

# MIKROENKAPSULASI PROBIOTIK *Lactobacillus plantarum* DAN ANALISIS EKSPRESI GEN *MANNOSE SPESIFIC ADHESIN*

## *MICROENCAPSULATION OF PROBIOTIC Lactobacillus plantarum AND ANALYSIS OF ITS MANNOSE SPECIFIC ADHESIN GENE EXPRESSION*

Novik Nurhidayat

Puslit Biologi LIPI, Cibinong Science Center  
Pos-el: noviknur@yahoo.com

### ABSTRAK

*Infectious disease remains as a prominent health problem and worsened by the emerging antibiotic resistance. Probiotic has been an alternatively popular application. Lactobacillus plantarum mar8 isolated from tropical fruit showed a stable mannose specific adhesin (MSA) activity in term of competing for and inducing immunity to infecting pathogen. This research focused on coating the probiotic with dextrin in fruit juice using a spraydrying technique to produce microencapsulated probiotic. The microencapsulation using 5% dextrin in either passion fruit or orange juice produced more compact capsule and supported higher probiotic viability. The microencapsulated probiotic expressed MSA gene for at least 10 generation indicating conserved function of probiotic.*

**Keywords:** Probiotics, *Lactobacillus plantarum*, Mannose specific adhesin, Immunity

### ABSTRAK

Penyakit infeksi masih merupakan masalah utama apalagi terapi antibiotik telah menyebabkan terjadinya resistensi. Alternatif aplikasi probiotik telah banyak dilakukan. Isolat *Lactobacillus plantarum* mar8 dari buah tropis terseleksi karena menunjukkan aktivitas *mannose specific adhesin* (MSA) yang stabil dalam berkompetisi dan menginduksi respons imunitas terhadap infeksi. Penelitian ini dipusatkan pada upaya perlindungan sel probiotik dalam penyalut dekstrin dan jus buah untuk mendapatkan butiran mikroenkapsulasi yang tepat guna sebagai alternatif terhadap sediaan cair yang kurang praktis. Mikroenkapsulasi dilakukan dengan teknik semprot kering dan fungsi probiotik produk dianalisis dengan ekspresi gen MSA. Konsentrasi dekstrin 5% dalam jus markisa atau jeruk menghasilkan butiran mikrokapsul yang kompak dan lebih mendukung viabilitas probiotik. Probiotik terenkapsulasi ini tetap stabil berfungsi karena mengekspresikan gen MSA selama sepuluh generasi kultur mikroenkapsulasi.

**Kata kunci:** Probiotik, *Lactobacillus plantarum*, Mannose specific adhesin, Imunitas

## PENDAHULUAN

Penyakit infeksi masih merupakan penyebab utama kesakitan dan kematian. Sebagai contoh, penyakit diare secara global menyebabkan kesakitan 100 juta penduduk dan kematian 3 juta per tahun.<sup>1</sup> Sementara demam *typhoid* menyebabkan 16 juta penderita dengan 600 ribu kematian per

tahun.<sup>2</sup> Di Indonesia, diare dan demam *typhoid* tercatat menyebabkan kematian masing-masing lebih dari 140 ribu dan 73 ribu orang per tahun.<sup>3</sup> Terapi penyakit infeksi ini umumnya adalah dengan antibiotika, namun telah terbukti kurang efektif karena menyebabkan resistensi pada patogen penginfeksi.<sup>4</sup>

Salah satu alternatif penanggulangan infeksi adalah dengan memanfaatkan probiotik. Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang dapat meningkatkan kerja sistem pencernaan, fungsi metabolisme, dan kesehatan pada umumnya. Probiotik menghasilkan enzim glukosidase dan transferase yang memodifikasi karbohidrat kompleks menjadi siap pakai dalam sistem pencernaan.<sup>5</sup> Selain sebagai sumber protein sel tunggal, probiotik ini juga berperan dalam meningkatkan fungsi sistemik imunitas.<sup>6,7</sup> Sebagian besar probiotik yang telah dikarakterisasi adalah jenis yang berbasis susu dan berasal dari daerah subtropis. Probiotik jenis ini telah diklaim dapat digunakan dalam pencegahan dan terapi penyakit infeksi.<sup>8,9,10</sup> Namun, sebagian besar klaim penelitian tersebut dilakukan di daerah subtropis dan belum banyak dilakukan di daerah tropis, di mana sebagian besar penyakit infeksi terjadi.<sup>1,2</sup>

Pada daerah tropis seperti Indonesia, penelitian sebelumnya melaporkan adanya keragaman probiotik *Lactobacillus* di dalam buah-buahan, seperti pada buah markisa. Pada penelitian tersebut, species *L. plantarum* Mar8 terseleksi karena berpotensi mereduksi peningkatan kolesterol, pencegahan aterosklerosis, peningkatan sistem imunitas, dan detoksifikasi senyawa beracun.<sup>11,12,13,14,15,16</sup> Secara spesifik, species ini juga menunjukkan aktivitas *mannose specific adhesin* (MSA) yang dikonfirmasi dengan ekspresi spesifik gen MSA.<sup>17</sup> MSA ini telah dikenal berperan dalam sistem pelekatan terhadap inang, kompetisi dengan patogen dan perangsangan sistem imunitas.<sup>18,19,20</sup>

Sebagian besar sediaan probiotik yang beredar adalah dalam bentuk cair berbasis susu yang relatif kurang praktis untuk disimpan dan dibawa. Probiotik dalam sediaan cair sering menimbulkan rasa dan aroma yang tidak disukai (*off flavor*).<sup>21</sup> Sebagaimana bakteri pada umumnya, probiotik dalam sediaan cair ini akan mengalami transformasi genetis lebih sering dan cepat dari pada di habitat alaminya.<sup>22,23</sup> Transformasi ini mengurangi viabilitas dan sering mendegradasi fungsi probiotiknya.

