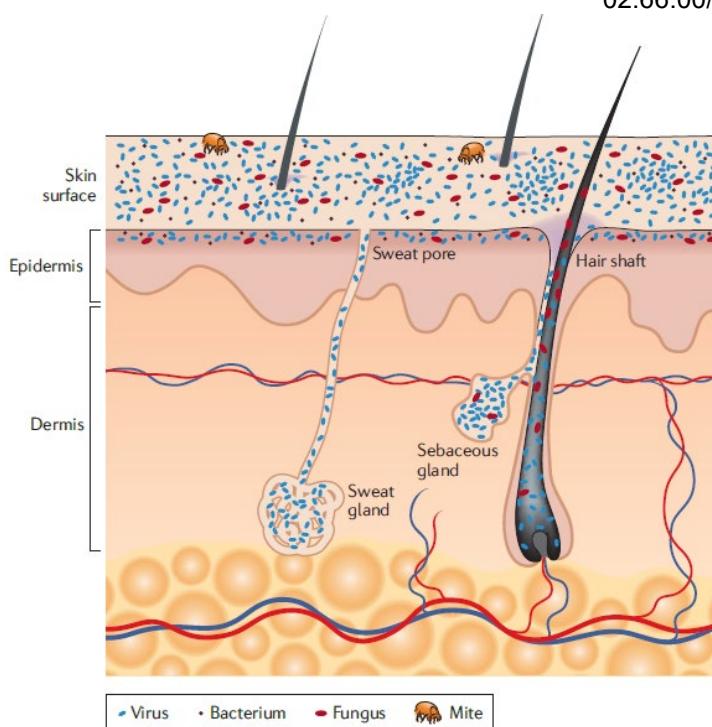


BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri Probiotik dan Mikrobioma Kulit

Mikroorganisme sangat erat kaitannya terhadap kehidupan, beberapa diantaranya dapat memberi manfaat dan tidak sedikit pula terdapat mikroorganisme yang dapat merugikan. Salah satu mikroorganisme tersebut adalah bakteri. Bakteri adalah sel prokariotik yang khas, dimana bakteri ini merupakan uniselular dan tidak mengandung struktur yang terbatasi membran di sitoplasmanya/ tidak memiliki membran inti sel. Bakteri dapat menimbulkan berbagai perubahan kimiawi pada substansi yang ditumbuhinya. Mikroorganisme ini sangat luas penyebarannya dalam lingkungan sehari-hari baik dalam tubuh manusia, permukaan bumi maupun atmosfer (Pelczar, Michael J & Chan, 1986). Salah satu bakteri yang dapat memberikan manfaat adalah bakteri probiotik, dimana menurut FAO/WHO (2001 dan 2002), Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup yang apabila dikonsumsi dengan jumlah yang cukup dapat memberi manfaat kesehatan. Terdapat 3 (tiga) hal yang harus dipenuhi oleh mikroorganisme probiotik: (1) mikroorganisme dalam kondisi hidup saat dikonsumsi dan mampu berkolonisasi di kolon (usus besar); (2) jumlahnya cukup; (3) membawa manfaat terhadap kesehatan tubuh serta definisi tersebut diperkuat dengan tambahan dari organisasi ISAPP (2014) yang mengusulkan bahwa probiotik tidak hanya mikroorganisme yang hidup saja tetapi merupakan strain yang teridentifikasi dengan baik (well-defined strains) (Hill dkk., 2014). Bakteri probiotik mayoritas berasal dari bakteri asam laktat (Parvez et al., 2006)

Mikrobioma kulit adalah komunitas atau kumpulan berbagai mikroba pada kulit yang memiliki peran penting dalam memainkan respon imun bawaan dan adaptif serta pemeliharaan fungsi penghalang kulit (Lee et al., 2019). Seluas 1,8 m² area kulit dapat menjadi ekosistem sebagai habitat yang mendukung berbagai mikroorganisme untuk hidup karena dengan banyaknya area lipatan, invaginasi dan relung khusus pada kulit. Peran utama kulit adalah sebagai penghalang fisik, melindungi tubuh dari potensi serangan organisme asing atau zat beracun. Kulit juga merupakan antarmuka dengan lingkungan luar yang dapat dijajah oleh beragam mikroorganisme seperti bakteri, jamur, dan virus sebagai serta tungau (lihat gambar 2.1). (Grice & Segre, 2011)



Gambar 2.1 Skema histologi kulit dilihat secara *cross-section* dengan mikroorganisme dan lekatan kulit (Grice & Segre, 2011)

