

**AMOBILISASI *Lactobacillus bulgaricus* DALAM
Ca-ALGINAT-KITOSAN**

TUGAS AKHIR

Oleh:
DHINI FEBRIA PRASETYANI
0210923004



JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2007

**AMOBILISASI *Lactobacillus bulgaricus* DALAM
Ca-ALGINAT-KITOSAN**

TUGAS AKHIR

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Oleh:

DHINI FEBRIA PRASETYANI

0210923004



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2007**

LEMBAR PENGESAHAN TUGAS AKHIR

**AMOBILISASI *Lactobacillus bulgaricus* DALAM
Ca-ALGINAT-KITOSAN**

Oleh:

DHINI FEBRIA PRASETYANI

0210923004

**Telah dipertahankan didepan Majelis Penguji
pada tanggal
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia**

Pembimbing I,

Pembimbing II,

Arie Srihardyastutie, S.Si,M.Kes

NIP: 132 300 238

Dra. Anna Roosdiana M.app.Sc

NIP: 132 000 070

Mengetahui

Ketua Jurusan Kimia

Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

M.Farid Rahman, S.Si, M.Si

NIP: 132 158 726

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Dhini Febria Prasetyani
NIM : 0210923004-92
Jurusan : Kimia
Penulis Tugas Akhir berjudul :
Amobilisasi *Lactobacillus bulgaricus* dalam
Ca-Alginat-Kitosan

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari Tugas Akhir yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis didaftar pustaka dalam tugas akhir ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata Tugas Akhir yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Malang, Januari 2007
Yang menyatakan

(Dhini Febria Prasetyani)
NIM. 0210923004

AMOBILISASI *Lactobacillus bulgaris* DALAM Ca-ALGINAT-KITOSAN

ABSTRAK

Lactobacillus bulgaricus merupakan kelompok bakteri asam laktat yang menghasilkan enzim laktase. Enzim ini menghidrolisis laktosa menjadi glukosa dan galaktosa dilanjutkan dengan proses fermentasi. Imobilisasi *Lactobacillus bulgaricus* perlu dilakukan agar dapat dipakai secara berulang. Sel ini disiapkan dengan cara menginokulasikan dalam media pertumbuhan selama 19 jam dan kemudian sel itu di panen untuk diimobilisasikan dalam Ca-Alginat yang terbuat dari konsentrasi Na-Alginat 3% dan CaCl_2 0,1M. Sel amobil dilapisi dalam berbagai konsentrasi kitosan (0,5-2,0%). Kondisi optimum dari aktivitas sel amobil dipelajari melalui penentuan kadar asam laktat yang dihasilkan pada berbagai konsentrasi kitosan, variasi suhu, waktu inkubasi dan konsentrasi sel. Selain itu juga efisiensi pemakaian ulang. Asam laktat yang dihasilkan diukur secara volumetri. Hasil penelitian menunjukkan kondisi optimum aktivitas sel amobil di capai pada konsentrasi kitosan 1,5%, suhu 45°C , waktu inkubasi 4 jam dan konsentrasi sel 2,5 %. Sel amobil yang dihasilkan dapat digunakan empat kali pengulangan dengan efisiensi lebih dari 50%.



IMMOBILIZED *Lactobacillus bulgaricus* IN Ca-ALGINAT-CHITOSAN

ABSTRACT

Lactobacillus bulgaricus is one group of lactic acid bacteria that producing lactase. This enzyme hydrolyzes lactose to be galactose and glucose, which followed by fermentation. *Lactobacillus bulgaricus* immobilization is required to be used in repetition. The cell was prepared by inoculating *Lactobacillus bulgaricus* in growth medium for 19 hours, then cell was harvested for immobilization in Ca-Alginate which made of 3% Na-Alginate concentration and 0.1M CaCl₂. The immobilized cell was coated in various chitosan concentration (0.5%-2%). The optimum condition of immobilized cell activity was studied by determining lactic acid product in various chitosan concentration, temperatures, incubation time and cell concentration. The efficiency of its reusability was also determined. The produced lactic acid was measured volumetrically. The result showed that optimum conditions of immobilized cell activity was found at 1.5% of chitosan concentration, 45°C, 4 hours incubation time and 2.5% of cell concentration. In addition, the immobilized can be used four times repetition resulting in more than 50% of efficiency



KATA PENGANTAR

Puja dan Puji syukur alhamdulillah penulis persembahkan kehadiran Allah SWT, karena atas rahmat dan hidayah-Nya maka penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul “**Amobilisasi *Lactobacillus bulgaris* dalam Ca-alginat-kitosan**”. Tugas akhir ini penulis susun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Sain jurusan Kimia Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang.

Dapat terselesainya skripsi ini tidak terlepas atas bantuan yang telah diberikan oleh berbagai pihak yang telah menyumbangkan tenaga, pikiran, dan waktunya. Dalam kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Arie Srihardyastutie, S.Si, M.Kes. dan Dra. Anna Roosdiana, M.App.,Sc selaku dosen Pembimbing I dan II, yang banyak memberikan bimbingan, arahan dan dukungan dalam menyelesaikan tugas akhir ini
2. Drs.Suratmo selaku Dosen Penasehat Akademik yang telah memberikan nasehat selama perkuliahan.
3. Dr.Ir H Chasan Bisri, Siti Mutrofin, S.Si, M.Sc, Ir.Bambang Ismuyanto,MS, Elvina Dhiaul Ifitah, S.Si., M.Si selaku Dosen Penguji yang telah memberikan kritik dan saran dalam perbaikan tugas akhir ini.
4. M.Farid Rahman, S.Si., Msi, selaku Ketua Jurusan Kimia, serta segenap Staf Pengajar dan Karyawan Jurusan Kimia.
5. Bapak, alm. Ibu, Dany Christiwan, adik Riska, Ernest yang senantiasa mendo'akan, memberikan semangat, perhatian dan kasih sayang yang melimpah.
6. Semua teman-teman Jurusan Kimia, khususnya angkatan 2002 dan semua pihak yang telah membantu selama penelitian sampai terselesainya tugas akhir ini.

Akhirnya dengan segala keterbatasan, penulis mengharapkan kritik dan saran dari semua pihak untuk perbaikan naskah tugas akhir ini, sehingga dapat bermanfaat bagi kita semua.

Malang, Januari 2007

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Susu.....	5
2.2 Pertumbuhan Bakteri.....	6
2.3 Bakteri Asam laktat.....	6
2.4 <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	7
2.5 Fermentasi.....	8
2.5.1 Pengaruh Suhu.....	10
2.5.2 Pengaruh Waktu.....	10
2.5.3 Kultur Starter.....	12
2.6 Pembentukan Asam Laktat.....	13
2.7 Amobilisasi Mikroba.....	15
2.8 Alginat.....	18
2.9 Kitosan.....	19
2.10 Amobilisasi Dengan Menggunakan Ca-Alginat-Kitosan.....	20
2.10.1 Amobilisasi Dengan Menggunakan Ca-Alginat.....	20
2.10.2 Amobilisasi Dengan Menggunakan Ca-Alginat-Kitosan.....	22
2.11 Hipotesis.....	22

BAB III Metode penelitian

3.1 Tempat Penelitian	23
3.2 Bahan dan Alat penelitian	23
3.2.1 Bahan penelitian.....	23
3.2.2 Bahan Kimia	23
3.2.3 Alat Penelitian.....	23
3.3 Tahapan Penelitian.....	24
3.3.1 Tahapan Penelitian.....	25
3.4 Cara Kerja	26
3.4.1 Penyiapan Media.....	26
3.4.1.1 Media Nutrien Agar	26
3.4.1.2 Media pertumbuhan	26
3.4.2 Peremajaan Biakan.....	26
3.4.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan.....	26
3.4.4 Pembuatan Biakan Aktif (larutan inokulum)	27
3.4.5 Produksi Sel <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	27
3.4.6 Hibrid Mikrokapsul.....	27
3.4.7 Penentuan Jumlah Sel dengan Haemocytometer	28
3.4.8 Pengukuran Kadar Asam Laktat Hasil Fermentasi Susu oleh Bakteri Asam Laktat Amobil.....	28
3.4.9 Penentuan Karakterisasi Bakteri Amobil	28
3.4.10 Penentuan waktu inkubasi optimum	29
3.4.11 Penentuan suhu optimum	29
3.4.12 Konsentrasi <i>Lactobacillus bulgaricus</i> amobil optimum	29
3.4.13 Efisiensi Pemakaian Ulang Bakteri Amobil.....	29
3.5 Analisa Data.....	29

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Amobilisasi <i>Lactobacillus bulgaricus</i> dalam Ca-alginat- Kitosan.....	30
4.2 Penentuan Kondisi Optimum <i>Lactobacllus bulgaricus</i> Amobil.....	32
4.2.1 Pengaruh Suhu Inkubasi Optimum Terhadap Aktivitas <i>Lactobacllus bulgaricus</i> Amobil	32
4.2.2 Pengaruh waktu Inkubasi Optimum Terhadap Aktivitas <i>Lactobacllus bulgaricus</i> Amobil	34
4.2.3 Pengaruh konsertrasi sel amobil Optimum Terhadap Aktivitas <i>Lactobacllus bulgaricus</i> Amobil.....	36

4.3 Efisiensi Pemakaian Ulang <i>Lactobacillus bulgaricus</i> Amobil.....	38
--	----

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan.....	40
5.2 Saran.....	40

DAFTAR PUSTAKA	41
-----------------------------	----

LAMPIRAN	44
-----------------------	----



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Proses pembentukan asam laktat dari laktosa oleh bakteri asam laktat homofermentatif dengan menggunakan jalur EMP	14
Gambar 2.2 Struktur Alginat	18
Gambar 2.3 Manik-manik Ca-alginat	19
Gambar 2.4 Struktur Kitosan	19
Gambar 2.5 Kitosan	20
Gambar 2.6 Reaksi Na-alginat dengan CaCl_2	21
Gambar 4.1 Grafik Pengaruh Konsentrasi Kitosan Terhadap Jumlah Kadar Asam Laktat	31
Gambar 4.2 Grafik Penentuan Suhu Inkubasi Optimum <i>Lactobacillus bulgaricus</i> Amobil	33
Gambar 4.3 Grafik Penentuan Waktu inkubasi Optimum <i>Lactobacillus bulgaricus</i> Amobil	34
Gambar 4.4 Grafik Penentuan Konsentrasi <i>Lactobacillus bulgaricus</i> Amobil	36
Gambar 4.5 Grafik Efisiensi Pemakaian Ulang <i>Lactobacillus bulgaricus</i> Amobil	38
Gambar L 3.1 Kurva Pertumbuhan <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	49

