

**PENGARUH MIKROENKAPSULASI PROBIOTIK BAKTERI ASAM LAKTAT *INDIGENOUS* UNGGAS TERHADAP KEMAMPUAN EKSKLUSI KOMPETITIF PADA *Salmonella enteritidis* DAN *Escherichia coli* SECARA *IN VITRO***

***MICROENCAPSULATION OF INDIGENOUS POULTRY LACTIC ACID BACTERIA PROBIOTIC ON THE COMPETITIVE EXCLUSION AGAINST *Salmonella enteritidis* AND *Escherichia coli* IN VITRO***

**Monica Sonia Indri Pradipta\*, Sri Harimurti, dan Widodo**  
Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281

Submitted: 7 December 2016, Accepted: 1 March 2017

**INTISARI**

Penelitian ini dilaksanakan untuk mengkaji pengaruh mikroenkapsulasi probiotik bakteri asam laktat (BAL) asal saluran pencernaan ayam terhadap *Salmonella enterica* serotipe Enteritidis ATCC 13076 dan *Escherichia coli* EPEC. Probiotik BAL yang digunakan terdiri atas *Streptococcus thermophilus* strain Kp-2, *Lactobacillus murinus* strain Ar-3, dan *Pediococcus acidilactici* strain Kd-6. Mikroenkapsulasi probiotik dilakukan dengan teknik *spray drying* pada suhu *inlet/outlet* 160/80°C menggunakan bahan penyalut campuran maltodekstrin dan susu skim (20% b/v). Uji eksklusi kompetitif dilakukan secara *in vitro* dengan metode difusi sumuran. Variabel yang diukur pada penelitian ini yaitu zona jernih yang dibentuk. Data zona jernih setiap perlakuan dianalisis statistik menggunakan analisis variansi (ANOVA) rancangan acak lengkap pola searah dan dilanjutkan dengan uji *Duncan multiple range test* (DMRT). Data zona jernih yang dihasilkan probiotik sebelum dan sesudah mikroenkapsulasi diuji dengan uji t-test. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kemampuan setiap strain melawan patogen mengalami penurunan setelah dilakukan mikroenkapsulasi. *S. thermophilus* Kp-1 memiliki daya antagonistik yang sama sebelum maupun sesudah *spray drying* terhadap *E. coli* EPEC maupun *S. enteritidis* ATCC 13076 ( $P>0.05$ ). Proses mikroenkapsulasi dengan metode *spray drying* menurunkan kemampuan antagonistik probiotik baik strain tunggal maupun multi strain terhadap bakteri patogen.

(Kata kunci: *In vitro*, Metode sumuran, Mikroenkapsulasi, Probiotik, Zona jernih)

**ABSTRACT**

*This study was conducted to investigate the effect of microencapsulation of lactic acid bacteria (LAB) probiotic isolated from chickens' gastrointestinal tract on Salmonella enterica serotype enteritidis ATCC 13076 and Escherichia coli EPEC. Probiotic of LAB used were Streptococcus thermophilus strain Kp-2, Lactobacillus murinus strain Ar-3, and Pediococcus acidilactici strain Kd-6. Microencapsulation were conducted by spray drying with inlet/outlet temperatures of 160/80°C using maltodextrin and skim milk powder (20% w/v) as coating materials. Competitive exclusion test was conducted in vitro using well diffusion method. Variable measured in this study was the clear zone observed. The data of clear zone among treatments were analyzed using analysis of variance (ANOVA) one way followed by Duncan multiple range test (DMRT); except the data of clear zone resulted by probiotic before and after microencapsulation that was analyzed using t-test. The result showed that the ability of each strain against pathogen was decreased after being encapsulated. S. thermophilus before and after microencapsulation had the same antagonistic ability against E. coli and S. enteritidis ( $P>0.05$ ). Microencapsulation process with spray drying method decreased antagonistic ability of probiotic against pathogenic bacteria both in single and multi strain.*

(Key words: Clear zone, In vitro, Microencapsulation, Probiotic, Well diffusion method)

\* Korespondensi (corresponding author):  
Telp. +62 895 0715 0468  
E-mail: mncpradipta@gmail.com

## Pendahuluan

*Colibacillosis* dan *Salmonellosis* merupakan jenis penyakit utama yang menyerang ayam oleh infeksi bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella spp* (Kabir, 2010). Infeksi *Escherichia coli* pada ayam dapat menyebabkan mortalitas yang sangat tinggi sehingga dalam kurun waktu semalam ribuan ekor ayam akan mati. Penyakit *Salmonellosis* yang disebabkan *Salmonella spp.* menyebabkan keracunan darah yang fatal pada embrio ayam yang penularannya melalui transmisi telur tetas (Shah et al., 2012). Adanya infeksi bakteri tersebut dapat menyebabkan gangguan pencernaan dan metabolisme pada ayam sehingga menurunkan produktivitas ayam sebagai penghasil telur tetas dan daging (Haider et al., 2004).

