

**STUDI KOMPARASI PENGGUNAAN pH LARUTAN PENCERNAAN
SECARA *IN VITRO* TERHADAP STRUKTUR MIKROENKAPSULAT DAN
VIABILITAS *Lactobacillus acidophilus* DENGAN *REFINED CARRAGEENAN*
Eucheuma spinosum 4,5% SEBAGAI PENGENKAPSULAT**

**LAPORAN SKRIPSI
TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN**

Oleh :

**WAWAN YUHANTO
NIM. 0410830081**



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
MALANG
2009**

repository.ub.ac.id

**STUDI KOMPARASI PENGGUNAAN pH LARUTAN PENCERNAAN
SECARA *IN VITRO* TERHADAP STRUKTUR MIKROENKAPSULAT DAN
VIABILITAS *Lactobacillus acidophilus* DENGAN *REFINED CARRAGEENAN*
Eucheuma spinosum 4,5% SEBAGAI PENGENKAPSULAT**

**Laporan Skripsi Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Perikanan Pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya Malang**

Oleh :

**WAWAN YUHANTO
NIM : 0410830081**

DOSEN PENGUJI I

(Ir. TITIK DWI SULISTIYATI, MP)
NIP. 131 576 470
Tanggal:

MENYETUJUI,
DOSEN PEMBIMBING I

(Ir. DWI SETIJAWATI, M.Kes)
NIP. 131 759 606
Tanggal:

DOSEN PEMBIMBING II

(Ir. MUHAMMAD FIRDAUS, MP)
NIP. 132 310 158
Tanggal:

MENGETAHUI,
KETUA JURUSAN MSP

(Ir. MAHENO SRI WIDODO, MS)
NIP. 131 471 522
Tanggal:

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah memberi rahmat sehingga penulisan skripsi ini dapat diselesaikan. Penulis menyadari bahwa skripsi ini tidak akan berjalan dengan baik tanpa dukungan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

1. Ir. Dwi Setijawati, M.Kes, selaku Dosen Pembimbing I yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan sehingga laporan ini dapat tersusun.
2. Ir. Muhammad Firdaus, MP, selaku Dosen Pembimbing II yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan sehingga laporan ini dapat tersusun.
3. Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP, selaku Dosen Penguji, yang berkenan menguji laporan skripsi penulis
4. Laboran Laboratorium Sentral Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Pertanian, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Laboratorium Mikrobiologi Dasar dan Laboratorium Biokimia Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang
5. Kedua orang tua yang memberi dukungan secara moril dan materiil selama penyelesaian skripsi.
6. Semua teman THP 04 yang telah memberi bantuan dan dorongan sehingga laporan ini dapat tersusun.

Akhirnya penulis berharap semoga laporan ini bermanfaat dan dapat memberikan informasi bagi pembaca.

Malang, Mei 2009

Penulis

RINGKASAN

WAWAN YUHANTO (0410830081). Skripsi Tentang Studi Komparasi Penggunaan pH Larutan Pencernaan Secara *In Vitro* Terhadap Struktur Mikroenkapsulat Dan Viabilitas *Lactobacillus acidophilus* Dengan *Refined Carrageenan Eucheuma spinosum* 4,5% Sebagai Pengenkapsulat
(dibawah bimbingan **Ir. Dwi Setijawati, MKes** dan **Ir. M Firdaus, MP**).

Probiotik adalah mikroba yang menguntungkan bagi hewan atau manusia dengan cara meningkatkan keseimbangan mikroba dalam usus. Probiotik memberikan efek kesehatan karena dapat mengurangi pertumbuhan bakteri jahat di dalam saluran usus, meningkatkan penyerapan laktosa pada orang-orang yang tidak toleran terhadap laktosa, mengurangi serum kolesterol, membantu proses pencernaan dan mengurangi jumlah racun dalam usus (Parvez *et al.*, 2006). *Lactobacillus acidophilus* adalah salah satu spesies bakteri probiotik yang termasuk dalam genus *Lactobacillus* yang ditemukan di dalam usus manusia dan hewan (Frece, 2004). Agar memberikan efek kesehatan, probiotik harus dapat mencapai ke dalam usus besar dalam keadaan hidup dan dalam jumlah cukup yaitu $10^6 - 10^7$ Colony-Forming Unit (CFU)/ml produk.

Jumlah probiotik yang tersedia dalam bahan pangan dapat menurun akibat faktor lingkungan, antara lain: suhu, pH dan kadar oksigen terlarut dalam udara. Lebih lanjut, bakteri ini akan dipengaruhi oleh adanya enzim hidrolitik, kondisi asam pada perut, dan asam empedu pada rongga pencernaan (Lo, 2007).

Untuk menjaga agar bakteri probiotik dapat mencapai usus dalam jumlah yang memadai, maka diperlukan suatu lapisan yang mampu melindungi bakteri tersebut. Perlindungan bakteri probiotik dapat dilakukan dengan cara teknik mikroenkapsulasi. Bahan alami yang bisa digunakan atau secara potensial bermanfaat sebagai bahan enkapsulasi antara lain adalah selulose, gum arab, agar-agar, *k*-karaginan, alginat, kitosan, dan pektin Polimer-polimer tersebut kebanyakan akan membentuk gel pada kondisi yang spesifik, yang merupakan syarat sebagai bahan enkapsulasi. Karaginan adalah contoh bahan alami yang dapat menjadi bahan pengenkapsulat karena dalam bentuk yang umum, bereaksi dengan ion-ion potasium membentuk gel (King, 1995).

Berdasarkan uraian diatas perlu dilakukan suatu penelitian lagi yaitu apakah *refined carrageenan* dari *Eucheuma spinosum* dengan konsentrasi tertentu bisa dijadikan sebagai pengenkapsulat yang efektif terhadap *viabilitas Lactobacillus acidophilus* pada pH 2 dan 7

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia Hasil Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Mikrobiologi Dasar Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, dan Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Agustus 2008 - Februari 2009.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan *viabilitas Lactobacillus acidophilus* dan struktur mikroenkapsulat pada pH yang berbeda dari konsentrasi terbaik *Refined Carrageenan Eucheuma spinosum* sebagai pengenkapsulat.

Penelitian ini dilakukan secara eksperimen dan dibagi menjadi dua tahap. Tahap pendahuluan adalah untuk mencari karakteristik *refined carrageenan* dari *Eucheuma spinosum* dan untuk menentukan konsentrasi terbaik *refined carrageenan* sebagai bahan

pengkapsulatan. Tahap penelitian inti yaitu tentang studi perbandingan viabilitas dan struktur mikroenkapsulatan pada pH 2 dan 7.

Parameter uji dalam penelitian pendahuluan tahap pertama meliputi analisa fisiko kimia *Refined carrageenan Eucheuma spinosum* seperti kadar air, kadar abu, total Pb, total sulfat, viskositas, *gelling point*, *melting point*, kekuatan gel, dan FTIR (*Fourier Transform Infra Red*). Sedangkan parameter uji penelitian pendahuluan tahap kedua adalah uji viabilitas *Lactobacillus acidophilus* pada konsentrasi *Refined carrageenan* yang berbeda yang disusun dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dan parameter uji penelitian inti yaitu viabilitas *Lactobacillus acidophilus* dan struktur mikroenkapsulatan pada pH 2 dan 7, dan kemudian data hasil pengamatan diolah dengan uji t dan uji struktur mikroenkapsulatan dengan menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM).

Berdasarkan hasil analisa fisiko kimia sampel *Refined carrageenan* didapatkan nilai kadar air 11,04%, kadar abu 19,6%, Total Pb 6,84 mg/kg, Total sulfat 25,77%, viskositas 210 mPas, *gelling point* 25,5°C, *melting point* 80°C, kekuatan gel 1124 g/cm². Data analisa FTIR menunjukkan bahwa karaginan yang dibuat adalah jenis iota karaginan hal ini ditunjukkan dengan adanya dua gugus D-galaktosa 4 sulfat pada puncak serapan 849,58 cm⁻¹ dan gugus 3,6 anhidrogalaktosa 2 sulfat pada serapan 804,26 cm⁻¹.

Hasil uji viabilitas *Lactobacillus acidophilus* pada pH 2 diperoleh jumlah koloni sebesar 1,6.10² CFU/ml dan pada pH 7 tidak terdapat koloni bakteri yang hidup. Struktur mikroenkapsulatan mengalami penurunan ukuran diameter setelah mengalami perlakuan pada pH yang berbeda.



DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Identifikasi Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Kegunaan	6
1.5 Hipotesa	6
1.6 Tempat dan Waktu	6
2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 <i>Eucheuma spinosum</i>	7
2.2 <i>Refined Carrageenan</i>	10
2.2.1 <i>Iota carrageenan</i>	13
2.2.2 Sifat-sifat <i>Iota carrageenan</i>	13
2.3 Probiotik.....	17
2.4 Mikroenkapsulasi.....	23
2.4.1 Bahan Inti.....	24
2.4.2 Enkapsulat	24
2.4.3 Teknik Enkapsulasi.....	26
3. METODE PENELITIAN	29
3.1 Materi Penelitian	29

3.1.1 Bahan	29
3.1.2 Alat.....	29
3.2 Metode Penelitian	29
3.2.1 Variabel Penelitian.....	30
3.2.2 Rancangan Percobaan	30
3.3 Pelaksanaan Penelitian	30
3.3.1 Penelitian Pendahuluan	30
3.3.2 Penelitian Utama	31
3.4 Prosedur Kerja	33
3.4.1 Pembuatan <i>Reffined Carrageenan</i>	33
3.4.2 Mikroenkapsulasi <i>lactobacillus acidophilus</i>	34
3.4.3 Uji Struktur Mikroenkapsulat dan Viabilitas <i>Lactobacillus acidophilus</i>	35
3.5 Parameter Uji	36
3.5.1 Kadar Abu	36
3.5.2 Kadar Air	36
3.5.3 Logam Berat (AAS).....	37
3.5.4 Kadar Sulfat ($BaSO_4$)	37
3.5.5 <i>Melting Point</i>	38
3.5.6 <i>Gelling Point</i>	39
3.5.7 <i>Gell Strength</i>	39
3.5.8 Viskositas	40
3.5.9 <i>Fourier Transform Infra Red (FTIR)</i>	41
3.5.10 Viabilitas <i>Lactobacillus acidophilus</i>	41
3.5.11 <i>Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)</i>	42
4. HASIL dan PEMBAHASAN	43
4.1 Hasil analisa Fisiko Kimia karaginan	43
4.2 Struktur Mikroenkapsulat	45
4.2.1 Penentuan Konsentrasi	45
4.2.2 CLSM	46
4.3 Uji Viabilitas	47

5. KESIMPULAN dan SARAN 51

 5.1 Kesimpulan 51

 5.2 Saran 51

DAFTAR PUSTAKA 52

LAMPIRAN..... 57



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rumput laut tumbuh dan tersebar hampir di seluruh perairan Indonesia. Tumbuhan ini bernilai ekonomis karena penggunaannya sangat luas untuk industri kembang gula, kosmetik, es krim, media cita rasa, roti, susu, pengalengan ikan, obat-obatan dan lain sebagainya. Jenis-jenis yang bernilai ekonomis penting adalah *Gracilaria*, *Gelidella*, *Gelidium*, *Pterrocclaidia* sebagai penghasil agar-agar, *Chondrus*, *Eucheuma*, *Gigartina*, *Hypnea*, *Iriclaea* sebagai penghasil karaginan; *Furcellaria* sebagai penghasil furcellaran; dan *Ascophyllum*, *Durvillea*, *Turbinaria* sebagai penghasil alginat (Indriani dan Sumiarsih, 1995).

Eucheuma spinosum merupakan rumput laut yang termasuk dalam golongan *Rhodophyceae*. *Eucheuma spinosum* dikenal juga dengan nama *E. denticulatum* dan *E. muricatum*. Rumput laut ini mengandung beberapa bahan makanan yang cukup penting artinya yaitu iota karaginan. Karaginan yang terkandung pada rumput laut jenis ini terdapat pada dinding sel dan lamela tengah yang membentuk suatu bahan yang kental (Suryaningrum, 1998).

Karaginan merupakan getah rumput laut yang diperoleh dari hasil ekstraksi rumput laut merah dengan menggunakan air panas atau larutan alkali pada temperatur tinggi. Karaginan mempunyai kemampuan yang unik, yaitu dapat membentuk berbagai variasi gel pada temperatur ruang. Larutan karaginan dapat mengentalkan dan menstabilkan partikel-partikel sebaik pendispersian koloid dan emulsi air/minyak. Aplikasi karaginan sebagai lapisan pembungkus dapat berfungsi untuk mengontrol kelembaban. Semakin meluasnya aplikasi karaginan dalam berbagai bidang dan sifatnya

yang aman dan tidak beracun, serta keunikan sifat yang dimilikinya menyebabkan sampai saat ini belum dapat digantikan oleh zat tambahan lainnya (Anggraini, 2004). Karaginan, biasanya diproduksi dalam bentuk garam Na, K, Ca. Pemakaian karaginan diperkirakan 80% digunakan di bidang industri makanan, farmasi dan kosmetik. Pada industri makanan sebagai *stabilizer*, *thickener*, *gelling agent*, *additive* atau komponen tambahan dalam pembuatan coklat, milk, pudding, instant milk, makanan kaleng dan bakery (Istini dkk., 2008). Selain itu karena sifat gelnya yang kuat karaginan juga digunakan sebagai media untuk mikroenkapsulasi bakteri probiotik atau bakteri asam laktat (Mosilhey, 2003).

Probiotik dapat digambarkan sebagai makanan atau obat yang didalamnya terkandung mikroba hidup, yang ketika dicerna diharapkan dapat memberikan keuntungan fisiologi kepada hewan yang memakannya (Ishibashi dan Yamazaki, 2001). Menurut Fuller (1991) probiotik adalah suplemen makanan berupa mikroba hidup yang menguntungkan bagi hewan inang yang memakannya dengan cara meningkatkan keseimbangan mikroba dalam usus. Keuntungan mengkonsumsi probiotik antara lain: mengurangi pertumbuhan bakteri jahat di dalam saluran usus, meningkatkan penyerapan laktosa pada orang-orang yang tidak toleran terhadap laktosa, mengurangi serum kolesterol, membantu proses pencernaan dan mengurangi jumlah racun dalam usus (Parvez *et al.*, 2006).

Standar bioviabilitas probiotik agar sampai ke usus dalam keadaan hidup atau tidak rusak harus mencapai jumlah yang memadai yaitu sebesar 1×10^7 Colony-Forming Unit (CFU)/ml bakteri probiotik (Drakoularakou, 2003). Namun demikian, pengurangan jumlah sel dan daya tahan bakteri secara signifikan dalam produk makanan dapat terjadi dan tidak dapat terelakan karena perubahan lingkungan seperti pH, suhu dan kadar

oksigen terlarut. Lebih lanjut lagi, setelah dikonsumsi, bakteri probiotik akan dipengaruhi oleh enzim hidrolitik, kondisi asam pada perut, dan asam empedu pada rongga pencernaan (Lo, 2007).

Bakteri probiotik harus dilindungi supaya dapat mencapai usus dalam jumlah yang memadai. Perlindungan bakteri probiotik dapat dilakukan dengan cara teknik mikroenkapsulasi. Mikroenkapsulasi adalah teknik penyalutan bahan inti yang berbentuk padatan, cairan maupun gas dengan suatu bahan penyalut. Dua bahan yang terlibat dalam proses ini adalah inti dan penyalut. Inti adalah bahan yang akan disalut dan penyalut adalah bahan yang digunakan untuk menyalut inti. Bahan inti dapat berupa gas, cairan dan padatan yang bersifat hidrofobik atau hidrofilik (Kondo, 1979).

Bahan enkapsulat yang dipilih dalam proses enkapsulasi haruslah dapat memberi suatu lapisan yang kohesif dengan inti, tercampur secara kimia dengan inti dan tidak bereaksi dengan inti, serta bersifat kuat, *impermeable*, dan stabil (Lachman *et al.*, 1994). Bahan yang biasa digunakan sebagai bahan enkapsulat adalah polimer organik atau non-organik baik berasal dari bahan alam ataupun buatan. Bahan enkapsulat yang digunakan pada bahan pangan kebanyakan berasal dari bahan alami atau turunannya (Kondo, 1979).

Bahan alami yang bisa digunakan atau secara potensial bermanfaat sebagai bahan enkapsulasi antara lain adalah selulose, gum arab, agar-agar, karaginan, alginat, kitosan, dan pektin. Semua bahan di atas adalah hidrokoloid yang termasuk dalam polimer dengan perkecualian maltodekstrin dan selulose (carboxymethyl cellulose/CMC), yang merupakan selulose anionik. Polimer-polimer tersebut kebanyakan akan membentuk gel pada kondisi yang spesifik, yang merupakan syarat sebagai bahan enkapsulasi. Karaginan adalah contoh bahan alami yang dapat menjadi

bahan pengenkapsulat karena dalam bentuk yang umum, bereaksi dengan ion-ion potasium membentuk gel (King, 1995).

1.2 Identifikasi Masalah

Mikroenkapsulasi didefinisikan sebagai teknologi pengemasan bahan padat, cair ataupun gas dalam ukuran mikro, yang dikemas dalam kapsul yang bisa melepaskan isi pada kondisi spesifik yang terkontrol. Mikroenkapsulasi mempunyai banyak manfaat dalam bidang industri pangan seperti menstabilkan material inti, mencegah reaksi oksidasi, mencegah pelepasan rasa, bau dan warna makanan, melindungi bahan dari kehilangan nutrisi dan juga digunakan sebagai pelindung bakteri probiotik untuk meningkatkan kemampuannya selama proses fermentasi (Anal and Singh., 2007).

