

Ketua Dosen Pembimbing I
Kedua Dosen Pembimbing II
Kedua Dosen Pembimbing III
Kedua Dosen Pembimbing IV
Kedua Dosen Pembimbing V
Kedua Dosen Pembimbing VI
Kedua Dosen Pembimbing VII
Kedua Dosen Pembimbing VIII
Kedua Dosen Pembimbing IX
Kedua Dosen Pembimbing X
Kedua Dosen Pembimbing XI
Kedua Dosen Pembimbing XII
Kedua Dosen Pembimbing XIII
Kedua Dosen Pembimbing XIV
Kedua Dosen Pembimbing XV
Kedua Dosen Pembimbing XVI
Kedua Dosen Pembimbing XVII
Kedua Dosen Pembimbing XVIII
Kedua Dosen Pembimbing XIX
Kedua Dosen Pembimbing XX
Kedua Dosen Pembimbing XXI
Kedua Dosen Pembimbing XXII
Kedua Dosen Pembimbing XXIII
Kedua Dosen Pembimbing XXIV
Kedua Dosen Pembimbing XXV
Kedua Dosen Pembimbing XXVI
Kedua Dosen Pembimbing XXVII
Kedua Dosen Pembimbing XXVIII
Kedua Dosen Pembimbing XXIX
Kedua Dosen Pembimbing XXX
Kedua Dosen Pembimbing XXXI
Kedua Dosen Pembimbing XXXII
Kedua Dosen Pembimbing XXXIII
Kedua Dosen Pembimbing XXXIV
Kedua Dosen Pembimbing XXXV
Kedua Dosen Pembimbing XXXVI
Kedua Dosen Pembimbing XXXVII
Kedua Dosen Pembimbing XXXVIII
Kedua Dosen Pembimbing XXXIX
Kedua Dosen Pembimbing XL
Kedua Dosen Pembimbing XLI
Kedua Dosen Pembimbing XLII
Kedua Dosen Pembimbing XLIII
Kedua Dosen Pembimbing XLIV
Kedua Dosen Pembimbing XLV
Kedua Dosen Pembimbing XLVI
Kedua Dosen Pembimbing XLVII
Kedua Dosen Pembimbing XLVIII
Kedua Dosen Pembimbing XLIX
Kedua Dosen Pembimbing L
Kedua Dosen Pembimbing LI
Kedua Dosen Pembimbing LII
Kedua Dosen Pembimbing LIII
Kedua Dosen Pembimbing LIV
Kedua Dosen Pembimbing LV
Kedua Dosen Pembimbing LVI
Kedua Dosen Pembimbing LVII
Kedua Dosen Pembimbing LVIII
Kedua Dosen Pembimbing LIX
Kedua Dosen Pembimbing LX
Kedua Dosen Pembimbing LXI
Kedua Dosen Pembimbing LXII
Kedua Dosen Pembimbing LXIII
Kedua Dosen Pembimbing LXIV
Kedua Dosen Pembimbing LXV
Kedua Dosen Pembimbing LXVI
Kedua Dosen Pembimbing LXVII
Kedua Dosen Pembimbing LXVIII
Kedua Dosen Pembimbing LXIX
Kedua Dosen Pembimbing LXX
Kedua Dosen Pembimbing LXXI
Kedua Dosen Pembimbing LXXII
Kedua Dosen Pembimbing LXXIII
Kedua Dosen Pembimbing LXXIV
Kedua Dosen Pembimbing LXXV
Kedua Dosen Pembimbing LXXVI
Kedua Dosen Pembimbing LXXVII
Kedua Dosen Pembimbing LXXVIII
Kedua Dosen Pembimbing LXXIX
Kedua Dosen Pembimbing LXXX
Kedua Dosen Pembimbing LXXXI
Kedua Dosen Pembimbing LXXXII
Kedua Dosen Pembimbing LXXXIII
Kedua Dosen Pembimbing LXXXIV
Kedua Dosen Pembimbing LXXXV
Kedua Dosen Pembimbing LXXXVI
Kedua Dosen Pembimbing LXXXVII
Kedua Dosen Pembimbing LXXXVIII
Kedua Dosen Pembimbing LXXXIX
Kedua Dosen Pembimbing XL

PENGARUH KONSENTRASI
DPS DAN PERUBAHAN WILAYAS
Lactobacillus
Sindobacterium bifidum
Tanggungan
SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN

Oleh :
ALIFIANY ASYIFA RAKHMANDA
NIM. 115080301111001



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2015

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

SKRIPSI

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

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

Oleh :

ALIFIANY ASYIFA RAKHMANDA

NIM. 115080301111001



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

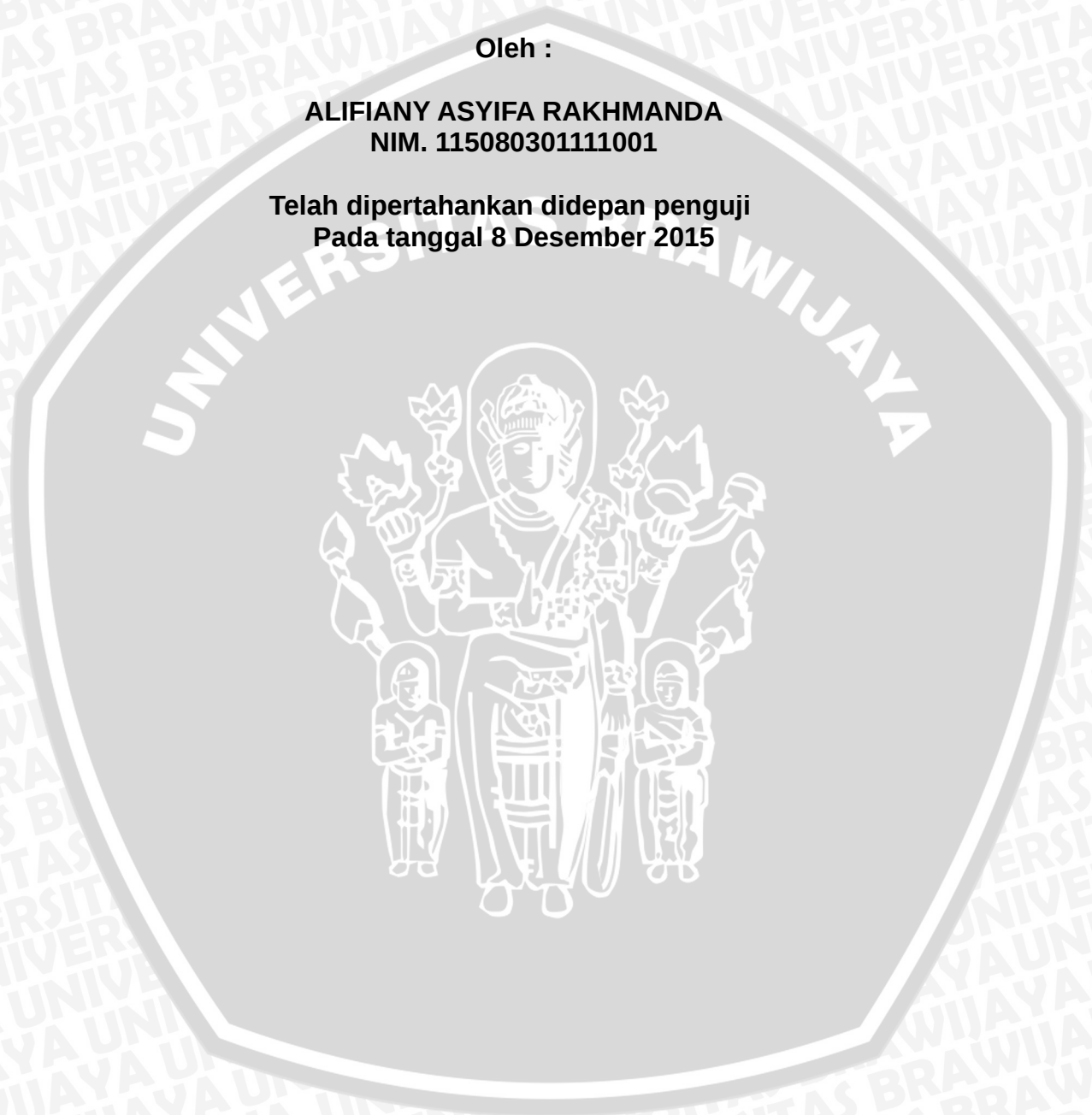
SKRIPSI

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

Oleh :

**ALIFIANY ASYIFA RAKHMANDA
NIM. 115080301111001**

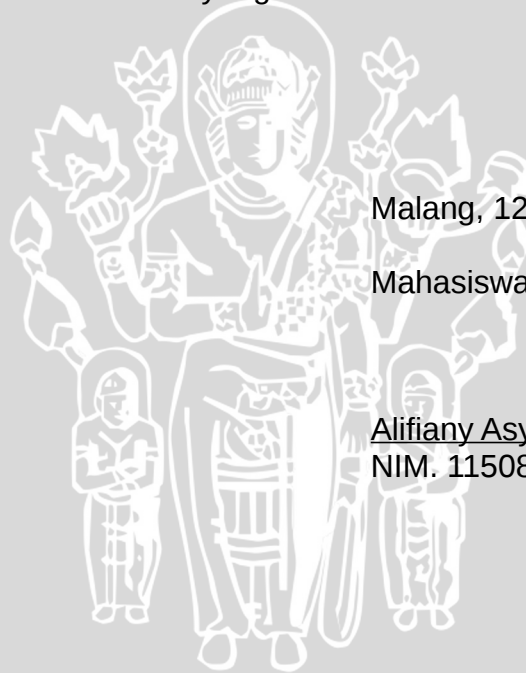
**Telah dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal 8 Desember 2015**



PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya 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 skripsi ini hasil penjiplakan (*plagiasi*), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.



Malang, 12 Desember 2015

Mahasiswa

Alifiany Asyifa Rakhmanda

NIM. 115080301111001

UCAPAN TERIMA KASIH

Dalam kesempatan ini penulis tak lupa menyampaikan rasa syukur dan ucapan terima kasih sebesar-besarnya atas segala bantuan serta dukungan dari semua pihak yang telah membantu, kepada:

1. Ayahku tercinta Joni Ilham Widiyanto, Ibuku tercinta Ririn Fatmawati, dan Adikku Nisrina Aufa Aziza.
2. Ibu Dr. Ir. Dwi Setijawati, M.Kes dan Bapak Dr. Ir. M. Firdaus, MP selaku dosen pembimbing yang dengan sangat sabar memberikan bimbingan, serta pengarahan dalam penelitian hingga penyusunan laporan skripsi ini.
3. Bapak Prof. Ir. Sukoso, M.Sc, Ph.D selaku dosen penguji I dan Dr. Ir. Yahya, MP selaku dosen penguji II yang telah memberikan bimbingan dan pengarahannya untuk menyelesaikan laporan skripsi ini.
4. Teman tim Mikrokapsul yang akhirnya jadi teman dekat, sahabat serta partner in crime Aryanti Dyah Ayu yang telah bersama-sama saling mendukung serta mendorong dalam suka dan dukanya selama penelitian hingga penyelesaian laporan skripsi ini.
5. Spesial untuk Imam Mustakim, atas semua bantuan, do'a serta segala dukungan yang diberikan dalam pelaksanaan penelitian hingga penyelesaian laporan skripsi ini.
6. Spesial juga untuk ke 3 sahabat terbaikku Nissa Hardini, Reny Permatasari dan Urwah Albiruni yang selalu bersama dari semester 1

sampai sekarang, yang selalu mendukung dan mendo'akan hingga laporan skripsi ini selesai.

7. Mbak Rizka khikmatun, mbak aryani, mbak nita marsha, mas arif yang telah memberikan pengarahan demi kelancaran penelitian ini.

Malang, 27 Mei 2015

Penulis

RINGKASAN

ALIFIANY ASYIFA RAKHMANDA Pengaruh Konsentrasi Karagenan *Eucheuma spinosum* dan Kitosan Mix Sebagai Bahan Pengenkapsulat Terhadap Viabilitas *Lactobacillus acidophillus* dan *Bifidobacterium bifidum* di bawah bimbingan (**Dr. Ir. Dwi Setijawati, M.Kes** dan **Dr. Ir. M. Firdaus, MP**)

Bakteri probiotik merupakan mikroflora alami yang terdapat pada saluran pencernaan. Bakteri probiotik ini sangat bermanfaat untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan mencegah pertumbuhan bakteri patogen. Efek meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan mencegah pertumbuhan bakteri patogen tersebut muncul jika jumlah bakteri hidup sampai di saluran pencernaan lebih dari 10^6 CFU/g atau 10^6 CFU/mL. Salah satu bakteri probiotik yaitu *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacterium bifidum*.

Banyak informasi yang menyebutkan bahwa daya tahan hidup *L. acidophilus* dan *B. bifidum* sangat rendah dan rentan, sehingga manfaat dari bakteri probiotik ini tidak dapat dirasakan sepenuhnya. Oleh sebab itu diperlukan adanya teknologi untuk mempertahankan daya tahan hidup dan viabilitas dari bakteri probiotik sehingga dapat dirasakan manfaatnya.

Teknologi yang dapat digunakan untuk mempertahankan daya tahan hidup bakteri probiotik salah satunya adalah dengan cara enkapsulasi. Enkapsulasi dapat dilakukan dengan berbagai cara yaitu dengan metode atomisasi, ekstruksi dan emulsifikasi. Gabungan antara metode ekstruksi dan emulsifikasi salah satunya adalah metode gel partikel. Metode gel partikel mampu mengenkapsulasi *L. acidophilus* dan *B.* Mikroenkapsulasi merupakan proses pelapisan suatu partikel inti dengan bahan atau material lainnya. Material yang umumnya digunakan adalah berupa gum arab, maltodekstrin, natrium kaseinat, gelatin, sirup glukosa padat dan beberapa bahan turunan pati, alginat, gellan gum dan xanthan gum, karaginan, cellulose asetat phthalate, kitosan, pati, gelatin dan protein susu

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen yang dibagi menjadi dua tahap, yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Metode eksperimen dilakukan untuk mengetahui

sebab akibat dua variabel atau lebih, dengan mengendalikan pengaruh dari variabel lain. Penelitian ini dilakukan dengan penelitian yang berjenis Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana yang kemudian dilanjutkan dengan ANOVA dan uji BNT (Beda Nyata Terkecil).