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Kandungan komposisi susu pada jenis ternak yang Berbeda	5
Tabel 4.1 Kadar asam laktat <i>Lactobacillus bulgaricus</i> amobil dalam konsentrasi Na-Alginat 3% dan berbagai konsentrasi kitosan	32
Tabel 4.2 Kadar asam laktat <i>Lactobacillus bulgaricus</i> amobil dalam berbagai suhu dengan konsentrasi Na-Alginat 3% dan konsentrasi kitosan 1,5 % selama 4 jam	33
Tabel 4.3 Kadar asam laktat <i>Lactobacillus bulgaricus</i> amobil dalam berbagai waktu inkubasi dengan konsentrasi Na-Alginat 3% dan konsentrasi kitosan 1,5 % pada suhu 45°C	35
Tabel 4.4 Aktivitas <i>Lactobacillus bulgaricus</i> amobil dalam berbagai konsentrasi dengan konsentrasi Na-Alginat 3% dan konsentrasi kitosan 1,5 % pada suhu 45 oC pada waktu 4 jam	37
Tabel 4.5 Tabel Efisiensi Pemakaian Ulang <i>Lactobacillus bulgaricus</i> Amobil	38
Tabel L.3.1. Densitas optik sel <i>Lactobacillus bulgaricus</i> pada interval 0-24 jam	48
Tabel L.4.1 Jumlah sel <i>Lactobacillus bulgaricus</i> terjebak pada berbagai konsentrasi Na-Alginat	49
Tabel L.4.2 Kadar asam laktat <i>Lactobacillus bulgaricus</i> amobil dalam konsentrasi Na-Alginat 3% dan berbagai konsentrasi kitosan	50
Tabel L.5.1 Kadar asam Laktat sebelum amobil	51
Tabel L.5.2 Kadar asam laktat <i>Lactobacillus bulgaricus</i> amobil dalam berbagai suhu dengan konsentrasi Na-Alginat 3% dan konsentrasi kitosan 1,5 % selama 4 jam	52
Tabel L.5.3 Kadar asam laktat <i>Lactobacillus bulgaricus</i> amobil dalam berbagai waktu inkubasi dengan konsentrasi Na-Alginat 3% dan konsentrasi kitosan 1,5 % pada suhu 45 °C	53

Tabel L.5.4 Kadar asam laktat <i>Lactobacillus bulgaricus</i> amobil dalam berbagai konsentrasi dengan konsentrasi Na-Alginat 3% dan konsentrasi kitosan 1,5 % pada suhu 45 °C pada waktu 4 jam.....	54
Tabel L.5.5 Efisiensi Pemakaian Ulang <i>Lactobacillus bulgaricus</i> amobil dalam berbagai konsentrasi dengan konsentrasi Na-Alginat 3% dan konsentrasi kitosan 1,5 % pada suhu 45 °C, pada waktu 4 jam, konsentrasi 2,5 %	55
Tabel L.5.6 Tabel Efisiensi Pemakaian Ulang <i>Lactobacillus bulgaricus</i> Amobil.	56
Tabel L.6.1 Penentuan F_{hitung} pada Variasi Konsentrasi Kitosan.....	58
Tabel L.6.1.1 Uji Beda Nyata Terkecil 5% Pengaruh Konsentrasi Kitosan.....	58
Tabel L.6.2 Penentuan F_{hitung} pada Variasi Suhu.....	59
Tabel L.6.2.1 Uji Beda Nyata Terkecil 5% Pengaruh Variasi Suhu.....	59
Tabel L.6.3 Penentuan F_{hitung} pada Variasi Waktu	60
Tabel L.6.3.2 Uji Beda Nyata Terkecil 5% Pengaruh Variasi Waktu.....	60
Tabel L.6.4 Penentuan F_{hitung} pada Variasi Konsentrasi Sel.....	61
Tabel L.6.4.1 Uji Beda Nyata Terkecil 5% Pengaruh Konsentrasi Sel	61
Tabel L.6.5 Penentuan F_{hitung} pada Efisien Pemakaian Ulang <i>Lactobacillus bulgaricus</i> Amobil	62
Tabel L.6.5.1 Uji Beda Nyata Terkecil 5% Pengaruh Efisien Pemakaian Ulang <i>Lactobacillus bulgaricus</i> Amobil.....	62

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Preparasi Larutan	44
Lampiran 2 Perhitungan Pembuatan Larutan	45
Lampiran 3 Pembuatan kurva pertumbuhan <i>Lactobacillus</i> <i>bulgaricus</i>	48
Lampiran 4 Penentuan Konsentrasi sel Na-Alginat	49
Lampiran 5 Penentuan Kondisi Optimum <i>Lactobacillus</i> <i>bulgaricus</i> amobil	51
Lampiran 6 Analisis Statistika	56
Lampiran 7 Diagram Alir Penelitian	63
Lampiran 8 Diagram Kerja Penelitian.....	64



BAB I

PENDAHULUAN

1.2 Latar Belakang

Susu berperan penting dalam pemenuhan kebutuhan protein hewani, sehingga dianjurkan untuk dikonsumsi sebagai pola menu empat sehat lima sempurna karena kandungan nutrisinya tinggi. Susu saat ini digunakan sebagai penambah kalori karena susu mengandung air, laktosa, lemak, kasein, albumin, mineral (Dwijoseputro, 1998). Menurut Widodo (2003), Kualitas produk susu sangat dipengaruhi oleh kualitas awal susu. Salah satu pengaruh kualitas susu adalah bakteri yang terkandung didalamnya. Bakteri yang terdapat dalam susu sangat berperan dalam menentukan kualitas susu serta terjadinya pengasaman melalui fermentasi

Salah satu bakteri yang berperan aktif sebagai starter dalam fermentasi susu adalah bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat adalah bakteri yang menfermentasi gula untuk menghasilkan sejumlah besar asam laktat. Salah satu arti penting dari proses fermentasi susu oleh bakteri asam laktat adalah dihasilkan asam laktat yang digunakan sebagai pemecah laktosa (Widodo, 2003)

Lactobacillus bulgaricus merupakan salah satu kelompok bakteri asam laktat yang berperan aktif dalam fermentasi susu. Salah satu aspek yang menguntungkan dari pemanfaatan bakteri asam laktat pada fermentasi susu adalah dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen (bakteri penyebab penyakit). *Lactobacillus bulgaricus* merupakan bakteri yang memiliki sel bervariasi dari panjang dan tipis, kadang berbentuk batang, dengan lebar kurang dari 2 μm dan menghasilkan enzim laktase yang dapat mengubah laktosa menjadi asam laktat (Gilliand, 1985).

Amobilisasi sel dapat didefinisikan sebagai penempatan atau pembatasan fisik dari sel utuh pada suatu daerah ruang dengan mempertahankan beberapa aktivitas yang diinginkan. Daerah dimana sel ditempatkan disebut sistem sel amobil atau kumpulan sel amobil yang dapat dibagi dalam tiga komponen yaitu sel, material pendukung, dan larutan yang mengisi sisa dari ruang (Bernath dan Ventasubramanian, 1987).

Caragenaan, alginat dan agar merupakan yang paling banyak digunakan dalam amobilisasi. Salah satu senyawa turunan dari alginat adalah Na-alginat yang mempunyai sifat yang larut dalam air, tetapi bila telah bereaksi dengan garam kalsium membentuk Ca-alginat (Hawley,1978). Konsentrasi larutan Na-alginat mempengaruhi butiran sel teramobil yang terbentuk . Jika konsentrasi larutan Na-alginat dinaikkan maka akan didapatkan butiran gel dengan porositas rendah, dalam hal ini mempengaruhi keefektifan metode teramobilisasi (Cheetam dan Bucke, 1979). Keuntungan amobilisasi dengan Ca-Alginat bersifat aman, cepat, murah dan dapat diaplikasikan pada sebagian besar enzim, penurunan aktivitas relatif rendah karena tidak ada reaksi langsung dengan enzim dan juga dapat digunakan untuk hampir semua biokatalisator (Judoamidjojo, dkk 1992).

Prestikasari (2006) telah mengamobilisasi *Lactobacillus bulgaricus* dengan variasi konsentrasi Na-alginat 1-3 % (b/v) produksi asam laktat paling tinggi didapatkan pada konsentrasi Na-alginat 3% dengan kadar asam laktat 0,013% dengan efisiensi *Lactobacillus bulgaricus* amobil hingga tiga kali pemakaian ulang. Pemakaian ulang bakteri asam laktat yang telah diamobil dengan menggunakan Ca-alginat menunjukkan penurunan kadar asam laktat.

Faktor-faktor yang menyebabkannya karena adanya kerusakan pori-pori gel Ca-alginat secara bertahap yang diikuti dengan kerusakan sel. Dimungkinkan karena pengaruh suhu yang digunakan untuk menentukan kadar asam laktat dalam pemakaian berulang amobil jauh lebih besar dibandingkan suhu yang digunakan untuk pembentukan manik. Seiring dengan penambahan ulangan pemakaian yang dilakukan memungkinkan adanya sel yang terlepas dari gel, karena berkurangnya kekerasan dalam gel Ca-alginat. Berkurangnya sel mengakibatkan kadar asam laktat yang dihasilkan berkurang (Prestikasari , 2006).

Berdasarkan uraian diatas, maka untuk memperbaiki sistem amobil dapat menggunakan sistem amobil double layer dengan menggunakan kitosan. Karena Struktur kitosan mirip dengan selulosa yang merupakan homopolimer D-Glukosamin dengan ikatan $\beta(1-4)$. Karena kemiripan struktur inilah kitosan digolongkan sebagai selulosa dengan penggantian satu gugus hidroksil oleh amida pada setiap monomernya (Ratlidge, 1994).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah disebutkan di atas, maka dapat dirumuskan suatu permasalahan, yaitu :

1. Bagaimana pengaruh konsentrasi Ca-alginat-kitosan terhadap jumlah sel *Lactobacillus bulgaricus* yang terjebak dalam Ca-alginat-kitosan ?
2. Bagaimana kondisi optimum *Lactobacillus bulgaricus* amobil dalam Ca-alginat-kitosan di dalam fermentasi susu untuk menghasilkan asam laktat ?
3. Bagaimana efisiensi pemakaian ulang *Lactobacillus bulgaricus* yang telah diamobilisasi dengan menggunakan Ca-alginat-kitosan dalam menfermentasi susu ?

1.3 Batasan Masalah

Penelitian ini dibatasi pada :

1. Penentuan konsentrasi Na-alginat-kitosan yang digunakan sebagai material pendukung untuk pembentukan Ca-alginat-kitosan.
2. Penentuan kondisi optimum *Lactobacillus bulgaricus* amobil dalam Ca-alginat-kitosan dengan memvariasi suhu, waktu inkubasi dan konsentrasi *Lactobacillus bulgaricus* dalam fermentasi susu.
3. Penentuan efisiensi pemakaian ulang *Lactobacillus bulgaricus* amobil dengan mengukur kadar asam laktat yang terbentuk dalam fermentasi susu sampai 5 kali perulangan.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh konsentrasi Ca-alginat-kitosan yang digunakan dalam proses amobilisasi sel dari *Lactobacillus bulgaricus* terhadap jumlah sel yang terjebak dalam Ca-alginat-kitosan

2. Mengetahui kondisi optimum *Lactobacillus bulgaricus* amobil dalam Ca-alginat-kitosan didalam fermentasi susu untuk menghasilkan asam laktat
3. Mengetahui efisiensi pemakaian ulang *Lactobacillus bulgaricus* amobil dalam fermentasi susu.

