

**PENGARUH KONSENTRASI KARAGINAN *Eucheuma cottoni* DAN KITOSAN
MIX SEBAGAI BAHAN PENGENKAPSULAT TERHADAP VIABILITAS
Lactobacillus acidophilus DAN *Bifidobacterium bifidum***

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN**

Oleh :
ARYANTI DYAH AYU BUDIUTAMI
NIM. 115080301111066



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2015**

**PENGARUH KONSENTRASI KARAGINAN *Eucheuma cottoni* DAN KITOSAN
MIX SEBAGAI BAHAN PENGENKAPSULAT TERHADAP VIABILITAS
Lactobacillus acidophilus DAN *Bifidobacterium bifidum***

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan
Di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

Oleh:

**ARYANTI DYAH AYU BUDIUTAMI
NIM. 115080301111066**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2015**

SANITASI DAN HIGIENE PADA PROSES PEMBEKUAN IKAN LAYUR
(*Trichiurus Savala*) DI CV.DUTA LAUTAN BUANA FISH AND COLD
STORAGE KABUPATEN SIDOARJO JAWA TIMUR

PENYUSUNAN LAPORAN PRAKTEK KERJA LAPANG
SEBAGAI SALAH SATU SYARAT MEMPEROLEH GELAR SARJANA
PADA FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Oleh:

Aryanti Dyah Ayu Budiutami

NIM. 115080301111066

Menyetujui,
Dosen Pembimbing

(Dr. Ir. Dwi Setijawati, M. Kes)

NIP. 19611022 198802 2 001

001

Tanggal: 06 JAN 2016

Mengetahui,
Dosen penguji

(Eko Waluyo, S. Pi, M.Sc)

NIP. 19800424 2005001 1

Tanggal: 06 JAN 2016

Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP

(Dr. Ir. Arning Wuljeng Ekawati, MS)

NIP. 19620805 198603 2 001

Tanggal: 06 JAN 2016

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan laporan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, 8 Desember 2015

Mahasiswa



Aryanti Dyah Ayu Budiutami

UCAPAN TERIMAKASIH

Dengan terselesainya penulisan laporan skripsi ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan jalan dan kemudahan dalam menjalankan penelitian skripsi serta penyusunan laporan skripsi sampai selesai.
2. Mama, Papa serta adik Aryanti Dyah Ayu Dwiputranti yang telah memberikan do'a dan semangat serta selalu membantu dalam segala hal.
3. Ibu Dr. Ir. Dwi Setijawati, M.Kes. sebagai pembimbing I, atas bimbingan dan arahnya dalam penelitian ini sehingga dapat terselesaikannya laporan skripsi ini.
4. Bapak Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP. selaku dosen pembimbing II, atas bimbingan dan arahnya dalam penelitian ini sehingga dapat terselesaikannya laporan skripsi ini.
5. Bapak Prof. Ir. Sukoso, MSc, PhD sebagai dosen penguji I yang telah berkenan meluangkan waktunya untuk hadir sebagai penguji dalam ujian skripsi penulis, beserta bimbingan dan arahnya dalam penyelesaian laporan skripsi ini.
6. Ibu Dr. Ir. Yahya, MP. selaku dosen penguji II yang telah berkenan meluangkan waktunya untuk hadir sebagai penguji dalam ujian skripsi penulis, beserta bimbingan dan arahnya dalam penyelesaian laporan skripsi ini.
7. Arga Nugraha penyemangat setia yang selalu membantu dimanapun dan kapanpun.
8. Rajiv H, Anton, Nisa, Uki, Prima, Fafa, Nila, Aisyah, dan Lita yang selalu menemani di kampus, dan teman-teman THP '11 khususnya teman satu tim mikroenkapsulasi yaitu Alifiany Asyifa R.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan ucapan syukur kami panjatkan kepada ALLAH SWT yang telah melimpahkan rahmat serta karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi sebagai salah satu syarat kelulusan di Universitas Brawijaya khususnya pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan dengan judul Pengaruh Konsentrasi Karaginan *Eucheuma cottoni* dan kitosan mix sebagai Bahan Pengenkapsulat Terhadap Viabilitas *Lactobacillus acidophilus* Dan *Bifidobacterium bifidum*. Pada skripsi ini disajikan tulisan dalam pokok-pokok bahasan yang meliputi pendahuluan pada bab I, tinjauan pustaka pada bab II, materi dan metode penelitian pada bab III, hasil dan pembahasan pada bab IV, serta kesimpulan dan saran pada bab V.

Penulis menyadari dalam laporan ini tentunya ada kekurangan, maka diharapkan kritik dan saran sehingga dapat menjadi lebih sempurna. Semoga laporan ini dapat bermanfaat bagi penulis pada khususnya, dan bagi pembaca pada umumnya.

Malang, 8 Desember 2015

Penulis



RINGKASAN

ARYANTI DYAH AYU BUDIUTAMI Pengaruh Konsentrasi Karaginan *Eucheuma cottoni* Dan Kitosan Mix Sebagai Bahan Pengekapsulat Terhadap Viabilitas *Lactobacillus acidophilus* Dan *Bifidobacterium bifidum* (Dibawah bimbingan **Dr. Ir. Dwi Setijawati, M. Kes** dan **Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP**).

Probiotik merupakan bakteri hidup yang dapat diberikan sebagai suplemen makanan. Pendeknya waktu hidup probiotik ini menjadikan permasalahan tentang bagaimana cara mempertahankan viabilitas probiotik ini agar tetap memberikan efek fungsional. Teknologi mikroenkapsulasi digunakan untuk menjaga viabilitas bakteri probiotik selama pemrosesan produk dan penyimpanan. Mikroenkapsulasi merupakan suatu proses pembungkusan partikel padatan kecil, cairan ataupun gas dalam sebuah pembungkus yang berukuran 1 – 1000 μm . Karaginan biasa dipakai untuk bahan pengekapsulat. Karaginan merupakan polisakarida sulfat, diekstrak dari beberapa spesies rumput laut merah (Rhodophyceae) dengan fraksi kappa d-galaktosa unit terkait bergantian dengan α (1,3) -d-galaktosa-4-sulfat dan β (1-4) -3,6-anhydro-d-galaktosa. Kitosan β -1,4-2 amino-2-dioksi-D-glukosa telah dipelajari sebagai bahan penyalut bahwa yang memiliki struktur yang hampir sama dengan selulosa. kitosan merupakan salah satu matriks imobilisasi yang paling menjanjikan karena memiliki kemampuan membentuk membran.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh campuran kappa dan kitosan sebagai bahan pengekapsulat terhadap viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum*.

Penelitian menggunakan rancangan penelitian Rancangan Acak Lengkap sederhana (tanpa interaksi) dengan 3 perbedaan konsentrasi bahan pengekapsulat dengan 3 kali ulangan. Selang kepercayaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 95%. Analisa data dengan menggunakan sidik ragam ANOVA dan apabila nyata maka dilanjutkan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

Berdasarkan hasil penelitian, viabilitas *L. acidophilus* didapatkan hasil tertinggi pada perlakuan B (Kappa:kitosan=25%:75%) sebesar 4,42035 untuk kadar air mikroenkapsulasi *L. acidophilus* tertinggi 8,8918 untuk aktivitas air (aW) tertinggi pada *L. acidophilus* sebesar 0,6447. Sedangkan untuk Viabilitas *B. bifidum* tertinggi pada perlakuan B (Kappa:kitosan=25%:75%) sebesar 5,4198 untuk kadar air mikroenkapsulasi *B. bifidum* tertinggi 8,8555 untuk aktivitas air (aW) tertinggi pada *B. bifidum* sebesar 0,6373..

Kata Kunci : Probiotik, Mikroenkapsulasi, Kitosan, Viabilitas.

DAFTAR ISI

Halaman

| | |
|--|-----------|
| PERNYATAAN ORISINALITAS | ii |
| UCAPAN TERIMAKASIH | iii |
| KATA PENGANTAR | iv |
| RINGKASAN | v |
| DAFTAR ISI | vi |
| DAFTAR GAMBAR | viii |
| DAFTAR TABEL | ix |
| DAFTAR LAMPIRAN | x |
| | |
| 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 3 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 3 |
| 1.4 Hipotesis | 3 |
| 1.5 Kegunaan Penelitian | 3 |
| 1.6 Tempat dan Waktu Penelitian | 4 |
| | |
| 2. TINJAUAN PUSTAKA | 5 |
| 2.1 Bakteri Probiotik | 5 |
| 2.2 Persyaratan Bakteri Probiotik | 6 |
| 2.3 <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 7 |
| 2.4 <i>Bifidobacterium bifidum</i> | 9 |
| 2.5 Karaginan | 10 |
| 2.6 Kappa Karaginan | 12 |
| 2.7 Kitosan | 14 |
| 2.8 Enkapsulasi | 16 |
| 2.9 Gel Partikel Foam Mat | 17 |
| 2.10 Viabilitas Probiotik | 19 |
| | |
| 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN | 21 |
| 3.1 Materi Penelitian | 21 |
| 3.1.1 Bahan Penelitian | 21 |
| 3.1.2 Alat Penelitian | 21 |
| 3.2 Metode dan Rancangan Penelitian | 22 |
| 3.2.1 Metode Penelitian | 22 |
| 3.2.2 Rancangan Penelitian dan Teknis Analisa Data | 22 |
| 3.3 Prosedur Penelitian | 23 |
| 3.3.1 Penelitian pendahuluan | 23 |
| 3.3.1.1 Pembuatan Semi Refined Carageenan (SRC) <i>E. cottoni</i> | 23 |
| 3.3.1.2 Pembuatan Kitosan | 24 |
| 3.3.1.3 Pembuatan mikrokapsul dengan metode gel partikel foam mat | 25 |
| 3.3.1.4 Penyalutan Kitosan | 25 |
| 3.3.2 Prosedur Kerja Penelitian Utama | 26 |
| 3.3.2.1 Uji viabilitas mikrokapsul campuran <i>L. acidophilus</i> dan <i>B. bifidum</i> dengan penyalut kappa SRC | |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| | kitosan mix | 26 |
| 3.3.3 | Analisa Pengujian | 26 |
| 3.3.3.1 | Uji Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) | 26 |
| 3.3.3.2 | Viabilitas Probiotik | 27 |
| 3.3.3.3 | Kadar air | 28 |
| 3.3.3.4 | Pengujian Aktivitas Air (Aw) | 29 |
| 3.3.4 | Analisa Data | 30 |
| 4. | HASIL DAN PEMBAHASAN | 31 |
| 4.1 | Spektra FT-IR SRC <i>E. cottoni</i> | 31 |
| 4.2 | Viabilitas <i>L. acidophilus</i> dan <i>B. bifidum</i> | 33 |
| 4.2.1 | Viabilitas <i>L. acidophilus</i> | 33 |
| 4.2.2 | Viabilitas <i>B. bifidum</i> | 36 |
| 4.2.3 | Yield Enkapsulasi | 37 |
| 4.3 | Kadar air | 39 |
| 4.3.1 | Kadar air mikroenkapsulasi <i>L. acidophilus</i> | 39 |
| 4.3.2 | Kadar air mikroenkapsulasi <i>B. bifidum</i> | 41 |
| 4.4 | Aktivitas Air (Aw) | 42 |
| 4.4.1 | Aw <i>L. acidophilus</i> | 42 |
| 4.4.2 | Aw <i>B. bifidum</i> | 44 |
| 5. | KESIMPULAN DAN SARAN | 46 |
| 5.1 | Kesimpulan | 46 |
| 5.2 | Saran | 46 |
| | DAFTAR PUSTAKA | 47 |



DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Halaman |
|--|---------|
| 1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 8 |
| 2. <i>Bifidobacterium bifidum</i> | 9 |
| 3. Jenis-jenis karaginan | 11 |
| 4. Struktur Kitin dan Kitosan | 15 |
| 5. Mikroenkapsulasi dengan metode gel partikel | 18 |
| 6. Spektra FT-IR <i>E. cottoni</i> dan kitosan | 31 |
| 7. Viabilitas log CFU/mL <i>L. acidophilus</i> dengan perbandingan bahan pengenkapsulat (kappa:kitosan) | 34 |
| 8. Viabilitas log CFU/mL <i>B. bifidum</i> dengan perbandingan bahan pengenkapsulat (kappa:kitosan) | 36 |
| 9. Yield Enkapsulasi setelah proses pengeringan | 37 |
| 10. Scanning Electron Microscope (SEM) dengan perbesaran (a) 1000, (b) 2500, (c) 5000 dan (d) 10.000 | 38 |
| 11. Kadar air mikroenkapsulasi kappa kitosan mix dengan penambahan bakteri probiotik <i>L. acidophilus</i> | 40 |
| 12. Kadar air mikroenkapsulasi kappa kitoan mix dengan penambahan bakteri probiotik <i>B. bifidum</i> | 41 |
| 13. Aw <i>L. acidophilus</i> dengan perbandingan bahan pengenkapsulat kappa kitosan mix | 43 |
| 14. Aw <i>B. bifidum</i> dengan perbandingan bahan pengenkapsulat kappa kitosan mix | 44 |



DAFTAR TABEL

| Tabel | Halaman |
|--|---------|
| 1. Unit-unit monomer karaginan..... | 12 |
| 2. Daya kelarutan karaginan pada berbagai media pelarut..... | 13 |
| 3. Model rancangan percobaan dalam penelitian pendahuluan..... | 23 |



DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Halaman |
|--|---------|
| 1. Pembuatan Semi <i>Refined</i> Carageenan (SRC) <i>E. cottoni</i> | 52 |
| 2. Foto Proses Pembuatan Kappa Karaginan..... | 53 |
| 3. Pembuatan Kitosan..... | 55 |
| 4. Foto Proses Pembuatan Kitosan..... | 56 |
| 5. Pembuatan Mikrokapsul dengan metode gel partikel foam mat..... | 58 |
| 6. Foto Pembuatan mikrokapsul metode gel partikel <i>foam mat drying</i> | 59 |
| 7. Spectra FT-IR SRC <i>E.cottoni</i> | 61 |
| 8. Spectra FT-IR Kitosan..... | 62 |
| 9. Data hasil penelitian utama..... | 63 |
| 10. ANOVA <i>L. acidophilus</i> | 64 |
| 11. ANOVA <i>B. bifidum</i> | 65 |
| 12. Data Kadar air <i>L. acidophilus</i> dan <i>B. Bifidum</i> | 66 |
| 13. ANOVA kadar air <i>L. acidophilus</i> | 67 |
| 14. ANOVA kadar air <i>B. bifidum</i> | 68 |
| 15. ANOVA Aw <i>L. acidophilus</i> | 69 |
| 16. ANOVA Aw <i>B. bifidum</i> | 70 |



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Probiotik merupakan bakteri hidup yang dapat diberikan sebagai suplemen makanan. Pemberian probiotik dapat menghasilkan asam lemak rantai pendek yang menyebabkan suasana usus menjadi asam sehingga menekan bakteri patogen. Mikroflora yang digolongkan sebagai bakteri probiotik terutama adalah dari golongan *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* (Sobariah *et al.*, 2007). Populasi probiotik memiliki standar minimal jumlah bakteri sesuai dengan standar FAO/WHO bahwa standar untuk jumlah populasi bakteri yang harus ada dalam kultur starter sekitar 10^6 - 10^7 cfu/gram (Onayanti *et al.*, 2004)

Kelemahan dari *L. acidophilus* adalah *L. acidophilus* menunjukkan fase stasioner yang pendek serta diikuti kehilangan viabilitas sel yang cepat, walaupun disimpan pada suhu beku. Pendeknya waktu hidup probiotik ini menjadikan permasalahan tentang bagaimana cara mempertahankan viabilitas probiotik ini agar tetap memberikan efek fungsional. Salah satu cara mempertahankan viabilitas adalah dengan cara mikroenkapsulasi (Setijawati *et al.*, 2011).

Teknologi mikroenkapsulasi digunakan untuk menjaga viabilitas bakteri probiotik selama pemrosesan produk dan penyimpanan. Mikroenkapsulasi merupakan suatu proses pembungkusan partikel padatan kecil, cairan ataupun gas dalam sebuah pembungkus yang berukuran 1 – 1000 μm . Akan tetapi untuk mengembangkan sistem enkapsulasi yang sesuai dengan target, diperlukan suatu pengetahuan yang mendalam tentang sifat-sifat bahan yang dipilih sebagai bahan pengkapsulat misalnya kestabilan bahan, biomolekul sel yang akan

dikapsulasi serta ketersediaan bahan pengkapsulat untuk digunakan. (Nazzaro *et al.*, 2012).

Salah satu yang dapat digunakan sebagai bahan pengkapsulat adalah karaginan dan kitosan. Meningkatnya kesadaran masyarakat terhadap keterbatasan sumberdaya alam dan masalah lingkungan, mendorong penggunaan bahan alam yang sifatnya terbarukan, mudah terurai secara biologis dan ramah lingkungan mengalami peningkatan. Penggunaan biopolimer yang bersifat terbarukan, seperti polisakarida (pati, karaginan, alginat, kitosan); protein (gelatin, gluten, kasein) dan gabungannya, menggantikan polimer berbahan dasar petro-kimia sudah banyak dilakukan (Siracusa *et al.*, 2008).

Karaginan biasa dipakai untuk bahan pengkapsulat. Dalam bidang industri, karaginan selain sebagai bahan pengemulsi dan penstabil, karaginan juga berfungsi sebagai pembentuk gel, pensuspensi, pengikat, protective (melindungi koloid), film former (mengikat suatu bahan), syneresis inhibitor (menghalangi terjadinya pelepasan air) dan flocculating agent (mengikat bahan-bahan lain) (Mindarwati,2006). Setijawati *et al.*, (2011) kappa karaginan dapat digunakan sebagai bahan pengkapsulat karena kappa karaginan memiliki kekuatan gel yang bagus karena adanya gugus fungsi anhidro galaktosa (AG). Dengan adanya gugus fungsi AG ini akan menghasilkan pembentukan gel dengan nilai kekuatan gel yang tinggi seperti yang terjadi pada agar. Selain karaginan bahan penyalut yang dapat digunakan adalah kitosan.

Kitosan diperoleh dengan cara mengkonversi kitin, sedangkan kitin dapat diperoleh dari kulit udang. Kitosan telah dipelajari sebagai bahan penyalut oleh (Herdini *et al.*, 2010) bahwa kitosan memiliki struktur yang hampir sama dengan selulosa. Beberapa polimer turunan selulosa, seperti hidroksipropil metil selulosa (HPMC) dan etil selulosa (EC) telah banyak digunakan dalam sediaan lepas

terkendali, baik dalam bentuk matriks maupun mikrokapsul. Dalam penelitian ini digunakan campuran kappa dan kitosan sebagai penyalut ganda untuk memperoleh struktur mikrokapsul yang diinginkan.

Berdasarkan latar belakang tersebut, dibutuhkan penelitian untuk mengetahui campuran konsentrasi bahan yang tepat antara kappa dan kitosan untuk meningkatkan viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum*. Sehingga dilakukan penelitian mengenai pengaruh konsentrasi kappa dan kitosan mix sebagai bahan pengenkapsulat terhadap viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum*.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang mendasari penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah ada pengaruh konsentrasi kappa dan kitosan sebagai bahan pengenkapsulat akan mempengaruhi viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum*.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh campuran kappa dan kitosan sebagai bahan pengenkapsulat terhadap viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum*.

1.4 Hipotesis

Hipotesa yang mendasari penelitian ini adalah:

H_1 = Diduga penggunaan campuran kappa dan kitosan pada konsentrasi yang berbeda memberikan pengaruh terhadap viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum*.

H_0 = Diduga penggunaan kappa dan kitosan pada konsentrasi yang berbeda tidak memberikan pengaruh terhadap viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum*.

1.5 Kegunaan Penelitian

Kegunaan penelitian ini diharapkan hasil yang diperoleh dapat memberikan informasi mengenai pengaruh konsentrasi kappa Semi Refined Carageenan (SRC) dan kitosan sebagai bahan pengenkapsulat terhadap viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum*. Sehingga dapat digunakan sebagai informasi untuk pengembangan metode mikroenkapsulasi dikemudian hari.