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan campuran iota karaginan dan kitosan dengan perbandingan 25%:75% berpengaruh terhadap viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum* dibuktikan dengan hasil tertinggi sebesar 6,4103 CFU/g dan 6,7013 CFU/g.



KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT, atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi sebagai salah satu syarat kelulusan di Universitas Brawijaya khususnya pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan dengan judul “PENGARUH KONSENTRASI KARAGENAN *Eucheuma spinossum* 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.

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis walaupun telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti dan cermat, tetapi masih dirasakan banyak kekurangan, maka penulis mengharapkan saran yang membangun untuk tulisan ini agar bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 12 Desember 2015

Penulis

1. PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Bakteri probiotik merupakan mikroflora alami yang terdapat pada saluran pencernaan. Bakteri probiotik ini sangat bermanfaat untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan mencegah pertumbuhan bakteri patogen. Efek meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan mencegah pertumbuhan bakteri patogen tersebut muncul jika jumlah bakteri hidup sampai di saluran pencernaan lebih dari 10^6 CFU/g atau 10^6 CFU/mL (Usmiati dan Utami, 2008). Beberapa probiotik umum meliputi berbagai spesies dari genera *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* seperti: *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. reuteri* dan *L. rhamnosus*. (Manin, 2010)

Genus *Lactobacillus* termasuk probiotik yang sering digunakan dalam produk makanan, minuman, maupun produk farmasi. Salah satu spesies *Lactobacillus* adalah *Lactobacillus acidophilus*. *L. acidophilus* merupakan bakteri gram positif yang tidak berspora dengan selnya berbentuk bacillus (batang) dan bersifat fakultatif anaerob. Bakteri ini tergolong BAL yang dapat memecah glukosa, laktosa atau golongan gula lainnya menjadi asam laktat dan energi melalui proses metabolisme anaerobik dengan bantuan enzim laktat dehidrogenase (Rosiana *et al.*, 2008).

Genus yang termasuk probiotik lainnya adalah *Bifidobacteria* salah satu spesiesnya yaitu *B. bifidum*. 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 (Senditya *et al.*, 2014). Namun banyak informasi yang menyebutkan bahwa daya tahan hidup *L. acidophilus* dan *B. bifidum* sangat rendah dan rentan, sehingga manfaat dari bakteri probiotik ini tidak dapat dirasakan sepenuhnya. Oleh sebab itu diperlukan adanya teknologi untuk mempertahankan daya tahan hidup dan viabilitas dari bakteri probiotik sehingga dapat dirasakan manfaatnya.

Teknologi yang dapat digunakan untuk mempertahankan daya tahan hidup bakteri probiotik salah satunya adalah dengan cara enkapsulasi. Enkapsulasi dapat

dilakukan dengan berbagai cara menurut Burgain *et al.*, (2011) yaitu dengan metode atomisasi, ekstruksi dan emulsifikasi. Gabungan antara metode ekstruksi dan emulsifikasi salah satunya adalah metode gel partikel. Metode gel partikel mampu mengenkapsulasi *L. acidophilus* dan *B. bifidum* sesuai dengan penelitian yang pernah dilakukan oleh Arif (2014). Mikroenkapsulasi merupakan proses pelapisan suatu partikel inti dengan bahan atau material lainnya. Material yang umumnya digunakan adalah berupa gum arab, maltodekstrin, natrium kaseinat, gelatin, sirup glukosa padat dan beberapa bahan turunan pati (Yuliani *et al.*, 2007), alginat, gellan gum dan xanthan gum, karaginan, cellulose asetat phthalate, kitosan, pati, gelatin dan protein susu (Burgain *et al.*, 2011).

Salah satu yang dapat digunakan sebagai bahan penyalut adalah karaginan dan kitosan. Karaginan merupakan polisakarida yang diekstraksi dari beberapa spesies rumput laut atau alga merah (*rhodophyceae*). Karaginan dibagi atas tiga kelompok utama yaitu : *kappa*, *iota* dan *lambda* karaginan yang memiliki struktur yang jelas. Iota karaginan akan membentuk gel dengan tekstur keras dengan adanya ion Ca^{2+} (garam kalsium) (Arif, 2014). Karaginan telah dipelajari sebagai bahan penyalut *L. acidophilus* oleh Setijawati *et al.*, (2011) dan mempunyai kemampuan viabilitasnya hingga 10^6 CFU/mL. Karaginan juga mampu digunakan sebagai bahan penyalut *B. bifidum* sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Arif (2014) dengan menggunakan metode gel partikel dan mempunyai kemampuan viabilitas 10^5 CFU/mL. Bahan selain karaginan yang dapat digunakan sebagai bahan penyalut *L. acidophilus* dan *B. bifidum* adalah kitosan.

Kitosan telah dipelajari sebagai bahan penyalut oleh (Wukirsari, 2006) bahwa kemampuannya sebagai bahan bioadhesif akan membuat kapsul tertahan lebih

lama dalam dinding usus sehingga absorpsi senyawa aktif akan meningkat. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Albadran *et al.*, (2015), kemampuan kitosan sebagai bahan penyalut *Lactobacillus* dengan menggunakan metode *freeze drying* didapatkan viabilitas $9,3 \pm 0,05$ log CFU/mL. Kitosan juga mampu digunakan sebagai bahan penyalut *B. bifidum* sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Chavari *et al.*, (2010) dengan menggunakan metode ekstruksi dan mempunyai kemampuan viabilitas sebesar $9,38 \pm 0,92$ log CFU/mL.

Berdasarkan latar belakang masalah tersebut, sehingga dibutuhkan penelitian untuk mengetahui apakah campuran antara iota karaginan dan kitosan mampu meningkatkan viabilitas bakteri *L. acidophilus* dan *B. bifidum*.

2. Rumusan Masalah

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

3. Tujuan Penelitian

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

4. Hipotesis

Hipotesa yang mendasari penelitian ini adalah:

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

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

5. Kegunaan Penelitian

Kegunaan penelitian ini diharapkan hasil yang diperoleh dapat memberikan informasi mengenai pengaruh iota *Semi Refined Carageenan* dan kitosan mix sebagai bahan pengenkapsulat terhadap viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum* sehingga dapat digunakan sebagai informasi untuk pengembangan metode mikroenkapsulasi dikemudian hari.

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 aW karaginan dan kitosan dilaksanakan di Laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya Malang pada bulan Agustus 2015. Pengujian spektrofotometer FT-IR dilakukan di Laboratorium Sentral FMIPA Universitas Negeri Malang (UM) pada bulan April 2015. Penelitian utama dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan pada bulan Mei – Juli 2015. Pengamatan dengan menggunakan *Scanning Electron Microscope* dilaksanakan di Laboratorium Sentral Ilmu MIPA Universitas Negeri Malang pada bulan Agustus 2015.



2. TINJAUAN PUSTAKA

1. Bakteri Probiotik

Bakteri probiotik merupakan bakteri non patogen yang bermanfaat bagi tubuh utamanya bagi keseimbangan mikroflora dalam usus apabila dikonsumsi dengan jumlah yang memadai. Bakteri probiotik banyak terdapat pada berbagai makanan dan produk susu, baik yang terdapat maupun yang ditambahkan pada produk tersebut. Banyak manfaat dari bakteri probiotik, antara lain membantu respon imun, meningkatkan resistensi terhadap patogen, mengurangi bakteri merugikan dalam tubuh, menjaga keseimbangan mikroba pada usus, meningkatkan kinerja sistem pencernaan dan penyerapan makanan (Parameswari *et al.*, 2009). Bakteri probiotik dapat bermanfaat bagi tubuh apabila memenuhi persyaratan.

Persyaratan bakteri probiotik adalah memiliki pengaruh positif atau memberi keuntungan pada inang, mempunyai masa simpan yang panjang sehingga dapat tetap hidup sepanjang umur simpan apabila diaplikasikan dalam produk, dapat bertahan didalam saluran pencernaan, mampu memproduksi zat antimikrobal yang dapat melawan bakteri patogen dan mampu menstabilkan mikroflora intestin. Menurut Arslan *et al.*, (2015), bakteri probiotik mampu mencegah infeksi pada gastrointestinal, diare dan penyakit radang usus ,mampu menurunkan serum lipid dan meningkatkan sistem kekebalan tubuh karena bakteri probiotik mempunyai sifat antibakteri dan antimutagenik efek. Mikroorganisme probiotik ini mampu menunjukkan efek menguntungkan apabila saat makanan mengandung bakteri probiotik jumlah yang memadai (10^6 - 10^7 CFU/g). Beberapa probiotik umum meliputi berbagai spesies dari genus *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* seperti: *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. reuteri* dan *L. rhamnosus* (Manin, 2010).

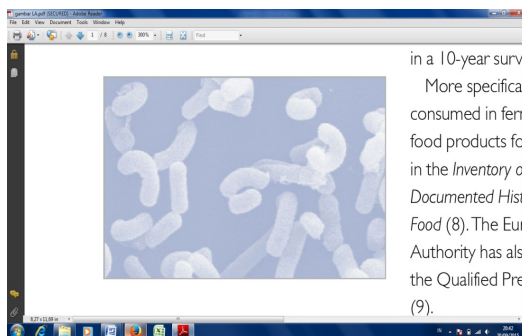
1.1. *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus merupakan salah satu bakteri asam laktat (BAL) yang menguntungkan bagi kesehatan tubuh. Menurut Garrity *et al.*, (2004), taksonomi *L. acidophilus* adalah :

Kingdom : *Bacteria*
Order : *Lactobacillales*
Family : *Lactobacillaceae*
Genus : *Lactobacillus*
Spesies : *Lactobacillus acidophilus*

L. acidophilus termasuk dalam bakteri low gram positif yang berbentuk batang atau kokus (ujung membulat) dengan ukuran 1,5 - 6 μm dan bentuk tunggal, berpasangan atau rantai pendek. bakteri ini merupakan salah satu dari bakteri probiotik dengan genus *Lactobacillus*. Bakteri jenis ini mampu tumbuh pada suasana asam yaitu dengan kisaran pH 4,5 – 6 dengan suhu optimal untuk bakteri hidup yaitu 45°C dan tidak dapat tumbuh pada suhu <15 (Antara, 2010). Bakteri ini membutuhkan riboflavin, asam pantotenat, asam folat dan niasin untuk tumbuh,

L. acidophilus paling banyak dijumpai pada saluran gastro intestinal baik pada manusia maupun hewan. Pada usus halus, jumlahnya dapat mencapai 10^6 - 10^7 sel/g. Pada usus besar jumlahnya berkisar antara 10^{10} - 10^{11} sel/g (Manin,2010). Bentuk dari *L. acidophilus* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. *Lactobacillus acidophilus*

Sumber: Rahrs (2008)

Kegunaan *L. acidophilus* apabila dikonsumsi dengan jumlah yang tepat sudah tidak diragukan lagi. Menurut Triana *et al.*, (2006), *L. acidophilus* mampu menurunkan kolesterol, *Lactobacillus* menghasilkan zat-zat anti kolesterol dan menyerap sejumlah kolesterol ke dalam selnya. Manfaat *L. acidophilus* yang begitu penting bagi tubuh dapat dirasakan manfaatnya apabila jumlahnya mencapai 10^6 CFU/mL. Oleh sebab itu diperlukan upaya untuk melindungi *L. acidophilus* dengan cara enkapsulasi. Upaya tersebut telah dilakukan oleh Setijawati *et al.*, (2011) dengan menggunakan penyalut karaginan mampu menjaga viabilitas hingga 10^6 CFU/mL.

1.2. ***Bifidobacterium bifidum***

Bifidobacterium bifidum adalah salah satu bakteri probiotik yang berasal dari genus *Bifidobacterium* yang bermanfaat bagi kesehatan tubuh manusia apabila dikonsumsi dengan jumlah yang tepat. Menurut Garrity *et al.*, (2004), taksonomi *B. bifidum* adalah :

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Order	: <i>Bifidobacteriales</i>
Family	: <i>Bifidobacteriaceae</i>
Genus	: <i>Bifidobacterium</i>
Spesies	: <i>Bifidobacterium bifidum</i>

B. bifidum termasuk dalam kategori bakteri gram positif dengan panjang 2 – 8 μm yang dapat tumbuh pada kisaran pH 4,5 - 8,5 dengan suhu $\pm 40^\circ\text{C}$. Karakteristik yang paling penting dari bakteri *B. bifidum* adalah kondisi lingkungan hidup untuk pertumbuhannya (Burgain *et al.*, 2011). *B. bifidum* sering digunakan sebagai komponen makanan yang berbasis probiotik, tetapi daya tahan *B. bifidum* sangat rendah dan rentan dengan kematian. Banyak yang mengabaikan fakta bahwa

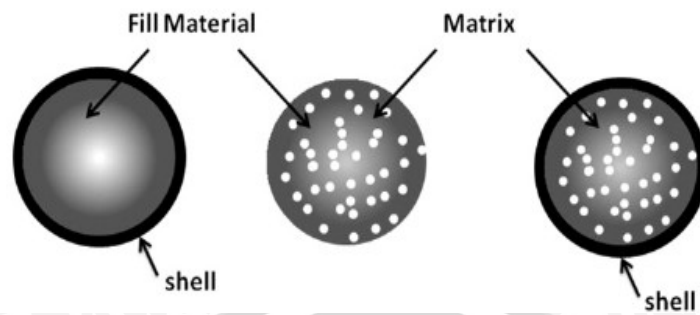
spesies *B. bifidum* ini membutuhkan kondisi anaerob atau tanpa oksigen untuk pertumbuhannya (Reuter, 2001). Sehingga diperlukan metode untuk melindungi *B. bifidum* agar dapat dirasakan manfaatnya dalam tubuh. Metode untuk melindungi *B. bifidum* dapat dilakukan dengan cara enkapsulasi sesuai dengan penelitian yang pernah dilakukan oleh Arif (2014) bahwa enkapsulasi dengan menggunakan penyalut karaginan dan menggunakan metode gel partikel mampu melindungi *B. bifidum* hingga 10^5 CFU/mL.

