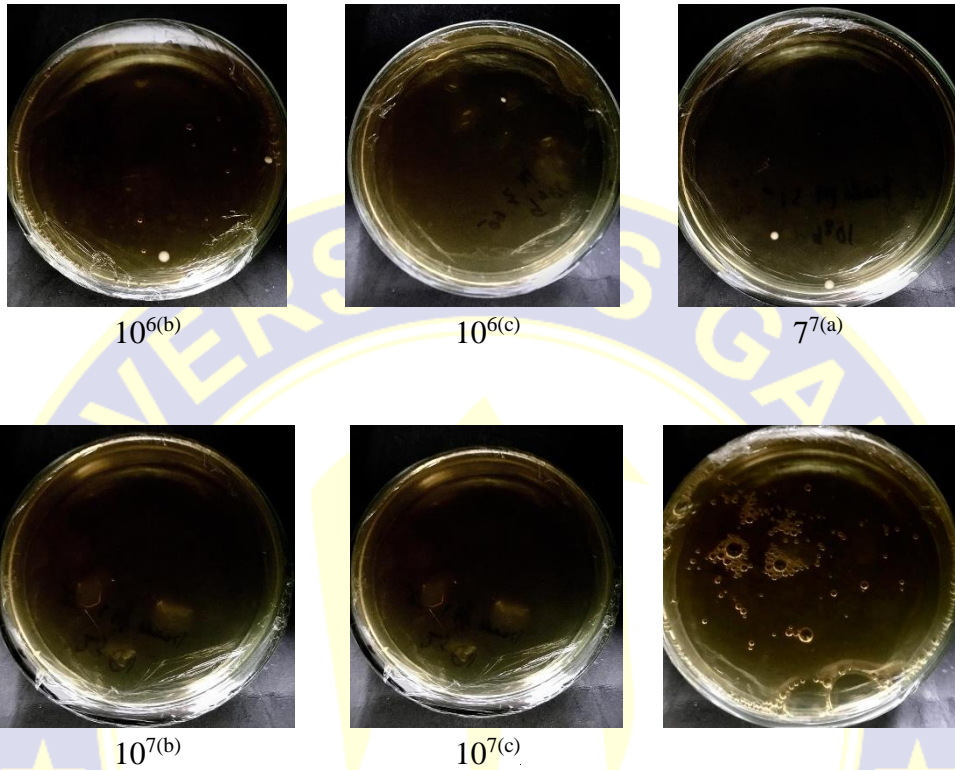
## LAMPIRAN 4

(LANJUTAN)



**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus Sp* setelah dilakukan enkapsulasi, kemudian diinkubasi pada pH 3 selama 1 menit

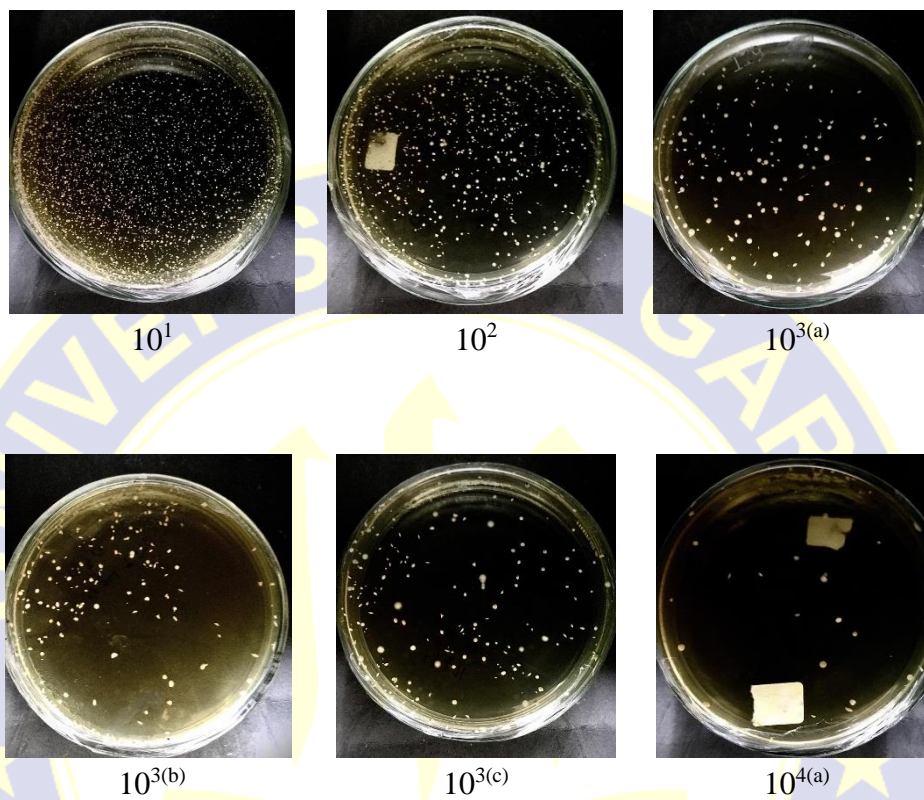


**LAMPIRAN 4****(LANJUTAN)**

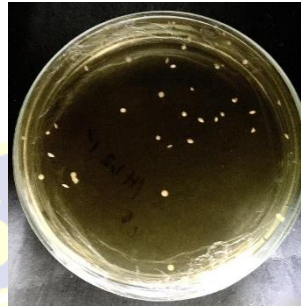
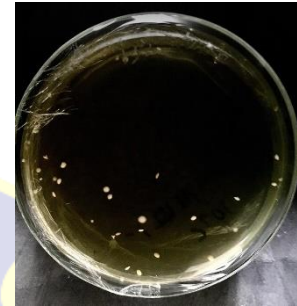
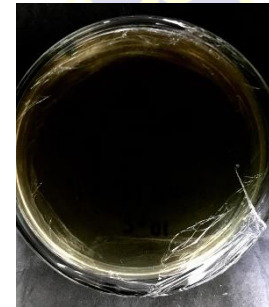
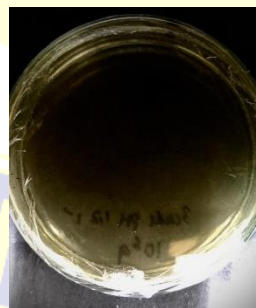
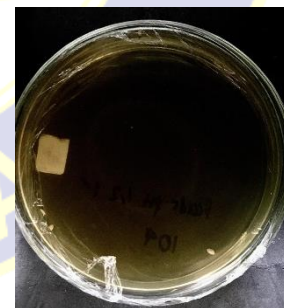
**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 0,2%, kemudian diinkubasi pada pH 3 selama 60 menit

## LAMPIRAN 4

## (LANJUTAN)

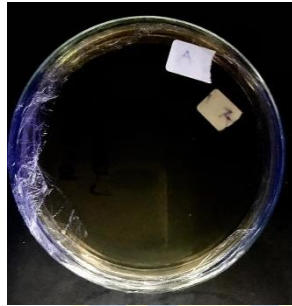


**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dienkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 0,2%, kemudian diinkubasi pada pH 3 selama 120 menit

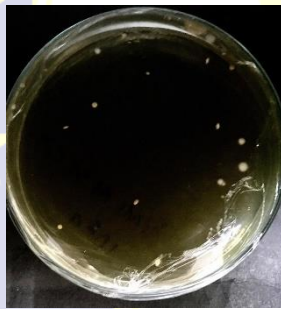
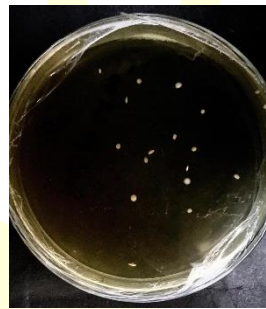
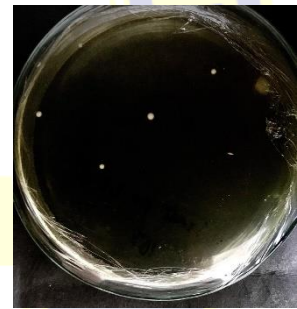
**LAMPIRAN 4****(LANJUTAN)** $10^3$  $10^4$  $10^5$  $10^{6(a)}$  $10^{6(b)}$  $10^{6(c)}$  $10^{7(a)}$  $10^{7(b)}$  $10^{7(c)}$

## LAMPIRAN 4

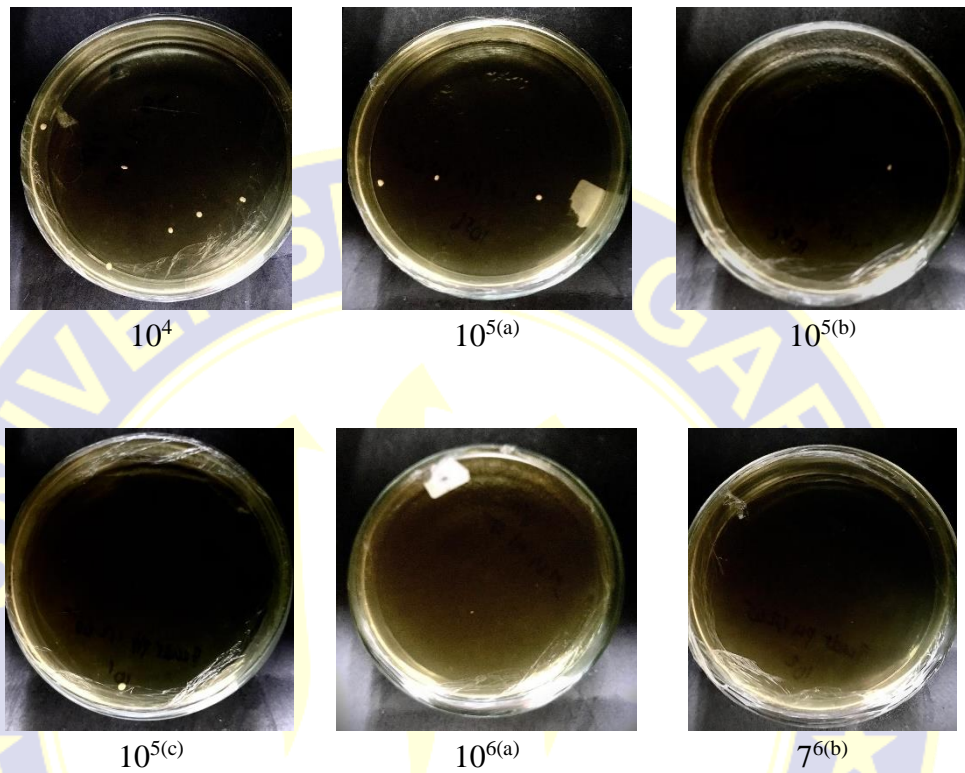
## (LANJUTAN)

 $10^8$ 

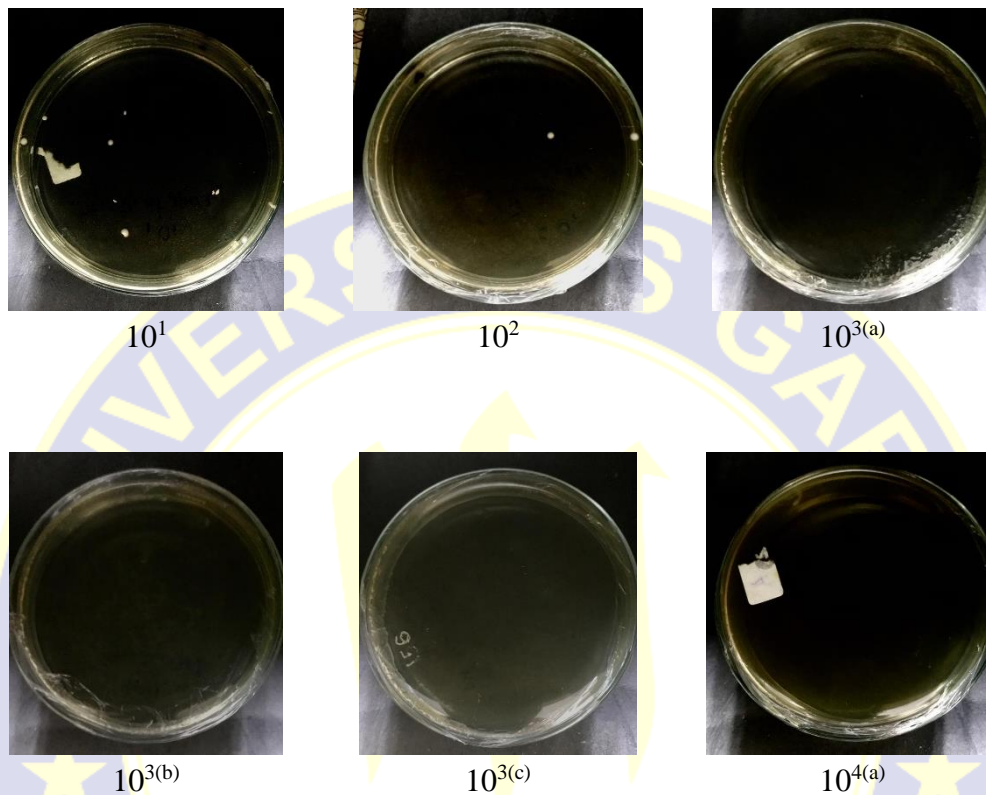
**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp.setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 0,2%, kemudian diinkubasi pada pH 1,2 selama 1 menit

 $10^1$  $10^2$  $10^3$

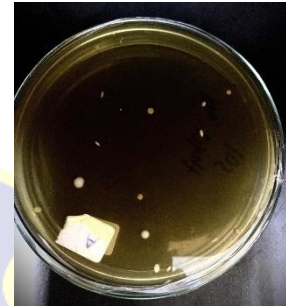
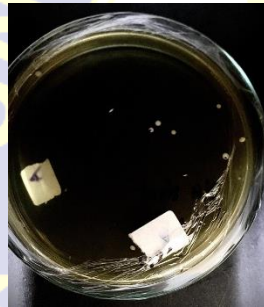
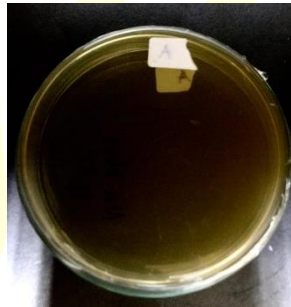
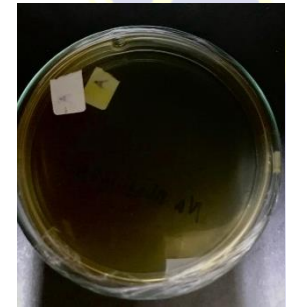
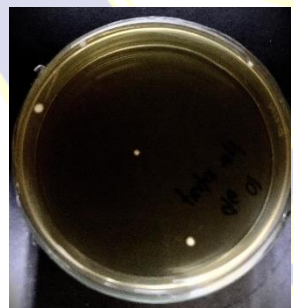
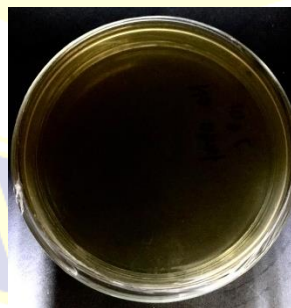
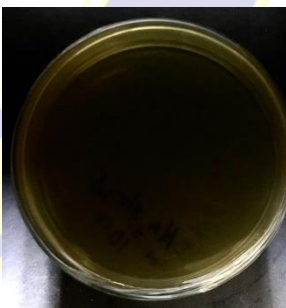
LAMPIRAN 4  
(LANJUTAN)



**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus Sp* setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 0,2%, kemudian diinkubasi pada pH 1,2 selama 60 menit

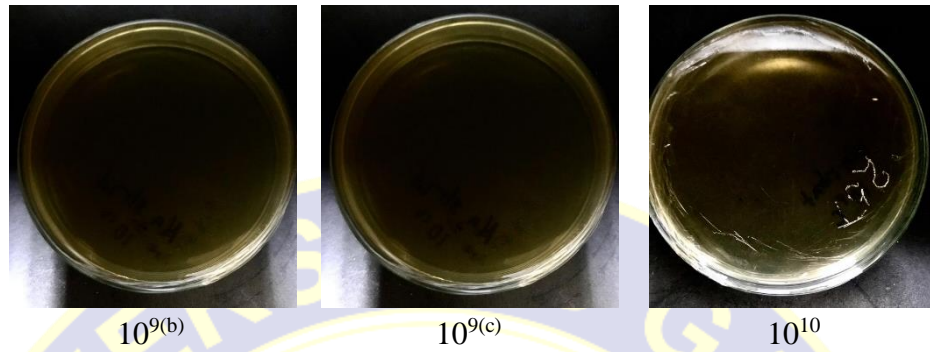
**LAMPIRAN 4****(LANJUTAN)**

Gambar V.2 Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 0,2%, kemudian diinkubasi pada pH 1,2 selama 120 menit