Lactobacillus acidophilus adalah salah satu spesies bakteri probiotik yang termasuk dalam genus *Lactobacillus* yang ditemukan di dalam usus manusia dan hewan. Sebagai probiotik, ketika diberikan dalam jumlah yang cukup, *Lactobacillus acidophilus* dipercaya dapat menciptakan suatu keseimbangan yang sehat antara mikroflora yang berbahaya dan yang menguntungkan di dalam usus (Frece, 2004).

Namun perlu diingat bahwa sifat probiotik itu mudah sekali menurun sebelum sampai ke usus. Untuk dapat memberikan pengaruhnya, suatu bahan harus mengandung sedikitnya 1×10^7 CFU/ml bakteri probiotik dan dapat mencapai target sasaran (Drakoularakou, 2003). Bakteri probiotik ketika dicerna membentuk tingkat populasi yang tinggi atau rendah atau mungkin mati. Dan juga perlu ditekankan bahwa tingkat populasi bakteri di bawah 1×10^7 cfu/ml tidak akan memberikan peran yang signifikan. Oleh karena itu, jelas bahwa untuk dapat memberikan manfaat bagi kesehatan, kultur

bakteri harus dapat menjangkau tempat sasaran pada suatu tingkat minimum bakteri probiotik hidup (Kushal *et al.*, 2006).

Maka untuk mencegah kerusakan tersebut, *Lactobacillus acidophilus* harus dilindungi dengan suatu bahan penyalut. Salah satu cara untuk meningkatkan jumlah sel probiotik dalam media pembawa adalah dengan penjeratan secara fisik di dalam polimer sebelum disatukan ke dalam produk pangan. Berbagai cara telah dilakukan untuk menjerat kultur probiotik ke dalam gel alami seperti dalam kalsium alginat dan juga karaginan (Champagne *et al.*, 1993). *Lactobacillus acidophilus* yang dienkapsulasi dengan kalsium alginat ketika diamati jumlahnya menjadi lebih banyak daripada yang tidak dienkapsulasi. Bakteri yang dienkapsulasi dengan menggunakan kalsium alginat ini juga mampu bertahan pada kondisi asam (pH 2,5) (Kailasapathy, 2002).

Bahan-bahan yang biasa digunakan untuk mikroenkapsulasi antara lain golongan polimer sintesis seperti polystyrene dan polyurathane, golongan protein seperti kolagen, putih telur dan gelatin, golongan polisakarida antara lain agar, alginat, karaginan, selulose, dekstran, pektat dan lignin. Karaginan (k-karaginan, i-karaginan) merupakan bahan alami yang bisa digunakan sebagai bahan enkapsulan karena sifatnya yang mendukung seperti dapat membentuk gel secara *reversibel* artinya dapat membentuk gel pada saat pendinginan dan kembali cair pada saat dipanaskan, tidak bersifat toksik terhadap bahan inti (King, 1995).

Berdasarkan uraian diatas perlu dilakukan suatu penelitian lagi yaitu apakah *refined carrageenan* dari *Eucheuma spinosum* dengan konsentrasi tertentu bisa dijadikan sebagai pengenkapsulat yang efektif terhadap viabilitas *Lactobacillus acidophilus* pada pH yang berbeda.

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah :

Untuk mendapatkan viabilitas *Lactobacillus acidophilus* dan struktur mikroenkapsulat pada pH yang berbeda dari konsentrasi 4,5% *refined carrageenan Eucheuma spinosum* sebagai bahan pengenkapsulat.

1.4 Kegunaan

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang teknologi enkapsulasi *refined carrageenan* dari *Eucheuma spinosum* sebagai bahan pengenkapsulat terhadap viabilitas *Lactobacillus acidophilus*.

1.5 Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah

Diduga pada pH yang berbeda akan didapatkan viabilitas *Lactobacillus acidophilus* dan struktur mikroenkapsulat pada konsentrasi 4,5%.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Mikrobiologi Dasar Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, dan Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Agustus 2008– Februari 2009.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Eucheuma spinosum*

Rumput laut (seaweed) merupakan tumbuhan tingkat rendah berupa thallus (batang) yang bercabang-cabang, dan hidup di laut dan tambak dengan kedalaman yang masih dapat dicapai oleh cahaya matahari. Rumput laut atau juga biasa disebut dengan ganggang atau *algae* terdiri dari empat kelas yaitu: ganggang hijau-biru (*Cyanophyceae*), ganggang hijau (*Chlorophyceae*), ganggang merah (*Rhodophyceae*) dan ganggang coklat (*phacophyceae*) (Hira dan Eka, 2006).

Banyak penelitian yang membuktikan bahwa rumput laut adalah bahan pangan berkhasiat, berikut beberapa diantaranya: antikanker, antioksidan (Klorofil pada ganggang laut hijau dapat berfungsi sebagai antioksidan, zat ini membantu membersihkan tubuh dari reaksi radikal bebas yang sangat berbahaya bagi tubuh), mencegah kardiovaskular (Ekstrak rumput laut dapat menurunkan tekanan darah pada penderita hipertensi, mengkonsumsi rumput laut juga sangat dianjurkan bagi pengidap stroke karena dapat menyerap kelebihan garam pada tubuh), makanan diet (Kandungan serat pada rumput laut sangat tinggi yang bersifat mengenyangkan dan memperlancar proses metabolisme tubuh sehingga sangat baik dikonsumsi penderita obesitas). Secara umum, rumput laut yang dapat dimakan adalah jenis ganggang biru (*Cyanophyceae*), ganggang hijau (*Chlorophyceae*), ganggang merah (*Rodophyceae*) atau ganggang coklat (*phacophyceae*) (Sutomo, 2006).

Di Indonesia, jenis rumput laut yang betul-betul mendapat perhatian serta pengelolaan yang sungguh-sungguh adalah jenis ganggang merah seperti *Eucheuma sp*, *Gelidium sp*, *Gracilaria sp*, dan *Hypnea sp*. Salah satu spesies rumput laut dari jenis

ganggang merah (*Rhodophyceae*) yang dapat menghasilkan iota-karaginan yaitu *Eucheuma spinosum*. Klasifikasi rumput laut *Eucheuma spinosum* adalah sebagai berikut:

Divisio	: Rhodophyta
Kelas	: Rhodophyceae
Ordo	: Gigartinales
Family	: Solieriaceae
Genus	: <i>Eucheuma</i>
Spesies	: <i>Eucheuma spinosum</i> (Anonymous, 2008 ^a)

Eucheuma spinosum atau yang biasa disebut *Eucheuma denticulatum* mempunyai ciri-ciri thallus bulat tegak dengan ukuran panjang 5-30 cm, transparan, warna coklat kekuningan sampai merah keunguan. Permukaan thallus tertutup oleh tonjolan yang berbentuk seperti duri-duri runcing yang tidak beraturan, duri tersebut ada yang memanjang seolah berbentuk seperti cabang (Suryaningrum, 1998). Alga ini tumbuh tersebar di perairan Indonesia pada tempat-tempat yang sesuai dengan persyaratan tumbuhnya, antara lain substrat batu, air jernih, ada arus atau terkena gerakan air lainnya, dengan kadar garam antara 28-36‰ dan cukup sinar matahari. Alga ini yang diperoleh dari produksi alami dan budidaya merupakan komoditas ekspor dan untuk konsumsi dalam negeri. Di dalam negeri dimanfaatkan untuk bahan makanan, sayuran dan lalapan pada beberapa tempat tertentu di wilayah pantai antara lain di Lombok (Anonymous, 2008^a). Morfologi *Eucheuma spinosum* dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. *Eucheuma spinosum* (Anonymous, 2008^a)

Perkembangbiakan rumput laut dilakukan dengan 2 cara yaitu secara kawin antara gamet jantan dan gamet betina (*generatif*) serta tidak kawin melalui *vegetatif*, *konjugatif* dan penyebaran spora yang terdapat pada kantong spora (*carpospora*, *cystocarp*) (Hira dan Eka, 2006).

Jenis rumput laut merah mempunyai beberapa manfaat, baik di bidang pangan, industri, maupun kesehatan. Dalam bidang pangan, manfaat rumput laut merah adalah sebagai bahan penstabil, bahan tambahan makanan, bahan pengemulsi, dan pengental. Dalam bidang industri, manfaat rumput laut merah adalah sebagai bahan tambahan dalam industri tekstil, kertas, keramik, fotografi, dan lain-lain. Sedangkan dalam bidang kesehatan, manfaat rumput laut merah adalah sebagai pengemulsi; bahan penstabil; bahan suspensi dalam pembuatan tablet dan kapsul (Nindyaning, 2007). Rumput laut yang termasuk Rhodophyceae beberapa diantaranya mengandung bahan makanan yang cukup penting artinya yaitu karaginan. Karaginan yang terkandung di dalamnya terdapat pada dinding sel dan lamela tengah yang membentuk suatu bahan yang kental (Suryaningrum, 1998).

2.2 Refined Carrageenan

Karaginan merupakan salah satu jaringan bahan-bahan utama dalam industri makanan. Karaginan adalah bahan alami, yang sering diaplikasikan sebagai makanan. Karaginan adalah nama umum dari famili polisakarida, yang dihasilkan dengan cara ekstraksi dari beberapa spesies rumput laut merah (*Rhodophyta*) (Van de Velde and De Ruiter, 2002).

Selama beberapa tahun terakhir, jumlah pemasaran karaginan mengalami peningkatan sebesar 3% per tahun dan jumlah penjualan yang meliputi seluruh dunia sebesar US\$ 310 milyar pada tahun 2000. Sektor produksi susu melaporkan sebagian besar dari aplikasi karaginan didalam produk makanan, seperti kue yang dibekukan, susu coklat, keju lembut, dan krim kocok. sebagai tambahan terhadap ini, karaginan digunakan dalam berbagai produk makanan non-susu, seperti produk siap saji, jeli, pakan ternak, saus, dan produk non-pangan, seperti formulasi farmasi, kosmetik dan pengeboran cairan minyak yang baik (Van De Velde and De Ruiter, 2002). Karaginan merupakan senyawa polisakarida yang memiliki kegunaan hampir sama dengan agar-agar, antara lain sebagai bahan pengental, pembuat gel dan juga pengemulsi (Hira dan Eka, 2006).

Karaginan merupakan senyawa hidrokoloid yang terdiri atas ester kalium, natrium, magnesium dan kalium sulfat dengan galaktosa 3,6 anhidrogalaktosa kopolimer. Karaginan adalah suatu bentuk polisakarida linier dengan berat molekul diatas 100 kDa. Karaginan tersusun dari perulangan unit-unit galaktosa dan 3,6-anhidrogalaktosa (3,6-AG). Keduanya baik yang berikatan dengan sulfat atau tidak, dihubungkan dengan ikatan glikosidik -1,3 dan -1,4 secara bergantian.. Karaginan merupakan getah rumput laut yang diperoleh dari hasil ekstraksi rumput laut merah

dengan menggunakan air panas (*hot water*) atau larutan alkali pada temperatur tinggi. Karaginan merupakan nama yang diberikan untuk keluarga polisakarida linear yang diperoleh dari alga merah dan penting untuk pangan (Syamsuar, 2007).

Secara umum karaginan yang ditulis dalam awalan huruf Yunani, menandakan komponen yang utama pada sampel. Tatanama ini digunakan secara luas didalam perdagangan, ilmu pengetahuan, dan perundang-undangan. Namun demikian, sistem ini tidak cocok untuk menggambarkan polimer kompleks secara jelas. Untuk menggambarkan struktur yang lebih kompleks telah diusulkan suatu alternatif tatanama untuk karaginan dan agar-agar. Kode tulisan ini didasarkan pada tatanama IUPAC yang ditemukan dan diterima di seluruh dunia dan mengizinkan uraian sistematis molekul-molekul polimer yang kompleks. Struktur berdasar pada suatu urutan yang sempurna dari residu β -(1,3)-D-galaktosa dan α -(1,4)-3,6-anhidro-D-galaktosa atau residu α -(1,4)-D-galaktosa yang disebut struktur yang ideal. Didasarkan pada tatanama-Knutsen, nama dan kode tulisan pada struktur yang umum, berturut-turut κ , i , dan λ -karaginan adalah karaginan 4'-sulfat (G4S-DA), karaginan 2,4'-disulfat (G4S-DA2S), dan karaginan 2,6,2'-trisulfat (G2S-D2S,6S) (Van De Velde dan De Ruiter, 2002).

Kode tatanama ini mempunyai arti penting dalam publikasi ilmiah yang berhubungan dengan karaginan dan agar-agar. Banyak pengarang menggambarkan struktur kompleks berdasarkan tatanama ini. Ditambahkan lagi notasi (S) untuk sulfat ester, metil eter (M), piruvat asetal (P) dan unit glikosil seperti Xylose (X) diperkenalkan untuk menggambarkan karaginan dengan substituen yang berbeda. Tatanama penulisan karaginan dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Pilihan Kode Tulisan Tatanama Karaginan yang Berbeda

Kode tulisan	Ditemukan dalam karaginan	Nama IUPAC*
G	β	3- β -D-galaktosa
D	-	4- α -D-galaktosa
DA	κ, β	4-3,6-anhidro- α -D-galaktosa
S	$\kappa, i, \lambda, \mu, \nu, \Theta$	Ester sulfat (O-SO ₃ ⁻)
G2S	λ, Θ	3- β -D-galaktosa 2-sulfat
G4S	κ, i, μ, ν	3- β -D-galaktosa 4-sulfat
DA2S	i, Θ	4-3,6-anhidro- α -D-galaktosa 2-sulfat
D2S,6S	λ, ν	4- α -D-galaktosa 2,6-disulfat
D6S	μ	4- α -D-galaktosa 6 sulfat

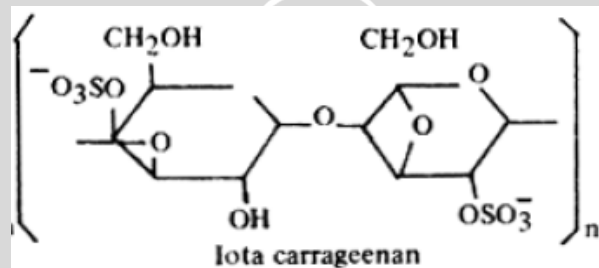
Sumber: (Van De Velde and De Ruiter, 2002)

Karaginan, biasanya diproduksi dalam bentuk garam Na, K, Ca. Pemakaian karaginan diperkirakan 80% digunakan di bidang industri makanan, farmasi dan kosmetik. Pada industri makanan sebagai stabilizer, thickener, gelling agent, additive atau komponen tambahan dalam pembuatan coklat, milk, pudding, instant milk, makanan kaleng dan bakery (Istini dkk., 2008).

Berbagai produk karaginan yang terdapat di pasar antara lain adalah: 1). karaginan murni (refined carrageenan) dalam bentuk kappa, iota, dan lambda, 2). kombinasi karaginan murni, 3). kombinasi karaginan murni dan garam, gula atau bahan lain, 4). karaginan semi-murni (*semi refined carrageenan*), 5). kombinasi karaginan murni dan karagenan semi-murni, 6). kombinasi karaginan semi murni dan garam, gula atau bahan lain, 7). kombinasi karaginan murni, karagenan semi-murni dan garam, gula atau bahan lain (Anggraini, 2004). Berdasarkan struktur pendulangan unit polisakarida, karaginan dapat dibagi menjadi tiga fraksi utama yaitu k-(Kappa), λ -(Lambda), dan *i*-(Iota) karaginan. Secara prinsip, fraksi-fraksi karaginan ini berbeda dalam nomor dan posisi grup ester (Anggraini, 2004).

2.2.1 Iota Karaginan

Iota karaginan dihasilkan dari rumput laut jenis *Eucheuma spinosum*. Iota karaginan ditandai dengan adanya 4-sulfat ester pada setiap residu D-glukosa dan gugusan 2-sulfat ester pada setiap gugusan 3,6-anhidro-D-galaktosa. Gugusan 2-sulfat ester tidak dapat dihilangkan oleh proses pemberian alkali seperti kappa karaginan. Iota karaginan sering mengandung beberapa gugusan 6-sulfat ester yang menyebabkan kurangnya keseragaman molekul yang dapat dihilangkan dengan pemberian alkali (Winarno, 1996). Struktur kimia *i*-(Iota) karaginan dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. struktur kimia *i*-(Iota) karaginan

2.2.2 Sifat-sifat iota karaginan

Sifat-sifat karaginan meliputi sifat fisik dan kimiawi. Sifat fisik karaginan meliputi viskositas dan pembentukan gel. Sedangkan sifat kimiawi adalah kelarutan dan stabilitas (Suryaningrum, 1998).

a. Kelarutan

kelarutan karaginan dalam air dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu suhu, adanya ion, senyawa organik yang larut dalam air, garam dan tipe ion (suryaningrum, 1998). Daya kelarutan iota karaginan pada berbagai media pelarut dapat dilihat pada tabel 2 berikut.

