

PENGARUH KONSENTRASI NATRIUM ALGINAT SEBAGAI PENJERAT SEL *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 DAN LAMA PENYIMPANAN TERHADAP JUMLAH SEL YANG TERLEPAS DAN KARAKTER CARRIER

(Effect of sodium alginate concentration in Lactobacillus acidophilus FNCC 0051 entrapment and storage period on the number of released cells and carrier's character)

Nike Ratnasari^{a*}, Netty Kusumawati^a, Indah Kuswardani^a

^a Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, Indonesia

*Penulis korespondensi
Email: nix_v0n@yahoo.com

ABSTRACT

The aim of this study is to know the effect of sodium alginate concentration in *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 entrapment, refrigeration storage ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) period and interaction of both factors on the number of released cells and carrier's character (UHT milk). The experimental design used was factorial RBD (Randomized Block Design) design with two factors, sodium alginate concentration (1%, 1,5%, 2%) and storage period (0, 10, 20 days). The parameters observed are the number of released cells (Total Plate Count / TPC), pH and total lactic acid of the carrier (UHT milk). The obtained data are statistically analyzed by ANOVA (Analysis of Variance) at $\alpha=5\%$ and continued with Duncan's Real Difference Distance test (Duncan's Multiple Range Test) to determine which level of the treatment that gives a significant differences. Sodium alginate concentration and storage period had significant effect on the number of released cells and carrier's character (pH and total lactic acid of UHT milk) and there is interaction between both factors. The lower level of sodium alginate concentration increased the number of released cells, decreased pH value and increased total lactic acid. During 20 days storage, the amount of released cells and acidity of carrier increased than 0 and 10 days. Interaction between both factors which give the less number of released cells (3,7948 log cfu/ml) and carrier's character changes (pH = 6,4767 and total lactic acid= 0,0741 %) is combination of 2% sodium alginate concentration in 0 days storage.

Keywords: immobilized, alginate, isomalt

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh konsentrasi natrium alginat (Na-alginat) sebagai penjerat sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 dan lama penyimpanan pada suhu refrigerator ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) serta interaksi kedua faktor tersebut terhadap jumlah sel yang terlepas dan karakter carrier yang digunakan (susu UHT). Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) desain faktorial yang terdiri dari dua faktor yaitu konsentrasi Na-alginat (1%, 1,5%, 2%) dan lama penyimpanan (hari ke-0, 10, 20). Pengulangan yang dilakukan sebanyak 3(tiga) kali. Parameter yang diuji yaitu jumlah sel yang terlepas (ALT), pH dan total asam laktat carrier (susu UHT). Data yang diperoleh dianalisa secara statistik dengan uji ANOVA (Analysis of Varians) pada $\alpha = 5\%$ dan dilanjutkan dengan uji Beda Jarak Nyata Duncan (Duncan's Multiple Range Test) untuk menentukan taraf perlakuan mana yang memberikan beda nyata. Konsentrasi Na-alginat dan lama penyimpanan masing-masing memberikan pengaruh nyata serta terdapat pengaruh interaksi antara kedua faktor perlakuan terhadap jumlah sel yang terlepas dan karakter carrier (pH dan total asam susu UHT). Sampai pada konsentrasi Na-alginat 2%, semakin rendah konsentrasi Na-alginat yang digunakan maka semakin besar jumlah sel yang terlepas, nilai pH menurun dan total asam meningkat. Selama 20 hari penyimpanan, jumlah sel yang

terlepas dan keasaman carrier meningkat dibandingkan hari ke-0 dan 10. Interaksi antara kedua faktor yang memberikan nilai terkecil terhadap jumlah sel yang terlepas (3,7948 log cfu/ml) dan perubahan terhadap karakter carrier (nilai pH = 6,4767 dan total asam = 0,0741 %) adalah kombinasi antara penggunaan 2% konsentrasi Na-alginat selama penyimpanan pada hari ke-0.