2. Enkapsulasi

Enkapsulasi adalah teknologi untuk menyalut atau melapisi suatu zat inti dengan suatu lapisan dinding polimer sehingga menjadi partikel kecil. Adanya lapisan dinding polimer, menyebabkan zat inti terlindungi dari pengaruh lingkungan luar. Dengan kata lain mikroenkapsulasi adalah teknologi yang menjanjikan untuk mempertahankan mikroba hidup yang kemudian dapat diaplikasikan ke dalam makanan (Rajam dan Anandharamakrishnan, 2015).

Proses enkapsulasi dapat didefinisikan sebagai proses di mana sel-sel ditahan dalam suatu membran enkapsulasi untuk mengurangi cedera sel atau sel hilang. Beberapa manfaat dari enkapsulasi meliputi perlindungan dari *bakterio fage* dan faktor yang merugikan serta meningkatkan kelangsungan hidup selama proses dan penyimpanan dan mengubahnya ke dalam bentuk bubuk sehingga lebih mudah untuk digunakan (Martin *et al.*, 2015). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Burgain *et al.*, (2011), menyatakan bahwa enkapsulasi komponen bioaktif dapat digunakan dalam banyak aplikasi di industri makanan diantaranya adalah untuk mengendalikan oksidatif reaksi, mempertahankan rasa, warna dan bau, penyediaan secara berkelanjutan dan dapat dikendalikan, serta memperpanjang umur simpan. Enkapsulasi yang umum digunakan dalam banyak aplikasi industri dapat dilihat pada

Gambar 3.



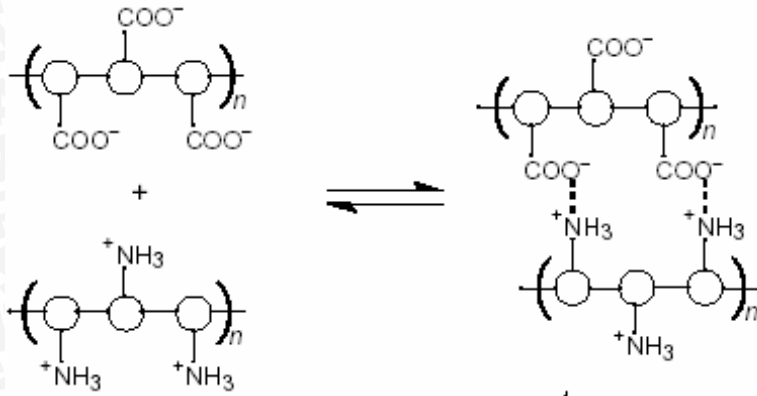
Gambar 3. Enkapsulasi
Sumber : Burgain (2011)

3. Bahan-bahan pengenkapsulat

Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan enkapsulasi probiotik adalah alginat, gellan gum atau xanthan gum, karaginan, selulosa asetat ftalat, kitosan, pati, gelatin, protein susu (Burgain *et al.*, 2011). Cock *et al.*, (2013), menyatakan bahwa bahan-bahan seperti gluten, kasein, whey protein dan albumin, biasanya digunakan sebagai bahan enkapsulasi berbasis protein, sedangkan bahan yang umumnya digunakan untuk enkapsulasi *L. acidophilus* adalah kitosan, sodium alginat, selulosa asetat ftalat dan modifikasi pati. Untuk *B. bifidum* yang umum digunakan sebagai bahan enkapsulat bakteri tersebut adalah kitosan dan pati.

Karaginan merupakan kelompok polisakarida galaktosa yang diekstraksi dari rumput laut. Sebagian besar karaginan mengandung natrium, magnesium dan kalsium yang dapat terikat pada gugus ester sulfat dari galaktosa dan kopolimer 3,6-anhidro-galaktosa. Karaginan kompleks, bersifat larut dalam air, berantai linier dan sulfat galaktan. Senyawa ini terdiri atas sejumlah unit-unit galaktosa dan 3,6-anhidro galaktosa yang berikatan dengan gugus sulfat atau tidak dengan ikatan α 1,3-D-galaktosa dan β 1,4-3,6-anhidro galaktosa. Berdasarkan substituen sulfatnya pada setiap monomer maka karaginan dapat dibedakan dalam beberapa tipe yaitu kappa, iota, lamda, mu, nu dan xi- karaginan (Diharmi *et al.*, 2011).

Iota karaginan mampu digunakan



sebagai bahan penyalut yang disatukan dengan kitosan dikarenakan kedua bahan tersebut mempunyai perbedaan muatan sehingga dapat berikatan ionik satu dengan yang lainnya. Iota karaginan bermuatan negatif sedangkan kitosan memiliki muatan positif. Muatan negatif pada iota karaginan disebabkan adanya gugus ester sulfat dan muatan positif kitosan berasal dari gugus aminonya. Pembentukan ikatan ionik antara iota karaginan dan kitosan dapat dilihat pada gambar 4.

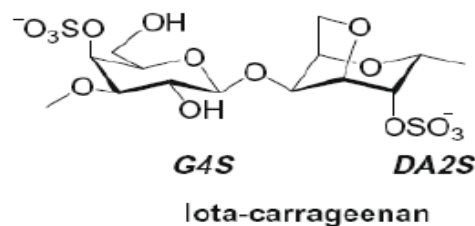
Gambar 4. Pembentukan ikatan ionik antara iota karaginan dan kitosan

Sumber : Wukirsari (2006)

3.1. Iota Karaginan

Iota karaginan adalah karaginan yang diperoleh dari ekstraksi rumput laut yang termasuk ke dalam golongan alga merah yaitu *Eucheuma spinosum*. Menurut Ulfah (2009), *E. spinosum* dikenal dengan nama ilmiah *E. muricatum* dan *E. denticulatum* merupakan penghasil utama iota karaginan. Ciri fisik *E. spinosum* mempunyai bentuk thallus bulat tegak, dengan ukuran panjang 5-30 cm, transparan, warna coklat kekuningan sampai merah kekuningan. *E. spinosum* termasuk bahan utama dalam produksi iota karaginan yang umum digunakan. Sebagian besar karaginan mengandung natrium, magnesium dan kalsium yang dapat terikat pada gugus ester sulfat dari galaktosa dan kopolimer 3,6-anhidro-galaktosa. Menurut Distantina *et al.*, (2010), iota karaginan memiliki spektrum 800-805 cm^{-1} (3,6-anhidrogalaktosa-2-sulfat). Struktur iota karaginan dapat dilihat pada **Gambar 4**.

Gambar 4. Struktur Iota Karaginan



Sumber: Distantina et al., (2010).

Perbedaan utama antara iota dengan kappa karaginan adalah adanya gugus 2-sulfat pada 3,6-anhidro-D-galaktosa pada iota karaginan yang mempengaruhi sensitivitasnya terhadap ion kalium. Menurut Setijawati et al., (2011) dengan adanya gugus fungsi anhidro galaktosa (AG) pada karaginan menyebabkan karaginan mempunyai kekuatan gel yang bagus sehingga mampu digunakan sebagai bahan pengkapsulat. Dengan adanya gugus fungsi AG ini akan menghasilkan pembentukan gel dengan nilai kekuatan gel yang tinggi seperti yang terjadi pada agar. Penggunaan karaginan sebagai bahan pengenkapsulat dapat dilihat berdasarkan sifat dan kekuatan gelnya.

Parameter	Karagenan <i>E. spinosum</i>	Karagenan Standar (FAO)
Kadar air	11.09%	Maksimum 12
Kadar abu	26.32%	15-30%
Kadar abu tidak larut asam	0.30%	< 1%
Kadar sulfat	27.76%	14-40%

Standar mutu karaginan di Indonesia yang baku belum ada, tetapi mutu karaginan dalam kancah Internasional memiliki spesifikasi tersendiri yaitu spesifikasi menurut FAO (Food Agriculture Organization), FCC (Food Chemical Codes) di Amerika, dan EEC (European Economic Community) di Eropa adalah kadar sulfat maksimal 18 – 40 %, viskositas minimal 5 cp, kadar abu maksimum 35 %, dan kadar air maksimal 12 % (Gliksman, 1983 dalam Marsino, 2005). Perbandingan SRC iota karaginan dengan karaginan standar dapat dilihat pada **Gambar 5**.

Gambar 5. Perbandingan SRC iota karaginan dan karaginan standar
Sumber :Diharmi *et al.*,(2011)

Peningkatan gugus 2-sulfat hingga 25-50% menurut Ulfah (2009) menyebabkan penurunan sensitivitas terhadap ion kalium yang juga mengakibatkan penurunan kekuatan gel yang terbentuk. Walaupun demikian, adanya gugus 2-sulfat ester hingga 80% akan menyebabkan peningkatan sensitivitas terhadap ion kalsium. Hal inilah yang akan menyebabkan iota karaginan akan membentuk gel yang kuat bila dicampur dengan ion kalsium. Karaginan telah dipelajari sebagai bahan penyalut *L. acidophilus* oleh Setijawati *et al.*, (2011) dan mempunyai kemampuan viabilitasnya hingga 10^6 CFU/mL. Karaginan juga mampu digunakan sebagai bahan penyalut *B. bifidum* sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Arif (2014) dengan menggunakan metode gel partikel dan mempunyai kemampuan viabilitas 10^5 CFU/mL.

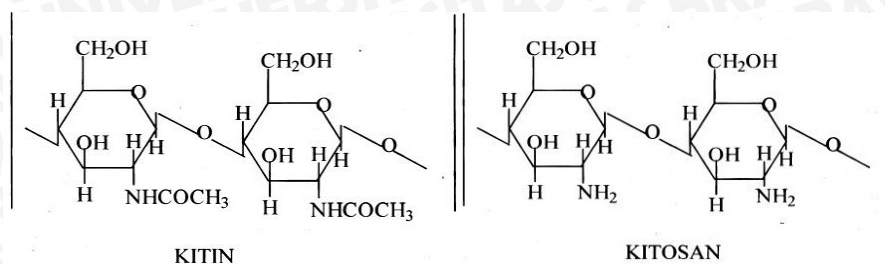
3.2. **Kitosan**

Kitosan merupakan senyawa golongan karbohidrat polisakarida yang telah banyak diaplikasikan dalam berbagai produk dengan nilai ekonomis yang tinggi. Kitosan dapat di manfaatkan pada bidang biokimia, farmakologi atau obat-obatan, gizi, pertanian, pangan, mikrobiologi, penanganan air limbah, coating atau pelapis, kosmetik dan lain sebagainya. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Chavvarri *et al.*, (2010), kitosan juga digunakan sebagai bahan pelapis untuk meningkatkan enkapsulasi probiotik. Kitosan baik digunakan sebagai bahan pengenkapsulat menurut Estenvinho (2013), karena kitosan merupakan produk

alami, berasal dari glukosa, memiliki kemampuan yang baik dalam menjaga dan melepaskan berbagai zat penting, tidak beracun, mempunyai kemampuan yang baik dalam lambung, dan memiliki banyak fungsi dalam pengaplikasiannya.

Kitosan terbuat dari kitin yang sudah mengalami proses penghilangan gugus asetilnya dengan cara deasetilasi, sedangkan kitin merupakan senyawa yang biasa terdapat pada hewan golongan *orthopoda*, *annelida*, *molusca*, *corlengterfa* dan *nematoda*. Proses deasetilasi kitosan dilakukan dengan pemberian larutan NaOH 50% pada kitin. Kualitas kitosan ditentukan dari nilai derajat deasetilasinya. Konsentrasi NaOH dan suhu deasetilasi pada tahap produksi kitosan berpengaruh terhadap nilai derajat deasetilasi.

Derajat deasetilasi adalah ukuran besarnya penghilangan gugus asetil pada gugus asetamida kitin. Semakin meningkatnya % derajat deasetilasi menyebabkan semakin banyaknya gugus asetil yang terlepas atau semakin banyaknya gugus aktif amida bebas (NH) yang terdapat dalam molekul kitosan. Jika DD 40-100% (Derajat Asetilasi, DA lebih kecil dari 40%) disebut kitosan. Secara umum derajat deasetilasi untuk kitosan sekitar 60 % dan sekitar 90 100 % untuk kitosan yang mengalami deasetilasi penuh. Hal ini tergantung dari bahan baku kitin yang digunakan. Proses yang dijalankan DD adalah salah satu karakteristik kimia yang paling penting karena mempengaruhi kemampuan kitosan pada pengaplikasiannya. Nilai DD dapat ditentukan dengan FTIR (Fourier Transform Infra Red). Nilai DD dapat dinyatakan sebagai persamaan sebagai berikut. $\%DD = 100 - [(A_{1665} - A_{3450}) \times 115]$, dimana Nilai A1655 dan A3450 merupakan nilai A yang sesuai untuk pita serapan 1655 cm^{-1} dan 3450 cm^{-1} . Pita serapan 1655 cm^{-1} merupakan pita serapan karbonil gugus N-asetil sedangkan pita serapan 3450 cm^{-1} merupakan pita serapan gugus NH_2 (Barleany *et al.*, 2014). Struktur kimia kitosan dapat dilihat pada **Gambar 5**.



Gambar 6. Struktur kimia kitin dan kitosan

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

Kitosan terdiri dari polimer 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. (Mahatmanti *et al.*, 2010).

Kitosan telah dipelajari sebagai bahan penyalut oleh (Wukirsari, 2006) bahwa kemampuannya sebagai bahan bioadhesif akan membuat kapsul tertahan lebih lama dalam dinding usus sehingga absorpsi senyawa aktif akan meningkat. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Albadran *et al.*, (2015), kemampuan kitosan sebagai bahan penyalut *Lactobacillus* dengan menggunakan metode *freeze drying* didapatkan viabilitas $9,3 \pm 0,05$ log CFU/mL. Kitosan juga mampu digunakan sebagai bahan penyalut *B. bifidum* sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Chavari *et al.*, (2010) dengan menggunakan metode ekstruksi dan mempunyai kemampuan viabilitas sebesar $9,38 \pm 0,92$ log CFU/mL.