Infeksi *Salmonella enterica* serotipe enteritidis pada ayam dan manusia dapat mengakibatkan penyakit dan gangguan saluran pencernaan atau gastro-enteritis (Berchieri et al., 2001). Infeksi pada ayam lebih lanjut dapat mengakibatkan kerugian ekonomi yang cukup besar. Penularan *Salmonella enteritidis* dapat terjadi secara vertikal dari induk ke anak ayam melalui telur, dan secara horizontal dari ayam sakit ke ayam sehat melalui alat-alat dan bahan-bahan yang terkontaminasi (Kusumaningsih et al., 2007).

Penelitian mengenai pemberian probiotik sebagai alternatif antibiotik telah banyak dilakukan hingga saat ini. Namun demikian untuk memberikan pengaruh yang baik dan menguntungkan inang, probiotik yang diberikan harus betul-betul teruji. Probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang bisa berupa strain tunggal maupun campuran beberapa strain. Penggunaannya sebagai suplemen pakan ternak dapat berbentuk serbuk, diteteskan oral, atau diberikan melalui air minum (Fuller, 1992). Probiotik yang digunakan pada penelitian ini merupakan probiotik hasil isolasi saluran pencernaan unggas yang telah diseleksi keunggulannya. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa pemberian probiotik secara oral mampu melawan infeksi *Salmonella pullorum* secara *in vivo* (Harimurti, 2009; Harimurti, 2011). Pemberian probiotik dalam kultur cair secara oral tidak aplikatif dalam peternakan skala industri karena akan membutuhkan waktu dan tenaga kerja dalam jumlah besar.

Berdasarkan definisi probiotik sebagai mikroorganisme hidup yang menguntungkan inangnya, maka menjadi penting untuk mempertahankan viabilitas probiotik. Salah satu metode untuk menjaga viabilitas sel mikrobia yaitu dengan cara melindungi sel dari faktor lingkungan luar melalui enkapsulasi (Kailasapathy, 2002; Mortazavian et al., 2012). *Spray drying* merupakan salah satu teknik enkapsulasi yang mudah dilakukan dan umum digunakan (Mutukumira et al., 2014). Sel probiotik akan disemprotkan pada suhu udara panas untuk membentuk partikel bulat berukuran mikron yang menyelubungi sel (Serna-Cock dan Vallejo-Castillo, 2013).

Bahan penyalut yang cocok digunakan untuk metode *spray drying* harus memiliki aktivitas pengemulsi yang tinggi, stabilitas yang tinggi, kecenderungan membentuk jaringan halus dan padat selama pengeringan dan tidak menyebabkan terjadinya pemisahan lipid dari emulsi selama pengeringan (Imagi et al., 1992). Karbohidrat seperti pati, maltodekstrin, dan padatan sirup jagung biasanya digunakan dalam mikroenkapsulasi bahan makanan. Namun, bahan dinding dari komponen tersebut memiliki sifat *interfacial* yang buruk dan harus dimodifikasi secara kimia untuk meningkatkan aktivitas permukaannya. Sebaliknya, protein memiliki karakter ampifilik yang memberikan sifat fisikokimia dan fungsional yang dibutuhkan untuk enkapsulasi bahan inti hidrofobik. Selain itu, senyawa protein seperti natrium kaseinat, isolat protein kedelai, dan konsentrat protein whey bisa juga diharapkan untuk mendapatkan sifat mikroenkapsulasi yang baik (Gharsallaoui et al., 2007). Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh mikroenkapsulasi terhadap aktivitas anti bakteri probiotik.

## Materi dan Metode

### Materi

**Probiotik BAL.** Probiotik BAL yang digunakan meliputi strain *Lactobacillus murinus* (Ar-3), *Streptococcus thermophilus* (Kp-2), *Pediococcus acidilactici* (Kd-6) dan campuran ketiga strain (MIX) milik Sri Harimurti (2007). Bakteri patogen yang digunakan adalah *Salmonella enterica* serotipe *enteritidis* ATCC 13076 dan *Escherichia coli* EPEC.

**Media.** Media yang digunakan untuk pertumbuhan probiotik BAL yaitu media *peptone glucose yeast (PGY) broth* dan *PGY agar*. Media untuk pertumbuhan bakteri patogen digunakan media *nutrient broth (NB)* dan *nutrient agar (NA)*.