1.5 Manfaat Penelitian

Melalui penelitian ini maka diharapkan diperoleh informasi tentang konsentrasi Ca-alginat-kitosan yang digunakan dalam proses amobilisasi *Lactobacillus bulgaricus* dalam Ca-alginat-kitosan, kondisi optimum bakteri *Lactobacillus bulgaricus* amobil dalam Ca-alginat-kitosan didalam fermentasi susu, dan memberikan informasi bahwa *Lactobacillus bulgaricus* amobil dapat diaplikasikan dalam fermentasi susu secara berulang.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Susu

Sifat susu yang perlu diketahui adalah bahwa susu merupakan media yang baik sekali bagi pertumbuhan mikroba, sehingga bila penanganannya tidak baik dapat menimbulkan penyakit (Hadiwiyoto, 1993).

Komposisi susu dapat beragam, tergantung pada beberapa faktor, yaitu diantaranya adalah (Buckle, dkk, 1987):

1. Jenis ternak

Komposisi susu berlainan pada setiap jenis ternak yang berbeda, seperti daftar komposisi pada masing-masing mamalia berikut:

Tabel 2.1 Kandungan komposisi susu pada jenis ternak yang berbeda

Jenis	Lemak (%)	Protein (%)	Laktosa (%)	Abu (%)	Air (%)
Kambing	4,09	3,71	3,71	0,79	87,81
Kerbau	7,40	4,74	4,74	0,78	82,44
Domba	8,28	5,44	5,44	0,90	80,60
Sapi	3,90	3,40	3,40	0,72	87,10

2. Waktu pemerahan

Semakin teratur jarak pemerahan, semakin teratur pula kandungan lemak pada susu tersebut.

3. Keragaman akibat musim

Kandungan lemak pada susu biasanya menurun pada akhir musim semi dan akan meningkat lagi menjelang musim dingin

4. Umur sapi

Umur sapi hanya berpengaruh sedikit pada komposisi susu. Selama jangka waktu 10 tahun, rata-rata kandungan lemak menurun kira-kira 0,2 %.

5. Penyakit

Penyakit pada sapi biasanya mengacaukan keseimbangan unsur-unsur di dalam susu.

6. Makanan ternak

Kurangnya pemberian makanan akan mengurangi volume hasil susu.

Semua keragaman komposisi susu dikarenakan faktor-faktor di atas, secara umum susu memiliki kandungan yaitu lemak 3,9 %, protein 3,4 %, laktosa 4,8%, abu 0,72 %, air 87,10 %. Bersama dengan bahan-bahan lain dengan jumlah sedikit seperti sitrat, enzim-enzim, fosfolipid, vitamin A, Vitamin B, dan vitamin C (Buckle, dkk, 1987). Menurut Rahman (1992) laktosa merupakan karbohidrat utama dalam susu yang dapat digunakan oleh bakteri starter sebagai sumber karbon dan energi untuk pertumbuhan. Laktosa akan dihidrolisis oleh bakteri starter dan hasil akhirnya berupa asam piruvat. Selanjutnya asam piruvat akan diubah menjadi asam laktat. Asam laktat yang terbentuk ini menyebabkan penurunan pH.

2.2 Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan bakteri ini dapat didefinisikan sebagai pertambahan secara teratur semua komponen di dalam sel hidup. Pada organisme uniseluler (bersel tunggal) yang disebut pertumbuhan adalah pertambahan jumlah sel yang berarti juga pertambahan jumlah organisme, misalnya pertumbuhan yang terjadi pada suatu kultur mikroba (Fardiaz, 1988).

2.3 Bakteri Asam laktat

Asam laktat pertama pertama kali ditemukan dalam susu asam oleh seorang ahli kimia Swedia pada tahun 1780 (Rahman, 1992). Asam laktat ini dibentuk dari laktosa susu dimana bakteri asam laktat adalah group mikroorganisme yang menfermentasi laktosa tersebut menjadi asam laktat (Salle,1968).

Bakteri asam laktat adalah kelompok bakteri yang dalam metabolisme karbohidratnya menghasilkan asam laktat sebagai bahan utama, merupakan kelompok bakteri gram positif berbentuk batang dan bulat, katalase negatif, dan tidak berbentuk spora, mikroaerofilik sampai aerob tidak mereduksi nitrit menjadi nitrat,

suhu optimum pertumbuhan 20-40°C. Sifat-sifat bakteri asam laktat adalah tumbuh pada pH 3,8-8,00 serta mampu memfermentasikan berbagai monosakarida dan disakarida (Stainer,dkk,1982).

Bakteri asam laktat memiliki sedikit kemampuan untuk merangsang kekebalan tubuh. Fungsi dari sistem ini tidak hanya melindungi tubuh dari bakteri patogen dan senyawa beracun, tetapi juga mendeteksi dan menghancurkan sel karsinogenik. Bakteri ini memproduksi antibiotik untuk mencegah diare (Mitsuoka, 1990). Bakteri Asam laktat pada umumnya dapat dibagi menjadi dua macam, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. Pada golongan homofermentatif hasil fermentasi terbesar merupakan asam laktat yaitu kira-kira 85% , sedangkan pada heterofermentatif jumlah asam laktat yang dihasilkan kurang dari 85% atau kira-kira seimbang dengan hasil-hasil lainnya, misalnya asam asetat, etanol, CO₂ dan sebagainya (Winarno dkk, 1980). Reaksi yang terjadi menurut Salle (1961) adalah sebagai berikut :

1. Homofermentatif



2. Heterofermentatif



Mikroba yang melakukan fermentasi asam laktat terutama adalah bakteri asam laktat, yang termasuk genus bakteri asam laktat yaitu *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, dan *Pediococcus* (Nickerson dan Sinskey, 1997)

2.4 *Lactobacillus bulgaricus*

Lactobacillus bulgaricus merupakan bakteri yang berbentuk batang, soliter (berantai), tidak berspora, mikroaerofil sampai anaerob, gram positif pH optimum 6, suhu optimum 40°-55°C. Biakan ini mampu menfermentasikan karbohidrat seperti mampu membentuk asam dari glukosa tanpa memproduksi gas CO₂ (homofermentatif), galaktosa positif, laktosa positif, fruktosa positif, dan sukrosa negatif. Bakteri ini termasuk group *termobacterium*, mampu tumbuh pada suhu 45°C dan tidak mampu pula tumbuh pada

suhu 15°C, toleransi pH umumnya 5,5-5,8 (Buchanan dan Gibbon, 1974).

Lactobacillus bulgaricus mempunyai klasifikasi sebagai berikut (Salle,1961) :

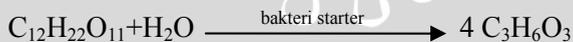
Kingdom : Plant
Divisi : Protophyta
Klass : Schizomycetes
Orde : Eubacteriales
Famili : Lactobacillaceae
Tribe I : Lactobacillaceae
Genus : Lactobacillus
Species : *Lactobacillus bulgaricus*

Lactobacillus bulgaricus bersifat non motil, produksi pigmennya sedikit, warnanya kuning, orange atau merah bata.

Bersifat mikroaerofil atau anaerob, maka sedikit sekali yang tumbuh pada permukaan medium atau bagian atas medium (Salle, 1968). Menurut Gilliland (1985) karakteristik utama dari *Lactobacillus bulgaricus* adalah dapat menfermentasi laktosa, glukosa, dan galaktosa. *Lactobacillus bulgaricus* menghidrolisis laktosa dengan adanya enzim β galaktosidase. Sebagian besar *Lactobacilli* memiliki enzim. β galaktosidase.

2.5 Fermentasi

Fermentasi adalah suatu proses perubahan kimia dari suatu substrat organik yang dapat berlangsung karena aksi enzim-enzim yang dihasilkan oleh mikroba-mikroba hidup tertentu. Sebagai suatu proses metabolisme, fermentasi memiliki ciri-ciri yaitu oksidasi berlangsung tidak sempurna, terjadi transformasi sejumlah besar substrat oleh sejumlah jasad hidup dan energi yang dihasilkan relatif rendah (Judoamidjojo, dkk, 1992).



Proses fermentasi yaitu ditujukan untuk memperbanyak jumlah mikroba dan menggiatkan metabolismenya di dalam makanan, tetapi jenis mikroba yang digunakan sangat terbatas yaitu disesuaikan dengan hasil akhir yang dikehendaki (Winarno, dkk, 1980).

Prinsip kerja fermentasi menurut Winarno (1980) terjadi karena adanya aktivitas mikroba penyebab fermentasi pada substrat organik yang sesuai. Terjadinya fermentasi ini dapat menyebabkan perubahan sifat bahan pangan, sebagai akibat pemecahan kandungan-kandungan bahan pangan tersebut.

Fermentasi timbul sebagai hasil metabolisme tipe anaerobik. Semua organisme membutuhkan sumber-sumber energi yang diperoleh dari metabolisme bahan pangan selama hidupnya. Bahan baku energi yang banyak digunakan di antara mikroorganisme adalah oksigen, dengan adanya oksigen glukosa dapat diuraikan sehingga menghasilkan air, CO₂ dan sejumlah energi (ATP) yang digunakan untuk tumbuh. Ini merupakan metabolisme aerobik (Buckle dkk, 1987)

Buckle dkk, (1987) menyatakan beberapa mikroorganisme dapat mencerna bahan baku energinya tanpa O₂ dan sebagainya, bahan baku ini hanya sebagian yang dipecah, menghasilkan sebagian kecil energi, CO₂, air dan produk akhir metabolik organik lain yang dihasilkan termasuk sejumlah besar asam laktat, asam asetat dan etanol serta sejumlah kecil asam organik volatil lainnya, alkhohol dan ester dari alkhohol tersebut. pertumbuhan yang sering terjadi tanpa adanya O₂ disebut fermentasi.

Fermentasi susu pada umumnya bakteri asam laktat yang tumbuh di dalam susu menggunakan laktosa dan glukosa sebagai sumber energi dan karbon dalam menghasilkan asam laktat. Selama berlangsungnya fermentasi terbentuk asam yang menyebabkan rasa dan aroma yang khas, serta komponen-komponen cita rasa yang khas seperti karbonil, asetaldehida, aseton, dan diasetil (Helferich dan Westhoff, 1980).

Ada empat pokok yang perlu di perhatikan dalam proses fermentasi menurut Rahman (1992) yaitu : mikroba, medium fermentasi, fermentor dan kondisi lingkungan. Seleksi terhadap jenis dan jumlah inokulum yang akan ditambahkan akan menentukan kualitas dan kuantitas hasil fermentasi.