1.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian pendahuluan dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan dan Laboratorium Nutrisi dan Biokimia Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang pada bulan Februari – April 2015. Pemeliharaan dan penyimpanan kultur bakteri dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pengujian sifat fisik karaginan dan kitosan dilaksanakan di Laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya Malang pada bulan April 2015. Pengujian spektrofotometer FT-IR dilakukan di Laboratorium FMIPA Universitas Negeri Brawijaya Malang (UB) pada bulan April 2015. Penelitian utama dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan pada bulan Mei – Juni 2015. Pengamatan dengan menggunakan Scanning Electron Microscope dilaksanakan di Laboratorium Sentral FMIPA Universitas Negeri Malang (UM) pada bulan Juli 2015.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Probiotik

Widarnani *et al.*, (2012), Probiotik adalah agen mikroba hidup yang mampu memberikan keuntungan bagi inang dengan memodifikasi komunitas mikroba atau berasosiasi dengan inang memperbaiki nilai nutrisi dan pemanfaatan pakan, meningkatkan respon inang terhadap penyakit, dan memperbaiki kualitas lingkungan ambangnya. Anggriani *et al.*, (2012), yang dimaksud probiotik adalah produk yang tersusun oleh biakan mikroba atau pakan alami mikroskopik yang bersifat menguntungkan dan memberikan dampak bagi peningkatan keseimbangan mikroba saluran usus hewan inang. Dalam aplikasinya di dunia perikanan, probiotik sebagai agen pengurai dapat digunakan baik secara langsung ditebarkan ke air atau melalui perantara makanan hidup (*live food*).

Probiotik kini menjadi sebuah alternative dalam dunia kesehatan terutama untuk menjaga keseimbangan mikroflora usus. Kini berbagai bahan pangan bahkan disuplementasi dengan jenis pangan fungsional lain sehingga dapat meningkatkan fungsinya terhadap kesehatan (Nisa *et al.*,2009). Viabilitas probiotik sangat penting, yaitu preparasi mikroba hidup sehingga sampai pada usus. Jumlah mikroba hidup harus cukup untuk memberikan efek positif bagi kesehatan dan mampu berkolonisasi sehingga dapat mencapai jumlah yang diperlukan selama waktu tertentu. Untuk menjaga viabilitas bakteri maka perlu usaha melindungi bakteri, salah satunya dengan metode enkapsulasi (Rizqiyati *et al.*, 2009).

Bakteri probiotik merupakan mikroorganisme non patogen, yang jika dikonsumsi memberikan pengaruh positif terhadap fisiologi dan kesehatan

inangnya (Triana *et al.*, 2006). Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup yang dikonsumsi oleh manusia atau hewan dalam jumlah yang cukup, mampu hidup dan melewati kondisi lambung dan saluran pencernaan serta bermanfaat bagi sel inangnya dengan jalan meningkatkan kesehatan bagi inangnya. Probiotik juga harus termasuk kelompok aman atau GRAS (*Generally Recognized as Safe*). *L. plantarum* dan *L. acidophilus* termasuk spesies bakteri yang tergolong dalam probiotik (Arief *et al.*, 2010).

2.2 Persyaratan Bakteri Probiotik

Senyawa yang dihasilkan oleh BAL adalah asam organik, suatu peptida yang bersifat antimikroba, berbagai jenis vitamin, asam folat serta senyawa flavor. BAL juga menurunkan pH lingkungannya dan mengeksresikan senyawa yang mampu menghambat mikroorganisme patogen seperti H₂O₂, diasetil, CO₂, asetaldehid, d-isomer, asam amino dan bakteriosin. Jumlah minimal strain probiotik yang ada dalam produk makanan minimum sebesar 10⁷ CFU/g atau jumlah strain probiotik yang harus dikonsumsi setiap hari sekitar 10⁶⁻⁸ CFU/g, dengan tujuan untuk mengimbangi kemungkinan penurunan jumlah bakteri probiotik pada saat berada dalam jalur pencernaan (Manojlovic *et al.*, 2010).

Reksohadiwinoto (2014), secara umum persyaratan yang ditetapkan oleh *The Food and Agriculture Organization/World Health Organization* (FAO/WHO), mikroba probiotik harus memenuhi kriteria sebagai berikut:

- Mikroba dapat tetap hidup selama melewati saluran pencernaan
- Mikroba mampu tumbuh berkembang biak di dalam usus halus
- Mikroba dari kelompok gram positif; mikroba tidak terbatas pada genus *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium*
- Mikroba memperlihatkan manfaat spesifik pada kesehatan yang terukur dengan ditunjukkan pada test *in vitro*, hewan, dan atau manusia (*in vivo*)

- Harus disebutkan dosis yang direkomendasikan dan durasi penggunaannya.

Persyaratan bakteri asam laktat (BAL) yang dapat digunakan sebagai agensia probiotik, selain harus merupakan penghuni tetap jalur pencernaan, bakteri ini harus memiliki sifat toleran terhadap asam atau empedu, mampu tumbuh dengan cepat dan memproduksi asam dalam jumlah besar pada jalur intensin, memproduksi substansi antimikroba yang dapat menekan patogen intestin, dan mempunyai kemampuan untuk menempel pada sel epitel usus (Fuller, 1989). Beberapa kultur yang berpotensi sebagai agensia probiotik, khususnya BAL yang merupakan penghuni saluran pencernaan manusia dan berperan dalam keseimbangan mikroflora tubuh dan teruji secara klinis, terutama adalah jenis : *Lactobacillus: L. acidophilus, L. casei, L. plantarum* dan *Bifidobacteria : B. bifidum* (Sutinah, 2003).

2.3 *Lactobacillus acidophilus*

L. acidophilus adalah salah satu bakteri yang bersifat probiotik, dapat berfungsi terapeutik pada tubuh. Namun ada kelemahan pada flavor, oleh karena itu diupayakan untuk dikombinasi dengan stater lainnya seperti *L. bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* yang diketahui bercita rasa baik (Sunarlim dan Setiyanto, 2008).

Menurut Mariana dan Susanti (2012), *L. acidophilus* merupakan salah satu strain bakteri asam laktat yang telah banyak, dimanfaatkan sebagai probiotik. Kemampuan *L. acidophilus* untuk tumbuh di dalam sistem pencernaan dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen enterik dan memperbaiki keseimbangan mikroflora dalam sistem pencernaan sehingga dapat dimanfaatkan untuk menjaga kesehatan tubuh. Potensi ini menyebabkan *L. acidophilus* digunakan sebagai probiotik.

Lactobacillus sp termasuk Gram positif, tidak berspora, tidak motil oleh flagel, fakultatif anaerob, kadang-kadang mikroaerofilik, sedikit tumbuh di udara tapi bagus pada keadaan di bawah tekanan oksigen rendah, beberapa anaerob pada isolasi. Umumnya bakteri ini tumbuh baik pada 5 % CO_2 . Koloni pada media agar biasanya 2-5 mm, cembung, dan tanpa pigmen, kemoorganotrof, metabolismenya adalah fermentatif dan Saccharoclastic. Sedikit dari produk akhir karbon adalah laktat, tidak menghasilkan nitrat, tumbuh optimum pada suhu 30-40°C (Feliatra 2004).

Menurut Habibilah (2009), *L. acidophilus* merupakan salah satu jenis bakteri probiotik. Klasifikasi *L. acidophilus* adalah sebagai berikut :

| | |
|----------|------------------------------------|
| Kingdom | : Monera |
| Division | : Fimicutes |
| Class | : bacili |
| Ordo | : Lactobacillales |
| Family | : Lactobacillaceae |
| Genus | : lactobacillus |
| Species | : <i>Lactobacillus acidophilus</i> |



Gambar 1. *Lactobacillus acidophilus*
Sumber: Prescott *et al.*, (2002)

L. acidophilus merupakan bakteri asam laktat yang berbentuk batang (basil) dan termasuk dalam kelompok *low Gram positive* bakteri atau bakteri yang memiliki lapisan peptidoglikan yang sama dengan bakteri Gram negatif sehingga akan berwarna merah pada saat pewarnaan Gram. Bakteri dari jenis *Lactobacillus* akan tumbuh secara optimum pada pH antara 4,5 – 6,4 dan

termasuk golongan anaerob fakultatif tetapi terkadang juga diklasifikasikan kedalam golongan *aerotolerant anaerobe* yang secara alamiah ditemukan pada tubuh manusia yaitu dalam mulut, saluran usus dan vagina. Bakteri ini tidak bersifat patogen. (Prescott *et al.*, 2002).

2.4 *Bifidobacterium bifidum*

Bifidobacterium bifidum merupakan bakteri salah satu jenis bakteri asam laktat yang tergolong sebagai bakteri probiotik karena mampu memberikan efek yang positif bagi kesehatan manusia. Menurut Garrity *et al.*, (2004), *B. Bifidum* diklasifikasikan sebagai berikut :

| | |
|---------------------|----------------------------------|
| Domain | : Bacteria |
| Kingdom | : Bacteria |
| Phylum | : Actinobacteria |
| Subclass | : Actinobacteridae |
| Ordo | : Bifidobacteriales |
| Family | : Bifidobacteriaceae |
| Genus | : Bifidobacterium |
| Specific descriptor | : bifidum |
| Scientific name | : <i>Bifidobacterium bifidum</i> |



Gambar 2. *Bifidobacterium bifidum*

Sumber: Prescott *et al.* (2002)

Bakteri dari genus *Bifidobacteria* merupakan bakteri yang tergolong dalam *high Gram positive bacteria* karena mampu menyerap pewarna kristal violet dengan sangat kuat pada saat pewarnaan Gram sehingga koloni Bifidobacteria akan nampak ungu kehitaman. Bakteri jenis ini tidak bersifat motil, tidak berspora dan berbentuk batang berkelompok (berangkai) dengan bentuk batang

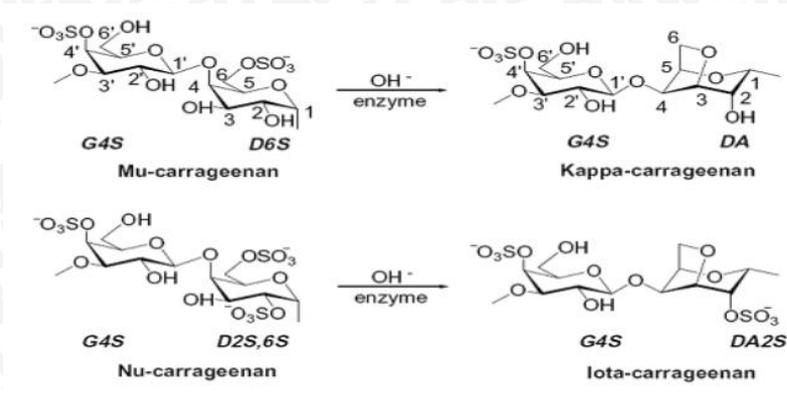
bercabang (Y), bersifat anaerob serta ditemukan dalam mulut dan saluran usus vertebrata berdarah panas. (Prescott *et al.*, 2002).

B. bifidum merupakan spesies bakteri asam laktat dari genus bifidobakteria. Beberapa efek positif dari *B. bifidum*, yaitu mencegah kolonisasi bakteri patogen pada saluran pencernaan, memproduksi asam laktat dan asam asetat, yang akan menurunkan pH saluran pencernaan, peningkatan berat badan bayi, memproduksi vitamin B, dan menciptakan keseimbangan mikroflora intestinal (Anggraeni dan Prangdimurti, 2011).

Penampakan koloni kultur *Bifidobacterium* pada medium agar di bawah kondisi anaerobic bisa bervariasi tergantung fungsi medium dan spesies yang digunakan. Secara umum, bentuk koloni adalah bulat, buram atau mengkilap dan mempunyai diameter yang bervariasi. Scardovi dan Boverter membedakan dua tipe yang berbeda dari koloni berbentuk halus, konveks, putih, dan mengkilap. Tetapi koloni lainnya terlihat kasar dengan tepian yang tidak beraturan (Matteruzi *et al.*, 2003).

2.5 Karaginan

Menurut Setijawati *et al.*, (2011), kappa karaginan dapat digunakan sebagai bahan pengkapsulat karena kappa karaginan memiliki kekuatan gel yang bagus karena adanya gugus fungsi anhidro galaktosa (AG). Dengan adanya gugus fungsi AG ini akan menghasilkan pembentukan gel dengan nilai kekuatan gel yang tinggi seperti yang terjadi pada agar.



Gambar 3. Jenis-jenis karaginan

Sumber: Distantina *et al.*, (2010)

Karaginan mu adalah prekursor karaginan kappa, karaginan nu adalah prekursor iota. Tiga jenis karaginan komersial yang paling penting adalah karaginan iota, kappa dan lambda. Jenis karaginan yang berbeda ini diperoleh dari spesies rhodophyta yang berbeda. Secara alami, jenis iota dan kappa dibentuk secara enzimatik dari prekursornya oleh sulfohidrolase. Sedangkan secara komersial, jenis ini diproduksi menggunakan perlakuan alkali atau ekstraksi dengan alkali (Distantina *et al.*, 2010).

Karaginan merupakan hidrokolloid alami yang digunakan sebagai gelling agent, agen suspensi, pengemulsi dan penstabil. Karaginan terbuat dari spesies rumput laut *E. cottonii* dan *E. spinosum*. Ada tiga jenis karaginan yang umumnya ditemukan yaitu kappa, iota dan lamda. Semi-refined carrageenan (SRC) merupakan tepung rumput laut yang diekstrak untuk pemulihan refined carrageenan, SRC diharapkan dapat menggantikan fungsi dari refined carrageenan sehingga dapat menghemat pemakaiannya. SRC juga memiliki harga yang lebih murah bila dibandingkan dengan refined carrageenan (Istini dan Zalnika, 2007).

Menurut Prasetyowati *et al.*, (2008), struktur karaginan dibagi menjadi 3 fraksi berdasarkan unit penyusunnya yaitu kappa, iota dan lambda karaginan dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Unit-unit monomer karaginan

| Fraksi Karaginan | Monomer |
|------------------|---|
| Kappa | D-galaktosa 4-sulfat 3,6-anhidro-D-galaktosa |
| Iota | D-galaktosa 4-sulfat 3,6-anhidro-D-galaktosa 2-sulfat |
| Lambda | D-galaktosa 2-sulfat D-galaktosa 2,6-disulfat |

2.6 Kappa Karaginan

Ciri fisik *E. cottonii* adalah mempunyai thallus silindris, permukaan licin, cartilagenous. Keadaan warna tidak selalu tetap, kadang-kadang berwarna hijau, hijau kuning, abu-abu atau merah. Perubahan warna sering terjadi hanya karena faktor lingkungan. Kejadian ini merupakan suatu proses adaptasi kromatik yaitu penyesuaian antara proporsi pigmen dengan berbagai kualitas pencahayaan (Prasetyowati *et al.*, 2008).

Klasifikasi *Eucheuma cottonii* menurut Anggadiredja (2006) adalah sebagai berikut:

| | |
|-----------|----------------------------|
| Phylum | : Rhodophyta |
| Class | : Floridaephycidae |
| Sub class | : Bangiophycidae |
| Ordo | : Gigartinalus |
| Family | : Solieriaceae |
| Genus | : <i>Eucheuma</i> |
| Species | : <i>Eucheuma cottonii</i> |

Karaginan merupakan polisakarida sulfat, diekstrak dari beberapa spesies rumput laut merah (Rhodophyceae). Berdasarkan kandungan sulfatnya, karaginan diklasifikasikan menjadi kappa, iota dan lamda dengan jumlah sulfatnya berturut-turut 20%, 33% dan 42% (Villanueva *et al.* 2004).

E. cottonii akan menghasilkan tipe kappa-karaginan, dengan sifat gel yang keras dan kokoh. Salah satu metoda proses yang umum digunakan untuk

mengekstrak adalah metoda pemanasan dengan alkali. Pemanfaatan *E. cottonii* dengan hasil ekstrak karaginan adalah sebagai bahan pengenkapsulat (encapsulating agent) pada metoda enkapsulasi (Setijawati *et al.*, 2011).

Stabilitas maksimum karaginan dalam larutan berada pada pH 9 dan akan terhidrolisis pada pH di bawah 3,5. Pada pH 6 atau lebih umumnya larutan karaginan dapat mempertahankan proses produksi karaginan. Hidrolisis asam akan terjadi jika karaginan berada dalam bentuk larutan, hidrolisis akan meningkat sesuai dengan peningkatan suhu. Viskositas larutan karaginan akan menurun jika pH-nya diturunkan di bawah 4,3. Kappa dan iotakaraginan dapat digunakan sebagai pembentuk gel pada pH rendah, tetapi tidak mudah terhidrolisis sehingga tidak dapat digunakan dalam pangan (Kasim, 2013). Daya kelarutan karaginan pada berbagai media pelarut dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Daya kelarutan karaginan pada berbagai media pelarut

| Medium | Kappa | Iota | Lambda |
|----------------------------|---|-----------------------------|--------------|
| Air panas | Larut di atas 60°C | Larut di atas 60°C | Larut |
| Air dingin | Garam natrium larut, Garam K, Ca, tidak larut | Garam Na, larut garam Ca | Larut |
| Susu panas | Larut | Larut | Larut |
| Susu dingin | Garam Na, Ca, K tidak larut tetapi akan mengembang | Tidak larut | Larut |
| Larutan pekat gula | Panas, larut | Larut, sukar | Larut, panas |
| Larutan pekat garam | Tidak larut | Larut, panas | Larut, panas |

Sumber: (Kasim, 2013)

Kappa karaginan adalah polimer hidrofilik yang terdiri dari polisakarida struktural utama dari banyak spesies rumput laut *Eucheuma*. Mereka terdiri dari d-galaktosa unit terkait bergantian dengan α (1,3) -d-galaktosa-4-sulfat dan β (1-4) -3,6-anhydro-d-galaktosa. Mirip dengan polisakarida lain, penyinaran hasil k-karaginan mengalami penurunan drastis dari berat molekul rata-rata (Mw). (Abad *et al.* 2009).

Menurut Pebrianata (2005), kappa karaginan jika dimasukkan ke dalam air dingin akan membesar membentuk sebaran kasar yang memerlukan pemanasan sampai 70°C untuk melarutkannya. Suhu pembetukan gel dan kualitas gel dipengaruhi oleh konsentrasi, jumlah dan adanya ion-ion logam seperti K⁺, NH₄⁺, Ca⁺⁺, Sr⁺⁺ dan Ba⁺⁺. Secara umum karaginan membentuk gel yang keras pada suhu antara 45°C dan 65°C dan meleleh kembali jika dinaikkan sampai 10-20°C dari suhu yang telah ditetapkan tadi. Gel yang lebih lemah terbentuk jika terdapat ion NH₄⁺, Ca⁺⁺, Sr⁺⁺ dan Ba⁺⁺. Kappa karaginan mempunyai tipe gel yang *rigid* atau mudah pecah dicirikan dengan tingginya sineresis, yaitu adanya aliran cairan pada permukaan gel. Aliran ini berasal dari pengerutan gel sebagai akibat meningkatnya gumpalan pada daerah penghubung. Sineresis tergantung pada konsentrasi kation-kation yang ada dan harus dicegah dalam jumlah yang berlebih. Gel yang terbentuk dari kappa karaginan berwarna agak gelap dan mempunyai tekstur mudah retak.