Kata kunci: imobil, alginat, isomalt

PENDAHULUAN

Sinbiotik merupakan gabungan dari prebiotik dan probiotik yang masing-masing komponennya dapat memberikan keuntungan bagi kesehatan manusia jika dikonsumsi (Crittenden, 1999). Produk sinbiotik biasanya adalah produk berbasis susu (*fermented dan non-fermented food*). Probiotik dapat memberikan manfaat bagi tubuh ketika dibawa masuk ke dalam tubuh dan mampu bertahan melewati saluran pencernaan dan berkolonisasi. Tujuan tersebut dicapai apabila jumlah probiotik dalam produk minimal 10⁶-10⁷ cfu/ml produk (ISAPP, 2005). Teknik imobilisasi diterapkan pada produk *carrier* sinbiotik untuk melindungi probiotik dari lingkungan yang tidak menguntungkan dengan cara menjerat sel dalam suatu matriks hidrokoloid. Bahan yang biasa digunakan sebagai penjerat sel adalah natrium alginat (Na-alginat).

Kombinasi alginat dengan karbohidrat dapat meningkatkan kemampuan perlindungan terhadap sel-sel bakteri yang dijerat dan memberikan kemampuan difusi mikronutrien dan metabolit ke dalam dan ke luar *beads* (matriks penjerat), sehingga menghasilkan *beads* yang mengandung sel-sel bakteri yang aktif bermetabolisme (Jankowski *et al.*, 1997). Karbohidrat ini dapat juga berperan sebagai agen prebiotik, salah satunya adalah golongan polyol yaitu isomalt (Livesey, 2003). Penggunaan prebiotik dalam penelitian ini adalah isomalt 3% karena menurut Harti, dkk., (2012), bahwa pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* menggunakan prebiotik Chitosan-oligosakarida (COS) dengan kisaran 1%, 2% dan 3% paling tinggi pertumbuhannya adalah pada konsentrasi COS 3%. Menurut Dewi (2005), jumlah sel

yang terlepas dari dalam *beads* semakin besar selama penyimpanan. Penggunaan konsentrasi Na-alginat yang berbeda akan berpengaruh terhadap kekuatan perlindungan matriks dalam menahan sel keluar dari *beads* serta berpengaruh terhadap karakter dari produk *carrier* sinbiotik selama penyimpanan. Menurut Chandramouli *et al.* (2004), penggunaan konsentrasi larutan alginat lebih dari 2% tidak memungkinkan untuk menghasilkan *beads* yang homogen karena peningkatan viskositas larutan dan penurunan difusivitas massa. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan konsentrasi Na-alginat 1%, 1,5% dan 2% dengan penambahan prebiotik isomalt sebesar 3% pada susu UHT sebagai produk *carrier* sinbiotik selama 0, 10 dan 20 hari penyimpanan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh konsentrasi Na-alginat sebagai penjerat sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 dan lama penyimpanan serta interaksi antara kedua faktor terhadap jumlah sel yang terlepas dan karakter *carrier*.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Susu UHT *Full Cream* "Ultra Milk" Ultra Jaya, kultur bakteri *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051, akuades, larutan NaCl 0,85% (Riedelde Haën 31434), larutan Na-sitrat 0,1 M teknis, Na-Alginat murni (Zigma A2033-100G), larutan CaCl₂ 1% teknis, air pepton 0,1% (Peptone from meat merk "MERCK 1.07224.1000"), NaOH 0,1 N (p.a.), asam oksalat 0,1 N, indikator *phenolphthalein* 1%, alkohol 96%, larutan *Crystal Violet* modifikasi Hucker, larutan iodin, larutan alkohol aseton, larutan *Safranin Gram Stain*, minyak *immerse*, kertas lensa, sumbat kapas, *aluminium foil*,

kertas coklat dan korek api, *deMan*, *Rogosa*, *Sharpe bouillon* (yang selanjutnya disebut MRS) *Broth* (Pronadisa Cat. 1215.00), *Bacto Agar* (MERCK 214010), dan *MRS Agar* (Pronadisa Cat. 1043.00).