Tabel 2. Daya kelarutan iota karaginan pada berbagai media pelarut

Medium	Iota
Air Panas	Larut di atas suhu 60°C
Air dingin	Jika mengandung garam Na larut, garam Ca memberi dispersi <i>thixotropic</i>
Susu panas	Larut di atas suhu 60°C
Susu dingin	Tidak larut
Larutan gula pekat	Larut, tapi sukar
Larutan garam pekat	Tidak larut

Sumber : Winarno (1996)

b. Viskositas

Viskositas karaginan dipengaruhi oleh konsentrasi, temperatur, jenis karaginan, berat molekul dan adanya molekul lain. Jika konsentrasi karaginan meningkat maka viskositas akan meningkat secara logaritmik. Viskositas akan menurun secara progresif dengan adanya peningkatan suhu. Perubahan tersebut bersifat reversible apabila pemanasan dilakukan pada kondisi optimum yaitu pada pH 9 dengan pemanasan yang tidak terlalu lama (Porto, 2003).

c. Pembentukan gel

karaginan memiliki kemampuan membentuk gel pada saat larutan panas menjadi dingin. Proses pembentukan gel bersifat *thermo-reversible*, artinya gel dapat mencair pada saat pemanasan dan membentuk gel kembali saat pendinginan. Mekanisme pembentukan gel karaginan yaitu struktur polimer karaginan pada suhu di atas titik cairnya berbentuk gulungan-gulungan yang menyebar secara acak. Pada saat didinginkan, suatu matrik polimer tiga dimensi terbentuk dengan pilinan (*double helix*) dari setiap ujungnya rantai polimernya. Tahap berikutnya menyebabkan berkumpulnya pilinan polimer tiga dimensi tersebut (Porto, 2003).

Kondisi gel pada karaginan dapat bervariasi dari keras, rapuh, lunak dan elastis. Hal ini dipengaruhi oleh sifatnya, konsentrasi, tipe ion yang ada (Suryaningrum, 1998). Selain itu pembentukan gel juga dipengaruhi oleh sensitifitas terhadap garam, yaitu:

Iota : $\text{Na}^+ \ll \text{K}^+ \ll \text{Ca}^{2+}$

Kappa : $\text{Na}^+ \ll \text{Ca}^{2+} \ll \text{K}$

Tabel 3. Karakteristik gel iota karaginan

Karakteristik	Iota
Efek kation	Gel lebih kuat dengan ion kalsium
Tipe gel	Elastis
Stabilitas freezing thawing	stabil

Sumber : Uju (2005)

d. Stabilitas

karaginan dalam larutan memiliki stabilitas maksimum pada pH 9 dan tidak boleh berada pada pH di bawah 3,5 karena akan terhidrolisis. Pada pH 6 atau lebih umumnya larutan karaginan dapat mempertahankan kondisi proses. Hidrolisis asam akan terjadi jika karaginan berada dalam bentuk larutan, hidrolisis akan meningkat sesuai dengan peningkatan suhu. Larutan karaginan akan menurun viskositasnya jika pHnya diturunkan di bawah 4,3. stabilitas iota karaginan yang disebabkan oleh pH disajikan pada

Tabel 4.

Tabel 4. Stabilitas iota karaginan pada pH alkali dan asam

Stabilitas	Iota
Pada pH netral dan alkali	Stabil
Pada pH asam	Terhidrolisis dalam larutan. Stabil dalam bentuk gel

Sumber : Uju (2005)

Selain itu ada juga sifat-sifat umum karaginan antara lain seperti disajikan pada tabel 5 berikut ini.

Tabel 5 Sifat-sifat umum karaginan

Sifat umum	Spesifikasi
Melting point	50 – 70°C
Setting point	30 – 50°C
Viskositas (air; 1,5% sol pada 75°C)	30 -300 cps
Gel strength (air; 1,5% sol; 0,2 KCl; 20 °C)	500 – 1200 g/cm ²
(air; 1,5% sol; 20 °C)	100 - 350 g/cm ²
(susu; 0,5% sol; 20 °C)	500 – 2000 g/cm ²
Kadar air	Maks 18%
Kadar abu	Maks 15%

Sumber : Porto (2003).

Salah satu cara untuk menunjukkan perbedaan karaginan dan tipenya yaitu dengan spektroskopi inframerah, dimana akan ditunjukkan gugus fungsi karaginan serta intensitas serapan pada panjang gelombang tertentu. Intensitas serapan ikatan glikosidik dan ester sulfat, sangat kuat pada ketiga tipe karaginan. Intensitas serapan yang ditunjukkan oleh 3,6-anhidrogalaktosesangat kuat pada karaginan tipe kappa, sedangkan pada iota tidak ada atau sangat lemah, dan pada karaginan tipe lambda sama sekali tidak ada. Intensitas serapan pada 3,6-anhidrogalaktose 2 sulfat pada karaginan iota sangat kuat, pada kappa tidak ada atau sangat lemah, dan pada lambda sama sekali tidak ada. Pentingnya penentuan tipe ini dalam kaitannya dengan pemanfaatan karaginan dalam berbagai industri. Karena karaginan dengan tipe yang berbeda memberikan sifat-sifat fisika yang berbeda terutama viskositas dan kekuatan gelnya yang pada gilirannya mempengaruhi dalam aplikasinya pada industri makanan, minuman, serta industri lainnya (Satari, 1996). Karakteristik karaginan dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Karakteristik Karaginan

No. Spesifikasi	KMI*	FCC*
1. Logam Berat	- Sebagai Pb - Tidak lebih dari 40 mg/kg	- Sebagai Pb - Tidak lebih dari 0,004%
2. Arsen	Tidak lebih dari 3 mg/kg	Tidak lebih dari 23 ppm
3. Timah Hitam	Tidak lebih dari 10 mg/kg	Tidak lebih dari 10 ppm
4. Abu Total	Tidak lebih dari 35%	Tidak lebih dari 35%
5. Abu tak larut asam	Tidak lebih dari 1%	Tidak lebih dari 1%
6. Sulfat	Tidak kurang dari 20%-40%	18%-40%
7. Susut pengeringan	Tidak lebih dari 12%	Tidak lebih dari 12%
8. Viskositas larutan 1,5%		Tidak kurang dari 5 cps pada 75 ^o C

Sumber: * Kodeks Makanan Indonesia (1979)

** Food Chemical Codex (1978)

2.3 Probiotik

Probiotik berasal dari bahasa Yunani yang berarti “untuk kehidupan“ (for life). disebut juga “bakteri bersahabat“, “bakteri menguntungkan“, “bakteri baik“ atau “bakteri sehat“. Apabila didefinisikan secara lengkap, probiotik merupakan mikroba hidup yang dapat membantu sistem pencernaan pada manusia, bersaing dengan bakteri patogen, serta meningkatkan keseimbangan flora dalam usus (Martha *et al.*, 2001).

Probiotik juga dapat diartikan sebagai makanan suplemen yang mengandung mikroba hidup. Yang dikenal paling baik adalah golongan Bakteri Asam Laktat (BAL) dan Bifidobacterium yang digunakan secara luas pada produk yoghurt dan juga produk susu lainnya. Organisme (bakteri probiotik) ini bersifat non-patogenik dan non-toksigenik, mempertahankan kelangsungan hidup selama penyimpanan, dan bertahan hidup saat melintasi perut dan usus kecil (MacFarlane *et al.*, 1999). Sedang menurut

Salminen *et al* (1998), probiotik didefinisikan sebagai bakteri baik yang tinggal dalam bahan makanan yang dapat memberikan keuntungan bagi kesehatan manusia.

Bakteri Asam Laktat sangat berperan dalam membantu proses pencernaan kita. BAL mampu memproses karbohidrat dalam susu yang disebut laktosa menjadi asam laktat. Mereka secara natural ada didalam susu (murni) dan secara luas digunakan sebagai kultur starter dalam produksi berbagai macam produk olahan fermentasi susu. Cara kerja dari bakteri ini adalah dengan membantu menurunkan derajat keasaman dan menghambat pertumbuhan organisme pengganggu dalam sistem pencernaan (Anonymous, 2006^b).

Istilah BAL mulanya hanya ditujukan untuk sekelompok bakteri yang menghasilkan keasaman pada susu (*Milk souring organism*). Secara umum BAL didefinisikan sebagai suatu kelompok bakteri gram positif, tidak menghasilkan spora, berbentuk bulat atau batang yang memproduksi asam laktat sebagai produk akhir metabolik utama selama fermentasi karbohidrat. BAL dikelompokkan ke dalam beberapa genus diantaranya *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, dan *Pediococcus* (Pato, 2003). Diantara genus dan spesies BAL yang dapat dijadikan probiotik adalah seperti tampak pada tabel 7.

Tabel 7. Bakteri Asam Laktat yang Digunakan Sebagai Probiotik

Genus	Spesies
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. cellobiosus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. lactis</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>S. alivarius subsp. thermophilus</i> , <i>S. intermedius</i>
<i>Leuconostoc</i>	-
<i>Pediococcus</i>	-

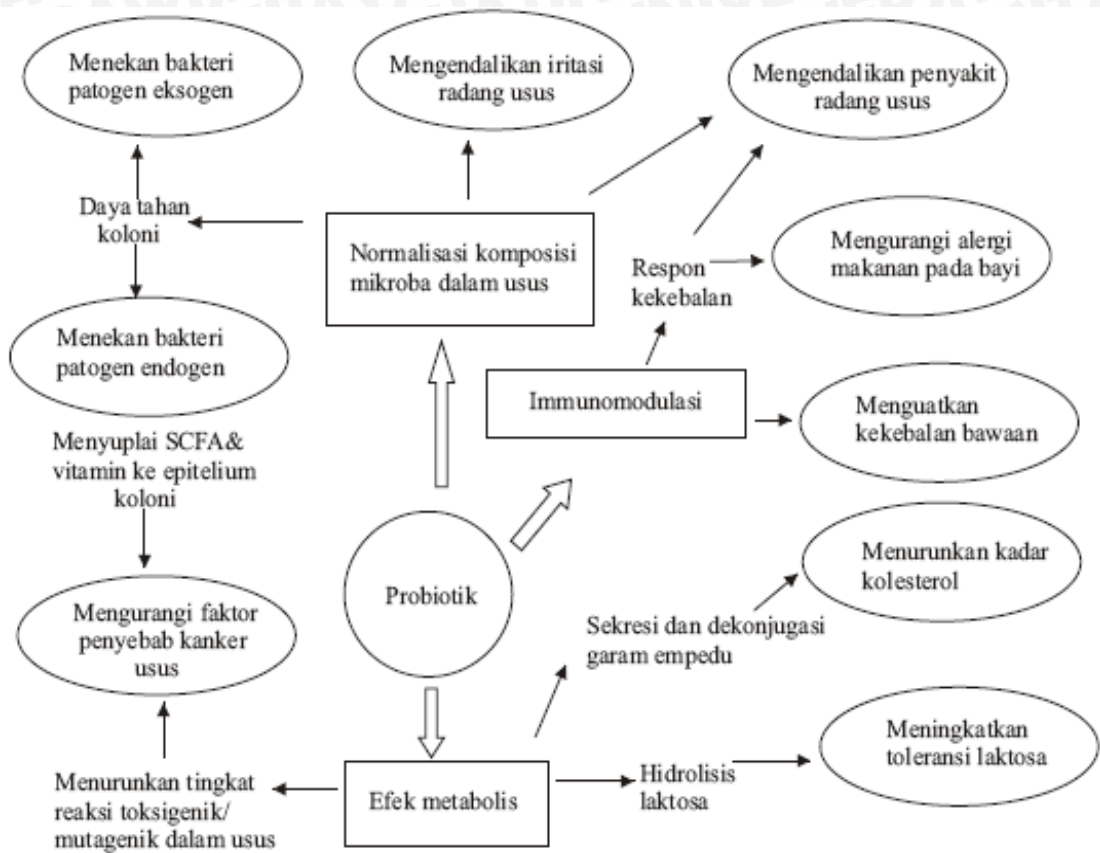
Sumber: Pato (2003).

Probiotik telah disarankan sebagai terapi alternatif untuk perawatan infeksi usus ataupun pencegahan diare. Agen bioterapi ini menyiapkan mikroorganisme bersifat nonpatogenis yang diketahui memiliki efek menguntungkan pada ekosistem usus dan memberikan daya tahan pada infeksi seperti yang pernah ditunjukkan pada uji klinis terhadap hewan percobaan (Lima *et al.*, 1999).

Probiotik memiliki beberapa manfaat bagi manusia antara lain mengurangi efek intoleransi pada laktosa, mencegah dan merawat infeksi diare, meningkatkan respon kekebalan tubuh untuk mencegah serangan penyakit alergi dan potensi mengatur penyakit radang usus (Desmond *et al.*, 2002).

Beberapa manfaat probiotik adalah: 1). mencegah kanker yaitu dapat menghilangkan bahan prokarsinogen dari tubuh dan mengaktifkan sistem kekebalan tubuh, 2). bahan aktif anti tumor dan berfungsi sebagai anti oksidan, 3). didalam usus manusia, mampu memproduksi berbagai vitamin yang secara mudah akan terserap kedalam tubuh, 4). kemampuannya memproduksi asam laktat dan asam asetat di usus akan menyebabkan usus menjadi asam dan akhirnya menekan pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *Clostridium perfringens* penyebab radang usus, disamping itu juga menekan bakteri patogen lainnya, 5). asam-asam tersebut juga mengurangi penyerapan amonia

dan amina karena bila terserap dalam jumlah besar akan dapat meningkatkan tekanan darah, kolesterol dan kanker yang disebabkan nitrosamin (Anonymous, 2008^e). Berbagai manfaat probiotik terhadap kesehatan manusia seperti pada gambar 3 di bawah ini.



Gambar 3. Berbagai manfaat dari probiotik (Parves *et al.*, 2006)

Probiotik harus memenuhi beberapa kriteria: 1). memberikan efek yang menguntungkan pada inang, 2). tidak patogenik dan tidak toksik, 3). mengandung sejumlah besar sel hidup, 4). mampu bertahan dan melakukan kegiatan metabolisme dalam usus, 5). tetap hidup selama dalam penyimpanan dan waktu digunakan, 6). mempunyai sifat sensori yang baik, 7). diisolasi dari sel inang (Fuller, 1991).

Prinsip kerja dari probiotik adalah bakteri-bakteri probiotik (*Lactobacillus* dan *Bifidobacterium*) bekerja secara anaerob menghasilkan asam laktat mengakibatkan turunnya pH saluran pencernaan yang menghalangi perkembangan dan pertumbuhan

bakteri-bakteri patogen, bakteri probiotik ini mendiami mukosa pencernaan yang juga berakibat perubahan komposisi dari bakteri yang terdapat dalam saluran pencernaan (Samadi, 2008). Beberapa spesies dari genus *Lactobacillus* yang digunakan sebagai probiotik untuk manusia dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Spesies *Lactobacllus* yang digunakan sebagai probiotik untuk manusia

Spesies Obligat homofermentatif	Spesies Fakultatif heterofermentatif	Spesies Obligat heterofermentatif
<i>L. acidophilus</i> <i>L. crispatus</i> <i>L. amylovarus</i> <i>L. gallinarum</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. delbrueckii ssp bulgaricus</i> <i>L. salivarius ssp salivarius</i>	<i>L. casei</i> <i>L. paracasei ssp paracasei</i> <i>L. paracasei ssp tolerans</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. fermentum</i> <i>L. reuteri</i>

Sumber: Mosilhey (2003).

Lactobacillus acidophilus adalah satu dari beberapa bakteri probiotik dari genus *lactobacillus*. Bakteri ini mempunyai panjang antara 0,6 – 0,9 μm , tidak berflagela, tidak berspora serta tidak toleran terhadap garam. Bakteri ini mampu tumbuh pada lingkungan yang lebih asam daripada bakteri lainnya (pH 4-5 atau kurang) dan suhu optimal untuk hidup adalah 45°C. Banyak ditemukan pada saluran usus manusia ataupun hewan, vagina dan juga mulut. Seperti kebanyakan (tetapi tidak semuanya) bakteri asam laktat lainnya, *L acidophilus* mampu mengubah laktosa menjadi asam laktat. Seperti spesies terkait lainnya (yang dikenal sebagai heterofermentatif) memproduksi etanol, karbondioksida, dan juga asam asetat juga melalui cara yang sama. *L acidophilus* sendiri (bakteri homofermentatif) hanya memproduksi asam laktat. Bakteri ini bisa mati karena

pengaruh panas yang berlebih, kelembaban dan juga sengatan sinar matahari langsung (Anonymous, 2008^d). Morfologi *Lactobacillus acidophilus* dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. *Lactobacillus acidophilus* (Anonymous, 2008^e).

Lactobacillus acidophilus adalah satu dari beberapa bakteri probiotik dari genus *lactobacillus*. *Lactobacillus acidophilus* berasal dari bahasa latin *Lacto* yang berarti susu, *bacillus* yang berarti bentuk batang, sedangkan *acidophilus* berarti suka asam.

Klasifikasi *Lactobacillus acidophilus* :

Kingdom : Bacteria
Divisi : Firmicutes
Kelas : Bacilli
Ordo : Lactobacillales
Family : Lactobacillaceae
Genus : *Lactobacillus*
Species : ***Lactobacillus acidophilus***

(Anonymous, 2008^d).

Lactobacillus acidophilus adalah salah satu spesies yang ditemukan dalam saluran pencernaan hewan dan manusia. Ketika diberikan dalam jumlah yang cukup, sebagai probiotik, *Lactobacillus acidophilus* dipercaya mampu menciptakan keseimbangan yang sehat antara mikroba menguntungkan dan yang berpotensi merugikan di dalam usus. Potensi probiotik ini telah menunjukkan kemampuannya tahan pada proses pencernaan dalam saluran pencernaan dan resistan pada empedu. Lebih jauh

lagi, penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa *L acidophilus* mampu menurunkan tingkat kolesterol (Kos *et al.*, 2003).