Mikroba yang hidup di lingkungan bebas berbeda dengan mikrobiota yang hidup pada mamalia (mammalian microbiota). Mikrobioma di lingkungan bebas memiliki sifat yang ekstrem disebabkan karena paparan udara yang lembab. Lingkungan mikroba pada tubuh manusia dianggap sebagai lingkungan yang istimewa karena suasana yang hangat, eutrotrofik, dan stabil. Mikrobioma yang hidup pada tubuh manusia diantaranya adalah bakteri, eukariotik, archaea, dan virus.(Sudarmono, 2016). Mikrobioma kulit menempati berbagai macam relung kulit dan melindungi terhadap invasi patogen atau organisme berbahaya. Mikrobioma kulit ini juga memiliki peran dalam melatih miliaran sel T yang ditemukan di kulit (Grice & Segre, 2011). Terdapat empat filum bakteri utama dalam mikrobioma yang teridentifikasi pada kulit yaitu *Actinobacteria* sekitar 52%, *Firmicutes* sekitar 24%, *Proteobacteria* sekitar 17%, dan *Bacteroidetes* sekitar 7% (McLoughlin dkk., 2021). Sedangkan genus yang dominan pada mikrobioma kulit adalah *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, dan *Staphylococcus* (Cooper dkk., 2015; Tavaria, 2017). Probiotik dengan mikrobioma kulit memiliki keterkaitan satu sama lain, dimana studi klinis mengenai penggunaan topikal probiotik dapat memberikan efek peningkatan kesehatan lain di luar kesejahteraan usus seperti pengobatan suportif pada dermatitis atopik (Axt-Gadermann dkk., 2021), penyembuhan luka bakar dan bekas luka (O'Neill et al., 2013), meremajakan kulit dan juga meningkatkan kekebalan bawaan kulit (Tavaria, 2017) kemudian menurut Arck, dkk (2010) mengusulkan konsep sumbu *gut-brain-skin*, yang menunjukkan bahwa

modulasi mikrobioma dengan penyebaran probiotik dapat memberikan efek menguntungkan yang ditemukan, misalnya pada peradangan dan homeostatis kulit.

2.2. Viabilitas, Bentuk Preparasi Probiotik dan Lisat Bakteri dalam Sediaan Topikal

Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup apabila diberikan dalam jumlah yang memadai, dapat memberikan manfaat bagi kesehatan konsumen (Seyedain-Ardabili et al., 2016). Viabel atau viabilitas merupakan jumlah sel yang dapat hidup, umumnya diperkirakan sebagai ukuran konsentrasi sel (Yulinery & Nurhidayat, 2016). Dimana viabilitas dapat dievaluasi dengan metode cawan hitung (Apridani, 2014; Simbolon, D. L. S., Yusmarini, & Ali, 2016). Untuk memberikan keuntungan bagi kesehatan, viabilitas bakteri probiotik dalam suatu produk makanan harus memenuhi tingkat minimum 10^6 CFU/g produk makanan atau 10^7 CFU/g baik pada saat proses distribusi maupun saat dimakan harus berada dalam jumlah yang cukup untuk menghasilkan asupan harian 10^8 CFU/g (Apridani dkk., 2014; Chávarri dkk., 2010). Sedangkan untuk produk kosmetik karena masalah keamanan, produk kosmetik diharapkan memiliki kandungan yang rendah mikroorganisme (di bawah 500 unit pembentuk koloni (CFU)/g untuk produk area mata dan 1000 CFU/g untuk sisanya) (Cinque dkk., 2011). Untuk memenuhi keberadaan probiotik dalam jumlah tersebut, mikroorganisme ini tidak boleh terpengaruh oleh paparan faktor lingkungan, bahan-bahan dalam formula tidak boleh menimbulkan toksisitas dan harus melindungi sel-sel mikroba dari lingkungan yang dapat mendukung cedera sel (Ezekiel dkk., 2020; Mahmoud dkk., 2020; Seyedain-Ardabili dkk., 2016). Sehingga viabilitas atau kelangsungan hidup probiotik tetap terjaga. Namun, terdapat banyak faktor yang dapat mempengaruhi kelangsungan hidup dan fungsionalitas probiotik seperti perlakuan panas, suhu penyimpanan, pengaruh keberadaan beberapa bahan tambahan seperti pengawet dan lainnya. Oleh karena itu, selama produksi probiotik, kelangsungan hidup sel dan bioavailabilitas dalam tuan rumah harus dipertimbangkan (Mahmoud dkk., 2020).

Sebelum probiotik diolah atau dimasukan kedalam suatu produk, probiotik tersebut akan disiapkan atau dipreparasi baik dalam keadaan bentuk sel hidup maupun dalam bentuk bebas sel. Dalam bentuk preparasi sel hidup diantaranya yaitu dalam bentuk pelet bakteri (Yulinery & Nurhidayat, 2016), sel kultur (Oerlemans et al., 2020) dan ekstrak liofilisasi probiotik atau *lyophilized probiotic extract/LPE* (Mehdi-Alamdarloo dkk., 2016) sedangkan bentuk preparasi probiotik dalam keadaan bebas sel diantaranya yaitu supernatan bebas sel atau *cell free supernatant/CFS* (George-Okafor et al., 2020; Noni, 2017), supernatan kultur bebas sel atau *cell free culture supernatants/ CFCS* (Yang dkk., 2021),

supernatan bekas kultur atau *spent culture supernatant* (C. C. Tsai et al., 2013) dan lisat bakteri bebas sel atau *cell-free bacterial lysate* (Krinsky dkk., 2016).

