

UJI VIABILITAS MIKROENKAPSULASI *Lactobacillus casei* MENGGUNAKAN Matrik Natrium Alginat

Microencapsulation Viability Test Of Lactobacillus Casei Using Sodium Alginate Matric

Nelly Suryani*, Ofa Suzanti Betha, Qurry Mawaddana
Fakultas Ilmu Kesehatan, UIN Syarif Hidayatullah Jakarta
Email : nelly.suryani@uin.jkt.ac.id
081289345004

*Corresponding Author

Abstract

Lactobacillus casei is a species that is often used as a probiotic but is not resistant to very acidic environments. Microencapsulation in this study was carried out using the extrusion method with a matrix of sodium alginate concentrations of 2%, 3%, and 4%. The three concentrations of sodium alginate were tested for their ability to protect *Lactobacillus casei* ATCC 393 from the effects of gastric acid simulation fluid. From the viability test, the results of enumeration of cells in the concentration of sodium alginate 2%, 3% and 4% were 3.08×10^6 colonies / gram; 7.41×10^4 colonies / gram; and 1.01×10^7 colonies / gram. The three MLNs with the three concentrations were incubated in gastric acid simulation fluid (0.08 M HCl; 0.2% NaCl; pH 1.5) for 120 minutes. The enumeration results of MLN viability after testing the gastric acid liquid at a concentration of 4% were 4.5×10^3 colonies / gram, whereas at a concentration of 2% and 3% the viability value was <25 colonies / gram (did not meet the requirements for bacterial cell calculations). These results indicate that MLN at a concentration of 2% and 3% has not been able to maintain bacterial cells contained in the sodium alginate matrix, while 4% MLN is only able to maintain 0.04% of the number of encapsulated cells after incubation in simulating gastric acid.

Keywords: microencapsulation, *L. casei* ATCC 393, extrusion, simulation of gastric acid, MLN (*Lactobacillus casei* microencapsulation with Sodium Alginate).

Abstrak

Bakteri *Lactobacillus casei* merupakan salah satu spesies yang sering digunakan sebagai probiotik namun tidak tahan terhadap lingkungan yang sangat asam. Mikroenkapsulasi pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode ekstrusi dengan matrik natrium alginat konsentrasi 2%, 3%, dan 4%. Ketiga konsentrasi natrium alginat tersebut diuji kemampuannya melindungi *Lactobacillus casei* ATCC 393 dari pengaruh cairan simulasi asam lambung. Dari pengujian viabilitas, didapatkan hasil enumerasi sel dalam konsentrasimatrik natrium alginat 2%, 3% dan 4% berturut-turut adalah $3,08 \times 10^6$ koloni/gram; $7,41 \times 10^4$ koloni/gram; dan $1,01 \times 10^7$ koloni/gram. Ketiga MLN dengan ketiga konsentrasi tersebut diinkubasi pada cairan simulasi asam lambung (0,08 M HCl; 0,2% NaCl; pH 1,5) selama 120 menit. Hasil enumerasi viabilitas MLN setelah pengujian simulasi cairan asam lambung pada konsentrasi 4% adalah $4,5 \times 10^3$ koloni/gram, sedangkan pada konsentrasi 2% dan 3% nilai viabilitasnya <25 koloni/gram (tidak memenuhi syarat perhitungan sel bakteri). Hasil tersebut menunjukkan bahwa MLN pada konsentrasi 2% dan 3% belum mampu mempertahankan sel bakteri yang terkandung didalam matrik natrium alginat, sedangkan MLN 4% hanya mampu mempertahankan 0,04% dari jumlah sel yang terenkapsulasi setelah diinkubasi dalam simulasi cairan asam lambung.

Kata kunci : mikroenkapsulasi, *L. casei*, ekstrusi, simulasi cairan asam lambung, MLN (Mikroenkapsulasi *Lactobacillus casei* dengan Natrium Alginat).