Alternatif bentuk sediaan cair adalah padat yang biasanya menggunakan teknologi kering beku (*freeze drying*) dan semprot kering (*spray drying*). Teknik semprot kering lebih sederhana

dan praktis di mana suspensi probiotik dalam bahan penyalut diubah menjadi tetesan cair yang dikontakkan dengan udara panas sehingga terbentuk butiran. Butiran ini yang kemudian dipisahkan dengan siklon dan dikumpulkan sebagai produk. Penyalutan ini mempertahankan viabilitas dengan melindungi probiotik dari kerusakan akibat kondisi pemanasan selama proses, kekeringan dalam masa simpan, asam lambung dan garam empedu di sistem pencernaan. Sebagian besar bahan penyalut yang digunakan adalah susu skim, casein, albumin, gelatin, gum, alginat dan pati. Bahan tersebut digunakan untuk probiotik berbasis susu seperti *Bifidobacteria longum*, *B. bifidus*, *L. bulgaricus*, dan *L. acidophilus*.<sup>24,25,26,27</sup> Isolat terseleksi *L. plantarum* Mar8 dapat dienkapsulasi dengan susu skim, namun viabilitasnya tidak terlalu tinggi dan susu skim relatif mahal dan sulit didapat.<sup>13</sup> *L. plantarum* spp termasuk *L. plantarum* ATCC 8014 dapat dienkapsulasi dengan alginat dan kitosan.<sup>28</sup> Susu skim dan alginat-kitosan kurang larut dalam air dan dapat memberikan rasa selain buah yang kurang tepat untuk aplikasi probiotik berbasis buah. Khusus untuk aroma dan rasa buah seperti jeruk nipis, telah berhasil dilakukan enkapsulasi dari ekstrak kulit dan buah dengan bahan penyalut dekstrin.<sup>29</sup> Potensi dekstrin sebagai penyalut probiotik isolat klinis telah diteliti, namun konsentrasinya relatif tinggi yaitu berkisar antara 50%–70%.<sup>30</sup> Kombinasi penyalut dekstrin dengan jus buah dalam mikroenkapsulasi *L. plantarum* belum dilaporkan. Selain viabilitas, permasalahan kestabilan fungsi probiotik segera setelah proses mikroenkapsulasi belum banyak dibahas.

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengenkapsulasi *L. plantarum* Mar8 dengan menggunakan bahan penyalut dekstrin dalam jus buah. Dekstrin selain mudah larut dalam air, juga dapat melindungi material yang peka terhadap panas dan oksidasi. Dekstrin juga melindungi senyawa volatil seperti aroma buah. Bentuk sediaan ini diharapkan dapat lebih mempertahankan viabilitas dan stabilitas fungsi probiotik seperti aktivitas MSA setidaknya dalam 10 generasi sediaan mikroenkapsulasi.

## METODE PENELITIAN

Isolat probiotik yang digunakan adalah *L. plantarum* Mar8 hasil seleksi isolat dari buah markisa. Kultur dilakukan dalam media *Glukose Yeast Extract and Peptone* (GYP) yang dimodifikasi dengan imbuhan ekstrak buah markisa atau jeruk dan 0,5%  $\text{CaCO}_3$ . Inkubasi dilakukan dalam inkubator 37°C selama 48 jam.

Mikroenkapsulasi probiotik dilakukan dengan teknik semprot kering menggunakan bahan penyalut dekstrin (D) dengan variasi konsentrasi 2%, 5%, dan 10% dalam jus buah markisa (M) atau jeruk (J). Proses ini menggunakan *Spray Dryer EYELA tipe SD-1000* dengan kecepatan 5 ml/menit, suhu *inlet* 125°C, dan suhu *outlet* 72°C. Parameter utama adalah viabilitas probiotik sebelum dan sesudah serta 14 hari setelah mikroenkapsulasi diukur dengan menghitung jumlah sel probiotik yang dapat tumbuh di media GYP. Viabilitas dinyatakan juga dalam ketahanan hidup setelah pemanasan proses mikroenkapsulasi dan daya simpan selama 14 hari penyimpanan yang dipercepat pada kondisi suhu 37°C.

Bentuk butiran mikroenkapsulasi hasil perlakuan terbaik selanjutnya diamati secara mikroskopis dengan *scanning electron microscopy* yang dilengkapi dengan *Energy Dispersion X-ray Spectroscopy* (SEM-EDXS) dengan pembesaran sampai 5.000 x dengan menggunakan mikroskop *SEM model JEOL JSM 5310LV*. Analisis EDXS lebih ditujukan untuk mendeteksi pencemaran logam berat dalam produk mikroenkapsulasi.