Fermentasi juga mempunyai manfaat dan kerugiannya, dimana makanan-makanan yang mengalami proses fermentasi mempunyai nilai gizi yang lebih tinggi daripada bahan asalnya. Hal ini tidak hanya dikarenakan mikroba yang bersifat katabolik atau memecah komponen-komponen yang kompleks menjadi zat-zat yang lebih sederhana sehingga lebih mudah dicerna, tetapi mikroba juga

dapat mensintesa beberapa vitamin yang kompleks dan faktor pertumbuhan bahan lainnya, misalnya produksi dari beberapa seperti riboflavin, vitamin B12 dan provitamin A. Melalui proses fermentasi juga dapat terjadi pemecahan oleh enzim-enzim tertentu terhadap bahan-bahan yang tidak dapat dicerna oleh manusia misalnya selulosa, hemiselulosa, dan polimer-polimernya menjadi gula sederhana atau turunan-turunannya (Stainer, dkk, 1982).

2.5.1 Pengaruh Suhu

Selama melakukan aktivitasnya mikroba menbebaskan panas, sehingga didalam industri, fermentor selalu dilengkapi dengan pendinginan. Suhu ini perlu dikontrol karena tiap mikroba mempunyai toleransi suhu yang berbeda-beda dimana mikroba masih tetap hidup dan aktif (Rutgers dan Ebing, 1995).

Pengaruh suhu terhadap kecepatan pertumbuhan spesifik mikroba yang digolongkan pada tigolongan yaitu psikrofilik, mesofilik dan termofilik. Bakter psikrofilik adalah bakteri yang mampu tumbuh antara 0°C sampai 30°C, bakteri mesofilik tumbuh antara 25°C sampai 40°C dan bakteri thermofilik mampu tumbuh pada suhu 50 atau lebih (Peltzer dan Chan, 1986).

Menurut Kandel dkk, (1986) Apabila ada kenaikan suhu, maka proses reaksi dapat berlangsung dengan cepat dikarenakan semua proses laju reaksi di pengaruhi oleh suhu. Hal ini menyebabkan bakteri mampu tumbuh lebih cepat pada lingkungan yang lebih panas. Namun di atas suatu temperatur kritis, panas dapat mendenaturasi protein, sehingga dapat merusak senyawa essensial dan dapat membunuh sel-sel. (Kandel dan Mckane, 1986).

2.5.2 Pengaruh Waktu

Istilah pertumbuhan bakteri dan mikroorganisme mengacu pada pertambahan total massa sel dan bukan perubahan individu organisme. Selang waktu yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel membentuk suatu populasi disebut waktu generasi. Tidak semua species bakteri mempunyai waktu generasi yang sama (Pelezar, 1986). Sedangkan menurut Kendel dan Mckane (1986), dinamika pertumbuhan bakteri dapat diamati melalui proses inokulasi bakteri ke dalam kultur media cair dan mengukur ukuran populasi pada

interval waktu tertentu. Manakala hasil pengukuran ini diplotkan menjadi suatu kurva pertumbuhan.

Hasil pengukuran ini kemudian diplotkan menjadi suatu kurva pertumbuhan dengan 4 fase pertumbuhan berbeda yaitu (Kandel dan Mckane, 1986) :

1. Lag fase atau fase adaptasi

Bila mikroba memasuki atau dipindahkan ke dalam lingkungan yang baru, mikroba tersebut tidak dapat segera memperbanyak diri, tetapi pada suatu periode tertentu. Selama lag fase ini tidak dapat diamati adanya kenaikan jumlah sel, proses reproduksi tidak terjadi dan mikroba-mikroba tersebut melakukan metabolisme aktif dan menyesuaikan diri pada lingkungan yang baru sebelum mikroba tersebut mulai menaikkan jumlahnya melalui pembelahan (Kandel dan Mckane, 1986).

2. Fase Logaritmik (log)

Pada fase pertumbuhan logaritmik (log) jumlah sel-sel bakteri selama pertumbuhan eksponensial dicatat sebagai suatu logaritma untuk menyatakan perubahan eksponensial (Kandel dan Mckane, 1986). Pada fase ini kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh medium tempat tumbuhnya seperti pH dan kandungan nutrient, juga kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembapan udara. Pada fase ini mikroba membutuhkan lebih banyak energi dibanding fase lainnya (Fardiaz, 1988).

3. Fase stasioner

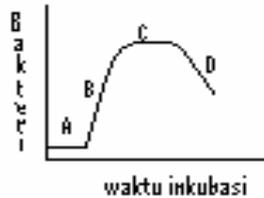
Selama fase stasioner ini, tidak ada lagi kenaikan ukuran populasi. Jumlah sel tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati (Kandel dan Mckane, 1986). Ukuran sel menjadi lebih kecil karena sel tetap membelah meskipun zat-zat nutrient sudah habis. Karena kurang nutrisi, sel kemungkinan mempunyai komposisi berbeda dengan sel yang tumbuh pada fase logaritmik. Sel-sel lebih tahan terhadap keadaan ekstrem seperti panas, dingin, radiasi dan bahan-bahan kimia (Fardiaz, 1988).

4. Fase kematian

Pengurangan nutrisi secara terus-menerus menyebabkan banyak metabolit yang terbuang, mikroba-mikroba akan mengalami

kematina secara cepat dan pada laju yang tetap. Penurunan populasi pada fase ini hamper sama dengan kenaikan populasi selama fase log (Capuccino and Sherman,1983).

Adapun kurva pertumbuhan dari bakteri adalah sebagai berikut (Capuccino and Sherman,1983):



- A: Fase adaptasi (lag fase)
- B: Fase logaritmik (log fase)
- C: Fase stasioner
- D: Fase kematian

Perhitungan jumlah bakteri dapat dilakukan dengan metode densitas optik ($OD = optical\ density$), dimana densitas optik bakteri dapat membiaskan cahaya dengan gelombang tertentu. Jumlah cahaya yang ditransmisikan setelah melewati suspensi biakan berbanding terbalik dengan jumlah mikroorganisme. Spektrofotometer dapat digunakan untuk mengukur transmitansi atau OD (jumlah cahaya yang diabsorpsi), dimana OD sebanding dengan kepekatan sel dalam suspensi biakan (Lay, 1994).

2.5.3 Kultur Starter

Kultur starter dapat diartikan sebagai mikroba yang digunakan untuk menfermentasi suatu produk pangan. Jenis mikroba yang digunakan sebagai kultur starter harus memiliki kemampuan untuk menghasilkan perubahan yang diinginkan pada produk yang difermentasi (UK Center, 2002).

Menurut Gilliland (1985), kultur yang digunakan dalam proses fermentasi harus mempunyai sifat-sifat sebagai berikut :

- Tidak mengandung kontaminan
- Aktif menghasilkan produk yang diharapkan
- Jumlah mikroba seragam dan proporsional jika berbentuk kultur campuran.

Kultur yang digunakan harus dalam keadaan aktif sehingga fase log dalam proses fermentasi berlangsung minimal mungkin dan kemampuan menghasilkan produknya stabil, dan presentase starter yang digunakan tidak boleh terlalu rendah, karena akan menyebabkan fermentasi berjalan dengan lambat dan kurang efisien,

sebaiknya kultur yang mempunyai konsentrasi yang terlalu tinggi akan menyebabkan terjadinya kompetisi antar bakteri starter dalam memperebutkan media (Kosikowski, 1982).

2.6 Pembentukan Asam Laktat

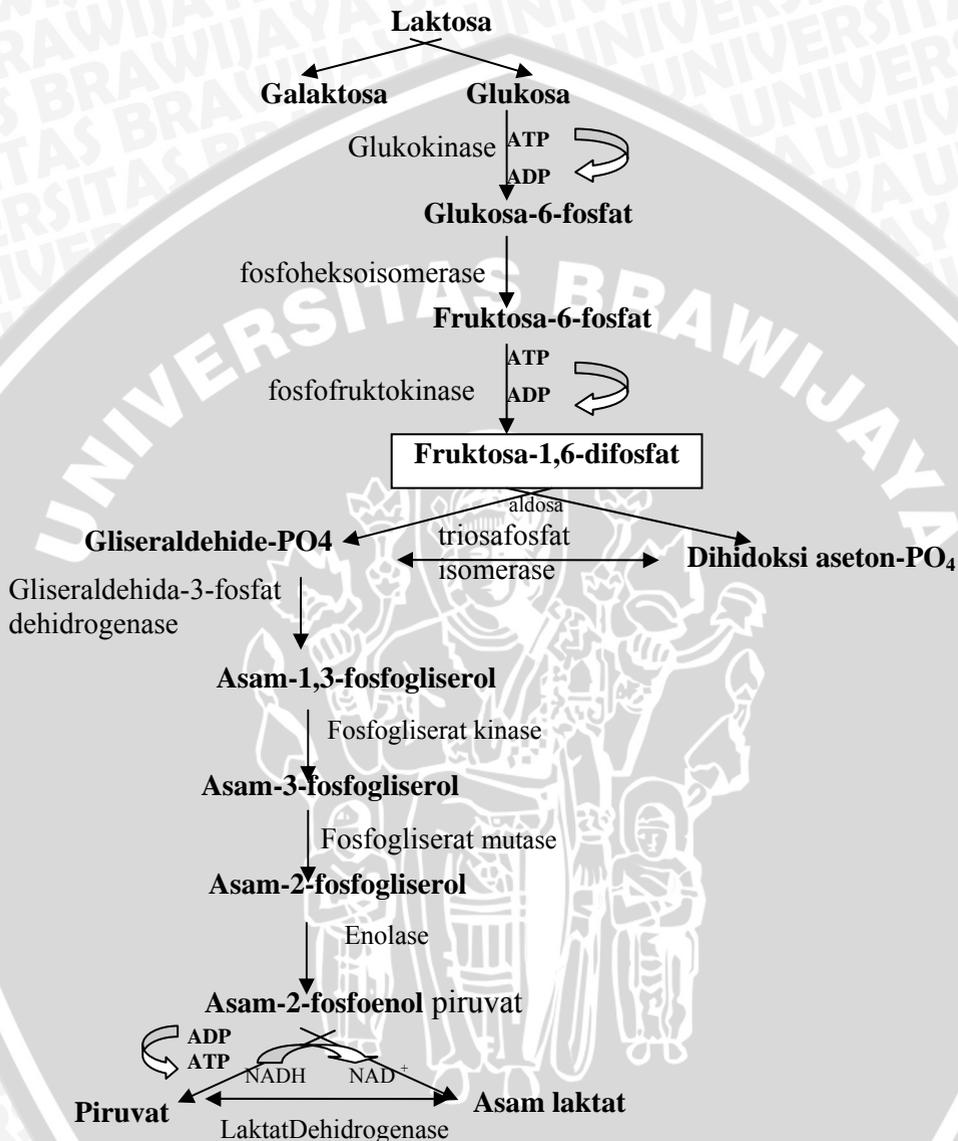
Dalam pengasaman susu ini terdapat proses pembentukan asam laktat seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Menurut Gilliland (1985) untuk mendapatkan energi, bakteri asam laktat harus mampu menggunakan laktosa. Laktosa ini akan dihidrolisis terlebih dahulu oleh kedua bakteri menjadi glukosa dan galaktosa dengan menggunakan enzim α -D-galaktosidase dan α -D-fosfogalatosidase yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat. Setelah hidrolisis laktosa berakhir, komponen heksosa difermentasikan lewat jalur Embden Meyer Holf Parros (EMP) (Gilliland, 1985).