**Peralatan untuk peremajaan probiotik BAL dan bakteri patogen serta uji eksklusi kompetitif probiotik BAL terhadap patogen secara *in vitro*.** Alat yang digunakan untuk peremajaan probiotik meliputi: alat-alat gelas, mikropipet, tip, timbangan analitik merk Mettler PM 4600 DeltaRange, *autoclave* merk Hirayama HICLAVE HVE-2.5, lampu pijar, *laminar air flow (LAF)* merk Gelman Sciences, sentrifuge, sumuran 9,5 mm, dan inkubator.

#### Metode

**Preparasi produksi biomassa probiotik BAL berdasarkan metode Muttaqin (2005) yang dimodifikasi.** Masing-masing kultur probiotik BAL *Lactobacillus murinus* (Ar-3), *Streptococcus thermophilus* (Kp-2), *Pediococcus acidilactici* (Kd-6) sebanyak 0,25 ml (5%) ditumbuhkan pada 5 ml media *PGY broth* selama 24 jam pada suhu 37°C. Kultur sel yang diperoleh selanjutnya dipakai sebagai starter untuk inokulasi pada media *PGY broth* 10 ml media lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Biomassa hasil inokulasi kedua ini dipakai untuk inokulasi ketiga pada 30 ml media air kelapa dan ekstrak tauge yang telah disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Inokulasi keempat dilakukan pada 1800 ml media air kelapa dan ekstrak tauge lalu diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C.

**Preparasi mikroenkapsulasi probiotik BAL berdasarkan metode Mutukumira et al. (2014) yang dimodifikasi.** Biomassa sel pada media 1800 ml air kelapa dan ekstrak tauge dipanen dengan sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm (1350 x g) selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang lalu pelet dicuci dengan *phosphate buffer saline (PBS)*. Biomassa sel berupa pellet basah dihitung konsentrasi sel bakteri dan dicampur dengan larutan susu skim-maltodekstrin untuk preparasi *spray drying*.

Bahan penyalut yang digunakan adalah campuran susu skim-maltodekstrin (1:1). Larutan yang dibuat sebanyak 600 ml

sementara bahan penyalut yang digunakan sebanyak 20% dari total larutan (Mutukumira et al., 2014). Sebanyak 60 g susu skim dilarutkan pada 300 ml aquadest steril dan disterilisasi pada suhu 115°C selama 10 menit. Sebanyak 60 g maltodekstrin dilarutkan dalam 300 ml aquadest steril dan disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya kedua larutan dicampur secara aseptis lalu digojok halus selama 15 menit. Larutan susu skim-maltodekstrin yang telah steril sebanyak 600 ml dicampur dengan suspensi biomassa sel bakteri dengan konsentrasi masing-masing biomassa sel  $9,31 \times 10^{12}$  CFU dan digojok halus menggunakan *shaker* selama 1 jam pada suhu 20°C.

Larutan susu skim-maltodekstrin yang telah dicampur biomassa sel dikeringkan menggunakan *spray dryer* (SD-Basic Lap Plant) dengan *nozzle* pada suhu *spray dryer inlet/outlet* 160/80°C. Mikrokapsul dikemas pada kemasan plastik klip dan disimpan pada suhu kamar.

**Preparasi konsentrasi sel probiotik BAL enkapsulasi dan nonenkapsulasi serta konsentrasi patogen.** Pada umur simpan hari ke-7, konsentrasi probiotik BAL enkapsulasi diukur dengan cara melarutkan 0,5 g probiotik BAL enkapsulasi ke dalam 4,5 ml larutan NaCl 0,85% steril lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Tahap selanjutnya dilakukan seri pengenceran setelah inkubasi. Penghitungan jumlah sel dilakukan dengan metode *pour plate* setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Konsentrasi probiotik BAL enkapsulasi umur inkubasi 24 jam pada *L. murinus* adalah  $1,0 \times 10^6$  CFU/ml, *S. thermophilus*  $8,9 \times 10^6$  CFU/ml, *P. acidilactici*  $1,0 \times 10^6$  CFU/ml, dan campuran ketiga strain (MIX)  $1,5 \times 10^7$  CFU/ml. Untuk memperoleh konsentrasi campuran ketiga strain (MIX) menjadi  $10^6$  CFU/ml maka dilakukan pengenceran 1:10 pada larutan NaCl 0,85% steril.