Analisis kestabilan fungsi probiotik dilakukan pada 10 generasi hasil mikroenkapsulasi. Kestabilan fungsi probiotik dianalisis berdasarkan ekspresi gen *MSA* untuk aktivitas MSA. Analisis dilakukan dengan teknik *Reverse Transcription and Quantitative Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) pada mRNA dalam RNA total yang diisolasi dengan menggunakan teknik proteksi RNA dengan larutan fenol dalam etanol. Lysis sel probiotik dilakukan dengan *lysozyme* dan *sodium dodecyl sulphate* (SDS). Lysat sel kemudian didenaturasi dengan kalium asetat dan dipisahkan dengan larutan kloroform. RNA dalam fase air kemudian diendapkan dengan isopropanol dan dicuci dengan etanol 70%. mRNA dalam RNA total kemudian diubah menjadi cDNA dan diamplifikasi dengan reaksi RT-qPCR dengan primer:

lp\_1229F 5'AAGGACAGAAGCGGCCGCC-GTGC GAAAGGATAGATT3' dan lp\_1229R 5'ACGGGCCTCGAGGCCCTACTCTTTGT-GCT3'.<sup>18</sup> Reaksi RT-qPCR terdiri atas reaksi *reverse transcription* pada 55°C selama 30 menit, denaturasi awal pada 95°C selama 3 menit, dan 50 siklus qPCR yang terdiri atas denaturasi 95°C selama 30 detik, *annealing* 57°C selama 30 detik. Reaksi dilakukan dalam mesin *Real Time PCR Biorad CFX 90* dan data dianalisis dengan *Biorad CFX manager software version 1.5*.

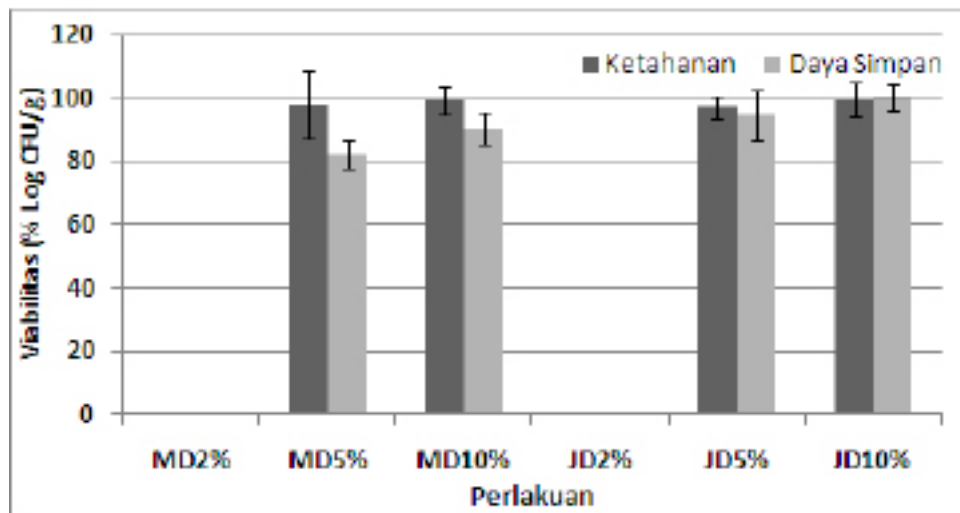
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Mikroenkapsulasi Probiotik

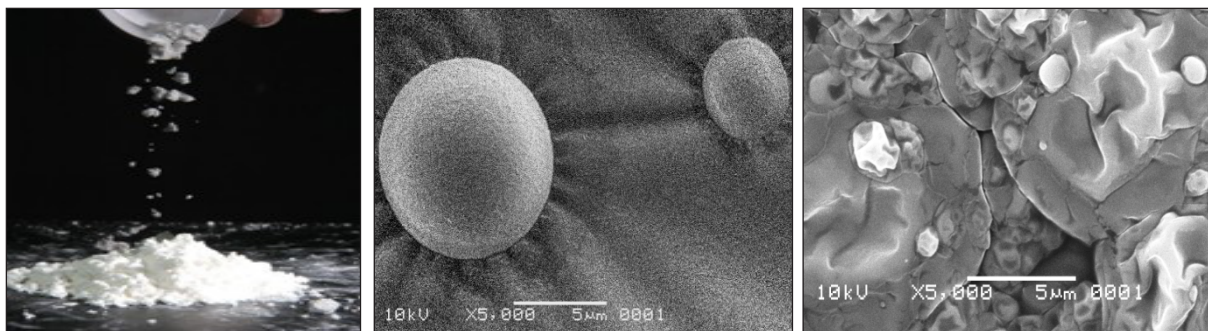
Hasil eksperimen menunjukkan bahwa dekstrin 2% tidak dapat mendukung viabilitas probiotik selama proses semprot kering. Konsentrasi dekstrin 5% dan 10% dalam jus ke dua buah tersebut memberikan ketahanan hidup setelah proses enkapsulasi dan selama penyimpanan yang relatif tidak berbeda (Gambar 1). Hal ini berarti bahwa 5% dekstrin dapat digunakan secara tepat guna. Konsentrasi dekstrin ini relatif jauh lebih sedikit daripada yang dilaporkan Seveline<sup>30</sup> yang mencapai 50%–70%. Konsentrasi dekstrin tinggi adalah tidak praktis dan ekonomis karena memperlambat laju mikroenkapsulasi, produk menjadi lengket, dan lebih mahal. Hasil eksperimen juga mengindikasikan bahwa jeruk dapat digunakan sebagai bahan alternatif terhadap markisa yang merupakan habitat asli probiotik ini. Jeruk lebih berlimpah daripada markisa yang relatif lebih terbatas ketersediaannya.