Energi yang dihasilkan dari jalur EMP ini dalam bentuk ATP, berasal dari dua molekul glukosa yang dipecah, dapat digunakan untuk pertumbuhan. Fermentasi dari galaktosa per molekulnya hanya menghasilkan satu molekul ATP, karena satu ATP dibuat untuk mengubah galaktosa menjadi glukosa-6-PO₄. Hal ini menyebabkan terjadinya akumulasi galaktosa bebas selama pertumbuhan (Gilliland, 1985).

Fardiaz (1988) menyatakan jalur EMP terdiri dari beberapa tahap, masing-masing dikatalisis oleh enzim tertentu. Jalur tersebut ditandai dengan pembentukan fruktosa difosfat menjadi dua molekul gliserol dehid fosfat yang dikatalisis oleh enzim aldose. Kemudian terjadi reaksi hidrogenasi gliseraldehidafosfat, dikatalisis oleh enzim gliseraldehidafosfat hidrogenase dan menghasilkan energi dalam bentuk ATP. Atom hidrogen yang terlepas akan ditangkap oleh NAD⁺ membentuk NADH (Fardiaz, 1988).

Asam piruvat yang terbentuk dari jalur EMP bertindak sebagai penerima hidrogen dan reduksi asam piruvat oleh NADH menghasilkan asam laktat. Fermentasi seperti ini disebut fermentasi homolaktat karena satu-satunya produksi hasil fermentasi adalah asam.

Proses perubahan laktosa terhadap asam laktat (Kuswanto, 1989):



Gambar 2.1 Proses pembentukan asam laktat dari laktosa oleh bakteri asam laktat homofermentatif dengan menggunakan jalur EMP (Kuswanto dan Sudarmadji, 1989)

2.7 Amobilisasi Mikroba

Amobilisasi sel dapat didefinisikan sebagai penempatan atau pembatasan fisik dari sel utuh pada suatu daerah ruang dengan mempertahankan beberapa aktivitas yang diinginkan. Daerah dimana sel ditempatkan disebut sistem sel amobil atau kumpulan sel amobil yang dapat dibagi dalam tiga komponen yaitu sel, material pendukung, dan larutan yang mengisi sisa dari ruang (Willaert dan Baron, 1996).

Teknik amobilisasi sel adalah teknik yang digunakan agar sel mikroba tidak bergerak, baik melalui pengikatan pada padatan pendukung maupun penjebakan pada matriks. Tujuan amobilisasi sel adalah untuk meningkatkan aktivitas mikroba dan menggunakan mikroba amobil tersebut untuk fermentasi ulang maupun fermentasi kontinue (Panji, 1998).

Sel amobil, sel berada pada keadaan tumbuh, istirahat dan autolisis. Sel mikroba dapat diamobilisasi secara langsung tanpa ekstraksi enzim sehingga dapat menghindari kehilangan aktivitas enzim dapat diminimalkan. Sel mikroba juga memiliki multienzim yang bila diamobilisasi dapat digunakan sebagai solid sehingga dapat mengganti metode fermentatif yang melibatkan reaksi multienzim (Witter, 1993).

Menurut Witter (1993) keuntungan sel amobil dibandingkan enzim amobil:

- ❖ Stabilitas umumnya lebih baik
- ❖ Lebih murah
- ❖ Menghindari preparasi dan purifikasi enzim
- ❖ Dapat menghasilkan multienzim
- ❖ Sumber energi tersedia (dapat dibuat)
- ❖ Aktivitas sel lebih besar daripada enzim

Mikroorganisme seperti bakteri, ragi dan jamur dapat dengan lebih mudah diamobilisasi dengan metode : adsorpsi, ikatan kovalen, ikatan silang, penjebakan. Sebagian besar prinsip yang ada pada amobilisasi sel, ikatan kovalen, ikatan silang, adsorpsi fisik dan penjebakan dalam matriks polimer sintetik dan alami (Wang, Nang Sun, 2003)

Metode amobilisasi mikroba diklasifikasikan dalam 3 pendekatan yaitu (Chibatha, dkk, 1978) :

1. Metode ikatan mikroba pada carrier. Metode ini didasarkan pada pengikatan mol mikroba yang tidak larut dalam air dengan jalan absorpsi fisik, ikatan ionik dan ikatan kovalen.

➤ *Adsorpsi fisik*

Metode ini didasarkan pada absorpsi fisik mol enzim pada permukaan carrier. Didalam pencampuran, faktor PH, sifat pelarut, kekuatan ion, konsentrasi enzim dengan carrier serta suhu dan waktu pencampuran harus diatur bagi enzim sehingga diperoleh aktivitas enzim yang maksimal (Suhartono, 1989). Berbagai carrier dapat digunakan antara lain, karbon aktif, aluminium hidroksida, alumina, silika gel, bentonit, dan hidroksi apatik (Chibata, dkk, 1978)

➤ *Ikatan ionik*

Metode ini didasarkan pada ikatan ionik molekul pada carrier yang tidak terlarut air, sifat ikatannya lebih stabil dibandingkan dengan absorpsi fisik. Metode ikatan ionik tidak menyebabkan perubahan konformasi atau destruksi dari pusat aktif akan tetapi metode ini kurang menguntungkan yaitu mikroba dapat keluar dari carrier yang disebabkan lemahnya ikatan antara mikroba dengan carrier (Chibata, dkk, 1978)

➤ *Ikatan kovalen*

Pada metode ini mikroba terikat pada carrier yang tidak larut air dengan ikatan kovalen. Bagian enzim yang berikatan kovalen dengan carrier bukan bagian yang menjalankan fungsi katalitiknya, agar proses amobilisasi tidak menurunkan aktivitas enzim. Hal ini dapat dilakukan dengan menjaga lingkungan reaksi yaitu pH, konsentrasi mikroba, konsentrasi carrier, waktu, suhu reaksi amobilisasi (Suhartono, 1989).

2. Metode ikatan silang

Metode ini didasarkan pada pembentukan ikatan silang antara molekul mikroba dengan pereaksi bifungsi atau multifungsi seperti glukoraldehid, turunan isosianat dan sebagainya. Metode ini digunakan untuk amobilisasi sel-sel *E.coli* yang mempunyai aktivitas aspartase tinggi. Sel-sel *E.coli* diamobilisasi dengan

memperkuat dinding sel atau mengikat sel-sel secara silang dengan reaksi bifungsi seperti glukoraldehid (Chibata, dkk 1978)

Suatu mikroba yang dimobilisasi dapat disebut juga mikroba tidak larut air (*Water insoluble microbe*), mikroba terjebak (*Trapped microbe*) mikroba tetap (*fixed microbe*) dan mikroba yang didukung matrika (*matrix supported microbe*) (Smith, 1990)

Keuntungan sistem amobilisasi sel dibandingkan dengan amobilisasi enzim (Willaert dan Baron, 1996) :

- ❖ Sel amobil dapat berkembang biak pada bahan pendukung dan untuk memperbaharui sistem katalis didalam sel dengan persediaan bahan gizi dari media kultur, perkembangbiakan diri atau regenerasi diri dari sistem katalis.
- ❖ Kepadatan sel amobil lebih tinggi dibandingkan dengan sel yang dijebak setelah pertumbuhan sel dan sebagai konsekuensi, mengakibatkan produktivitas yang lebih tinggi
- ❖ Sel amobil mudah terpisah dari sistem reaksi. Selain itu, sel amobil dapat dipakai ulang atau dipakai kontinu dalam berbagai jenis reaktor.
- ❖ Pencucian sel selama fermentasi kontinu dapat dihindari pada nilai pengenceran yang tinggi.

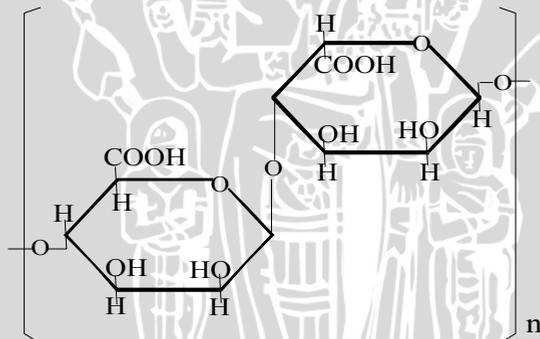
Faktor utama yang harus diperhatikan untuk amobilisasi sel maupun enzim adalah matriks yang digunakan dan interaksi antara enzim dan matriks. Berdasarkan komposisi kimianya, matriks ini dapat digolongkan menjadi polimer alami dan sintesis (Rahayu, 1982). Matriks tersebut menurut Cao dkk, (1996) secara ideal harus berfungsi untuk mengurangi penghambatan produk, meningkatkan kerja enzim, menyesuaikan nilai pH menjadi optimum dan menghambat biodegradasi akibat mikroorganisme.

Beberapa jenis matriks dapat digolongkan sebagai gel. Pemakaian gel sebagai matriks pengamobil dapat digunakan baik untuk sistem penjebakan (*entrapping*) maupun pengikat apabila memiliki permukaan yang luas terutama pada bagian internalnya. Keuntungan yang dapat diperoleh dari penggunaan gel ini adalah bentuk sesuai dengan konformasi yang diinginkan seperti bentuk membran atau bentuk partikel (Sasmito, 1990). Bahan yang paling banyak digunakan sebagai matriks dalam amobilisasi adalah polisakarida terutama dari algae dan selulosa, keduanya digunakan dalam metode penjebakan (seperti alginat dan karagenan) (Fardiaz, 1988).

2.8 Alginat

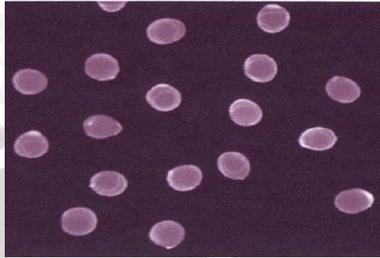
Alginat ($C_6H_8O_6$) merupakan kopolimer (Polisakarida dari Asam β -D-Manuronat dan α -L guluronat yang dihubungkan oleh ikatan 1,4). Polimer ini mengandung suatu gugus karboksil pada masing-masing gugus gula dan dengan adanya Ca^{2+} atau kation multivalen lainnya dalam larutan air akan membentuk gel. Konsentrasi polimer dalam gel adalah 1-5% tergantung preparasi alginat yang digunakan. Gel alginat yang paling stabil didapatkan dengan menggunakan polimer yang memiliki perbandingan asam poligluronat tinggi (Brown, 2004; Kennedy, 1985).