Pembuatan Sel Imobil

5 ml kultur *L.acidophilus* FNCC 0051 dalam resuspensi MRSB diambil dan dimasukkan ke dalam masing-masing larutan Na-alginat steril dengan konsentrasi 1% (b/v), 1,5% (b/v) dan 2% (b/v) yang sudah ditambahkan prebiotik isomalt sebanyak 3% (b/v). Larutan kemudian dihomogenkan dan setelah itu diambil menggunakan syring dengan diameter jarum sebesar 1,2 mm untuk ditetaskan dalam 300 ml larutan CaCl_2 1% suhu 4-7°C. Setelah semua larutan selesai ditetaskan, maka disimpan pada suhu $\pm 5^\circ\text{C}$ selama 15 menit. Setelah 15 menit, *beads* yang sudah terbentuk dicuci dengan 100 larutan garam NaCl 0,85% sebanyak tiga kali pencucian.

Pembuatan Susu Probiotik

Sel imobil yang sudah terbentuk ditimbang sebanyak ± 30 gram. Setelah itu sel imobil tersebut dimasukkan ke dalam 100 ml susu UHT *full cream* secara aseptis. Setelah itu dimasukkan ke dalam *refrigerator* (4-7°C) dan dilakukan penyimpanan 0, 10 dan 20 hari.

Pemisahan Sel yang Terlepas (Sel Bebas) dengan Sel yang Terimobil

Susu yang telah dilakukan penyimpanan disaring secara aseptis untuk memisahkan susu dan *beads*. Susu yang telah terpisah mengandung sel bebas yang merupakan sel yang terlepas dari dalam *beads* dan siap dilakukan pengujian. *Beads* yang terpisah kemudian dicuci dengan 100 ml larutan NaCl 0,85% sebanyak tiga kali, setelah itu *beads* siap dilakukan pengujian.

Pengujian Angka Lempeng Total (ALT) Sel Bebas pada Susu UHT

Media MRS Agar (agar 1,2%) dicairkan dengan memanaskan dalam

penangas air. Setelah media mencair, media didinginkan sampai mencapai suhu 50°C. Setelah itu, dilakukan pembuatan *pepton from meat* 0,1% dan dipipet masing-masing 4,5 mL ke dalam satu seri tabung reaksi dari pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-5} (untuk pengenceran 10^{-1} dipipet sebanyak 9 ml). Sampel susu yang telah dipisahkan dari *beads* dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi pengenceran 10^{-1} , kemudian dilanjutkan dengan pemipetan sebanyak 0,5 ml dari pengenceran 10^{-1} ke pengenceran berikutnya sampai 10^{-5} dan dihomogenkan. Pada pengenceran 10^{-2} sampai dengan 10^{-5} , dilakukan pemipetan 1 mL pada masing-masing pengenceran kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Media MRS Agar yang telah bersuhu 50°C dituang ke dalam masing-masing cawan petri, lalu dihomogenkan dengan rotasi angka delapan. Setelah media dalam cawan petri memadat, maka dilakukan inkubasi selama 48 jam dengan suhu 37°C. Setelah 48 jam, dilakukan penghitungan jumlah ALT.

Pengukuran pH

Pertama-tama, dilakukan kalibrasi alat pH-meter dengan cara mencelupkan elektroda pH-meter ke dalam larutan *buffer* pH 4,0 atau *buffer* pH 7,0. Setelah dicelupkan ke dalam larutan *buffer*, elektroda dicuci dengan akuades menggunakan botol semprot. Sisa akuades yang masih menempel pada elektroda dikeringkan dengan menggunakan *tissue*. Elektroda yang sudah dikeringkan, kemudian dimasukkan ke dalam sampel susu dan dibiarkan beberapa saat untuk memperoleh hasil pembacaan nilai pH yang stabil.