Pengamatan dengan SEM menunjukkan bahwa struktur butiran dengan bahan penyalut dekstrin 5% relatif lebih kompak daripada butiran dengan bahan penyalut dekstrin 10% yang berbentuk lebih besar dan tidak teratur (Gambar 2). Analisis hasil SEM EDXS menunjukkan tidak ada logam berat terdeteksi sehingga produk mikroenkapsulasi ini relatif aman (Gambar 3).

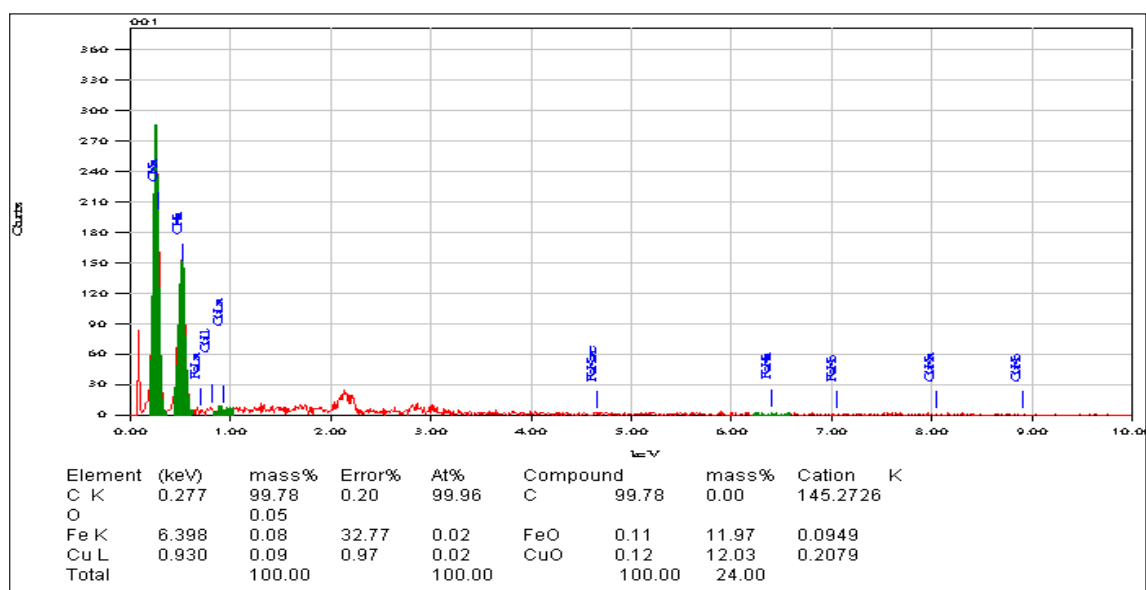
Dalam bentuk termikroenkapsulasi probiotik *L. plantarum* Mar8 dapat lebih lama bertahan dalam sistem pencernaan. Dengan *spray drying*, kultur cair probiotik akan diselubungi oleh bahan penyalut sehingga terlindung dari degradasi karena radiasi cahaya atau oksigen dan memperlambat evaporasi. Proses semprot secara



**Gambar 1.** Viabilitas probiotik *L. plantarum* Mar8 setelah proses semprot kering dan setelah 14 hari kondisi penyimpanan yang dipercepat. Probiotik tersebut disalut dengan jus markisa (M) atau jeruk (J) dan dekstrin (D) pada konsentrasi 2%, 5%, dan 10%. Data merupakan rata-rata dari tiga ulangan.



**Gambar 2.** Foto butiran hasil mikroenkapsulasi probiotik *L. plantarum* Mar8 dengan penyalut dekstrin 5% dalam jus jeruk yang ditabur (panel kiri). Foto SEM menunjukkan butiran ini relatif lebih kompak daripada butiran dengan penyalut dekstrin 10%. (Bandingkan foto panel tengah dan kanan).



**Gambar 3.** Spektrograf jumlah energi dispersi spesifik hasil analisis *Energy Dispersion X Ray Spectroscopy* dari butiran probiotik *L. plantarum* Mar8 terenkapsulasi dekstrin 50% dalam jus jeruk.