4. Viabilitas Bakteri

Mikroorganisme probiotik mampu menunjukkan efek yang dapat memberikan keuntungan bagi yang mengkonsumsi apabila mengandung bakteri probiotik dengan jumlah yang memadai yaitu 10^6 - 10^7 CFU/g, sehingga bakteri yang digunakan sebagai agensia probiotik harus tetap hidup selama melewati saluran pencernaan (Manin, 2010), sering kali bakteri tidak mampu bertahan dalam saluran pencernaan. Pada dasarnya bakteri probiotik paling banyak dijumpai dalam tubuh manusia maupun hewan. Viabilitas bakteri dalam tubuh manusia dapat dilihat pada

Tabel 1.

	n	Jejunum log ₁₀	n	Ileum log ₁₀	n	Colon log ₁₀
<i>Streptococcus</i>	4	6.1-8.0	6	5.9-8.0	8	6.7-8.2
<i>Bifidobacteria</i>	0	-	2	7.4-8.0	5	7.6-10.2
<i>Lactobacillus</i>	7	5.6-9.4	6	6.0-8.4	9	6.2-10.2
<i>L. gasseri</i>	7	5.5-9.3	6	5.8-7.5	8	6.1-9.2
<i>L. reuteri</i>	5	5.8-8.4	5	5.8-7.5	8	5.5-7.4
<i>L. salivarius</i>	3	5.6-8.6	4	5.5-8.2	4	5.8-7.2
<i>L. casei</i>	1	8.3	1	6.3	5	5.5-6.8
<i>L. plantarum</i>	1	8.7	1	6.3	3	5.5-7.0
<i>L. buchneri</i>	2	3.4-7.5	1	6.0	0	-

Tabel 1. Viabilitas bakteri dalam tubuh manusia

Sumber : Reuter (2001)

Bakteri probiotik dalam tubuh dirasa belum mencukupi oleh karena itu tubuh perlu mendapatkan asupan probiotik yang berasal dari luar, tetapi bakteri probiotik utamanya *L. acidophilus* dan *B. bifidum* mempunyai daya tahan hidup yang sangat rendah dan rentan akan kematian. Oleh sebab itu diperlukan upaya untuk menjaga agar tetap hidup salah satunya dengan cara enkapsulasi. Enkapsulasi dikatakan berhasil apabila bahan yang dienkapsulasi memiliki viabilitas sel yang relatif tinggi dan sifat-sifat fisiologis yang relatif sama dengan sebelum dienkapsulasi, sehingga dapat dikatakan bahwa viabilitas bakteri merupakan parameter keberhasilan dari enkapsulasi. Bahan yang mampu menjaga viabilitas bakteri probiotik dengan cara

enkapsulasi menurut Burgain *et al.*, (2011) yaitu alginat, gellan gum dan xanthan gum, karaginan, selulosa asetat phtalat, kitosan, pati, gelatin dan protein susu.

Bahan pengenkapsul yang telah dipelajari sebagai bahan penyalut *L. acidophilus* diantaranya adalah karaginan. Menurut Setijawati *et al.*, (2011) karaginan mempunyai kemampuan untuk menjaga viabilitas *L. acidophilus* hingga 10^6 CFU/mL. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Albadran *et al.*, (2015), bahwa kitosan mempunyai kemampuan sebagai bahan penyalut *Lactobacillus* dengan menggunakan metode *freeze drying* dan didapatkan viabilitas $9,3 \pm 0,05$ log CFU/mL. *L. acidophilus* mampu dienkapsulasi dengan alginat sebagai bahan pengenkapsulat berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Kim *et al.*, (2007) bahwa alginat mampu mengenkapsulasi *L. acidophilus* menggunakan metode *dropping* hingga mencapai viabilitas $9,4 \times 10^6$ CFU/mL. Menurut Triana *et al.*, (2006) selain bahan-bahan seperti alginat, kitosan dan karaginan *L. acidophilus* juga mampu dienkapsulasi oleh susu skim dengan menggunakan metode *spray dryer* hingga dapat dijaga viabilitasnya mencapai 10^7 CFU/mL.

Karaginan selain mampu digunakan sebagai bahan pengenkapsulat *L. acidophilus* juga mampu digunakan sebagai bahan penyalut *B. bifidum* sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Arif (2014) dengan menggunakan metode gel partikel dan mempunyai kemampuan viabilitas 10^5 CFU/mL. Bahan selain karaginan yang dapat digunakan sebagai bahan penyalut *B. bifidum* adalah kitosan. Kitosan telah dipelajari sebagai bahan penyalut oleh (Wukirsari, 2006) bahwa kemampuannya sebagai bahan bioadhesif akan membuat kapsul tertahan lebih lama dalam dinding usus sehingga absorpsi senyawa aktif akan meningkat. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Chavari *et al.*, (2010) dengan menggunakan metode ekstruksi mempunyai kemampuan viabilitas sebesar $9,38 \pm$

0,92 log CFU/mL. Selain itu, menurut penelitian Arif (2014) karaginan mampu menjaga viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum mix* hingga 6,3 log CFU/mL menggunakan metode gel partikel dan juga mampu menjaga viabilitasnya hingga dalam pengujian *gastric tract* dan *intestinal tract* masing – masing sebesar 3,8 log CFU/mL dan 4,3 log CFU/mL.



3. METODOLOGI PENELITIAN

1. Alat dan Bahan Penelitian

1.1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam pembuatan *Semi Refined Carageenan* (SRC) adalah *Eucheuma spinosum* yang diperoleh dari perairan Madura, Jawa Timur. Rumpun laut didatangkan dalam keadaan setengah kering dengan menggunakan wadah berupa karung beras. Bahan yang digunakan dalam pembuatan kitosan adalah cangkang kulit udang yang diperoleh dari pabrik kerupuk udang Pasuruan, Jawa Timur. Kulit udang didatangkan 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 Universitas Brawijaya Malang. Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan SRC antara lain CaOH_2 teknis, CaCl_2 teknis, air dan akuades. Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan kitosan antara lain adalah NaOH 3,5%, HCL 1N, NaOH 50%, air dan akuades. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan mikrokapsul adalah sol iota SRC, kitosan, KCl 0,3 M, akuades dan kertas saring. Pengujian viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum* menggunakan bahan antara lain MRS-Agar, NaCl dan Sodium Thiosulphate

1.2. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam pembuatan SRC adalah waterbath, spatula, beaker glass 500 mL, baskom, blender, gelas ukur 100 mL, timbangan digital, ayakan, loyang dan kertas lakmus merah. Alat yang digunakan dalam pembuatan kitosan adalah baskom, beaker glass 500 mL, *hotplate*, spatula, *magnetic stirrer*, blender, oven, loyang dan 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 *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacterium bifidum* adalah sprayer alkohol, bunsen, tabung reaksi, *Laminar Air Flow*, cawan petri, blue tip, timbangan Sartorius, inkubator, *colony counter* dan mikropipet.

2. Metode dan Rancangan Penelitian

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 iota dan kitosan
2. Variabel terikat : Viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum*.

2.2. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Rancangan Acak Lengkap sederhana (tanpa interaksi) dengan 4 perbedaan konsentrasi bahan pengenkapsulat dengan 2 kali ulangan.

Penelitian ini terbagi menjadi dua macam percobaan yaitu pengujian terhadap *L. acidophilus* dan pengujian terhadap *B. bifidum*. Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Model rancangan percobaan

Jenis Bakteri Probiotik	Perlakuan	Ulangan		Total	Rerata
		1	2		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	A	A1	A2		
	B	B1	B2		
	C	C1	C2		
	D	D1	D2		
<i>Bifidobacteriu m bifidum</i>	A	A1	A2		
	B	B1	B2		
	C	C1	C2		
	D	D1	D2		

Keterangan :

- A = Iota : Kitosan 75% : 25%
- B = Iota : Kitosan 25% : 75%
- C = Iota : Kitosan 0% : 100%
- D = Iota : Kitosan 100% : 0%

3. Prosedur Penelitian

3.1. Penelitian pendahuluan

3.1.1. Pembuatan *Semi Refined Carrageenan (SRC) E. spinosum*

Rumput laut *Eucheuma spinosum* segar dicuci sampai bersih kemudian di jemur sampai kering. Disiapkan 24 g CaOH₂, untuk *E. spinosum*. Kemudian larutan tersebut diencerkan dalam 400 mL akuades. Rumput laut yang telah kering ditimbang sebanyak 20 g lalu diekstraksi dalam *waterbath* selama 60 menit dengan suhu ± 70° C untuk *Eucheuma spinosum*. Rumput laut yang telah diekstraksi selanjutnya di blender dan ditambahkan CaCl₂ pada *E. spinosum* masing-masing sebanyak 3 g. Selanjutnya disaring sehingga diperoleh residu dan dilanjutkan dengan pencucian dengan menggunakan CaCl₂ pada *E. spinosum* masing-masing sebanyak 1,5 g, pencucian tersebut dilakukan sebanyak 2 kali dan dilanjutkan pencucian dengan menggunakan air hingga pH netral. Residu yang diperoleh kemudian dikeringkan sampai kering dan dihaluskan dengan ukuran 100 mesh.

3.1.2. Pembuatan Kitosan (Wardaniati dan Setyaningsih, 2007)

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 3,5% 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 kemudian dikeringkan selama 2 jam. Proses ini dilanjutkan dengan proses demineralisasi pada suhu 60-65°C dengan menggunakan larutan HCl 1 N dengan perbandingan sampel dengan larutan HCl = 1 : 10 (gr serbuk/mL HCl) sambil diaduk konstan selama 60 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.

3.2. Penelitian Utama

3.2.1. Pembuatan mikrokapsul menggunakan metode gel partikel *foammat* (Arif, 2014)

Mikroenkapsulasi *L. acidophilus* dan *B. bifidum* dengan bahan penyalut iota karaginan dan kitosan pada prinsipnya yaitu bakteri atau suspensi sel yang dienkapsulasi oleh SRC iota karaginan dan kitosan yang telah dicampur sampai homogen kemudian mengejel pada suhu 42-45°C, selanjutnya di lapis dengan menggunakan busa putih telur, kemudian dikeringkan pada suhu 40°C. Pembuatan mikroenkapsulasi dengan menggunakan metode gel partikel *foammat* ini berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Arif (2014) yang telah dimodifikasi. Ditimbang sebanyak 2,25 g SRC (1,125 g iota SRC dan 1,125 g kitosan) ditambahkan 30 mL akuades kemudian dipanaskan di atas *hot plate* hingga mencapai suhu 97°C, sambil terus diaduk karaginan diangkat dari *hot plate* dan suhunya diturunkan hingga 40-45°C sambil terus diaduk agar tidak cepat membentuk gel. Kemudian sebanyak 30 mL kultur *L. acidophilus* dan *B. bifidum* dimasukkan ke dalam sol karaginan dan diaduk hingga homogen dengan menggunakan *magnetic stirrer* pada 1000 rpm.

Campuran sel dan sol dimasukkan ke dalam larutan 75 mL larutan KCl 0,3 M menggunakan spuit 50 mL dengan jarum berukuran 1 mm, pengadukan dilakukan menggunakan *magnetic stirrer* selama 10 menit, mikrokapsul yang didapat disaring menggunakan kain saring sehingga diperoleh residu. Setelah diperoleh residu, mikroenkapsulasi kemudian dibalut dengan menggunakan *foammat* berupa putih telur sebanyak 17,5% dari berat residu yang didapatkan. Kemudian mikrokapsul dikeringkan dalam oven dengan suhu 40°C selama 48 jam hingga kering dan menjadi serbuk mikrokapsul.

3.2.2. Pengujian Viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum* (Harmayani *et al.*, (2001))

Pengujian viabilitas sel *L. acidophilus* dan *B. Bifidum* pada semua tahapan proses baik kering beku (*freeze drying*) ataupun kering semprot (*spray drying*) dilakukan pada media MRS agar. Menurut Harmayani *et al.*,(2001), pada kultur kering yang sudah jadi, pengenceran terlebih dahulu dilakukan dengan menimbang 1 g kultur kering secara aseptis, kemudian dimasukkan ke dalam 9 mL aquades steril dan dicatat sebagai pengenceran 10^{-1} . Kemudian dilanjutkan untuk pengenceran hingga 10^{-5} . Selanjutnya dilakukan penanaman secara duplo dengan menggunakan media MRS agar dan diinkubasi selama 48 jam dengan suhu 37°C , sehingga diperoleh jumlah koloni bakteri *L. acidophilus* dan *B. bifidum*.

Yield enkapsulasi merupakan efisiensi dari penyalut dengan jumlah bakteri yang mampu bertahan hidup setelah proses enkapsulasi dihitung sebagai *Encapsulation Yield (EY)* (Chavarri *et al.*, 2010).

$$EY = \frac{N}{N_0} \times 100\%$$

Keterangan :

N = jumlah sel hidup yang terlepas dari mikrosfer setelah proses pengeringan.
N₀ = jumlah sel hidup yang ditambahkan (kepadatan awal)

3.2.3. Pengujian Aktivitas Air (Aw) (Susanto, 2009)

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.

3.2.4. Pengujian Kadar Air (Susanto, 2009)

Pengujian kadar air pada intinya adalah penguapan air yang terkandung dalam suatu bahan apabila bahan tersebut dipanaskan pada suhu 105° C selama waktu tertentu. Sehingga diperoleh perbedaan berat sebelum dan sesudah dipanaskan. Perbedaan berat sebelum dan sesudah dipanaskan tersebut yang dikatakan dengan kadar air. Metode pengujian kadar air berdasarkan metode oven menurut Susanto (2009) yaitu, botol timbang dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 105°C selama 24 jam. Kemudian didinginkan dan dikeringkan dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang (A). Sampel yang telah ditimbang ± 1 g (B) dimasukkan ke dalam botol timbang. Kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 4-6 jam. Setelah itu sampel yang kering ditimbang dan dihitung berat konstannya (C) dan didapatkan hasil kadar air. Kadar air ditentukan dengan rumus sebagai berikut.

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

3.2.5. Uji *Fourier Transform Infrared Spectrometer* (FT-IR)

Pengujian *Fourier Transform Infrared Spectrometer* (FT-IR) dilakukan di Laboratorium Sentral Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang. Pengujian dengan FT-IR ini bertujuan untuk mengetahui gugus fungsional yang terdapat pada iota SRC dan kitosan. Uji FT-IR ini merupakan salah satu kemajuan dari instrumentasi sinar Infra merah (IR). Teknik ini memberikan

informasi dalam hal kimia, seperti struktur dan konformasional pada polimer dan polipaduan, perubahan induksi tekanan dan reaksi kimia.