Alginat diisolasi dari anggota famili fucaceae (rumput laut dan laminariales salah satu senyawa turunan dari alginat adalah Na-Alginat yang mempunyai sifat terdispersi dalam air tetapi bila telah bereaksi dengan garam kalsium membentuk gel Ca-Alginat yang tidak larut dalam air. Dan juga tidak larut dalam alkohol, eter, kloroform (Hawley, 1987). Menurut Buckingham (1983), struktur molekul alginat adalah sebagai berikut:



Gambar 2.2 Struktur Alginat

Menurut Heinemann, dkk., (2004) pembentukan manik-manik lipase amobil yang terbentuk dalam larutan $CaCl_2$ (rata-rata dari 70 buah manik-manik) mempunyai tingkat kekompakan permukaan manik-manik sebesar 89 % seperti pada Gambar 3.

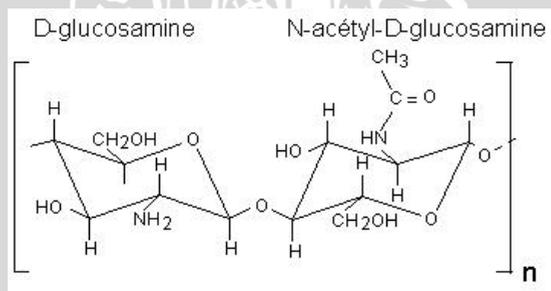


Gambar 2.3 Manik-manik Ca-alginat

2.9 Kitosan

Kitosan merupakan polisakarida yang mengandung lebih dari 5000 unit glukosamin yang mempunyai berat lebih dari 1 juta dalton. Kitosan ditemukan didalam jamur, hewan tak bertulang belakang, dan hewan laut. Secara komersial diperoleh dari exoskeleton (kutikula) hewan bertulang keras (ketam, udang dan lainnya *shellfish*). Kitosan diperoleh melalui proses deasetilasi (Kolstad, 2004).

Kitosan merupakan polimer polisakarida dari Kitin, yang diperoleh dari selulose, polimer ini terdiri atas sebagian besar rantai N-Acetyl-D-Glucosamin tidak bercabang. Kitin Deasetilasi sebagai kitosan yang terdiri atas rantai D-Glucosamin. Kitosan dan kitin mempunyai struktur berikut (Ratledge, 1994):



Gambar 2.4 Struktur Kitosan

Kitosan merupakan polimer dari kitin, yang mempunyai struktur mirip dengan kitin yaitu merupakan homopolimer D-Glucosamin dengan ikatan $\beta(1-4)$. Karena kemiripan struktur inilah

kitosan digolongkan sebagai selulosa dengan penggantian satu gugus hidroksil oleh amida pada setiap monomernya.

Kitosan adalah, suatu polimer bermuatan positif dan dapat mengikat unsur bermuatan negatif. Poli kation yang protonnya membentuk pH yang lebih rendah, dimana biopolimernya merupakan sumber daya alam yang dapat diperbaharui yang berasal dari kitin (Dautzenberg, 1994).



Gambar 2.5 Kitosan

2.10 Amobilisasi Dengan Menggunakan Ca-Alginat-Kitosan

2.10.1 Amobilisasi Dengan Menggunakan Ca-Alginat

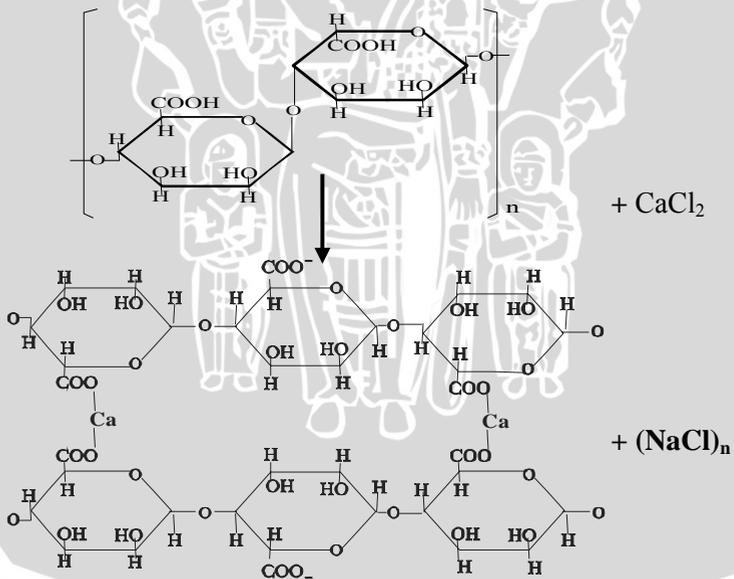
Amobilisasi dengan menggunakan carrier Na-Alginat yang bersifat polianion merupakan salah satu metode yang paling banyak dilakukan, karena murah dan mudah tata caranya. Amobilisasi dilakukan pada suhu kamar yang menggunakan larutan CaCl_2 sebagai ion penetral, karena alginat merupakan suatu polimer poli anion, sehingga diperoleh enzim yang amobil yang terperangkap didalam Ca-Alginat. Komponen Ca^{2+} ini sangat penting perannya dalam mempertahankan struktur padatan. Tingkat porositas dari metode amobilisasi enzim tergantung pada konsentrasi polimer yang digunakan, ion logam perangkap dan konsentrasi enzim itu sendiri (Suhartono, 1989).

Bahan yang paling banyak dipergunakan sebagai pengemban dalam amobilisasi adalah polisakarida, terutama dari algae dan selulosa, keduanya dipergunakan dalam metode penjemakan (seperti alginat dan karagenan). Alginat adalah senyawa glukoronan yang diekstraksi dari ganggang coklat yang mengandung residu D-asam manuronat dan L-asam glukoronat (Rahayu, 1989). Menurut

Kennedy,(1985) polimer ini mengandung satu gugus karboksil pada masing-masing gula, dengan adanya Ca^{2+} atau kation multivalen lainnya dalam larutan air membentuk gel. Sel dapat terambil dengan terperangkap didalam gel atau bagian permukaannya baik oleh reaksi gugus karboksil polisakarida atau reaksi dengan gel alginat setelah aktivasi gugus karboksilnya dengan karbodimida sehingga dibentuk derivat O-osikeria (Rahayu,1989).

Amobilisasi dilakukan dengan sel dan Na-Alginat pada larutan CaCl_2 . sehingga diperoleh sel yang terjebak dalam Ca-Alginat. Menurut (Glicsmann,1982) terbentuknya gel ini disebabkan oleh kation kalsium bivalen bereaksi dengan monovalen anion karboksilat alginat membentuk jaringan tiga dimensi. Kekuatan gel akan meningkat dengan kenaikan konsentrasi Na-Alginat dan CaCl_2 (Suhartono,1989).

Reaksi pembentukan gel Ca-alginat secara sederhana (Wang, 1996) :
 $2 \text{Na}(\text{Alginat}) + \text{Ca}^{++} \text{-----} > \text{Ca}(\text{Alginat})_2 + 2 \text{Na}^+$
 terbentuknya gel Ca-alginat disebabkan oleh kation kalsium bivalen dari CaCl_2 bereaksi dengan monovalen anion karboksilat alginat yang akan membentuk jaringan tiga dimensi . (Glicsman, 1982) :



Gambar 2.6 Reaksi Na-alginat dengan CaCl_2

2.10.2 Amobilisasi Dengan Menggunakan Ca-Alginat-Kitosan

Kitosan banyak digunakan sebagai manik-manik berongga dengan poli anion. Untuk manik-manik berongga disiapkan kitosan dan *Sulfoethylcellulosa* (SEC) misalnya Ca-alginat. Manik-Manik berongga ini akan mempunyai kestabilan mekanis yang baik, dasar kompleks polyelectrolite-polyelectrolite (*simplexes*) bisa dibentuk dengan *Sulfoethylcellulosa* (SEC) misal Ca-alginat sebagai poli anion. Kombinasi dengan suatu poli anion. Sulfoethylselulose (SEC) disiapkan dengan teknik meneteskan manik-manik berongga 0.15 setiap 5 mm (Dautzenberg, 1994).

Amobilisasi dilakukan dengan melakukan penjebakan dengan alginat, kemudian bakteri dijebak dengan menggunakan kitosan untuk membentuk amobilisasi double layer. Dimana sebelumnya gel ca-alginat yang terbentuk di suspensi kedalam larutan kitosan. Secara fisik kitosan akan menyelubungi gel alginat yang telah terbentuk sebelumnya, setelah itu dimasukkan kedalam natrium tripoliphospat (Taqieddin, dkk, 2002).

Muatan positif residu amina dari kitosan bereaksi dengan muatan negatif dari tripolifosfat membentuk ikatan ionik. Kekuatan gel ini akan semakin meningkat dengan kenaikan kitosan yang digunakan (Taqieddin, dkk, 2002).

2.11 Hipotesis

Berdasarkan uraian diatas hipotesis yang dapat dikemukakan adalah :

1. Konsentrasi Na-alginat-kitosan untuk amobilisasi berpengaruh terhadap jumlah sel *Lactobacillus bulgaricus* yang terjebak dalam Ca-alginat-kitosan.
2. *Lactobacillus bulgaricus* yang diamobilisasi dalam Ca-alginat-kitosan mempunyai kondisi optimum dalam fermentasi susu meliputi suhu inkubasi, waktu inkubasi dan konsentrasi *Lactobacillus bulgaricus* amobil.
3. *Lactobacillus bulgaricus* amobil dapat digunakan secara berulang dalam fermentasi susu.

BAB III

Metode penelitian

3.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya Malang. Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental.

3.2 Bahan dan Alat penelitian

3.2.1 Bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan adalah susu skim dan kultur murni *Lactobacillus bulgaricus* yang didapat dari Laboratorium Peternakan Universitas Gajah Mada..

3.2.2 Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : akuades, Na-alginat, nutrient agar, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Glukosa, pepton, NaOH, indikator pp, buffer fosfat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaCl, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Sodium alginat, $(\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10})$ natrium tripolifosfat, kitosan, $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, dan CH_3COOH . Semua bahan yang digunakan mempunyai derajat kemurnian pro analis (p.a), kecuali bila disebut diatas.

3.2.3 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada percobaan ini meliputi alat-alat gelas, tabung reaksi kecil cawan petri, mikroskop cahaya, eppendorf, tabung sentrifuse aluminium foil, bola hisap, kapas steril non absorben, bunsen, neraca analitik Mettler AR 25, Spektronik 20 (merk Bousch and Lomb), inkubator (merk heracus tipe B 50-42), Shaker waterbath (merk Karl Kolb tipe4 psl 1), Autoclav elektrik (merk All American model 200X), buret, statif, pengaduk magnet

Heidloph MR 2002, dan oven, lemari pendingin (merk Bosc), serta penangas air.

3.3 Tahapan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode percobaan dilaboratorium yaitu dengan konsentrasi Na-alginat 3% (b/v) dan variasi konsentrasi kitosan 0,5%, 1%, 1,5%, 2% (b/v), amobilisasi *Lactobacillus bulgaricus* dalam Ca-alginat-kitosan terdiri dari 7 perlakuan dan 3 variasi yaitu :

- Variasi suhu : 35°C; 40°C; 45°C; 50°C; 55°C.
- Variasi waktu inkubasi : 1; 2; 3; 4; 5; 6 jam.
- Variasi konsentrasi bakteri Asam laktat 1%, 1,5%; 2%; 2,5%; 3%; (b/v) dan efisiensi pemakaian ulang bakteri Asam laktat.