Konsentrasi probiotik BAL nonenkapsulasi diperoleh melalui tahapan inokulasi kultur sebanyak 0,25 ml ke dalam 5 ml media *PGY broth* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Tahap selanjutnya dilakukan seri pengenceran setelah inkubasi. Penghitungan dengan metode *pour plate* setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Konsentrasi probiotik BAL nonenkapsulasi umur inkubasi 24 jam pada *L. murinus* adalah

6,1 x 10<sup>8</sup> CFU/ml, *S. thermophilus* 3,7 x 10<sup>8</sup> CFU/ml, *P. acidilactici* 1,2 x 10<sup>7</sup> CFU/ml, dan campuran ketiga strain (MIX) 4,3 x 10<sup>8</sup> CFU/ml. Untuk memperoleh konsentrasi *L. murinus*, *S. thermophilus*, dan campuran ketiga strain (MIX) menjadi 10<sup>6</sup> CFU/ml maka dilakukan pengenceran 1:100 pada larutan NaCl 0,85% steril. Sementara untuk memperoleh konsentrasi *P. acidilactici* menjadi 10<sup>6</sup> CFU/ml maka dilakukan pengenceran 1:10 pada larutan NaCl 0,85% steril.

Konsentrasi patogen diketahui melalui tahapan inokulasi kultur sebanyak 1 ml ke dalam 10 ml media PGY broth kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Tahap selanjutnya dilakukan seri pengenceran setelah inkubasi. Penghitungan dilakukan dengan metode *pour plate* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Konsentrasi *S. enteritidis* umur inkubasi 24 jam adalah 2,0 x 10<sup>7</sup> CFU/ml, sedangkan konsentrasi *E. coli* 1,3 x 10<sup>6</sup> CFU/ml. Untuk memperoleh konsentrasi *S. enteritidis* menjadi 10<sup>5</sup> CFU/ml maka dilakukan pengenceran 1:100 pada larutan NaCl 0,85% steril. Sementara untuk memperoleh konsentrasi *E. coli* menjadi 10<sup>5</sup> CFU/ml maka dilakukan pengenceran 1:10 pada larutan NaCl 0,85% steril.

**Uji eksklusif kompetitif probiotik BAL terhadap bakteri patogen dengan metode difusi sumuran (Hardewi, 2000) yang dimodifikasi.** Metode difusi sumuran dilakukan dengan penanaman kultur bakteri patogen (10<sup>5</sup>CFU/ml) pada media PGY agar, kemudian ditambahkan *nutrien agar* (agar lunak). Sumuran diletakkan di atas agar dan diinokulasi kultur bakteri asam laktat nonenkapsulasi dan enkapsulasi sebanyak 150 µl umur 24 jam dengan konsentrasi 10<sup>6</sup>CFU/ml, diinkubasi 37°C selama 24 hingga 48 jam. Zona jernih yang dihasilkan diukur diameternya menggunakan jangka sorong dalam satuan mm kemudian dikurangi dengan diameter sumuran yaitu 9,5 mm.

#### Analisis data

Data zona jernih yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis variansi rancangan acak lengkap pola searah. Perbandingan kemampuan uji eksklusif kompetitif sebelum dan sesudah *spray drying* dianalisis menggunakan analisis variansi t-test.

## Hasil dan Pembahasan

*Spray drying* dipilih sebagai metode enkapsulasi karena beberapa keunggulannya yaitu cepat, biaya produksi rendah, dapat mengontrol ukuran partikel, dan cocok untuk aplikasi skala industri (Burgain et al., 2011; Serna-Cock dan Vallejo-Castillo, 2013; Mutukumira et al., 2014). Hasil penelitian menunjukkan bahwa strain *P. acidilactici* sebelum *spray drying* secara signifikan ( $P < 0,05$ ) memiliki kemampuan menghambat *E. coli* dan *S. enteritidis* yang lebih baik dibandingkan strain *S. thermophilus*, *L. murinus*, maupun campuran ketiga strain (MIX) (Tabel 1a). Namun demikian, setelah *spray drying* terlihat bahwa *P. acidilactici* menghasilkan zona jernih yang sama dengan strain lain ( $P > 0,05$ ) (Tabel 1a). Penghambatan bakteri patogen oleh probiotik dicerminkan dari zona jernih yang dihasilkan di sekitar sumuran. Penghambatan dinilai positif apabila zona jernih di sekitar koloni probiotik sebesar 0,5 mm atau lebih (Schillinger dan Lucke, 1989; Arias et al., 2013).