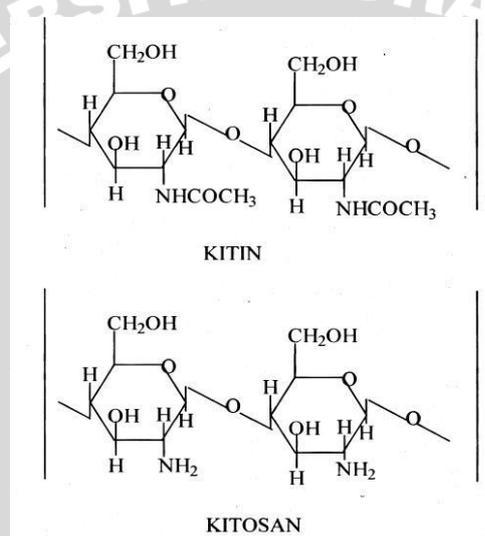
2.7 Kitosan

Kitosan merupakan biopolimer alami yang menarik disebabkan adanya gugus amino reaktif dan grup fungsional hidroksil. Kitosan memiliki karakteristik biokompatibilitas yang diinginkan serta kemampuan untuk meningkatkan permeabilitas membran. Oleh karenanya kitosan merupakan salah satu matriks immobilisasi yang paling menjanjikan karena memiliki kemampuan membentuk membran, sifat adhesi yang baik, harga murah, tidak beracun, kekuatan mekanis dan hidrofilitas yang tinggi serta perbaikan stabilitas (Nakorn dan Erdawati, 2008).

Kitosan yang disebut juga dengan β -1,4-2 amino-2-dioksi-D-glukosa merupakan turunan dari khitin melalui proses deasetilasi. Kitosan juga merupakan suatu polimer multifungsi karena mengandung tiga jenis gugus fungsi

yaitu asam amino, gugus hidroksil primer dan sekunder. Adanya gugus fungsi ini menyebabkan kitosan mempunyai reaktifitas kimia yang tinggi (Sedjati, 2006).

Mahatmanti *et al.*, (2008), Kitosan adalah polimer dari 2-amino-2 Deoksi-D-glukosa. Untuk membedakan polimer kitin dan kitosan berdasarkan kandungan nitrogennya. Polimer kitin mempunyai kandungan nitrogen kurang dari 7% dan kitosan bila mempunyai kandungan nitrogen lebih dari 7%. Di alam kelompok kitin dan kitosan merupakan senyawa yang tidak dibatasi dengan stoikiometri secara pasti. Struktur kitin dan kitosan disajikan dalam **gambar 4**.



Gambar 4. Struktur Kitin dan Kitosan

Sumber: Mahatmanti *et al.*, (2008)

Derajat deasetilasi merupakan parameter untuk meningkatkan tingkat kemurnian kitosan, semakin tinggi derajat deasetilasi maka semakin murni kitosan yang ditandai dengan semakin sedikit kandungan gugus asetilnya, yang berarti proses deasetilasi telah berjalan dengan baik (Wisuda *et al.*, 2014).

Ditambahkan Wiyarsi dan Erfan, (2008), aktivitas kitosan akan meningkat seiring peningkatan derajat deasetilasi (DD) kitosan, karena semakin besar DD menunjukkan semakin banyaknya gugus asetil dari kitin yang diubah menjadi situs aktif NH₂ dalam kitosan.

Kitosan adalah produk deasetilasi kitin yang merupakan polimer rantai panjang glukosamin dengan bobot molekul $2,5 \times 10^5$ Dalton dan rumus kimia poli(2- amino-2-deoksi-D-Glukosa), memiliki rumus molekul $[C_6H_{11}NO_4]_n$. Kitosan sedikit larut dalam asam klorida, serta larut baik dalam asam lemah, seperti asam formiat dan asam asetat. Beberapa diantara keunggulan kitosan yakni mempunyai massa molekul besar sehingga memiliki daya absorpsi besar dan non toksik (Pebriani,2012).

2.8 Enkapsulasi

Enkapsulasi adalah proses fisik dimana bahan aktif (bahan inti), seperti partikel padatan, tetesan air ataupun gas, dikemas dalam bahan sekunder (dinding), berupa lapisan film tipis. Proses ini digunakan untuk melindungi suatu zat agar tetap tersimpan dalam keadaan baik dan melepaskan zat tersebut pada kondisi tertentu saat digunakan. Ide dasar enkapsulasi berasal dari sel, yaitu permeabilitas selektif membran sel memberikan perlindungan terhadap inti sel dari kondisi lingkungan yang berubah-ubah dan berperan dalam pengaturan metabolisme sel. Enkapsulasi yang berkembang saat ini menggunakan prinsip yang sama untuk melindungi bahan aktif dari kondisi lingkungan yang tidak mendukung (Ariandy *et al.*, 2011).

Mikroenkapsulasi merupakan suatu proses pembungkusan partikel padatan kecil, cairan ataupun gas dalam sebuah pembungkus yang berukuran 1 – 1000 μm . Akan tetapi untuk mengembangkan sistem enkapsulasi yang sesuai dengan target, diperlukan suatu pengetahuan yang mendalam tentang sifat-sifat bahan yang dipilih sebagai bahan pengkapsulat misalnya kestabilan bahan, biomolekul sel yang akan dikapsulasi serta ketersediaan bahan pengkapsulat untuk digunakan (Nazzaro *et al.*, 2012). Tujuan dari

mikroenkapsulasi tersebut yaitu untuk melindungi bahan inti dari penguapan dan mengatur volatilitas dari bahan inti yang dienkapsulasi (Istiyani, 2008).

Teknologi pengkapsulan bahan aktif dalam ukuran mikron atau dengan istilah mikroenkapsulasi merupakan salah satu cara yang saat ini sudah sangat banyak digunakan, contohnya di industri farmasi, makanan, kertas, tinta, perfumery, dan pertanian. Pembuatan mikrokapsul terdiri dari pembuatan resin urea-formaldehid, emulsifikasi minyak dalam larutan urea-formaldehid dan mikroenkapsulasi (Purwaningsih *et al.*, 2010).

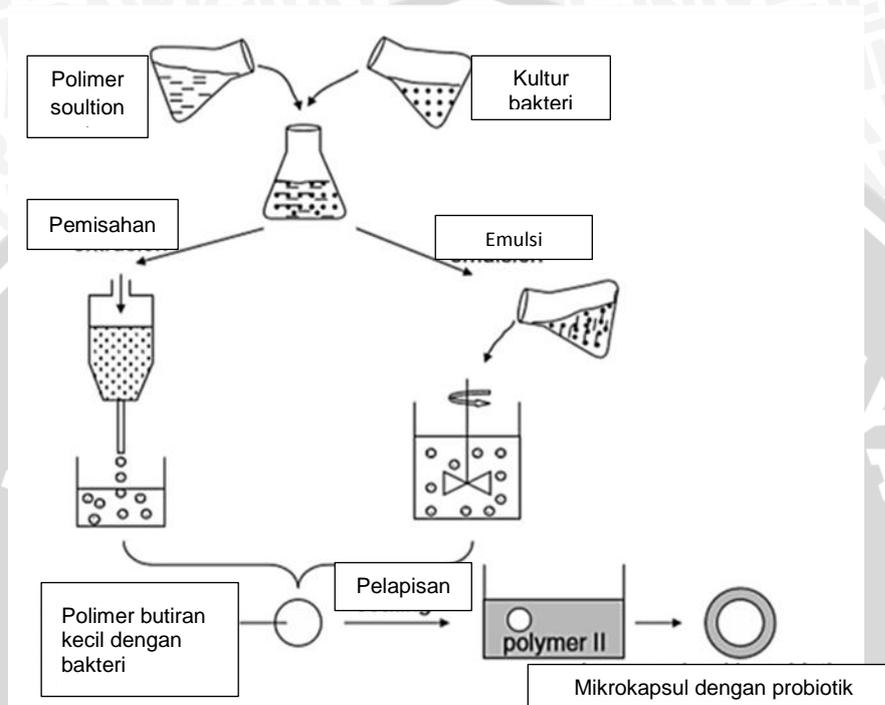
Keuntungan yang merupakan keunggulan mikroenkapsulasi adalah bahan aktif yang dikapsulkan (*active ingredient core* atau *payload*) dapat dikeluarkan dari dalam kapsul secara terkendali (*controlled release*) dalam kondisi dan laju tertentu sesuai dengan keinginan (Yuliani *et al.*, 2013). Teknologi mikroenkapsulasi digunakan untuk menjaga viabilitas bakteri probiotik selama pemrosesan produk dan penyimpanan. Hal terpenting dalam proses mikroenkapsulasi bakteri probiotik adalah mikrokapsul mampu menjaga bakteri probiotik tetap hidup serta melepaskan bakteri probiotik tersebut saat mencapai organ saluran pencernaan yang dituju. (Rokka dan Rantamäki, 2010).

2.9 Gel Partikel Foam Mat

- Gel Partikel

Gel partikel merupakan metode yang sering digunakan dalam proses pembuatan mikrokapsul bakteri probiotik, yaitu gabungan antara metode ekstruksi dengan metode emulsifikasi. Dalam metode gel partikel ini, kultur murni dari bakteri probiotik akan dicampur dengan larutan polimer (bahan pengkapsulat) kemudian disemprotkan dengan menggunakan jarum-jarum dengan diameter lubang 0,3 – 3 mm kedalam larutan penjendal (pembentuk gel) sehingga akan menghasilkan butiran-butiran mikrokapsul dengan diameter

sesuai dengan ukuran lubang jarum yang digunakan. Teknologi ini memiliki kelebihan karena murah harganya, tidak perlu peralatan yang mahal, dan mudah penanganannya (Manojlovic *et al.*, 2010). Proses mikroenkapsulasi dengan metode gel partikel secara lengkap dapat dilihat pada **gambar 4**



Gambar 5. Mikroenkapsulasi dengan metode gel partikel

Sumber : Manojlovic *et al.*, (2010)

- Foam Mat Drying

Pengeringan busa (*foam-mat drying*) merupakan cara pengeringan bahan berbentuk cair yang sebelumnya dijadikan busa terlebih dahulu dengan menambahkan zat pembusa atau peka terhadap panas atau mengandung senyawa yang menyebabkan lengket jika dikeringkan dengan cara lain. Konsentrasi busa yang semakin banyak akan meningkatkan luas permukaan dan memberi struktur berpori pada bahan sehingga akan meningkatkan kecepatan pengeringan (Zubaedah *et al.*, 2003). Putih telur banyak digunakan sebagai

bahan pembusa karena sifatnya yang mampu membentuk busa secara baik (Ramaswamy dan Marcotte, 2006).

Keuntungan utama dari pengeringan *foam-mat drying* adalah suhu yang digunakan lebih rendah dan waktu pengeringan yang lebih singkat bila dibandingkan dengan pengeringan tanpa bahan pembusa pada tipe pengeringan yang sama. Waktu pengeringan yang lebih pendek tergantung pada luas permukaan yang terkena udara pengering, serta perpindahan masa pada bahan pembusa (Ratti dan Kudra, 2006).

2.10 Viabilitas Probiotik

Triana *et al.*, (2006), strain *Lactobacillus sp. Mar 8* yang dienkapsulasi memiliki pertumbuhan yang cukup cepat/tinggi, terutama pada media susu skim 10%, yaitu $8,3 \times 10^7$ CFU/mL setelah diinkubasi selama 24 jam. Pertumbuhan yang lambat dapat membawa pengaruh buruk pada kultur, karena resiko kontaminasi semakin meningkat, terutama dalam skala besar. Pertumbuhan *Lactobacillus sp. Mar 8* pada media susu skim dengan konsentrasi 10% lebih baik daripada konsentrasi 5%. Karena itu konsentrasi susu skim 10% dianggap layak digunakan dalam proses enkapsulasi.

Kualitas hasil enkapsulasi tergantung dari bahan dan metode yang digunakan. Perlakuan enkapsulasi yang dilakukan terhadap *B. Longum* jumlah sel bakteri probiotik tertinggi terdapat pada enkapsulasi dengan enkapsulan gum arab yaitu 8,09 log CFU/g, sedangkan jumlah sel terendah didapat pada enkapsulasi dengan enkapsulan maltodekstrin yaitu 7,58 log CFU/g (Osmond *et al.*, 2008).

Viabilitas bakteri probiotik yang telah dienkapsulasi dengan metode spray drying menggunakan penambahan penyalut Gum Arab 10% dan Maltodekstrin 10% menghasilkan mikrokapsul probiotik yang memiliki viabilitas tinggi hingga

masa penyimpanan 6 minggu pada suhu kulkas (4°C) dan pada penyimpanan suhu ruang (28°C) viabilitasnya bertahan selama 1 minggu sebesar $1,2 \times 10^{10}$ CFU/g (Magfirah *et al.*, 2013).

Onayanti *et al.*, (2004), viabilitas bakteri probiotik yang telah dienkapsulasi dengan metode *cross link* menggunakan penambahan penyalut alginat 3% dan kitosan 0,4% serta bahan tambahan berupa glycerol dan susu skim 10% menghasilkan mikrokapsul probiotik yang memiliki viabilitas tinggi hingga masa penyimpanan 6 minggu pada suhu kulkas (4°C) dan pada penyimpanan suhu ruang (28°C) viabilitasnya bertahan selama 1 minggu.

Bioenkapsulasi dengan pollard menghasilkan viabilitas probiotik *L. casei* lebih tinggi ($2,4 \times 10^8$ sel/mL) dibandingkan bioenkapsulasi dengan tepung terigu yang menghasilkan viabilitas $9,3 \times 10^7$ sel/g paska fermentasi. Setelah 4 minggu penyimpanan (4-5°C) viabilitas probiotik yang didapatkan adalah $9,37 \times 10^7$ sel/g (bioenkapsulasi dengan pollard), $1,07 \times 10^7$ sel/g (bioenkapsulasi dengan tepung terigu) dan $1,48 \times 10^6$ sel/g (bioenkapsulasi tanpa filler). Bioenkapsulasi probiotik juga menghasilkan laju penurunan pH lebih lama (1 jam) dibandingkan probiotik non enkapsulasi (Widodo *et al.*, 2003).

Ketahan bakteri setelah spray drying untuk semua perlakuan bahan enkapsulasi relatif baik yaitu sekitar 88%. Jumlah bakteri sebelum spray drying adalah 9,4 log cfu/g berat kering, setelah spray drying turun menjadi 8,4 log cfu/g berat kering, berarti penurunannya populasi hanya sebanyak 1 siklus log. Jumlah bakteri setelah dienkapsulasi dengan metode spray drying untuk semua bahan enkapsulasi berkisar antara 10^7 - 10^9 cfu/g berat kering (Rizqiati *et al.*, 2008).

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam pembuatan Semi Refined Carageenan (SRC) adalah jenis rumput laut *Eucheuma cottoni* yang diperoleh dari petani rumput laut perairan Madura, Provinsi Jawa Timur. Rumput laut didatangkan dalam keadaan setengah kering dengan menggunakan wadah berupa karung beras. Bahan yang digunakan dalam pembuatan kitosan adalah menggunakan cangkang udang yang diperoleh dari pabrik kerupuk udang, Pasuruan Provinsi Jawa timur. Cangkang udang didapatkan dalam keadaan kering dengan menggunakan wadah berupa karung beras.

Bakteri probiotik menggunakan jenis bakteri asam laktat *L. acidophilus* dan *B. bifidum* yang diperoleh dari stok laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Univeritas Brawijaya Malang. Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan SRC antara lain CaOH_2 teknis, CaCl_2 teknis, KOH teknis, KCl teknis, air, dan akuadest. Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan kitosan antara lain cangkang udang, NaOH 3,5%, HCL 1 N, NaOH 50% dan akuadest. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan mikrokapsul adalah sol SRC, KCl 0,3 M, akuadest dan kertas saring. Pengujian viabilitas *L. acidophillus* dan *B. bifidum* menggunakan Nafis dan MRSA.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam pembuatan SRC adalah *waterbath*, spatula, beaker glass 500mL, baskom, blender, gelas ukur 100mL, timbangan digital, ayakan, loyang, dan kertas lakmus merah. Alat yang digunakan dalam pembuatan kitosan adalah oven, blender, *hot plate*, *magnetic stirrer*, kertas lakmus, ayakan. Alat yang digunakan pada pembuatan mikrokapsul adalah

magnetic stirrer, *hotplate*, beaker glass 500 mL, gelas ukur 100 mL, oven, loyang, beaker glass 50 mL, spatula, serta spuit 50 mL dengan jarum berdiameter 1 mm. Alat yang digunakan untuk menganalisa viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum* adalah sprayer alkohol, bunsen, tabung reaksi, *Laminar Air Flow*, cawan petri, *blue tip*, timbangan Sartorius, stirrer incubator, inkubator colony counter, dan mikropipet.

3.2 Metode dan Rancangan Penelitian

3.2.1 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen termasuk ke dalam metode kuantitatif. Metode eksperimen dilakukan untuk mengetahui sebab akibat dua variabel atau lebih, dengan mengendalikan pengaruh variabel lain.

Metode ini dilaksanakan dengan memberikan variabel bebas secara sengaja kepada obyek penelitian untuk mengetahui akibatnya didalam variabel terikat. Adapun variabel-variabel dalam penelitian ini antara lain :

1. Variabel bebas : Perbedaan konsentrasi kappa SRC dan kitosan
2. Variabel terikat : Viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum*.

3.2.2 Rancangan Penelitian dan Teknis Analisa Data

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Rancangan Acak Lengkap sederhana (tanpa interaksi) dengan 3 perbedaan konsentrasi bahan pengenkapsulat dengan 3 kali ulangan. Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Model rancangan percobaan dalam penelitian pendahuluan

| Konsentrasi Mikrokapsul Probiotik <i>L. Acidophilus</i> | Ulangan | | | Total | Rerata |
|--|----------------|----------------|----------------|-------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| A | A ₁ | A ₂ | A ₃ | | |
| B | B ₁ | B ₂ | B ₃ | | |
| C | C ₁ | C ₂ | C ₃ | | |
| D | D ₁ | D ₂ | D ₃ | | |

| Konsentrasi Mikrokapsul Probiotik <i>B. Bifidum</i> | Ulangan | | | Total | Rerata |
|--|----------------|----------------|----------------|-------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| A | A ₁ | A ₂ | A ₃ | | |
| B | B ₁ | B ₂ | B ₃ | | |
| C | C ₁ | C ₂ | C ₃ | | |
| D | D ₁ | D ₂ | D ₃ | | |

Keterangan :

A = Kappa : Citosan = 75% : 25%

B = Kappa : Citosan = 25% : 75%

C = Kappa : Citosan = 0% : 100%

D = Kappa : Citosan = 100% : 0%

Selang kepercayaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 95%.

Analisa data dengan menggunakan sidik ragam ANOVA dan apabila nyata maka dilanjutkan uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Uji BNT efektif digunakan untuk mendeteksi beda rata-rata yang sebenarnya jika diterapkan setelah uji F nyata pada taraf 5%. Jika hasil analisis keragaman menunjukkan adanya perbedaan ($F_{\text{tabel } 5\%} < F_{\text{hit}} < F_{\text{tabel } 1\%}$ atau $F_{\text{hit}} > F_{\text{tabel } 1\%}$) maka dilanjutkan dengan uji BNT 5% menggunakan program Microsoft Excel.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Penelitian pendahuluan

3.3.1.1 Pembuatan Semi Refined Carageenan (SRC) *E. cottoni*

Rumput laut *Euचेuma cottoni* segar dicuci sampai bersih kemudian dijemur sampai kering. Disiapkan 24 g KOH untuk *E. cottoni*. Kemudian larutan tersebut diencerkan dalam 400mL akuades. Rumput laut yang telah kering

ditimbang sebanyak 20 g lalu diekstraksi dalam waterbath selama 120 menit dengan suhu 80°C untuk *E. cottoni*. Rumput laut yang telah diekstraksi selanjutnya di blender dan ditambahkan KCL sebanyak 3 g. Hasil yang di dapat selanjutnya disaring hingga diperoleh residu dan dilanjutkan dengan pencucian dengan menggunakan KCL sebanyak 1,5 g, pencucian tersebut dilakukan sebanyak 2 kali dan dilanjutkan pencucian dengan menggunakan air hingga pH netral. Selengkapya dapat dilihat dalam **Lampiran 1**.