Pengukuran Total Asam

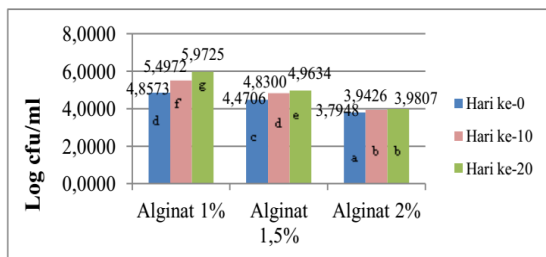
Pengukuran total asam yang dilakukan adalah dengan metode titrasi. Sampel susu sebanyak 10 ml dipipet dengan pipet volume dan dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml. Kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas

di labu takar. Susu diambil 10 ml dari labu takar dan dipipet dengan pipet volume ke erlenmeyer 250 mL, serta ditambahkan 2 sampai 3 tetes indikator PP 1%. Setelah itu, larutan dititrasi dengan menggunakan NaOH 0,1 N yang sudah distandarisasi dengan larutan H₂C₂O₄ 0,1 N. Titrasi sampel dengan NaOH 0,1 N dilakukan sampai tepat timbul warna merah muda. Total asam dinyatakan sebagai % asam dominan dan pada penelitian ini dinyatakan dengan total asam laktat (BM=90). Rumus perhitungan total asam (5) adalah:

$$\text{Kadar asam} = \frac{\text{volume NaOH (mL)} \times \text{N NaOH} \times \text{BM asam laktat} \times \text{FP} \times 100\%}{\text{volume bahan (mL)} \times 1000}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Angka Lempeng Total (ALT) merupakan salah satu metode penghitungan jumlah mikroorganisme yang hidup dengan cara menghitung koloni yang ditumbuhkan pada media agar. Pada penelitian ini, dilakukan pengujian ALT terhadap sel bebas karena selama penyimpanan *carrier* ada sel dalam *beads* yang terlepas keluar dan dihitung sebagai sel bebas. Rerata nilai ALT sel bebas dan pengaruh interaksi perbedaan konsentrasi Na-alginat dengan lama penyimpanan terhadap jumlah ALT sel bebas (log cfu/ml) dalam susu UHT selama penyimpanan dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Pengaruh Interaksi Perbedaan Konsentrasi Na-alginat dengan Lama Penyimpanan terhadap jumlah ALT sel bebas (log cfu/ mL)

Selama masa penyimpanan, terjadi peningkatan jumlah sel bebas yang tidak sama pada *beads* dengan konsentrasi Na-alginat yang berbeda. Hal ini terlihat selama

20 hari penyimpanan pada *beads* dengan konsentrasi Naalginat 1% mengalami peningkatan jumlah sel bebas sebanyak 1,0552 log cycle, Na-alginat 1,5% sebanyak 0,4928 log cycle dan Na-alginat 2% sebanyak 0,1859 log cycle. Peningkatan jumlah sel bebas selama penyimpanan disebabkan karena adanya perubahan kekuatan dan kekokohan matriks *beads* selama penyimpanan.

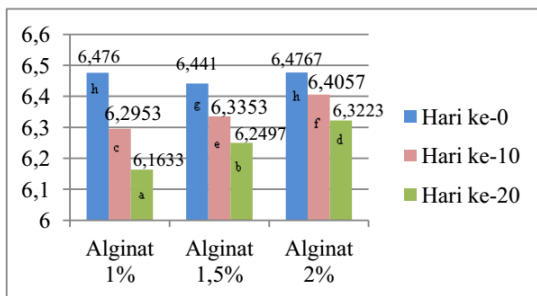
Selama penyimpanan, terjadi akumulasi metabolit dari hasil metabolisme sel yang terimobil maupun sel bebas menghasilkan asam dan menyebabkan penurunan pH. Adanya H⁺ dari asam akan mensubstitusi Ca²⁺ sehingga matriks gel Ca-alginat terdegradasi dan menjadi lebih longgar menyebabkan jumlah sel bebas meningkat (Krasaekoopt *et al.*, 2003). Selain itu, terjadi kenaikan diameter *beads* selama penyimpanan karena adanya difusi nutrien ke dalam *beads*. Kenaikan diameter *beads* menyebabkan penurunan kerapatan dan kekokohan matriks gel. Semakin besar konsentrasi bahan pembuat matriks penjerat maka karakteristik fisik *beads* yang dihasilkan juga semakin kuat dan lebih dapat bertahan dari perubahan-perubahan yang terjadi selama penyimpanan sehingga dapat mengurangi jumlah sel bebas Chandramouli *et al.* (2004).