Produk dengan lisat bakteri mengandung *heat-inactivated* bakteri probiotik, Dalam arti sempit pengertian lisat bakteri tersebut menyatakan bahwa lisat bakteri bukan termasuk kedalam probiotik. Tetapi lisat diproduksi oleh bakteri probiotik dan dapat menunjukkan efek menguntungkan yang serupa dengan bakteri hidup. Lisat adalah sel yang membran luarnya telah rusak karena bahan kimia atau proses fisik (Klein dkk., 2013). Salah satu manfaat lisat yaitu sebagai pilihan pengobatan lebih lanjut yang jarang digunakan untuk penyakit COPD dengan konsep immunomodulator dari ekstrak bakteri yang telah diliofilisasi untuk pemberian oral (Cazzola dkk., 2012; Tricarico dkk., 2004; Woodhead dkk., 2011). Selain untuk pemberian oral, lisat digunakan pula untuk pemberian topikal. Dimana dalam *Cell Free Supernatant* (CFS), lisat sel atau metabolit lebih stabil bila dibandingkan dengan bentuk sel hidupnya, karena hal tersebut lisat menjadi pilihan yang lebih cocok untuk pengembangan aplikasi topikal (Htwe dkk., 2019). Berdasarkan hasil pencarian dari dua situs pengecer besar produk kosmetik di Amerika Utara mengungkapkan bahwa setidaknya terdapat 50 produk telah dikomersialkan dengan klaim mengandung probiotik Beberapa produk kosmetik yang sudah beredar luas dipasaran tersebut mengandung lisat probiotik dari bakteri asam laktat untuk penggunaan topikal (Puebla-Barragan & Reid, 2021).

Tabel 2.1. Produk kosmetik mengandung klaim probiotik dari 50 produk yang diiklankan oleh pengecer besar kosmetik di Amerika (Puebla-Barragan & Reid, 2021)

Produk ID	Tipe Produk	Komposisi Kandungan
1	Balm	<i>Lactococcus ferment lysate</i>
2	Balm	<i>Lactobacillus ferment</i>
3	Cleanser	<i>Bifida ferment lysate</i>
4	Cleanser	<i>Lactobacillus ferment</i>
5	Cleanser	<i>Lactobacillus ferment</i>
6	Cleanser	<i>Bifida ferment lysate</i>
7	Cleanser	<i>Lactobacillus ferment</i>
8	Cream	<i>Lactobacillus ferment, Lactococcus ferment,</i>
9	Cream	<i>Lactobacillus ferment</i>
10	Cream	<i>Lactobacillus ferment</i>
11	Cream	<i>Lactobacillus ferment</i>
12	Cream	<i>Bifida ferment lysate</i>

13	<i>Cream</i>	<i>Lactobacillus ferment</i>
14	<i>Cream</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
15	<i>Cream</i>	<i>Lactococcus ferment lysate</i>
16	<i>Cream</i>	<i>Lactobacillus ferment</i>
17	<i>Cream</i>	<i>Lactobacillus ferment lysate</i>
18	<i>Cream</i>	<i>Lactobacillus ferment</i>
19	<i>Cream</i>	<i>Bifida ferment lysate</i>
20	<i>Deodorant</i>	<i>Saccharomyces ferment filtrat</i>
21	<i>Foundation</i>	<i>Lactobacillus ferment</i>
22	<i>Foundation</i>	<i>Lactobacillus</i>
23	<i>Foundation</i>	<i>Lactococcus ferment lysate</i>
24	<i>Gel</i>	<i>Lactobacoccus ferment lysate</i>
25	<i>Gel</i>	<i>Lactobacillus, lactococcus ferment lysate, etc</i>
26	<i>Gel</i>	<i>Leuconostoc ferment lysate</i>
27	<i>Gel</i>	<i>Lactococcus ferent lysate</i>
28	<i>Gel</i>	<i>Lactobacillus, greek yogurt, yogurt powder</i>
29	<i>Mask</i>	<i>Lactobacillus, greek yogurt, yogurt powder</i>
30	<i>Mask</i>	<i>Bifida ferment lysate</i>
31	<i>Mask</i>	<i>Lactococcus ferment lysate</i>
32	<i>Mask</i>	<i>Lactococcus ferment lysate</i>
33	<i>Mask</i>	<i>Lactobacillus ferment</i>
34	<i>Mask</i>	<i>Lactobacillus ferment, Lactococcus ferment, etc</i>
35	<i>Exfoliant</i>	<i>Lactobacillus ferment</i>
36	<i>Exfoliant</i>	<i>Lactococcus ferment lysate</i>
37	<i>Primer</i>	<i>Saccharomyces ferment filtrat</i>
38	<i>Exfoliant</i>	<i>Lactobacillus ferment, Lactococcus ferment, etc</i>
39	<i>Exfoliant</i>	<i>Saccharomyces ferment filtrat</i>
40	<i>Exfoliant</i>	<i>Lactobacillus ferment, Lactococcus ferment</i>
41	<i>Serum</i>	<i>Lactocococcus ferment lysate</i>
42	<i>Serum</i>	<i>Lactobacillus ferment, Lactococcus ferment, etc</i>
43	<i>Serum</i>	<i>L. bulgaricus ferment lysate</i>
44	<i>Serum</i>	<i>Bifida ferment lysate</i>
45	<i>Serum</i>	<i>Lactobacillus ferment extract</i>
46	<i>Serum</i>	<i>Bifida ferment lysate</i>
47	<i>Serum</i>	<i>Lactobacillus</i>