Beberapa strain *Lactobacillus acidophilus* mungkin cocok disebut sebagai probiotik atau bakteri yang bersahabat. Jenis bakteri ini mendiami saluran usus dan vagina untuk melawan bakteri yang tidak menyehatkan. Pemecahan nutrisi oleh *L acidophilus* menjadi asam laktat dan hidrogen peroksida serta zat lain yang membuat lingkungan sekitarnya menjadi tidak cocok bagi organisme lain. *L acidophilus* juga merebut nutrisi mikroorganisme lain di dalam usus, dengan begitu akan mengakibatkan bakteri lain akan kalah bersaing di dalam saluran usus. Selama pencernaan, *L acidophilus* juga membantu memproduksi niasin, asam folat, dan piridoksin selain itu juga membantu dalam dekonjugasi empedu, memisahkan asam amino dari asam empedu yang kemudian bisa digunakan kembali oleh tubuh (Anonymous, 2008^d).

2.4 Mikroenkapsulasi

Mikroenkapsulasi didefinisikan sebagai teknologi pengemasan bahan padat, cair ataupun gas dalam ukuran mikro, yang dikemas dalam kapsul yang bisa melepaskan isi pada kondisi spesifik yang terkontrol (Anal and Singh, 2007). Menurut King (1995) mikroenkapsulasi dapat digambarkan sebagai proses tentang pembentukan suatu bahan penyalut secara berkelanjutan, lapisan tipis di sekitar bahan enkapsulan (partikel-partikel padat, cair dan juga sel-sel gas) yang secara keseluruhan dimasukkan ke dalam dinding kapsul sebagai suatu inti dari suatu bahan yang dienkapsulasi.

Mikroenkapsulasi dilakukan sebagai suatu metode untuk membungkus partikel-partikel individu yang sangat kecil di dalam lapisan pelindung, yang dirancang untuk melindungi, memisahkan, membantu dalam penyimpanan, menangani atau mengatur

pelepasan bahan aktif (Mayya *et al.*, 2003). Manfaat lain proses mikroenkapsulasi adalah melindungi bahan inti yang tidak stabil, sensitif terhadap lingkungan; meningkatkan daya tahan dengan cara mencegah reaksi degradasi (Ghosh, 2006). Dalam mikroenkapsulasi ini dibagi menjadi tiga konteks yaitu inti, kulit, dan teknik enkapsulasi.

2.4.1 Bahan Inti

Mikrokapsul bisa dibagi menjadi dua bagian utama yaitu inti dan kulit. Inti (bagian dalam) yang berisi bahan aktif. Bahan-bahan dalam inti mungkin bisa dalam bentuk padat, cair, dan gas. Bahan inti paling sering digunakan dalam bentuk sol, dispersi ataupun emulsi. Kecocokan bahan inti dan kulit adalah suatu hal yang penting untuk meningkatkan efisiensi proses mikroenkapsulasi dan perlakuan pendahuluan dari bahan inti adalah sering kali dilaksanakan untuk memperbaiki kecocokan seperti itu. Ukuran dari bahan inti juga memegang peran penting untuk difusi, permeabilitas, dan juga aplikasi yang terkontrol. Bergantung pada aplikasi, bahan inti yang berbeda bisa dienkapsulasi, termasuk pigmen, warna, monomer-monomer, katalisator-katalisator, dan juga nano partikel (Ghosh, 2006).

2.4.2 Enkapsulat

Kulit (bagian luar)/enkapsulat merupakan bahan yang melindungi bagian inti dalam waktu lama ataupun singkat dari pengaruh luar. Kelimpahan bahan alami maupun polimer buatan manusia, menyediakan ruang lingkup yang luas dalam pemilihan bahan kulit, yang mungkin bisa dibuat permeable, semi permeable, dan impermeable. Permeable biasanya digunakan untuk aplikasi, kapsul semi permeable biasanya tidak tembus terhadap bahan inti tetapi dapat menyerap cairan dengan berat molekul rendah.

Jadi kapsul ini dapat digunakan untuk menyerap substansi dari lingkungan dan melepaskannya kembali ketika dibawa ke medium lain. Kulit yang impermeabel melindungi inti dari lingkungan luar. Karena itu untuk melepaskan kembali bahan inti, kulit harus dipecah oleh tekanan dari luar, dilelehkan, dikeringkan, dihancurkan pada pelarut atau didegradasi dengan menggunakan pengaruh cahaya (Ghosh, 2006).

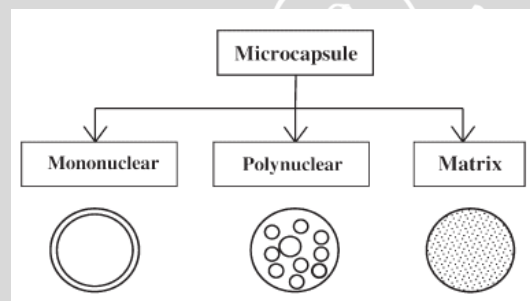
Enkapsulat yang dipilih dalam proses mikroenkapsulasi haruslah dapat memberikan suatu lapisan tipis yang kohesif dengan inti, tercampur secara kimia dan tidak bereaksi dengan inti, serta mempunyai sifat yang sesuai dengan tujuan penyalutan (kuat, fleksibel, *impermeable*, stabil dan bersifat optis) (Lachman *et al.*, 1994).

Enkapsulat yang ideal haruslah mempunyai sifat, sebagai berikut: 1). mempunyai sifat reologi yang bagus pada konsentrasi tinggi, 2). berkemampuan mendispersi atau mengemulsi bahan inti dan menstabilkan emulsi yang dihasilkan, 3). tidak reaktif terhadap bahan inti selama proses atau penyimpanan, 4). dapat menyaluti bahan inti dalam strukturnya selama proses atau penyimpanan, 5). mampu melepaskan pelarut atau bahan lainnya secara sempurna yang digunakan dalam proses mikroenkapsulasi, 6). mampu melindungi bahan inti dari faktor lingkungan, 7). larutan dalam pelarut yang diterima pada industri pangan (misal: air, etanol, dsb), 8). polimer yang tidak reaktif dengan bahan inti, 9). mampu melarutkan bahan inti dan melepaskannya, dan 10). murah (Mosilhey, 2003).

Bahan pengenkapsulat dapat menggunakan kekayaan polimer alami yang dapat diaplikasikan seperti : gum Arab, selulosa, agar, kitosan, gelatin, karaginan (κ -karaginan, ι -karaginan, λ -karaginan) (King, 1995). Sedang menurut Kondo (1979), bahan yang biasa digunakan sebagai enkapsulat adalah polimer organik atau non-organik baik

berasal dari bahan alam maupun buatan. Enkapsulat yang digunakan pada bahan pangan kebanyakan berasal dari bahan alami atau turunannya dan FDA telah memasukkannya sebagai GRAS (*Generally Recognized As Safe*).

Morfologi mikro kapsul bergantung pada bahan inti dan proses deposisi kulit. Berdasarkan morfologinya bisa diklasifikasikan sebagai mononuklear, polinuklear, dan tipe matriks. Mononuklear (inti-kulit) berarti posisi kulit disekitar inti, polinuklear berarti ada banyak inti di dalam sebuah kulit. Pada tipe matriks, bahan inti didistribusikan secara homogen di dalam inti (Ghosh, 2006). Gambar morfologi mikro kapsul dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Morfologi mikro kapsul

2.4.3 Teknik Enkapsulasi

Pada umumnya teknik mikroenkapsulasi probiotik dapat dibagi menjadi dua bagian yaitu mikroenkapsulasi probiotik dalam larutan mikroenkapsulat disebut sebagai teknik cair, dan yang kedua adalah pengeringan larutan enkapsulan dengan tujuan untuk mendapatkan bentuk granula atau tepung yang disebut dengan teknik kering. Beberapa proses penting yang digunakan pada proses mikroenkapsulasi dapat dilihat pada tabel 10.

Tabel 9. Teknik Mikroenkapsulasi

Teknik kering	Teknik cair
<ul style="list-style-type: none"> • Spray drying • Freeze drying • Fluided bed drying 	<ul style="list-style-type: none"> • Coacervation • Emulsi • extrusi

Sumber: King (1995)

Prinsip proses mikroenkapsulasi menurut Kondo (1979) ada empat yaitu: 1). Pendispersian bahan inti kedalam medium mikroenkapsulasi, 2) Pencampuran bahan penyalut dengan dispersi bahan inti, 3) Penggabungan, pendepositan dan penyalutan bahan penyalut pada bahan inti, 4) Penstabilan mekanis dengan perlakuan kimia tau fisik.

Menurut Lin *et al.* (1995) terdapat beberapa teknik mikroenkapsulasi yang dapat digunakan yaitu pengeringan semprot (*Spray-drying*), pendinginan semprot (*Spray-chilling*), akstruksi, dan koaservasi. Sedangkan menurut Risch dan Reineccius (1995), menyatakan bahwa teknik mikroenkapsulasi secara fisik yang paling banyak digunakan adalah teknik pengeringan (*Spray drying*) dan teknik cairan (*coaservation*). Namun berdasar pada kesederhanaan teknik, ketersediaan alat, mutu mikroenkapsulat yang dihasilkan serta biaya, khususnya pada bahan pangan, maka teknik *spray drying* lebih banyak digunakan (Dziezak, 1988; Kroschwitz, 1990).

King (1995) membagi enkapsulat berdasar ukuran partikel yang dienkapsulasi menjadi tiga, yaitu makroenkapsulat (> 5000 μm), mikroenkapsulat (0,2 μm -5000 μm) dan nanomikroenkapsulat (<0,2 μm). Sementara itu struktur mikroenkapsulat dapat berupa *globula*, *sferis*, *flokulen* (gumpalan padat), atau seperti ginjal (Pothakamury dan

Canovas, 1995). Berdasarkan sebaran bahan intinya dapat terbagi menjadi dua: bahan inti yang terkonsentrasi pada bagian inti mikroenkapsulat dan yang menyebar merata pada dinding mikroenkapsulat (Re, 1998).



3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Materi penelitian

3.1.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan karaginan, antara lain: *Eucheuma spinosum*, air, aquades, kalsium hidroksida ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) 6%, HCl 0,2 N, Kalium klorida (KCl) 1,5%, Koran, kertas saring, kertas lakmus, Bahan yang digunakan sebagai bahan inti mikroenkapsulasi yaitu *Lactobacillus acidophilus*. Bahan-bahan yang digunakan dalam proses pembuatan mikroenkapsulasi adalah kultur bakteri *Lactobacillus acidophilus*, tepung karaginan, NaCl 0,9%, aquades, minyak nabati, tween 80, dan KCL 3 M.

3.1.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan karaginan, antara lain baskom, *beaker glass* 1000 ml, timbangan digital, blender, labu hisap, *waterbath*, spatula, gelas ukur 1000 ml dan 100 ml, kain saring dan loyang. Alat yang digunakan dalam proses mikroenkapsulasi adalah *beaker glass*, *stirrer hotplate*, *falcon*, *sentrifuge*, erlenmeyer, rak tabung reaksi, gelas ukur, pipet volume, pipet serologis, autoklaf, tali, dan timbangan analitik, termometer.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen adalah metode penelitian dengan teknik pengambilan data observasi langsung pada kondisi buatan dengan tujuan melihat suatu hasil yang menggambarkan sebab akibat dari variabel yang diteliti (Nawawi, 1983). Studi eksperimen bertujuan untuk menguji hipotesa tentang adanya hubungan antar variabel dan sebab akibat.

Persoalan dirumuskan dengan jelas dalam bentuk hipotesis dan percobaan yang dilakukan dengan uji hipotesa tersebut (Marzuki, 1977).

3.2.1 Variabel Penelitian

Menurut Surachmad (1994), ada 2 macam variabel dalam penelitian, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas adalah variabel yang diselidiki pengaruhnya, sedangkan variabel terikat adalah variabel yang diperkirakan akan timbul sebagai pengaruh dari variabel bebas. Variabel bebas dan terikat dalam penelitian ini adalah:

- variabel bebas : pH 2 dan 7
- variabel terikat : *Viabilitas Lactobacillus acidophilus* dan struktur mikroenkapsulat

3.2.2 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan dalam penelitian ini terbagi menjadi dua tahap yaitu tahap pertama untuk mendapatkan sifat fisiko kimia *refined carrageenan* dan untuk mengetahui konsentrasi terbaik *Refined Carrageenan* sebagai pengenkapsulat yang dirancang secara acak lengkap dan tahap kedua untuk mengetahui viabilitas *Lactobacillus acidophilus* pada perlakuan pH 2 dan 7.

3.3 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi 2 tahap, yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama.

3.3.1 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan ini adalah untuk mendapatkan karakteristik fisiko kimia *Refined Carrageenan* (RC) dari *Eucheuma spinosum* dan untuk mengetahui konsentrasi *Refined Carrageenan* sebagai pengenkapsulat Parameter uji dalam penelitian pendahuluan tahap pertama meliputi analisa fisiko kimia *Refined carrageenan*

Eucheuma spinosum seperti kadar air, kadar abu, total Pb, total sulfat, viskositas, *gelling point*, *melting point*, kekuatan gel, dan FTIR (*Fourier Transform Infra Red*). Sedangkan parameter uji untuk penelitian pendahuluan tahap kedua adalah uji viabilitas *Lactobacillus acidophilus*. Rancangan percobaan penelitian pendahuluan tahap kedua dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Perlakuan konsentrasi *refined carrageenan* yang berbeda

Konsentrasi	Ulangan		
	A (4%)	A1	A2
B (4,5%)	B1	B2	B3
C (5%)	C1	C2	C3

3.3.2 Penelitian Utama

Penelitian utama adalah tentang studi perbandingan viabilitas *Lactobacillus acidophilus* dan struktur mikroenkapsulat dari konsentrasi terbaik pada pH 2 dan 7. Rancangan percobaan penelitian tahap kedua dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Perlakuan pH 2 dan 7

pH	Ulangan		
	A (pH 2)	a1	a2
B (pH 7)	b1	b2	b3

Parameter uji penelitian utama yaitu viabilitas *Lactobacillus acidophilus* dan struktur mikroenkapsulat pada pH 2 dan 7, kemudian data hasil pengamatan diolah dengan uji t dan uji struktur mikrokapsul dengan menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM).

Data hasil pengamatan diolah dengan uji t yaitu menguji perbedaan dua perlakuan/populasi. Pada dasarnya uji t adalah membedakan antara t hitung dengan t tabel .

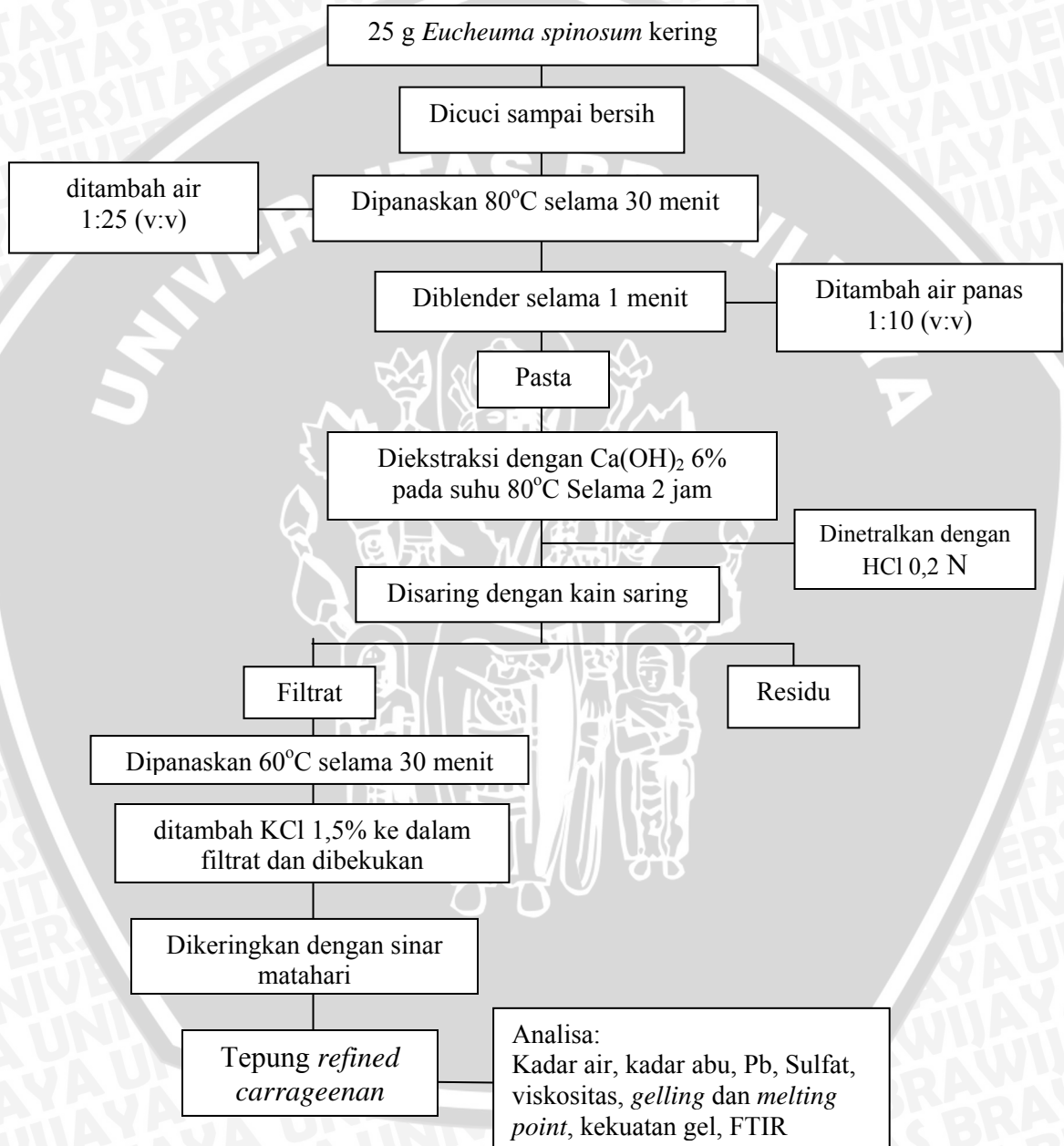
- jika tingkat t hitung $>$ t tabel 5% tetapi lebih kecil dari t tabel 1% maka perbedaan tersebut dikatakan nyata, artinya 95% dari perbedaan yang terjadi memang benar.
- jika tingkat t hitung $>$ t tabel 1% maka perbedaan tersebut dikatakan sangat nyata, artinya 99% dari perbedaan yang terjadi memang benar.
- jika tingkat t hitung $<$ t tabel 5% maka perbedaan tersebut dikatakan tidak beda nyata.