*Lactobacillus murinus* strain Ar-3, *Pediococcus acidilactici* strain Kd-6, dan *Streptococcus thermophilus* strain Kp-2 merupakan Gram positif dan bersifat homofermentatif. Ketiga strain BAL tersebut berasal dari saluran pencernaan ayam kampung pada segmen *caecum*. *Pediococcus acidilactici* strain Kd-6 dan *Streptococcus thermophilus* strain Kp-2 adalah BAL yang tahan terhadap kekeringan dan suhu tinggi hingga 50°C (Harimurti et al., 2007). *Lactobacillus murinus* strain Ar-3, *Pediococcus acidilactici* strain Kd-6, dan *Streptococcus thermophilus* strain Kp-2 dalam bentuk kultur basah terbukti memiliki daya hambat terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Salmonella enteritidis* (Setyaningrum, 2000; Hardewi, 2000). Sementara *E. coli* dan *S. enteritidis* merupakan bakteri Gram negatif, *non acid fast*, non spora, fakultatif anaerob, dan bersifat motil (Kabir, 2010; Ray, 2004). Alakomi et al. (2000) melaporkan bahwa asam laktat adalah agen penghancur membran bakteri Gram negatif yang dibuktikan dengan kemampuannya merusak lipopolisakarida pada dinding sel *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, dan *Pseudomonas aeruginosa*.

Asam lemak rantai pendek seperti asam format, asetat, propionat, butirat, dan laktat yang diproduksi oleh bakteri probiotik selama metabolisme karbohidrat secara anaerob memiliki peran penting dalam menurunkan pH

(Gillor *et al.*, 2008). Aksi penghambatan mikrobial oleh asam organik terjadi melalui kombinasi aksi antara bentuk ion terdisosiasi dan bentuk molekul tidak terdisosiasi (Kashket, 1987 *cit.* Gillor *et al.*, 2008; Alakomi *et al.*, 2000). Bentuk ion terdisosiasi akan memberikan penghambatan berupa penurunan kecepatan pertumbuhan dan perpanjangan fase lag bakteri (fase adaptasi). Sementara bentuk molekul tidak terdisosiasi yang memiliki sifat lebih lipofilik akan bebas masuk melalui membran dan menurunkan pH internal sel yang pada akhirnya mengakibatkan kematian sel (Ray, 2004).

Kemampuan penghambatan terhadap *E. coli* dan *S. enteritidis* pada *L. murinus*, *P. acidilactici*, dan campuran ketiga strain (MIX) mengalami penurunan setelah spray drying; kecuali pada *L. murinus* terhadap *E. coli* dan *S. thermophilus* terhadap *E. coli* dan *S. enteritidis* (Tabel 1b). Kemampuan *L. murinus* dan campuran ketiga strain (MIX) setelah mikroenkapsulasi menurun melawan *S. enteritidis* (Tabel 1b). Papaconstantinou dan

Thomas (2007) menyatakan bahwa waktu inkubasi *S. enteritidis* (8-48 jam) lebih cepat dibandingkan *E. coli* (72-96 jam). Dengan demikian dalam waktu inkubasi yang sama (48 jam) probiotik melawan lebih banyak *S. enteritidis* daripada *E. coli* sehingga zona jernih yang dihasilkan ketika melawan *S. enteritidis* lebih kecil dibandingkan *E. coli*. Charkowski *et al.* (2002) melaporkan pertumbuhan *Salmonella enterica* selama 48 jam yaitu  $3,7 \log_{10}$ , sedangkan *Escherichia coli* secara signifikan lebih rendah dibandingkan *Salmonella enterica* yaitu  $2,3 \log_{10}$ .

*S. thermophilus* memiliki kemampuan menghambat yang sama sebelum dan setelah mikroenkapsulasi terhadap *E. coli* dan *S. enteritidis* (Tabel 1b). Hal ini terjadi karena *S. thermophilus* merupakan BAL yang tahan terhadap kekeringan dan suhu  $50^{\circ}\text{C}$  (Harimurti *et al.*, 2007). Tabel 2 menunjukkan bahwa ketahanan hidup (*survival viability*) *S. thermophilus* mencapai 90% setelah

Tabel 1a. Zona penghambatan probiotik bakteri asam laktat (BAL) sebelum dan sesudah mikroenkapsulasi terhadap *E. coli* dan *S. enteritidis* secara *in vitro* (inhibition zone of lactic acid bacteria (LAB) probiotic before and after microencapsulation on *E. coli* and *S. enteritidis* *in vitro*)

Strain (10 <sup>6</sup> CFU/ml)	<i>E. coli</i> 10 <sup>5</sup> CFU/ml		<i>S. enteritidis</i> 10 <sup>5</sup> CFU/ml	
	Sebelum mikroenkapsulasi (mm) (before microencapsulation (mm))	Setelah mikroenkapsulasi (mm) (after microencapsulation (mm))	Sebelum mikroenkapsulasi (mm) (before microencapsulation (mm))	Setelah mikroenkapsulasi (mm) (after microencapsulation (mm))
<i>L. murinus</i>	3.00±1.32 <sup>ab</sup>	2.83 ±1.76 <sup>ns</sup>	3.50±0.50 <sup>a</sup>	2.33±0.58 <sup>b</sup>
<i>S. thermophilus</i>	2.33 ±0.58 <sup>a</sup>	1.50±0.50 <sup>ns</sup>	3.00±0.50 <sup>a</sup>	2.50±0.00 <sup>b</sup>
<i>P. acidilactici</i>	5.17 ±0.29 <sup>c</sup>	3.50±0.50 <sup>ns</sup>	5.50±0.50 <sup>b</sup>	2.67±0.29 <sup>b</sup>
MIX	4.33±1.04 <sup>bc</sup>	1.33±0.29 <sup>ns</sup>	3.67±0.29 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c,ns</sup> superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ) (mean in the same column with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ )).