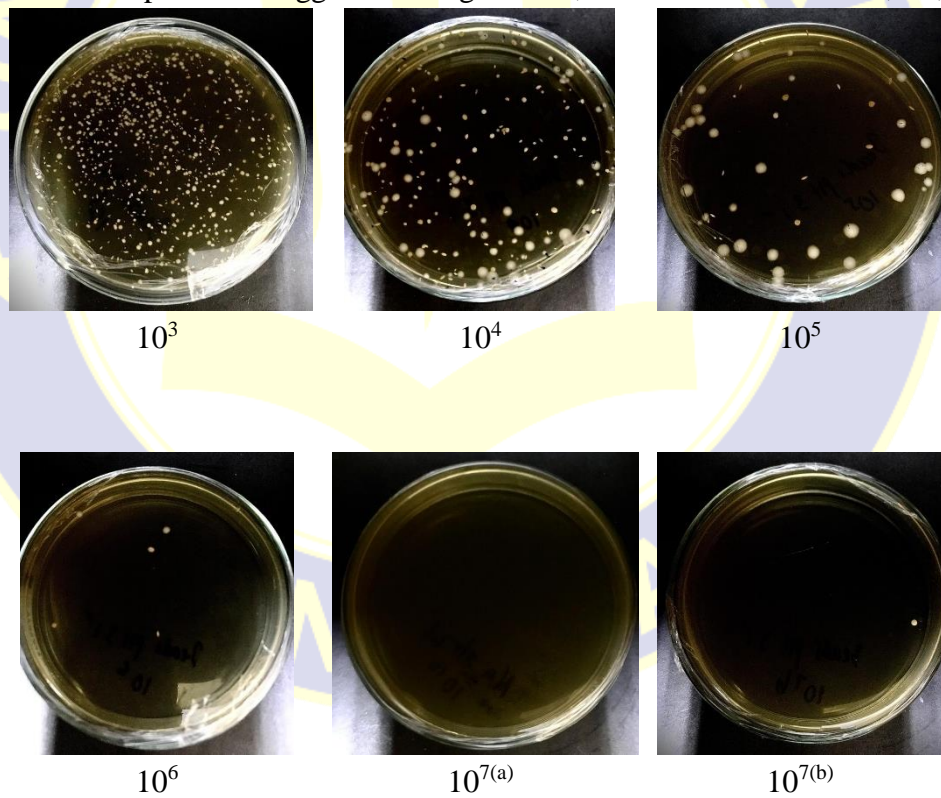
**LAMPIRAN 4****(LANJUTAN)** $10^3$  $10^4$  $10^5$  $10^6$  $10^7$  $10^{8(a)}$  $10^{8(b)}$  $10^{8(c)}$  $10^{9(a)}$

## LAMPIRAN 4

## (LANJUTAN)

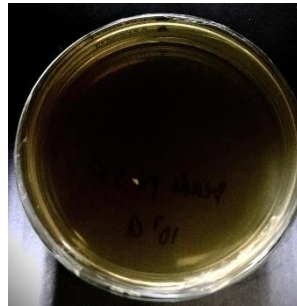


**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan kitosan 0,6%,

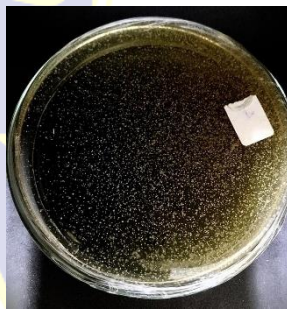
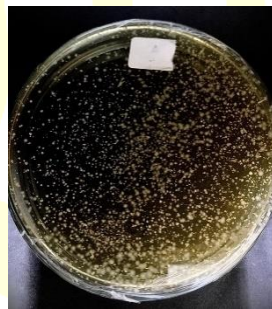
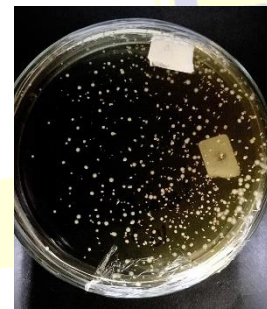


## LAMPIRAN 4

## (LANJUTAN)

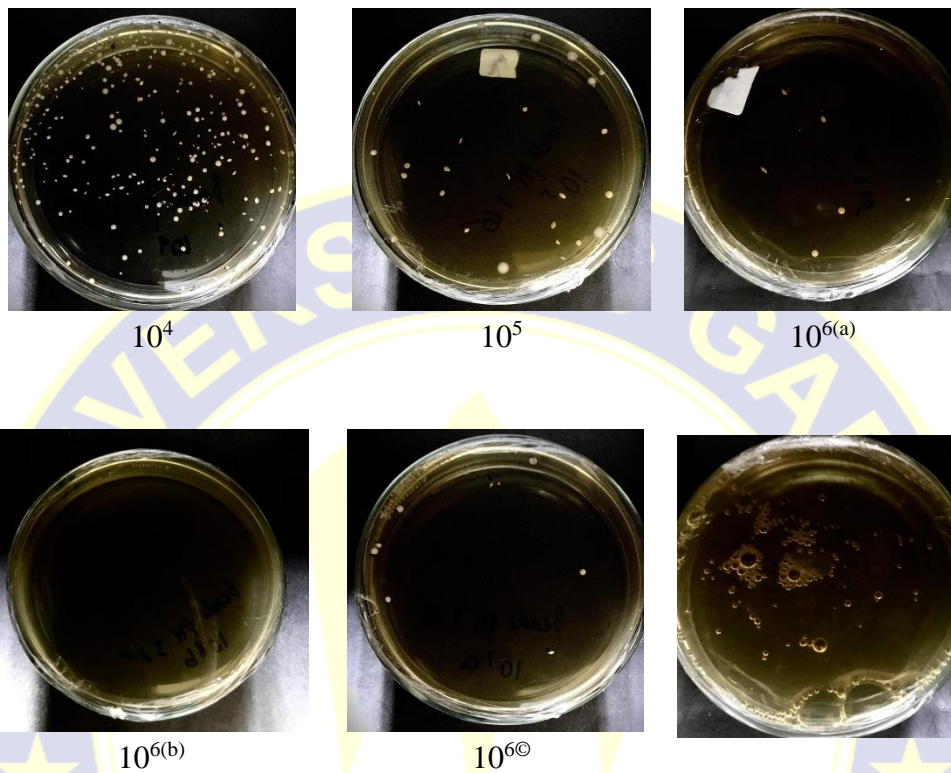
 $10^{7(c)}$ 

**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 0,6%, kemudian diinkubasi pada pH 3 selama 1 menit

 $10^1$  $10^2$  $10^3$

## LAMPIRAN 4

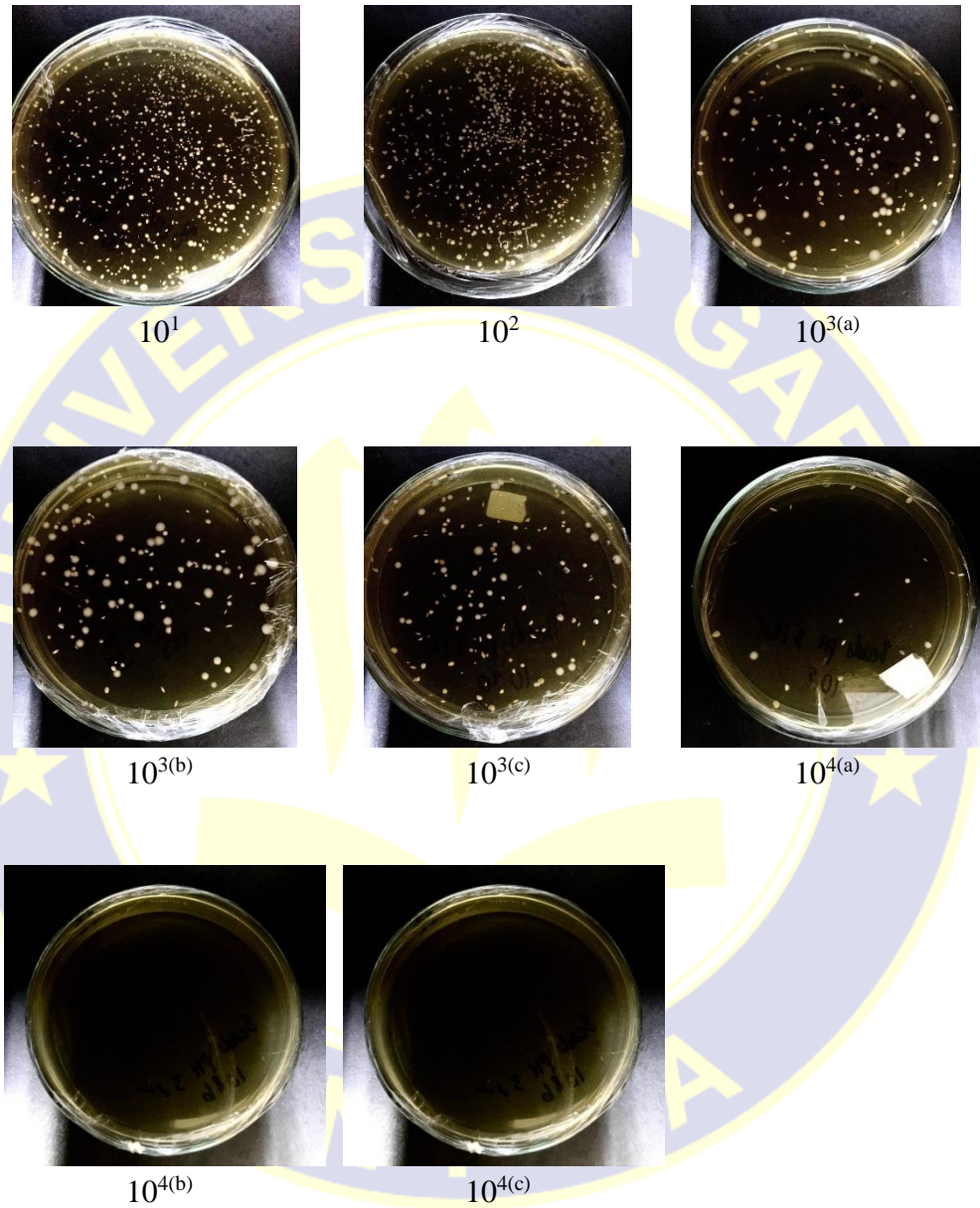
## (LANJUTAN)