PENDAHULUAN

Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup, yang jika diberikan atau dikonsumsi dalam jumlah tertentu akan memberikan manfaat kepada inang. Menurut Federasi Susu Internasional, nilai minimum bakteri hidup yang harus dipenuhi sekitar 1×10^7 koloni/gram dalam sediaan probiotik [1]. Sifat-sifat yang harus dimiliki bakteri probiotik agar efektif menghasilkan nutrisi dan efek terapeutik adalah dapat bertahan hidup, artinya bakteri yang dikonsumsi harus bertahan sampai usus kecil dan melewati asam lambung, sehingga bakteri harus dapat bertahan pada pH yang sangat rendah [2].

Kelompok bakteri spesies *Lactobacillus sp.* merupakan bakteri asli pada pencernaan manusia, sehingga menjadi pilihan utama produk probiotik [3] dan *Lactobacillus casei* merupakan salah satu spesies yang sering digunakan sebagai probiotik karena merupakan bakteri non-patogen dan aman. Manfaat dari *Lactobacillus casei* diantaranya dapat mengurangi tingkat keparahan dan waktu diare, dan merangsang sistem kekebalan tubuh usus [4] namun, *Lactobacillus sp.* memiliki kelemahan dalam mempertahankan diri di lingkungan yang sangat asam, di cairan empedu, serta pada suhu yang tinggi [5]. Nilai pH optimum yang dapat ditoleransi *Lactobacillus casei* berada di kisaran 3-5 [6].

Probiotik yang beredar di pasaran dalam bentuk sediaan cair memiliki kekurangan, diantaranya kurang efisien dalam hal stabilitas saat penyimpanan maupun dalam pengemasan [7], disamping itu kemungkinan untuk ditumbuhi bakteri lain lebih besar dibandingkan dalam bentuk

serbuk. Oleh karena itu, perlu dibuat dalam bentuk sediaan padat [8]. Selain itu, produk suplemen probiotik dalam bentuk padat, beberapa tahun terakhir mengalami peningkatan.

Berdasarkan masalah diatas, produk probiotik dapat digunakan dengan cara enkapsulasi bakteri. Enkapsulasi bakteri juga merupakan suatu cara yang dapat melindungi dan membawa mikroorganisme sampai ke usus [9]. Mikroenkapsulasi dengan *bead* hidrokoloid telah di uji dapat meningkatkan viabilitas probiotik di dalam makanan dan saat di saluran pencernaan [5] [10]. Mikroenkapsulasi membantu ketidakstabilan inti di lingkungan, meningkatkan stabilitas, dan memperpanjang umur simpan inti [11].

Alginat merupakan bahan yang sering digunakan pada enkapsulasi probiotik. *Bead* alginat telah diuji dapat meningkatkan ketahanan hidup probiotik 80-95% [12]. Preparasi *bead* alginat sebagai matrik bakteri, dapat dilakukan dengan cara ekstrusi dan emulsi [13].

Penggunaan ekstrusi sebagai metode enkapsulasi bakteri memiliki beberapa keuntungan, diantaranya metode ekstrusi merupakan metode yang mudah dan murah dalam pengoperasian, memberikan viabilitas yang tinggi pada bakteri, dan tidak merusak sel probiotik seperti halnya ketika menggunakan teknik spray-drying [9], oleh karena itu tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh konsentrasi natrium alginat terhadap viabilitas bakteri *Lactobacillus casei* ATCC 393 di dalam cairan asam lambung dengan metode ekstrusi.

METODE PENELITIAN

Alat

Autoklaf digital (ALP, Jepang), Inkubator, *shaker incubator*, lemari pendingin (Sanyo, Jepang), *coloni counter* (Rocker), *laminar air flow* (Ogawa Seiki, Jepang), *digimatic micrometer* (Mitutoyo, Jepang), sentrifugator, mikroskop optik (Motic).

Bahan

Bakteri *Lactobacillus casei* ATCC 393 (PT. DIPA), Natrium alginat (Shadong Bio-Technology), CaCl₂ (0,2 M), medium MRS agar (Oxoid), medium MRS *broth* (Oxoid), buffer fosfat, HCl 0,08 M, NaCl 0,9%, dan akuadestilasi.