Tabel 1b. Zona penghambatan probiotik bakteri asam laktat (BAL) sebelum dan sesudah mikroenkapsulasi terhadap *E. coli* dan *S. enteritidis* secara *in vitro* berdasarkan t-test (inhibition zone of lactic acid bacteria (LAB) probiotic before and after microencapsulation on *E. coli* and *S. enteritidis* *in vitro* based on t-test)

Strain (10 <sup>6</sup> CFU/ml)	<i>E. coli</i> 10 <sup>5</sup> CFU/ml		<i>S. enteritidis</i> 10 <sup>5</sup> CFU/ml	
	Sebelum mikroenkapsulasi (mm) (before microencapsulation (mm))	Setelah mikroenkapsulasi (mm) (after microencapsulation (mm))	Sebelum mikroenkapsulasi (mm) (before microencapsulation (mm))	Setelah mikroenkapsulasi (mm) (after microencapsulation (mm))
<i>L. murinus</i>	3.00±1.32	2.83 ±1.76 <sup>ns</sup>	3.50±0.50	2.33±0.58 <sup>sig</sup>
<i>S. thermophilus</i>	2.33±0.58	1.50±0.50 <sup>ns</sup>	3.00±0.50	2.50±0.00 <sup>ns</sup>
<i>P. acidilactici</i>	5.17±0.29	3.50±0.50 <sup>sig</sup>	5.50±0.50	2.67±0.29 <sup>sig</sup>
MIX	4.33±1.04	1.33±0.29 <sup>sig</sup>	3.67±0.29	0.00±0.00 <sup>sig</sup>

<sup>ns</sup> dan <sup>sig</sup> pada kolom yang sama setelah mikroenkapsulasi untuk tiap sampel berdasarkan hasil t-test ( $P > 0,05$ ) dan ( $P < 0,05$ ) (<sup>ns</sup> and <sup>sig</sup> mean in the same column after microencapsulation for each sample based on t-test result ( $P > 0.05$ ) dan ( $P < 0.05$ )).

Tabel 2. Viabilitas probiotik bakteri asam laktat sebelum dan setelah mikroenkapsulasi (log CFU/g)  
(*viability of lactic acid bacteria probiotics before and after microencapsulation (log CFU/g)*)

Waktu	Log CFU/g			
	<i>Lactobacillus murinus</i> <sup>sig</sup>	<i>Streptococcus thermophilus</i> <sup>sig</sup>	<i>Pediococcus acidilactici</i> <sup>ns</sup>	MIX <sup>sig</sup>
Sebelum mikroenkapsulasi ( <i>before microencapsulation</i> )	3,67 x 10 <sup>9</sup>	2,33 x 10 <sup>9</sup>	4,33 x 10 <sup>8</sup>	1,33 x 10 <sup>10</sup>
Setelah mikroenkapsulasi ( <i>after microencapsulation</i> )	1,00 x 10 <sup>8</sup>	2,67 x 10 <sup>8</sup>	1,00 x 10 <sup>8</sup>	1,33 x 10 <sup>9</sup>
Viabilitas survive ( <i>survival viability</i> )	83,94%	90,53%	93,89%	90,01%

ns=non significant

sig=significant (P<0.05).

dilakukan mikroenkapsulasi. Dengan demikian viabilitas *S. thermophilus* tetap terjaga pasca pengeringan.

Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa bakteri asam laktat multistrain berupa *Lactobacillus murinus* DPC6002 dan DPC6003, *Lactobacillus pentosus* DPC6004, *Lactobacillus salivarius* DPC6005, dan *Pediococcus pentosaceus* DPC6006 hasil isolasi dari usus babi memiliki kemampuan menurunkan infeksi *Salmonella* (Casey et al., 2007). Namun demikian Gardiner et al. (2004) menemukan bahwa *Lactobacillus murinus* tidak menunjukkan daya hambat terhadap *Salmonella*. Pada sisi lain kombinasi *L. salivarius*, *P. pentosaceus*, dan *L. pentosus* menunjukkan aktivitas penghambatan yang besar terhadap *Salmonella*. Sementara itu Kizerwetter-swida dan Binek (2005) menyatakan bahwa *Lactobacillus* memiliki aktivitas antimikrobal yang rendah terhadap *E. coli* dan *S. enteritidis* daripada *Clostridium perfringens*.