3.4 Prosedur Kerja

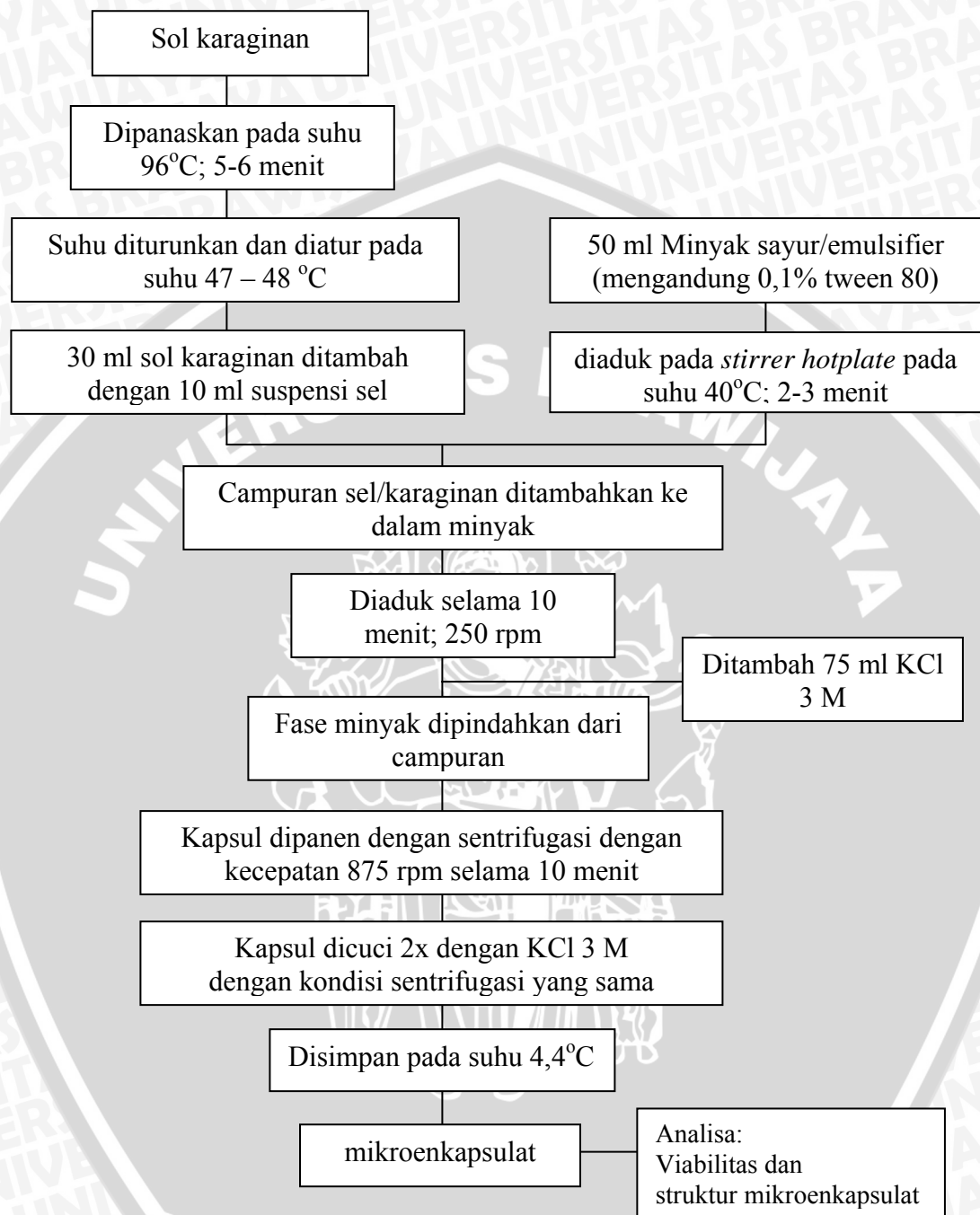
Langkah-langkah pembuatan *Refined carrageenan* dari *Eucheuma spinosum* dan mikroenkapsulat *Lactobacillus acidophilus* adalah sebagai berikut:

3.4.1 Pembuatan *Refined Carrageenan*



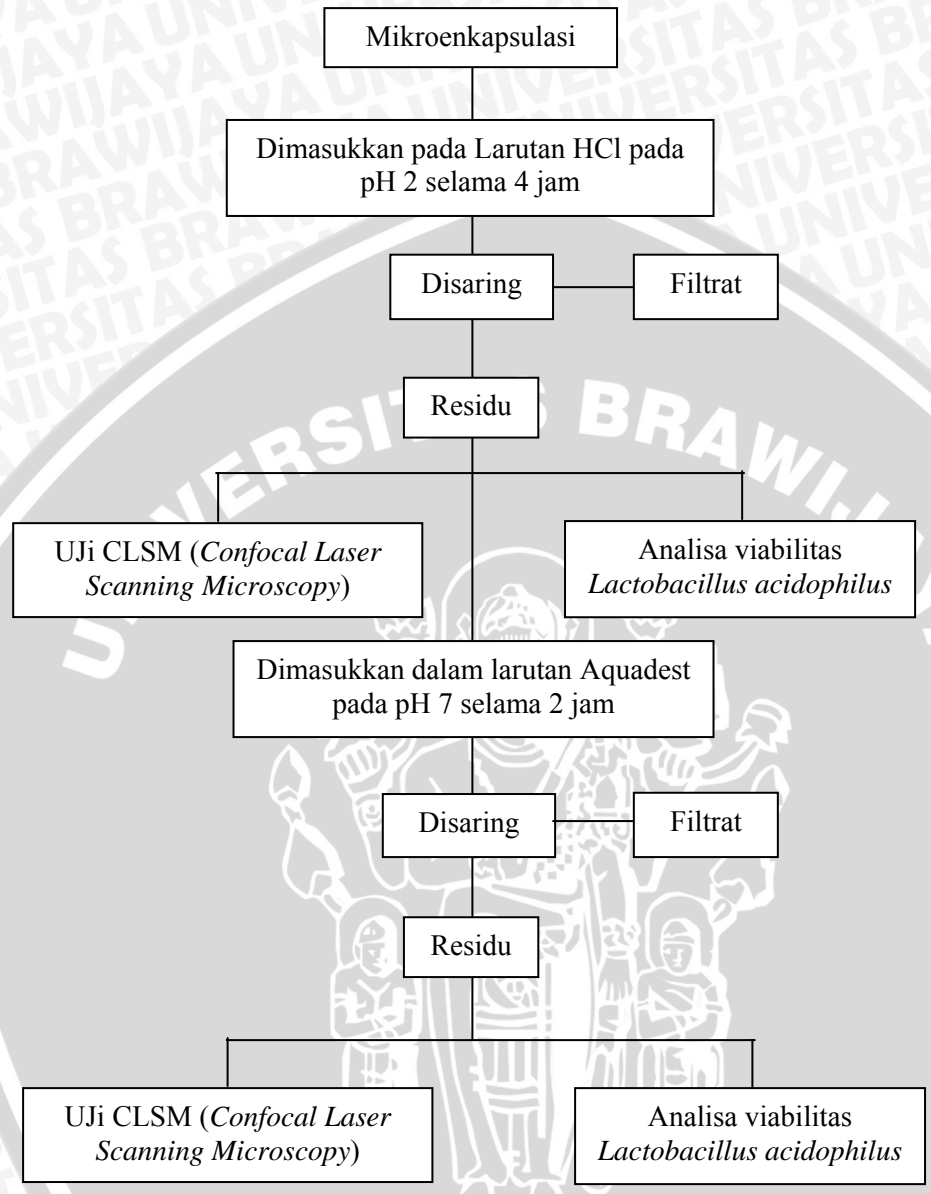
Gambar 6. Prosedur pembuatan *refined carrageenan*
 Sumber : Modifikasi penelitian, Sindha Kurniasari (2006)

3.4.2 Mikroenkapsulasi *Lactobacillus acidophilus*



Gambar 7. Mikroenkapsulasi *Lactobacillus acidophilus*
Sumber : Adhikari *et al* (2003)

3.4.3 Uji Struktur Mikroenkapsulasi dan Viabilitas *Lactobacillus acidophilus*



Gambar 8. Uji Struktur Mikroenkapsulat dan Viabilitas *Lactobacillus acidophilus*

3.5 Parameter Uji

3.5.1 Kadar Abu (AOAC, 1995)

Penentuan kadar abu didasarkan menimbang sisa mineral sebagai hasil pembakaran bahan organik pada suhu sekitar 550 °C. Cawan porselin dikeringkan di dalam oven selama satu jam pada suhu 105 °C, lalu didinginkan selama 30 menit di dalam desikator dan ditimbang hingga didapatkan berat tetap (A). Ditimbang contoh sebanyak 2 g (B), dimasukkan kedalam cawan porselin dan dipijarkan di atas nyala api pembakar bunsen hingga tidak berasap lagi. Setelah itu dimasukkan kedalam tanur listrik (*furnace*) dengan suhu 650 °C selama ± 12 jam. Selanjutnya cawan didinginkan selama 30 menit pada desikator, kemudian ditimbang hingga didapatkan berat tetap (C). Kadar abu dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Kadar Abu} = \frac{(A+B)-A}{B} \times 100 \%$$

3.5.2 Kadar Air (AOAC, 1995)

Kadar air bahan adalah jumlah air bebas yang terkandung didalam bahan yang dapat dipisahkan dengan cara fisis seperti penguapan dan destilasi (Sumardi *et al.*, 1992). Kadar air menyatakan jumlah air serta bahan-bahan volatil yang terkandung dalam karaginan. Kadar air suatu produk biasanya ditentukan oleh kondisi pengeringan, pengemasan dan cara penyimpanan. Penentuan kadar air didasarkan pada perbedaan berat contoh sebelum dan sesudah dikeringkan. Cawan porselin yang akan digunakan, dikeringkan terlebih dahulu kira-kira 1 jam pada suhu 105 °C, lalu didinginkan dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang hingga beratnya tetap (A). Contoh ditimbang kira-kira 2 g (B) dalam cawan tersebut, dikeringkan dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama 5 jam atau beratnya tetap. Cawan yang berisi contoh didinginkan di dalam

desikator selama 30 menit lalu ditimbang hingga beratnya tetap (C). Kadar air dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{(A+B)-C}{B} \times 100 \%$$

3.5.3 Logam Berat (AAS) (Apriyantono dkk., 1989)

Prinsip yang digunakan adalah penghilangan bahan-bahan organik dengan pengabuan kering, residu dilarutkan dalam asam encer. Larutan disebarkan dalam nyala api yang ada di dalam alat AAS sehingga absorpsi atau emisi logam dapat dianalisis dan diukur pada panjang gelombang. Kandungan logam berat yang ingin dianalisis adalah Pb, Zn, Cu dan As menggunakan Spektrofotometer Absorpsi Atom (AAS).

Prosedurnya sebanyak 5-6 ml HCl 6 N ditambahkan ke dalam cawan berisi abu, kemudian dipanaskan di atas hot plate (pemanas) dengan pemanasan rendah sampai kering. Setelah itu ditambahkan 15 ml HCl 3 N, lalu cawan dipanaskan di atas pemanas sampai mulai mendidih. Setelah didinginkan dan disaring, filtrat dimasukkan ke dalam labu takar yang sesuai. Diusahakan padatan tertinggal sebanyak mungkin dalam cawan, dan diencerkan dengan air sampai tanda tera. Blanko disiapkan menggunakan pereaksi yang sama. Alat AAS diset sesuai petunjuk dalam manual alat tersebut. Diukur larutan standar logam, blanko dan larutan sampel. Selama penetapan sampel, dilakukan pemeriksaan apakah nilai standar tetap konstan. Kemudian dibuat kurva standar untuk masing-masing logam (nilai absorpsi/emisi vs konsentrasi logam dalam µg/ml).

3.5.4 Kadar Sulfat (BaSO₄) (FMC Corp, 1977)

Kadar sulfat merupakan parameter yang digunakan untuk berbagai jenis polisakarida yang terdapat dalam alga merah (Winarno 1996). Hasil ekstraksi rumput

laut biasa dibedakan berdasarkan kandungan sulfatnya. Agar-agar mengandung sulfat tidak lebih dari 3 - 4 % dan karaginan minimal 18 % (Moirano 1977).

Prinsip yang dipergunakan adalah gugus sulfat yang telah ditimbang dan dihidrolisa diendapkan sebagai $BaSO_4$. Contoh ditimbang sebanyak 1 g dan dimasukkan ke dalam labu erlemeyer yang ditambahkan 50 ml HCl 0,2 N kemudian direfluks sampai mendidih selama 6 jam sampai larutan menjadi jernih. Larutan ini dipindahkan ke dalam gelas piala dan dipanaskan sampai mendidih. Selanjutnya ditambahkan 10 ml larutan $BaCl_2$ di atas penangas air selama 2 jam. Endapan yang terbentuk disaring dengan kertas saring tak berabu dan dicuci dengan akuades mendidih hingga bebas klorida. Kertas saring dikeringkan ke dalam oven pengering, kemudian diabukan pada suhu $1000^\circ C$ sampai diperoleh abu berwarna putih. Abu didinginkan dalam desikator kemudian ditimbang. Perhitungan kadar sulfat adalah sebagai berikut :

$$\% \text{ Kadar Sulfat} = \frac{\text{Berat endapan } BaSO_4 \times 0,4116}{\text{Berat sampel}} \times 100 \%$$

3.5.5 *Melting Point* (Suryaningrum dan Utomo, 2002)

Sifat-sifat karaginan adalah *thermally reversible*. Proses pemanasan dengan suhu yang lebih tinggi dari suhu pembentukan gel akan menyebabkan polimer karaginan dalam larutan menjadi *random coil* (acak). Jika pemanasan diteruskan, maka gel akan mencair. Proses mencairnya gel tersebut disebut dengan *melting point*.

Penentuan titik leleh bisa dilakukan dengan mempersiapkan larutan karaginan dengan konsentrasi 6,67 % (b/b) dan aquades. Sampel diinkubasi pada suhu $10^\circ C$ selama ± 2 jam. Pengukuran titik leleh dilakukan dengan cara memanaskan gel karaginan dalam *waterbath*. Di atas gel karaginan tersebut diletakkan gotri dan ketika

gotri jatuh ke dasar gel karaginan maka suhu tersebut dinyatakan sebagai titik leleh karaginan (Suryaningrum dan Utomo, 2002).

3.5.6 Gelling Point (Suryaningrum dan Utomo, 2002)

Larutan karaginan dengan konsentrasi 6,67 % (b/b) disiapkan dengan akuades dalam gelas ukur volume 15 ml. Suhu sampel diturunkan secara perlahan-lahan dengan cara menempatkan pada wadah yang telah diberi pecahan es. Titik jendal diukur pada saat larutan karaginan mulai membentuk gel dengan menggunakan termometer digital Hanna.

3.5.7 Gell Strenght (Ariesandy, 2008)

Kekuatan gel merupakan sifat fisik karaginan yang utama, karena kekuatan gel menunjukkan kemampuan karaginan dalam pembentukan gel. Salah satu sifat fisik yang penting pada karaginan adalah kekuatan untuk membentuk gel yang disebut sebagai kekuatan gel. Kekuatan gel sangat penting untuk menentukan perlakuan yang terbaik dalam proses ekstraksi tepung karaginan. Salah satu sifat penting tepung karaginan adalah mampu mengubah cairan menjadi padatan atau mengubah bentuk sol menjadi gel yang bersifat *reversible*. Kemampuan inilah yang menyebabkan tepung karaginan sangat luas penggunaannya, baik dalam bidang pangan maupun farmasi (Glicksman, 1969).