**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 0,6%, kemudian diinkubasi pada pH 3 selama 60 menit

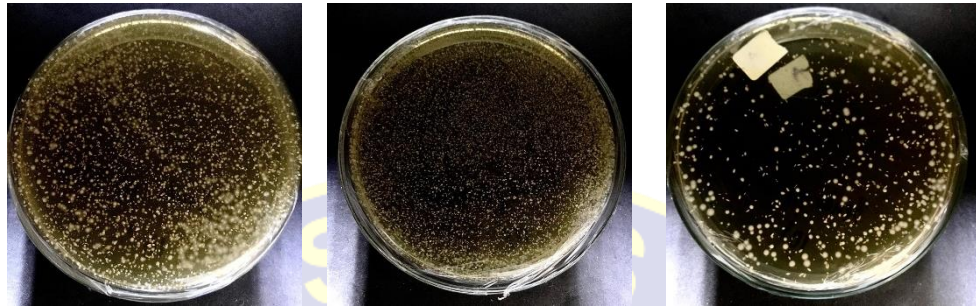
## LAMPIRAN 4

## (LANJUTAN)



**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 0,6%, kemudian diinkubasi pada pH 3 selama 120 menit

**LAMPIRAN 4**  
**(LANJUTAN)**



10<sup>1</sup>

10<sup>2</sup>

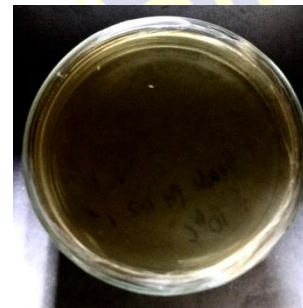
10<sup>3</sup>



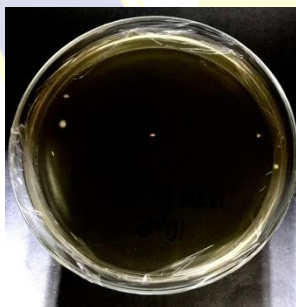
10<sup>4</sup>



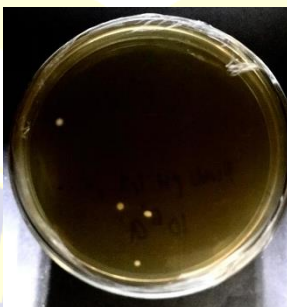
10<sup>5</sup>



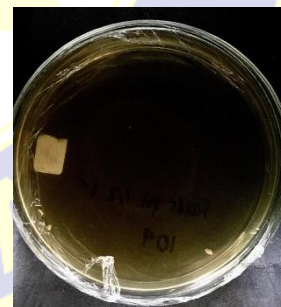
10<sup>6(a)</sup>



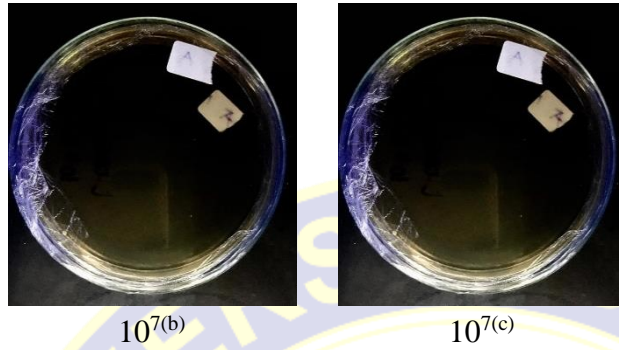
10<sup>6(b)</sup>



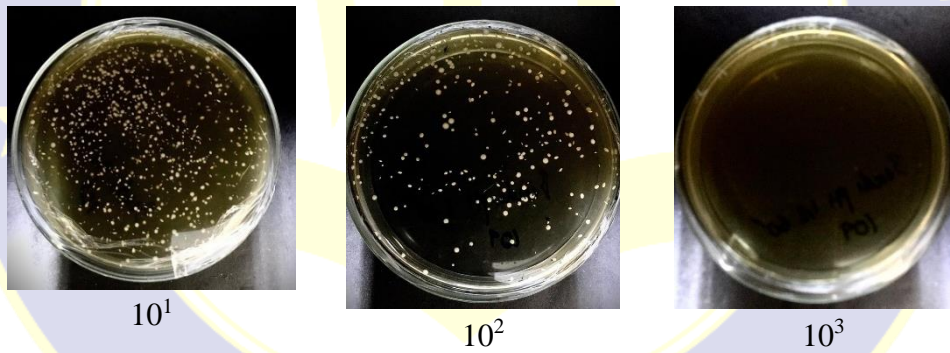
10<sup>6(c)</sup>

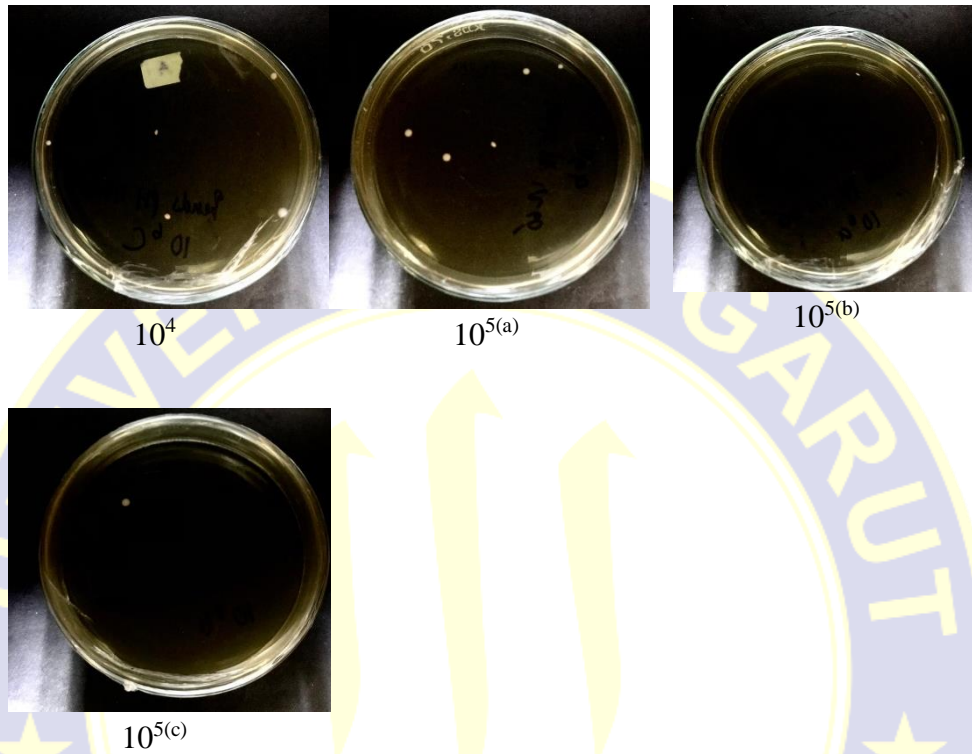


10<sup>7(a)</sup>

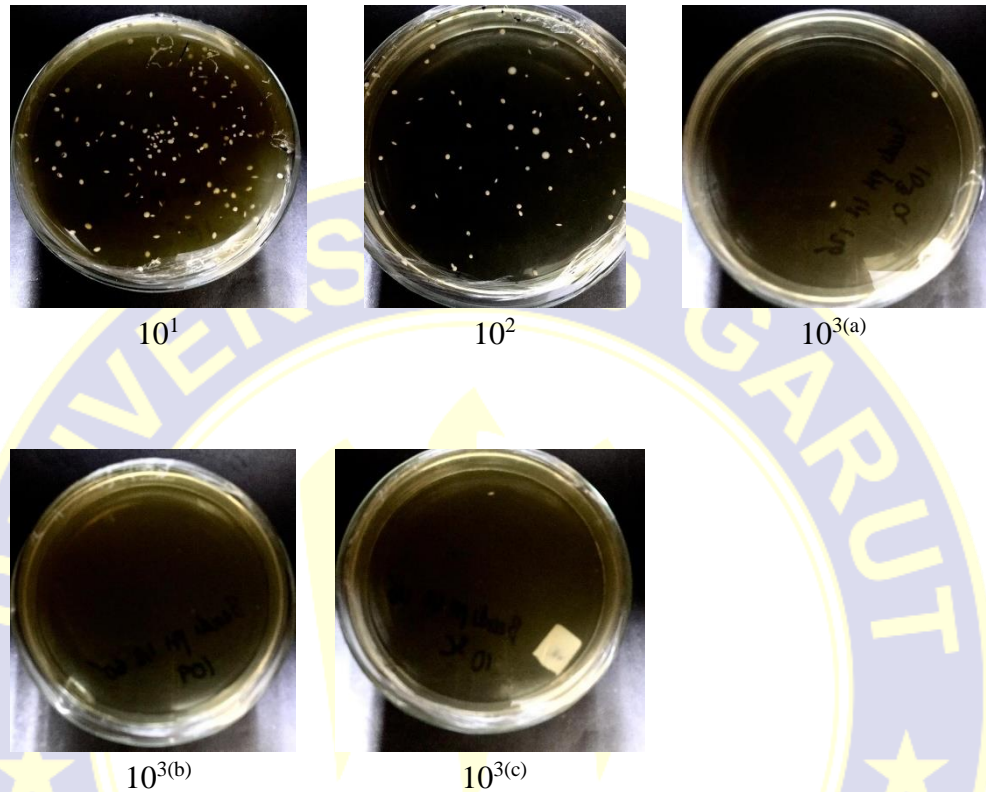
**LAMPIRAN 4****(LANJUTAN)**

**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 0,6%, kemudian diinkubasi pada pH 1,2 selama 1 menit



**LAMPIRAN 4****(LANJUTAN)**

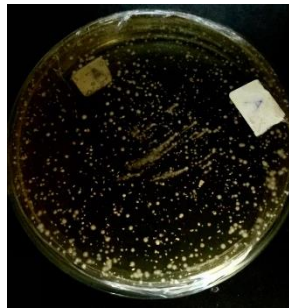
**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 0,6%, kemudian diinkubasi pada pH 1,2 selama 60 menit

**LAMPIRAN 4****(LANJUTAN)**

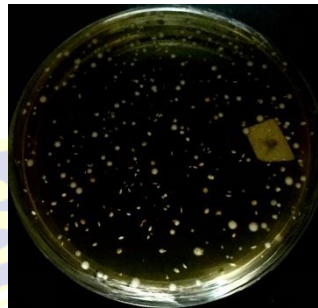
**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 0,6%, kemudian diinkubasi pada pH 1,2 selama 120 menit

LAMPIRAN 4

(LANJUTAN)



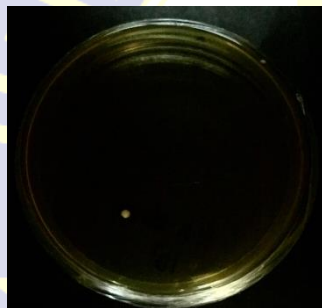
$10^3$



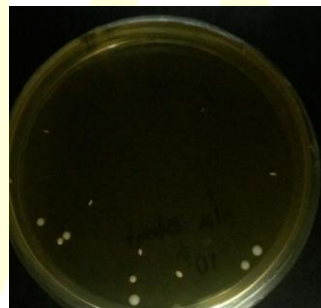
$10^4$



$10^5$



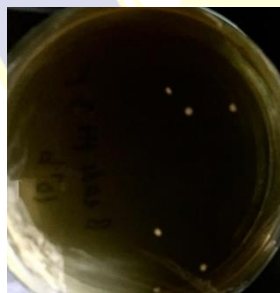
$10^6$



$10^{7(a)}$



$10^{7(b)}$



$10^{7(c)}$



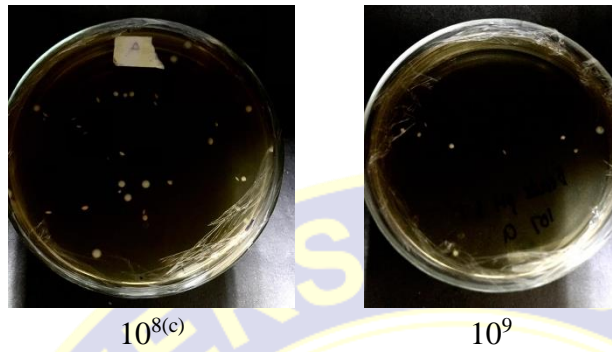
$10^{8(a)}$



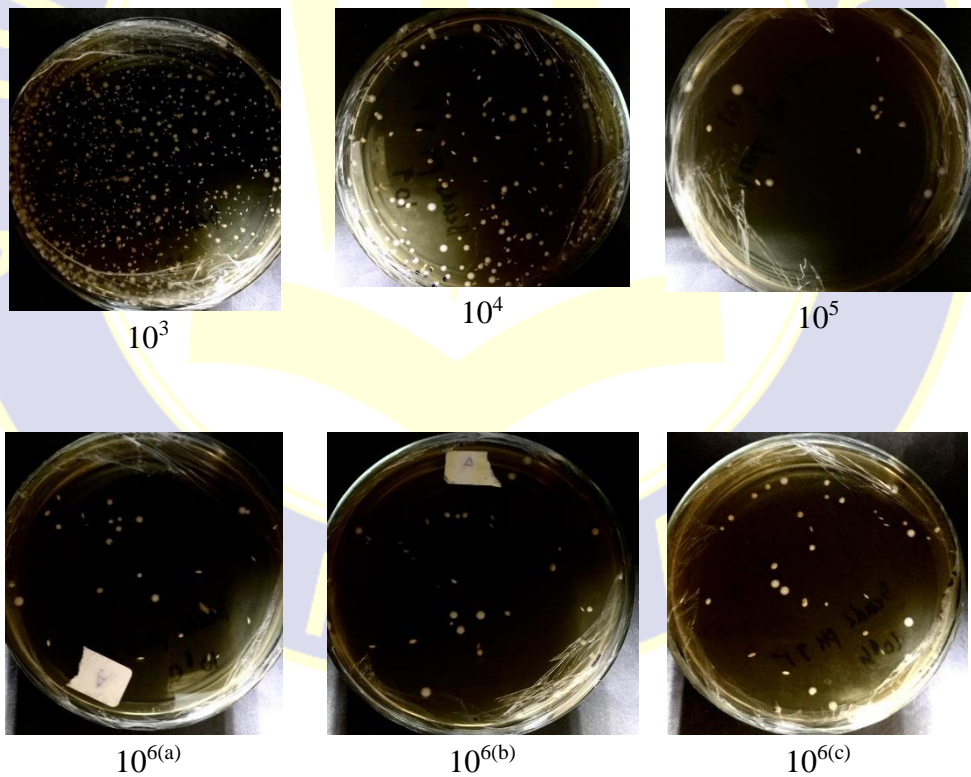
$10^{8(b)}$

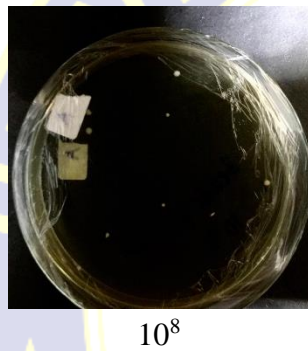
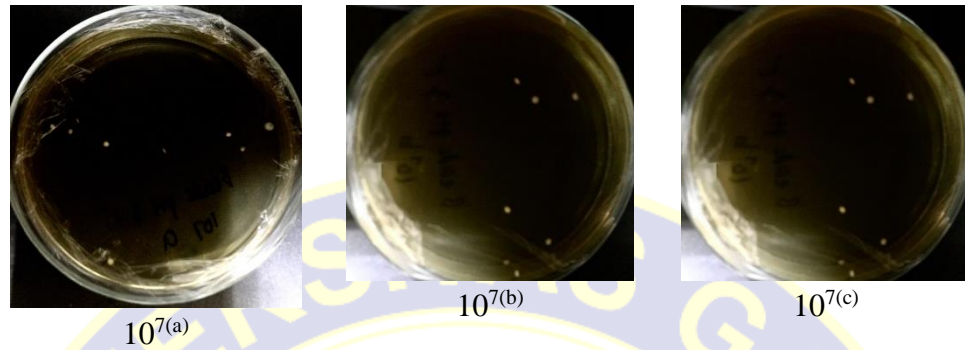
## LAMPIRAN 4

## (LANJUTAN)

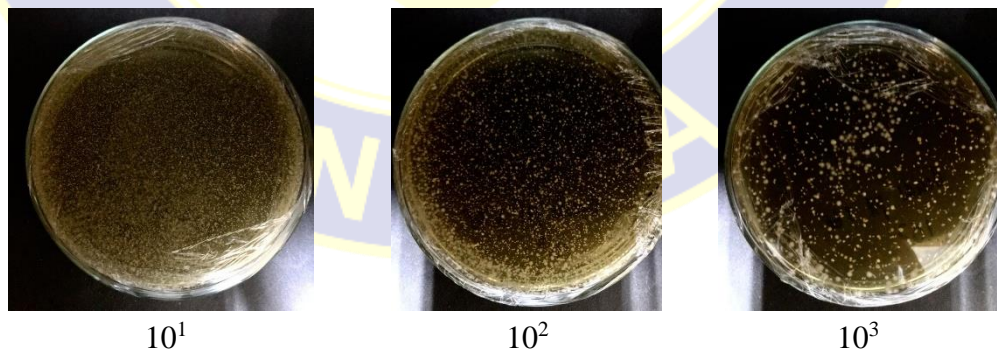


**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 1%,



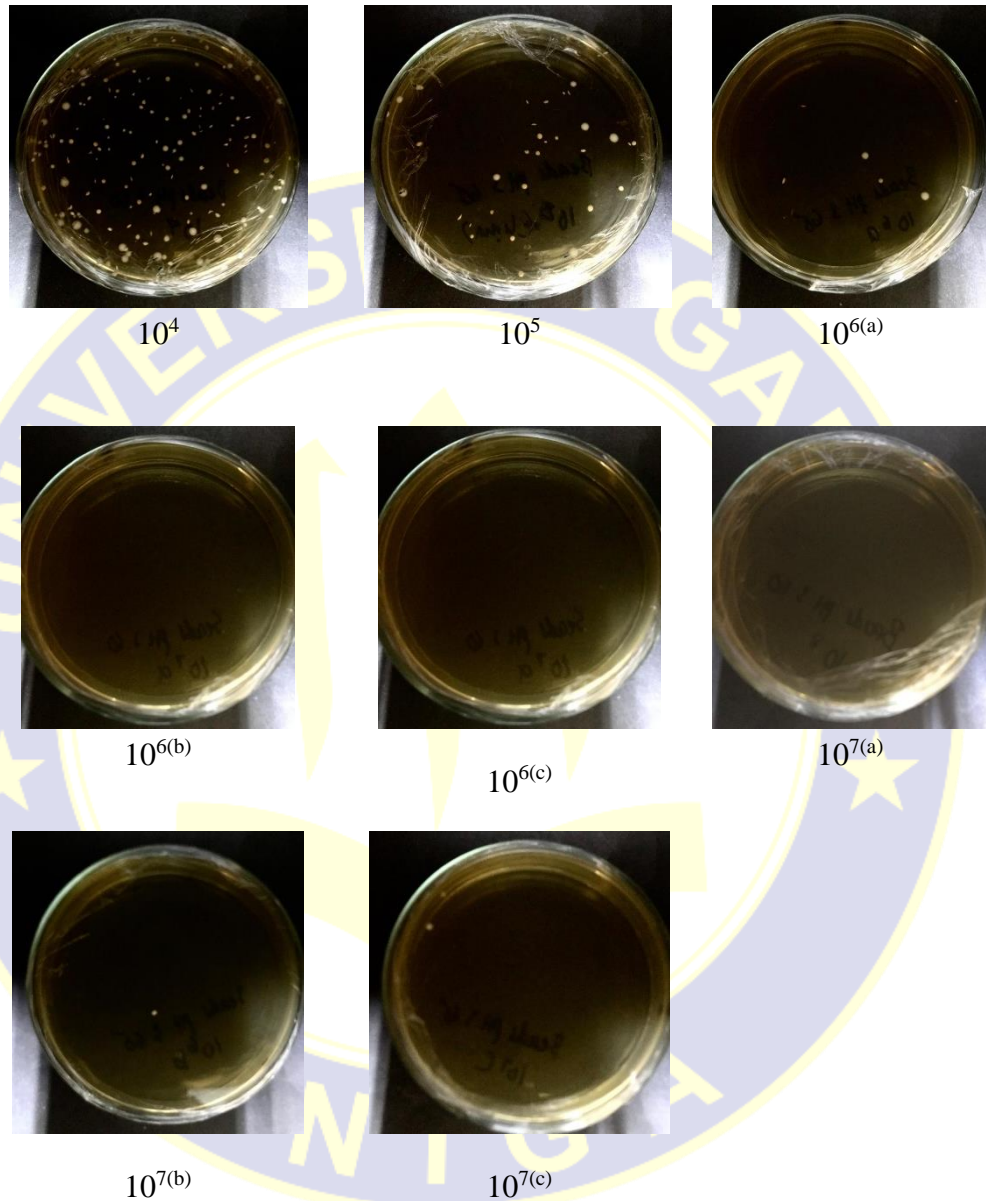
**LAMPIRAN 4****(LANJUTAN)**

**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus Sp* setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 1%, kemudian diinkubasi pada pH 3 selama 1 menit