Prosedur

Kultivasi Bakteri dan Pembuatan Suspensi Bakteri

Sebanyak 1 ose biakan bakteri *Lactobacillus casei* ATCC 393 yang diambil dari MRS agar, diinokulasi pada 10 ml MRS *broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil biakan bakteri dipindahkan ke dalam 100 ml MRS *broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam yang digunakan untuk produksi sel bakteri [14] [15, dengan modifikasi]. Biakan dipanen dengan sentrifugasi 4400 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C [5]. Kemudian dilakukan pencucian sebanyak 2x dengan larutan NaCl 0,9% steril [15] [16].

Enkapsulasi Bakteri

Sebanyak 50 ml suspensi bakteri *Lactobacillus casei* ATCC 393 dicampur homogen dengan 50 ml larutan natrium alginat konsentrasi 4%, 6%, dan 8%, sehingga konsentrasi akhir campuran menjadi 2%, 3%, dan 4%, menggunakan *magnetic stirrer* kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Campuran homogen dimasukkan ke dalam jarum suntik no. 30 G dan diteteskan ke dalam *beaker glass*

yang berisi larutan CaCl₂ 0,2 M. *Bead* sel amobil yang terbentuk didiamkan selama 30 menit di dalam larutan, kemudian dipisahkan dan dicuci dengan larutan NaCl 0,9% steril [16]. *Bead* yang terpisah disaring dengan kertas saring dan dipindahkan ke cawan petri kemudian disimpan dalam kulkas.

Efisiensi Enkapsulasi (%)

Efisiensi enkapsulasi dapat dirumuskan sebagai berikut (Adrianto, 2011) :

$$\text{Efisiensi enkapsulasi (\%)} = \frac{P \times Q}{R} \times 100\%$$

P = populasi *Lactobacillus* per gram *beads* (koloni/gram).

Q = massa *beads* yang dihasilkan dari total suspensi biopolimer-sel yang digunakan (gram).

R = total *Lactobacillus* di dalam suspensi biopolimer-sel (CFU).

Enumerasi Bakteri Setelah Enkapsulasi

MLN enkapsulasi bakteri dari masing-masing konsentrasi natrium alginat diambil 1 gram dan ditambahkan 9 ml larutan bufer fosfat (pH 6,9) dan divorteks selama 30 menit sehingga terbentuk suspensi dari masing-masing konsentrasi natrium alginat. Suspensi yang terbentuk diatas, didiamkan selama 15 menit pada suhu ruangan (20-25°C) dengan tujuan melarutkan *bead* [11]. Enumerasi bakteri dilakukan dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC). Bakteri pada medium *MRS broth* yang didapat dari suspensi bakteri diatas, diambil sebanyak 1 ml kemudian dilarutkan dalam NaCl steril 0,9% steril 9 ml dan dihomogenkan menggunakan vorteks selama 30 detik (Pengenceran 10⁻¹). Kemudian dilakukan seri pengenceran sampai koloni yang terdapat dalam cawan petri 25-250 koloni [6] dan dilakukan enumerasi pada 3 seri pengenceran terakhir. Sebanyak 0,1 ml dari 3 seri pengenceran terakhir diambil kemudian disebar dengan mikropipet ke permukaan MRS agar dalam cawan petri dengan tiga pengulangan dan diratakan. Biakan kemudian diinkubasi selama 72 jam pada suhu 37°C.

Perhitungan jumlah total koloni dengan rumus [17] [18] :

$$\text{koloni/gram} = \frac{\text{rata - rata koloni}}{\text{volume di cawan petri} \times \text{fp}}$$

Uji Viabilitas Setelah Inkubasi dalam Simulasi Asam Lambung

MLN diambil 1 gram dan ditempatkan di tabung reaksi yang berisi 10 ml cairan simulasi asam lambung. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam. Setelah itu, MLN diambil dan didepolimerisasi kemudian dilakukan enumerasi viabilitas seperti langkah enumerasi sebelumnya.