Dalam teknik ini padatan diuji dengan cara merefleksikan sinar infra merah yang melalui tempat kristal sehingga terjadi kontak dengan permukaan cuplikan. Degradasi atau induksi oleh oksidasi, panas, maupun cahaya, dapat diikuti dengan cepat melalui infra merah. Sensitivitas FTIR adalah 80-200 kali lebih tinggi dari instrumentasi dispersi standar karena resolusinya lebih tinggi (Gunawan dan Azhari, 2010). Analisa FTIR pada sampel kitosan bertujuan untuk mengetahui gugus fungsi pada kitosan serta untuk mengetahui %DD atau Derajat Deasetilasi pada kitosan. Menurut Barleany *et al.*, (2014), derajat deasetilasi kitosan dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

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

3.3. 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:

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

Di mana :

μ = nilai rerata harapan (*mean*)

A_1 = pengaruh faktor perlakuan

ε_{ij} = pengaruh galat

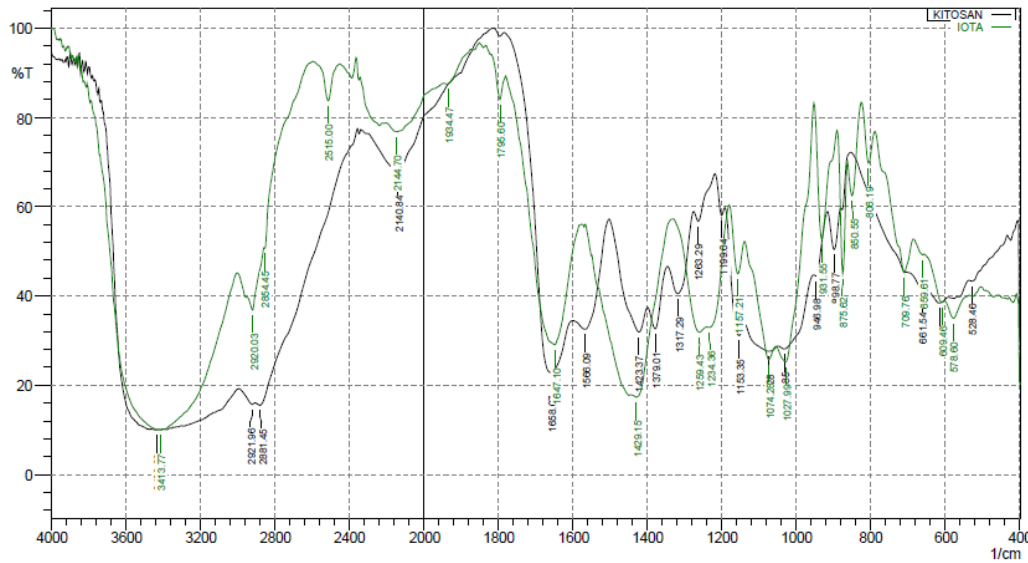
Kemudian hasil penelitian dilakukan pengujian dengan menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA) yang kemudian dilanjutkan uji F. Apabila hasil yang diperoleh menunjukkan adanya perbedaan ($F_{\text{tabel}} 5\% < F_{\text{hit}} < F_{\text{tabel}}$ atau $F_{\text{hit}} > F_{\text{tabel}} 1\%$) sehingga diperoleh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



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Spektrofotometer FTIR SRC *E. spinosum* dan Kitosan

Tujuan



analisa spektra FTIR pada SRC *E. spinosum* dan kitosan adalah untuk mengetahui informasi dalam hal kimia dari bahan tersebut, seperti struktur dan gugus fungsional *E. spinosum* dan kitosan. Hasil analisa spektrofotometer FTIR dari SRC *E. spinosum* dan kitosan dapat dilihat pada **Gambar 6**.

Gambar 6. Spektra FTIR SRC *E. spinosum* dan Kitosan

— = Kitosan

- - - = SRC *E. spinosum* (Iota)

SRC *E. spinosum* mempunyai berkas absorpsi yang paling kuat pada gugus fungsi ester sulfat yang muncul pada bilangan gelombang $1234,36\text{ cm}^{-1}$. Gugus fungsi 3,6-anhidrogalaktosa muncul pada bilangan gelombang $931,55\text{ cm}^{-1}$. Gugus fungsi galaktosa-4-sulfat muncul pada bilangan gelombang $850,55\text{ cm}^{-1}$. gugus fungsi 3,6-anhidrogalaktosa-2-sulfat muncul pada bilangan gelombang $805,19\text{ cm}^{-1}$. Menurut Distantina *et al.*, (2010), dalam spectra $1500\text{-}500\text{ cm}^{-1}$, FTIR spectroscopy menunjukkan adanya berkas absorpsi yang sangat kuat pada daerah $1210\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$ (karena ikatan S=O pada eseter sulfat) dan daerah $1010\text{-}1080\text{ cm}^{-1}$ (dianggap ikatan Glikosidik) pada semua jenis karaginan. Perbedaan utama karaginan kappa dan iota ditunjukkan dengan lebar spektrum $840\text{-}850\text{ cm}^{-1}$ (galaktosa-4-sulfat) yang dimiliki karaginan jenis kappa, sedangkan spektrum $800\text{-}805\text{ cm}^{-1}$ (3,6-

anhidrogalaktoza-2-sulfat) yang dimiliki karaginan iota. Selain hasil FTIR tersebut iota karaginan di uji kadar air yang terkandung dan di dapatkan hasil sebesar 11,04. Menurut Diharmi *et al.*, (2011) SRC iota karaginan memiliki kadar air maksimal 12%. Sehingga dengan hasil tersebut diatas dapat disimpulkan bahwa karaginan yang dihasilkan dari SRC *E. spinosum* termasuk iota karaginan.

Analisa FTIR pada sampel kitosan bertujuan untuk mengetahui gugus fungsi pada kitosan serta untuk mengetahui %DD atau Derajat Deasetilasi pada kitosan. Derajat deasetilasi yang diperoleh pada kitosan sebesar 44,16 %. Menurut Barleany *et al* (2014), apabila nilai DD 40-100 disebut kitosan. Secara umum derajat deasetilasi untuk kitosan sekitar 60 % dan sekitar 90-100 % untuk kitosan yang mengalami deasetilasi penuh. Hal ini tergantung dari bahan baku kitin yang digunakan.

Hasil analisa spektra FTIR memperlihatkan pola serapan yaitu pada bilangan gelombang $3433,06\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan vibrasi gugus -OH dan N-H . Pada bilangan gelombang $2921,96\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan vibrasi gugus C-H . Pada bilangan gelombang $1658,67$ menunjukkan vibrasi gugus NH_2 . Gugus fungsi CH_3 ditunjukkan pada bilangan gelombang $1423,27\text{ cm}^{-1}$. Sedangkan gugus fungsi C-O-C ditunjukkan pada bilangan gelombang $1074,28\text{ cm}^{-1}$. Pada bilangan gelombang $898,77\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan gugus fungsi NH_2 . Menurut Sukma *et al.*, (2014), O-H dan N-H ditunjukkan pada bilangan gelombang $3363,24\text{ cm}^{-1}$, C-H ditunjukkan pada bilangan gelombang $2902,12\text{ cm}^{-1}$, NH_2 ditunjukkan pada bilangan gelombang $1658,48\text{ cm}^{-1}$, CH_3 ditunjukkan pada bilangan gelombang $1434,77\text{ cm}^{-1}$, C-O-C ditunjukkan pada bilangan gelombang $1064,51\text{ cm}^{-1}$, sedangkan NH_2 ditunjukkan pada bilangan gelombang $871,66$. Sehingga dengan hasil analisa kitosan dengan menggunakan spektrofotometer FTIR dapat disimpulkan bahwa terdapat kemiripan

pola serapan antara kitosan dan iota karaginan yang dihasilkan dan dibuktikan dengan literatur.

Iota karaginan mampu digunakan sebagai bahan penyalut yang disatukan dengan kitosan dikarenakan kedua bahan tersebut mempunyai perbedaan muatan sehingga dapat berikatan ionik satu dengan yang lainnya. Iota karaginan bermuatan negatif sedangkan kitosan memiliki muatan positif. Muatan negatif pada iota karaginan disebabkan adanya gugus fungsi ester sulfat yang muncul pada bilangan gelombang $1234,36 \text{ cm}^{-1}$ dan muatan positif kitosan berasal dari gugus aminonya yaitu pada bilangan gelombang $898,77 \text{ cm}^{-1}$.

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

2.1. Viabilitas *L. acidophilus*

Hasil ANOVA pengaruh campuran iota karaginan dan kitosan terhadap viabilitas *L. acidophilus* menunjukkan adanya perbedaan yang sangat berbeda nyata dengan $F_{\text{hitung}} > F_{1\%}$ (**Lampiran 5**). Pengaruh campuran iota karaginan dan kitosan terhadap viabilitas *L. acidophilus* dapat dilihat pada **Gambar 7**.

Gambar 7. Viabilitas *L. acidophilus* dengan perbandingan bahan pengenkapsulat (iota karaginan : kitosan) A = 75% : 25%, B = 25% : 75%, C = 100% : 0% dan D = 0% : 100%.

Gambar 7 menunjukkan bahwa viabilitas tertinggi yaitu pada perlakuan B dengan perbandingan iota dibanding kitosan 25% : 75%. Menurut Shi *et al.*, (2013) karaginan dengan konsentrasi 20% yang dicampur dengan gum 80% mampu menjaga viabilitas *L. bulgaricus* hingga $9,02 \log \text{ CFU/mL}$. Penurunan viabilitas *L. acidophilus* kemungkinan disebabkan karena kurangnya kerapatan pada struktur karaginan serta kualitas kitosan yang kurang baik dibuktikan dengan derajat

deasetilasi yang kecil, akibatnya pengaruh luar dapat mempengaruhi viabilitas *L. acidophilus*.

Kitosan dengan konsentrasi 40% mampu menjaga viabilitas *Lactobacillus* hingga $9,3 \pm 0,05$ log CFU/mL (Albadran *et al.*, 2015). Penurunan viabilitas tersebut disebabkan karena kurang maksimalnya kitosan dalam membentuk membran semi permeabel yang mengakibatkan stabilitas gel pada karaginan kurang meningkat. Menurut Chavvari *et al.*, (2010), bahwa bahan enkapsulat yang ditambah dengan kitosan mempunyai viabilitas yang lebih baik dibandingkan dengan tanpa tambahan kitosan, karena kitosan mampu membentuk membran semi permeabel yang dapat meningkatkan stabilitas gel sehingga mampu melindungi probiotik yang dienkapsulasi.

2.2. Viabilitas *B. bifidum*

Hasil ANOVA pengaruh campuran iota karaginan dan kitosan terhadap viabilitas *B. bifidum* menunjukkan adanya perbedaan yang nyata dengan $F_{hitung} > F_{5\%}$ (**Lampiran 6**). Pengaruh campuran iota karaginan dan kitosan terhadap viabilitas *B. bifidum* dapat dilihat pada **Gambar 8**.

Gambar 8. Viabilitas *B. bifidum* dengan perbandingan bahan pengenkapsulat (iota karaginan : kitosan) A = 75% : 25%, B = 25% : 75%, C = 100% : 0% dan D = 0% : 100%.

Gambar 8 menunjukkan bahwa viabilitas tertinggi pada perlakuan B dengan perbandingan iota banding kitosan 25% : 75%. Kamalian *et al.*, (2014), Penyalut kitosan dengan konsentrasi 40% yang digabung dengan alginat 60% mampu menjaga viabilitas *B. pseudocatenulatum* hingga $8,72 \pm 0,14$ CFU/g. Penurunan viabilitas tersebut disebabkan karena kurangnya kerapatan pada karaginan yang dapat mempengaruhi viabilitas *B. bifidum* dan kurang maksimalnya kitosan dalam

membentuk membran semi permeabel yang disebabkan kualitas kitosan yang kurang baik dibuktikan dengan derajat deasetilasi kecil yang mengakibatkan stabilitas gel pada karaginan kurang meningkat.

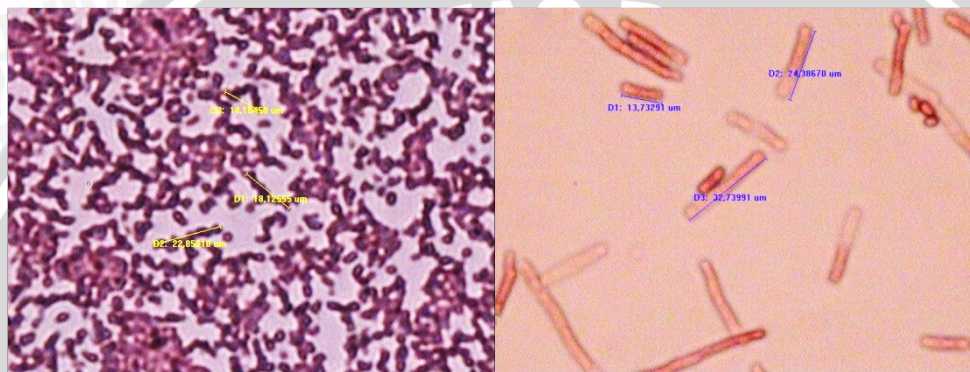
Kemampuan kitosan dalam meningkatkan stabilitas gel berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Chavvari *et al.*, (2010) bahwa bahan enkapsulat yang ditambah dengan kitosan mempunyai viabilitas yang lebih baik dibandingkan dengan tanpa tambahan kitosan. Hal tersebut disebabkan karena kitosan mampu membentuk membran semi permeabel yang dapat meningkatkan stabilitas gel sehingga mampu melindungi probiotik yang dienkapsulasi. Membran semi permeabel yang dihasilkan oleh kitosan dihasilkan karena kitosan mampu memberikan ikatan yang kuat pada karaginan.