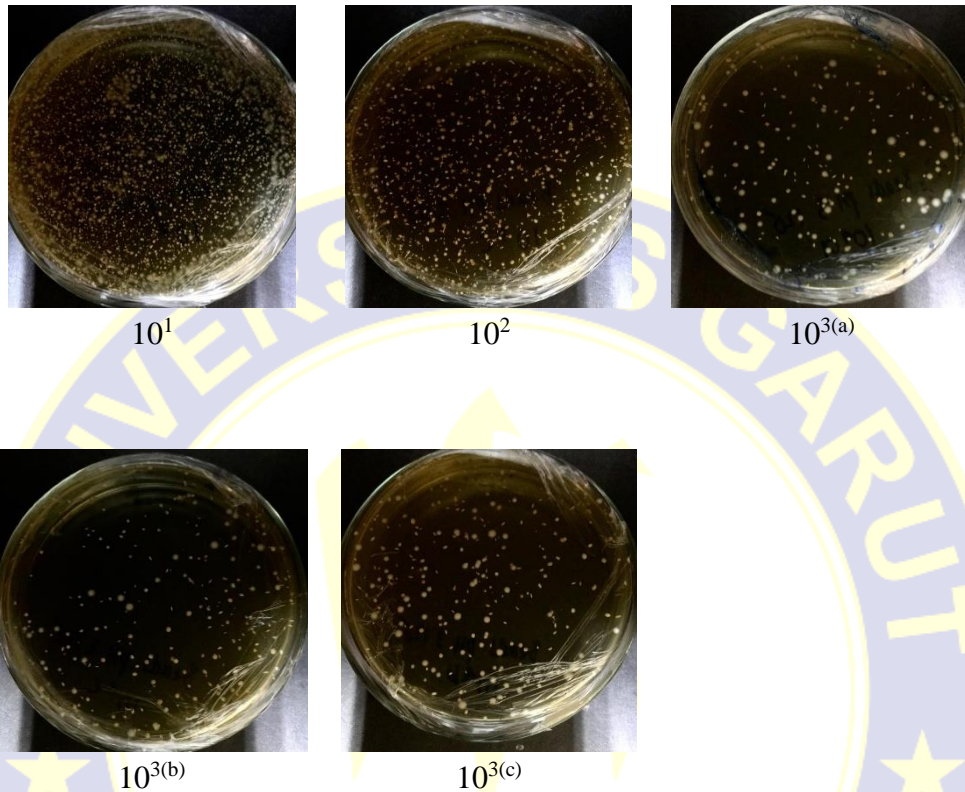


## LAMPIRAN 4

## (LANJUTAN)

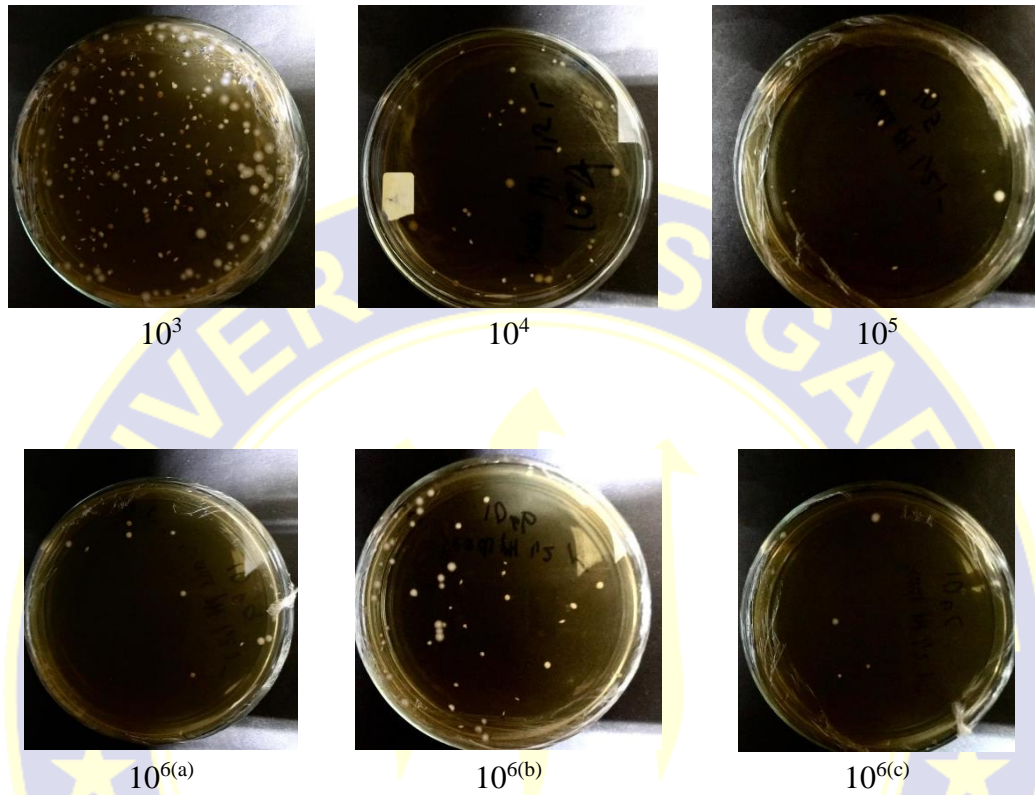


**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 1%, kemudian diinkubasi pada pH 3 selama 60 menit

**LAMPIRAN 4****(LANJUTAN)**

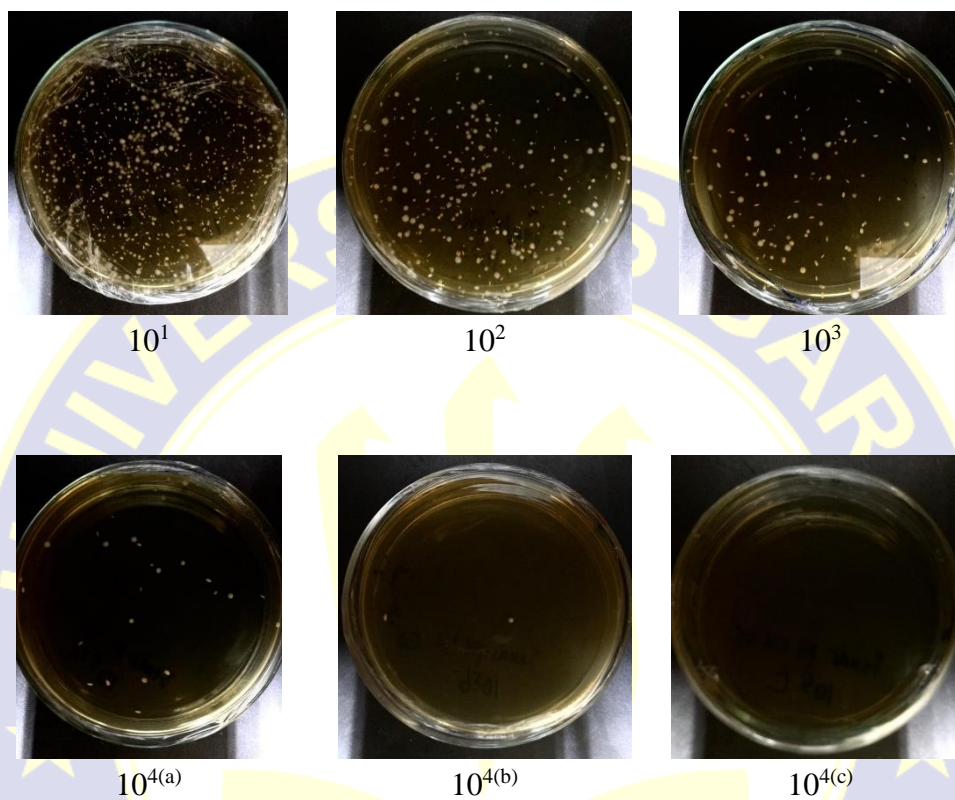
**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 1%, kemudian diinkubasi pada pH 3 selama 60 menit

**LAMPIRAN 4**  
**(LANJUTAN)**



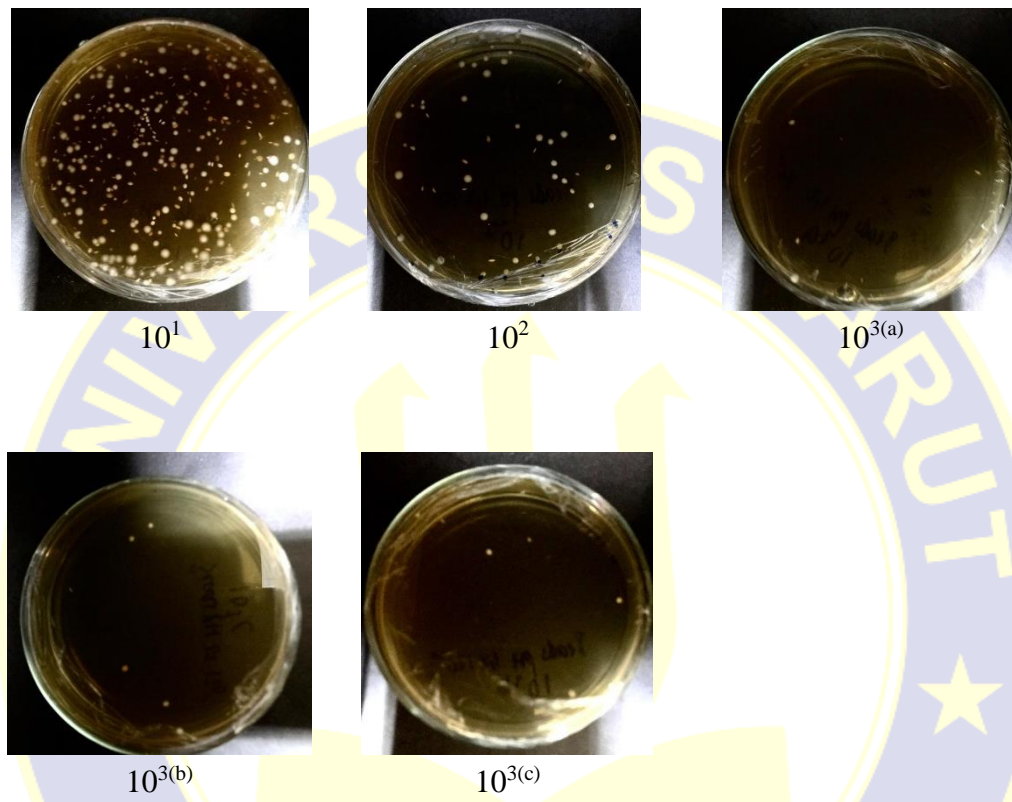
**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 1%, kemudian diinkubasi pada pH 1,2 selama 1 menit

**LAMPIRAN 4**  
**(LANJUTAN)**



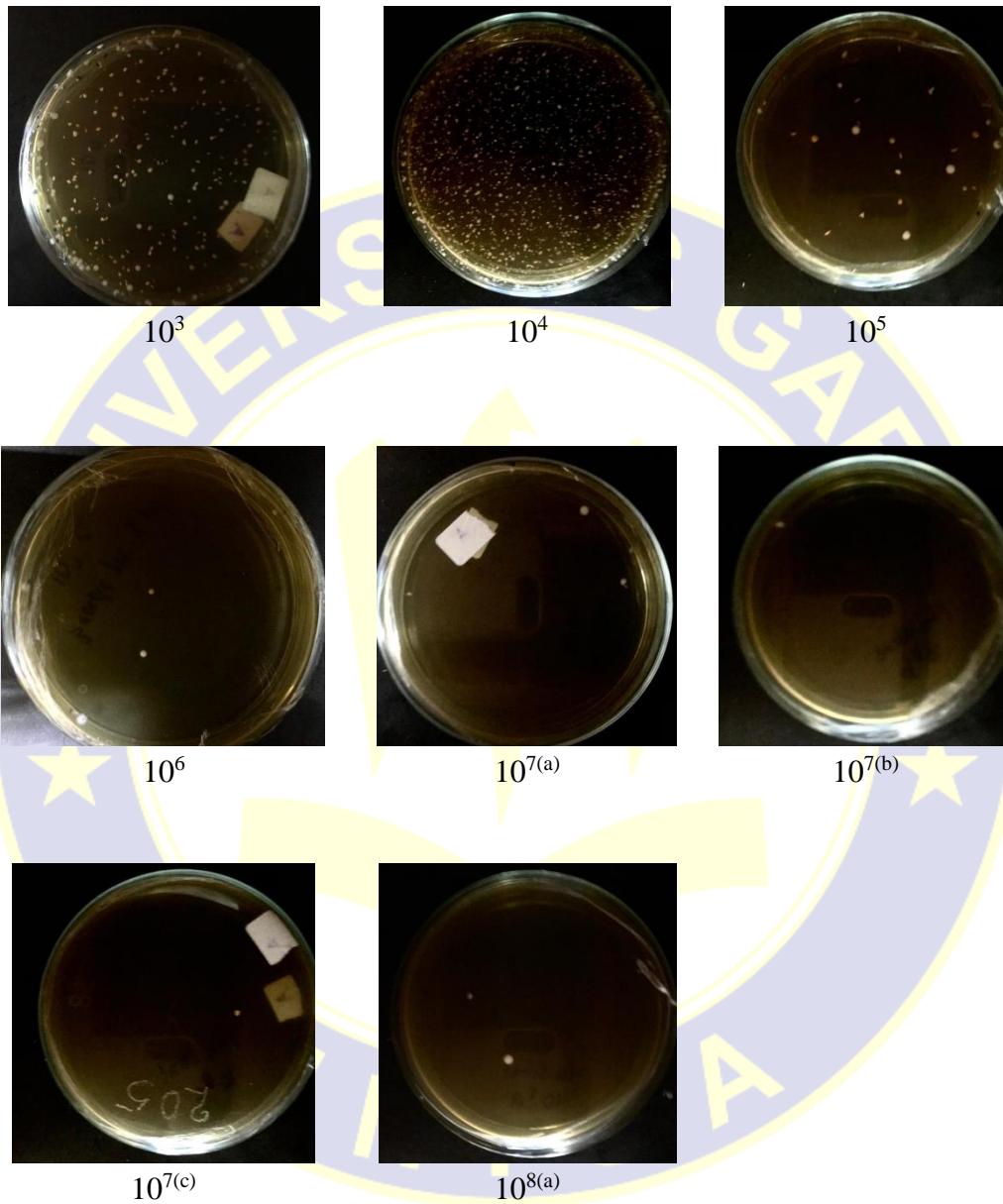
**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 1%, kemudian diinkubasi pada pH 1,2 selama 60 menit