Keasaman susu sebagai *carrier* produk dinyatakan berdasarkan nilai pH dan total asam. pH merupakan derajat keasaman atau alkalinitas suatu bahan, yang dinyatakan sebagai konsentrasi H⁺ dan memiliki kisaran nilai antara 1 sampai dengan 14 (Considine dan Considine, 1982). Total asam susu diuji dengan metode titrasi total asam laktat dan dinyatakan sebagai % asam laktat karena asam yang dihasilkan oleh sel bakteri sebagai metabolit selama penyimpanan adalah asam laktat. Hubungan antara pH dan total asam (%) adalah semakin rendah pH maka semakin tinggi total asam karena semakin banyak asam laktat yang dihasilkan untuk menurunkan pH.

Rerata nilai pH dan pengaruh interaksi perbedaan konsentrasi Na-alginat dengan lama penyimpanan terhadap pH

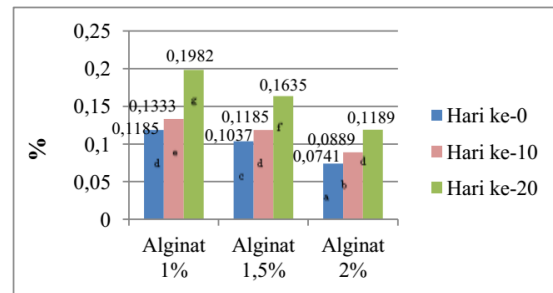
susu selama penyimpanan dapat dilihat pada Gambar 2. Sedangkan rerata nilai total asam (%) dan pengaruh interaksi perbedaan konsentrasi Na-alginat dengan lama penyimpanan terhadap total asam susu selama penyimpanan dapat dilihat pada Gambar 3.

Selama penyimpanan, terjadi penurunan pH dan kenaikan total asam yang tidak sama pada *beads* dengan konsentrasi Na-alginat yang berbeda. Hal ini terlihat selama 20 hari penyimpanan pada *beads* dengan konsentrasi Na-alginat 1% mengalami penurunan pH sebesar 0,3127, Na-alginat 1,5% sebesar 0,1913 dan Na-alginat 2% sebesar 0,1544. Pada penelitian ini, penurunan pH diikuti juga dengan kenaikan total asam susu selama penyimpanan. Tetapi, penurunan pH tidak selalu sebanding dengan kenaikan total asam (%), karena nilai pH tergantung pada derajat ionisasi asam yang terdapat dalam produk sedangkan total asam tergantung dari banyaknya konsentrasi asam yang paling dominan dalam suatu produk.



Gambar 2. Pengaruh Interaksi Perbedaan Konsentrasi Na-alginat dengan Lama Penyimpanan terhadap pH Susu selama Penyimpanan

Kenaikan total asam (%) selama penyimpanan juga tidak sama pada *beads* dengan konsentrasi Na-alginat yang berbeda (Gambar 3). Hal ini terlihat selama 20 hari penyimpanan, pada *beads* dengan konsentrasi Na-alginat 1% mengalami peningkatan total asam laktat sebesar 0,0797%, Na-alginat 1,5% sebesar 0,0598% dan Na-alginat 2% sebesar 0,0448%.