3.3.1.2 Pembuatan Kitosan

Pembuatan kitosan pada prinsipnya adalah memproses kulit udang kering menjadi kitin lalu menjadi kitosan dengan cara menghilangkan gugus asetilnya menggunakan proses deproteinasi, demineralisasi, dan deasetilasi. Bahan baku yang digunakan adalah kulit udang kering. Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Wardaniati dan Setyaningsih (2007), kulit udang kemudian dihancurkan hingga menjadi serbuk. Selanjutnya dilakukan proses deproteinasi. Proses ini dilakukan pada suhu 75-80°C, dengan menggunakan larutan NaOH 1 M dengan perbandingan serbuk udang dengan NaOH = 1 : 10 (g serbuk/mL NaOH) sambil diaduk konstan selama 60 menit. Kemudian disaring dan endapan yang diperoleh dicuci dengan menggunakan aquadest sampai pH netral. Proses ini dilanjutkan dengan proses demineralisasi pada suhu 25-30°C dengan menggunakan larutan HCl 2 M dengan perbandingan sampel dengan larutan HCl = 1 : 10 (gr serbuk/mL HCl) sambil diaduk konstan selama 120 menit. Kemudian disaring dan endapan yang diperoleh dicuci dengan menggunakan aquadest sampai pH netral. Hasil dari proses ini disebut kitin. Kitin kemudian dimasukkan dalam larutan NaOH dengan konsentrasi 20%W pada suhu 90-100°C sambil diaduk konstan selama 60 menit pada proses deasetilasi. Hasil yang berupa slurry disaring, lalu dicuci dengan akuades sampai pH netral

lalu dikeringkan. Hasil yang diperoleh dari proses tersebut yang dinamakan dengan kitosan. Selengkapnya dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

3.3.1.3 Pembuatan mikrokapsul dengan metode gel partikel foam mat

Prinsip dari mikroenkapsulasi *L. acidophilus* dan *B. bifidum* yaitu suspensi sel dienkapsulasi sol semi SRC yang telah menggejel pada suhu 42-45°C dan di lapisi lagi menggunakan busa putih telur, kemudian dikeringkan pada suhu 40°C. Pembuatan mikroenkapsulasi dengan metode gel partikel foam mat berdasarkan penelitian Arif (2015), adalah sebagai berikut, ditimbang 2,25 g karaginan (1,125 g kappa karaginan dan 1,125 g iota karaginan) ditambahkan 30 mL akuades kemudian dipanaskan di atas *hot plate* hingga mencapai suhu 80°C, sambil terus diaduk karaginan diangkat dari *hot plate* dan suhunya diturunkan hingga 40°C sambil terus diaduk agar tidak cepat menggelasi. Sebanyak 30 mL kultur *L. acidophilus* dan *B. bifidum* di masukan ke dalam sol karaginan, dan diaduk hingga homogen. Campuran sel dan sol dimasukkan ke dalam larutan 75 mL larutan KCl 3,9 M menggunakan pipet tetes, pengadukan dilakukan menggunakan *magnetic stirrer* selama 10 menit, mikrokapsul yang didapat disaring menggunakan kain saring sampai didapatkan residu. Penambahan busa putih telur mengacu pada hasil penelitian terdahulu oleh Kartikasari (2013), residu tersebut ditambahkan dengan busa putih telur sebanyak 17,5% dari total residu. Kemudian campuran residu dan busa putih telur dikeringkan dalam oven pada suhu 40-45°C dan didapat mikrokapsul. Selengkapnya dapat dilihat pada **Lampiran 5**.

3.3.1.4 Penyalutan Kitosan

Kapsul kappa-kitosan dibuat dengan cara menyalut kapsul kappa dengan kitosan. Caranya kapsul iota dimasukkan ke dalam gelas piala yang berisi larutan kitosan. Ragam konsentrasi kitosan yang digunakan adalah 1:1, 1:3 dan 3:1

dalam asam asetat 1% (v/v) dan diaduk dengan pengaduk magnetik selama 10 menit. Setelah itu kapsul disaring. Kapsul kappa-kitosan yang diperoleh dieringkan pada suhu kamar selama 12 jam.

3.3.2 Prosedur Kerja Penelitian Utama

3.3.2.1 Uji viabilitas mikrokapsul campuran *L. acidophilus* dan *B. bifidum* dengan penyalut kappa SRC kitosan mix

Total Plate Count probiotik sangat penting, yaitu preparasi mikroba hidup sehingga sampai pada usus. Jumlah mikroba hidup harus cukup untuk memberikan efek positif bagi kesehatan dan mampu berkolonisasi sehingga dapat mencapai jumlah yang diperlukan selama waktu tertentu (Rizqiati *et al.*, 2009).

Upaya untuk meningkatkan viabilitas probiotik telah banyak dilakukan. Peningkatan viabilitas probiotik selama proses produksi, penyimpanan, dan terhadap kondisi pencernaan banyak dilakukan dengan penggunaan kitosan sebagai bahan tambahan pengenkapsulat. Rizqiati *et al.*, (2009) menjelaskan pentingnya viabilitas probiotik, yaitu preparasi mikroba hidup yang bermanfaat bagi kesehatan. Jumlah mikroba hidup harus cukup memberikan efek positif bagi kesehatan dan mampu berkolonisasi sehingga dapat mencapai jumlah yang diperlukan selama waktu tertentu.

3.3.3 Analisa Pengujian

3.3.3.1 Uji Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR)

Pengujian *Fourier Transform Infrared Spectrometer* (FT-IR) dilakukan di Laboratorium FMIPA Universitas Negeri Brawijaya (UB) untuk mengetahui gugus fungsional dari kappa yang dihasilkan dari ekstraksi *E. cottoni*. Spektrum *infrared* dihasilkan dari pentransmisiian cahaya yang melewati sampel kemudian diplot sebagai intensitas fungsi energi, panjang gelombang (μm) atau bilangan gelombang (cm^{-1}). Metode spektroskopi FTIR (Fourier Transform Infrared

Spectrometer), yaitu metode spektroskopi inframerah yang dilengkapi dengan transformasi Fourier untuk analisis hasil spektrumnya. Metode spektroskopi yang digunakan adalah metode absorpsi, yaitu metode spektroskopi yang didasarkan atas perbedaan penyerapan radiasi inframerah. Absorpsi inframerah oleh suatu materi dapat terjadi jika dipenuhi dua syarat, yaitu kesesuaian antara frekuensi radiasi inframerah dengan frekuensi vibrasional molekul sampel dan perubahan momen dipol selama bervibrasi (Anam *et al.*, 2007).

Menurut Dheni *et al.*, (2014), derajat deasetilasi kitosan dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\%DD = 100 - \left[\left(\frac{A_{1665}}{A_{3450}} \right) \times 115 \right]$$

Menurut (Khan *et al.*, 2002), derajat deasetilasi dihitung dari perbandingan antara absorbansi pada 1655 cm^{-1} dengan absorbansi 3450 cm^{-1} dengan rumus:

$$DD = 100 - \left[\left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \times 115 \right]$$

$$\text{Dengan } (A_{1655}) \text{ amida} = \text{Log}_{10}(DF_2 / DE)$$

$$(A_{3450}) \text{ hidroksil} = \text{Log}_{10}(AC / AB)$$

Keterangan: DD adalah derajat deasetilasi, A_{1655} adalah absorbansi pada bilangan gelombang 1655 cm^{-1} yang menunjukkan serapan karbonil dari amida. A_{3450} merupakan absorbansi bilangan gelombang 3450 cm^{-1} yang menunjukkan serapan hidroksil dan digunakan sebagai standar internal. Faktor 1,33 merupakan nilai perbandingan $\frac{A_{1655}}{A_{3450}}$ untuk kitosan yang terdeasetilasi 100%.

3.3.3.2 Viabilitas Probiotik

Prosedur kerja dari analisis viabilitas probiotik adalah sebagai berikut :

- Mikrokapsul diambil sebanyak 1 g

- Dimasukkan kedalam 10 mL larutan NaFis
- Dihomogenkan menggunakan vortex mixer selama 30 detik.
- Dilakukan pengenceran bertingkat sebanyak 5 kali dan dilakukan penanaman secara duplo pada pengenceran 10^{-2} - 10^{-5} dengan menggunakan metode tuang dalam media MRS-Agar ditambah dengan Sodium thiosulphate 1%.
 - Diinkubasi dalam kondisi anaerob pada suhu 37°C selama 72 jam.
 - Perhitungan viabilitas dilakukan dengan menggunakan perhitungan Total Plate Count (TPC) dalam satuan log CFU/mL. Untuk viabilitas *L. acidophilus* tanpa ditambah dengan Sodium thiosulphate.

Pengujian viabilitas sel pada setiap tahapan proses (baik kering beku maupun kering semprot) dilakukan pada media MRS agar dengan metode surface planting dengan beberapa seri pengenceran (Harmayani *et al.*, 2001). Pengujian viabilitas *L. acidophilus* menurut Srianta *et al.*, (2007) sebagai berikut, *L. acidophilus* dituangkan ke dalam MRS agar, kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 48 jam. Setelah diinkubasi, dilanjutkan dengan perhitungan jumlah total bakteri.

Cara perhitungan TPC (Fardiaz 1988) adalah sebagai berikut:

$$\text{TPC (koloni/mL)} = \text{Jumlah koloni per cawan} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}}$$

3.3.3.3 Kadar air

Analisa kadar air dilakukan untuk mengetahui jumlah air yang terkandung dalambahan panganserta untuk mempermudah proses selanjutnya (Setiani,2013). Prinsip penentuan kadar air menggunakan metode pengeringan dalam oven. Metode ini dilakukan dengan menguapkan air yang ada dalam bahan dengan pemanasan dengan suhu 105°C selama 3 jam kemudian menimbang bahan sampai didapat berat konstan yang berarti air yang ada dalam

bahan telah diuapkan semua. Prosedur kerja dari analisis kadar air adalah sebagai berikut :

- Timbang bahan yang telah dihaluskan sebanyak 2 g dalam botol timbang yang telah diketahui beratnya.
- Dikeringkan dalam oven bersuhu 100 – 105°C selama 3 – 5 jam. Kemudian didinginkan dalam eksikator dan ditimbang.
- Pengurangan berat bahan merupakan banyaknya air dalam bahan. Persentase kadar air dalam bahan dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut :

$$\text{Berat basah (\% WB)} = \frac{(A+B)-C}{B} \times 100\%$$

Dimana :

- A : berat botol timbang
B : berat sampel
C : berat akhir (botol timbang + sampel) yang telah dikeringkan

3.3.3.4 Pengujian Aktivitas Air (Aw)

Pengujian aktivitas air (Aw) dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Brawijaya. Pengukuran aktivitas air menggunakan alat Aw meter. Metode pengujian Aw menurut Susanto (2009) yaitu, Aw meter dikalibrasi dengan memasukkan cairan $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan ditutup dibiarkan selama 3 menit sampai angka pada skala pembacaan menjadi 0.9. Aw meter dibuka dan sampel dimasukkan dan alat ditutup ditunggu hingga 3 menit, setelah 3 menit skala Aw meter dibaca dan dicatat, perhatikan skala temperatur dan faktor koreksi. Jika skala temperatur di atas 20°C, maka pembacaan skala Aw ditambahkan sebanyak kelebihan temperatur dikalikan faktor koreksi sebesar 0.002°, begitu pula dengan temperatur di bawah 20°C.

3.3.4 Analisa Data

Analisa data dilakukan dengan metode kuantitatif. Analisa dalam penelitian kuantitatif bersifat deduktif, menggunakan teori uji empiris dan dilakukan setelah selesai pengumpulan data secara tuntas dengan menggunakan sarana statistik. Penelitian ini menggunakan metode perhitungan Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana. Secara umum Rancangan Acak Lengkap dinyatakan dengan model matematis menurut Murdiyanto (2005), adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + A_1 + \epsilon_{ij}$$

Di mana :

μ = nilai rerata harapan (mean)

A_1 = pengaruh faktor perlakuan

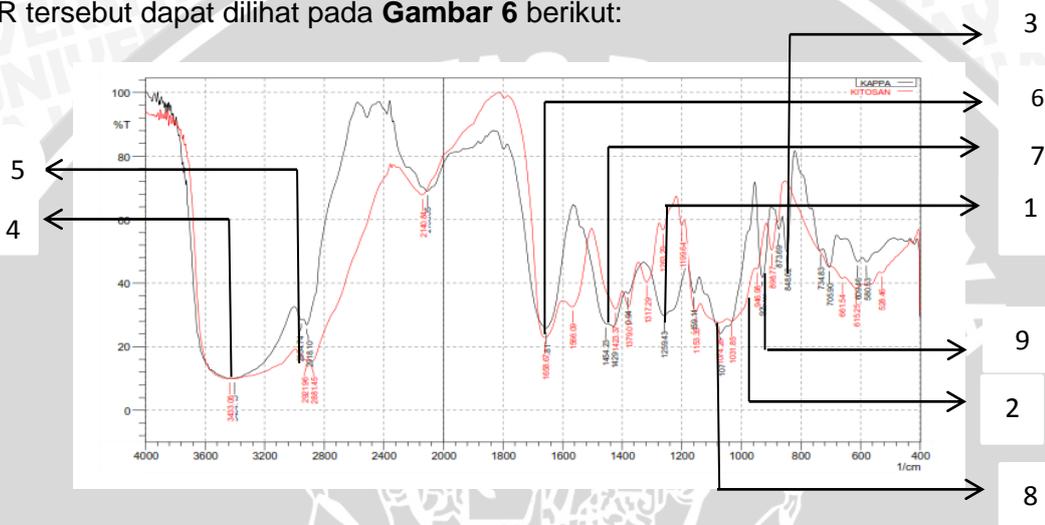
ϵ_{ij} = pengaruh galat

Kemudian hasil penelitian dilakukan pengujian dengan menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA) yang kemudian dilanjutkan uji F. Apabila hasil yang diperoleh menunjukkan adanya perbedaan ($F_{\text{tabel } 5\%} < F_{\text{hit}} < F_{\text{tabel}}$ atau $F_{\text{hit}} > F_{\text{tabel } 1\%}$) sehingga diperoleh hasil yang berbeda nyata atau sangat berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Spektra FT-IR SRC *E. cottoni*

Spektrofotometer FT-IR pada karaginan *E. cottonii* dilakukan untuk mengetahui gugus fungsional dari karaginan yang dihasilkan dari proses semi murni (*semi refined*). Selengkapnya dapat dilihat pada **Lampiran 7**. Spektra FT-IR tersebut dapat dilihat pada **Gambar 6** berikut:



Gambar 6. Spektra FT-IR *E. cottoni* dan kitosan

— : kitosan
 — : SRC *E. cottoni*

Analisa karaginan dari *E. cottoni* menggunakan spektrofotometer FT-IR dilakukan untuk mengetahui gugus fungsional dari karaginan yang dihasilkan dengan dari proses semi murni (*semi refined*). SRC dari *E. cottoni* gugus fungsi ester sulfat muncul pada bilangan gelombang 1259,43 cm^{-1} (gambar 1). Gugus fungsi 3,6-anhidrogalaktosa muncul pada bilangan gelombang 929,63 cm^{-1} (gambar 2). Gugus fungsi galaktosa-4-sulfat muncul pada bilangan gelombang 848,62 cm^{-1} (gambar 3). Menurut FAO (2001), kappa karaginan ditandai dengan gugus D-galaktosa-4-sulfat dan 3,6-anhidro-D-galaktosa. Analisa menggunakan spektrofotometer FT-IR, gugus fungsi D-galaktosa-4-sulfat akan muncul pada bilangan gelombang 840-850 cm^{-1} , gugus 3,6-anhidro-D-galaktosa akan muncul



pada bilangan gelombang 928-933 cm^{-1} , gugus 3,6-anhidrogalaktosa-2-sulfat akan muncul pada bilangan gelombang 800-805 cm^{-1} serta gugus fungsi ester sulfat akan muncul pada bilangan gelombang 1220-1260 cm^{-1} . Sehingga dapat disimpulkan bahwa SRC yang dihasilkan dari *E. cottoni* merupakan kappa karaginan.

Menurut Setijawati *et al.*, (2011), penentuan gugus fungsional karaginan dengan menggunakan metoda FTIR dapat diketahui bahwa karaginan yang dihasilkan SRC jenis *Eucheuma cottonii* memiliki sifat polisakarida yaitu larut dalam air, dimana dapat diketahui dengan adanya gugus hidroksil pada bilangan gelombang 3371.34 cm^{-1} . sedangkan bilangan gelombang 1167,82 cm^{-1} menunjukkan total sulfat, bilangan gelombang 850,55 cm^{-1} menunjukkan anhidro galaktosa ester sulfat, dan bilangan gelombang 806,19 cm^{-1} menunjukkan ester sulfat. Sehingga dengan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa karaginan yang dihasilkan dari SRC *E. cottoni* termasuk ke dalam kappa karaginan.

Kitosan dilakukan uji spektra untuk mengetahui gugus yang terkandung dalam kitosan tersebut. Hasil spektra kitosan dapat dilihat pada **Gambar 6**. Hasil analisa spektra FTIR memperlihatkan pola serapan yaitu pada bilangan gelombang 3433,06 cm^{-1} (gambar 4) menunjukkan vibrasi gugus -OH dan N-H ulur. Pada bilangan gelombang 2921,96 cm^{-1} (gambar 5) menunjukkan vibrasi gugus C-H ulur. Pada bilangan gelombang 1658,67 cm^{-1} (gambar 6) menunjukkan vibrasi gugus NH_2 guntingan. Gugus fungsi CH_3 ditunjukkan pada bilangan gelombang 1423,27 cm^{-1} (gambar 7). Sedangkan gugus fungsi C-O-C ditunjukkan pada bilangan gelombang 1074,28 cm^{-1} (gambar 8). Pada bilangan gelombang 898,77 cm^{-1} (gambar 9) menunjukkan gugus fungsi NH_2 kibasan.

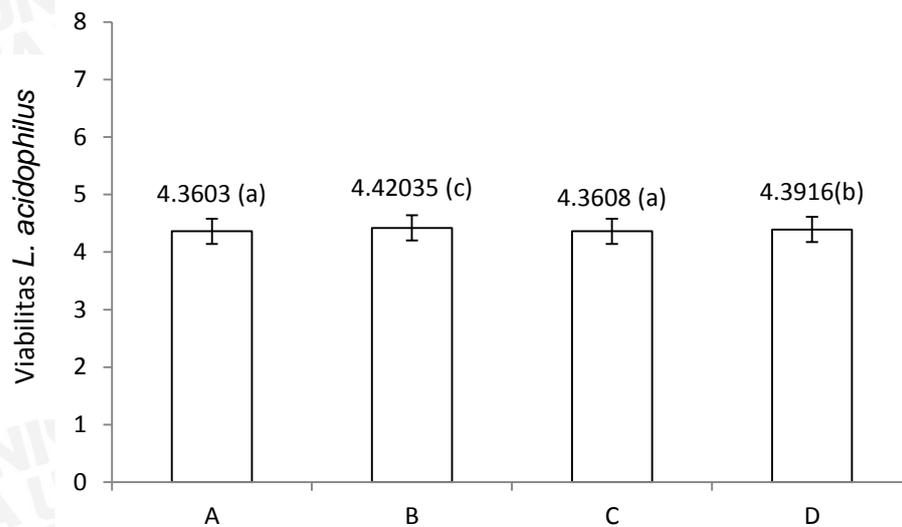
Menurut Wiyarsi dan Erfan, (2008), kitosan yang dihasilkan dari cangkang udang dikarakterisasi dengan spektroskopi infra merah untuk mengidentifikasi

gugus-gugus fungsionalnya. Serapan karakteristik kitosan terdapat pada bilangan gelombang $3448,72 \text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan adanya ikatan hidrogen dari gugus $-\text{OH}$ yang tumpang tindih dengan rentangan $-\text{NH}$. Serapan pada $2885,51 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi rentangan dari $-\text{CH}$. Adapun vibrasi tekuk $-\text{CH}$ muncul pada bilangan gelombang $1566,2 \text{ cm}^{-1}$. Vibrasi rentangan C-O yang merupakan salah satu serapan karakteristik polisakarida muncul pada bilangan gelombang $1072,0 \text{ cm}^{-1}$, juga terlihat bahwa serapan pada daerah 1627 cm^{-1} semakin lemah dan ini menandakan deasetilasi mendekati sempurna. Serapan pada daerah ini menunjukkan adanya rentangan gugus karbonil amida (R-NH-C=O). Sehingga dengan hasil analisa FTIR dapat disimpulkan bahwa terdapat kemiripan pola serapan antara kitosan yang dihasilkan dengan literatur. selengkapnya dapat dilihat pada **Lampiran 8**.