48	Serum	<i>Bifida ferment lysate</i>
49	<i>Soap Bar</i>	<i>Bifida ferment lysate</i>
50	<i>Soap Bar</i>	<i>Yogurt</i>

2.3. Karakteristik Bakteri Genus *Lactobacillus*

Menurut Parvez, dkk (2006) organisme yang paling umum digunakan dalam sediaan probiotik adalah bakteri asam laktat (lihat Tabel 2.2), dan umumnya bakteri tersebut adalah bakteri yang aman karena menurut Noni., dkk (2017) bakteri asam laktat tidak menghasilkan toksin dan dikenal dengan sebutan *food grade microorganism* yaitu mikroorganisme yang tidak beresiko terhadap kesehatan. Kriteria pemilihan bakteri asam laktat yang akan digunakan sebagai 'probiotik' mencakup kemampuan memberikan efek menguntungkan pada tuan rumah, tahan menjadi bahan olahan pada jumlah sel yang tinggi serta tetap layak selama umur simpan produk, dan tidak beracun dalam persiapannya. Probiotik yang paling luas dipelajari dan banyak digunakan adalah bakteri asam laktat, terutama genus *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium sp* (Parvez et al., 2006). Hal ini sesuai pula menurut Hill. dkk (2014), Invernici. dkk (2018), Marco. dkk (2006) dan Minocha (2009) bahwa pada umumnya bakteri probiotik yang digunakan dipasaran saat ini mayoritas berasal dari genus *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* tetapi tidak dipungkiri pula terdapat beberapa produk komersial yang beredar dipasaran mengandung strain dari genus lain seperti *Propionibacterium*, *Enterococcus*, dan *Escherichia* juga tersedia (Sarao & Arora, 2017)

Tabel 2.2. Spesies BAL yang paling umum digunakan dalam sediaan probiotik (Parvez dkk., 2006)

<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Streptococcus sp.</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>S. cremoris</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ent. facium</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>L. delbrueckii spp. (bulgaricus)</i>	<i>B. animalis</i>		<i>S. dicetylactis</i>
	<i>B. infantis</i>		<i>S. intermedius</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. curvatus</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. fermentum</i>			
<i>L. lactis</i>			

*L. plantarum**L. reuteri*

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri probiotik gram positif, bersifat non patogen, menghasilkan asam laktat, berbentuk *coccus* (bulat), atau *bacillus* (batang), tidak membentuk spora, katalase negatif dan oksidase positif, serta proses fermentasinya menghasilkan asam laktat (Putri dkk., 2018). Bakteri asam laktat mempunyai kemampuan menfermentasikan gula menjadi asam laktat, karena produksi asam laktat oleh BAL berjalan dengan cepat, maka pertumbuhan mikroba lain yang tidak diinginkan dapat terhambat. BAL terdiri dari famili *Lactobacillaceae* yaitu genus *Lactobacillus* dan famili *Streptococcaceae* terutama *Leuconostoc*, *Streptococcus* dan *Pediococcus* (Syukur S, 2013). Bakteri genus *Lactobacillus* memiliki ciri koloni berwarna putih hingga kuning krem, berbentuk batang, permukaan tipis dan melebar dengan tepian licin pada agar miring yang digores, koloni bundar bergelondong, berukuran $0,5\text{-}1,2 \times 0,5\text{-}1,5 \mu\text{m}$ (Soeharsono, 2010; Syukur S, 2013), serta menurut Putri dkk (2018) genus *Lactobacillus* bersifat anaerob fakultatif, berbentuk batang ($0,5\text{-}1,5 \mu\text{m}$ s/d $1,0\text{-}10 \mu\text{m}$), dan tidak bergerak (non motil).



Gambar 2.2 *Lactobacillus bulgaricus* (Surono, 2016)

Identifikasi genus *Lactobacillus* sebagai bakteri gram positif dapat dicirikan dengan teknik pewarnaan bakteri, dimana karakter dari bakteri gram positif ini dapat menahan zat warna meski telah didekolorisasi dengan alkohol (Irianto, 2006; Putri dkk., 2018) hal ini dikarenakan pada bakteri gram positif memiliki struktur dinding sel seperti jala yang tebal yang terbuat dari peptidoglikan (50-90% berat selubung sel) (Jawetz E, Melnick J, 2013). Selain itu dinding sel pada bakteri gram positif memiliki persentase kandungan lipid yang lebih rendah dibandingkan dengan bakteri gram negatif yaitu sekitar 1-4% sehingga dapat menahan zat warna meski telah dilakukan dekolorisasi oleh alkohol. Struktur dinding sel pada bakteri gram positif berlapis tunggal (mono) memiliki tebal sekitar 15-80 nm (Pelczar, Michael J & Chan, 1986).