Gardiner et al. (2004) melaporkan bahwa melalui metode Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD-PCR), *L. murinus* ditemukan dalam keadaan predominasi yaitu level populasinya tinggi diantara kombinasi 5 strain probiotik yang diberikan pada pakan ternak. *Lactobacillus* memiliki reputasi sebagai penghuni saluran pencernaan yang dominan karena sifatnya mudah tumbuh, memiliki toleransi yang tinggi terhadap oksigen atau tanpa oksigen (fakultatif anaerob) (Walter, 2008). Probiotik multistrain (komersial) dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri lebih rendah dibandingkan probiotik monostrain terhadap *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, dan *Escherichia coli* (Darabi et al., 2014). Berdasarkan literatur di atas, sangat mungkin bahwa mikrokapsul probiotik multistrain (MIX) pada penelitian ini memberikan daya hambat rendah karena

adanya predominasi *L. murinus* sebelum dilakukan mikroenkapsulasi. Sifat *L. murinus* yang tidak tahan panas tentu menyebabkan kematian sel dalam jumlah besar. Hal ini didukung dengan data penelitian ini yang menyatakan bahwa *survival viability* dari *L. murinus* 83,94% yang lebih rendah dibandingkan dengan strain lainnya (lebih dari 90%) setelah *spray drying* (Tabel 2).

Secara keseluruhan kemampuan daya hambat probiotik mengalami penurunan setelah dilakukan mikroenkapsulasi. Hal ini didukung dengan turunnya viabilitas probiotik pasca mikroenkapsulasi (Tabel 2). Penurunan viabilitas selama proses termal berhubungan dengan kerusakan sel yang dihasilkan dari kombinasi efek panas dan stress mekanik; sebagai contoh meliputi denaturasi DNA dan RNA, kerusakan ribosom, dehidrasi membran sitoplasma, dan kerutan membran sel karena penguapan air (Behboudi-Jobbehdar et al., 2013).

## Kesimpulan

Hasil uji antagonistik probiotik strain tunggal (single strain) menunjukkan daya hambat terhadap *E. coli* dan *S. enteritidis*. Proses mikroenkapsulasi menurunkan kemampuan probiotik baik singlestrain maupun multistrain dalam menghambat bakteri patogen.

## Daftar Pustaka

- Alakomi, H. L., E. Skytta, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm, K. Latva-Kala, and I. M. Helander. 2000. Lactic acid permeabilizes Gram-Negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol.* 66: 2001-2005.
- Arias, O. A. B., M. de la Luz Reyes, M. L. Navarro, Y. B. Solis, M. Márquez, G. G. Sanchez, R. Snell, and R. Zuñiga.