4.2 Viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum*

4.2.1 Viabilitas *L. acidophilus*

Data hasil penelitian selengkapnya dapat dilihat pada **Lampiran 9**. Hasil ANOVA pengaruh campuran kappa karaginan dan kitosan terhadap viabilitas *L. acidophilus* menunjukkan adanya perbedaan yang sangat berbeda nyata dengan $F_{\text{hitung}} > F_{1\%}$ (**Lampiran 10**), oleh sebab itu dapat disimpulkan bahwa rasio kappa karaginan dan kitosan sebagai bahan pengenkapsulat sangat memberikan pengaruh nyata terhadap viabilitas *L. acidophilus*. Pengaruh campuran kappa karaginan dan kitosan terhadap viabilitas *L. acidophilus* dapat dilihat pada **Gambar 7**.



Gambar 7. Viabilitas log CFU/mL *L. acidophilus* dengan perbandingan bahan pengenkapsulat (kappa:kitosan)

Gambar 7 menunjukkan bahwa viabilitas tertinggi pada perlakuan B dengan perbandingan kappa : kitosan yaitu 25% : 75%. Menurut Setijawati *et al.*, (2011), Perlakuan pada kondisi berbeda memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap viabilitas *L. acidophilus* pada kondisi kontrol, berbeda pada kondisi pH 2 dan berbeda pada kondisi pH 7 secara invitro. Rata-rata viabilitas *L. acidophilus* pada berbagai kondisi perlakuan berbeda mengalami penurunan dari 10^6 cfu/mL menjadi 10^3 cfu/mL pada pH2 dan menjadi 10^2 cfu/mL pada pH7. Salah satu faktor yang mempengaruhi pembentukan mikrobeads dan viabilitas tergantung kepada konsentrasi bahan penyalut. Semakin tinggi konsentrasi bahan penyalut, semakin besar viabilitasnya.

Mikrokapsul alginat berbentuk porous, sehingga zat aktif di dalamnya dapat mengalami kebocoran (leakage). Untuk mencegah kebocoran dari zat aktif dalam mikrokapsul alginat, mikrokapsul tersebut disalut kembali dengan lapisan luar yang tidak mengandung zat aktif. Penyalutan dengan lapisan luar tersebut juga bertujuan untuk meningkatkan stabilitas mekanik dan stabilitas kimia zat

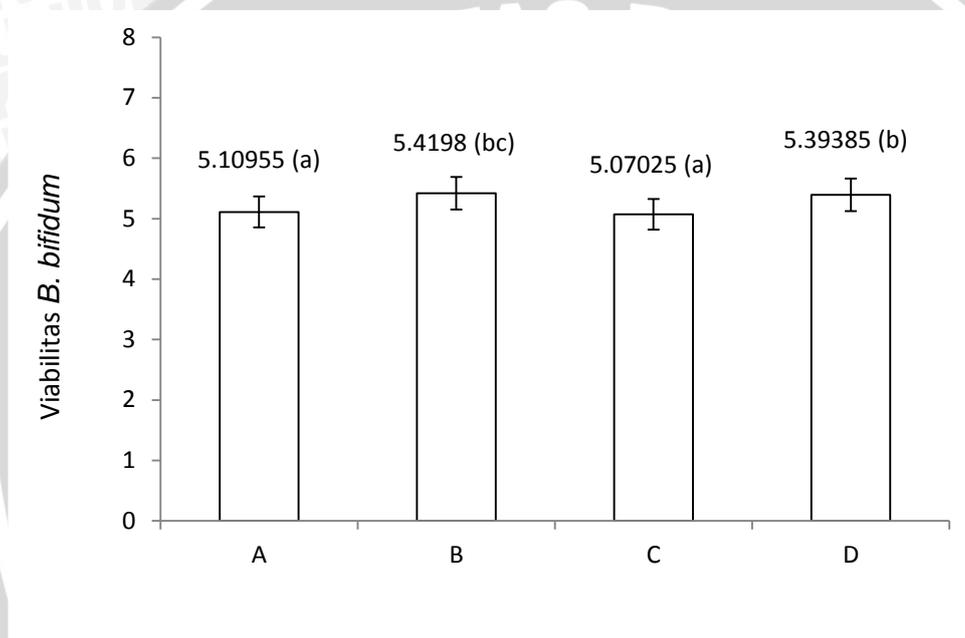
aktif di dalamnya. Secara kimia, gelasi dengan kalsium pada alginat adalah proses yang reversibel. Pengelat seperti laktat, fosfat, dan kaiton K^2 , atau Mg^{2+} dapat menggantikan ion Ca^{2+} pada gel Ca-alginat yang menjadikan gel tersebut kurang stabil (Lioni, Drichoutis, & Nerantzis, 2008).

Salah satu contoh polimer alami yang dapat digunakan untuk menyalut mikrokapsul alginat adalah kitosan, yaitu polisakarida alami yang didapat dari kitin yaitu vertebrata yang tersebar luas di lautan dan pantai. Kitosan terdiri dari β (1-4)-2 amino-2-deoksi-D-glukosa (D-glukosamin) dan 2-asetamido-2-deoksi-D-glukosa (N-asetil-D-glukosamin). Kitosan diproduksi dengan deasetilasi kitin, perbedaan dari sifat kitosan yang diproduksi berdasarkan perbedaan derajat deasetilasi (Sakkinen, 2003). Keberadaan gugus amino pada kitosan menjadikan kitosan bersifat polielektrolit kationik yang larut dalam larutan asam lemah.

Berat molekul kitosan $1,2 \times 10^5$, tergantung pada degradasi yang terjadi selama proses deasetilasi. Sifat-sifat kitosan dihubungkan dengan adanya gugus-gugus amino ($-NH_2$) dan hidroksil ($-OH$) yang terikat. Adanya gugus-gugus tersebut menyebabkan kitosan mempunyai reaktifitas yang tinggi dan memberikan sifat polielektrolit kation sehingga dapat berperan sebagai amino pengganti. Adsorben kitosan mempunyai kemampuan mengikat lebih kuat daripada kitin karena gugus-gugus aktifnya. Kitosan merupakan polielektrolit kationik dan polimer berantai panjang, mempunyai berat molekul besar dan reaktif karena adanya gugus amina dan hidroksil yang bertindak sebagai donor elektron. Karena sifat-sifat itu, kitosan bisa berinteraksi dengan partikel-partikel koloid (Widhi dan Sumarni, 2003).

4.2.2 Viabilitas *B. bifidum*

Hasil ANOVA pengaruh campuran kappa karaginan dan kitosan terhadap viabilitas *B. bifidum* menunjukkan adanya perbedaan yang nyata dengan $F_{hitung} > F_{5\%}$ (**Lampiran 11**), oleh sebab itu dapat disimpulkan bahwa rasio kappa karaginan dan kitosan sebagai bahan pengenkapsulat memberikan pengaruh nyata terhadap viabilitas *B. bifidum*. Pengaruh campuran kappa karaginan dan kitosan terhadap viabilitas *B. bifidum* dapat dilihat pada **Gambar 8**.



Gambar 8. Viabilitas log CFU/mL *B. bifidum* dengan perbandingan bahan pengenkapsulat (kappa:kitosan)

Gambar 8 menunjukkan bahwa viabilitas tertinggi pada perlakuan B dengan perbandingan kappa : kitosan yaitu 25% : 75% lebih tinggi dibandingkan dengan perbandingan perlakuan A, C, dan D. Onayanti *et al.*, (2004), viabilitas bakteri probiotik yang telah dienkapsulasi dengan metode *cross link* menggunakan penambahan penyalut alginat 3% dan kitosan 0,4% serta bahan tambahan berupa glycerol dan susu krim 10% menghasilkan mikro kapsul probiotik yang memiliki viabilitas tinggi hingga masa penyimpanan 6 minggu pada suhu

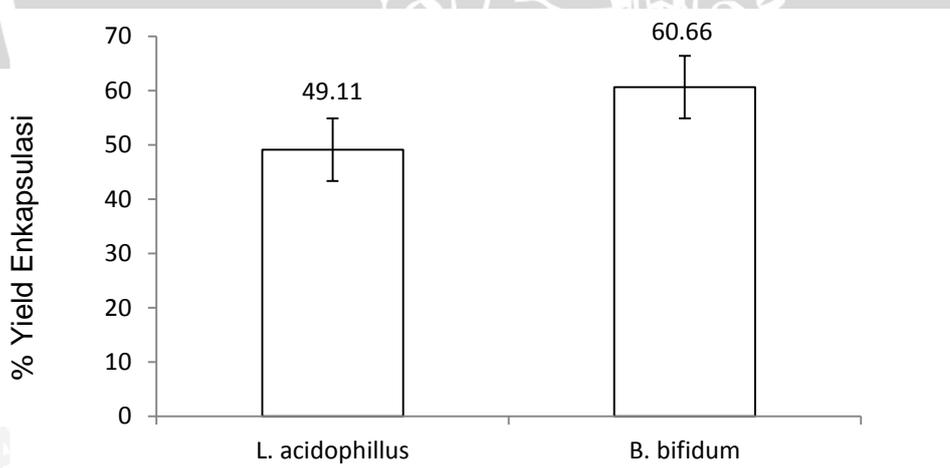
kulkas (4°C) dan pada penyimpanan suhu ruang (28°C) viabilitasnya bertahan selama 1 minggu.

Viabilitas probiotik terkapsulasi juga dapat mengalami penurunan karena adanya proses pengeringan sampai dengan dua siklus log. Viabilitas probiotik yang terkapsulasi juga dipengaruhi oleh bahan pengkapsulat yang digunakan.

Probiotik yang terkapsulasi dalam karaginan proses murni (*Refined Carageenan*) akan menghasilkan viabilitas probiotik yang lebih baik apabila dibandingkan dengan menggunakan karaginan proses semi murni (Setijawati *et al.*, 2011).

4.2.3 Yield Enkapsulasi

Yield enkapsulasi merupakan presentase perbandingan antara viabilitas sel setelah mengalami proses pengeringan enkapsulasi pada suhu 40° C selama 48 jam dengan viabilitas awal sel atau kepadatan awal sel. Yield tertinggi diperoleh enkapsulat *B. Bifidum* sebesar 60,66% sedangkan *L. Acidophilus* sebesar 49,11%. Yield enkapsulat dapat dilihat pada **Gambar 9**.

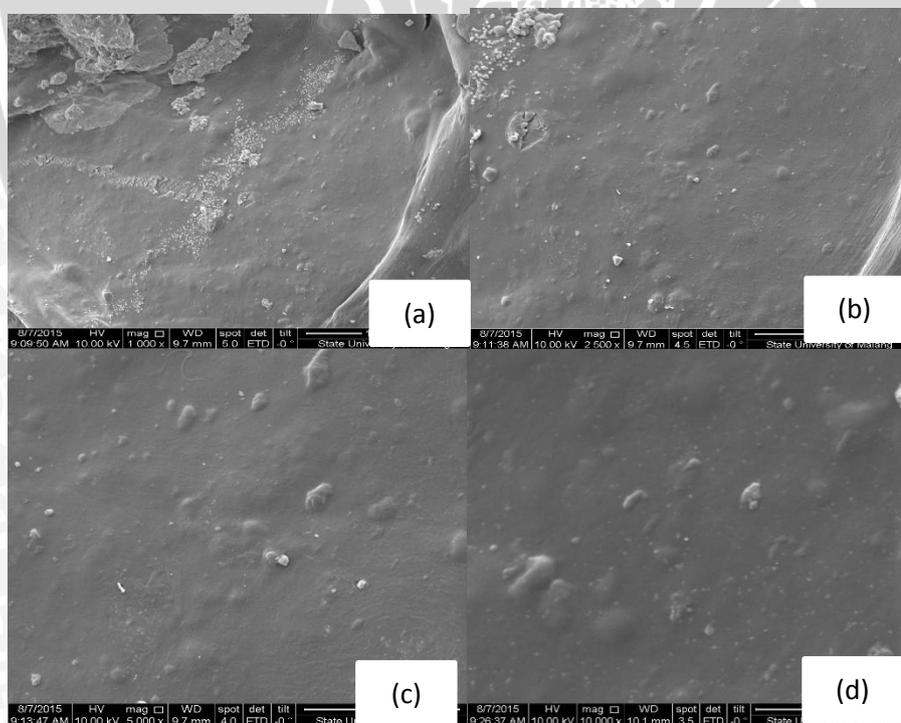


Gambar 9. Yield Enkapsulasi setelah proses pengeringan

Perbedaan persentase *L. acidophilus* dan *B. Bifidum* kemungkinan disebabkan oleh retaknya matriks enkapsulat pada saat pengeringan sehingga menyebabkan bakteri tersebut tidak mampu bertahan akibat pengaruh dari

lingkungan luar. Analisa Scanning Electron Microscope (SEM) pada mikroenkapsulasi bertujuan untuk mengetahui komparabilitas bahan yang digunakan. Menurut (Zaidar *et al.*, 2013) , dilakukan uji SEM untuk melihat komparabilitas campuran zat tambahan serta menunjukkan morfologi permukaan dari film apakah sudah merata.

Menurut Anggraeni (2008), SEM sangat cocok digunakan dalam situasi yang membutuhkan pengamatan permukaan kasar dengan pembesaran berkisar antara 20 kali sampai 500.000 kali. Sebelum melalui lensa elektromagnetik terakhir *scanning raster* mendeflesikan berkas elektron untuk menscan permukaan sampel. Hasil scan ini tersinkronisasi dengan tabung sinar katoda dan gambar sampel akan tampak pada area yang di-scan. Tingkat kontras yang tampak pada tabung sinar katoda timbul karena hasil refleksi yang berbeda-beda dari sampel. Hal tersebut dikuatkan dengan hasil pengamatan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) yang dapat dilihat pada **Gambar 10**.



Gambar 10. Scanning Electron Microscope (SEM) dengan perbesaran (a) 1000, (b) 2500, (c) 5000 dan (d) 10.000

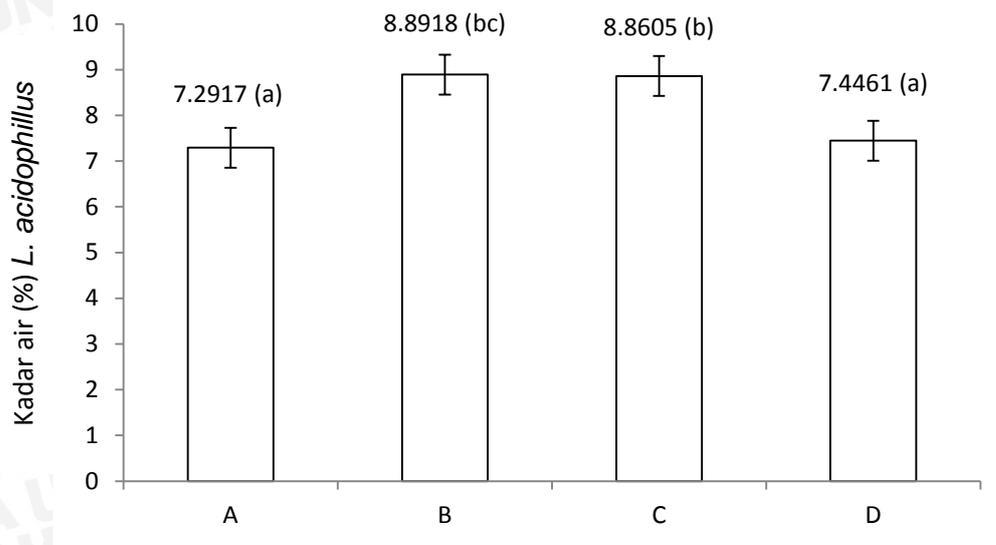
Gambar 10 menunjukkan sel-sel bakteri yang menempel pada permukaan matriks enkapsulasi jelas terdeteksi utamanya pada pada pembesaran 5.000x. Hasil SEM enkapsulat menunjukkan rata-rata diameter 2,34 μm , sehingga dapat dilihat bahwa bakteri probiotik tersebut terenkapsulasi oleh kappa dan kitosan. Menurut Antara (2010) bahwa bakteri probiotik mempunyai diameter sekitar 1,5 – 6 μm . Kim *et al.*, (2008) menambahkan bahwa menurut analisa morfologi mikrokapsul yang mengandung bakteri baik menggunakan metode beku atau kering umumnya mempunyai permukaan yang berbentuk bulat-bulat dan terdapat bakteri.

Pada gambar 10 menunjukkan enkapsulat yang dihasilkan memiliki permukaan yang bergelombang dan tidak rata. Permukaan yang tidak rata tersebut dimungkinkan karena pada tahap pembuatan enkapsulat dengan metode gel partikel dan pengeringan dengan menggunakan oven terjadi penguapan pelarut kurang seragam sehingga matriks yang telah menyerap air kehilangan kandungan air hanya pada beberapa sisinya, akibatnya terbentuk permukaan enkapsulat yang bergelombang. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Srifana *et al.*, (2014) bahwa pengeringan pada pembuatan air yang ekstrim akibat pemanasan dengan suhu tinggi yang berakibat terbentuknya lekukan-lekukan pada permukaan mikrokapsul.

4.3 Kadar air

4.3.1 Kadar air mikroenkapsulasi *L. acidophilus*

Data analisis kadar air mikroenkapsulasi dengan bahan pengenkapsulat kappa (*E. cottonii*) kitosan mix dengan penambahan *L. acidophilus* dapat dilihat pada (**Lampiran 12**). Hasil analisis data menunjukkan bahwa antar perlakuan berbeda nyata ($F < 0.05$) (**Lampiran 13**), Hasil pengujian kadar presentase kadar air ditunjukkan melalui diagram batang seperti yang terlihat pada **Gambar 11**.



Gambar 11. Kadar air mikroenkapsulasi kappa kitosan mix dengan penambahan bakteri probiotik *L. Acidophilus*

Gambar 11 menunjukkan bahwa kadar air mikroenkapsulasi kappa kitosan mix dengan penambahan bakteri probiotik *L. acidophilus* pada tiap konsentrasi berbeda. Kadar air tertinggi terdapat pada perlakuan B dengan konsentrasi kappa : kitosan = 25% : 75%. Menurut Setijawati *et al.*, (2011), hasil Analisis Fisiko Kimia *Semi Refined Carrageenan (SRC) E. cottonii* menghasilkan kadar air 10,6%, kadar abu 18,7%, total SO_4 28,8%, gel strength 1060, gelling point 25,2°C, melting point 80°C dan viskositas 180.