2.4. Potensi Probiotik Genus *Lactobacillus* Pada Kulit Dalam Sediaan Topikal

Baru-baru ini, penyelidikan mengenai kegunaan probiotik dalam bidang kesehatan tidak hanya terbatas pada usus pencernaan, namun juga mulai digunakan sebagai terapi topikal untuk kulit terutama pada genus *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium*. Kulit dan usus memiliki banyak kesamaan keduanya mendukung mikrobiota yang beragam secara taksonomi, bertindak sebagai penghalang antara lingkungan internal dan eksternal. Aplikasi *B. longum* untuk kulit manusia yang sehat dapat mengurangi kehilangan air pada kulit (O'Neill et al., 2013), serta *Lactobacilli* spesifik dapat menghambat patogen kulit *Staphylococcus aureus* ke primer keratinosit manusia (Prince et al., 2012).

Potensi probiotik genus *Lactobacillus* pada kulit dalam sediaan topikal telah dilakukan sebelumnya oleh beberapa penelitian, potensi tersebut dapat memberikan peluang bagi industri untuk semakin mengembangkan penggunaan probiotik dalam sediaan topikal. Potensi tersebut diantaranya yaitu sediaan gel topikal mengandung probiotik *Lactobacillus casei*, memiliki khasiat dan keamanan yang dapat digunakan untuk pengobatan dermatofitosis (Mehdi-alamdarloo dkk., 2016). Dimana *Lactobacillus casei* memproduksi senyawa yang berbeda seperti asam laktat dengan efek bakterisida pada patogen MRSA (Karska-wysocki dkk., 2010). Selanjutnya dalam suspensi yang digunakan secara topikal yang mengandung *L. plantarum* 226v, *L. brevis* H-24, *L. salivarius* 20555, *L. rhamnosus* 20021, *L. casei* 01, *L. casei* 431 dapat berperan sebagai antibiofilm dan memulihkan keseimbangan mikroba kulit. Dimana dalam pengujinya probiotik yang terpilih mampu mengurangi perlekatan sel patogen dengan kulit (perlekatan ini karena adanya pembentukan biofilm patogen), dengan mengevaluasi kapasitas probiotik untuk mengganggu prabiofilm yang terbentuk, sebagian besar probiotik yang diuji tersebut mampu mencegah pembentukan biofilm, Namun, probiotik tidak dapat memecah biofilm yang telah terbentuk. Pembentukan biofilm patogen ini berpengaruh pada perkembangan infeksi kulit (Lopes dkk., 2017). Kemudian penggunaan genus *Lactobacillus* dalam bentuk sedian gel, dimana kemampuan *L. rhamnosus* gg, *L. pentosus* KCA1 dan *L. plantarum* WCFS1 untuk menghambat *Candida albicans* secara in vitro dalam sediaan gel dilihat berdasarkan pengujian, menghasilkan penurunan tingkat keparahan infeksi meskipun tidak sepenuhnya membasmikan infeksi (Oerlemans dkk., 2020). Selanjutnya dalam pengujian yang telah dilakukan oleh M. Tawaran (2016) pemberian krim probiotik topikal *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020 dapat meningkatkan ekspresi distribusi kepadatan kolagen III pada lapisan dermis tikus jantan galur Sprague-Dawley yang dipapari sinar UVB (Tawaran et al., 2016). Lalu aplikasi dari krim yang mengandung *Lactobacillus pentosus* KCA1 relatif

mampu menurunkan secara signifikan spesies *Corynebacterium* yang berlebihan, dimana bakteri tersebut adalah salah satu bakteri penghasil bau pada kulit ketiak (Onwuliri et al., 2021).

2.5. Metode Preparasi Probiotik

Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup apabila diberikan dalam jumlah yang memadai, dapat memberikan manfaat bagi kesehatan konsumen (Seyedain-Ardabili et al., 2016). Pemberian mikroorganisme probiotik dalam jumlah yang cukup selalu berkaitan dengan manfaat kesehatan. Untuk memberikan efek yang menguntungkan, mikroorganisme ini tidak boleh terpengaruh oleh paparan faktor lingkungan yang dapat menyebabkan cedera dan kerusakan sel probiotik. Proses pembuatan sediaan topikal, lama waktu simpan dan komponen dalam formula dimungkinkan dapat mempengaruhi kelangsungan hidup bakteri probiotik dalam sediaan tersebut. Kelangsungan hidup strain probiotik akan tergantung pada faktor-faktor tersebut serta pH produk akhir, keberadaan mikroorganisme lain, suhu penyimpanan dan keberadaan inhibitor mikroba dalam substrat.(Collins dkk., 1998; Rodrigues dkk., 2020).