Analisa Data

Data perbandingan diameter pada konsentrasi enkapsulasi bakteri dianalisis secara statistik dengan menggunakan perangkat lunak SPSS 16.0 for windows dengan metode *One Way Repeated Measures ANOVA*. Metode *paired sample t-test* dilakukan untuk membandingkan data diameter masing-masing konsentrasi MLN sebelum dan sesudah enkapsulasi dengan matrik natrium alginat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Viabilitas *Lactobacillus casei* ATCC 393 Sebelum Enkapsulasi

Enumerasi dilakukan terhadap suspensi bakteri, setelah enkapsulasi, dan setelah dilakukan pengujian terhadap simulasi cairan asam lambung. Hasil enumerasi menunjukkan jumlah sel bakteri *Lactobacillus casei* ATCC 393 pada suspensi sebelum dilakukan mikroenkapsulasi menggunakan natrium alginat adalah $1,02 \times 10^8$ koloni/ml (8,001 log koloni/ml) untuk suspensi konsentrasi 2% dan 4%, dan $8,2 \times 10^7$ koloni/ml (7,914 log koloni/ml) untuk suspensi konsentrasi 3%.

Organoleptis Enkapsulasi Matrik Natrium Alginat Sebelum dan Sesudah Ditambahkan Suspensi *Lactobacillus casei* ATCC 393

Secara fisik, bentuk MLN ketiga konsentrasi natrium alginat tanpa bakteri *Lactobacillus casei* ATCC 393 memiliki bentuk bulat, berwarna putih keruh, dan berbau amis laut. Hasil pengamatan organoleptis pada enkapsulasi bakteri *Lactobacillus casei* ATCC 393 setelah ditambahkan sel bakteri berbentuk oval hingga bulat dan berwarna putih keruh.

Enumerasi Bakteri dalam Matrik Enkapsulasi

Hasil enumerasi bakteri setelah enkapsulasi dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pengukuran Viabilitas *Lactobacillus casei* ATCC 393 Terenkapsulasi pada Berbagai Konsentrasi Alginat

Konsentrasi Natrium Alginat	Viabilitas Sebelum Simulasi Asam Lambung (koloni/gram)	Rata-rata Viabilitas (koloni/gram)
2%	5×10^6	$3,08 \times 10^6$
	$1,15 \times 10^6$	
3%	$3,32 \times 10^4$	$7,41 \times 10^4$
	$1,15 \times 10^5$	
4%	$6,9 \times 10^5$	$1,01 \times 10^7$

Hasil viabilitas sel bakteri setelah proses enkapsulasi pada konsentrasi 2%, 3%, dan 4% dapat dilihat pada Tabel 1. Jumlah sel bakteri yang dienkapsulasi natrium alginat 4% lebih banyak dibandingkan dengan jumlah sel bakteri yang dienkapsulasi menggunakan natrium alginat 2% dan 3%. Hal ini disebabkan karena efisiensi enkapsulasi meningkat secara signifikan dengan meningkatnya konsentrasi biopolimer [19]. Efisiensi penjerapan bakteri *Lactobacillus casei* ATCC 393 di dalam MLN bervariasi antara 0,06% sampai 9,61% dengan efisiensi penjerapan tertinggi pada MLN konsentrasi 4%. Efisiensi penjerapan bakteri *Lactobacillus casei* ATCC 393 di dalam MLN yang dihasilkan memiliki nilai

yang sangat kecil. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh suspensi yang ditambahkan ke dalam matrik natrium alginat, 50 ml, terlalu banyak.