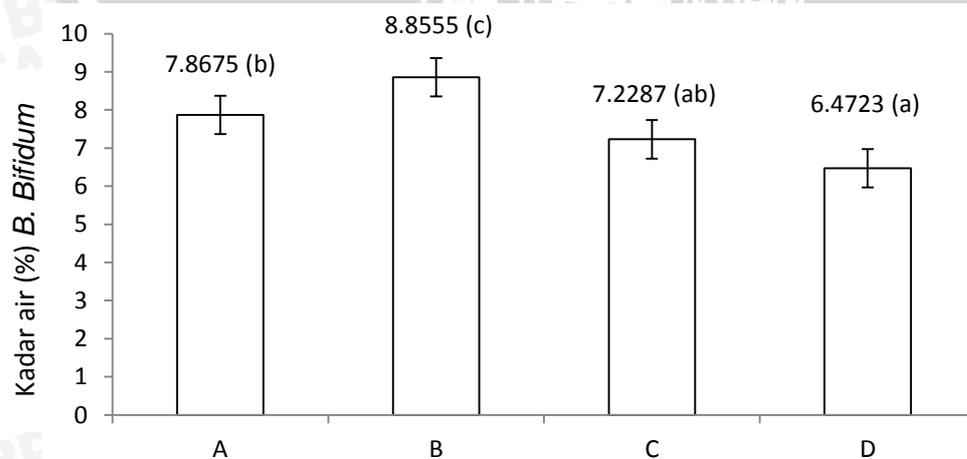
Kadar air merupakan parameter penting yang berhubungan dengan stabilitas produk selama penyimpanan. Kadar air mikrokapsul oleoresin jahe berkisar antara 1,60-3,27% dengan rata-rata 2,50%. Kisaran kadar air yang diperoleh merupakan tipikal kadar air produk mikrokapsul yang diperoleh dari spray drying (2-6%) (Reineccius, 2004). Kadar air mikrokapsul dipengaruhi oleh suhu inlet spray drying dan laju alir umpan, tetapi tidak dipengaruhi oleh keduanya.

Hasil analisis menunjukkan bahwa nilai kadar air yang dihasilkan dipengaruhi secara nyata oleh perbandingan formulasi konsentrasi kitosan yang ditambahkan. Kadar air yang dihasilkan berbanding lurus dengan hasil viabilitas *L. acidophilus* yang diperoleh, dimana perbandingan B lebih tinggi dibandingkan dengan perbandingan lainnya. Hal tersebut saling berhubungan, apabila kadar air yang dihasilkan terlalu rendah hal itu disebabkan karena banyaknya rongga atau pori-pori yang besar pada dinding enkapsulasi yang akan menyebabkan kematian pada bakteri yang dilindungi. Menurut Setiani *et al.* (2013), faktor yang mempengaruhi kadar air yaitu kelembapan udara sekitar yang berkaitan dengan tempat penyimpanan bahan, sifat, dan jenis bahan maupun perlakuan yang telah dialami oleh bahan tersebut.

4.3.2 Kadar air mikroenkapsulasi *B. bifidum*

Data analisis kadar air mikroenkapsulasi dengan bahan pengenkapsulat kappa (*E. cottonii*) kitosan mix dengan penambahan *B. bifidum* dapat dilihat pada lampiran 1. Hasil analisis data menunjukkan bahwa antar perlakuan berbeda nyata ($F < 0.05$) (**Lampiran 14**), Hasil pengujian kadar air dapat dilihat pada

Gambar 12.



Gambar 12. Kadar air mikroenkapsulasi kappa kitosan mix dengan penambahan bakteri probiotik *B. Bifidum*

Gambar 12 menunjukkan kadar air mikroenkapsulasi kappa kitosan mix dengan penambahan bakteri probiotik *B. bifidum* pada tiap konsentrasi berbeda. Kadar air tertinggi terdapat pada perlakuan B dengan konsentrasi kappa : kitosan = 25% : 75%. Penelitian yang dilakukan Osmond *et al.*, (2014), menunjukkan bahwa hasil enkapsulasi *B. longum* dengan enkapsulan susu skim memiliki kadar air sebesar 12,6%, sedangkan penambahan gum arab menghasilkan kadar air sebesar 14,63%. Enkapsulasi bakteri probiotik dengan penambahan maltodekstrin menghasilkan kadar air sebesar 9,72%. Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan adanya kadar air pada bakteri yang telah dienkapsulasi, sehingga mempengaruhi hasil kadar air.

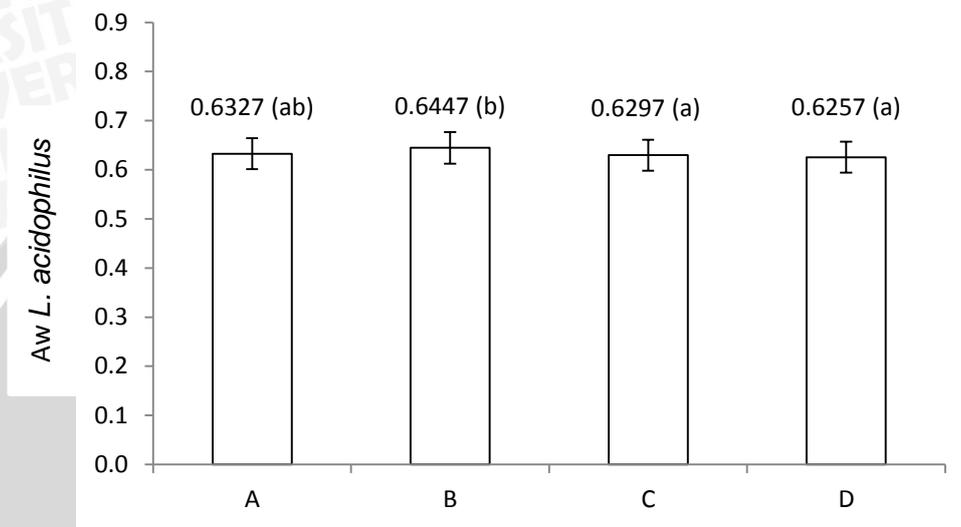
Hasil analisis menunjukkan bahwa nilai kadar air yang dihasilkan dipengaruhi secara nyata oleh perbandingan formulasi konsentrasi kitosan yang ditambahkan. Kadar air yang dihasilkan berbanding lurus dengan hasil viabilitas *B. bifidum* yang diperoleh, dimana perbandingan B lebih tinggi dibandingkan dengan perbandingan lainnya. Hal tersebut saling berhubungan, apabila kadar air yang dihasilkan terlalu rendah hal itu disebabkan karena banyaknya rongga atau pori-pori yang besar pada dinding enkapsulasi yang akan menyebabkan kematian pada bakteri yang dilindungi. Menurut Setiani *et al.*, (2013), faktor yang mempengaruhi kadar air yaitu kelembapan udara sekitar yang berkaitan dengan tempat penyimpanan bahan, sifat, dan jenis bahan maupun perlakuan yang telah dialami oleh bahan tersebut.

4.4 Aktivitas Air (A_w)

4.4.1 A_w *L. acidophilus*

Hasil ANOVA pengaruh campuran kappa karaginan dan kitosan terhadap aktivitas air (A_w) *L. acidophilus* menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata dengan $F_{hitung} > F_{5\%}$, (**Lampiran 15**), oleh sebab itu dapat disimpulkan

bahwa rasio kappa karaginan dan kitosan sebagai bahan pengenkapsulat memberikan pengaruh yang sangat berbeda nyata terhadap kadar Aw *L. acidophilus*. Pengaruh campuran kappa karaginan dan kitosan terhadap kadar Aw *L. acidophilus* dapat ditunjukkan melalui diagram batang seperti yang terlihat pada **Gambar 13**.



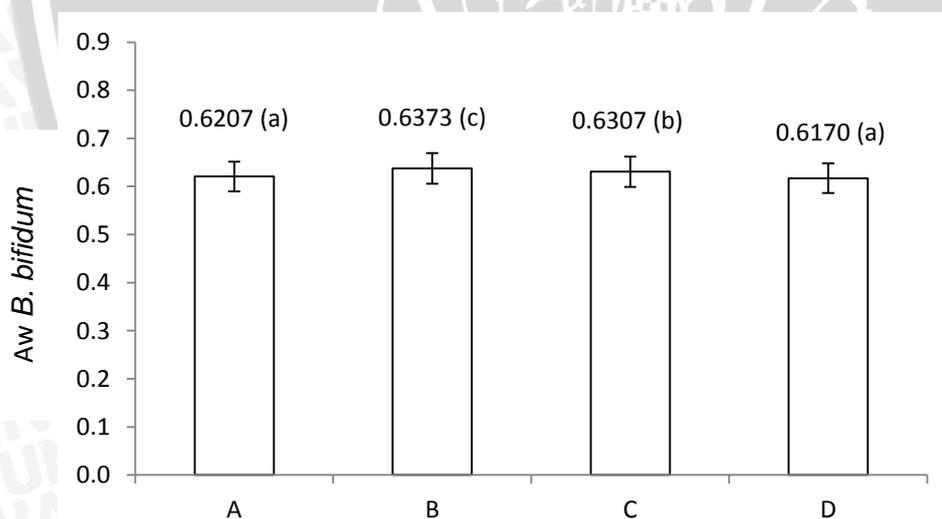
Gambar 13. aW *L. acidophilus* dengan perbandingan bahan pengenkapsulat kappa kitosan mix.

Gambar 13 menunjukkan bahwa aktivitas air pada perlakuan B dengan perbandingan kappa : kitosan yaitu 25% : 75% lebih tinggi dibandingkan dengan perbandingan yang lain. Aktivitas air merupakan parameter penting yang menentukan kestabilan produk selama penyimpanan, khususnya karakteristik pelepasan bahan aktif dari dalam mikrokapsul. Nilai aw berhubungan dengan tingkat hidrasi dalam bahan yang mempengaruhi molecular mobility komponen-komponen penyusun bahan pengkapsul. Aktivitas air mikrokapsul yang dihasilkan berkisar antara 0,276-0,436. Pada rentang nilai aw tersebut, diduga bahan pengkapsul berada pada status glassy dimana pelepasan bahan volatil dari dalam mikrokapsul mengikuti mekanisme difusi Ficks dengan laju yang rendah (Yuliani *et al.*, 2007).

Aktivitas air yang dihasilkan berbanding lurus dengan hasil viabilitas *L. acidophilus* yang diperoleh, dimana perbandingan B lebih tinggi dibandingkan dengan perbandingan lainnya. Hal tersebut saling berhubungan, karena aktivitas air sangat mempengaruhi pertumbuhan bakteri yang ada didalamnya. Aktivitas air atau Aw mampu menunjukkan jumlah air bebas di dalam pangan yang dapat digunakan oleh mikroba untuk pertumbuhannya.

4.4.2 Aw *B. bifidum*

Hasil ANOVA pengaruh campuran kappa karaginan dan kitosan terhadap aktivitas air (Aw) *B. bifidum* menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata dengan $F_{hitung} > F_{5\%}$ (**Lampiran 16**), oleh sebab itu dapat disimpulkan bahwa rasio kappa karaginan dan kitosan sebagai bahan pengenkapsulat memberikan pengaruh yang sangat berbeda nyata terhadap kadar Aw *B. bifidum*. Pengaruh campuran kappa karaginan dan kitosan terhadap kadar Aw *B. bifidum* dapat ditunjukkan melalui diagram batang seperti yang terlihat pada **Gambar 14**.



Gambar 14. Aw *B. bifidum* dengan perbandingan bahan pengenkapsulat kappa kitosan mix.

Gambar 14 menunjukkan bahwa aktivitas air tertinggi pada perlakuan B dengan perbandingan kappa : kitosan yaitu 25% : 75%. Nilai aw produk ini

berhubungan dengan kemampuan penyalut mempertahankan bahan aktif tetap di dalam kapsul atau menjadi suatu indikasi pelepasan bahan aktif. Nilai aw yang tinggi menjadi indikator adanya pelepasan bahan aktif yang jumlahnya lebih besar dari pada nilai aw yang relatif lebih rendah. Namun demikian, pada hidrasi yang lebih lanjut, bahan aktif akan kembali terenkapsulasi yang dikenal dengan istilah *reencapsulating* (Yuliani *et al.*, 2007)

Air yang dihasilkan berbanding lurus dengan hasil viabilitas *B. bifidum* yang diperoleh, dimana perbandingan B lebih tinggi dibandingkan dengan perbandingan lainnya. Hal tersebut saling berhubungan, karena aktivitas air sangat mempengaruhi pertumbuhan bakteri yang ada didalamnya. Aktivitas air atau Aw mampu menunjukkan jumlah air bebas di dalam pangan yang dapat digunakan oleh mikroba untuk pertumbuhannya.



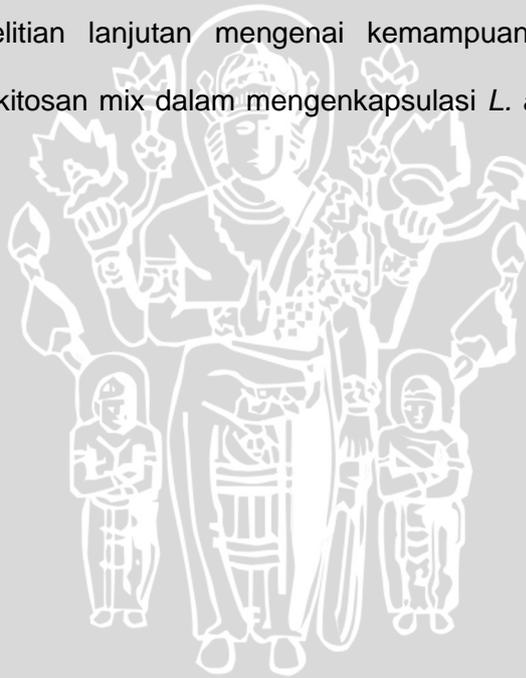
5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa H_1 diterima pada taraf signifikansi 1% dan 5%. Sehingga disimpulkan bahwa rasio kappa dan kitosan yang berbeda memberikan pengaruh nyata terhadap viabilitas probiotik. Hasil tertinggi untuk viabilitas *L. acidophilus* dan *B. Bifidum* yang terenkapsulat kappa karaginan dan kitosan dengan perbandingan 25% : 75% sebesar 4,4158 CFU/g dan 5,45965 CFU/g.

5.2 Saran

Perlunya penelitian lanjutan mengenai kemampuan bahan penyalut kappa karaginan dan kitosan mix dalam mengenkapsulasi *L. acidophilus* dan *B. bifidum*.



DAFTAR PUSTAKA

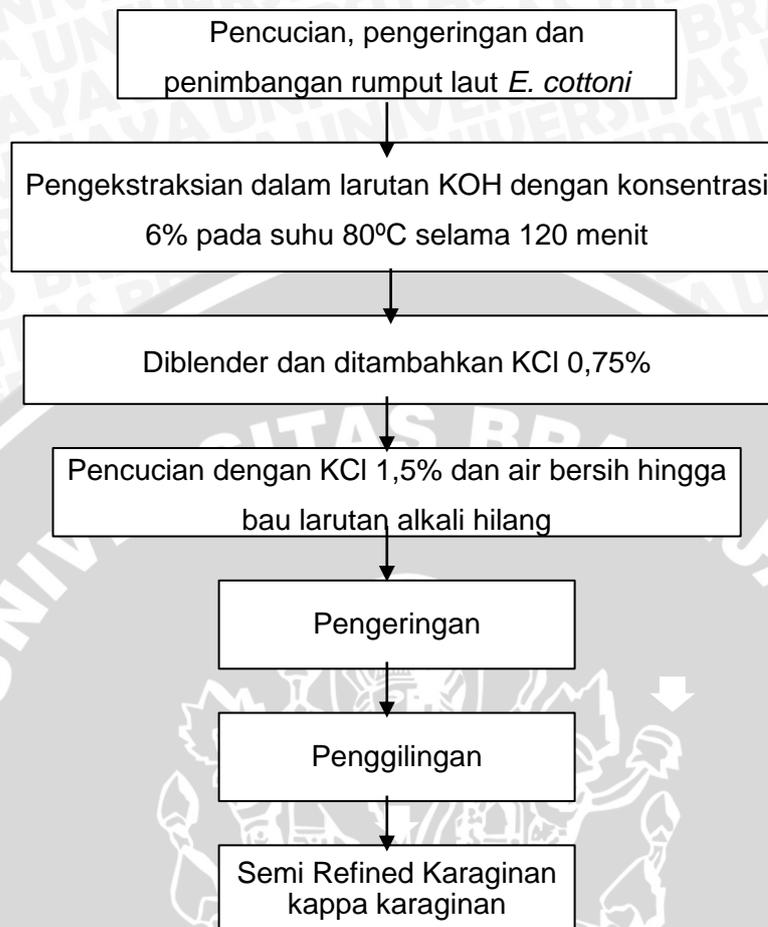
- Abad, Lucille V, A. B., Fernando, L. S. Relleve, Montefalcon, D. R. V., Girlie, E. P. Lopez. 2015. Characterization of low molecular weight fragments from gamma irradiated κ -carrageenan used as plant growth promoter. Radiation Physics and Chemistry. Vol. 10. No 2.
- Anam, C., Sirojudin, K., Sofian F. 2007. Analisis Gugus Fungsi Pada Sampel Uji, Bensin Dan Spiritus Menggunakan Metode Spektroskopi FTIR. Jurnal. Jurusan Fisika Fakultas MIPA UNDIP. Vol 10., No.1 hal 79-85.
- Anggadiredja, J. 2006. Rumput Laut. Penebar Swadaya. Jakarta. Hal: 134.
- Anggraeni, S dan Prangdimurti, E. 2011. Effect Of Temperature And Duration Time Of Brewing Black Tea (*Camellia sinensis*) Also Digestion Process In Vitro Concerning Inhibition Of Alpha Amylase And Alpha Glucosidase Activity In Vitro. Skripsi. IPB. Bogor.
- Anggriani, R., Iskandar dan A. Taofiqurrohman. 2012. Efektifitas Penambahan Bacillus sp. Hasil isolasi dari saluran pencernaan ikan patin pada pakan komersial terhadap kelangsungan hidup dan Pertumbuhan Benih Ikan Nila Merah (*Oreochromis niloticus*). Jurnal Perikanan dan Kelautan. 3 (3): 75-83.
- Antara, Nyoman Semadi. 2010. Pemilihan dan Penanganan Starter Yoghurt di Tingkat Industri. Universitas Udayana Kampus Bukit Jimbaran: Bali.
- Ariandy, F. N., Rico A., Evi F. 2011. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Probiotik dari Saluran Pencernaan Ayam Kampung (*Gallus domesticus*). IPB: Bogor.
- Arief, I., B. Laksmi, dan Astawan. 2010. Efektifitas Probiotik *Lactobacillus plantarum* 2C12 dan *Lactobacillus acidophilus* 2B4 Sebagai Pencegah Diare pada Tikus Percobaan. Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor. Media Peternakan Desember 2010. Halaman 137-143.
- Arief, M. 2014. Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Probiotik pada Simulasi Saluran Pencernaan Manusia terhadap Viabilitas Probiotik. Skripsi Program Studi Teknologi Hasil Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Distantina, S., Fadilah, Rochmadi, M.Fahrurrozi, Wiratni. 2010. Proses Ekstraksi Karagenan Dari *Eucheuma cottonii*. Seminar Rekayasa Kimia dan Proses. ISSN:1411-4216
- FAO, Food and Agricultural Organization. 2001. "Description Functional Uses" 9.
- Feliatra. 2004. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan. 6(2): 75-80

- Fuller, R. 1989. Probiotics in Man and Animal. *Journal of Applied Bacteriology*. Vol.66. Halaman 365-378.
- Garrity, George M, Julia A Bell, Timothy G Lilburn, and East Lansing. 2004. *Taxonomic Outline Of The Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer.
- Habililah, M. F. 2009. Pengaruh Variasi Konsentrasi Dan Perbandingan Starter Bakteri (*Lactobacillus acidophilus*) dan (*Bifidobacterium bifidum*) Terhadap Kualitas Yogurt Susu Kambing. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang. Halaman 1-95.
- Harmayani E, Ngatirah, Rahayu ES, Utami T. 2001. Ketahanan dan Viabilitas Probiotik Bakteri Asam Laktat selama Proses Pembuatan Kultur Kering dengan Metode Freeze dan Spray Drying. *Jurnal. Teknologi dan Industri Pangan*. XII: 126-132.
- Istini,S. Dan A. Zatznika. 2007. Pengaruh Jenis dan Konsentrasi *Semi-Refined Carrageenan (SRC)* Sebagai Stabilisator Terhadap Kualitas Es Krim. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*. Vol.9. Hal.27-33
- Istiyani, Khoirul, 2008, Mikroenkapsulasi Insulin untuk Sediaan Oral Menggunakan Metode Emulsifikasi dengan Penyalut Natrium Alginat dan Kitosan, Skripsi, Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok.
- Kasim, S. 2013. Rendemen Karaginan Yang Diperoleh Dari Rumput Laut Jenis *Eucheuma spinosum* Asal Kota Bau-Bau. *Majalah farmasi dan Farmakologi*. Vol. 17. No. 4.
- Kim, Se-jin, Seung Yong, Sae Hun, Ok-ja Song, li-shik Shin, Dong Su, and Hyun Jin. 2008. "Effect of Microencapsulation on Viability and Other Characteristics in *Lactobacillus Acidophilus* ATCC 43121." *Food Science and Technology* 41: 493–500.
- Kudra T., dan Ratti, C. 2006. Foam-mat Drying Energy and Cost Analyses. *Canadian Biosystems Engineering*. 48 (3):27-32.
- Magfirah, Risco G.Budji, Sartini. 2013. Viability Test From Digestivetract of Broiler Ducks *Anas domesticus* Encapsulated Spray Drying Method. Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Mahatmanti, W.F., Warian, S., Wisnu, S. 2008. Sintesis Kitosan dan Pemanfaatannya Sebagai Anti Mikroba Ikan Segar. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Semarang.
- Manojlovic, Verica, Viktor A Nedovic, and Kasipathy Kailasapathy. 2010. "Encapsulation of Probiotics for Use in Food Products." In *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, edited by N.J. Zuidam and V.A. Nedovic, 269–302.