2013. Antagonistic effect of probiotic strains against two pathogens: *Salmonella typhimurium* and *E. coli* O157:H7 resistant to antibiotics. *E-Gnosis*. 11: 1-16.
- Behboudi-Jobbehdar, S., C. Soukoulis, L. Yonekura, and I. Fisk. 2013. Optimization of spray-drying process condition for the production of maximally viable microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. *Drying Technology*. 31:1274-1283.
- Berchieri, A., Jr., C. K. Murphy, K. Marston, and P. A. Barrow. 2001. Observation on the persistence and vertical transmission *Salmonella enterica* serovars pullorum and gallinarum in chickens: Effect of bacterial and host genetic background. *Avian Pathol*. 30: 221-231.
- Burgain, J., C. Gaiani, M. Linder, and J. Scher. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial application. *J. Food Eng.* 104: 467-483.
- Casey, P. G., G. E. Gardiner, G. Casey, B. Bradshaw, P. G. Lawlor, P. B. Lynch, F. C. Leonard, C. Stanton, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, and C. Hill. 2007. A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Appl. Environ Microbiol*. 73: 1858-1863.
- Charkowski, A. O., J. D. Barak, C. Z. Sarreal, and R. E. Mandrell. 2002. Differences in growth of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa sprouts. *Appl. Environ Microbiol*. 68: 3114-3120.
- Darabi, P., M. Goudarzvand, M. M. Natanzi, and Z. Khodaii. 2014. Antibacterial activity of probiotic bacteria isolated from broiler feces and commercial strains. *Int. J. Enteric Pathog.* 2:1-6.
- Fuller, R. 1992. History and Development of Probiotics. In: *Probiotics the Scientific Basis*, Fuller, R (ed). Chapman & Hall, London, pp: 1-8.
- Gardiner, G. E., P. G. Casey, G. Casey, P. B. Lynch, P. G. Lawlor, C. Hill, G. F. Fitzgerald, C. Stanton, and R. P. Ross. 2004. Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol*. 70: 1895-1906.
- Gharsallaoui, A., G. Roudaut, O. Chambin, A. Voilley, and R. Saurel. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Research International*. 40: 1107-1121.
- Gillor, O., A. Etzion, and M. A. Riley. 2008. The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. *Appl Environ Microbiol Biotechnol*. 81: 591-606.
- Haider, M. G., M. G. Hossain, M. S. Hossain, E. H. Chowdhury, P. M. Das, and M. M. Hossain. 2004. Isolation and characterization of enterobacteria associated with health and disease in sonali chickens. *Bangl. J. Vet. Med.* 2: 15-21.
- Hardewi, S. 2000. Potensi Bakteri Asam Laktat sebagai Agensia Probiotik Ayam: Ketahanannya terhadap *Bile Salt* dan Daya Hambat terhadap Patogen *Salmonella sp.* Skripsi Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Imagi, J., T. Yamanouchi, K. Okada, M. Tanimoto, and R. Matsuno. 1992. Properties of agents that effectively entrap liquid lipids. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*. 56: 477-480.
- Kabir, S. M. L. 2010. Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 7: 89-114.
- Kailasapathy, K. 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Curr Issues Intest Microbiol*. 3: 39-48.
- Kizerwetter-swida, M. and M. Binek. 2005. Selection of potentially probiotic *Lactobacillus* strains towards their inhibitory activity against poultry enteropathogenic bacteria. *Pol. J. Microbiol*. 54: 287-294.
- Kusumaningsih, A., Supar, M, Sudarwanto, I. W. T. Wirawan, dan T. Ariyanti. 2007. Profil resistensi terhadap antimikroba isolat *Salmonella enterica* serotipe enteritidis yang diisolasi dari ayam dan produknya. *Prosiding Seminar Nasional Hari Pangan Sedunia XXVII*. Bogor, Indonesia, 21 November 2007.

- Mortazavian, A. M., R. Mohammadi, and S. Sohrabvandi. 2012. New Advances in the Basic and Clinical Gastroenterology: Delivery of Probiotic Microorganisms into Gastrointestinal Tract by Food Products. Iran: Tehran. [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com). Diakses pada 7 Januari 2015.
- Muttaqin, A. 2005. Mempelajari pembuatan pelet probiotik bakteri asam laktat untuk suplemen pakan ternak ayam. Skripsi. Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Mutukumira, A. N., J. Ang, and S. J. Lee. 2014. Viability and properties of spray-dried *Lactobacillus casei*-01. Proceedings of International Conference on Beneficial Microbes. Penang, Malaysia, 27<sup>th</sup>-29<sup>th</sup> May 2014.
- Papaconstantinou, H. T. and S. Thomas. 2007. Bacterial Colitis. Clin Colon Rectal Surg. 20: 18-27.
- Ray, B. 2004. Fundamental Food Microbiology. United States of America, CRC Press, Inc., Washington, D.C.
- Schillinger, U. and F. K. Lucke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl Environ Microbiol Biotechnol. 55: 1901-1906.
- Serna-Cock, L. and V. Vallejo-Castillo. 2013. Probiotic Encapsulation. Afr. J. Microbiol. Res. 7: 4743-4753.
- Setyaningrum, S. 2000. Potensi bakteri asam laktat sebagai agensia probiotik ayam: daya hambat terhadap patogen *E. coli* dan ketahanannya terhadap kondisi asam. Skripsi Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Shah, D. H., C. Casavant, Q. Hawley, T. Addwebi, D. R. Call, and J. Guard. 2012. *Salmonella enteritidis* strains from poultry exhibit differential responses to acid stress, oxidative stress, and survival in the egg albumen. Foodborne Pathog Dis. 9: 258-264.
- Harimurti, S., E. S. Rahayu, Nasroedin, and S. Kurniasih. 2007. Lactic acid bacteria isolated from the gastro-intestinal tract of chicken. Anim Prod. 9: 82-91.
- Harimurti, S. 2009. Study of competitive exclusion of *Salmonella pullorum* by probiotic strains in the broiler chickens. Proceedings of International Seminar of the 5<sup>th</sup> Asian Conference on Lactic Acid Bacteria: Microbes in Disease Prevention and Treatment. Singapore, July 2009.
- Harimurti, S. 2011. Probiotik bakteri asam laktat indigenus: pengaruhnya terhadap ekspresi biologis pada ayam broiler. Tesis. Sekolah Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Walter, J. 2008. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. Appl. Environ Microbiol. 74: 4985-4996.