Dari setiap perlakuan dilakukan 3 kali ulangan, pola rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL). Adapun tahap-tahap penelitian sebagai berikut :

1. Penyiapan media :

- Media padat
- Media pertumbuhan

2. Peremajaan biakan

3. Penentuan kurva pertumbuhan

4. Pembuatan biakan aktif (inokulum)

5. Amobilisasi bakteri Asam laktat

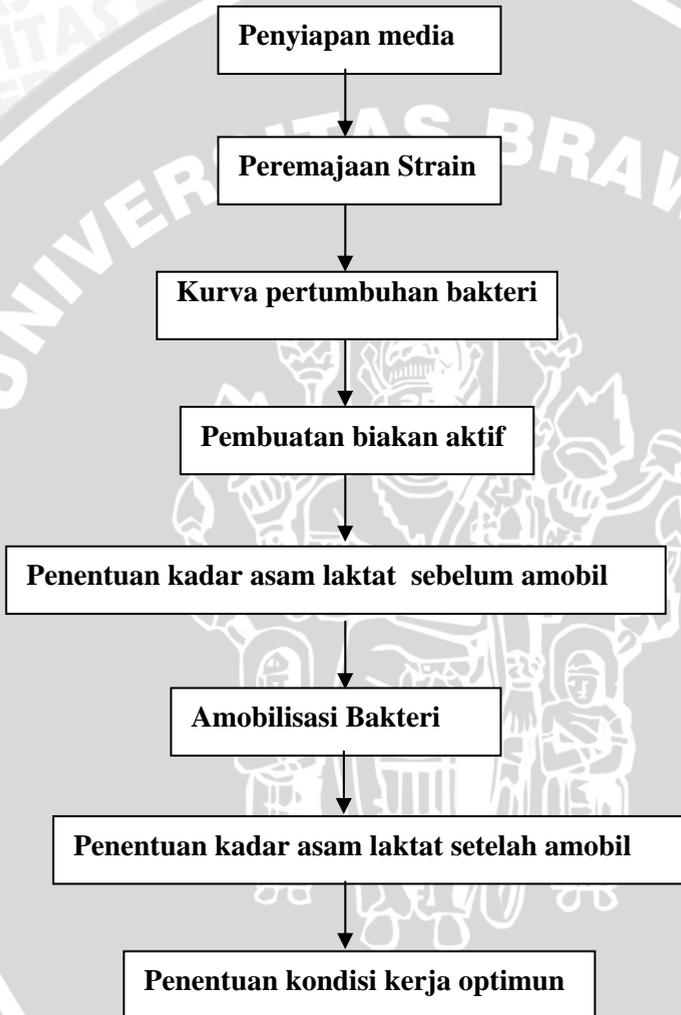
6. Penentuan kadar asam laktat oleh *Lactobacillus bulgaricus* amobil

7. Karakterisasi bakteri amobil

- Penentuan kondisi optimum
- Penentuan efisiensi pemakaian ulang bakteri amobil.

3.3.1 Tahapan Penelitian

Adapun tahap-tahap penelitian adalah sebagai berikut :



3.4 Cara Kerja

3.4.1 Penyiapan Media

3.4.1.1 Media Nutrien Agar

Ditimbang 3,00 gram media nutrien agar, ditambahkan akuadest 100 mL, dipanaskan sampai mendidih selama 10 menit, Dituang dalam tabung reaksi masing-masing 5 mL, ditutup dengan kapas, disterilisasi dengan autoklaf (121°C , 15 menit, 15psi), diletakkan pada posisi miring, dibiarkan mengeras selama 24 jam pada suhu kamar.

3.4.1.2 Media pertumbuhan

Komposisi 100 mL media pertumbuhan adalah 80 mL garam mineral yang sudah disterilisasikan, ditambah 15 mL glukosa 20% dan 5 mL susu murni, kemudian disterilisasi dengan autoklaf (121°C , 15 menit, 15 psi), diletakkan dalam lemari es.

3.4.2 Peremajaan Biakan

Biakan Bakteri asam laktat diremajakan pada media padat miring dengan cara menggoreskan jarum ose yang mengandung bakteri asam laktat secara aseptis dengan mendekatkan mulut tabung pada nyala api pada saat menggoreskan ose, lalu ditutup kembali dengan kapas steril dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C dalam inkubator. Sehingga diperoleh biakan murni asam laktat.

3.4.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Bakteri hasil peremajaan diambil sebanyak tiga mata ose, ditanam dalam erlemeyer yang berisi media pertumbuhan 100 mL, diinkubasi pada inkubator goyang dengan kecepatan 125 rpm pada suhu kamar selama 24 jam, diambil sebanyak 1mL dan diencerkan sampai dengan 10 ml kemudian diukur densitas optiknya setiap 2 jam pada panjang gelombang 620 nm selama 26 jam. Pengukuran diulang tiga kali.

3.4.4 Pembuatan Biakan Aktif (larutan inokulum)

Satu tabung kultur biakan murni dituangkan dalam 100 mL media cair secara aseptik, diinkubasi dalam inkubator goyang pada suhu 25°C dengan kecepatan 125 rpm, selama ½ fase logaritmik.

3.4.5 Produksi Sel *Lactobacillus bulgaricus*.

Sebanyak 100 mL larutan inokulum ditambahkan ke 1000 mL media pertumbuhan. Inkubasi dilakukan pada suhu 25°C, kecepatan putar 125 rpm selama fase awal stasioner yang didapat dari kurva pertumbuhan. Selanjutnya larutan campuran inokulum dan media pertumbuhan disentrifugasi dingin, kecepatan putar 3000rpm, selama 20 menit. Endapan sel disuspensikan dalam larutan pepton 0,1%.

3.4.6 Hibrid Mikrokapsul

Amobilisasi sel *lactobacillus bulgaricus* dilakukan dengan cara melakukan perbandingan konsentrasi Na-alginat 3,0% (b/v), dibuat dengan cara melarutkan 1,50 gram Na-alginat kedalam 50 mL akuadest. Diaduk sampai semua larut sempurna. Larutan Ca-alginat diambil masing-masing 20 mL dan dimasukkan kedalam gelas kimia, kemudian ditambahkan sebanyak 5 mL sel pada larutan Ca-alginat yang telah disiapkan sebelumnya. Campuran tersebut kemudian diteteskan dengan syringe 10 mL pada gelas kimia yang telah berisi 50 mL larutan CaCl₂ 0,1 mL sambil diaduk dengan pengaduk magnet. Kemudian manik-manik dibiarkan terendam dalam CaCl₂ selama 1 jam untuk mengeraskan manik-manik. Kemudian manik-manik tersebut dipisahkan dari larutan dengan menggunakan kertas saring. Setelah diambil kemudian dicuci dengan akuades, kemudian disuspensi dalam larutan kitosan. Hibrid mikrokapsul dibentuk dengan mengambil media ke dalam pipet plastik, kemudian meneteskannya ke dalam 3% (b/v) larutan sodium tripolifosfat dan Mikrokapsul disimpan dalam larutan ikatan silang atau larutan sodium tripolifosfat 3% selama 90 menit, dan dicuci dengan destilasi.

3.4.7 Penentuan Jumlah Sel dengan Haemocytometer

Perhitungan jumlah sel dilakukan dengan menggunakan haemocytometer. Pada perhitungan jumlah sel bebas dilakukan dengan pengenceran sampel dengan perbandingan 1:10. Pada perhitungan jumlah sel amobil tidak memerlukan pengenceran

3.4.8 Pengukuran Kadar Asam Laktat Hasil Fermentasi Susu oleh Bakteri Asam Laktat Amobil

Susu skim sebanyak 100 mL dimasukkan kedalam erlemeyer kemudian dipasturisasi pada suhu 70°C selama 15 menit dan didinginkan hingga suhu 45°C, dilanjutkan dengan penambahan bakteri amobil sebanyak-banyaknya 2,5 gram kemudian diinkubasi sesuai perlakuan pada suhu 45°C selama 3 jam.

Pengukuran kadar asam laktat dilakukan, sampel sebanyak 10 mL dimasukkan dalam erlemeyer dan ditambahkan 2 tetes indikator pp 1%. Sampel dititrasi dengan NaOH 0,1 M sampai warna menjadi merah muda dan dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ asam laktat} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}} \times \text{BM}_{\text{as.laktat}} \times 100\%}{W_{\text{sampel}} \times 1000}$$

V_{NaOH}	: Volume titrasi (mL)
M_{NaOH}	: Molaritas NaOH (mol/L)
$\text{BM}_{\text{as.laktat}}$: Berat Molekul asam Laktat (g/mol)
W_{sampel}	: Berat sampel (g)

3.4.9 Penentuan karakterisasi bakteri amobil

Karakterisasi amobil dengan menentukan dengan menentukan kondisi kerja optimum bakteri meliputi : waktu inkubasi optimum, konsentrasi bakteri asam laktat, suhu optimum. Nilai optimum ditentukan dari besarnya kadar asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat.

3.4.10 Penentuan waktu inkubasi optimum

Penentuan waktu inkubasi optimum ditentukan dengan mengukur kadar asam laktat pada variasi waktu inkubasi 1,2,3,4,5 dan 6 jam pada suhu optimum 45°C dengan konsentrasi starter 2,5%. Waktu inkubasi optimum diketahui dengan menggambarkan grafik hubungan waktu inkubasi terhadap kadar asam laktat.

3.4.11 Penentuan suhu optimum

Penentuan suhu optimum dilakukan dengan memberikan variasi suhu inkubasi pada suhu 35°C,40°C,45°C,50°C,55°C, selama 3 jam dan konsentrasi starter 2,5% Suhu optimum diketahui dengan menggambarkan grafik hubungan waktu inkubasi terhadap kadar asam laktat.

3.4.12 Konsentrasi *Lactobacillus bulgaricus* amobil optimum

Konsentrasi starter optimum ditentukan dengan mengukur kadar asam laktat pada variasi konsentrasi 1,5;2;2,5;3;3,5 % pada suhu dan waktu inkubasi optimum 45°C, selama 4 jam. Konsentrasi starter optimum diketahui dengan menggambarkan grafik hubungan konsentrasi starter terhadap kadar asam laktat.

3.4.13 Efisiensi Pemakaian Ulang Bakteri Amobil

Efisiensi pemakaian ulang bakteri amobil ditentukan dengan pemakaian ulang bakteri amobil dalam proses fermentasi sebanyak lima kali pemakaian pada suhu optimum 45°C, waktu inkubasi optimum 4 jam, konsentrasi starter 2,5%. Efisiensi pemakaian ulang bakteri amobil diketahui dengan menggambarkan grafik hubungan efisiensi terhadap kadar asam laktat.