Metode preparasi atau berbagai proses penyiapan partikel probiotik sebelum beralih ke tahap pembuatan sediaan topikal dapat menjadi tolak ukur untuk menjaga kelangsungan hidup probiotik. Dalam metode preparasi probiotik, proses ini juga melibatkan bentuk preparasi probiotik dimana bentuk preparasi probiotik tersebut secara garis besar terbagi menjadi dua yaitu probiotik yang dipreparasi dalam bentuk bebas sel dan probiotik yang dipreparasi dalam keadaan bentuk sel hidup. Probiotik yang dipreparasi dalam bentuk bebas sel diantaranya yaitu supernatan bebas sel (CFS). Supernatan bebas sel merupakan cairan yang terbentuk dari hasil sentrifugasi yang mengandung senyawa metabolit yang terbentuk selama fermentasi (Noni, 2017). Selain CFS, probiotik yang dipreparasi dalam bentuk bebas sel adalah lisat bakteri. Lisat bakteri mengandung *heat-inactivated* bakteri probiotik. Dalam arti sempit pengertian lisat bakteri tersebut menyatakan bahwa lisat bakteri bukan termasuk kedalam probiotik. Tetapi lisat diproduksi oleh bakteri probiotik dan dapat menunjukkan efek menguntungkan yang serupa dengan bakteri hidup. Lisat adalah sel yang membran luarnya telah rusak karena bahan kimia atau proses fisik (Klein dkk., 2013). Metode preparasi probiotik yang dipreparasi dalam bentuk bebas sel, yang pada umumnya telah dilakukan dalam penelitian adalah sebagai berikut :

1. Metode Ekstraksi (non-enkapsulasi)

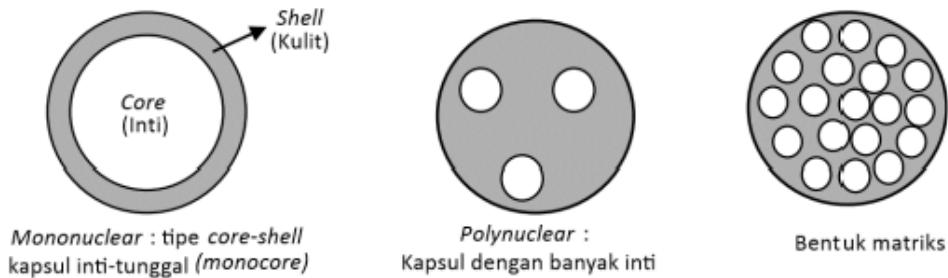
Metode preparasi probiotik dengan metode ekstraksi ini dapat menggunakan teknik sonikasi (Tawaran dkk., 2016). Teknik sonikasi merupakan metode ekstraksi

yang memanfaatkan gelombang ultrasonik dimana generator listrik ultrasonik akan membuat sinyal listrik kemudian diubah menjadi getaran fisik atau gelombang ultrasonik sehingga memiliki efek sangat kuat yang disebut dengan efek kavitasi pada larutan yang menyebabkan pecahnya molekul-molekul larutan tersebut sehingga mempercepat waktu kontak antara sampel dengan pelarut. Yang mengakibatkan proses pemindahan massa senyawa bioaktif dari dalam sel ke pelarut menjadi lebih cepat (Ashley et al., 2001; Rusdiana et al., 2018). Selain teknik sonikasi, dalam metode ekstraksi digunakan pula teknik sentrifugasi (Mehdi-Alamdarloo et al., 2016). Teknik ini merupakan teknik yang paling umum digunakan. Sentrifugasi merupakan proses pemisahan partikel berdasarkan berat partikel dengan densitas layangnya (buoyant density), Pada pemisahan, partikel yang memiliki densitas lebih tinggi daripada pelarut akan turun mengalami pengendapan (sedimentasi), dan partikel yang lebih ringan akan mengapung ke atas (Gopala, 2016)

Sedangkan metode preparasi untuk probiotik yang dipreparasi dalam keadaan bentuk sel hidup diantaranya yaitu dalam bentuk pelet bakteri (Yulinery & Nurhidayat, 2016), sel kultur (Oerlemans et al., 2020) dan ekstrak liofilisasi probiotik atau *lyophilized probiotic extract/LPE* (Mehdi-Alamdarloo dkk., 2016). Metode preparasi probiotik yang pada umumnya telah dilakukan dalam penelitian adalah sebagai berikut :

1. Metode Enkapsulasi dan Mikroenkapsulasi

Metode mikroenkapsulasi merupakan metode dengan proses fisikokimia atau mekanis yang berguna untuk memasukan bahan inti ke dalam bahan pelindung sehingga menghasilkan partikel berbentuk bola dengan membran semipermeabel tipis yang kuat dan memiliki kisaran diameter nanometer hingga milimeter (Frakolaki dkk., 2021). Metode mikroenkapsulasi ini memiliki teknik-teknik pembuatan yang sama dengan metode enkapsulasi namun perbedaannya hanya pada bentuk ukuran partikel, dimana pada metode mikroenkapsulasi kisaran partikelnya berkisar antara nanometer hingga milimeter. Metode Enkapsulasi merupakan suatu proses (proses pelapisan suatu bahan) yang dapat mempertahankan sifat fisik, kimia, dan biologis dari suatu senyawa aktif atau bahan inti dengan cara melapisinya di dalam suatu bahan penyalut (Asri dkk., 2021). Tujuan dari enkapsulasi diantaranya ialah untuk melindungi bahan inti yang sensitif dengan lingkungan, perlindungan bahan inti dari bahan beracun dan lainnya. Berikut adalah tipe morfologi dari metode enkapsulasi :



Gambar 2.3 Tipe Morfologi Enkapsulasi (Asri et al., 2021)