2.3. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengetahui perbedaan dalam segi morfologi antara *L. acidophilus* dan *B. bifidum*. Perbedaan morfologi bertujuan untuk mengidentifikasi bahwa yang tumbuh pada media MRS-Agar dan MRS-Agar termodifikasi merupakan bakteri probiotik dari jenis Gram positif dengan ditandai munculnya warna ungu pada saat pengamatan menggunakan mikroskop.

Hasil pewarnaan Gram pada kedua jenis bakteri ini adalah Gram positif, tetapi koloni *L. acidophilus* berwarna ungu kemerah-merahan berbentuk batang sedangkan koloni *B. bifidum* berwarna ungu kehitam-hitaman serta membentuk koloni berangkai yang membentuk huruf (Y). Hal ini sesuai dengan pernyataan 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 saat pengamatan dengan mikroskop. 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. *L. acidophilus* merupakan bakteri asam laktat yang berbentuk batang (basil) dan termasuk dalam kelompok *low Gram positive bacteri* atau bakteri yang memiliki lapisan peptidoglikan yang sama dengan bakteri Gram negatif sehingga akan berwarna merah pada saat pewarnaan Gram. Pengamatan morfologi *L. acidophilus* dan *B. bifidum* dapat dilihat pada **Gambar 9**.



Gambar 9. Pengamatan morfologi koloni bakteri dengan mikroskop cahaya pada perbesaran 400x : (A) *L. acidophilus*; (B) *B. bifidum*.

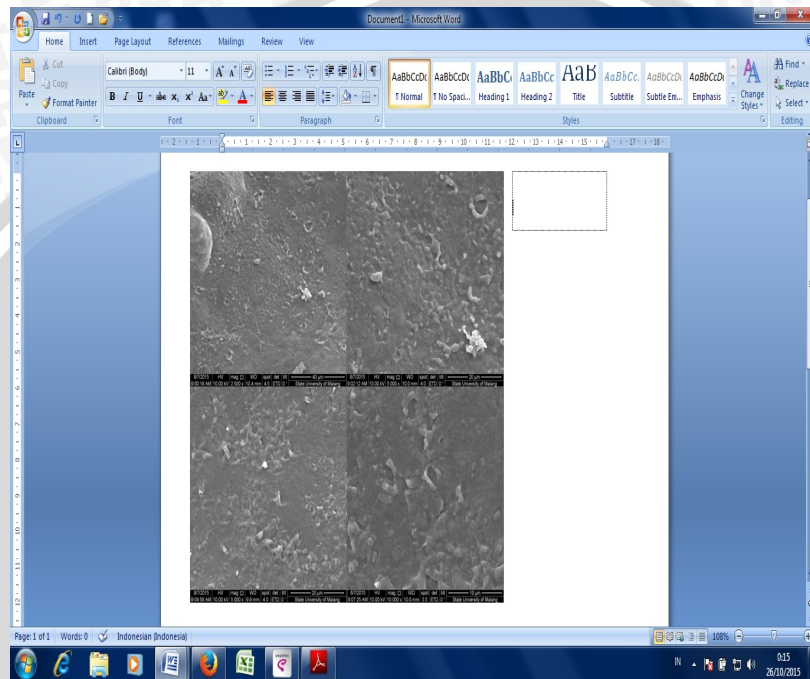
2.4. Yield Enkapsulasi

Yield enkapsulasi merupakan persentase perbandingan antara viabilitas sel setelah mengalami proses pengeringan enkapsulasi pada suhu 40^o C selama 48 jam dengan viabilitas awal sel atau kepadatan awal sel. Yield tertinggi diperoleh enkapsulat *B. bifidum* sebesar 74,44%, sedangkan *L. acidophilus* sebesar 71,11%.

Yield enkapsulat dapat dilihat pada **Gambar 9**.

Gambar 9. Yield enkapsulasi setelah proses pengeringan

Perbedaan persentase *L.acidophilus* dan *B. bifidum* kemungkinan disebabkan oleh minimal adanya retak matriks pada enkapsulat *B. bifidum* saat pengeringan sehingga menyebabkan bakteri tersebut lebih mampu bertahan akibat pengaruh dari lingkungan luar. 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) 2.500, (b) dan (c) 5.000, (d) 10.000

Gambar 10 menunjukkan enkapsulat yang dihasilkan memiliki permukaan yang bergelombang dan tidak rata. Permukaan yang tidak rata tersebut kemungkinan karena pada tahap pembuatan enkapsulat dengan metode gel partikel dan pengeringan dengan menggunakan oven terjadi penguapan pelarut yang 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 Srifiana *et al.*, (2014) bahwa pengeringan pada pembuatan mikrokapsul menyebabkan adanya penarikan air yang ekstrim akibat pemanasan dengan suhu tinggi yang berakibat

terbentuknya lekukan – lekukan pada permukaan mikrokapsul. 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 sel-sel bakteri yang menempel pada permukaan matriks enkapsulat jelas terdeteksi utamanya pada pembesaran 10.000x, dengan menggunakan tegangan 10.000 HV dan jarak antara lensa dan objek 10,0 mm. Hasil SEM enkapsulat menunjukkan adanya nisbah atau selisih sebanyak 0,664 μm dibandingkan dengan ukuran asli *L. acidophilus*. Menurut Antara (2010) bahwa *L. acidophilus* mempunyai diameter sekitar 1,5 – 6 μm . Selisih ukuran *L. acidophilus* tersebut membuktikan adanya *coating* atau lapisan luar yang mengkapsul *L. acidophilus* oleh kitosan dan iota karaginan sehingga mengakibatkan ukuran yang dihasilkan lebih tebal dan lebih panjang dari ukuran semula.

3. Kadar Air Enkapsulat

3.1. Kadar Air Enkapsulat *L. acidophilus*

Hasil ANOVA pengaruh campuran iota karaginan dan kitosan terhadap kadar air enkapsulat *L. acidophilus* menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata dengan $F_{\text{hitung}} > F_{1\%}$ (**Lampiran 7**). Pengaruh campuran iota karaginan dan kitosan terhadap kadar air enkapsulat *L. acidophilus* dapat ditunjukkan melalui diagram batang seperti yang terlihat pada **Gambar 11**.

Gambar 11. Kadar air enkapsulat *L. acidophilus* pada perbandingan bahan pengenkapsulat (iota karaginan : kitosan) yang berbeda.

Gambar 11 menunjukkan kadar air tertinggi yaitu pada perlakuan B ditunjukkan dengan hasil rata-rata kadar air sebesar 8,9645 %. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Arslan *et al.*, (2015) kadar air mikrokapsul berkisar 6,25 – 8,22 g/100g, tetapi dalam studi yang berbeda ditemukan kadar air yang lebih tinggi yaitu berkisar 7 – 9,5 g/100g terdeteksi oleh Rajam dan Anandharamakrishnan (2015).

Kadar air yang dihasilkan pada perlakuan B lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal itu disebabkan karena struktur kimia kitosan mempunyai kemampuan mengikat karaginan yang kuat. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Etchepare *et al.*, (2015), bahwa kitosan mempunyai kemampuan mengikat yang kuat sehingga mengarah ke pembentukan membran pada permukaan butiran yang dapat mengurangi kemungkinan migrasi bahan pelapis. Kadar air yang dihasilkan berbanding lurus dengan hasil viabilitas *L. acidophilus* yang diperoleh. Hal tersebut saling berhubungan, apabila kadar air yang dihasilkan terlalu rendah akan menyebabkan banyaknya rongga atau pori-pori yang besar pada dinding enkapsulat. Rongga tersebut dapat menyebabkan kematian pada bakteri yang dilindungi.

3.2. Kadar Air Enkapsulat *B. bifidum*

Hasil ANOVA pengaruh campuran iota karaginan dan kitosan terhadap kadar air *B. bifidum* menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata dengan $F_{hitung} > F_{1\%}$ (**Lampiran 8**). Pengaruh campuran iota karaginan dan kitosan terhadap kadar air enkapsulat *B. bifidum* dapat ditunjukkan melalui diagram batang seperti yang terlihat pada **Gambar 12**.

Gambar 12. Kadar air enkapsulat *B. bifidum* pada perbandingan bahan pengenkapsulat (iota karaginan : kitosan) yang berbeda.

Gambar 12 menunjukkan bahwa kadar air tertinggi pada perlakuan B ditunjukkan dengan hasil rata-rata kadar air sebesar 8,5917 %. Berdasarkan

penelitian yang telah dilakukan oleh Arslan *et al.*, (2015) kadar air mikrokapsul berkisar 6,25 – 8,22 g/100g, tetapi dalam studi yang berbeda ditemukan kadar air yang lebih tinggi yaitu berkisar 7 – 9,5 g/100g terdeteksi oleh Rajam dan Anandharamakrishnan (2015).

Kadar air yang dihasilkan pada perlakuan B lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal itu disebabkan karena struktur kimia kitosan mempunyai kemampuan mengikat karaginan yang kuat. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Etchepare *et al.*, (2015), bahwa kitosan mempunyai kemampuan mengikat yang kuat sehingga mengarah ke pembentukan membran pada permukaan butiran yang dapat mengurangi kemungkinan migrasi bahan pelapis. Kadar air yang dihasilkan berbanding lurus dengan hasil viabilitas *B. bifidum* yang diperoleh. Hal tersebut saling berhubungan, apabila kadar air yang dihasilkan terlalu rendah akan menyebabkan terbentuknya rongga atau pori-pori yang besar pada dinding enkapsulat yang akan menyebabkan kematian pada bakteri yang dilindungi.

4. Aktivitas Air (Aw)

4.1. Aktivitas Air (Aw) Enkapsulat *L. acidophilus*

Hasil ANOVA pengaruh campuran iota karaginan dan kitosan terhadap aktivitas air (Aw) enkapsulat *L. acidophilus* menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata dengan $F_{hitung} > F_{1\%}$ (**Lampiran 9**). Pengaruh campuran iota karaginan dan kitosan terhadap aktivitas air enkapsulat *L. acidophilus* dapat ditunjukkan melalui diagram batang seperti yang terlihat pada **Gambar 13**.

Gambar 13. Diagram batang aktivitas air enkapsulat *L. acidophilus* pada perbandingan bahan pengenkapsulat (iota karaginan : kitosan) yang berbeda.

Gambar 13 menunjukkan bahwa aktivitas air tertinggi pada perlakuan B ditunjukkan dengan hasil rata-rata kadar Aw sebesar 0,6323. Aktivitas air antara 0,15 dan 0,30 memang sering direkomendasikan untuk mikrokapsul guna memastikan stabilitas mikrobiologi yang ada di dalamnya, tetapi hal itu kebanyakan direkomendasikan bagi yang menggunakan metode *spray dryer*. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Hernandez *et al.*, (2014) aktivitas air mikrokapsul bakteri probiotik berkisar dalam rentan nilai 0,6 – 0,9. Aktivitas air dengan nilai 0,6 menurut Cislaghi *et al.*, (2012), berada dalam kisaran normal dan juga dalam batas yang direkomendasikan untuk memastikan stabilitas mikrobiologi yang ada di dalamnya.

Aktivitas air yang dihasilkan pada perlakuan B lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal itu disebabkan karena struktur kimia kitosan yang memiliki jumlah H⁺ lebih banyak dibandingkan iota karaginan sehingga dapat mengikat OH⁻ yang ada pada karaginan. Aktivitas air yang dihasilkan berbanding lurus dengan hasil viabilitas *L. acidophilus* yang diperoleh, dimana perbandingan B lebih tinggi dibandingkan dengan perbandingan lainnya. Aktivitas air mampu menunjukkan jumlah air bebas di dalam pangan yang dapat digunakan oleh mikroba untuk pertumbuhannya.

4.2. **Aktivitas Air (Aw) Enkapsulat *B. bifidum***

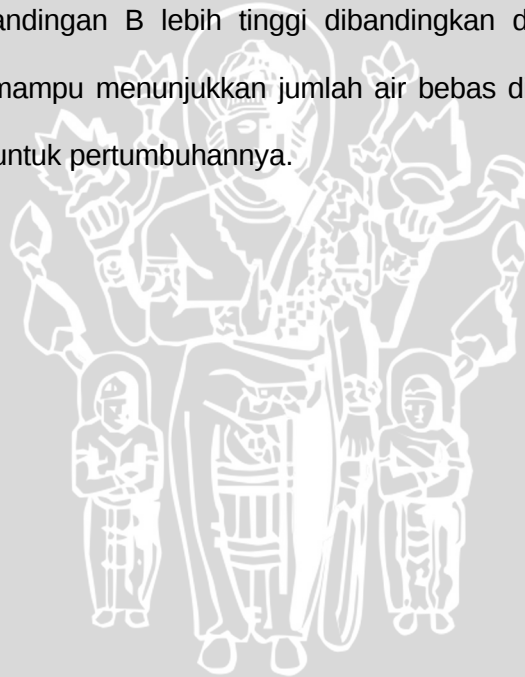
Hasil ANOVA pengaruh campuran iota karaginan dan kitosan terhadap aktivitas air enkapsulat (Aw) *B. bifidum* menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata dengan $F_{hitung} > F_{5\%}$ (**Lampiran 10**). Pengaruh campuran iota karaginan dan kitosan terhadap aktivitas air *B. bifidum* dapat ditunjukkan melalui diagram batang seperti yang terlihat pada **Gambar 14**.

Gambar 14. Diagram Diagram batang aktivitas air enkapsulat *B. bifidum* pada perbandingan bahan pengenkapsulat (iota karaginan : kitosan) yang berbeda.

Gambar 14 menunjukkan bahwa aktivitas air tertinggi yaitu pada perlakuan B ditunjukkan dengan hasil rata-rata Aw sebesar 0,6333. Aktivitas air antara 0,15 dan 0,30 memang sering direkomendasikan untuk mikrokapsul guna memastikan stabilitas mikrobiologi

yang ada di dalamnya, tetapi hal itu kebanyakan direkomendasikan bagi yang menggunakan metode *spray dryer*. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Hernandez *et al.*, (2014) aktivitas air mikrokapsul bakteri probiotik berkisar dalam rentan nilai 0,6 – 0,9. Aktivitas air dengan nilai 0,6 menurut Cislaghi *et al.*, (2012), berada dalam kisaran normal dan juga dalam batas yang direkomendasikan untuk memastikan stabilitas mikrobiologi yang ada di dalamnya.