Prosedur penentuan kekuatan gel adalah sebagai berikut, karaginan sebanyak 0,8 gram, KCl 0,08 gram didispersikan ke dalam 39 ml aquadest dan dipanaskan di atas *hotplate* dengan pengadukan secara teratur sampai suhu 80°C. kemudian volume larutan ditetapkan menjadi 50 ml dengan menambahkan aquadest. Selama larutan masih panas, dimasukkan ke dalam cetakan yang berdiameter kira-kira 4 cm dan dibiarkan pada suhu

10°C selama 2 jam. Gel yang terbentuk dalam cetakan dikeluarkan dan siap diukur dengan alat penetrometer.

Prosedur kerja penetrometer adalah sebagai berikut, jarum penetrometer dipasang kemudian sampel diletakan pada tempat sampel. Jarum penetro di atur sampai nol dan waktunya untuk mengukur ditentukan 10 detik lalu tombol penetro ditekan yang ditandai lampu menyala. Setelah lampu penunjuk mati, plunyer penetro ditekan yang berakibat jarum penetro berputar menunjukkan angka pada skala. Semakin kecil angka yang ditunjuk semakin kuat gel tersebut.

Perhitungan kekuatan gel adalah sebagai Berikut :

$$\text{Kekuatan Gel} = \frac{\text{Skala}}{28/10} \text{ mm/gr/detik}$$

3.5.8 Viskositas (FMC Corp, 1977)

Viskositas adalah pernyataan tahanan dari suatu cairan untuk mengalir. Satuan dari viskositas adalah poise (1 poise = 100 cP). Makin tinggi viskositas menandakan makin besarnya tahanan cairan yang bersangkutan. Larutan karaginan dengan konsentrasi 1,5 % dipanaskan dalam bak air mendidih sambil diaduk secara teratur sampai suhu mencapai 75 °C. Viskositas diukur dengan *Viscometer Brookfield*. Spindel terlebih dahulu dipanaskan pada suhu 75 °C kemudian dipasang ke alat ukur *viscometer Brookfield*. Posisi spindel dalam larutan panas diatur sampai tepat, viskometer dihidupkan dan suhu larutan diukur. Ketika suhu larutan mencapai 75 °C dan nilai viskositas diketahui dengan pembacaan viskosimeter pada skala 1 sampai 100. Pembacaan dilakukan setelah satu menit putaran penuh 2 kali untuk spindel no 1.

3.5.9 *Fourier Transform Infra Red (FTIR) (Hadik, 2008)*

FTIR sangat bermanfaat untuk tujuan identifikasi suatu komponen dan membantu kita dalam mengidentifikasi gugus fungsional dalam sebuah molekul sehingga sifat-sifat karaginan dapat dikarakteristik dengan jelas. Spektra inframerah menunjukkan absorpsi gugus karbonil untuk mengetahui keseimbangan antara struktur lingkaran dengan struktur rantai terbuka. Pengukuran absorpsi radiasi inframerah pada berbagai panjang gelombang dilakukan dengan spektrofotometer inframerah Shimadzu Model IR-430 (Simorangkir, 2004).

Prosedur pengujian sampel yang pertama adalah pembuatan pelet KBr. KBr yang digunakan yaitu jenis spektrograde, langkah pertama KBr dioven pada suhu 105°C selama 1 jam, selanjutnya ditumbuk halus, apabila sampel padat maka langsung dicampurkan ke dalam KBr tersebut serta ditumbuk halus bersama KBr, dengan perbandingan KBr:sampel (10:1), setelah KBr ditumbuk halus kemudian dicetak atau dipres pada alat pengepresan pelet KBr dan pellet siap diukur pada alat FTIR merek Shimadzu. Setelah itu hasil spectra infra merah akan muncul pada monitor.

3.5.10 *Viabilitas Lactobacillus acidophilus (Mortazavian et al., 2007)*

Efisiensi mikroenkapsulasi probiotik dapat dievaluasi dengan beberapa parameter kualitas, salah satu diantaranya yaitu pengukuran viabilitas atau daya tahan bakteri probiotik. Pengukuran jumlah sel yang mampu bertahan terhadap kondisi lingkungan yang bersifat merusak seperti tingkat keasaman dapat diketahui dengan menghitung jumlah sel yang mati dalam sampel produk atau melalui simulasi kondisi tubuh dalam satu waktu. Supaya dapat diketahui nilainya (pengurangan populasi bakteri pada kondisi pH asam), butiran mikrokapsul diberi perlakuan kondisi buatan seperti pada saluran

pencernaan (dengan menggunakan asam klorida pH 1,5 – 2 selama 2 jam kemudian pH netral dengan menggunakan fosfat *buffer*, enzim pencernaan dan juga garam empedu) dan jumlah sel yang mati dapat ditaksir ataupun dihitung. Suhu yang digunakan dalam pengukuran disarankan 37°C sesuai dengan suhu tubuh manusia.

3.5.11 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) (Anonymous, 2008^f)

CLSM merupakan alat yang digunakan untuk memperoleh gambar optik dengan resolusi tinggi. Gambar yang diperoleh titik demi titik dan dapat disusun kembali dalam komputer dan membentuk gambar obyek tiga dimensi. Ada beberapa langkah untuk mendapatkan gambar sampel dengan menggunakan CLSM, yang pertama adalah melihat bahan yang akan diamati di *VIS mode*, yaitu tempatkan bahan dalam model *epi-fluoresence* menggunakan binokular dan ubah perbesaran obyek benda. Kemudian masuk ke mode LSM, buka jendela "*Configuration control*" dan klik "*store/apply*" dengan begitu akan mensetting sistem secara otomatis. Langkah ketiga adalah proses memindai gambar dengan cara menekan tombol "*Find*" sehingga sistem secara otomatis akan membuka jendela gambar atau *image*, kemudian optimalkan *setting detector* setelah itu gambar akan siap untuk dipindai. Gambar yang diamati dapat dilihat pada bagian monitor dan dapat dilakukan analisa obyek dengan cara dilakukan pemotongan lapisan demi lapisan mikroenkapsulat sampai lapisan terdalam, kemudian dilakukan pemutaran, hingga terlihat bentuk yang menyerupai bola.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Analisa Fisiko Kimia *Refined Carrageenan*

Karaginan merupakan getah rumput laut dari jenis *Eucheuma sp* yang diekstraksi dengan air atau larutan alkali panas. Pada penelitian ini didapatkan hasil analisa sifat kimia tepung karaginan dari *Eucheuma spinosum* yang meliputi kadar air, kadar abu, total Pb, dan kadar sulfat, sementara untuk analisa sifat fisika meliputi viskositas, *gelling point*, *melting point*, dan kekuatan gel, selain itu juga analisa *FTIR* untuk mengetahui gugus fungsi dari karaginan yang dibuat. Hasil analisa fisiko kimia karaginan pada penelitian ini kemudian dibandingkan dengan karaginan standar sebagai indikator mutu karaginan yang dapat dilihat pada tabel 12 di bawah ini.

Tabel 12. Hasil Analisa Fisiko Kimia Tepung *Refined carrageenan*

Parameter	Karaginan <i>Eucheuma spinosum</i>
Kadar air (%)	11,04
Kadar abu (%)	19,6
Total Pb (mg/kg)	6,84
Total sulfat SO ₄ (%)	25,77
Viskositas (mPas)	210
Gelling point (°C)	25,5
Melting point (°C)	80
Kekuatan gel (g/cm ²)	1124

Sumber : Ariesandy (2008)

Berdasarkan hasil analisa sifat fisiko kimia dari tepung *refined carrageenan Eucheuma spinosum* didapatkan secara berturut-turut adalah kadar air 11,04%, kadar abu 19,6%, total Pb 6,84 mg/kg, total sulfat 25,77 %, viskositas 210 mPas, *gelling point* 25,5°C, *melting point* 80°C dan kekuatan gel sebesar 1124 g/cm².

Sifat fisiko kimia dari tepung *refined carrageenan* di atas masih sesuai dengan tepung karaginan standar. Menurut spesifikasi FAO karaginan harus mengandung kadar air maksimal 12%, kadar abu antara 15-40%, logam berat (sebagai Pb) maksimal 10 ppm, total sulfat antara 15-40%, viskositas minimal sebesar 15 cps, sementara nilai *gelling point*, *melting point* dan kekuatan gel tidak disebutkan. Sedang menurut Porto (2003) dijelaskan bahwa tepung karaginan mempunyai spesifikasi nilai *gelling point* sebesar 30°C, *melting point* sebesar 70°C dan kekuatan gel sebesar 500 – 1200 g/cm².

Dari hasil analisa FTIR, tepung *refined carrageenan* pada penelitian ini merupakan karaginan jenis iota. Hal ini ditunjukkan dengan adanya serapan inframerah yang ditunjukkan pada panjang gelombang 804,26 cm⁻¹ yang merupakan serapan dari ikatan 3,6 anhidrogalaktosa 2-sulfat dan panjang gelombang 849,58 cm⁻¹ menunjukkan serapan dari ikatan D-galaktosa 4 sulfat dan adanya dua gugus ester sulfat pada puncak serapan 1262,32 cm⁻¹ dan 1241,11 cm⁻¹. Hal ini sesuai dengan pernyataan Satari (1996) yang menyatakan bahwa serapan pada panjang gelombang 800-810 cm⁻¹ adalah ikatan c-o-s dari 3,6 anhidrogalaktosa 2-sulfat. Gugus fungsi 3,6 anhidrogalaktosa 2-sulfat merupakan gugus fungsi untuk tipe iota karaginan.

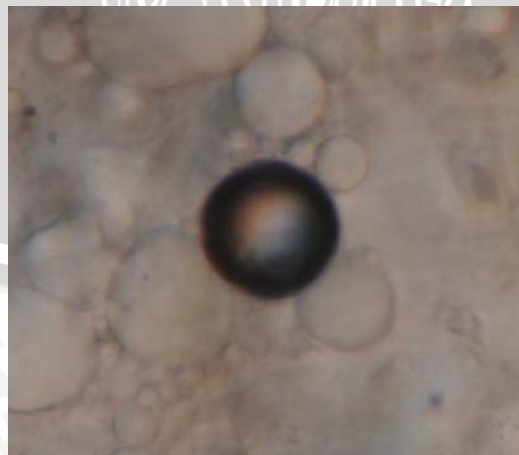
Berdasarkan sifat fisiko kimia, dapat dikatakan bahwa tepung *refined carrageenan* hasil penelitian di atas sesuai dengan persyaratan yang ditetapkan oleh FAO dan berdasar hasil analisa FTIR menunjukkan tipe iota karaginan. Pentingnya karakterisasi dan penentuan tipe karaginan di atas erat kaitannya dalam pemanfaatan di berbagai industri. Karaginan dengan tipe berbeda memberikan sifat-sifat fisika yang berbeda pula, terutama viskositas dan kekuatan gelnya yang pada gilirannya mempengaruhi dalam aplikasinya pada industri pangan, minuman dan industri lainnya. Berdasarkan pada sifat fisiko kimia di atas, tepung *refined carrageenan* hasil penelitian

dapat digunakan sebagai bahan pengenkapsulat bakteri asam laktat. Menurut King (1995) disebutkan bahwa karaginan merupakan bahan alami yang dapat digunakan sebagai enkapsulat karena sifatnya yang mendukung seperti dapat membentuk gel secara *reversible*, tidak bersifat toksik terhadap bahan inti serta mempunyai sifat yang sesuai dengan tujuan penyalutan (kuat, fleksibel, stabil).

4.2 Struktur Mikroenkapsulat

4.2.1 Penentuan Konsentrasi

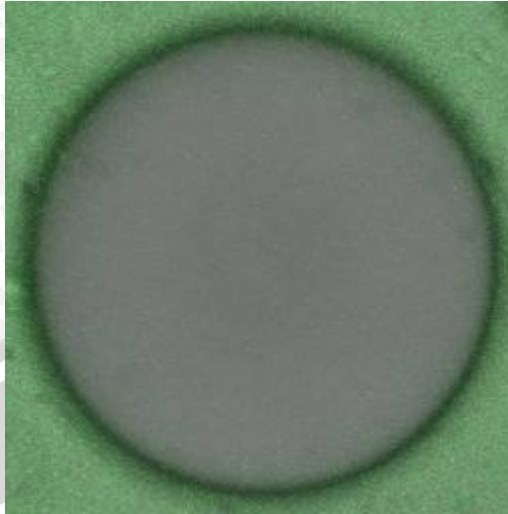
Berdasarkan pada penelitian pendahuluan tahap kedua yang bertujuan untuk mencari konsentrasi yang tepat sebagai bahan enkapsulat, digunakan konsentrasi *refined carrageenan* yaitu 1%, 2%, 3%, tetapi didapatkan hasil struktur mikroenkapsulat yang kurang sempurna. Pada konsentrasi *refined carrageenan* sebagai bahan pengenkapsulat 4% didapatkan gambar struktur mikroenkapsulat yang tebal, yang diasumsikan semakin tebal lapisan mikroenkapsulat maka semakin baik dalam melindungi bahan inti. Proses mikroenkapsulasi ini dilakukan tanpa menggunakan *Lactobacillus acidophilus*. Gambar struktur mikroenkapsulat pada penelitian tahap awal dapat dilihat pada gambar 9 berikut ini.



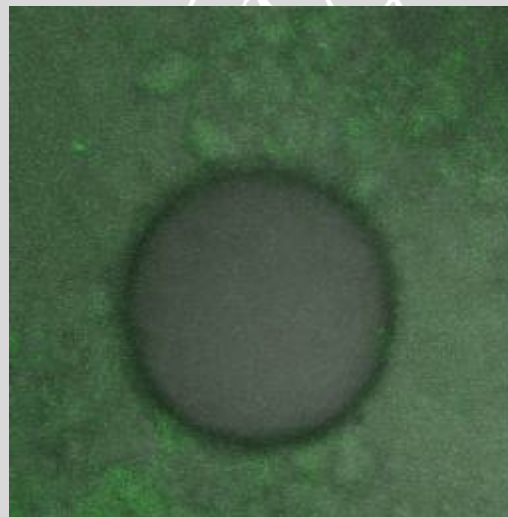
Gambar 9. Morfologi mikro kapsul pada penelitian pendahuluan

4.2.2 CLSM (*Confocal Laser Scanning Microscopy*)

Berdasarkan hasil analisa foto CLSM menunjukkan perbedaan ukuran dan struktur dari mikroenkapsulat setelah diberi perlakuan pada pH yang berbeda. Gambar struktur mikroenkapsulat setelah perlakuan pH 2 masih mempunyai ukuran yang besar meskipun kurang sempurna dengan ukuran diameter 52 μm sehingga masih mampu untuk melindungi bakteri didalamnya dari pengaruh pH asam. Sementara struktur mikroenkapsulat setelah mendapat perlakuan pH 7 mempunyai ukuran diameter yang lebih kecil yaitu 23 μm dikarenakan telah terkena paparan pH asam yang cukup lama pada perlakuan sebelumnya sehingga menjadikan kekuatan dinding mikroenkapsulat mudah terkikis pada saat diberi perlakuan pH 7 selama 2 jam dan mengakibatkan kemampuan mikro kapsul sebagai lapisan pelindung berkurang dan mengakibatkan penurunan viabilitas bakteri di dalamnya. Hal ini sesuai dengan pernyataan Lo (2007) yang menyatakan bahwa kelangsungan hidup bakteri probiotik ketika diberi perlakuan kondisi perut secara *in vitro* akan berkurang seiring dengan menurunnya ukuran diameter dari mikroenkapsulat, lebih lanjut dijelaskan bahwa ukuran diameter mikroenkapsulat yang kurang dari 100 μm tidak akan memberikan perlindungan yang signifikan terhadap bakteri probiotik dalam simulasi asam lambung. Gambar morfologi mikroenkapsulat pada pH 2 dan pH 7 dapat dilihat pada gambar 10 dan 11 berikut ini.



Gambar 10. Morfologi mikrokapsul pada pH 2
Ket: perbesaran 400x, diameter 52 μm



Gambar 11. Morfologi mikrokapsul pada pH 7
Ket: perbesaran 400x, diameter 23 μm

4.3 Uji Viabilitas

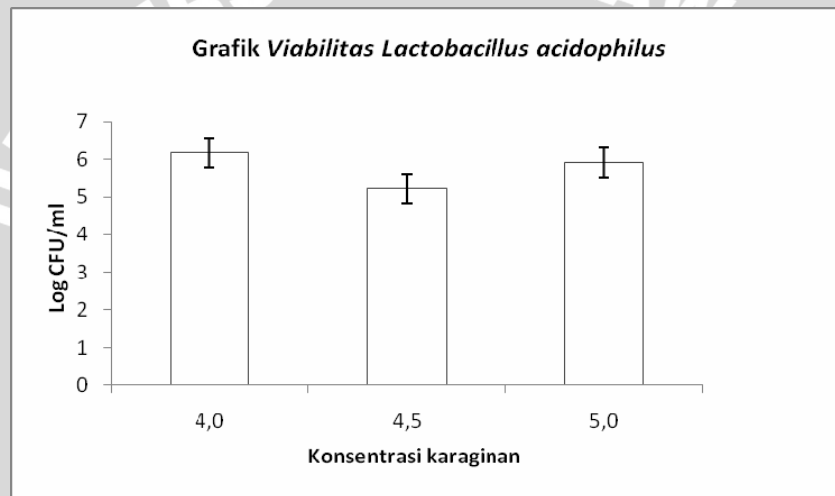
Berdasarkan hasil analisa viabilitas *Lactobacillus acidophilus* pada penelitian pendahuluan tahap kedua didapatkan jumlah koloni pada masing-masing konsentrasi *refined carrageenan* seperti pada tabel 13.