**LAMPIRAN 4**  
**(LANJUTAN)**

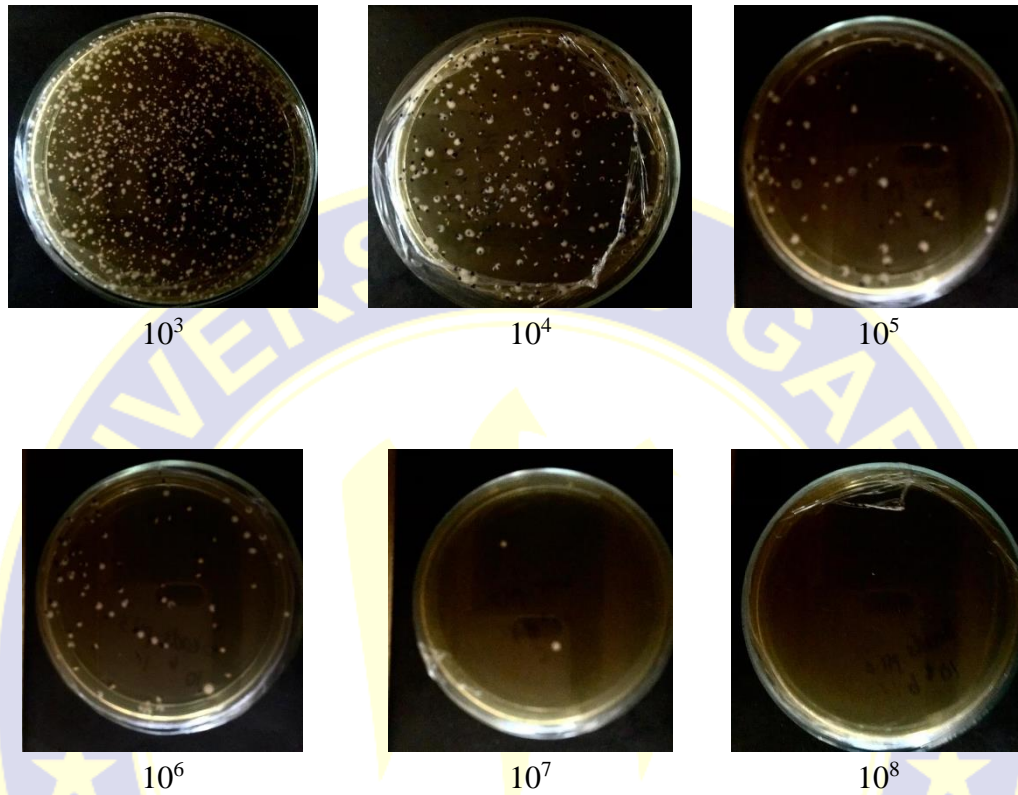


**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 1%, kemudian diinkubasi pada pH 1,2 selama 120 menit

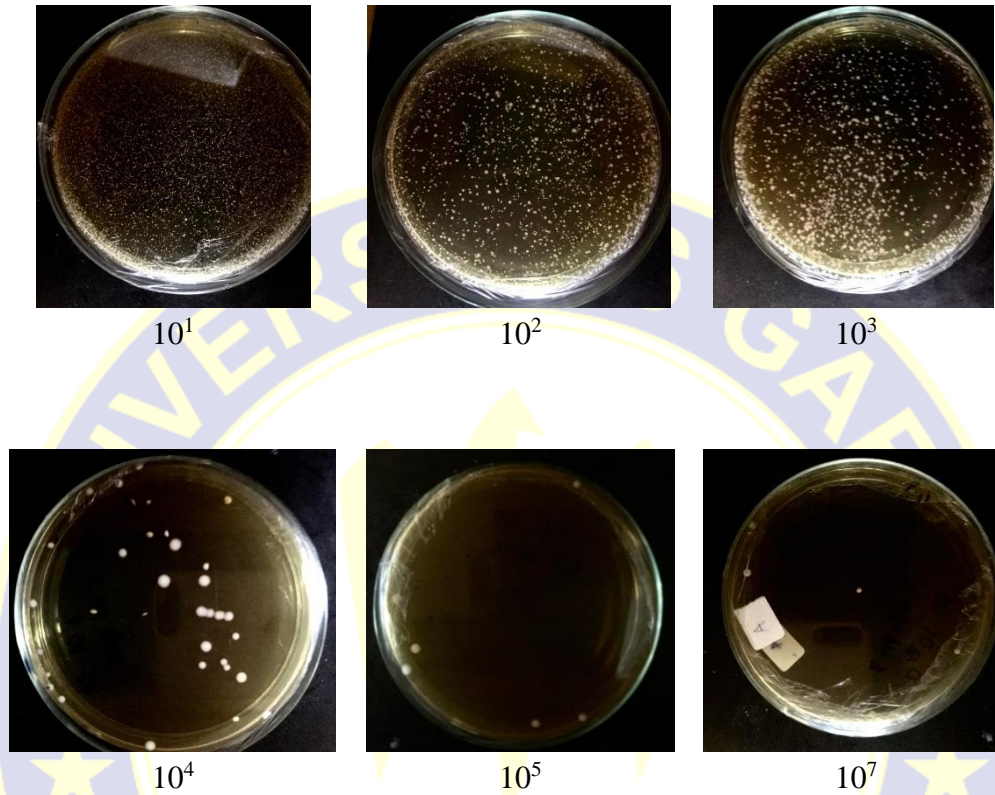
**LAMPIRAN 4**  
**(LANJUTAN)**



**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 2%

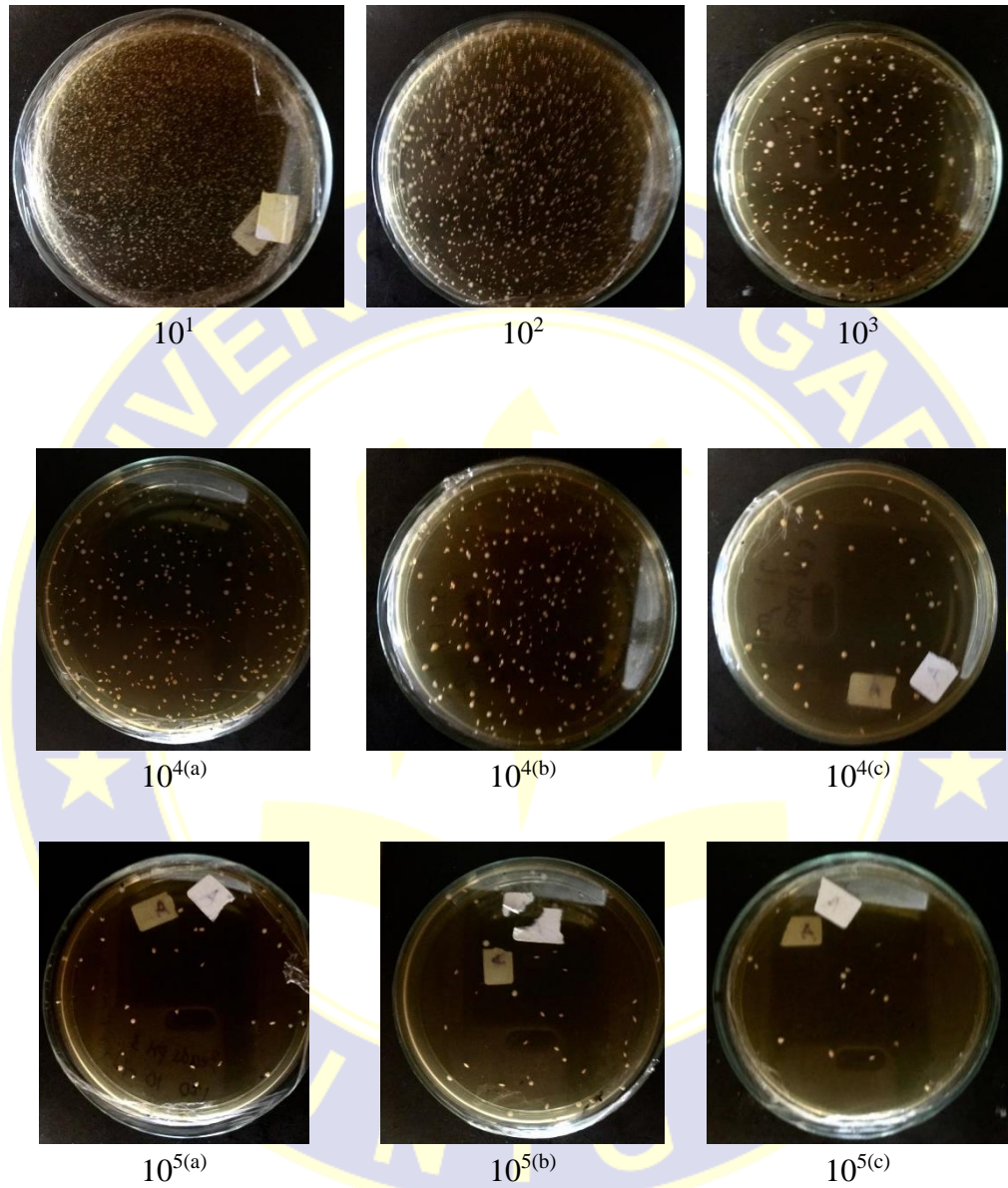
**LAMPIRAN 4****(LANJUTAN)**

**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 2%, kemudian diinkubasi pada pH 3 selama 1 menit

**LAMPIRAN 4****(LANJUTAN)**

**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 2%, kemudian diinkubasi pada pH 3 selama 60 menit

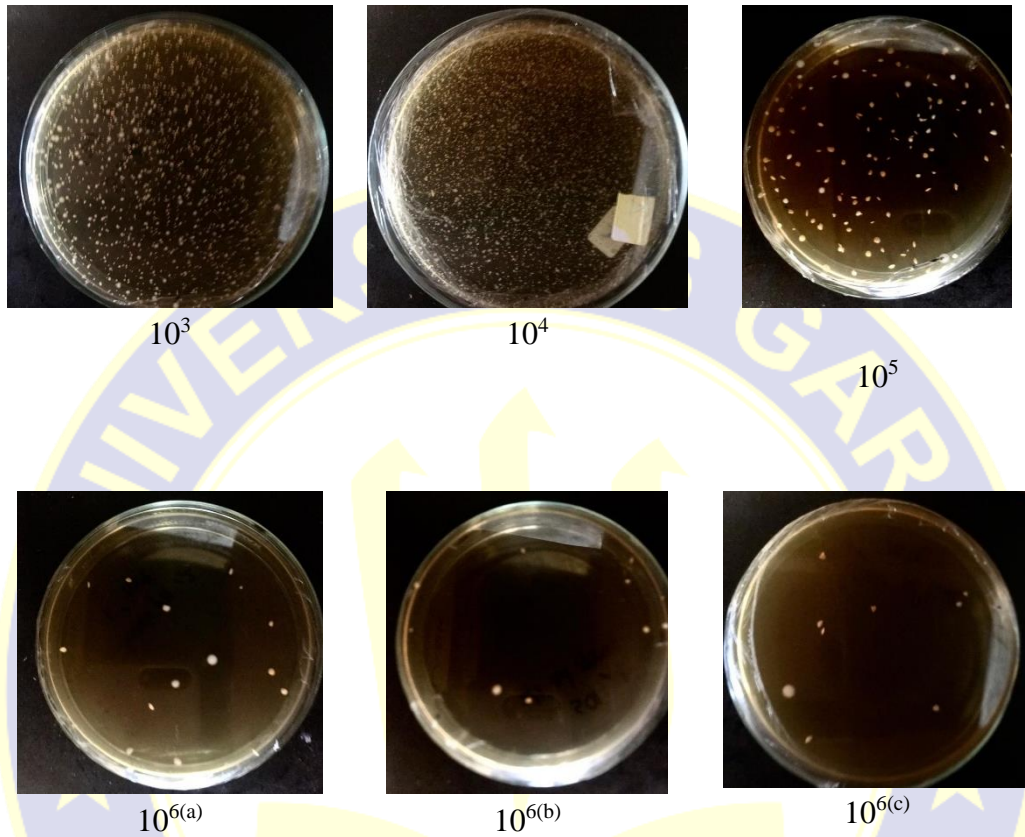
**LAMPIRAN 4**  
**(LANJUTAN)**



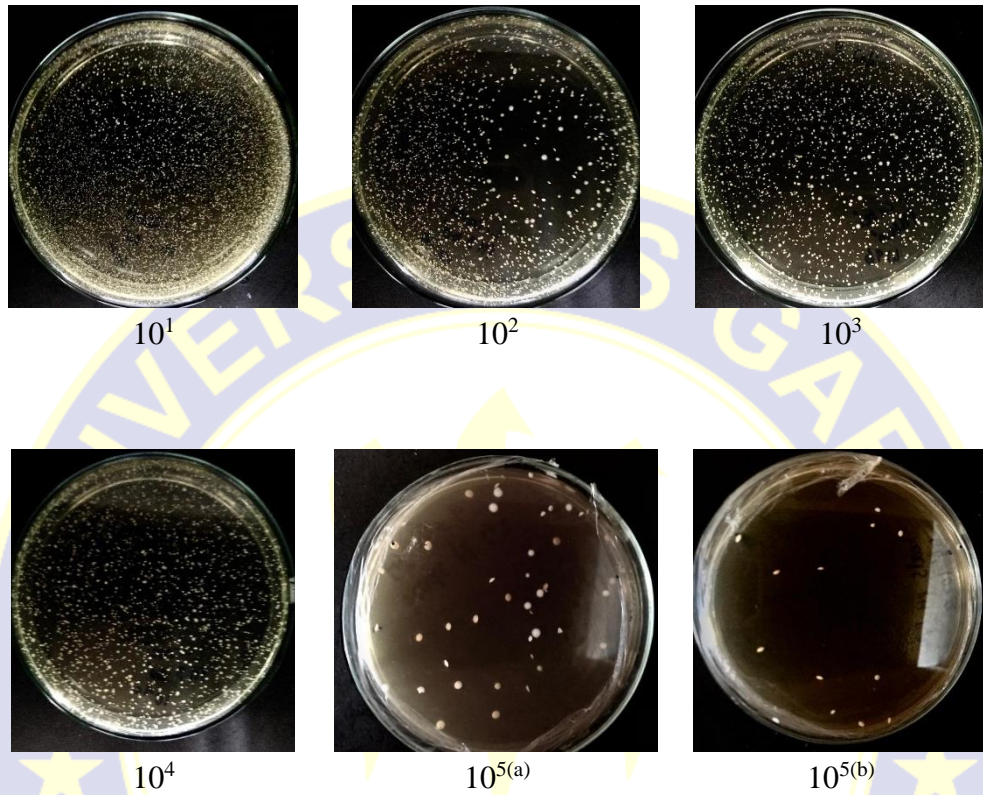
**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC Bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 2%, kemudian diinkubasi pada pH 3 selama 120 menit

## LAMPIRAN 4

## (LANJUTAN)



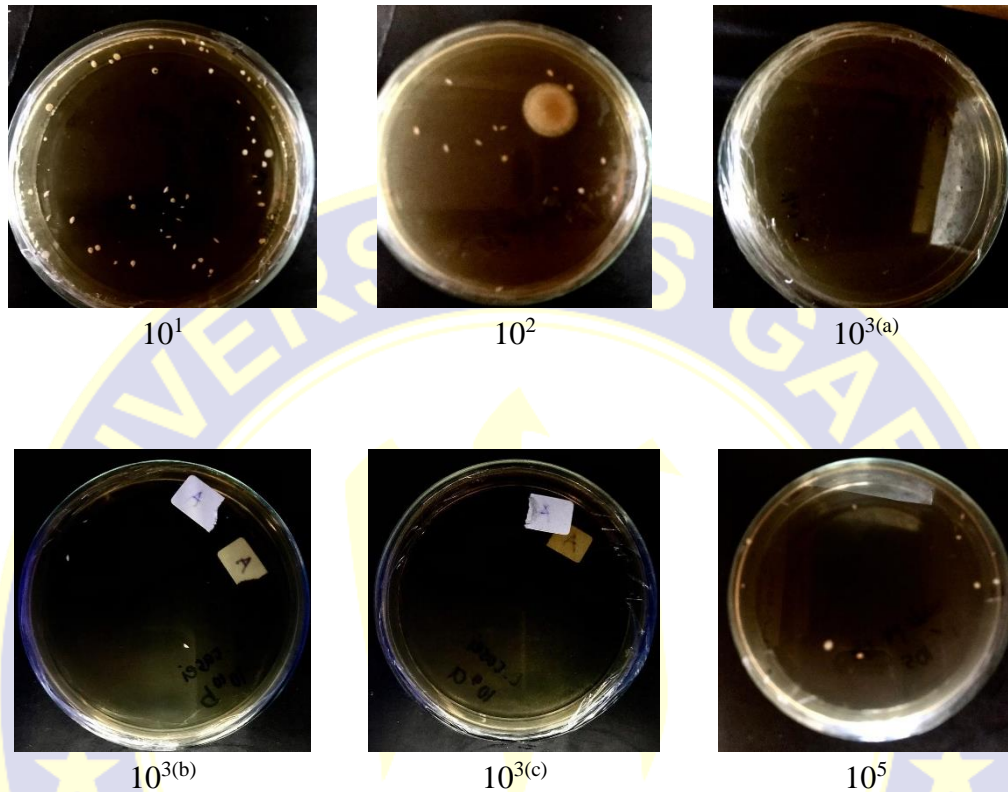
**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 2%, kemudian diinkubasi pada pH 1,2 selama 1 menit

**LAMPIRAN 4****(LANJUTAN)**

**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 2%, kemudian diinkubasi pada pH 1,2 selama 60 menit

## LAMPIRAN 4

## (LANJUTAN)



**Gambar V.2** Dokumentasi hasil TPC bakteri *Lactobacillus* Sp. setelah dilakukan enkapsulasi menggunakan Alginat 1%, Kitin 1% dan Kitosan 2%, kemudian diinkubasi pada pH 1,2 selama 120 menit

## DAFTAR RIWAYAT HIDUP



### Data Pribadi

Nama : Resty Purnamasari  
 Alamat : Kp. Cigadog, Kec. Cilawu, Desa Karyamekar,  
 RT/RW 002/008, Kab. Garut  
 Kode Pos : 44181  
 Nomor Telepon : 085322737724  
 Email : [Restyps123@gmail.com](mailto:Restyps123@gmail.com)  
 Tempat, Tanggal Lahir : Garut, 4 Desember 1998  
 Status : Belum Menikah  
 Warga Negara : Indonesia  
 Agama : Islam

### Riwayat Pendidikan

Tahun 2005 – 2011 : SDN Karyamekar 1  
 Tahun 2011 – 2014 : SMPN 1 Garut  
 Tahun 2014 – 2017 : SMAN 1 Garut  
 Tahun 2017 – 2021 : Universitas Garut

## DRAFT JURNAL

### ENKAPSULASI PROBIOTIK *Lactobacillus sp.* MENGGUNAKAN KOMBINASI BAHAN NATRIUM ALGINAT KITIN DAN TURUNANNYA

### PROBIOTIC ENKAPSULATION *Lactobacillus sp.* USING A COMBINATION OF NATRIUM ALGINATE KITIN AND DERIVATIVES

Djaenudin <sup>1)\*</sup>, Resty Purnamasari <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>

<sup>2)</sup>Fakultas MIPA-Universitas Garut, Jl. Jati No. 42b. Tarogong, Garut, Jawa Barat,  
email : [Restytps123@gmail.com](mailto:Restytps123@gmail.com)

\* Djaenudin : E-mail: [aburizki@yahoo.com](mailto:aburizki@yahoo.com)

#### ABSTRACT

*Lactobacillus sp.* is the largest genera belonging to lactic acid bacteria. *Lactobacillus sp.* cannot survive at the acidity level of the stomach (pH 1.5-2.5) and the concentration of bile salts in the digestive tract, so it is necessary to do encapsulation to increase the resistance of *Lactobacillus sp.* So that it can provide a therapeutic effect in the body according to the FAO recommendation, namely  $10^7$  CFU. Encapsulation is carried out using the extrusion technique because it is simple and inexpensive, does not cause probiotic damage, provides high probiotic viability, does not involve destructive solvents and can be carried out in aerobic and non-aerobic conditions. In addition, a storage test was carried out to determine the resistance of bacteria at temperatures of 4<sup>0</sup>C and 25<sup>0</sup>C. The encapsulation process is carried out by mixing *Lactobacillus sp.* with Na-Alginate and Nanokitin to form a suspension as an encapsulation material. The suspension formed is inserted into the syringe and pressurized by the plunger so that it is extruded in the form of free-falling droplets into the CaCl<sub>2</sub> solution and it is found that *Lactobacillus sp.* has been encapsulated. Then the microcapsules formed were coated with chitosan with a concentration of 0.2%; 0.6%, 1% and 2%. Then to determine the resistance value of *Lactobacillus sp.*, the TPC (Total Plate Count) method was

used. After encapsulating the resistance of *Lactobacillus* sp to simulated gastric acid at the most extreme pH (1.2) and the longest incubation time (120 minutes), namely  $2 \times 10^7$  CFU / gram. For resistance in simulated intestinal fluid (0.6% concentration) the resistance was at  $15 \times 10^6$  CFU / gram. For the storage test the preparation lasted for 2 weeks with a resistance value of  $4^\circ\text{C}$  ( $1 \times 10^8$ );  $37^\circ\text{C}$  ( $5 \times 10^9$ ). The resistance was taken from the best formulations, namely 1% Alginate, 1% Nanokitin and 2% Chitosan. Thus, *Lactobacillus* sp. this has the potential to be used as a probiotic agent.