Pengujian Viabilitas *Lactobacillus casei* ATCC 393 Setelah Mikrokapsulasi dan Setelah Uji Simulasi Asam Lambung

Hasil enumerasi bakteri setelah MLN diinkubasi pada simulasi cairan asam lambung dapat dilihat pada tabel 2. Jumlah sel bakteri pada konsentrasi natrium alginat 2% menurun dari $3,08 \times 10^6$ koloni/gram menjadi <25 koloni/gram (nilai tidak memenuhi syarat yang diperbolehkan untuk menghitung sel bakteri). Jumlah sel bakteri pada konsentrasi natrium alginat 3% menurun dari $7,41 \times 10^4$ menjadi <25 koloni/gram (nilai tidak memenuhi syarat yang diperbolehkan untuk menghitung sel bakteri). Bakteri *Lactobacillus casei* ATCC 393 masih dapat memenuhi syarat perhitungan sel bakteri pada konsentrasi natrium alginat 4% meskipun terjadi penurunan 99,96% dari jumlah sel sebelum diinkubasi pada simulasi cairan asam lambung, yaitu $1,01 \times 10^7$ koloni/gram menjadi $4,5 \times 10^3$ koloni/gram.

Tabel 2. Hasil Pengukuran Viabilitas *Lactobacillus casei* ATCC 393 Terenkapsulasi pada Berbagai Konsentrasi Alginat Setelah Diinkubasi pada Simulasi Cairan Asam Lambung

Kon. Natrium Alginat	Viabilitas Setelah Simulasi Asam Lambung (koloni/gram)	Rata-rata Viabilitas (koloni/gram)
2%	< 25 (Tidak memenuhi syarat perhitungan sel bakteri)	-
3%	< 25 (Tidak memenuhi syarat perhitungan sel bakteri)	-
4%	$4,5 \times 10^3$ $4,5 \times 10^3$	$4,5 \times 10^3$

Penurunan jumlah sel bakteri pada konsentrasi MLN 2% dan 3% mungkin disebabkan kepadatan bakteri pada suspensi awal yang terlalu sedikit dan waktu penyimpanan yang terlalu lama dari setelah dilakukan proses enkapsulasi sampai dilakukan uji simulasi asam lambung yang dapat menurunkan jumlah sel *Lactobacillus casei* ATCC 393 secara drastis. Penelitian lebih lanjut mengenai enumerasi MLN di ketiga konsentrasi setelah disimpan selama 4 minggu seharusnya dilakukan untuk mengetahui pengaruh masa penyimpanan terhadap jumlah sel bakteri di dalam matrik natrium alginat. Hasil persentase efisiensi penjerapan bakteri *Lactobacillus casei* ATCC 393 juga sangat kecil yang mungkin menyebabkan viabilitas pada konsentrasi enkapsulasi matrik natrium alginat 2% dan 3% setelah diinkubasi dengan simulasi asam lambung tidak dapat memenuhi syarat yang diperbolehkan untuk menghitung sel bakteri (<25 koloni/gram).

Hal lain yang dapat menurunkan jumlah sel bakteri ketiga konsentrasi MLN pada uji simulasi asam lambung adalah asam seperti HCl yang ditemukan dalam lambung manusia merupakan oksidator kuat sehingga dapat mengoksidasi dan mengganggu senyawa biomolekular penting di dalam sel [20].

Membran kalsium alginat mudah terdegradasi dengan cepat pada pH rendah dan kehilangan kestabilannya jika terdapat senyawa pengkelat seperti fosfat, laktat dan sitrat [10]. Terdegradasinya kalsium alginat dapat menyebabkan sel keluar ke lingkungan.

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian ini, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Berdasarkan nilai viabilitas sel bakteri *Lactobacillus casei* ATCC 393 pada enkapsulasi matrik natrium alginat

- dengan tiga konsentrasi, yaitu 2%, 3%, dan 4% disimpulkan bahwa *Lactobacillus casei* ATCC 393 dalam matrik dengan nilai viabilitas: $1,01 \times 10^7$ koloni/gram untuk konsentrasi 4%, $3,08 \times 10^6$ koloni/gram untuk konsentrasi 2%, dan $7,41 \times 10^4$ koloni/gram untuk konsentrasi 3%.
- Setelah diinkubasi dalam simulasi cairan asam lambung, matrik natrium alginat 4% masih dapat mempertahankan sel bakteri *Lactobacillus casei* ATCC 393 dengan jumlah sel, yaitu $4,5 \times 10^3$ koloni/gram meskipun mengalami penurunan viabilitas sel sebesar 99,96% dari sebelum diinkubasi. Kedua konsentrasi lainnya, yaitu 2% dan 3% belum mampu mempertahankan sel bakteri *Lactobacillus casei* ATCC 393 dalam cairan simulasi asam lambung.