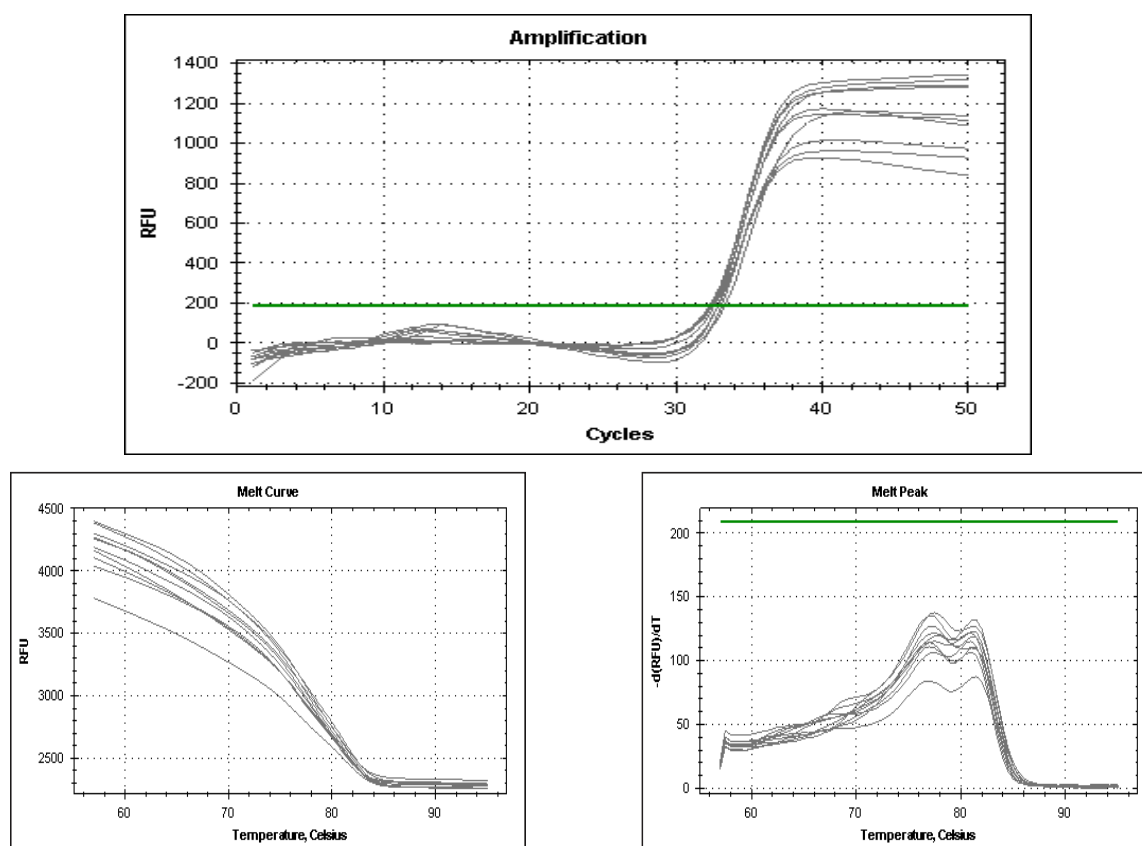
atomisasi (*atomize*) yang menggunakan udara, juga melindungi bahan yang sensitif terhadap panas, seperti kultur bakteri probiotik selama proses mikroenkapsulasi dan selama masa simpan. Teknik semprot ini lebih efisien daripada teknik pengeringan beku atau *freeze dryer* yang lebih rumit dan membutuhkan kondisi vakum. Secara praktis mikroenkapsulasi juga merupakan salah satu strategi untuk meningkatkan cita rasa dan daya tarik konsumsinya.

### Kestabilan Sediaan Mikroenkapsulasi

Probiotik tanpa mikroenkapsulasi dapat bertahan selama 12 jam di sistem pencernaan dengan perincian 4 jam di lambung dan usus halus, dan 8 jam di usus besar.<sup>31</sup> Ketahanan ini berkaitan erat dengan ekspresi gen *msa* dan *atpD*, gen yang terlibat dalam anabolisme energi.<sup>32</sup> Probiotik yang dimikroenkapsulasi bertahan lebih lama di lambung dan usus karena terlindung.

Hasil penelitian terhadap ekspresi gen *msa* dari sepuluh generasi probiotik yang dimikroenkapsulasi menunjukkan bahwa proses ini tidak mengganggu karakter probiosis. Probiotik tersebut tetap berfungsi karena mengekspresikan gen *msa* sebagaimana terlihat dari pola amplifikasi spesifik gen *msa* pada analisis RT-qPCR (Gambar 4). Analisis ini relatif lebih tepat guna dalam menghitung ekspresi gen pada berbagai fase dan kondisi pertumbuhan<sup>33</sup> dan selama dalam proses kehidupan probiotik di sistem pencernaan dari lambung sampai ke kolon.<sup>32</sup>

Data RTqPCR menunjukkan bahwa dalam sampel RNA dari semua generasi terdapat mRNA spesifik untuk gen *msa* dengan jumlah relatif tidak jauh berbeda sebagaimana ditunjukkan oleh grafik peningkatan amplifikasi pada nilai Ct (*threshold concentration*) sekitar 32–33. Nilai Ct terkecil (Ct = 32.31) yang menunjukkan jumlah mRNA spesifik gen *msa* yang terbanyak dihasilkan oleh generasi ke-10. Adapun generasi ke-2 memproduksi mRNA spesifik gen *msa* paling



**Gambar 4.** Jumlah amplifikasi spesifik dari mRNA gen *MSA* dengan teknik RT-qPCR yang dinyatakan dalam *relative fluorescence unit* (RFU) setiap generasi dari 10 generasi probiotik termikroenkapsulasi. Data *melt curve* dan *melt peak* (panel bawah) menunjukkan pola spesifik gen *MSA* yang relatif sama untuk setiap generasi.

sedikit sebagaimana ditunjukkan dengan nilai Ct yang terbesar (33.36). Pola *melt curve* dan *melting temperature* dari setiap reaksi dari setiap sampel 10 generasi relatif sama. Hal ini menunjukkan karakter spesifik dari gen *msa* dan tidak berbeda pada setiap generasi (Gambar 4).