- Mariana, E. dan H. Susanti. 2012. Pengaruh Suplementasi Tepung Terigu Terhadap Pertumbuhan dan Laju Pengasaman Probiotik *Lactobacillus acidophilus*. Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia. 4 (3): 14-19.
- Mindarwati, Endang. 2006. Kajian Pembuatan Edible Film Komposit dari Karagenan sebagai Pengemas Bumbu Mie Instant Rebus. Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- Nakorn, P.N. 2008. *Chitin nanowhisker and chitosan nanoparticles in protein immobilization for biosensor applications*. Journal of Metals, Materials and Minerals. Vol. 18. No. 2.
- Nazzaro, Filomena, Pierangelo Orlando, Florinda Fratianni, and Raffaele Coppola. 2012. "Microencapsulation in Food Science and Biotechnology." Current Opinion in Biotechnology 23. Elsevier Ltd: 182–86.
- Nisa, F. Joni, N. Dan Ruth, C. 2009. Viabilitas dan Deteksi Subletal Bakteri Probiotik pada Susu Kedelai Fermentasi Instan Metode Pengeringan Beku. Jurnal Teknologi Pertanian vol.9: 40-51.
- Onayanti, Nur., Risco G.B., dan Sartini . 2004. Uji Viabilitas Probiotik Asal Saluran Pencernaan Itik Pedaging *Anas domestica* yang Dienkapsulasi Dengan Metode Cross Link. Jurnal. Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Osmond, L.M. Purwijantiningih, F. Sinung Pranata. 2008. Viability Of Bacteria and Probiotics Candy Quality With Variations In The Type of Encapsulant. Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta.
- Pebrianata, E. 2005. Pengaruh Pencampuran Kappa dan Iota Karaginan terhadap Kekuatan Gel dan Viskositas Karaginan Campuran. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB : Bogor
- Pebriani, R.H., Yetria, R., Zulhadjri. 2012. Modifikasi Komposisi Kitosan Pada Proses Sintesis Komposit Tio²-Kitosan. Jurnal Kimia Unand, Universitas Andalas : Padang. Vol. 1 No. 1
- Prasetyowati, Corrine Jasmine A., Devi A. 2008. Pembuatan Tepung Karaginan dari Rumput Laut (*Euचेuma cottonii*) Berdasarkan Perbedaan Metode Pengendapan. Jurnal Teknik Kimia. No.2, Vol.15.
- Prescott, L., Harley, J. And Klein, D.A. 2002. Microbiology 5th Edition. McGraw Hill.820-950.
- Ramaswamy, H. Dan Marcotte, M. 2006. Food Processing Principles and Applications. Boca Raton: CRC Press. P 295-296
- Reineccius, G.A. 2004. Multiple-core encapsulation: The Spray drying of Food Ingredients. Leatherhead Internasional Limited, United Kingdom. 151-185.

- Reksohadwinoto, Budhi S. 2014. Mengenal Kinerja Probiotik: Produk, Aplikasi, & Mekanisme Kerja . Artikel Sains.
- Rizqiati, H. Jenie, H. Dan Nurhidaya. 2009. Karakteristik Mikrokapsul Probiotik *Lactobacillus plantarum* yang Dienkapsulasi dengan Susu Skim dan Gum Arab. *Journal Indonesian Tropical Agriculture* vol.34: 139-144.
- Rokka, Susanna, and Pirjo Rantamäki. 2010. Protecting Probiotic Bacteria by Microencapsulation: Challenges for Industrial Applications. *Eur Food Res Technol* 231: 1–12.
- Sedjati, Sri. 2006. Pengaruh Konsentrasi Kitosan terhadap Mutu Ikan Teri (*Stolephorus heterolobus*) Asin Keing Selama Penyimpanan Suhu Kamar. Universitas Diponegoro. Semarang. 113 hlm.
- Setiani, W., T. Sudiarti., Rahmidar, L. 2013. Preparasi dan karakterisasi edible film dari poliblend pati sukun – kitosan. *Jurnal Valensi*. Vol 3. No. 2.
- Setijawati, Dwi, Susinggih Wijana, and Imam Santosa. 2011. “Viabilitas Dan Struktur Mikrokapsul *Lactobacillus acidophilus* Dengan Bahan Penyalut Karaginan Semi Murni Jenis *Eucheuma cottoni*.” *Jurnal Teknologi Pangan* 2 (1): 50–67.
- Siracusa V ,Roculli P., Romanis, Rosa M.D. 2008. Biodegradable Polymers For Food Packaging: A Review *Trends in Food Science and Technology*: 634-643.
- Sobariah, Enok., Ali K., dan Ingrid S. 2007. Viabilitas Bakteri Probiotik In-Vitro dan Pengaruh Pemberian Air Oksigen Terhadap Pertumbuhan Bakteri Probiotik Secara In-Vivo. *Jurnal Gizi Pangan*2 (1): 22-28.
- Srifiana, Y., S. Surini., A. Yanuar. 2014. Mikroenkapsulasi Ketoprofen dengan Metode Koaservasi dan Semprot Kering Menggunakan Pragelatinisasi Pati Singkong Flatat sebagai Eksipien Penyalut. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 12 (2): 162-169.
- Sunarlim, Roswita Dan Setiyanto. 2008. Pengaruh Kombinasi *Lactobacillus acidophilus* Dengan Starter Yoghurt (*Lacobacillus bulgarius* dan *Streptococcus thermophilus*) Terhadap Mutu Susu Fermentasi. Seminar Nasional Teknologi Peternakan Dan Veteriner.
- Susanto, Agus. 2009. Uji Korelasi Kadar Air Kadar Abu *Water Activity* dan Bahan Organik Pada Jagung Di Tingkat Petani, Pedagang Pengumpul dan Pedagang Besar. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Vateriner*.
- Sutinah. 2003. Optimalisasi Konsentrasi Susu Tempe Dan pH Terhadap Viabilitas Bakteri Probiotik Pada Frozen Yogurt. Laporan Skripsi Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang. 80 hal.

- Triana, E. E, Yulianto. N, Nurhidayat. 2006. Uji Viabilitas *Lactobacillus sp.* Mar 8 Terenkapsulasi. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Bogor. Halaman 114-117.
- Villanueva, R.D., Mendoza W.G., Rodrigueza, M.R.C., Romero J.B., Montano M.N.E. 2004. Structure and functional performance of gigtartinean kappa-iota hybrid carrageenan and solieriacean kappa-iota carrageenan blends. Food Hydrocolloids. Vol.18.
- Wardaniati, Ratna Adi dan Setyaningsih. 2007. Pembuatan Chitosan Dari Kulit Udang dan Aplikasinya Untuk Pengawetan Bakso. Universitas Diponegoro : Semarang.
- Widarnani, D. Wahjuningrum dan F. Puspita. 2012. Aplikasi Bakteri Probiotik Melalui Pakan Buatan untuk Meningkatkan Kinerja Pertumbuhan Udang Windu *Penaeus monodon*. Jurnal Sains Terapan. 2 (1):32-49.
- Widodo, Soeparno, dan Endang Wahyuni. 2003. Bioencapsulation of Probiotics (*Lactobacillus casei*) with Pollard and Wheat Flour and its Roles for the Acidification Rate and Viability. Jurnal.Tekno. dan Industri Pangan, Vol. XIV, No. 2.
- Wiyarsi, Antuni dan Erfan Priyambodo, 2008. Pengaruh Konsentrasi Kitosan dari Cangkang Udang Terhadap Efisiensi Penjerapan Logam Berat. Jurusan Pendidikan Kimia UNY.
- Yuliani, S., dan Harimurti, N. 2007. Pengaruh Laju Alir Umpan dan Suhu Inlet Spray Drying Pada Karakteristik Mikrokapsul Oleorisin Jahe, Jurnal Pascapanen, 4(1), 18-26.
- Yuliani, S., Torley, J, P., Bhandari, B. 2013. Mikroenkapsulasi d-Limonen untuk Perisaan Produk Ekstruksi. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian Bogor.Bogor
- Zubaedah, E., Kusnadi, J., Andriastuti, I. 2003. Pembuatan Laru Yoghurt dengan Metode Foam-Mat Drying Kajian Penambahan Busa Putih Telur Terhadap Sifat Fisik Dan Kimia. Jurnal Teknologi dan Teknologi dan Idustri Pangan. Vol.14, No.3. Halaman 258-261.

Lampiran 1. Pembuatan Semi Refined Carageenan (SRC) *E. cottoni*

Lampiran 2. Foto Proses Pembuatan Kappa Karaginan



1. Pencucian rumput laut *E.cottoni*



4. Pengekstrasian dalam larutan KOH Dengan konsentrasi 6% pada suhu 80°C Selama 120 menit



2. Pengeringan rumput laut *E.cottoni*



5. Diblender dan ditambahkan KCl 0,75%



3. Penimbangan rumput laut *E.cottoni*



6. Pencucian dengan KCl 1,5% dan air bersih hingga bau larutan alkali hilang



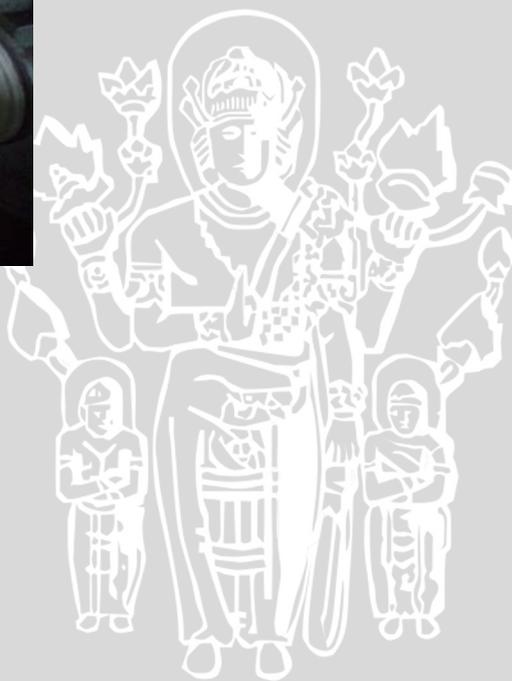
7. Pengeringan



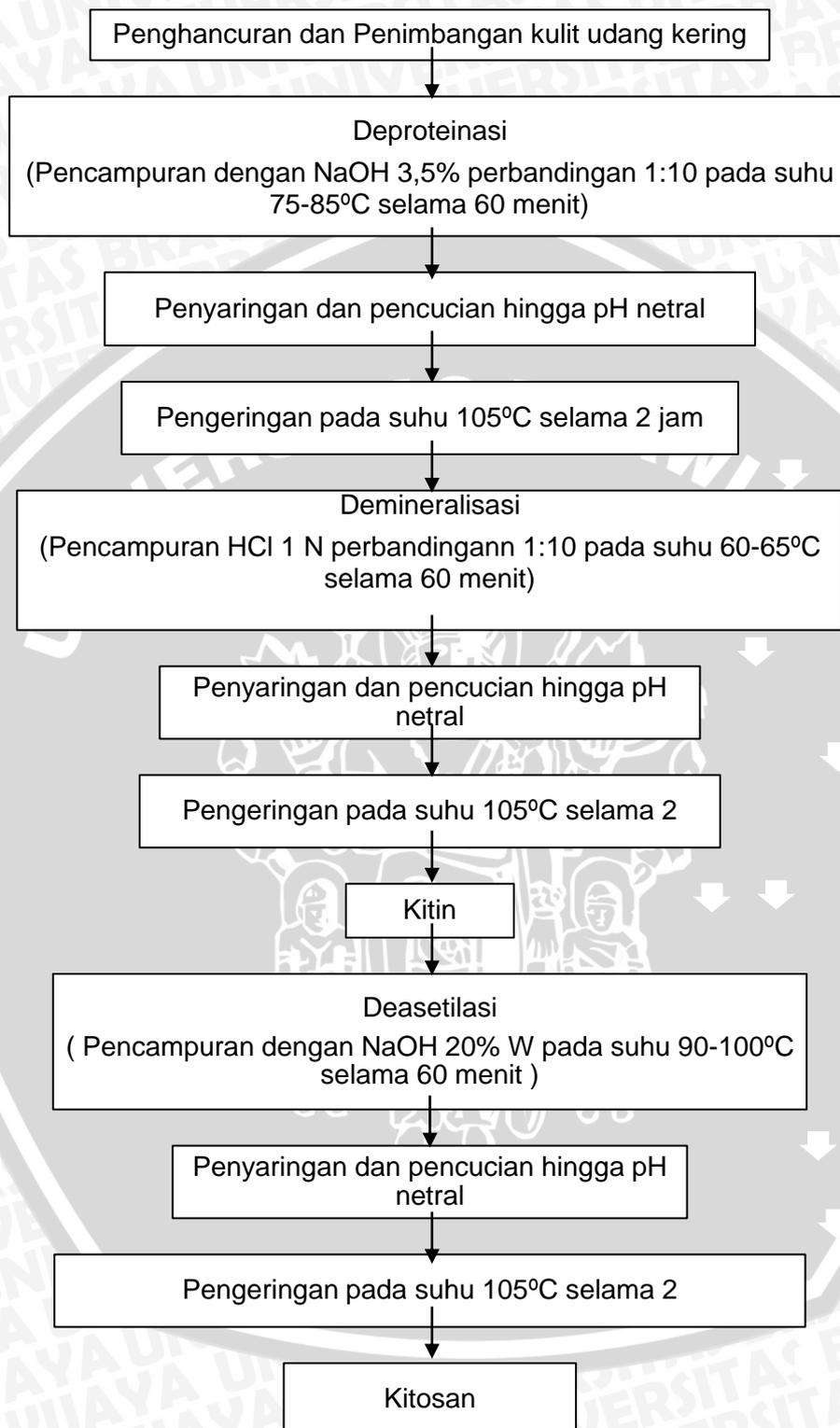
8. Penggilingan



9. Semi Refined Karaginan kappa karaginan



Lampiran 3. Pembuatan Kitosan



Lampiran 4. Foto Proses Pembuatan Kitosan



1. Penghancuran dan penimbangan kulit udang kering



4. Pengeringan pada suhu 105°C selama 2 jam



2. Deproteinasi (Pencampuran dengan perbandingan 1:10 Pada suhu 75-85°C selama 60 menit



5. Demineralisasi NaOH 3,5% (Pencampuran HCl 1 N perbandingan 1:10 pada suhu 60-65°C selama 60 menit



3. Penyaringan dan pencucian hingga pH netral



6. Penyaringan dan pencucian hingga pH netral





7. Pengeringan pada suhu 105°C pencucian selama 2 jam



10. Penyaringan dan hingga pH netral



8. Kitin



11. Pengeringan pada suhu 105°C selama 2 jam



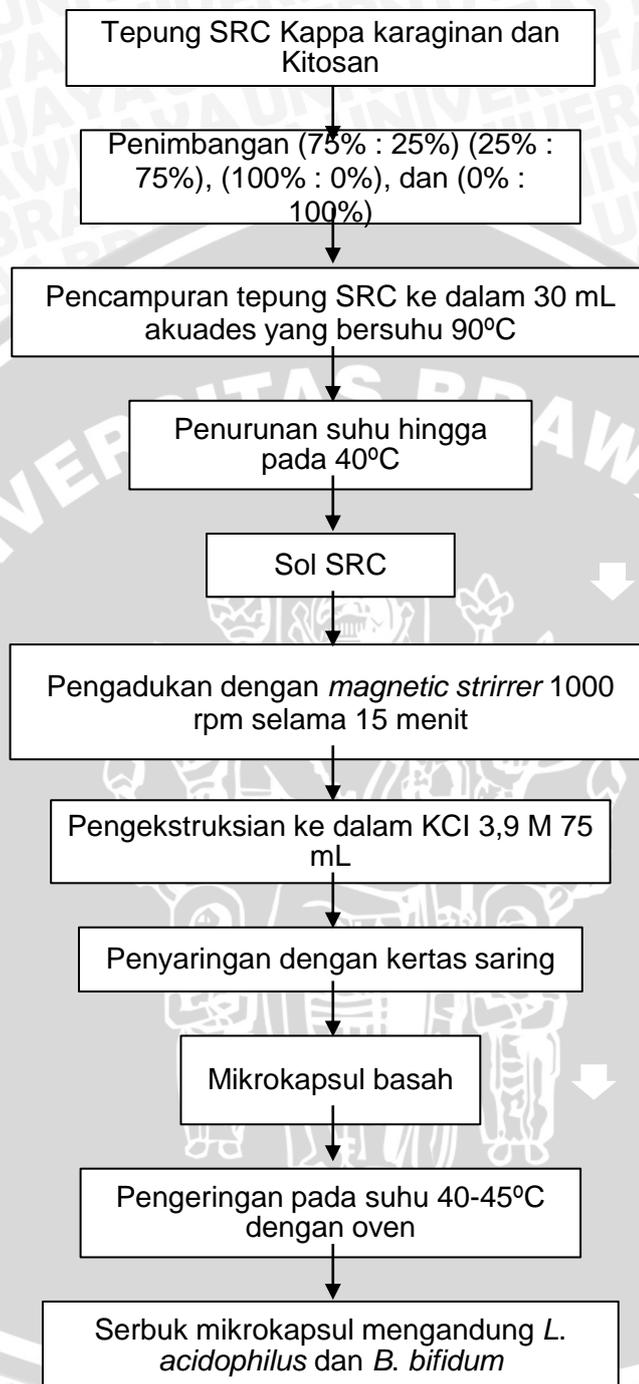
9. Deasetilasi (pencampuran dengan NaOH 20% W pada suhu 90-100°C selama 60 menit



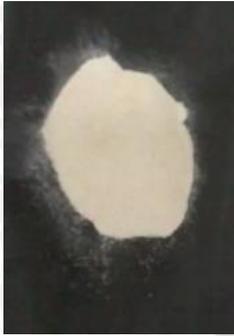
12. Kitosan



Lampiran 5. Pembuatan Mikro kapsul dengan metode gel partikel foam mat
(Arif, 2014)