Gambar 3. Pengaruh Interaksi Perbedaan Konsentrasi Na-alginat dengan Lama Penyimpanan terhadap Total Asam (%) selama Penyimpanan

Penurunan pH dan peningkatan total asam selama penyimpanan pada semua konsentrasi Na-alginat yang berbeda disebabkan karena selama penyimpanan sel yang terimobil maupun sel bebas masih melakukan metabolisme meskipun sangat lambat (suhu *refrigerator* $\pm 5^{\circ}\text{C}$) dan menghasilkan metabolit yang akan terakumulasi sehingga menyebabkan penurunan pH dan peningkatan total asam (%). Pada kombinasi perlakuan konsentrasi Na-alginat paling besar yaitu 2% dan lama penyimpanan 20 hari, penurunan pH dan kenaikan total asam (%) paling kecil karena kekuatan dan kerapatan *beads* tinggi (kokoh) sehingga dapat mengurangi jumlah sel yang terlepas dan laju difusi nutrisi serta akumulasi metabolit (asam laktat) oleh sel (terimobil dan bebas) (Lee and Heo, 2000; Chandramouli *et al*, 2004;. Sheu and Marshall, 1993). Hal ini sesuai dengan pernyataan Chandramouli *et al*. (2004), bahwa semakin besar konsentrasi bahan pembuat matriks penjerat yang digunakan maka karakteristik fisik *beads* juga semakin kuat.

KESIMPULAN

Interaksi antara konsentrasi Na-alginat sebagai penjerat sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 dan lama penyimpanan berpengaruh nyata terhadap jumlah sel yang terlepas dan karakter *carrier* (pH dan total asam susu UHT). Perlu dilakukan uji kesukaan terhadap susu UHT

sebagai *carrier* sinbiotik untuk mengetahui penerimaan konsumen.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Program Penelitian Desentralisasi 2014 yang telah membiayai penelitian ini sebagai bagian dari Hibah Bersaing yang berjudul "Penggunaan Tepung Pepaya an akteri Probiotik Terimobilisasi dalam Pembuatan Produk Sinbiotik : Optimasi Formulasi, Stabilitas dalam Sistem Pangan dan Manfaatnya terhadap Kesehatan Usus".

DAFTAR PUSTAKA

Chandramouli, V., K. Kailasapathy, P. Peiris dan M.Jones. 2004. An Improved Method of Microencapsulation and Its Evaluation to Protect *Lactobacillus spp.* In Simulated Gastric Condition, J of Microbiol Methods 56:27–35.

Considine, D.M. dan G. D. Considine. 1982. Food and Food Production Encyclopedia. New York: Van Nontrand Reinhold Co., Inc.

Crittenden, R.G. 1999. Prebiotics In: Probiotics: A Critical Review. Horizon Scientific Press, Wyomndham pp. 141 – 156.

Harti, A.S, R.A. Samsumaharto dan Hosea. 2012. Efek Penambahan

ChitoOligosakarida Sebagai Prebiotik Terhadap Pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Secara In Vitro. Surakarta, Jurnal Biomedika Vol. 5(1): 2302-1306.

ISAPP. 2005. Establishing Standards for Probiotic Products. Retrieved Available at :www.isapp.net. [6 November 2013].

Jankowski, T., M. Zielinska dan Wysakowska. 1997. Encapsulation of Lactic and Bacteria with Alginate or Starch Capsules. Biotechnol Technol. 11:31-34.

Krasaekoopt W., B. Bhandari, H. Deeth. 2003. Evaluation of Encapsulation Techniques of Probiotics for Yoghurt. Int. Dairy J. 13: 3-13.

Lee, K.I. dan T.R. Heo T.R. 2000. Survival of *Bifudobacterium Longum* Immobilized in Calcium Alginate Beads in Simulated Gastric Juicesand Bile Salt Solution. Appl. Environ. Microbiol. 66: 869-973.

Livesey, G., 2003. Health Potential of Polyols as Sugar Replacers, with Emphasis on Low Glycaemic Properties. Nutrition Research Reviews 16:163-191.

Sheu, T. Y., R.T. Marshall. 1993. Microentrapment of *Lactobacilli* In Calcium Alginate Gel, J. Food Sci. 54(3): 557-561.