Analisis RT-qPCR gen *msa* juga menunjukkan adanya keragaman ekspresi di antara generasi probiotik yang termikroenkapsulasi, di mana terlihat kecenderungan tidak berkurang dan bahkan ada peningkatan aktivitas ekspresi gen *msa*, sejalan dengan penambahan generasi kultur (Gambar 5). Kestabilan ekspresi gen *msa* dalam 10 generasi kultur yang dimikroenkapsulasi ternyata lebih baik daripada ekspresi yang teramati pada 10 generasi kultur tanpa mikroenkapsulasi di mana terjadi penurunan ekspresi setelah 6 generasi.<sup>23</sup> Hal ini menunjukkan kestabilan karakter probiosis setelah melalui proses mikroenkapsulasi. Proses enkapsulasi tidak saja melindungi viabilitas sel-sel probiotik, tetapi juga mempertahankan potensi genetis ekspresi gen *msa*. Hal ini juga menunjukkan bahwa gen *msa* dan produk proteinnya adalah esensial bagi kehidupan probiotik ini karena diekspresikan secara terus menerus (*consecutively expressed*).

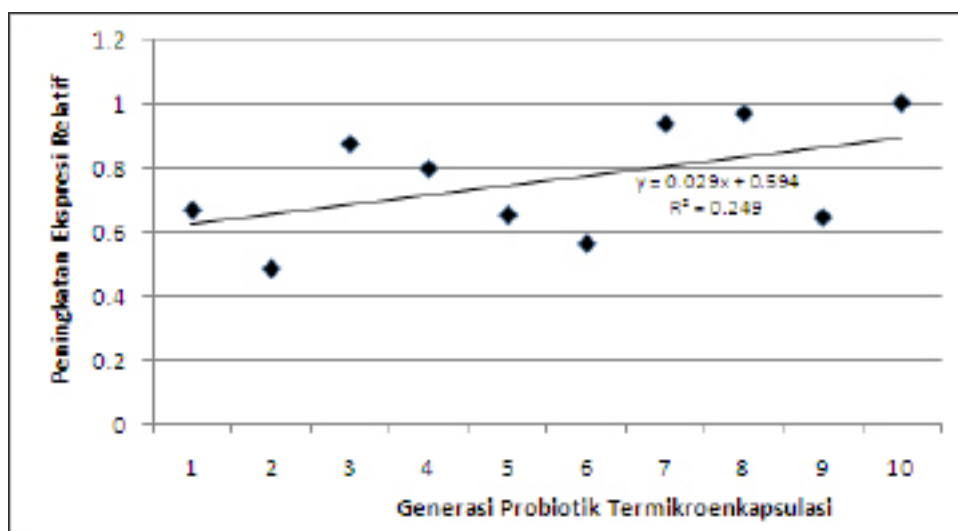
Secara praktis, hal ini menguntungkan karena tidak memerlukan proses induksi dalam ekspresi gen ini. Ekspresi gen *msa* inilah yang menjadikan probiotik ini lebih dapat berkompetisi dengan patogen penginfeksi terutama

dari golongan bakteri gram negatif penyebab utama terjadinya infeksi sistem pencernaan.<sup>34</sup> Selanjutnya, proses agregasi-imobilisasi patogen terjadi dan respons imunitas terbentuk.<sup>35</sup> Selain oleh ekspresi gen *msa*, respons imunitas juga terbentuk oleh ekspresi gen-gen yang terlibat dalam biosintesis *plantaricin*, bahan aktif anti-bakteri patogen.<sup>36,37</sup> Secara umum, probiotik *L. plantarum* mempunyai kapasitas induksi respons imunitas IFN-gamma, IL-12, dan TNF secara signifikan lebih besar daripada probiotik lain seperti *L. acidophilus*.<sup>38</sup>

## KESIMPULAN

Probiotik terseleksi *L. plantarum* Mar8 dari buah markisa dapat dimikroenkapsulasi dengan lebih baik dan stabil dalam 5% bahan penyalut dekstrin dalam jus buah markisa dan jeruk. Jus jeruk dapat menjadi alternatif jus markisa bila ketersediaannya terbatas. Bentuk sediaan mikroenkapsulasi seperti ini selain lebih praktis juga lebih mempertahankan viabilitas dan stabilitas fungsi probiotik. Fungsi ini diindikasikan oleh ekspresi gen *msa* untuk biosintesis protein *mannose specific adhesin* selama sepuluh generasi kultur mikroenkapsulasi.

Secara praktis sediaan probiotik termikroenkapsulasi diharapkan lebih tepat guna dalam pemanfaatannya untuk uji klinis sesuai tahapan upaya komersialisasi.



**Gambar 5.** Hasil analisis RT-qPCR yang menunjukkan tingkat ekspresi relatif dari gen *msa* dari sepuluh generasi kultur probiotik *L. plantarum* Mar8 yang dimikroenkapsulasi.