Penggunaan enkapsulasi memiliki beberapa keuntungan diantaranya (1) Kemudahan dalam penanganan bahan aktif; (2) memungkinkan imobilitas dari senyawa aktif; (3) Stabilitas produk meningkat; (4) meningkatkan keamanan bahan; (5) membuat tampilan yang lebih baik; (6) dapat mengatur properti bahan aktif (dari segi ukuran, struktur, warna); (7) memungkinkan pelepasan yang terkontrol (Mishra, 2016; Mourtzinos, I., dan Biliaderis, 2017). Penggunaan metode enkapsulasi dalam probiotik, diketahui enkapsulasi sel dapat meningkatkan ketahanan mikroorganisme probiotik untuk kondisi yang merugikan (Kim dkk., 2017), mengurangi kehilangan sel mikroorganisme yang dienkapsulasi dalam matriks hidrokoloid. Saat ini, teknik enkapsulasi probiotik yang digunakan disesuaikan berdasarkan partikel dan sifat probiotik(Pasqualin Cavalheiro dkk., 2015). Berikut adalah beberapa teknik yang digunakan dalam proses enkapsulasi sel :

a. Teknik Ekstrusi

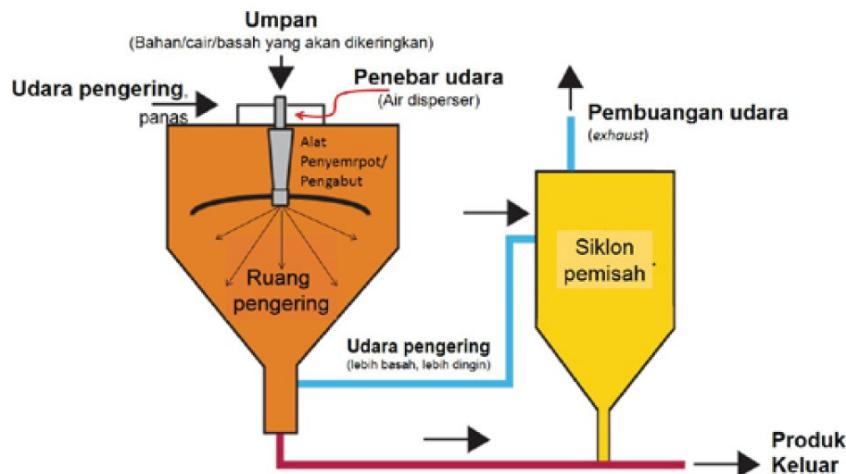
Enkapsulasi dengan teknik ekstrusi merupakan teknik yang sederhana, mudah digunakan dan memberikan biaya rendah. Selain proses yang relatif mudah, teknik ini dapat memastikan viabilitas sel yang tinggi pada sel yang telah dienkapsulasi (Krasaecko et al., 2003; Rodrigues et al., 2020). Pada dasarnya, teknik ini melibatkan penggunaan larutan hidrokoloid yang mengandung biakan mikroba, kemudian biakan tersebut diekstrusi melalui nosel dalam larutan pengikat silang sehingga memberikan perubahan langsung dari larutan hidrokoloid menjadi gel, yang berakhir pada pembentukan manik-manik (*Beads*). Gel yang dihasilkan tersebut umumnya stabil dalam media asam, namun dapat rusak dalam lingkungan basa (Etchepare dkk., 2016)

b. Teknik Emulsi

Emulsi adalah dispersi dua cairan yang tidak saling bercampur dan diperlukan zat penstabil, yang biasanya memiliki afinitas yang lebih besar terhadap fase kontinyu daripada fase terdispersi (Rodrigues et al., 2020). Jika fase terdispersinya berair, emulsi tersebut dinamakan emulsi air dalam minyak (W/O), sedangkan kebalikannya disebut emulsi minyak dalam air (O/W) atau fase balik. Emulsi jenis tersebut yang dibentuk oleh dua fase saja, disebut emulsi sederhana. Sedangkan bila menambahkan satu fase lagi dinamakan emulsi ganda, seperti emulsi air-dalam-minyak-dalam-air (W/O/W) atau minyak-dalam-air-dalam-minyak (O/W/O) (Goibier dkk., 2020). Sistem emulsi ini dapat digunakan untuk mengemas probiotik, meningkatkan perlindungan sel yang dienkapsulasi. Oleh karena itu, fase air terdispersi (emulsi W/O atau W/O/W) lebih disukai untuk digunakan, karena karakter hidrofilik sel bakteri (Wang dkk., 2020). Menurut Pandey dkk (2016) penggunaan emulsi sederhana untuk mengenkapsulasi *Lactobacillus plantarum* 299v dan metronidazol menggunakan xanthan dan guar gum dalam fase air, dan minyak bunga matahari dalam fase lipid. Strategi enkapsulasi ini meningkatkan viabilitas sel selama penyimpanan dan dianggap cocok untuk pelepasan terkontrol dari agen yang dienkapsulasi. Penggunaan hidrokoloid dalam sistem pengemulsi untuk mengenkapsulasi probiotik dikenal sebagai gelasi ionik internal. Dalam teknik ini, bahan hidrokoloid digunakan sebagai enkapsulator karena adanya zat pemanjangan. Dengan demikian, larutan hidrokoloid yang mengandung sel mikroba dan zat pemanjangan tak terionisasi ditambahkan ke fase pendispersi minyak dari emulsi air dalam minyak (W/O). (Rodrigues et al., 2020).