Lampiran 6. Pembuatan mikrokapsul metode gel partikel *foam mat drying*



1. Tepung SRC kappa dan kitosan



4. Penurunan suhu hingga pada suhu 40°C



2. Penimbangan Perbandingan kappa dengan kitosan



5. Sol SRC



3. Pencampuran tepung SRC ke dalam 30 mL akuades yang bersuhu 80°C



6. Penambahan kultur *L. acidophilus* (30 mL) dan *B. bifidum* (30 mL)





7. Pengadukan dengan *magnetic stirrer* 1000 rpm selama 15 menit



11. Mikro kapsul basah



8. Pengekstruksian ke dalam KCl 3,9 M 75 mL



12. Pengeringan dengan oven pada suhu 40°C



9. Penyaringan dengan kertas saring



13. Mikro kapsul kering



10. Penambahan 17,5% busa putih telur dari total residu

Lampiran 7. Spectra FT-IR SRC *E.cottoni*

| | Peak | Intensity | Corr. Inte | Base (H) | Base (L) | Area | Corr. Are |
|----|---------|-----------|------------|----------|----------|--------|-----------|
| 1 | 580.53 | 46.742 | 1.818 | 594.03 | 551.6 | 13.533 | 0.333 |
| 2 | 609.46 | 46.798 | 2.832 | 651.89 | 594.03 | 17.463 | 0.516 |
| 3 | 705.9 | 45.006 | 7.782 | 727.11 | 680.83 | 14.331 | 1.539 |
| 4 | 734.83 | 50.253 | 3.25 | 763.76 | 727.11 | 9.567 | 0.582 |
| 5 | 848.62 | 49.948 | 17.635 | 862.12 | 819.69 | 8.826 | 2.403 |
| 6 | 873.69 | 56.987 | 5.031 | 889.12 | 862.12 | 6.079 | 0.505 |
| 7 | 929.63 | 41.745 | 26.73 | 954.7 | 898.77 | 15.402 | 6.031 |
| 8 | 1070.42 | 24.166 | 22.456 | 1116.71 | 956.63 | 72.521 | 26.103 |
| 9 | 1159.14 | 36.887 | 6.918 | 1182.28 | 1141.78 | 15.897 | 1.479 |
| 10 | 1259.43 | 29.753 | 16.712 | 1326.93 | 1182.28 | 63.311 | 15.135 |
| 11 | 1380.94 | 36.747 | 1.445 | 1386.72 | 1328.86 | 21.923 | 0.278 |
| 12 | 1429.15 | 26.445 | 3.574 | 1444.58 | 1388.65 | 28.941 | 1.374 |
| 13 | 1454.23 | 27.272 | 0.684 | 1558.38 | 1452.3 | 38.266 | -1.081 |
| 14 | 1654.81 | 25.773 | 46.591 | 1785.96 | 1566.09 | 76.494 | 47.106 |
| 15 | 2108.05 | 68.935 | 9.753 | 2229.56 | 1957.61 | 36.348 | 8.406 |
| 16 | 2918.1 | 26.877 | 5.817 | 2939.31 | 2578.65 | 84.841 | 2.975 |
| 17 | 2954.74 | 28.504 | 1.06 | 3001.03 | 2941.24 | 31.17 | 0.414 |
| 18 | 3404.13 | 10 | 0.146 | 3411.84 | 3373.27 | 38.286 | 0.133 |



Lampiran 8. Spectra FT-IR Kitosan

| | Peak | Intensity | Corr. Inte | Base (H) | Base (L) | Area | Corr. Are |
|----|-------------|------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------------|------------------|
| 1 | 528.46 | 43.346 | 0.94 | 536.17 | 433.95 | 32.789 | 0.583 |
| 2 | 615.25 | 38.417 | 2.079 | 651.89 | 594.03 | 23.291 | 0.726 |
| 3 | 661.54 | 41.439 | 1.648 | 852.48 | 653.82 | 54.445 | 2.743 |
| 4 | 898.77 | 50.422 | 8.89 | 916.12 | 881.41 | 9.161 | 1.285 |
| 5 | 946.98 | 44.467 | 2.476 | 952.77 | 916.12 | 10.889 | 0.274 |
| 6 | 1031.85 | 28.141 | 3.488 | 1049.2 | 952.77 | 46.563 | 3.604 |
| 7 | 1074.28 | 27.588 | 2.541 | 1137.92 | 1049.2 | 47.583 | 2.567 |
| 8 | 1153.35 | 31.142 | 9.408 | 1190 | 1139.85 | 20.974 | 3.216 |
| 9 | 1199.64 | 58.081 | 3.927 | 1218.93 | 1191.93 | 5.677 | 0.353 |
| 10 | 1263.29 | 56.742 | 3.943 | 1274.86 | 1218.93 | 11.826 | 0.61 |
| 11 | 1317.29 | 40.519 | 10.963 | 1344.29 | 1276.79 | 22.911 | 4.037 |
| 12 | 1379.01 | 32.646 | 8.193 | 1398.3 | 1346.22 | 21.877 | 2.246 |
| 13 | 1423.37 | 31.932 | 10.078 | 1500.52 | 1400.22 | 40.462 | 6.718 |
| 14 | 1566.09 | 32.581 | 9.631 | 1598.88 | 1502.44 | 39.075 | 5.368 |
| 15 | 1658.67 | 22.859 | 32.007 | 1784.03 | 1600.81 | 59.816 | 19.829 |
| 16 | 2140.84 | 67.773 | 14.223 | 2306.71 | 1903.61 | 49.621 | 16.896 |
| 17 | 2881.45 | 15.51 | 3.381 | 2906.53 | 2356.85 | 217.151 | 2.072 |
| 18 | 2921.96 | 15.735 | 0.858 | 2991.39 | 2908.45 | 63.48 | 0.83 |
| 19 | 3433.06 | 10.001 | 0.019 | 3434.98 | 3423.41 | 11.552 | 0.004 |



Lampiran 9. Data hasil penelitian utama

| <i>L. acidophilus</i> | A1(1) | A1(2) | A2(1) | A2(2) | B1(1) | B1(2) | B2(1) | B2(2) | C1(1) | C1(2) | C2(1) | C2(2) | D1(1) | D1(2) | D2(1) | D2(2) |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 2 | 203 | 201 | 197 | 200 | 240 | 233 | 234 | 228 | 201 | 199 | 198 | 204 | 217 | 203 | 221 | 230 |
| 3 | 32 | 27 | 32 | 25 | 40 | 19 | 22 | 37 | 30 | 29 | 49 | 8 | 33 | 25 | 29 | 28 |
| 4 | 20 | 10 | 5 | 7 | 9 | 11 | 45 | 32 | 17 | 7 | 19 | 3 | 15 | 8 | 12 | 3 |
| 5 | 2 | 0 | 2 | 1 | 2 | 4 | 7 | 5 | 1 | 0 | 1 | 2 | 1 | 4 | 2 | 1 |
| | 0.232 | | 0.227 | | 0.266 | | 0.261 | | 0.230 | | 0.230 | | 0.239 | | 0.254 | |

| <i>B. bifidum</i> | A1(1) | A1(2) | A2(1) | A2(2) | B1(1) | B1(2) | B2(1) | B2(2) | C1(1) | C1(2) | C2(1) | C2(2) | D1(1) | D1(2) | D2(1) | D2(2) |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 2 | 504 | 420 | 442 | 420 | 812 | 980 | 752 | 824 | 370 | 385 | 401 | 242 | 640 | 820 | 604 | 567 |
| 3 | 120 | 130 | 138 | 127 | 294 | 260 | 245 | 254 | 170 | 66 | 155 | 51 | 244 | 221 | 205 | 210 |
| 4 | 25 | 30 | 3 | 11 | 20 | 39 | 10 | 32 | 3 | 10 | 8 | 7 | 27 | 30 | 30 | 25 |
| 5 | 1 | 10 | 0 | 2 | 2 | 5 | 1 | 2 | 0 | 5 | 1 | 0 | 5 | 2 | 2 | 0 |
| | 1.250 | | 1.325 | | 2.770 | | 2.495 | | 1.245 | | 1.110 | | 2.610 | | 2.350 | |

Keterangan : A = kappa : kitosan = 75% : 25%
 B = kappa : kitosan = 25% : 75%
 C = kappa : kitosan = 0% : 100%
 D = kappa : kitosan = 100% : 0%

| Perlakuan | <i>Lactobacillus acidophilus</i> | | <i>N₀ (log CFU/mL)</i> | |
|-----------|----------------------------------|-------|-----------------------------------|--------|
| | <i>N₀ (CFU/mL)</i> | | 1 | 2 |
| A | 0.232 | 0.227 | 4.3646 | 4.3560 |
| B | 0.266 | 0.261 | 4.4249 | 4.4158 |
| C | 0.230 | 0.230 | 4.3608 | 4.3608 |
| D | 0.239 | 0.254 | 4.3784 | 4.4048 |

| Perlakuan | <i>Bifidobacterium bifidum</i> | | <i>N₀ (log CFU/mL)</i> | |
|-----------|--------------------------------|-------|-----------------------------------|--------|
| | <i>N₀ (CFU/mL)</i> | | 1 | 2 |
| A | 1.250 | 1.325 | 5.0969 | 5.1222 |
| B | 2.770 | 2.495 | 5.4425 | 5.3971 |
| C | 1.245 | 1.110 | 5.0952 | 5.0453 |
| D | 2.610 | 2.350 | 5.4166 | 5.3711 |

Lampiran 10. ANOVA *L. acidophilus*

Lactobacillus acidophilus

| Perlakuan | Ulangan | |
|-----------|---------|--------|
| | I | II |
| A | 4.3646 | 4.3560 |
| B | 4.4249 | 4.4158 |
| C | 4.3608 | 4.3608 |
| D | 4.3784 | 4.4048 |

| Perlakuan | Ulangan | | Total | Rata-rata | sd |
|-----------|---------|--------|--------|-----------|-------|
| | I | II | | | |
| A | 4.3646 | 4.3560 | 8.7206 | 4.3603 | 0.006 |
| B | 4.4249 | 4.4158 | 8.8407 | 4.4203 | 0.006 |
| C | 4.3608 | 4.3608 | 8.7216 | 4.3608 | 0.000 |
| D | 4.3784 | 4.4048 | 8.7832 | 4.3916 | 0.019 |

FK 153.7035987

JKT 0.005382965

JKP 0.004956032

JKG 0.000426933

| ANOVA | | | | | | |
|-----------|----|------------|----------|----------|------|-------|
| SK | Db | JK | KT | F hitung | F 5% | F1% |
| Perlakuan | 3 | 0.00495603 | 0.001652 | 15.47793 | 6.59 | 16.69 |
| Galat | 4 | 0.00042693 | 0.000107 | | | |
| Total | 7 | 0.00538296 | | | | |

BNT5%= 0.028679354

| Perlakuan | Rata-rata | Notasi |
|-----------|-----------|--------|
| A | 4.3603 | a |
| B | 4.4203 | c |
| C | 4.3608 | a |
| D | 4.3916 | b |



Lampiran 11. ANOVA *B. bifidum*

Bifidobacterium bifidum

| Perlakuan | Ulangan | |
|-----------|---------|--------|
| | I | II |
| A | 5.0969 | 5.1222 |
| B | 5.4425 | 5.3971 |
| C | 5.0952 | 5.0453 |
| D | 5.4166 | 5.3711 |

| Perlakuan | Ulangan | | Total | Rata-rata | sd |
|-----------|---------|--------|---------|-----------|-------|
| | I | II | | | |
| A | 5.0969 | 5.1222 | 10.2191 | 5.1096 | 0.018 |
| B | 5.4425 | 5.3971 | 10.8396 | 5.4198 | 0.032 |
| C | 5.0952 | 5.0453 | 10.1405 | 5.0702 | 0.035 |
| D | 5.4166 | 5.3711 | 10.7877 | 5.3939 | 0.032 |

FK 220.3622

JKT 0.206714

JKP 0.203082

JKG 0.003632

ANOVA

| SK | db | JK | KT | F hitung | F 5% | F1% |
|-----------|----|----------|----------|----------|------|-------|
| Perlakuan | 3 | 0.203082 | 0.067694 | 74.55369 | 6.59 | 16.69 |
| Galat | 4 | 0.003632 | 0.000908 | | | |
| Total | 7 | 0.206714 | | | | |

BNT5%= 0.083649

| Perlakuan | Rata-rata | Notasi |
|-----------|-----------|--------|
| A | 5.1096 | a |
| B | 5.4198 | bc |
| C | 5.0702 | a |
| D | 5.3939 | b |



Lampiran 12. Data Kadar air *L. acidophilus* dan *B. bifidum*

| <i>L. acidophilus</i> | A | B | C | HASIL | <i>B. bifidum</i> | A | B | C | HASIL |
|-----------------------|---------|--------|---------|---------|-------------------|---------|--------|---------|---------|
| A1 | 10.3570 | 1.0051 | 11.3614 | 6.9645% | A1 | 10.4070 | 1.0365 | 11.4427 | 7.7183% |
| A2 | 10.3170 | 1.0105 | 11.3268 | 6.9273% | A2 | 10.2970 | 1.0059 | 11.3021 | 7.9531% |
| A3 | 10.2570 | 1.0021 | 11.2583 | 7.9832% | A3 | 10.2070 | 1.0087 | 11.2149 | 7.9310% |
| B1 | 10.2770 | 1.0119 | 11.2880 | 8.8942% | B1 | 10.1570 | 1.0103 | 11.1664 | 8.9082% |
| B2 | 10.3170 | 1.0125 | 11.3286 | 8.8889% | B2 | 10.2170 | 1.0098 | 11.2259 | 8.9127% |
| B3 | 10.2870 | 1.0121 | 11.2982 | 8.8924% | B3 | 10.2870 | 1.0291 | 11.3152 | 8.7455% |
| C1 | 10.2670 | 1.0199 | 11.2860 | 8.8244% | C1 | 10.3070 | 1.0101 | 11.3163 | 7.9200% |
| C2 | 10.1270 | 1.0087 | 11.1348 | 8.9224% | C2 | 10.2270 | 1.0249 | 11.2512 | 6.8299% |
| C3 | 10.2770 | 1.0187 | 11.2948 | 8.8348% | C3 | 10.3270 | 1.0092 | 11.3355 | 6.9362% |
| D1 | 10.2070 | 1.0477 | 11.2539 | 7.6358% | D1 | 10.1470 | 1.0175 | 11.1639 | 5.8968% |
| D2 | 10.2970 | 1.0143 | 11.3105 | 7.8872% | D2 | 10.2470 | 1.0334 | 11.2797 | 6.7738% |
| D3 | 10.3370 | 1.0271 | 11.3634 | 6.8153% | D3 | 10.3570 | 1.0376 | 11.3939 | 6.7463% |

Keterangan : A = Botol timbang setelah dikeringkan

B = Sampel mikroenkapsulasi *L. acidophilus* dan *B.bifidum*

C = Berat akhir

Lampiran 13. ANOVA kadar air *L. acidophilus*

KADAR AIR *Lactobacillus acidophilus*

| Perlakuan | Ulangan | | | Total | rata-rata | sd |
|-----------|---------|--------|--------|---------|-----------|--------|
| | I | II | III | | | |
| A | 6.9645 | 6.9273 | 7.9832 | 21.8750 | 7.2917 | 0.5992 |
| B | 8.8942 | 8.8889 | 8.8924 | 26.6755 | 8.8918 | 0.0027 |
| C | 8.8244 | 8.9224 | 8.8348 | 26.5816 | 8.8605 | 0.0538 |
| D | 7.6358 | 7.8872 | 6.8153 | 22.3383 | 7.4461 | 0.5606 |

FK= 97.4704 9500.4789 791.706573

JKT= 799.9120 8.2054

JKP= 798.5597 6.8531

JKG= 1.3523

| ANOVA | | | | | | |
|-----------|----|--------|--------|----------|------|------|
| SK | Db | JK | KT | F hitung | F 5% | F1% |
| Perlakuan | 3 | 6.8531 | 2.2844 | 13.5140 | 4.07 | 7.59 |
| Galat | 8 | 1.3523 | 0.1690 | | | |
| Total | 11 | 8.2054 | | | | |

BNT5%= 0.41114

| Perlakuan | Rata-rata | Notasi |
|-----------|-----------|--------|
| A | 7.2917 | a |
| B | 8.8918 | bc |
| C | 8.8605 | b |
| D | 7.4461 | a |

Lampiran 14. ANOVA kadar air *B. bifidum*

KADAR AIR *Bifidobacterium bifidum*

| Perlakuan | Ulangan | | | Total | rata-rata | sd |
|-----------|---------|--------|--------|---------|-----------|--------|
| | I | II | III | | | |
| A | 7.7183 | 7.9531 | 7.9310 | 23.6024 | 7.8675 | 0.1297 |
| B | 8.9082 | 8.9127 | 8.7455 | 26.5664 | 8.8555 | 0.0953 |
| C | 7.9200 | 6.8299 | 6.9362 | 21.6861 | 7.2287 | 0.6010 |
| D | 5.8968 | 6.7738 | 6.7463 | 19.4169 | 6.4723 | 0.4986 |

FK= 91.2718 8330.5415 694.2117896

JKT= 704.6547 10.4429

JKP= 703.3833 9.1715

JKG= 1.2714

| ANOVA | | | | | | |
|-----------|----|---------|--------|----------|------|------|
| SK | Db | JK | KT | F hitung | F 5% | F1% |
| Perlakuan | 3 | 9.1715 | 3.0572 | 19.2359 | 4.07 | 7.59 |
| Galat | 8 | 1.2714 | 0.1589 | | | |
| Total | 11 | 10.4429 | | | | |

BNT5%= 0.39866

| Perlakuan | Rata-rata | Notasi |
|-----------|-----------|--------|
| A | 7.8675 | b |
| B | 8.8555 | c |
| C | 7.2287 | ab |
| D | 6.4723 | a |

Lampiran 15. ANOVA Aw *L. acidophilus*

Aw Lactobacillus acidophilus

| Perlakuan | Ulangan | | | Total | rata-rata | sd |
|-----------|---------|-------|-------|--------|-----------|---------|
| | I | II | III | | | |
| A | 0.643 | 0.623 | 0.632 | 1.8980 | 0.633 | 0.01002 |
| B | 0.649 | 0.642 | 0.643 | 1.9340 | 0.645 | 0.00379 |
| C | 0.630 | 0.633 | 0.626 | 1.8890 | 0.630 | 0.00351 |
| D | 0.621 | 0.625 | 0.631 | 1.8770 | 0.626 | 0.00503 |

FK= 7.598000 57.729604 4.810800

JKT= 4.811708 0.000908

JKP= 4.811403 0.000603

JKG= 0.000305

ANOVA

| SK | db | JK | KT | F hitung | F 5% | F1% |
|-----------|----|----------|----------|----------|------|------|
| Perlakuan | 3 | 0.000603 | 0.000201 | 5.277899 | 4.07 | 7.59 |
| Galat | 8 | 0.000305 | 0.000038 | | | |
| Total | 11 | 0.000908 | | | | |

BNT5%= 0.00617117

| Perlakuan | Rata-rata | Notasi |
|-----------|-----------|--------|
| A | 0.6327 | ab |
| B | 0.6447 | b |
| C | 0.6297 | a |
| D | 0.6257 | a |



Lampiran 16. ANOVA Aw *B. bifidum*

Aw Bifidobacterium bifidum

| Perlakuan | Ulangan | | | Total | rata-rata | sd |
|-----------|---------|-------|-------|-------|-----------|---------|
| | I | II | III | | | |
| A | 0.618 | 0.628 | 0.616 | 1.862 | 0.621 | 0.00643 |
| B | 0.637 | 0.632 | 0.643 | 1.912 | 0.637 | 0.00551 |
| C | 0.621 | 0.634 | 0.637 | 1.892 | 0.631 | 0.00850 |
| D | 0.619 | 0.611 | 0.621 | 1.851 | 0.617 | 0.00529 |

FK= 7.517000 56.505289 4.708774

JKT= 4.709895 0.001121

JKP= 4.709551 0.000777

JKG= 0.000344

| ANOVA | | | | | | |
|-----------|----|----------|----------|----------|------|------|
| SK | db | JK | KT | F hitung | F 5% | F1% |
| Perlakuan | 3 | 0.000777 | 0.000259 | 6.022610 | 4.07 | 7.59 |
| Galat | 8 | 0.000344 | 0.000043 | | | |
| Total | 11 | 0.001121 | | | | |

BNT5%= 0.006557439

| Perlakuan | Rata-rata | Notasi |
|-----------|-----------|--------|
| A | 0.6207 | a |
| B | 0.6373 | c |
| C | 0.6307 | b |
| D | 0.6170 | a |