## DAFTAR PUSTAKA

- <sup>1</sup>Guerrou, R. L., M. Koset, A.A. Lima, B. Lornt, H. Guyat. 2002. Updating the DALYs for Diarrhoeal Diseases. *Trend in Parasitology*, 18: 191–193.
- <sup>2</sup>Crump, J.A., S.P. Luby, E.D. Mintz. 2004. The Global Burden of Typhoid Fever. *Bulletin of World Health Organization*, 85 (5): 346–353.
- <sup>3</sup>Djaja, S. dan A.Suwandono. 2001. The Estimation of Death Rate due to Infection Disease and Parasitic Infection in Indonesia. *Jurnal Epidemiologi Indonesia*, 5 (1): 20–24.
- <sup>4</sup>Simonsen, G.S., J.W. Tapsall, B. Allegranzi, E.A. Talbot, S. Lazzari. 2004. The Antimicrobial Resistance Containment and Surveillance Approach A Public Health Tool. *Bulletin of World Health Organization*, 82 (3): 928–934.
- <sup>5</sup>Lapierre, L., B. Mollet, J.E. Germond. 2002. Regulation and Adaptive Evolution of Lactose Operon Expression in *Lactobacillus delbrueckii*. *Journal of Bacteriology*, 184 (4): 828–835.
- <sup>6</sup>de Vrese, M.R. Ratenberg, C. Lane, M. Koopmans, T. Herremans, S. Schrezenmeir. 2005. Probiotic Bacteria Stimulates Virus Specific Neutralizing Antibodies Following a Booster Polio Vaccination. *Eur. J. Nutrition*, 44 (7): 406–413.
- <sup>7</sup>Haghighi, H., J. Gong, C.L. Gyles, M.A. Hayes, H. Zhou, B. Sanei, J.C. Chamber, S. Sharif. 2006. Probiotic Stimulate Production of Natural Antibodies in Chicken. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13 (9): 975–980.
- <sup>8</sup>Kanamori, Y., K. Hashizume, M. Sugiyama, M. Morotomi dan N. Yuki. 2001. Combination Therapy with *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus casei* and Galactooligosaccharides Dramatically Improved the Instestinal Function in a Girl with Short Bowel Syndrome. *Digestive Disease and Science*, 46 (9): 2010–2016.
- <sup>9</sup>Yosue, H., J. Kiyoshima, T. Hori. 2004. Reduction of Influenza Virus Titer and Protection Against Influenza Virus Infection in Infant Mice Feed *Lactobacillus casei* Shirota. *Clinical Diagnostic Lab. Immunology*, 11(4): 675–679.
- <sup>10</sup>Morimoto, K., T. Takeshita, M. Nanno, S. Tokudome, K. Nakayama. 2005. Modulation of Natural Killer Cell Activity by Supplementation of Fermented Milk Containing *Lactobacillus casei* in Habitual Smokers. *Preventive Medicine*, 40: 589–594.
- <sup>11</sup>Hardiningsih, R., R.N.R. Napitupulu, T. Yulinery. 2006a. Isolasi dan Uji Resistansi Beberapa Isolat *Lactobacillus* pada pH Rendah. *Biodiversitas*, 7: 15–17.
- <sup>12</sup>Hardiningsih, R. dan N. Nurhidayat. 2006b. Pengaruh Pemberian Pakan Hiperkolesterolemia terhadap Bobot Badan Tikus Putih Wistar yang Diberi Bakteri Asam Laktat. *Biodiversitas*, 7: 127–130.
- <sup>13</sup>Triana, E., E. Yulianto, N. Nurhidayat. 2006a. Uji Viabilitas *Lactobacillus sp.* Mar 8 Termikroenkapsulasi. *Biodiversitas*, 7: 114–117.
- <sup>14</sup>Triana. E., E. Kasim, N. Nurhidayat. 2006b. Pengaruh Probiotik *Lactobacillus sp.* Mar 8 terhadap Kadar Trigliserida pada Darah Tikus Putih Hiperkolesterolemia. *Gakuryoku*, XII: 170–173.
- <sup>15</sup>Yulinery, T. E. Yulianto, N. Nurhidayat. 2006a. Uji Fisiologis Probiotik *Lactobacillus sp.* Mar 8 yang telah Dimikroenkapsulasi dengan Menggunakan Spray Dryer untuk Menurunkan Kolesterol. *Biodiversitas*, 7: 118–122.
- <sup>16</sup>Yulinery, T., R. Hardiningsih dan E. Kasim. 2006b. Pengaruh Pakan Kolesterol terhadap Bobot Badan Tikus Sprague Dawley yang diberi *Monascus purpureus* Went Penurun Kolesterol. *Gakuryoku*, XII: 174–179.
- <sup>17</sup>Carmina, R.R. Safitri, S. Syarif, N. Nurhidayat. 2010. Analisis Ekspresi Gen Mannose Spesific Adhesin yang Berkaitan dengan Adhesi Probiotik di Epitel Usus pada Isolat Probiotik *Lactobacillus* dan *Leuconostoc* dengan Menggunakan Metode Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Medicinus*, 23 (3): 20–22.
- <sup>18</sup>Pretzer G. J.S. Molenaar, A. Wiersma, P.A. Bron, J. Lambert, W.M. de Vos, R. van der Meer, M.A. Smits, M. Kleerebezem. 2005. Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol*, 187 (17): 612–636.
- <sup>19</sup>Sun J., Le G.W., Shi Y.H., Su G.W. 2007. Factors Involved in Binding of *Lactobacillus Plantarum* Lp6 to Rat Small Intestinal Mucus. *Lett Appl Microbiol*, 44 (1): 79–85.
- <sup>20</sup>Tallon R., Arias S., Bressollier P., Urdaci M.C. 2007. Strain- and Matrix-dependent Adhesion of *Lactobacillus plantarum* is Mediated by Proteinaceous Bacterial Compounds. *J Appl Microbiol*, 102 (2): 442–510
- <sup>21</sup>Luckow, T., V. Sheehan, G. Fitzgerald, C. Delahunty. 2006. Exposure, Health Information and Flavour-Masking Strategies for Improving the Sensory Quality of Probiotic Juice. *Appetite*, 47 (3): 315–23. Epub 2006 Jul 20.
- <sup>22</sup>Mira, A., A. Pusker, V.F. Rodriguez. 2006. The Neolithic Revolution of Bacterial Genome. *Trend Microbiology*, 14 (5): 2000–2006.