Aktivitas air yang dihasilkan pada perlakuan B lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal itu disebabkan karena struktur kimia kitosan yang memiliki jumlah H^+ lebih banyak dibandingkan iota karaginan sehingga dapat mengikat OH^- yang ada pada karaginan. Aktivitas air yang dihasilkan berbanding lurus dengan hasil viabilitas *L. acidophilus* yang diperoleh, dimana perbandingan B lebih tinggi dibandingkan dengan perbandingan lainnya. Aktivitas air atau A_w 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 campuran iota karaginan dan kitosan dengan perbandingan 25%:75% berpengaruh terhadap viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum* dibuktikan dengan hasil tertinggi sebesar 6,4103 CFU/g dan 6,7013 CFU/g.

5.2 Saran

Probiotik dapat dirasakan manfaatnya apabila dapat melewati saluran pencernaan dengan jumlah yang memadai. Oleh sebab itu, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menguji kemampuan bahan penyalut iota karaginan dan kitosan *mix* dalam mengenkapsulasi *L. acidophilus* dan *B. bifidum*.

DAFTAR PUSTAKA

- Albadran, H. A., Chatzifragkou, A., Khutoryanskiy, V. V., and Charalampopoulos, D. 2015. Stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* in dry microcapsules under accelerated storage conditions. *Food Research International*, 74, 208–216.
- Antara, Nyoman Semadi. 2010. Pemilihan dan Penanganan Starter Yoghurt di Tingkat Industri. Universitas Udayana Kampus Bukit Jimbaran : Bali
- Arief, M. 2014. Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Probiotik pada Simulasi Saluran Pencernaan Manusia terhadap Viabilitas Probiotik. Skripsi Program Studi Teknologi Hasil Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Arslan, S., Erbas, M., Tontul, I., & Topuz, A. 2015. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 685–690.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells : From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 467–483.
- Chavarri, M., Maranon, I., Ares, R., Ibanez, F. C., Marzo, F., & Villarán, M. D. C. 2010. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1-2), 185–9
- Cislaghi, De Castro, F. P., Silva, C. D. R. E., Fritzen Freire, C. B., Lorenz, J. G., & Sant'Anna, E. S. 2012. Bifidobacterium Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. *Journal of Food Engineering*, 113(2), 186–193.
- Cock, Serna, L., & Vallejo-castillo, V. 2013. Probiotic encapsulation, African Journal of Mikrobiology Research. 7(40), 4743–4753.
- Barleany, D. R., Sapriullah, H dan Indy Roslia. 2014. Cangkang Rajungan Terhadap Kemampuannya Dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Escherechia coli*. Jurnal IPTEK Vol 18 No. 2.
- Diharmi, Andarini, Dedi Fardiaz, Nuri Andarwulan dan Endang Sri Heruwati. 2011. Karakteristik Karaginan Hasil Isolasi *Eucheuma spinosum* (Alga merah) Dari Perairan Sumenep Madura. Jurnal Perikanan dan Kelautan. 16,1, 117–124.
- Distantina, Sperisa, Fadilah, Rochmadi, Fahrurrozi dan Wiratni. 2010. Proses Ekstraksi Karaginan Dari *Eucheuma cottonii*. Seminar Rekayasa dan Proses ,4–5.
- Estevinho, B. N., Rocha, F., Santos, L., & Alves, A. 2013. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 31(2), 138–155.
- Etchepare De Araujo, M., Raddatz, G. C., de Moraes Flores, E. Marlon., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., Barin, J. S de Menezes, C. R. 2016. Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 511–517.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., Lilburn, T. G., Lansing, E., Bell, J. A. 2004. Taxonomic Outline of The Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Edition. Springer : New York. p.1-399.
- Harmayani, Emi., Ngatirah., Endang Sri., dan Tyas Utami. 2001. Ketahanan dan Viabilitas Probiotik Bakteri Asam Laktat Selama Proses Pembuatan Kultur Kering Dengan Metode Freeze dan *Spray Driying*. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Vol XII (2). Universitas Gajah Mada : Yogyakarta
- Hernandez, Carranza, P., Lopez-Malo, A., & Jimenez-Munguia, M.-T. 2013. Microencapsulation Quality and Efficiency of *Lactobacillus casei* by Spray Drying Using Maltodextrin and Vegetable Extracts. *Journal of Food Research*, 3(1), 61–69.
- Kamalian, N., Mirhosseini, H., Mustafa, S., Yazid, M., & Manap, A. 2014. Effect of alginate and chitosan on viability and release behavior of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 in simulated gastrointestinal fluid. *Carbohydrate Polymers*, 111, 700–706.

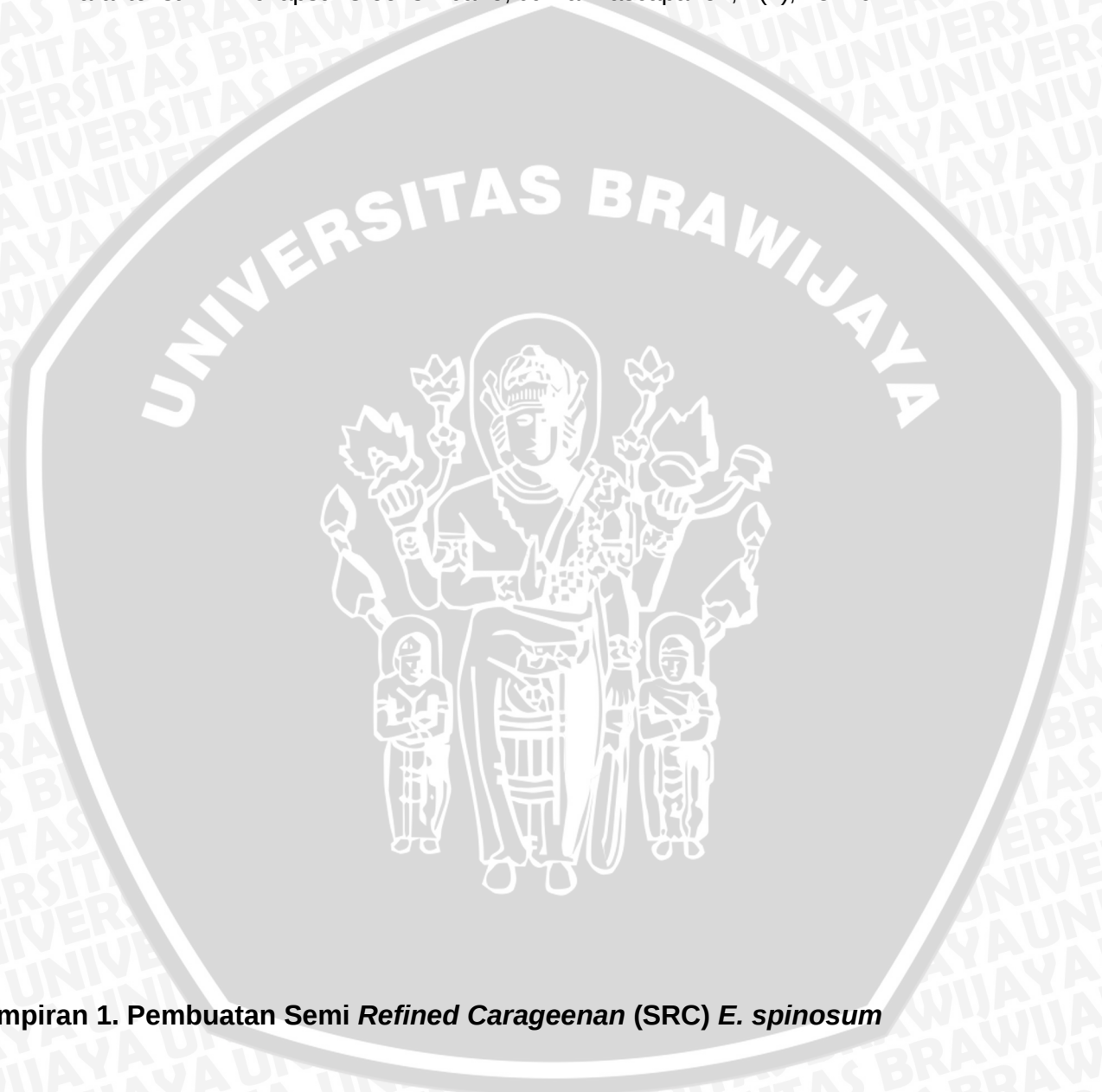
- Kim, S.J., Cho, S. Y., Kim, S. H., Song, O.-J., Shin, I.-S., Cha, D. S., & Park, H. J. 2008. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT - Food Science and Technology*, 41(3), 493–500.
- Mahatmanti, F. W., Sugiyono, W., & Sunarto, W. 2001. Sintesis Kitosan Dan Pemanfaatannya Sebagai Anti Mikrobia Ikan Segar, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. : Semarang. 101–111.
- Manin, F., & Metode, M. 2010. Potensi *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus fermentum* dari Saluran Pencernaan Ayam Buras Asal Lahan Gambut sebagai Sumber Probiotik, jurnal Ilmiah Ilmu-ilmu Peternakan Februari, Vol XIII (5).
- Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. 2014. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 15–25. doi:10.1016/j.ifset.2014.09.010
- Parameswari, A., Kuntari, Dan Herawati. 2009. Daya Hambat Probiotik Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans* (Growth Inhibition of Probiotics on The Growth of *Streptococcus mutans*). Universitas Airlangga : Surabaya
- Rahrs, Edwin. 2008. *Lactobacillus acidophilus* La-14. Danisco DK- Brabrand. Denmark
- Rajam, R., & Anandharamakrishnan, C. 2015. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 773–780.
- Reuter, G. 2001. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Microflora of the Human Intestine: Composition and Succession, Department of Food Hygiene, Veterinary Faculty, Free University of Berlin, Bruemmerstr. 10, D - 14195 Berlin (Dahlem), Germany, 43–53.
- Rosiana, A. D. ., Noor Erma dan Isnaeni. 2008. Pengaruh Asam-asam Organik Terhadap Pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* dan *Lactobacillus casei* (bakteri asam laktat). *Majalah Farmasi Airlangga*, Vol.6 No.2, Oktober 2008 Rosiana A.D.,et.al., 6(2), 53–56.
- Senditya, M., Hadi, M. S., Estiasih, T., & Saparianti, E. 2014. Efek Prebiotik Dan Sinbiotik *Simplisia Daun Cincau Hitam (Mesona Palustris Bl)* Secara In Vivo: Kajian Pustaka In Vivo Prebiotic And Synbiotic Effect Of Black Grass Jelly (*Mesona palustris Bl*) Leaf *Simplisia*: A Review, 2(3), 141–151.
- Setijawati, D., Wijana, S., & Santosa, I. 2011. Viabilitas Dan Struktur Mikrokapsul *Lactobacillus acidophilus* Dengan Bahan Penyalut Karaginan Semi Murni Jenis *Eucheuma cottonii*. *Jurnal Teknologi Pangan*, 2(1).
- Srifiana, Y., S. Surini., A. Yanuar. 2014. Mikroenkapsulasi Ketoprofen dengan Metode Koaservasi dan Semprot Kering Menggunakan Prigelatinisasi Pati Singkong Ftalat sebagai Eksipien Penyalut. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 12 (2): 162- 169.
- Sukma, S., Lusiana, S. E. dan Suratmo. 2014. Kitosan Dari Rajungan Lokal *Portunus pelagicus* Asal Probolinggo, Indonesia, Universitas Brawijaya : Malang 2(2), 506–512.
- 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 Veteriner*
- Triana, E. 2006. Uji Viabilitas *Lactobacillus sp.* Mar 8 Terenkapsulasi. *Biodiversitas, Journal of Biological Diversity*, LIPI ,7(2), 114–117.
- Ulfah, Marya. 2009. Pemanfaatan Iota Karaginan (*Eucheuma spinosum*) dan Kappa Karaginan (*Kappaphycus alvarezii*) Sebagai Sumber Serat Untuk Meningkatkan Kekenyalan Mie Kering. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor
- Usmiati, Sri., Sri Yuliani dan Erliza Noor. 2008. Aktivitas Hambat Terhadap Bakteri Patogen Oleh Serbuk Bakteriosin Asal *Lactobacillus sp.* Galur Scg 1223.

Institut Pertanian Bogor. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*. Vol 21 (2) 102-112

Wardaniati, Ratna Adi dan Setyaningsih. 2007. Pembuatan Chitosan Dari Kulit Udang dan Aplikasinya Untuk Pengawetan Bakso. Universitas Diponegoro : Semarang

Wukirsari, Tuti. 2006. Enkapsulasi Ibuprofen Dengan Penyalut Alginat-Kitosan. Skripsi . Institut Pertanian Bogor : Bogor

Yuliani, S., & Harimurti, N. 2007. Pengaruh Laju Alir Umpan dan Suhu Inlet *Spray Drying* Pada Karakteristik Mikrokapsul Oleorisin Jahe, *Jurnal Pascapanen*, 4(1), 18–26.