SARAN

Perlu dilakukan optimasi metode dan penambahan penyalut yang optimum sehingga menghasilkan mikroenkapsulasi dengan efisiensi penyerapan yang lebih baik lagi dan dapat mempertahankan jumlah sel bakteri *Lactobacillus casei* di dalam asam lambung.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Food and Agriculture Organisation of the United Nations and World Health Organization. 2001. *Health and Nutrition Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutrition Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. World Health Organization.
- [2] Fuller, R. 1992. *Prebiotics, The Scientific Basis*. London: Chapman and Hall.
- [3] Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition Vol. 73* (2 Suppl.): 365S–373S.
- [4] Islam, Mohammad Ariful, Cheol-Heui Yun, Yun-Jaie Choi, Chong-Su Cho. 2010. Microencapsulation of live probiotic bacteria. *J. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 20 (10): 1367-1377.
- [5] Mandal, S., A.K. Puniya, K. Singh. 2006. Effect of alginate concentration on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal* volume 16: 1190-1195.
- [6] Broadbent, Jeff R, Rebecca L. Larsen, Virginia Deibel, James L. Steele. 2010. Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to Acid Stress. *J. Bacteriology* Vol. 192: 2445-2458.
- [7] Tamime, AY dan Robinson NK. 1989. *Yoghurt Science and Technology*. Oxford: Pergamon Press.
- [8] Yulinery, Titin dan N. Nurhidayat. 2012. Analisis Viabilitas probiotik *Lactobacillus* Terenkapsulasi dalam Penyalut Dekstrin dan Jus Markisa (*Passiflora edulis*). Bidang Mikrobiologi: LIPI *J. Tek. Ling* Vol. 13: 109-121.
- [9] Solanki, Himanshu K., dkk. 2013. Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. *BioMed Research International* Vol. 2013.
- [10] Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13: 3–13.

- [11] Kailasapaty, Kaila. 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* Vol 3: 39-48.
- [12] Sheu, T. Y., dan Marshall, R. T. 1993. Microencapsulation of lactobacilli in calcium alginate gels. *Journal of Food Science*, 58: 557–561.
- [13] Mortazavian A, Razavi SH, Ehsani MR, Sohrabvandi S. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology (IJB)* 2007;5(1):1-18.
- [14] Zanjani, Mohammad Ali Khosravi, dkk. 2012. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* with calcium alginate-resistant starch and evaluation of survival and sensory properties in cream-filled cake. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6 (26) pp. 5511-5517.
- [15] Betha, Ofa Suzanti. 2014. Uji Aktivitas Enzim Protease dari Bakteri Amobil *Bacillus licheniformis* F11.4. *JML* Vol. 11 No.1: 98-101.
- [16] Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate MLN and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14: 737–743.
- [17] Depson, Ronald. 2012. *Identifikasi molekular dan pengaruh pemberian potensial probiotik bakteri asam laktat asal dadih terhadap kolesterol daging itik baying sumber daya genetik Sumatera Barat*. Tesis: Universitas Andalas.
- [18] Ivanovska, Tanja Petreska, dkk. 2012. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* in chitosan-ca-alginate microparticles using spray-drying method. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical and Chemical Engineering* Vol. 31 No. 1: 115-123.
- [19] Castilla OS, Calleros CL, Galindo HSG, Ramirez JA, dan Carter EJV. 2010. Textural properties of alginate-pectin MLN and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal condition and in yoghurt. *Food Research International* 43: 111 – 117.
- [20] Sahadeva, R.P.K., dkk. 2011. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *International Food Research Journal* Vol. 18(4): 1515-1522.