**Keywords:** *Bile Salt, Encapsulation, Nanokitin, Probiotics, Viability*

### ABSTRAK

*Lactobacillus* sp. merupakan genera terbesar yang termasuk ke dalam bakteri asam laktat. *Lactobacillus* sp. tidak dapat bertahan hidup pada tingkat keasaman lambung (pH 1,5-2,5) dan konsentrasi garam empedu pada saluran cerna, sehingga perlu dilakukan enkapsulasi untuk meningkatkan ketahanan *Lactobacillus* sp. Sehingga dapat memberikan efek terapeutik dalam tubuh sesuai dengan anjuran FAO yaitu  $10^7$  CFU. Enkapsulasi yang dilakukan menggunakan teknik ekstruksi karena sederhana dan murah, tidak menimbulkan kerusakan probiotik, memberikan viabilitas probiotik yang tinggi, tidak melibatkan pelarut yang merusak dan dapat dilakukan dalam kondisi aerob dan nonaerob. Selain itu dilakukan uji penyimpanan untuk mengetahui ketahanan bakteri pada suhu  $4^\circ\text{C}$  dan  $25^\circ\text{C}$ . Proses enkapsulasi dilakukan dengan cara mencampurkan *Lactobacillus* sp dengan Na-Alginat dan Nanokitin sehingga membentuk suspensi sebagai bahan enkapsulasi. Suspensi yang terbentuk dimasukkan ke dalam jarum suntik dan diberikan tekanan oleh *plunger* sehingga terekstrusi dalam bentuk tetesan yang jatuh bebas kedalam larutan  $\text{CaCl}_2$  dan didapatkan *Lactobacillus* sp sudah terenkapsulasi. Kemudian mikrokapsul yang terbentuk dilapisi kitosan dengan konsentrasi 0,2%; 0,6%, 1% dan 2%. Kemudian untuk mengetahui nilai ketahanan *Lactobacillus* sp dilakukan metode TPC (Total Plate Count). Setelah dilakukan enkapsulasi ketahanan *Lactobacillus* sp terhadap cairan simulasi asam lambung pada pH paling ekstrem (1,2) dan waktu inkubasi paling lama (120 menit) yaitu  $2 \times 10^7$  CFU/gram. Untuk ketahanan di dalam simulasi cairan usus

(konsentrasi 0,6%) ketahanannya ada pada  $15 \times 10^6$  CFU/gram. Untuk uji penyimpanan sediaan tersebut bertahan selama 2 minggu dengan nilai ketahanan  $4^{\circ}\text{C}$  ( $1 \times 10^8$ );  $37^{\circ}\text{C}$  ( $5 \times 10^9$ ). Ketahanan tersebut diambil dari formulasi terbaik yaitu Alginat 1%, Nanokitin 1% dan Kitosan 2%. Dengan demikian isolat *Lactobacillus* sp. ini berpotensi untuk dapat dimanfaatkan sebagai agensia probiotik.

**Kata Kunci :** *Bile Salt, Enkapsulasi, Nanokitin, Probiotik, Viabilitas*



## PENDAHULUAN

Probiotik adalah suatu suplemen yang mengandung bakteri berguna, dimana bakteri yang paling banyak digunakan untuk probiotik tersebut adalah Bakteri Asam Laktat (BAL). Pangan probiotik yang telah lama dikenal antara lain produk susu fermentasi oleh bakteri asam laktat seperti yoghurt, susu asidofilus, dan lain-lain. Selain mempunyai nilai nutrisi yang baik, produk tersebut dianggap memberi manfaat kesehatan dan terapeutik, alasannya karena terbawanya bakteri-bakteri hidup ke dalam saluran pencernaan yang mampu memperbaiki komposisi mikroflora usus sehingga mengarah pada dominansi bakteri-bakteri yang menguntungkan kesehatan. (Yuniastuti Ari, 2019)

Bakteri Asam Laktat (BAL) terdiri dari 4 genus yaitu: *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, dan *Lactobacillus* ("Pato 2003," 2004) Bakteri *Lactobacillus sp.* merupakan strain bakteri asam laktat yang tidak dapat bertahan hidup dalam keadaan asam seperti pada kondisi asam lambung (pH 1,5-2,5) dan selama proses pengolahan pada suhu tinggi. (Goldin, 1998) Sehingga untuk dapat bertahan hidup saat melewati lambung dan berkoloni di usus diperlukan penambahan zat pembawa agar probiotik berfungsi sehingga bisa bertahan hidup saat melewati lambung dan berkoloni di usus. (Mandal et al., 2006) Menurut FAO/WHO (2001) nilai minimum yang harus dipenuhi sekitar  $10^6$  -  $10^7$  CFU (Colony Forming Units)/gram bakteri dalam sediaan probiotik yang dapat berkoloni di usus. (Setijawati et al., 2014)

Salah satu upaya agar tidak terjadinya kerusakan dan pengurangan jumlah bakteri asam laktat yaitu dengan melakukan metode enkapsulasi. (Hernández-Carranza et al., 2013) Enkapsulasi adalah suatu proses pembungkusan atau disebut juga sebagai coating suatu bahan inti, dan dalam hal ini bahan inti yang digunakan adalah probiotik *Lactobacillus sp.*

Polimer yang akan digunakan untuk proses enkapsulasi ini adalah dengan menggunakan Na-Alginat, Nanokitin 1%, dan Kitosan yang digunakan sebagai lapisan pelindung paling luar. Alginat menjadi salah satu biopolimer yang paling umum digunakan dalam enkapsulasi. Keuntungannya adalah tidak toksik, membentuk matriks gel untuk menjerap mikroba dengan larutan  $\text{CaCl}_2$  dan murah. (Cook et al., 2013) Penambahan alginat dapat memperbaiki struktur ikatan silang

kitosan dalam gel sehingga ikatan silang menjadi lebih kaku dan gel menjadi lebih kuat. Makin tinggi nilai kekuatan pecah gel, makin kaku dan makin kuat ikatan yang terjadi antara polimer-polimer yang membentuk jaringan gel tersebut. (Sugita et al., 2015) Kitin merupakan polimer yang memiliki rantai panjang yang tidak bercabang. 2 asetamida-2 deoksi-D-glukopiranososa merupakan nama lain untuk kitin. Senyawa kitin dibentuk oleh unit unit penyusun yang bergabung satu sama lain melalui suatu ikatan (1- $\rightarrow$ 4) $\beta$ . (Mekawati, 2000) Polimer kitin dalam proses enkapsulasi digunakan sebagai pelindung enkapsulasi dan pengisi pori-pori pada alginat. Kitosan merupakan biopolymer yang dihasilkan dari proses deasetilasi senyawa kitin menggunakan alkali kuat. (Mekawati, 2000) Kitosan dalam proses enkapsulasi digunakan sebagai penyalut dan pengisi pori-pori pada alginat. (Sugita et al., 2015)

Pada penelitian Ayuningtyas 2015, dilakukan proses enkapsulasi dengan menggunakan probiotik *Bifidobacterium longum BF-1* berlapis kitosan dan nano alginat. Kemudian diuji ketahanannya dalam cairan asam lambung dan simulasi di dalam usus halus, diperoleh hasilnya bahwa penelitian yang telah dilakukannya dapat mempertahankan viabilitas probiotik yang lebih baik dibandingkan dengan sel probiotik tanpa enkapsulasi dengan  $P < 0,05$  dengan populasi akhir yang di dapatkannya  $> 7 \log \text{ cfu/mL}$ . (Ayuningtyas, 2015)

Kemudian dari penelitian Pradikaningrum 2015, dilakukan enkapsulasi dengan menggunakan probiotik menggunakan *Lactobacillus casei* menggunakan kitosan dengan berbagai macam konsentrasi diantaranya 2%; 2,5%, dan 3% dengan kepadatan jumlah sel  $1,8025 \times 10^5$  koloni/g;  $> 30$  koloni/g belum mampu mempertahankan sel *Lactobacillus casei* yang dinkubasi dalam simulasi cairan lambung pH 1,5 selama 120 menit. (Pradikaningrum, 2015)

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan sebelumnya, untuk meningkatkan ketahanan bakteri dalam cairan lambung dan agar bakteri dapat tersampaikan dengan baik pada usus maka penulis memutuskan untuk melakukan penelitian mengenai enkapsulasi probiotik *Lactobacillus sp.* menggunakan bahan campuran yang mengandung nano kitin 1%.

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui viabilitas/ ketahanan probiotik dalam lambung pada pH 3 dan 1,2 agar dapat tersampaikan ke usus kemudian melihat morfologi, dan bentuk dimensi *Lactobacillus sp* yang telah terenkapsulasi

menggunakan bahan 3 campuran nano kitin 1% pada simulasi cairan asam lambung menggunakan SEM (Scanning Electron Microscopy).

Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai enkapsulasi probiotik *Lactobacillus sp.* menggunakan bahan campuran yang mengandung nano kitin 1 %.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya seperti : *Lactobacillus casei*, larutan HCl 0,5 M, NaCl 0,2%, NaCl 0,9%, aquades, Na-sitrat 1%, alkohol, aseton, spiritus, MRS Broth, MRS Agar, Na-alginat 1%, larutan CaCl<sub>2</sub> 0,1 M, aquades steril, padatan kitosan dan padatan nano kitin.

### Pembuatan Media MRS Broth (*DeMan Rogosa Sharpe*)

Sejumlah 52 gram serbuk MRS Broth ditimbang kemudian dilarutkan dengan 1 liter air aquadest dan dipanaskan sampai larut pada suhu 60°C. Kemudian media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah dikeluarkan dari autoklaf media didiamkan beberapa saat. (Bridson, 2006)

### Pembuatan Media MRS Agar (*DeMan Ragosa Sharpe*)

Sejumlah 68,2 gram serbuk MRS Agar ditimbang dan dilarutkan dengan 1 liter aquadest dan dipanaskan sampai larut. Kemudian media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah dikeluarkan dari autoklaf, media didiamkan beberapa saat. (Bridson, 2006)

### Peremajaan Biakan Murni Bakteri *Lactobacillus sp.*

Peremajaan biakan murni bakteri *Lactobacillus sp.* pada media MRS Agar dilakukan dengan cara menggoreskan satu sampai dua ose bakteri *Lactobacillus sp* secara zigzag pada media MRS Agar miring didalam tabung reaksi steril. Kemudian mulut tabung media ditutup dengan kapas. Setelah itu biakan bakteri *Lactobacillus sp* diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator selama 48 jam sehingga didapatkan kultur *stock*. (Li et al., 2011)

## Preparasi Larutan Enkapsulasi

### 1. Pembuatan Suspensi Bakteri *Lactobacillus sp*

Sebanyak satu sampai dua ose kultur *stock lactobacillus sp* dimasukkan ke dalam 50 mL MRS Broth, kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* selama 48 jam dengan kecepatan 120 rpm dan suhu 37°C. (Li et al., 2011)

Kemudian dilakukan perhitungan jumlah koloni pada suspensi bakteri *Lactobacillus sp* dengan cara pengenceran hingga  $10^{10}$  cfu/mL. Pengenceran dilakukan dengan cara dipipet 1 mL suspensi *Lactobacillus sp* menggunakan mikropipet kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi 9 mL Pepton 0,1% steril kemudian divortex. Setelah itu suspensi *Lactobacillus sp* yang telah dilakukan pengenceran kemudian diambil sebanyak 1000  $\mu$ L dengan menggunakan mikropipet, kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Setelah itu masukkan MRS Agar steril. Perhitungan sel bakteri menggunakan metode *plate count*. Setelah itu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. (Woraharn et al., 2010)

Jumlah bakteri dihitung dengan rumus: (Woraharn et al., 2010)

$$\text{Cfu/mL} = \frac{\text{rata-rata total koloni}}{\text{Volume yang disebar ke dalam cawan petri x faktor pengenceran}}$$

#### Pembuatan Larutan Kitosan

Pembuatan larutan kitosan dibuat dalam empat konsentrasi, yaitu konsentrasi 0,2%; 0,6%; 1%, dan 2%. Untuk konsentrasi 0,2% kitosan ditimbang sebanyak 0,2 gram, konsentrasi 0,6% kitosan ditimbang sebanyak 0,6 gram, untuk konsentrasi 1% ditimbang sebanyak 1 gram dan untuk konsentrasi 2% kitosan ditimbang sebanyak 2 gram. Kemudian keempat konsentrasi kitosan tersebut dilarutkan dengan asam asetat 1% steril sebanyak 100 mL. (Chen et al., 2002)

#### Pembuatan Larutan Natrium Alginat

Sebanyak 1 gram Natrium Alginat ditimbang kemudian dilarutkan dengan aquadest yang telah dihangatkan pada suhu 60°C sebanyak 100 mL. Kemudian Natrium Alginat dilarutkan sambil diaduk dalam keadaan hangat hingga larut sempurna, kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. (Li et al., 2011)

#### Pembuatan Larutan Nanokitin

Nano kitin dibuat dengan cara melarutkan 0,1 gram kitin dalam 100 mL Aquabidesh kemudian dimasukkan ke dalam ultrasonikator dengan amplitude 70% selama 6 jam dan akan dihasilkan nanokitin endapan sebanyak 0,05 gram.

#### **Pembuatan Larutan $\text{CaCl}_2$ 0,1 M**

Sebanyak 32 gram kalsium klorida ditimbang kemudian dilarutkan dengan aquadest sebanyak 1 liter, kemudian setelah larut sempurna larutan  $\text{CaCl}_2$  0,1 M disterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$ , tekanan 1 atm selama 15 menit. (Li et al., 2011)

#### **Pembuatan Larutan Buffered Peptone Water 0,1%**

Sebanyak 0,1 gram buffered peptone water ditimbang. Kemudian dilarutkan dengan aquadest sebanyak 100 mL, kemudian setelah larut sempurna larutan peptone disterilkan dengan cara melewatkan larutan melalui *syringe filter*. (Li et al., 2011)

#### **Proses Enkapsulasi**

Sebanyak 0,40 gram Natrium Alginat dilarutkan dalam 40 mL air suling dan sebanyak 0,05 gram nanokitin dilarutkan dalam 5 mL aquadest yang telah ditambahkan 5 mL bakteri *Lactobacillus sp* untuk mencapai konsentrasi akhir bahan kapsul 0,05 g/50 mL. (Li et al., 2011)

Sebanyak 50 mL larutan bahan pengapsul (alginat nanokitin dan suspensi bakteri) dimasukkan ke dalam *syringe* 60 mL. Kemudian di pumping pada ekstrusi dengan 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  $\text{CaCl}_2$  0,1 M dengan pengadukan selama 30 menit, jarak antara ujung ekstruder dengan larutan kurang lebih 6 cm. Kemudian mikrokapsul tersebut disaring dengan kertas saring *Whatman* No.40 dalam *Laminar Air Flow*. Mikrokapsul yang diperoleh dilarutkan dalam 50 mL larutan kitosan (1,2%; 1,6%; dan 2%) dan diaduk selama 15 menit dalam *Laminar Air Flow*. Kemudian mikrokapsul disaring, ditiriskan, dikumpulkan dan ditimbang. (Li et al., 2011)

#### **Perhitungan *Lactobacillus sp* yang Terenkapsulasi**

Sebanyak 1 gram mikrokapsul *Lactobacillus sp* ditambahkan dengan 9 mL natrium sitrat 1% kemudian distirer selama 2 jam untuk masing-masing formula. Setelah

itu dilakukan pengenceran dengan larutan pepton 0,1% steril, diambil 100 mikro liter lalu dipindahkan ke media MRS Agar dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.(Benderska et al., 2012) kepadatan bakteri setiap 1 gram yang terbentuk dihitung dengan rumus : (Benderska et al., 2012)

$$\text{Jumlah Sel/gram} = \frac{\text{Jumlah Koloni}}{\text{Volume yang disebar kedalam cawan petri x faktor pengenceran}}$$