Tabel 13. Hasil analisa viabilitas *Lactobacillus acidophilus*

Perlakuan	Viabilitas*
A	$1,5 \cdot 10^6 \pm 0,029^a$
B	$1,6 \cdot 10^5 \pm 0,015^c$
C	$8,2 \cdot 10^5 \pm 0,013^b$

*Data disajikan sebagai rerata \pm SD, huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan pada tingkat $\alpha=0,05$

Pada penelitian tahap kedua di atas, dimana diperoleh konsentrasi terbaik dengan jumlah koloni paling sedikit yaitu konsentrasi 4,5%, seperti yang terlihat pada gambar 12 berikut.

**Gambar 12. Grafik viabilitas *Lactobacillus acidophilus***

Total BAL yang paling sedikit tumbuh di luar mikroenkapsulasi dianggap yang paling baik, karena diasumsikan bahwa semakin sedikit bakteri yang ada di luar mikroenkapsulasi maka semakin banyak bakteri yang terenkapsulasi dengan sempurna, sehingga hanya beberapa bakteri yang tidak bisa terperangkap ke dalam bahan pengenkapsulat. Hal ini dapat dikatakan bahwa proses mikroenkapsulasi berjalan efektif dikarenakan banyak bakteri yang terenkapsulasi tepat pada mikroenkapsulat. Menurut Mortazavian *et al* (2007) menyatakan bahwa ada beberapa parameter untuk menilai

keefektifan dari mikroenkapsulasi salah satunya adalah dengan mengetahui jumlah sel yang terenkapsulasi di dalam mikroenkapsulat.

Berdasarkan hasil analisa viabilitas di atas, konsentrasi terbaik kemudian diaplikasikan pada pH 2 dan 7 dan didapatkan data jumlah koloni bakteri seperti tampak pada tabel 14 berikut ini.

Tabel 14. Hasil analisa viabilitas *Lactobacillus acidophilus* pada pH 2 dan 7

Perlakuan	CFU/ml
A	$1,6 \cdot 10^2 \pm 0,04$
B	$0 \pm 0,00$

Data disajikan sebagai rerata \pm SD

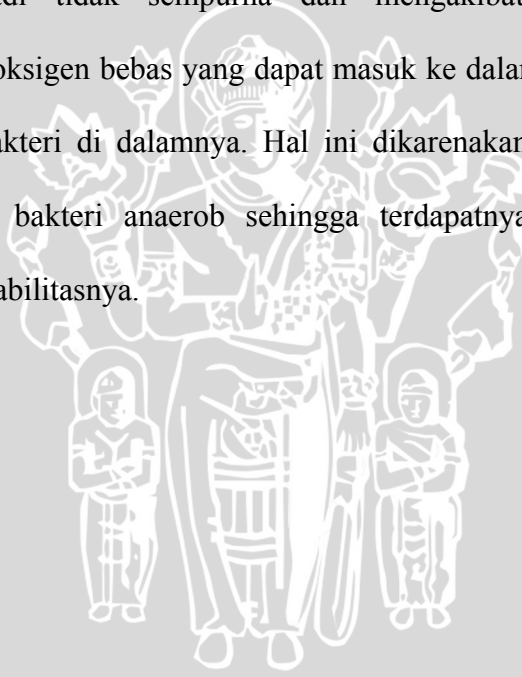
Berdasarkan data di atas didapatkan hasil bahwa jumlah total *Lactobacillus acidophilus* setelah melalui perlakuan pH 2 selama 4 jam sebesar $1,6 \cdot 10^2$ CFU/ml dan setelah perlakuan pH 7 selama 2 jam sebesar 0 CFU/ml atau tidak ditemukannya koloni bakteri yang mampu bertahan.

Berdasarkan hasil analisa uji t pada perlakuan A (pH 2) diperoleh hasil $\alpha=0,05 < \text{Sig}=0,94$. Dengan kata lain, pada tingkat signifikansi 5% rata-rata populasi jumlah koloni bakteri sebelum dan sesudah perlakuan pH 2 sama. Hasil analisa uji t pada perlakuan B (pH 7) juga menunjukkan hasil $\alpha=0,05 > \text{Sig}=0,000$. Dengan kata lain, pada tingkat signifikansi 5% rata-rata populasi jumlah koloni bakteri sebelum dan sesudah perlakuan pH 7 tidaklah sama. Dari data tersebut dapat dikatakan bahwa viabilitas *Lactobacillus acidophilus* mengalami penurunan yang cukup signifikan.

Kemampuan bakteri yang dapat bertahan ketika diberi perlakuan pH 2 dikarenakan adanya perlindungan dari iota karaginan yang berfungsi sebagai mikroenkapsulat. Dimana karaginan tersebut ketika dalam bentuk gel mempunyai sifat yang stabil dan tidak mudah terhidrolisis pada pH asam sehingga masih mampu untuk

melindungi bahan inti dari pengaruh luar seperti pH asam dan juga oksigen bebas. Menurut Lo (2007), mikroenkapsulasi probiotik di dalam butiran hidrokolid mampu untuk mempertahankan dan meningkatkan *viabilitas* dalam saluran pencernaan dengan cara melindungi sel di dalam matrik gel dari kondisi lingkungan yang merugikan.

Sedangkan pada perlakuan pH 7 tidak ditemukan koloni bakteri yang hidup hal ini dikarenakan kekuatan mikroenkapsulat sebagai pelindung bakteri mengalami penurunan akibat dari pengaruh pH asam yang terlalu lama sehingga terjadi pengikisan atau abrasi kulit mikroenkapsulat sedikit demi sedikit yang membuat struktur permukaan mikroenkapsulat menjadi tidak sempurna dan mengakibatkan faktor pengaruh lingkungan luar seperti oksigen bebas yang dapat masuk ke dalam mikroenkapsulat dan dapat mempengaruhi bakteri di dalamnya. Hal ini dikarenakan spesies *Lactobacillus acidophilus* merupakan bakteri anaerob sehingga terdapatnya oksigen bebas akan berpengaruh terhadap viabilitasnya.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- Berdasarkan hasil analisa fisiko kimia sampel *Refined carrageenan* didapatkan nilai kadar air 11,04%, kadar abu 19,6%, Total Pb 6,84 mg/kg, Total sulfat 25,77%, viskositas 210 mPas, *gelling point* 25,5°C, *melting point* 80°C, kekuatan gel 1124 g/cm². Data analisa FTIR menunjukkan bahwa karaginan yang dibuat adalah jenis iota karaginan hal ini ditunjukkan dengan adanya gugus D-galaktosa 4 sulfat pada puncak serapan 849,58 cm⁻¹ dan gugus 3,6 anhidrogalaktosa 2 sulfat pada serapan 804,26 cm⁻¹.
- Berdasarkan hasil analisa viabilitas *Lactobacillus acidophilus* pada beberapa konsentrasi *refined carrageenan* didapatkan konsentrasi terbaik yaitu 4,5%
- Hasil uji viabilitas *Lactobacillus acidophilus* pada pH 2 diperoleh jumlah koloni sebesar 1,6.10² CFU/ml dan pada pH 7 tidak terdapat koloni bakteri yang hidup. Dari hasil analisa foto CLSM didapatkan bahwa struktur dinding mikroenkapsulat setelah perlakuan pH yang berbeda mengalami perubahan akibat pengaruh pH asam yang mengakibatkan abrasi atau pengikisan lapisan kulit mikro kapsul sehingga diameter dari mikro kapsul berkurang

5.2 Saran

Viabilitas *Lactobacillus acidophilus* yang dienkapsulasi dengan *refined carrageenan* dari *Eucheuma spinosum* pada pH 2 dan 7 masih sangat rendah, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pemanfaatan *refined carrageenan* pada konsentrasi yang lebih besar

DAFTAR PUSTAKA

- Adhikari, K., A. Mustpha and I.U Grun. 2003. Survival and Metabolic Activity of Microencapsulated *Bifidobacterium longum* In Stirred Yogurt. Journal of Food Science
- Anal, A.K and H. Singh. 2007. Recent Advances in Microencapsulation of Probiotics For Industrial Applications and Targeted Delivery. Massey University. New Zealand
- Anggraini. 2004. Karaginan Apaan Sich?. <http://jlcome.blogspot.com/2007/10/karaginanapaansich.htm>. Akses tanggal 15 April 2008 pukul 15 wib
- Anonymous. 2008^a. *Eucheuma spinosum*. <http://www.ipitek.net> akses Senin, 07 Juli 2008
- _____. 2006^b. bakteri asam laktat. <http://www.kcm.com>
- _____. 2008^c. Probiotik. <http://www.jrenik.com>
- _____. 2008^d. *Lactobacillus acidophilus*. <http://www.wikipedia.org> akses Senin, 07 Juli 2008
- _____. 2008^e. bakteri *Lactobacillus acidophilus*. <http://www.probiotik.com> akses Senin, 07 Juli 2008
- _____. 2008^f. The Confocal Laser Scanning Microscope Overview. <http://www.zeiss.com>
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. Inc. Washington DC.
- Apriyantono, A., D. Fardiaz., N.L. Pupitasari., S. Yasni dan S. Budiyanto. 1989. Analisis Pangan.: Institut Pertanian Bogor Press. Bogor
- Ariesandy, M. 2008. Petunjuk Analisa Kimia. Laboratorium Kimia Fakultas MIPA UMM. Malang
- Champagne, C. P., F. Girand and N. Rodrigue. 1993. Production of Concentrated Suspensions of Thermophillic Lactic Acid Bacteria in Calcium Alginate Beads. International Dairy Journal
- Desmond, C., R.P. Ross and C. Stanton. 2002. Improved Survival of *Lactobacillus Paracasei* NFBC 338 in Spray-Dried Powders Containing Gum Acacia. Journal of Applied Microbiology

- Dziezak, J.D. 1988. Microencapsulation and Encapsulated Ingredients. Food Technology. 4: 136-151.
- Drakoularakou, A.P. 2003. A Study Of The Growth Of *Lactobacillus Acidophilus* In Bovine, Ovine And Caprine Milk. International Journal of Dairy Technology
- FMC Corp. 1977. *Carrageenan*. Marine Colloid Monograph Number One. Marine Colloids Division FMC Corporation. Springfield, New Jersey. USA
- Frece, J., B. Kos., I.K. Svetec and Z. Zgaga. 2005. Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. Journal of Applied Microbiology
- Fuller, R. 1991. Probiotics in Human Medicine. <http://www.gut.bmj.com>
- Ghosh, F.K. 2006. Functional Coating and Microencapsulation: A General Perspective. Wiley VCH. Weinheim
- Hadik. 2008. Petunjuk Penggunaan Alat FTIR (*Fourier Transform Infra Red*). Laboratorium Instrumen Jurusan Kimia Fakultas MIPA UB. Malang
- Hira, N dan J. Eka. 2006. Perkembangan Komoditi Rumput Laut di Indonesia. BEI. Indonesia
- Indriani, H dan E. Sumiarsih. 1995. Rumput Laut: Budidaya, Pengolahan, Pemasaran. Penebar Swadaya. Jakarta
- Ishibasi, N and S. Yamasaki. 2001. Probiotics and Safety. American Journal of Clinical Nutrition. New York
- Istini, S., A. Zatnika dan Suhaimi. 2008. Manfaat dan Pengolahan Rumput Laut. <https://www.kompas.com/kompas-cetak/0307/23/bahari/431127.htm>. Diakses tanggal 15 April 2008 pukul 17.00 WIB.
- Kailasapathy, K. 2002. Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. Horizon Scientific Press. Sidney
- King, A.H. 1995. Encapsulation of Food Ingredients. Merck & Co. New Jersey
- Kondo, A. 1979. Microcapsule Processing and Technology. Marcell Dekker. New York
- Kos, B., J. Suskovic., J. Frece and S. Matosic. 2003. Adhesion and Aggregation Ability of Probiotic Strain *Lactobacillus Acidophilus* M92. Journal of Applied Microbiology
- Kroschwitz, J.L. 1990. Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. New York: John Wiley & Sons

- Kushal, R., S.K. Anand and H. Chander. 2006. *In vivo* demonstration of enhanced probiotic effect of co-immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. International Journal of Dairy Technology
- Lachman, L., H.A. Lieberman and J.L. Kanig. 1994. Teori dan Praktek Farmasi Industri II. Alih Bahasa: Siti Suyatmi. Jakarta: UI-Press
- Lidbeck, A., C.E. Nord., J. Rafter., C. Nord and J.A. Gustaffson. 1992. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplements on mutagen excretion in faeces and urine in humans. *Microb Ecol Health Dis* 5, 59–67.
- Lima, J.V.M., E.C. Viera and J.R. Nicoli. 1999. Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp. *typhimurium* in gnotobiotic mice. *Journal of applied Microbiology*
- Lin, C., S. Lin and L.S. Hwang. 1995. Microencapsulation of Squid Oil With Hydrophilic macromolecules for Oxidative and Thermal Stabilization. *Journal of Food Science*, Vol.60 No.1.
- Lo, Y.M. 2007. Microencapsulation of Probiotic Bacteria in Xanthan-Chitosan Polyelectrolyte Complex Gels. Department of Nutrition and Food Science. University of Maryland
- Mayya, K.S., A. Bhattacharyya and J.F. Argillier. 2003. Micro-Encapsulation by Complex Coacervation: Influence of Surfactant. Society of Chemical Industries
- McFarlane, G.T and J.H. Cummings. 1999. Probiotics and Prebiotics: Can Regulating The Activities of Intestinal Bacteria Benefit Health?. <http://www.bmj.com>
- Mortazavian, A., S.H. Razavi., M.R. Ehsani and S. Sohrabvandi. 2007. Principles and Methods of Microencapsulation of Probiotic Microorganisms. Department of Food Science and Engineering, Faculty of Biosystem Engineering, Campus of Agriculture, University of Tehran. Iran
- Mosilhey, S.H. 2003. Influence of Difference Capsule Materials on the Physiological Properties of Microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. Dissertation. Rheinischen Friedrich-Wilhelms University. Bonn
- Nindyning, R. 2007. Potensi Rumput Laut. www.rumputlaut.org
- Orrhage, K., B. Brismar and C.E. Nord. 1994. Effect of Supplements With *Bifidobacterium Longum* and *Lactobacillus Acidophilus* on The Intestinal Microbiota During Administration Of Clindamycin. *Microb Ecol Health Dis* 7, 17–22.

- Parvez, S., K.A. Malik., S. Ah Kang and H.Y. Kim. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*
- Pato, U. 2003. Potensi Bakteri Asam Laktat Yang Diisolasi dari Dadih Untuk Menurunkan Resiko Penyakit Kanker. Pusat Penelitian Bioteknologi Unri. Pekanbaru
- Porto, S. 2003. Carrageenan. <http://www.agargel.com>
- Pothakamury, U.R and G.V.B. Canovas. 1995. Fundamental Aspects of Controlled Release in Foods. *Trend in Food Science & Technology*. 6: 397-406
- Re, M.I. 1998. Microencapsulation by Spray Drying. *Drying Technology*. 16: 1191-1236
- Risch, S.J and G.A. Reineccius. 1995. Encapsulation & Controlled Release of Food Ingredients. ACS Symposium Series 590. Whashington DC: American Chemical Society
- Salminen, S and A. von Wright. 1998. Current probiotics —safety assured? *Microbial Ecol. Health Dis.*
- Samadi. 2008. Probiotik Pengganti Antibiotik Dalam Pakan Ternak. <http://www.ppi-goettingen.de/mimbar/kliping/probiotik.html>. Diakses tanggal 5 April 2008 pukul 18.00 WIB.
- Sanders, M.E and T.R. Klaenhammer. 2001. Invited Review: The Scientific Basis Of *Lactobacillus Acidophilus* NCFM Functionality As A Probiotic. *Journal Dairy Science*.
- Satari, R. 1996. Karakteristik Polisakarida Karagenan Asal *Eucheuma sp.* Dan *Hypnea sp.* Puslitbang Oseanologi LIPI. Jakarta
- Suryaningrum, T.D. 1998. Sifat-Sifat Mutu Komoditi Rumput Laut *Eucheuma cottoni* dan *Eucheuma spinosum*. IPB Bgor. Bogor
- Sindha, K. 2006. Pengaruh Konsentrasi KCl Terhadap Mutu dan Rendemen Karaginan Dari *Eucheuma cottoni*. Skripsi. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang
- Suryaningrum, T.D dan B.S.B Utomo. 2002. Petunjuk Analisis Rumput Laut dan Hasil Olahannya. Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Perikanan dan Kelautan. Jakarta
- Sutomo, B. 2006. Manfaat Rumput Laut, Cegah Kanker dan Antioksidan Rumput Laut
Bahan pangan Lezat Multi Khasiat.

<http://www.blogger.com/nextblog?navBar=true>. Diakses tanggal 15 April 2008 pukul 17.00 WIB.