- <sup>23</sup>Escobar-Paremo, P., A. LeMenach, T. LeGall, C. Amarin, S. Gourion, B. Picard, D. Skurnik, E. Denamur. 2006. Identification of Forces Shaping the Commensal *Escherichia coli* Genetic Structure by Comparing Animal and Human Isolates. *Environmental Microbiology*, 8 (11): 1975–1984.
- <sup>24</sup>Lian, W.C., H.C. Hsio, C.C. Chou. 2003. Viability of Microencapsulated *Bifidobacteria* in Simulated Gastric Juice and Bile Solution. *Int. J. Food Microbiol*, 86: 293–301.
- <sup>25</sup>Picot, A. dan C. Lacroix. 2004. Encapsulation of *Bifidobacteria* in Whey Protein Based Microcapsules and Survival in Simulated Gastrointestinal Condition and in Yoghurt. *Int. Dairy Journal*, 14: 505–515.
- <sup>26</sup>Chandramouli, V. K. Kailasapathy, P. Peiris, M. Jones. 2004. An Improved Method of Microencapsulation and Its Evaluation to Protect *Lactobacillus spp* in Simulated Gastric Condition. *J. Microb Methods*, 56: 27–35.
- <sup>27</sup>Goderska, K. dan Z. Czarnecki. 2008. Influence of Microencapsulation and Spraydrying on the Viability of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains. *Polish Journal of Microbiology*, 57 (2): 135–140.
- <sup>28</sup>Kasra K.R., J. Fooladi, S. Peymanfar. 2010. Isolation and Microencapsulation of *Lactobacillus spp* from Corn Silage for Probiotic Application. *Iranian Journal of Microbiology*, 2 (2): 98–102.
- <sup>29</sup>Ahza, A.B. dan A.H. Slamet. 1997. Mikroenkapsulasi campuran Ekstrak Kulit dan Buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* SWINGLE) serta Aplikasinya pada Teh Celup. *Bulletin Teknologi dan Industri Pangan*, VIII (2): 7–13.
- <sup>30</sup>Seveline. 2005. *Pengembangan Produk Probiotik dari Isolat Klinis Bakteri Asam Laktat dengan Menggunakan Teknik Pengeringan Semprot dan Pengeringan Beku*. Tesis. Program Studi Ilmu Pangan. Bogor: Sekolah Pasca Sarjana IPB.
- <sup>31</sup>Marco M.L., M. Kleerebezem. 2008. Assessment of Real-time RT-PCR for Quantification of *Lactobacillus plantarum* Gene Expression During Stationary Phase and Nutrient Starvation. *J Appl Microbiol*. 104 (2): 587–94.
- <sup>32</sup>Duary R.K., Batish V.K., Grover S. 2010. Expression of the *atpD* Gene in Probiotic *Lactobacillus plantarum* Strains Under *in vitro* Acidic Conditions Using RT-qPCR. *Res Microbiol*, 161 (5): 399–405
- <sup>33</sup>Marco M.L., R.S. Bongers, W.M. de Vos, M. Kleerebezem. 2008. Spatial and Temporal Expression of *Lactobacillus plantarum* Genes in the Gastrointestinal Tracts of Mice. *Appl Environ Microbiol*, 73 (1): 124–32.
- <sup>34</sup>Castaldo, C., V. Vastano, R.A. Siciliano, M. Candela, M. Vici, L. Muscariello, R. Marasco, M. Sacco. 2009. Surface Displaced Alfa-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a Fibronectin Binding Protein. *Microb Cell Fact.*, 2009 (8) : 14.
- <sup>35</sup>Sung, K.J., R.Y. Hye, Y.C. Ju , K.S. Jeong. 2007. *Lactobacillus plantarum* Inhibits Epithelial Barrier Dysfunction and Interleukin-8 Secretion Induced by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *World. J. Gastroenterol*, 13 (13): 1962–1965.
- <sup>36</sup>Gross, G.J.V. Der Meulen, J. Snel, R. Van Der Meer, M. Kleerebezem, T. A. Niewold, M.M. Hulst, M.A. Smith. 2008. Mannose-specific Interaction of *Lactobacillus plantarum* with Porcine Jejunal Epithelium. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 54 (2): 215–223.
- <sup>37</sup>Meijerink M., S. van Hemert , N. Taverne, M. Wels, P. de Vos, P.A. Bron , H.F. Savelkoul, J. van Bilsen, M. Kleerebezem, J.M. Wells. 2010. Identification of genetic loci in *Lactobacillus plantarum* that Modulate the Immune Response of Dendritic Cells Using Comparative Genome Hybridization. *PLoS One*, 13 (5): 10632.
- <sup>38</sup>Visser Y.M., Snel J., Zuurendonk P.F., Smit B.A., Wicher H.J., Savelkoul H.F. 2010. Differential Effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* Strains on Cytokine Induction in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 59 (1): 60–70.