c. Teknik pengeringan semprot (*Spray drying*)

Teknik pengeringan semprot merupakan metode yang telah lama digunakan untuk mengubah bahan cair ke bentuk bubuk kering (Hariyadi, 2017). Pengering semprot secara efektif mengubah umpan basah dengan kadar air tinggi menjadi bentuk dan kualitas bubuk kering. Secara umum, skema alat pengering semprot dapat dilihat pada Gambar 2.3. Proses pengeringan semprot terdiri dari 3 tahap proses utama, yaitu proses (i) atomisasi, (ii) pengeringan, dan (iii) pengumpulan bubuk kering yang dihasilkan. (Hariyadi, 2017)



Gambar 2.4 Skema Pengering Semprot (Hariyadi, 2017)

Untuk mengenkapsulasi sel bakteri dengan teknik pengeringan semprot, berbagai polimer alami dapat digunakan, terutama gom arab dan pati, karena kemampuannya yang dikenal untuk membentuk partikel bulat setelah proses pengeringan. Bahan enkapsulasi polisakarida menunjukkan kelarutan yang baik, viskositas rendah pada konsentrasi tinggi, dan pengeringan cepat (Rodrigues et al., 2020). Selain itu, penggunaan kombinasi polimer yang berbeda dapat meningkatkan kelangsungan hidup sel yang dienkapsulasi. Suhu yang digunakan sangat penting, karena suhu rendah mengurangi laju penguapan air, yang membentuk agregat mikrosfer, sedangkan suhu tinggi dapat merusak zat membran bakteri, yang secara drastis mengurangi viabilitas seluler mikroorganisme yang dienkapsulasi. Kelangsungan hidup sel bakteri yang dienkapsulasi dengan teknik pengeringan semprot lebih bergantung pada suhu keluar daripada suhu masuk. Dimana pada *Lactobacillus acidophilus La-5* baru-baru ini dienkapsulasi dalam inulin dengan pengeringan semprot menggunakan suhu masuk dan keluar masing-masing 120 dan 55 °C. Tingkat kelangsungan hidup mikroorganisme setelah proses enkapsulasi mencapai 86,5% (Xavier dos Santos dkk., 2019).

d. Teknik pengeringan Beku (*Freeze drying*)/ Liofilisasi

Freeze drying atau pengeringan beku merupakan teknik pengeringan menggunakan suhu rendah.(Habibi dkk., 2019). Prinsip dasar dari *freeze drying* adalah pengeringan dengan suhu rendah dan tekanan vakum. Pada metode ini zat aktif dan penyalut didispersikan terlebih dahulu kedalam air. Selanjutnya dilakukan proses *pre-treatment* berupa pembekuan material kemudian akhirnya dilakukan pengeringan secara sublimasi langsung

dengan tekanan dan suhu rendah. Setelah itu campuran dikeringkan dalam alat *freeze dryer* dengan suhu -50°C tekanan 0.05 mbar selama 24 jam. Setelah dilakukan pengeringan, akan daftardihasilkan cake rapuh yang dapat dihancurkan menjadi kepingan kecil jika diperlukan (Asri dll., 2021).

e. Teknik Unggun terfluidisasi (*Fluidized bed Coating*)

Teknik *fluidized bed coating* digunakan untuk pelapisan, granulasi atau pengeringan, di mana lapisan diatomisasi diatas partikel padat dalam suspensi. Teknik ini merupakan proses yang cepat, yang menghadirkan biaya rendah dan produksi tinggi. Selain itu, beberapa bahan enkapsulasi, seperti lipid, protein dan polisakarida dapat digunakan (Manojlović, V., Nedović, V. A., Kailasapathy, K., & Zuidam, 2010). Prosesnya terdiri dari ruang yang dipanaskan, dimana partikel-partikel yang akan ditutupi dijaga agar tetap bergerak karena aliran udara. Bahan pelapis ditumbuk dan membasahi permukaan partikel, menyatu dan memadat secara berurutan, kemudian membentuk lapisan yang padat dan homogen. Sifat pelapis dipengaruhi oleh sudut injeksi (jenis semprotan atas, bawah atau tangensial), laju penguapan, pemadatan dan viskositas bahan enkapsulasi, serta keterbasahan partikel, kecepatan dan suhu udara fluidisasi, dan jumlah pelapisan (Manojlović, V., Nedović, V. A., Kailasapathy, K., & Zuidam, 2010). Dengan cara ini, untuk enkapsulasi probiotik, sel membutuhkan perlakuan sebelumnya yang mempromosikan partikel padat yang dapat tersuspensi dan tertutup, mencirikan unggun terfluidisasi sebagai teknik konenkapsulasi (Manojlović, V., Nedović, V. A., Kailasapathy, K., & Zuidam, 2010; Rodrigues et al., 2020)