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

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 2. Pembuatan Kitosan

Lampiran 3. Pembuatan Mikrokapsul (Arif, 2014)



Lampiran 4. Data hasil penelitian utama

<i>L. acidophilus</i>	A1(1))	A1(2))	A2(1))	B1(1))	B1(2)	B2(1))	B2(2))	C1(1))	C1(2))	C2(1))	C2(2))	D 1(1)	D1(2))	D2(1)	D2(2)
2	170	121	156	820	670	844	930	728	810	860	980	19 3	54	32	388
3	164	43	8	480	591	624	616	616	576	684	640	19	20	8	30
4	28	7	3	236	274	276	243	54	108	75	107	9	8	4	3
5	4	0	2	35	3	32	20	13	7	19	21	2	5	0	0

<i>B. bifidum</i>	A1(1))	A1(2))	A2(1))	B1(1))	B1(2)	B2(1))	B2(2))	C1(1))	C1(2))	C2(1))	C2(2))	D 1(1)	D1(2))	D2(1)	D2(2)
2	446	640	720	752	734	748	318	277	820	504	110	50 1	600	824	320
3	306	384	605	160	431	591	167	105	120	192	107	48 0	502	780	120
4	207	30	104	105	145	417	50	7	48	47	18	80	40	110	20
5	50	5	38	40	28	22	40	2	15	18	17	17	22	15	10

Keterangan : A = iota : kitosan = 75% : 25%
 B = iota : kitosan = 75% : 25%
 C = iota : kitosan = 75% : 25%
 D = iota : kitosan = 75% : 25%

Lactobacillus acidophilus

Bifidobacterium bifidum

Perlakuan	N ₀ (CFU/mL)		N ₀ (log CFU/mL)		Perlakuan	N ₀ (CFU/mL)		N ₀ (log CFU/mL)	
	1	2	1	2		1	2	1	2
A	1,18	0,613	5,0719	4,7875	A	11,85	11,3	6,0737	6,0530

B	25,5	25,95	6,4065	6,4141	B	46,5	5	6,6674	6,7352
C	8,1	9,1	5,9084	5,9590	C	1,12	1,49	5,0512	5,1746
D	0,21	0,332	4,3222	4,5211	D	5	5	5,7781	6,8129
						6	6,5		



Lampiran 5. ANOVA *L. acidophilus*

Lactobacillus acidophilus

Perlakuan n	Ulangan	
	I	II
A	4,1614	4,2516
B	6,4065	6,4141
C	5,9084	5,9590
D	4,0899	4,5211

Perlakuan n	Ulangan		Total	Rata-rata	sd
	I	II			
A	5,0719	4,7875	9,8594	4,9297	0,20110
B	6,4065	6,4141	12,8206	6,4103	0,00537
C	5,9084	5,9590	11,8674	5,9337	0,03578
D	4,3222	4,5211	8,8433	4,42165	0,14064
FK	43,3907	1882,75	235,344		
JKT	240,368	3	1		
JKP	9	5,02477			
JKG	240,307	1			
	3	4,96323			
	0,06153	9			
	1				

ANOVA

SK	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F
Perlakuan n	3	4,96323	1,65441	107,549	6,59	1
Galat	4	0,06153	0,01538			
Total	7	5,02477	3			

BNT5%= 0,12402 0,34430
8 1

Perlakuan n	Rata-rata	Notasi
A	4,9297	b
B	6,4103	d
C	5,9337	c



D	4,42165	a
---	---------	---

Lampiran 6. ANOVA B. bifidum

Bifidobacterium bifidum

Perlakuan n	Ulangan	
	I	II
A	6,0737	6,0530
B	6,6674	6,7352
C	5,0512	5,1746
D	5,7781	6,8129

Perlakuan n	Ulangan		Total	Rata-rata	sd
	I	II			
A	6,0737	6,0530	12,1267	6,06335	0,014637
B	6,6674	6,7352	13,4026	6,7013	0,047942
C	5,0512	5,1746	10,2258	5,1129	0,087257
D	5,7781	6,8129	12,591	6,2955	0,731714
FK	48,3461	2337,34	292,168		
JKT	295,4389	3,27076	5	2	
JKP	294,8934	2,72523			
JKG	0,54553	2			

ANOVA					
SK	db	JK	KT	F hitung	F 5%
Perlakuan n	3	2,72523 0,54553	0,90841 0,13638	6,66072 8	6,59
Galat	4	2 3,27076	2 3		
Total	7	2			



BNT5%= 0,36930 1,02517
 1 9

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
A	6,06335	a
B	6,7013	b
C	5,1129	a
D	6,2955	b



Lampiran 7. 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	10,3 570	1,00 50	11,36 13	6,96 52%	A1	10,2 270	1,00 13	11,22 75	7,98 96%
A2	10,2 470	1,00 21	11,24 84	6,98 53%	A2	10,2 070	1,00 27	11,20 89	7,97 85%
A3	10,2 315	1,02 15	11,25 22	7,83 16%	A3	10,2 176	1,00 76	11,22 44	7,93 97%
B1	10,3 170	1,00 73	11,32 34	8,93 48%	B1	10,1 770	1,00 79	11,18 40	8,92 95%
B2	10,2 370	1,00 32	11,23 93	8,97 13%	B2	10,1 670	1,00 60	11,17 22	7,95 23%
B3	10,1 987	1,00 14	11,19 92	8,98 74%	B3	10,1 974	1,01 20	11,20 85	8,89 33%
C1	10,3 070	1,01 05	11,31 66	8,90 65%	C1	10,1 570	1,00 81	11,16 43	7,93 57%
C2	10,3 070	1,01 17	11,31 78	8,89 59%	C2	10,2 670	1,03 52	11,30 15	6,76 20%
C3	10,2 591	1,00 91	11,26 73	8,91 88%	C3	10,2 357	1,02 11	11,25 61	6,85 54%
D1	10,1 970	1,00 02	11,19 64	7,99 84%	D1	10,3 170	1,00 32	11,31 96	5,98 09%
D2	10,2 970	1,00 40	11,30 03	6,97 21%	D2	10,2 870	1,00 53	11,29 16	6,96 31%
D3	10,2 286	1,00 75	11,23 53	7,94 04%	D3	10,2 218	1,00 75	11,22 86	6,94 79%

Keterangan : A = Botol timbang setelah dikeringkan

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

C = Berat akhir



Lampiran 8. ANOVA kadar air *L. acidophilus*

KADAR AIR *Lactobacillus acidophilus*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata	Standar Deviasi
	I	II	III			
A	6,9652	6,9853	7,8316	21,7821	7,2607	0,494516
B	8,9348	8,9713	8,9874	26,8935	8,9645	0,011146
C	8,9065	8,8959	8,9188	26,7212	8,9071	0,0057652
D	7,9984	6,9721	7,9404	22,9109	7,6370	1,966440
FK =	98,3077	813,372	805,367			
JKT=	9	5				
JKP=	812,217	6,85037				
JKG=	4	4				
	1,15556					
	1					
ANOVA						

SK	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1 %
Perlakuan	3	6,850374	2,283458	15,80848	4,07	7,59
Galat	8	1,155561	0,144445			
Total	11	8,005935				
BNT5%=	0,380059	1,055045				
Perlakuan	n	rata-rata	notasi			
A	7	7,2607	a			
B	8	8,9645	b			
C	7	8,90706	b			
D	7	7,63696	a			

Lampiran 9. ANOVA kadar air *B. bifidum*

KADAR AIR *Bifidobacterium bifidum*

Perlakuan n	Ulangan			Total	Rata-rata	S
	I	II	III			
A	7,9896	7,9785	7,9397	23,9078	7,9692	0
B	8,9295	7,9523	8,8933	25,7751	8,5917	0
C	7,9357	6,7620	6,8554	21,5531	7,1843	0
D	5,9809	6,9631	6,9479	19,8919	6,6306	30



		8304,29	692,024
FK =	91,1279	4	5
	700,820	8,79605	
JKT=	6	2	
	698,720	6,69631	
JKP=	8	5	
	2,09973		
JKG=	7		

ANOVA

SK	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F
Perlakuan		6,69631	2,23210	8,50432		
n	3	5	5	4	4,07	7
Galat	8	7	7			
Total	11	2				

BNT5%=	0,51231	1,42218
	5	8

Perlakuan	n	rata-rata	notasi
		7,96926	
A	7		a
B	8,5917		b
		7,18436	
C	7		a
		6,63063	
D	3		a

Lampiran 10. ANOVA Aw *L. acidophilus*

Aw Lactobacillus acidophilus

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata	sd
	I	II	III			
A	0,628	0,631	0,63	1,889	0,630	0,001528



B	0,631	0,632	0,634	1,897	0,6323	0,0015 28 0,0020
C	0,630	0,634	0,631	1,895	0,6317	82 0,0005
D	0,620	0,62	0,621	1,861	0,6203	77

FK =	7,542	56,881764	4,740147
JKT=	4,740444	0,000297	
	4,74042533		
JKP=	3	0,00027833	
	1,86667E-		
JKG=	05		

ANOVA

SK	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F1%
Perlakuan		0,00027833	9,27778	39,7619047		
n	3	3	E-05	6	4,07	7,59
Galat		1,86667E-	2,33333			
Total	8	05	E-06			
	11	0,000297				

BNT5%=	0,00152752	5	0,00424041
--------	------------	---	------------

Perlakuan	n	rata-rata	notasi
A		0,630	b
B		0,6323	b
C		0,6317	b
D		0,6203	a

Lampiran 11. ANOVA Aw *B. bifidum*

Aw Bifidobacterium bifidum

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata	sd
	I	II	III			
A	0,619	0,623	0,62	1,862	0,620	0,002



					7	082
					0,633	0,001
B	0,633	0,635	0,632	1,9	3	528
					0,620	0,001
C	0,619	0,622	0,62	1,861	3	528
					0,631	0,001
D	0,631	0,633	0,630	1,894	3	528

			4,7087
FK =	7,517	56,505289	74
		0,0004489	
JKT=	4,709223	17	
	4,7092003	0,0004262	
JKP=	33	5	
	2,26667E-		
JKG=	05		

ANOVA

SK	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F1%
Perlakuan	3	0,0004262	0,0001	50,147		
		5	42	06	4,07	7,59
Galat	8	2,26667E-	2,83E-			
		05	06			
		0,0004489				
Total	11	17				

BNT5% =	0,0016832	0,0046727
	51	04

Perlakuan	rata-rata	notasi
A	0,621	a
B	0,6333	b
C	0,6203	a
D	0,6313	b

Lampiran 12. Spektra FT-IR kitosan

	Peak	Intensit y	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	0.7 26
3	661.54	41.439	1.648	852.48	653.82	54.445	2.7 43
4	898.77	50.422	8.89	916.12	881.41	9.161	1.2 85
5	946.98	44.467	2.476	952.77	916.12	10.889	0.2 74
6	1031.8 5	28.141	3.488	1049.2	952.77	46.563	3.6 04
7	1074.2 8	27.588	2.541	1137.9 2	1049.2	47.583	2.5 67
8	1153.3 5	31.142	9.408	1190	1139.8 5	20.974	3.2 16
9	1199.6 4	58.081	3.927	1218.9 3	1191.9 3	5.677	0.3 53
10	1263.2 9	56.742	3.943	1274.8 6	1218.9 3	11.826	0.6 1
11	1317.2 9	40.519	10.963	1344.2 9	1276.7 9	22.911	4.0 37
12	1379.0 1	32.646	8.193	1398.3	1346.2 2	21.877	2.2 46
13	1423.3 7	31.932	10.078	1500.5 2	1400.2 2	40.462	6.7 18
14	1566.0 9	32.581	9.631	1598.8 8	1502.4 4	39.075	5.3 68
15	1658.6 7	22.859	32.007	1784.0 3	1600.8 1	59.816	19. 829
16	2140.8 4	67.773	14.223	2306.7 1	1903.6 1	49.621	16. 896
17	2881.4 5	15.51	3.381	2906.5 3	2356.8 5	217.15 1	2.0 72
18	2921.9 6	15.735	0.858	2991.3 9	2908.4 5	63.48	0.8 3
19	3433.0 6	10.001	0.019	3434.9 8	3423.4 1	11.552	0.0 04

Lampiran 13. Spektra FT-IR iota karaginan *E. spinosum*

	Peak	Intensit y	Corr. Inte	Base (H)	Base (L)	Area	Corr . Are
1	578.6	35.024	4.297	601.75	534.25	28.586	1.37
2	609.46	38.592	1.733	657.68	601.75	20.102	0.061
3	659.61	49.235	0.405	684.68	657.68	7.982	0.098
4	709.76	45.207	12.98	788.83	686.61	24.766	4.568
5	806.19	69.764	10.215	825.48	788.83	4.55	1.016
6	850.55	62.483	11.754	862.12	825.48	5.621	1.34
7	875.62	45.028	28.272	891.05	862.12	6.645	2.588
8	931.55	52.646	28.462	952.77	891.05	11.114	5.162
9	1027.99	25.236	17.064	1053.06	952.77	39.286	8.509
10	1074.28	25.77	6.394	1137.92	1054.99	37.563	3.166
11	1157.21	44.995	10.717	1180.35	1139.85	12.032	1.879
12	1234.36	32.958	2.738	1240.14	1180.35	22.468	1.928
13	1259.43	31.897	5.996	1328.86	1242.07	33.731	2.531
14	1429.15	17.318	5.908	1444.58	1330.79	55.468	2.718
15	1647.1	29.064	37.617	1780.17	1583.45	62.253	32.35
16	1795.6	84.018	7.24	1818.75	1780.17	2.05	0.601
17	1934.47	87.536	0.257	1936.4	1874.68	2.394	0.033
18	2144.7	76.806	4.015	2202.56	1949.9	23.829	3.568
19	2515	83.784	8.482	2596.01	2451.36	6.961	1.927
20	2854.45	50.687	0.401	2856.38	2597.94	27.632	0.017
21	2920.03	36.848	6.587	2950.89	2858.31	34.742	2.695

22	3413.7 7	10	1.563	3431.1 3	3002.9 6	306.29 3	20. 842
----	-------------	----	-------	-------------	-------------	-------------	------------

Lampiran 14. Dokumentasi Penelitian



1. Pencucian rumput laut *E. spinosum* dalam dengan

2. Pengekstrasian CaOH_2 6%
waterbath selama 1 jam
suhu 70°C



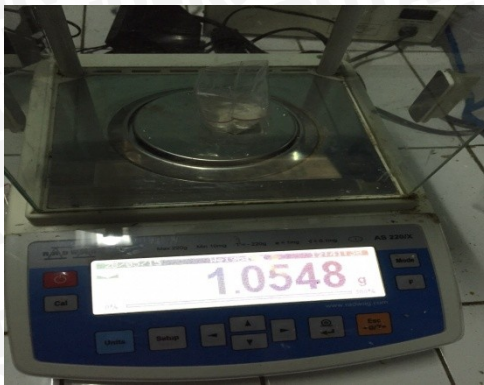
3. Pemisahan residu dengan filtrat

4. Residu ioda karaginan



5. Tepung ioda karaginan Kitosan

6. Proses Pembuatan



7. Penghalusan kitosan ukuran 100 mesh pengenkapsulat

8. Penimbangan bahan



9. Pembuatan sol iota dan kitosan KCL 0,3 M

10. Ekstruksi dalam





11. Penyaringan dengan kertas saring

12. Mikro kapsul basah