### **Proses Perendaman Mikrokapsul Mengandung Probiotik dalam Larutan Asam Lambung Simulasi**

Pembuatan larutan asam lambung simulasi dibuat dua variasi pH, yaitu pH 3 dan pH 1,2. Sebanyak 0,2 gram NaCl dilarutkan dalam 100 mL aquades, kemudian diasamkan dengan HCl 0,5 M hingga pH 3 dan pH 1,2 lalu dipipet masing-masing larutan pH sebanyak 9 mL larutan dan disimpan dalam tabung reaksi. Setelah itu, dimasukkan 1 gram mikrokapsul ke dalam tabung reaksi tersebut dan dilakukan inkubasi dengan variasi waktu perendaman yaitu 1 menit, 60 menit, dan 120 menit. Setelah mikrokapsul direndam dengan variasi waktu, mikrokapsul disaring dengan menggunakan kertas saring Whatmann No.40 mikrokapsul yang tersaring dimasukkan ke dalam larutan Na-sitrat 1% sebanyak 9 mL kemudian diaduk selama 2 jam untuk diuji viabilitas dan survivabilitas.(Sandoval-Castilla et al., 2010)

### **Uji Viabilitas Probiotik Hasil Enkapsulasi**

Mikrokapsul hasil enkapsulasi ditimbang sebanyak 1 gram dalam *Laminar Air Flow*, lalu direndam dalam larutan Na-sitrat 1% sebanyak 9 mL dalam gelas kimia 30 mL dan diaduk menggunakan *magnetic stirer* selama kurang lebih 2 jam pada suhu kamar. Setelah probiotik keluar dari mikrokapsul, dipipet 1 mL, dimasukkan ke dalam larutan Peptone 0,1% sebanyak 9 mL dan dilakukan pengenceran berturut-turut sebanyak 10 kali.(Lee & Heo, 2000)

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 1 mL larutan Peptone 0,1% yang mengandung probiotik, lalu digoyangkan perlahan agar bakteri menyebar ke seluruh bagian media dan dibiarkan selama 10 menit. Selanjutnya yaitu 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 (*Total Plate Count*).(Chen et al., 2002)

## HASIL DAN PEMBAHASAN

*Lactobacillus casei* merupakan salah satu genus bakteri asam laktat yang memiliki kemampuan menfermentasikan gula menjadi asam laktat. Bakteri Asam Laktat adalah bakteri gram positif biasanya non patogen, menghasilkan asam laktat, kelompok jenis bakteri gram positif, berbentuk coccus (bulat), atau bacillus (batang). *Lactobacillus casei* berbentuk batang berukuran 0,7 - 1,1 x 2,0 - 4,0  $\mu\text{m}$ , seringkali dengan ujung persegi dan cenderung membentuk rantai. Strain *Lactobacillus* penting untuk banyak fermentasi makanan dan merupakan konstituen normal mikroflora usus.

Diketahui bahwa bakteri probiotik tidak tahan terhadap asam lambung dan untuk meningkatkan ketahanan hidup probiotik saat melewati asam lambung adalah dengan melakukan teknik enkapsulasi dengan formulasi alginat 1% yang berfungsi sebagai pembentuk beads, nanokitin 1% yang berfungsi sebagai pengisi pori pori bagian dalam beads yang tahan asam, dan kitosan dengan variasi 0,2%, 0,6%, 1 % dan 2% yang berfungsi sebagai pengisi pori pori bagian beads.

Dalam keadaan *free cell* (dalam keadaan belum di enkapsulasi) dan belum dilakukan perendaman didalam simulasi cairan asam lambung (SGF) dilakukan perhitungan menggunakan metode Total Plate Count. Cairan SGF terbuat dari larutan NaCl pH 1,2 dan 3. Lambung ketika ada dalam keadaan normal pH nya berkisar 3 sedangkan ketika dalam keadaan asam pH nya berkisar 1,2. Setelah dilakukan pengujian ketahanan bakteri ada pada sekitar  $10^{10}$ - $10^{11}$  CFU sedangkan setelah direndam dalam simulasi cairan asam lambung ketahanannya berkurang sangat drastis.

**Tabel 1.** Viabilitas Bakteri Sebelum Dilakukan Enkapsulasi

Variasi SGF	Waktu inkubasi	Viabilitas
pH 3	1 menit	$7 \times 10^8$ CFU
pH 3	60 menit	$4 \times 10^5$ CFU
pH 3	120 menit	$2 \times 10^4$ CFU
pH 1,2	1 menit	0
pH 1,2	60 menit	0

pH 1,2	120 menit	0
--------	-----------	---

Pada tabel 1 dapat disimpulkan bahwa semakin lama waktu inkubasi dan semakin ekstrim pH cairan simulasi asam lambungnya maka ketahanannya akan semakin menurun yang pada akhirnya tidak memenuhi persyaratan yang telah direkomendasikan oleh FAO. Menurut FAO/WHO (2001) nilai minimum yang harus dipenuhi sekitar  $10^6$  - $10^7$  CFU (Colony Forming Units)/gram bakteri dalam sediaan probiotik yang dapat berkoloni di usus .(Setijawati et al., 2014)

Proses enkapsulasi dilakukan terhadap bakteri kandidat probiotik berlapis kitosan menggunakan alginat dan nanokitin. Alasan menggunakan ketiga bahan tersebut karena alginat termasuk hidrokoloid alami, telah dilaporkan pada beberapa penelitian bahwa enkapsulasi menggunakan alginat dapat mempertahankan viabilitas probiotik dalam produk makanan asam selama proses penyimpanan dengan suhu dingin.(Adhikari et al., 2000) Sedangkan pemilihan kitosan dikarenakan biopolimer alami yang ketersediaannya di alam sangat melimpah, selain itu kitosan merupakan polisakarida yang dihasilkan dari deasetilasi kitin.(Ayumi et al., 2018) Sedangkan nanokitin digunakan bertujuan untuk pengisi pori pori yang tahan asam, diharapkan dengan ditambahkannya nanokitin dapat meningkatkan viabilitas bakteri karena kitosan yang berfungsi sebagai pengisi pori pori utama alginat memiliki sifat tidak tahan terhadap asam. Alasan menggunakan kitin dalam bentuk nano karena kitin memiliki sifat tidak larut dalam air bahkan dalam asam memiliki sifat tidak larut sehingga digunakan dalam bentuk nano. Diharapkan ketika kitin digunakan dalam bentuk nano akan bercampur menjadi larutan koloid sehingga tidak mengganggu kelarutan dari campuran suspensi bakteri tersebut.

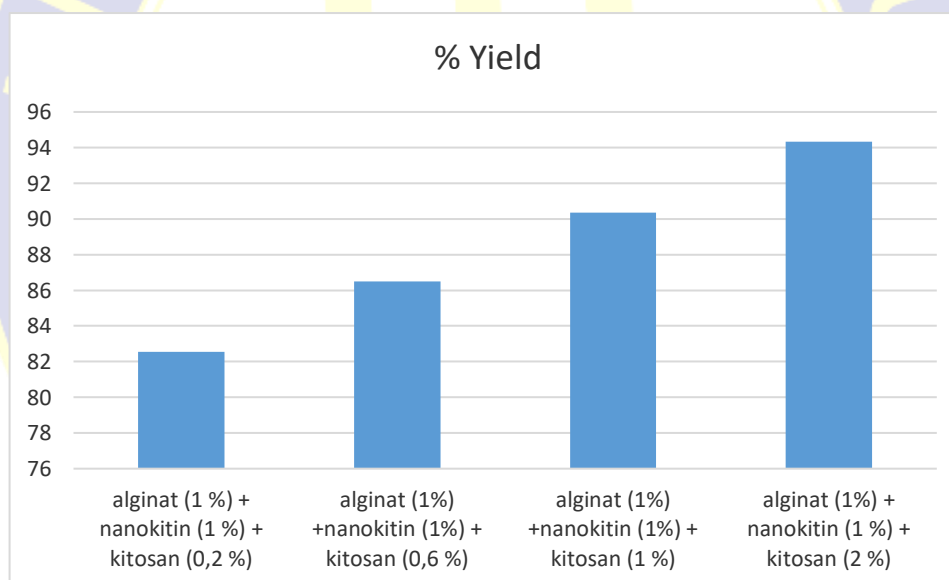
**Tabel 2.** Hasil Perhitungan *Lactobacillus* sp Hasil Enkapsulasi

Konsentrasi Kitosan	<i>Free cell Lactobacillus</i> sp (cfu/mL)	<i>Lactobacillus</i> sp Hasil Enkapsulasi (cfu/g)
0,2 %	$4 \times 10^{11}$	$3 \times 10^{10}$
0,6 %	$4 \times 10^{11}$	$3,3 \times 10^{10}$

1 %	$4 \times 10^{11}$	$9 \times 10^{10}$
2 %	$1 \times 10^{12}$	$2 \times 10^{11}$

Jumlah koloni bakteri awal sebelum dilakukan enkapsulasi adalah  $4 \times 10^{11}$  cfu/mL untuk konsentrasi kitosan 0,2%, 0,6% dan 1% dan  $1 \times 10^{12}$  cfu/mL untuk konsentrasi kitosan 2%. Setelah dilakukan perhitungan, didapatkan jumlah koloni bakteri setelah dienkapsulasi yaitu berturut-turut dari konsentrasi 0,2%; 0,6%; 1% dan 2% adalah  $3 \times 10^{10}$  cfu/g;  $3,3 \times 10^{10}$  cfu/g;  $9 \times 10^{10}$  cfu/g; dan  $2 \times 10^{11}$  cfu/g. Seperti yang tertera pada tabel bahwa tidak terjadi penurunan yang signifikan terhadap jumlah koloni bakteri setelah dilakukan proses enkapsulasi.

Penurunan terjadi dikarenakan pada proses enkapsulasi tidak semua bakteri terenkapsulasi di dalam matriks alginat kitosan dan nanokitin. Factor yang dapat menyebabkan berkurangnya jumlah sel *Lactobacillus casei* yang terenkapsulasi adalah kehilangan sel di dalam larutan CaCl ketika terjadinya tetesan beads yang



akan terbentuk kedalam larutan CaCl. (Pradikaningrum, 2015) Karena tidak terjadi penurunan signifikan sehingga mikrokapsul dapat diuji viabilitas dan survivabilitas pada kondisi lingkungan yang ekstrim yaitu simulasi cairan asam lambung (NaCl 0,2% pH 1,2 dan 3) dengan waktu inkubasi selama 1 menit, 60 menit, dan 120 menit.. Uji viabilitas *Lactobacillus sp* hasil enkapsulasi bertujuan untuk mengetahui keberhasilan dari pembuatan enkapsulasi *Lactobacillus sp* menggunakan matriks kitosan dengan menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*)

Kemudian beads yang lainnya direndam dalam cairan SGF pH 1,2 dan pH 3 dan di inkubasi dengan variasi waktu 1 menit, 60 menit, dan 120. Larutan pH dibuat menggunakan larutan

Natrium Klorida (NaCl) diatur pada kondisi 1-3, nilai ini merupakan kisaran pH yang umumnya diamati pada lambung manusia.(Hovgaard & Brøndsted, 1996)

**Tabel 3.** Jumlah Koloni Bakteri *Free Cell* dan Koloni Bakteri Setelah Proses Enkapsulasi dengan Variasi Waktu Inkubasi dalam Simulasi Cairan Asam Lambung pH 3

Konsentrasi Kitosan	pH 3					
	<i>Free cell</i>			Mikrokapsul		
	1'	60'	120'	1'	60'	120'
	cfu/mL	cfu/mL	cfu/mL	cfu/gr	cfu/gr	cfu/gr
0,2 %	$1 \times 10^8$	$4 \times 10^5$	$2 \times 10^4$	$1 \times 10^9$	$0,6 \times 10^8$	$4 \times 10^6$
0,6 %	$1 \times 10^8$	$4 \times 10^5$	$2 \times 10^4$	$1,5 \times 10^9$	$6 \times 10^8$	$6,3 \times 10^6$
1 %	$1 \times 10^8$	$4 \times 10^5$	$2 \times 10^4$	$9 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^9$	$23 \times 10^6$
2 %	$1 \times 10^8$	$4 \times 10^5$	$2 \times 10^4$	$3 \times 10^{10}$	$5 \times 10^9$	$12 \times 10^7$

Dapat dilihat dari tabel 3 ketahanan bakteri dalam cairan asam lambung sebelum dan setelah di enkapsulasi cenderung ketahanannya meningkat setelah dilakukannya enkapsulasi. Pada variasi kitosan berturut turut 0,2%, 0,6%, 1% dan 2% adalah  $4 \times 10^6$  cfu/g;  $6,3 \times 10^6$  cfu/g;  $23 \times 10^6$  cfu/g dan  $12 \times 10^7$  cfu/gr. Syarat dari FAO bakteri untuk bisa bermanfaat adalah minimal 10<sup>7</sup> cfu. Untuk bakteri yang di enkapsulasi menggunakan campuran bahan Alginat 1%, nanokitin 1% dan kitosan 2% memenuhi persyaratan FAO dengan jumlah bakteri  $12 \times 10^7$  sehingga kombinasi campuran tersebut merupakan yang terbaik dibandingkan variasi konsentrasi kitosan yang lainnya.

**Tabel 4.** Jumlah Koloni Bakteri *Free Cell* dan Koloni Bakteri Setelah Proses Enkapsulasi dengan Variasi Waktu Inkubasi dalam Simulasi Cairan Asam Lambung pH 1,2

Konsentrasi Kitosan	pH 1,2					
	Free cell			Mikrokapsul		
	1'	60'	120'	1'	60'	120'
	cfu/mL	cfu/mL	cfu/mL	cfu/gr	cfu/gr	cfu/gr
0,2 %	0	0	0	$2,6 \times 10^9$	$0,3 \times 10^7$	$2 \times 10^4$
0,6 %	0	0	0	$0,3 \times 10^9$	$0,3 \times 10^7$	$1,6 \times 10^5$
1 %	0	0	0	$3,3 \times 10^9$	$2,3 \times 10^7$	$6,3 \times 10^5$
2 %	0	0	0	$6 \times 10^9$	$21 \times 10^7$	$2 \times 10^7$

pH 1,2 diasumsikan merupakan pH paling ekstrem yang ada pada lambung kita. Dapat dilihat dari tabel 3 bahwa jumlah bakteri sebelum di enkapsulasi menunjukkan tidak ada jumlah koloni yang terbentuk artinya semua bakteri yang di inkubasi pada SGF dalam bentuk free cell ada dalam keadaan mati . Hal ini, disebabkan bakteri *Lactobacillus casei*. tidak tahan terhadap kondisi lingkungan yang sangat asam. Sedangkan untuk bakteri yang telah di enkapsulasi menggunakan kombinasi campuran bahan dengan berbagai variasi kitosan viabilitas bakteri cenderung meningkat sangat signifikan. Untuk mikrokapsul dengan kombinasi campuran alginate 1%, nanokitin 1% dan kitosan 2% menghasilkan viabilitas yang paling tinggi dan memenuhi syarat FAO ketika di ujikan dalam pH ektrim yaitu  $2 \times 10^7$  cfu/gr.

Semakin besar konsentrasi kitosan yang digunakan untuk mengenkapsulasi probiotik semakin lambat proses pelepasan sel bakteri.(Calinescu & Mateescu, 2008) Hal itu disebabkan karena semakin tinggi variasi kitosan yang digunakan maka viskositas nya pun akan semakin meningkat sehingga sulit untuk dilarutkan didalam asam.

Kemudian dapat diketahui untuk jumlah bakteri *Lactobacillus* sp hasil enkapsulasi yang memiliki ketahanan optimum yaitu  $10^7$  cfu adalah penyalutan menggunakan matriks kitosan dengan konsentrasi 2% baik untuk simulasi cairan SGF pada pH 3 dan pH 1,2. Mikrokapsul dengan kombinasi campuran Kitosan 2% dan nanokitin 1% dapat memberikan kekokohan pada beads yang terbentuk dengan cara mengisi kekosongan rongga pada kapsul kalsium alginat karena kapsul kalsium alginat sangat berpori yang memungkinkan cairan media dapat berdifusi keluar masuk matriks.