Syamsuar. 2007. Karakteristik Karaginan Rumput Laut *eucheuma cottonii* Pada Berbagai Umur Panen, Konsentrasi Koh dan Lama Ekstraksi. Jakarta : Institut Pertanian Bogor. <http://www.damandiri.or.id/detail.php?id=457>

Uju. 2005. Kajian Proses Pemurnian dan Pengkonsentrasian karaginan dengan membrane mikrofiltrasi. Sekolah Pasca Sarjana IPB Bogor. Bogor

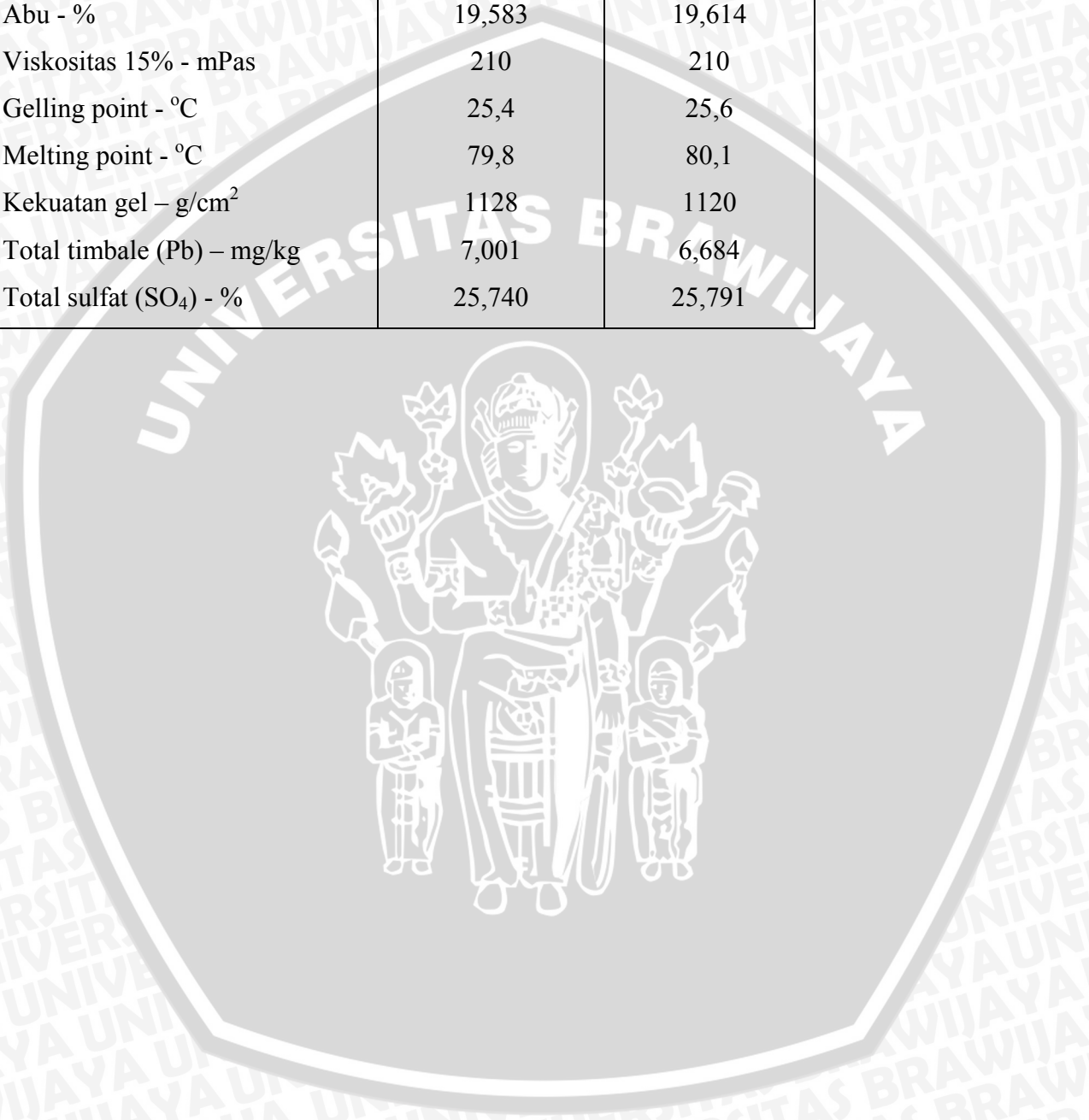
Van De Velde, F and G.A. De Ruiter. 2002. Carrageenan. In A. Steinbuchel, S. DeBaets, and E.J., VanDamme (Eds.), *Biopolymers (Vol.6) Polysaccharide II Polysaccharides from Eukaryotes* (pp. 245-274). Weinheim: Wiley-VCH

Winarno, F.G. 1996. *Teknologi Pengolahan Rumput Laut*. Pustaka Sinar Harapan. Jakarta

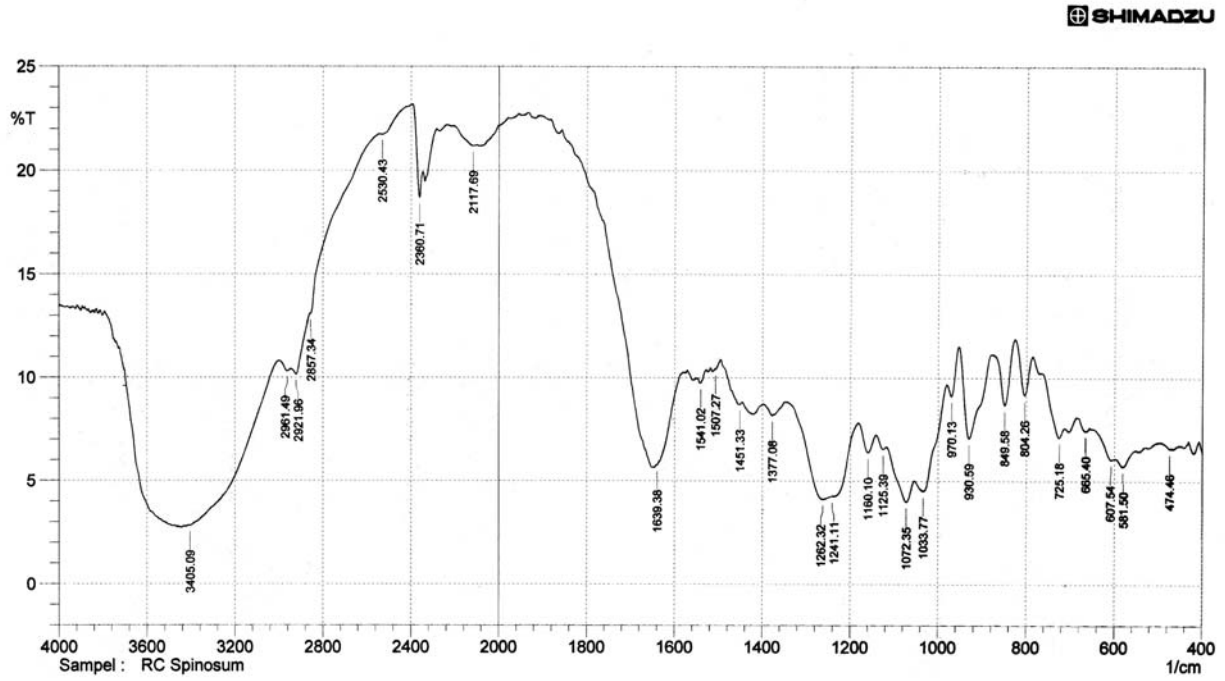


Lampiran 1. Hasil analisa fisiko kimia *refined carrageenan*

Parameter – satuan	Hasil	
	1	2
Air - %	11,034	11,045
Abu - %	19,583	19,614
Viskositas 15% - mPas	210	210
Gelling point - °C	25,4	25,6
Melting point - °C	79,8	80,1
Kekuatan gel – g/cm ²	1128	1120
Total timbale (Pb) – mg/kg	7,001	6,684
Total sulfat (SO ₄) - %	25,740	25,791



Lampiran 2. Spektra karaginan berdasarkan metode FTIR



Comment:

Sampel : RC Spinosum

No of Scans: 16

Resolution

Apodization:

Date/Time: 20 / 10 / 2008

Use : HADIK



Lampiran 3. Hasil analisa viabilitas *Lactobacillus acidophilus* pada beberapa konsentrasi larutan karaginan

Konsentrasi	Ulangan		
	I	II	III
4%	$1,5 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^6$
4,5%	$1,7 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^5$
5%	$8,5 \cdot 10^5$	$8,1 \cdot 10^5$	$8,0 \cdot 10^5$

Hasil analisa viabilitas *Lactobacillus acidophilus* pada pH 2

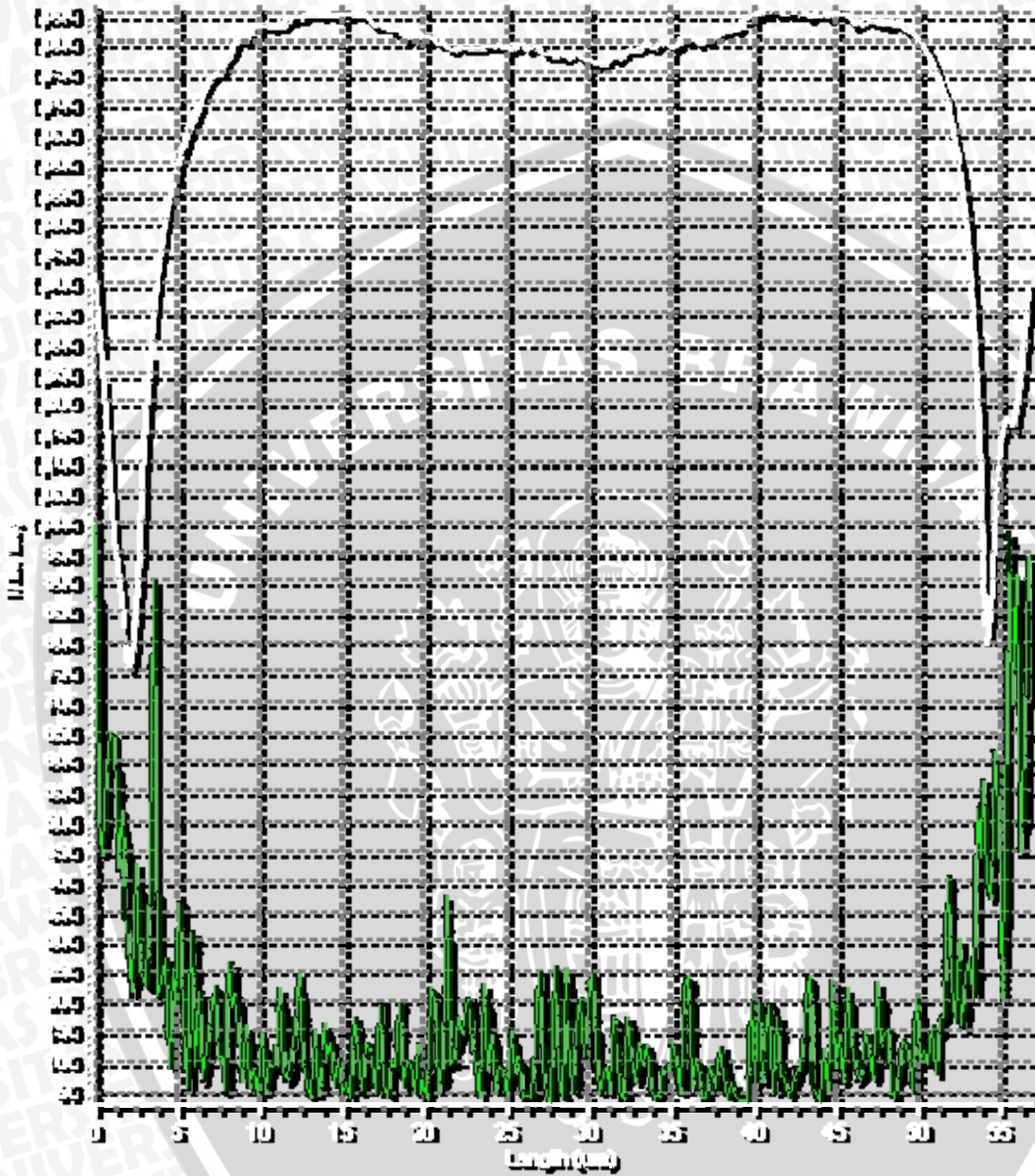
Konsentrasi	Ulangan		
	I	II	III
4,5%	$1,6 \cdot 10^2$	$1,8 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^2$

Hasil analisa viabilitas *Lactobacillus acidophilus* pada pH 7

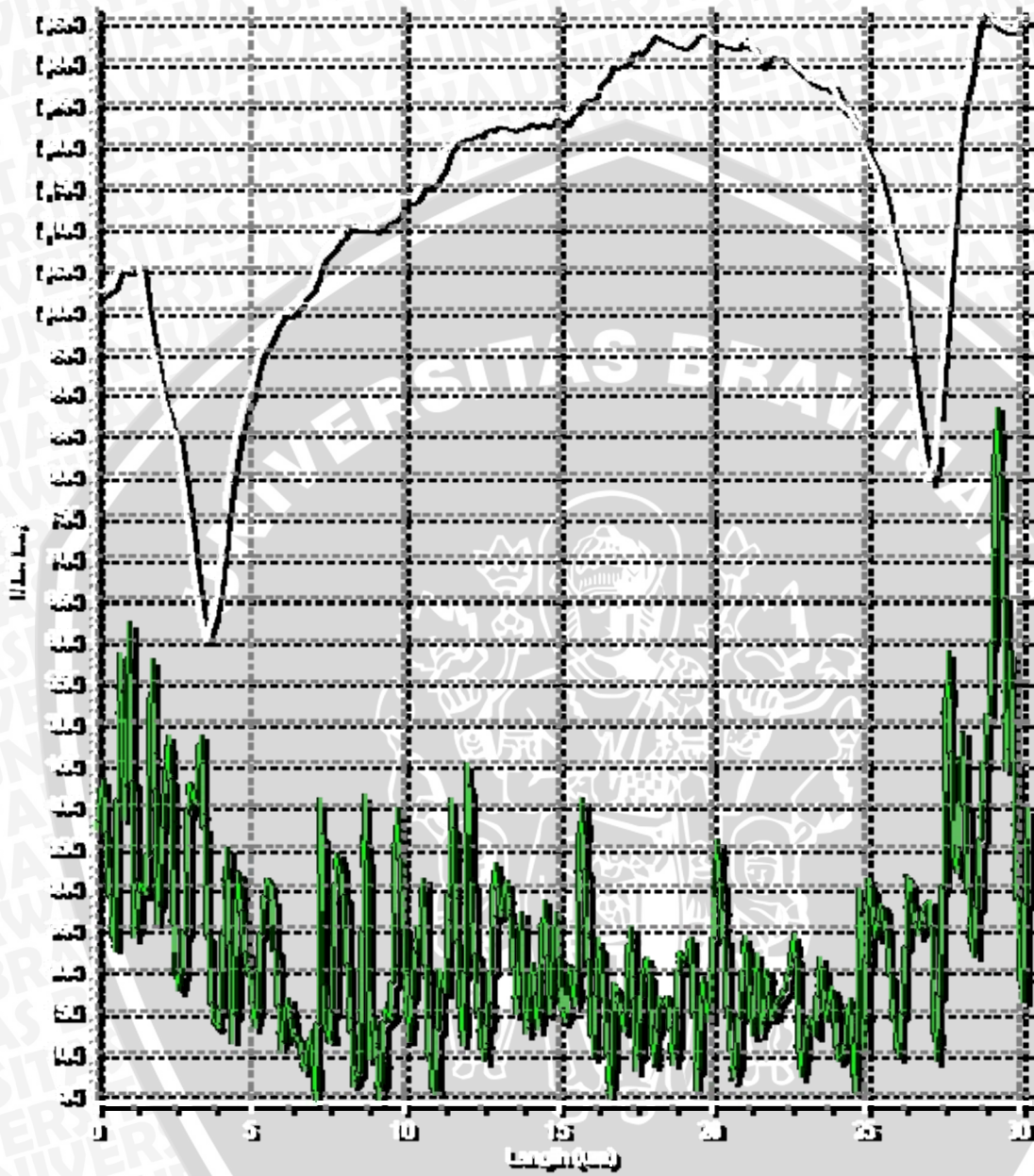
Konsentrasi	Ulangan		
	I	II	III
4,5%	0	0	0



Lampiran 4. Profile mikroenkapsulat setelah perlakuan pH 2



Lampiran 5. Profile mikroenkapsulat setelah perlakuan pH 7



Lampiran 6. Analisa data viabilitas *Lactobacillus acidophilus* pada pH 2

t-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Sebelum	6.1754463	3	.02900137	.01674395
	Sesudah	2.2118280	3	.04014981	.02318050

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Sebelum & Sesudah	3	-.989	.094

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	Sebelum - Sesudah	3.9636183	.06896740	.03981835	3.7922938	4.1349428	99.543	2	.000

Terima H_0 karena diperoleh hasil $\alpha=0,05 < \text{Sig}=0,094$. Dengan kata lain, pada tingkat signifikansi 5% rata-rata populasi jumlah koloni bakteri sebelum dan sesudah perlakuan pH 2 sama



Lampiran 7. Analisa data viabilitas *Lactobacillus acidophilus* pada pH 7

t-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Sebelum	5.2128963	3	.01520106	.00877633
	Sesudah	.0000000	3	.00000000	.00000000

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Sebelum & Sesudah	3	.	.

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	Sebelum - Sesudah	5.21289633	.01520106	.00877633	5.17513482	5.25065785	593.972	2	.000

Tolak H_0 karena diperoleh hasil $\alpha=0,05 > \text{Sig}=0,000$. Dengan kata lain, pada tingkat signifikansi 5% rata-rata populasi jumlah koloni bakteri sebelum dan sesudah perlakuan pH 7 tidaklah sama