Bakteri probiotik yang jumlahnya diatas  $10^7$  cfu/mL memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan manusia diantaranya dapat meningkatkan ketahanan tubuh

terhadap penyakit terutama infeksi usus dan diare, meningkatkan imunitas tubuh dalam proses pencernaan, dan juga dapat mencegah kanker usus besar.(Caly et al., 2015)

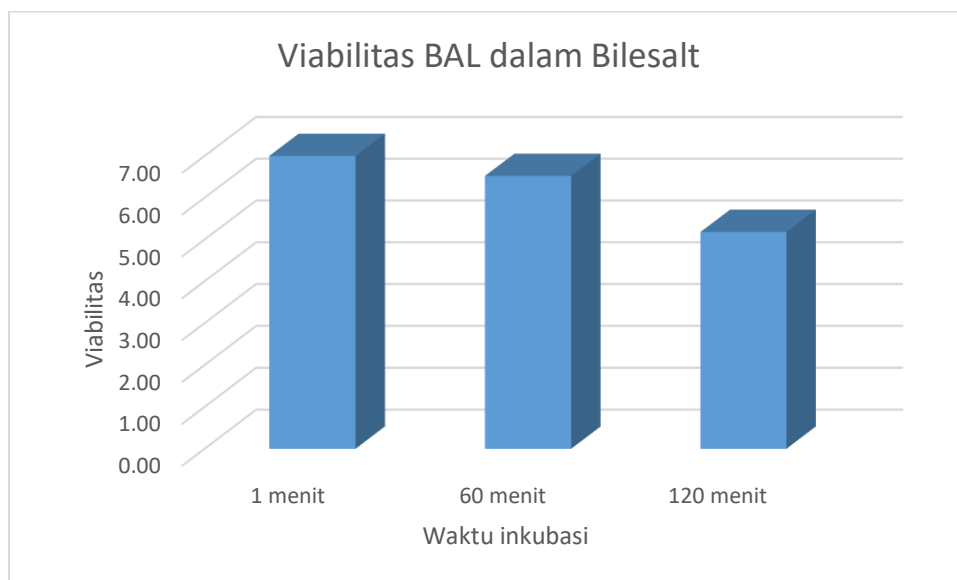
Selain dipengaruhi oleh variasi kitosan yang digunakan, semakin lama waktu inkubasi bakteri ketahanan bakteri di dalam cairan SGF akan semakin menurun. Hasil dari proses enkapsulasi dapat dikatakan berhasil apabila bahan yang dienkapsulasi memiliki viabilitas sel yang relatif tinggi dan memiliki sifat-sifat fisiologis yang relatif sama sebelum dienkapsulasi.

Uji lanjutan yang dilakukan adalah uji ketahanan *Lactobacillus casei* terhadap garam empedu (bile salt) . Pengujian bilesalt dilakukan pada beads dengan formulasi Alginat 1%, Nanokitin 1% dan Kitosan 2% yang menunjukkan survavibilitas dan viabilitas yang paling baik. Pengujian ini dilakukan dengan cara beads yang telah di rendam pada SGF pH 1,2 selama 120 menit kemudian dilakukan perendaman pada cairan Bilesalt dengan variasi 1 menit, 60 menit dan 120 menit. Alasan memilih direndam di pH 1,2 karena memilih pH yang paling ekstrim di dalam lambung dan 120 menit disimulasikan beads untuk menuju usus halus berada di dalam lambung selama 120 menit.

Berrada et al. (1991) menyatakan bahwa waktu yang diperlukan mulai saat bakteri masuk sampai keluar dari lambung sekitar 90 menit. Isolat yang diseleksi untuk digunakan sebagai probiotik harus mampu bertahan dalam keadaan asam lambung selama sedikitnya 90 menit.(Harjuni et al., 2016)

**Tabel 5.** Viabilitas *Lactobacillus* sp. Pada Simulasi Cairan Usus dan Garam Empedu

Formulasi	Bilesalt		
	1 menit	60 menit	120 menit
Alginat 1%, Nanokitin 1%, Kitosan 2%	$1 \times 10^7$	$3,3 \times 10^6$	$15 \times 10^6$



**Gambar 1.** Viabilitas *Lactobacillus* sp. Pada Simulasi Cairan Usus dan Garam Empedu

Pada gambar 1 Hasil pengamatan menunjukkan bahwa sel bakteri *Lactobacillus casei* dapat tumbuh dan bertahan hidup pada garam empedu dengan konsentrasi 0,6%. Toleransi yang baik terhadap garam empedu ini diduga karena peranan polisakarida sebagai salah satu komponen penyusun dinding sel bakteri Gram positif. (Harjuni et al., 2016)

Kemampuan bertahan dalam konsentrasi garam empedu berkaitan dengan kemampuan isolat menghasilkan Bile Salt Hydrolase (BSH). Beberapa *Lactobacillus* mempunyai enzim Bile Salt Hydrolase (BSH) dengan aktivitas untuk menghidrolisa garam empedu, sehingga mampu mengubah sifat fisikakimia yang dimiliki oleh garam empedu menjadi tidak toksik bagi bakteri asam laktat. Sel bakteri asam laktat yang tahan terhadap garam empedu, bila diinkubasi dalam media yang mengandung Bile Salt 0,3% masih terjadi pertumbuhan dan tidak terjadi lisis, namun mengalami sedikit kebocoran materi intraseluler. (Herawati & Aditiawati, 2001)

Pada gambar 1 dapat diketahui bahwa semakin lama waktu inkubasi di dalam bilesalt maka akan terjadinya penurunan tetapi tidak signifikan. Garam empedu mampu menembus dan bereaksi pada sisi membran sitoplasma yang bersifat lipofilik, sehingga dapat menyebabkan terjadinya kerusakan membrane sel. (Sunaryanto & Marwoto, 2013) Kematian/lisis sel bakteri oleh tingginya konsentrasi garam empedu dikarenakan aktivitas enzim  $\beta$ -galaktosidase terhadap

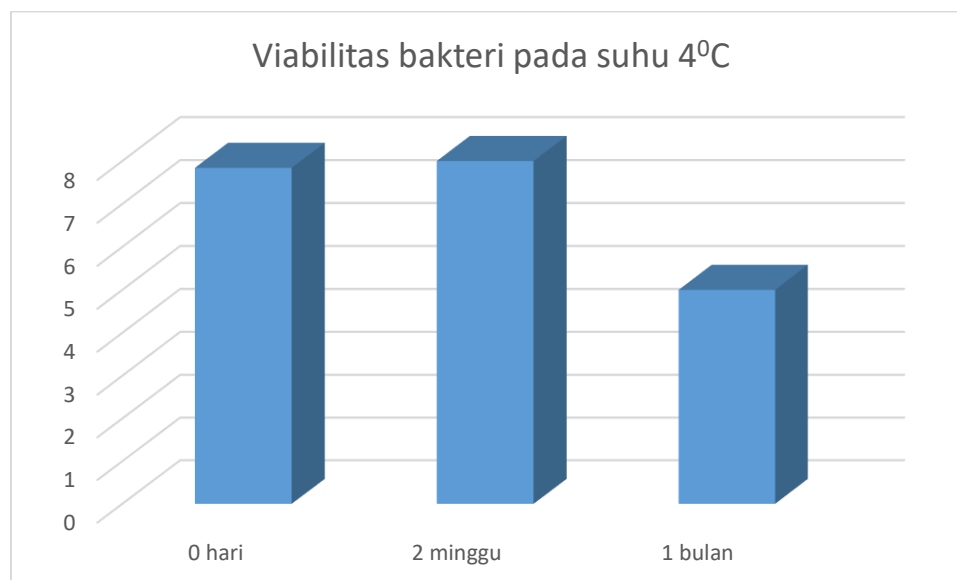
garam empedu meningkat sehingga permeabilitas membran sel meningkat dan menyebabkan materi intraseluler banyak yang keluar dari sel.

Dari tabel 5 dan gambar 1 dapat diketahui bahwa *Lactobacillus casei* dapat bertahan pada konsentrasi bilesalt 0,6% hal ini sejalan dengan penelitian Singhal et al.(2009) mendapatkan isolat *Lactobacillus casei* yang mampu bertahan dalam konsentrasi garam empedu sodium glycocholate and sodium taurocholate sampai dengan 0,3% dan mampu bertahan sampai dengan pH 2. Menurut Sivram PL dan Vishwanath (2012) bahwa salah satu syarat mikroba dapat digunakan sebagai agensia probiotik adalah mampu bertahan pada konsentrasi garam empedu paling tidak 0,3% dan pH 2. Hal ini disebabkan bahwa kondisi dalam saluran pencernaan manusia mengandung garam empedu rata-rata 0,3% dan dengan tingkat keasaman pH 2 – pH 3. (Sunaryanto & Marwoto, 2013)

Pada penelitian yang dilakukan dengan simulasi SGF pH 1,2 dan konsentrasi bilesalt 0,6% ternyata *Lactobacillus casei* masih mampu bertahan dengan viabilitas yang baik. Dengan demikian isolat *Lactobacillus casei* ini berpotensi untuk dapat dimanfaatkan sebagai agensia probiotik.

Kemudian dilakukan uji Penyimpanan pada beads yang memiliki formulasi yang terbaik yaitu Formulasi dengan menggunakan bahan campuran Alginat 1%, Nanokitin 1% dan kitosan 2%. Uji penyimpanan dilakukan pada suhu 4°C dan pada suhu 25°C. Suhu 4°C merupakan suhu penyimpanan ideal probiotik pada lemari pendingin, suhu 25°C dikondisikan sebagai suhu ruangan.

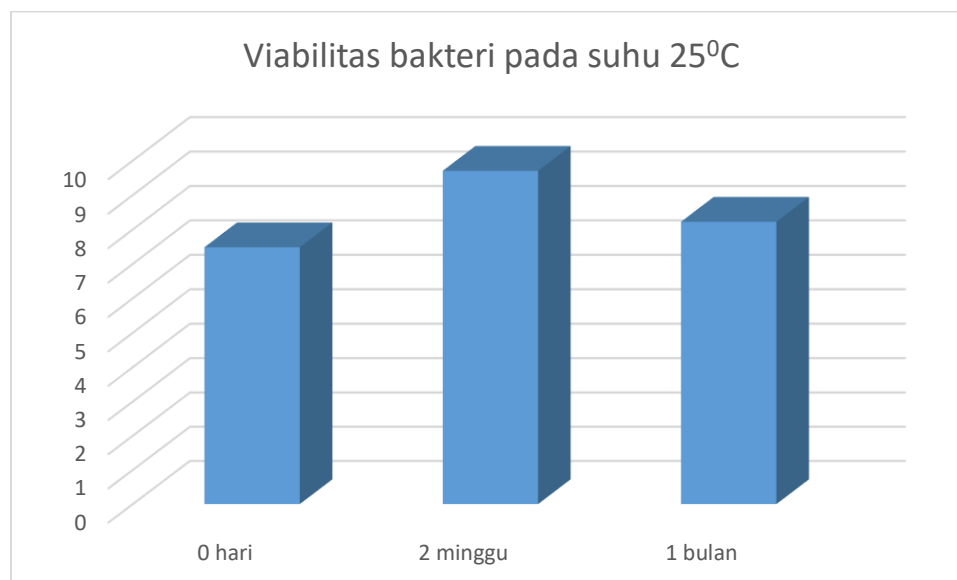
Suhu penyimpanan merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi viabilitas bakteri dalam sediaan. Oleh karena itu, uji ketahanan hidup bakteri selama penyimpanan dalam jangka waktu tertentu dengan memperhatikan pengaruh suhu perlu dilakukan sebagai skrining kelayakan produk untuk dapat memberikan efek optimal. (Utami, 2015)



**Gambar 2.** Viabilitas *Lactobacillus* sp. Terhadap Uji Penyimpanan pada Suhu 4°C

Pada gambar 2 tidak terjadinya penurunan yang signifikan antara penyimpanan 0 hari dan penyimpanan 2 minggu hal ini disebabkan karena suhu rendah akan mengakibatkan perpanjangan masa adaptasi bakteri terhadap lingkungan yang baru. Pada penyimpanan bersuhu rendah mikroorganisme masih dapat tumbuh dan pendinginan hanya bersifat menghambat pertumbuhannya. Namun pada jangka waktu tertentu saat mikroorganisme menjadi banyak akan tetap mengakibatkan kerusakan sel. Dapat dilihat pada jarak 2 minggu dan jarak 1 bulan terjadinya penurunan yang signifikan, diharapkan bakteri ketika di simpan dalam suhu 4°C tidak akan terjadinya penurunan viabilitasnya karena bakteri ada pada kondisi *dorman* tetapi pada penelitian kali ini jarak penyimpanan 2 minggu dan 1 bulan tetap mengalami penurunan hal tersebut terjadi karena terjadinya kerusakan pada sel. (Danah et al., 2019)

Suhu 4°C merupakan suhu yang dianjurkan untuk penyimpanan probiotik karena pada suhu ini dapat menghambat reaksi-reaksi enzimatik, kimiawi dan biokimia sel. Dalam buku Bergey Manual of Systematic Bacteriology disebutkan bahwa untuk pemeliharaan dan penyimpanan bakteri *Lactobacillus* dianjurkan pada suhu 4-7°C. (Utami, 2015)



**Gambar 3.** Viabilitas *Lactobacillus* sp. terhadap Uji Penyimpanan Pada Suhu 25°C

Hasil pengujian penyimpanan pada suhu 25°C pada penyimpanan 0 hari ( $0,3 \times 10^8$  CFU) terjadinya peningkatan pertumbuhan pada lama penyimpanan 2 minggu ( $5 \times 10^9$ ) CFU hal ini disebabkan karena masih tersedianya laktosa dan nutrisi dalam produk dan pada suhu ruang bakteri ada pada kondisi hidup. Semakin tinggi kandungan laktosa pada produk fermentasi maka semakin cepat pertumbuhan bakteri asam laktat. (Ayuti et al., 2016) kemudian jarak Antara 2 minggu ( $5 \times 10^9$  CFU/gram) dan 1 bulan ( $16,3 \times 10^7$  CFU/gram) terlihat terhadinya penurunan yang signifikan hal itu disebabkan karena Pertumbuhan *L. casei* diawali dengan fase awal (lag) yang merupakan masa penyesuaian bakteri (fase adaptasi). Pada fase tersebut terjadi sintesis enzim oleh sel bakteri yang dipergunakan untuk metabolisme metabolit. Setelah substrat atau persenyawaan tertentu yang diperlukan untuk pertumbuhan bakteri dalam media biakan mendekati habis dan terjadi penumpukan produk-produk penghambat, maka terjadi penurunan laju pertumbuhan bakteri asam laktat (Ayuti et al., 2016) Selain itu Penurunan ini disebabkan bakteri asam laktat mengalami penurunan aktivitas, karena laktosa sebagai sumber energi mengalami penurunan.

Hasil analisis menunjukkan semakin lama penyimpanan maka nilai total bakteri asam laktat yang dihasilkan semakin menurun. Lama penyimpanan akan menurunkan total bakteri asam laktat, dikarenakan hasil dari asam laktat yang meningkat menyebabkan pH menurun, namun bakteri asam laktat itu sendiri juga

tidak tahan dengan kondisi yang terlalu asam, sehingga bakteri akan mati/lisis. Sedangkan pada hasil analisis menunjukkan dengan adanya berbagai varian suhu menyebabkan total bakteri asam laktat menjadi semakin menurun karena suhu pertumbuhan bakteri asam laktat adalah 10°C -40°C dengan suhu optimum 30-37°C. Saat mikroorganisme tidak pada suhu optimum maka perkembangan metabolisme yang terjadi tidak optimum (Mallesha, 2010). Proses fermentasi BAL akan memanfaatkan karbohidrat yang ada hingga terbentuk asam laktat, hingga terjadi penurunan nilai pH dan peningkatan keasaman (Hidayat, 2013). (Setiawati & Yuniarta, 2018)

Dari data yang di hasilkan maka probiotik yang di enkapsulasi menggunakan bahan campuran Alginat 1%, Nanokitin 1%, dan Kitosan 1% memenuhi syarat sebagai produk probiotik dengan mutu yang masih baik pada penyimpanan 40C dan 250C dengan masa penyimpanan selama 1 bulan.

### KESIMPULAN

Setelah dilakukan uji suvivabilitas probiotik terenkapsulasi dalam simulasi cairan asam lambung pH 1,2 dan 3 dengan waktu inkubasi 1 menit, 60 menit dan 120 menit, didapati konsentrasi penyalut yang menunjukkan survivabilitas terbaik adalah formulasi Alginat 1%, Nanokitin 1% dan Kitosan 2% dengan waktu inkubasi paling lama yaitu 120 menit menghasilkan nilai viabilitas  $2 \times 10^7$ . Semakin lama waktu inkubasi dan semakin rendah variasi konsentrasi kitosan akan mengurangi viabilitas bakteri *Lactobacillus sp.* Pada uji viabilitas bakteri terhadap cairan simulasi usus dan garam empedu Untuk ketahanan di dalam simulasi cairan usus (konsentrasi 0,6%) ketahananya ada pada  $15 \times 10^6$  CFU/gram. Untuk uji penyimpanan sediaan tersbeut bertahan selama 2 minggu dengan nilai ketahanan 4°C ( $1 \times 10^8$ );37°C ( $5 \times 10^9$ ). Dengan demikian isolat *Lactobacillus sp.* ini berpotensi untuk dapat dimanfaatkan sebagai agensia probiotik.