3.5 Analisa Data

Data yang diperoleh dianalisa secara statistika (ANOVA). Semua data percobaan diuji dengan tingkat kepercayaan 95% atau Beda Nyata Terkecil (BNT) 5% dan pola Rancang Acak Lengkap, dapat dilihat pada lampiran 6

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Kemampuan fermentasi *Lactobacillus bulgaricus* amobil pada susu diukur berdasarkan asam total yang terbentuk. Asam total yang terbentuk di dalam proses fermentasi susu dapat diasumsikan sebagai kadar asam laktat. *Lactobacillus bulgaricus* merupakan bakteri asam laktat homofermentatif yang menghasilkan asam laktat sebagai produk utamanya. Penelitian dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu penyediaan media (padat dan cair), peremajaan kultur murni *Lactobacillus bulgaricus*, pembuatan kurva pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus*, amobilisasi *Lactobacillus bulgaricus*, penentuan kondisi optimum *Lactobacillus bulgaricus*, penentuan efisiensi pemakaian ulang *Lactobacillus bulgaricus* dalam proses amobil dalam proses fermentasi susu.

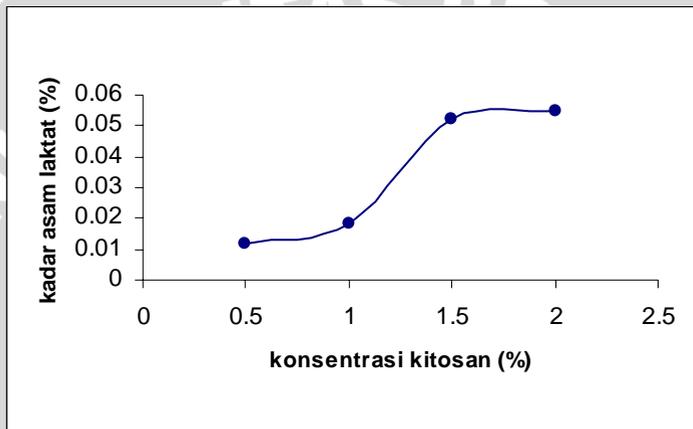
4.1 Amobilisasi *Lactobacillus bulgaricus* dalam Ca-alginat-Kitosan

Amobilisasi dilakukan dengan mencampurkan suspensi *Lactobacillus bulgaricus* (sel) dengan Na-alginat, kemudian campuran tersebut ditetaskan kedalam larutan CaCl_2 . Manik-manik yang terbentuk direndam dalam larutan CaCl_2 selama satu jam untuk menyempurnakan reaksi, sehingga diperoleh sel yang terjebak didalam gel Ca-alginat.

Lactobacillus bulgaricus yang telah terjebak kemudian disuspensikan kedalam larutan kitosan. Suspensi tersebut kemudian ditetaskan kedalam tripolifosfat dengan menggunakan pipet plastik untuk membentuk mikrokapsul. Selanjutnya dibiarkan selama 90 menit untuk menyempurnakan reaksi kemudian disaring dan dicuci dengan menggunakan akuades. Menurut Taqieddin (2002) muatan negatif tripolifosfat bereaksi dengan muatan positif residu amina dari kitosan untuk membentuk ikatan ionik. Tripolifosfat berdifusi kedalam kalsium alginat dan berfungsi sebagai adisi pengganti bagi kelat ion kalsium.

Lactobacillus bulgaricus amobil adalah *Lactobacillus bulgaricus* berikut matriknya yaitu Ca-alginat dan kitosan pada proses amobilisasi. Sel terjebak dalam dua gel, sehingga ketika

direaksikan dengan substrat dapat terjadi interaksi antara molekul substrat dengan sel, dan juga interaksi antara sel dengan Ca-alginat-kitosan. Kerapatan pori-pori gel Ca-alginat-kitosan, akan mempengaruhi aktivitas sel dalam berinteraksi dengan substrat dan menentukan keefektifan metode amobilisasi yang ditentukan oleh banyaknya sel yang berhasil terjebak dalam Ca-alginat-kitosan dan juga konsentrasi kitosan yang digunakan.



Gambar 4.1 Grafik Penentuan Pengaruh Konsentrasi Kitosan Terhadap Jumlah Kadar Asam Laktat

Berdasarkan hasil analisis secara statistik diperoleh nilai $F_{hitung} > F_{tabel}$ (5%) yang menunjukkan bahwa variasi konsentrasi kitosan berpengaruh sangat nyata terhadap produk yang dihasilkan. Pada Uji BNT (5%) pada tabel 4.1 menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan nyata antara konsentrasi 0,5%-1% dan 1,5%-2% tetapi berbeda nyata pada 1%-1,5%, berdasarkan hal tersebut diatas disimpulkan bahwa konsentrasi optimum untuk proses amobilisasi pada 1,5%. Dari Gambar 4.1 dan Tabel 4.1 menunjukkan bahwa grafik cenderung naik yang menggambarkan produk yang dihasilkan cenderung meningkat dengan kenaikan konsentrasi kitosan yang digunakan. Hal ini disebabkan oleh kemampuan *Lactobacillus bulgaricus* dalam membentuk asam laktat yang tidak hanya berasal dari laktosa. Menurut Suriwiraya (1978) bakteri *Lactobacillus sp*, *Streptococcus sp* dapat menghasilkan enzim selulose yang dapat digunakan untuk memecah selulosa menjadi D-glukosa.

Kitosan merupakan polisakarida yang mengandung glukosamine sedangkan alginat yang merupakan polisakarida dari Asam β -D-Manuronat dan α -L guluronat yang dihubungkan oleh ikatan 1,4 glikosidik.. Enzim selulose akan memecah polisakarida menjadi D-Glukosa, selanjutnya D-glukosa yang dihasilkan bersama sama dengan glukosa hasil hidrolisis laktosa akan difermentasi menjadi asam laktat.

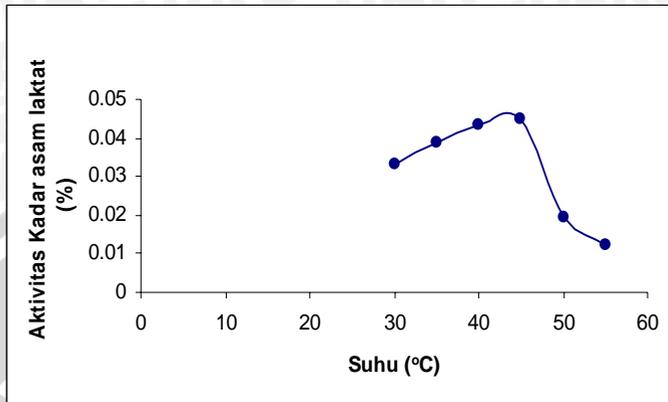
Tabel 4.1 Kadar asam laktat *Lactobacillus bulgaricus* amobil dalam konsentrasi Na-Alginat 3% dan berbagai konsentrasi kitosan

Konsentrasi Dalam Na-Alginat 3% dan Kitosan	Kadar asam Laktat rata-rata (%)	Notasi
0,5%	0,01±0,002	a
1%	0,02±0,004	a
1,5%	0,05±0,001	b
2%	0,06±0,001	b

4.2 Penentuan Kondisi Optimum *Lactobacillus bulgaricus* Amobil

4.2.1 Pengaruh Suhu Inkubasi Optimum Terhadap Aktivitas *Lactobacillus bulgaricus* Amobil

Proses ini ditentukan dengan menggunakan metode volumetri yang didasarkan pada reaksi asam basa, menggunakan titran NaOH. Pada penentuan suhu optimum *Lactobacillus bulgaricus* amobil, dilakukan variasi suhu 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, dan 55°C dengan konsentrasi sel dalam Ca-alginat 3% dan kitosan 1,5%.



Gambar 4.2 Grafik Penentuan Suhu Inkubasi Optimum *Lactobacillus bulgaricus* Amobil

Tabel 4.2 Kadar asam laktat *Lactobacillus bulgaricus* amobil dalam berbagai suhu dengan konsentrasi Na-Alginat 3% dan konsentrasi kitosan 1,5 % selama 4 jam

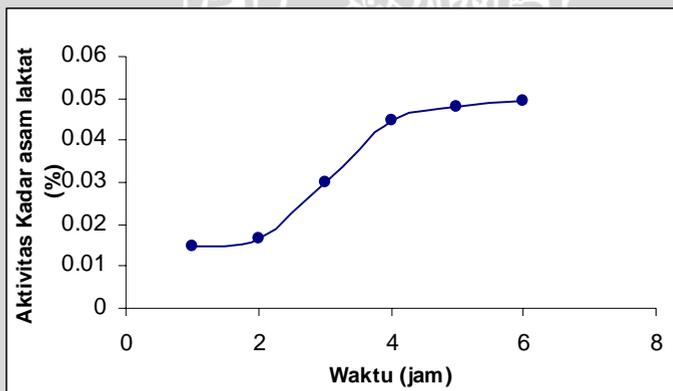
Suhu (°C)	Kadar asam Laktat rata-rata (%)	Notasi
30	0,03±0,003	b
35	0,04±0,003	b
40	0,04±0,001	c
45	0,05±0	c
50	0,02±0,003	a
55	0,01±0,003	a

Berdasarkan Gambar 4.2 dan Tabel 4.2 terlihat bahwa kadar asam laktat tertinggi dihasilkan pada suhu inkubasi 45°C dengan kadar asam laktat sebesar 0,045 %. Hal ini dapat dibuktikan dengan analisa uji statistik yang ditunjukkan pada Lampiran 6 bahwa ada pengaruh yang nyata (taraf nyata $\alpha = 0,05$) perlakuan terhadap suhu terhadap kadar asam laktat *Lactobacillus bulgaricus* dimana $F_{hitung} > F_{tabel}$. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada Tabel L.6.2.1 mendukung perlakuan suhu 45°C berbeda nyata terhadap perlakuan suhu 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C maka dapat disimpulkan

bahwa suhu optimum untuk *Lactobacillus bulgaricus* amobil adalah 45°C . Gambar 4.2 dan Tabel 4.2 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan konsentrasi asam laktat pada suhu inkubasi 30°C-45°C Hal ini dikarenakan meningkatnya energi kinetik yang akan mempercepat tumbukan antar molekul sehingga interaksi antara enzim dengan substrat semakin optimal. Sedangkan pada suhu inkubasi diatas 45°C terjadi penurunan yang signifikan. Menurut Kandel dan Mckane (1986), suhu antara 41-45°C merupakan suhu optimum bagi pertumbuhan bakteri asam laktat sehingga dapat memacu bakteri tersebut untuk berkembang biak dengan baik dan mampu untuk mendegradasi laktosa dengan optimum. Pada suhu 50-55°C kadar asam laktat menurun dikarenakan enzim- enzim yang terlibat dalam metabolisme dan fermentasi susu mengalami denaturasi sebagian.

4.2.2 Pengaruh Waktu Inkubasi Optimum Terhadap Aktivitas *Lactobacillus bulgaricus* Amobil

Pengujian pengaruh waktu inkubasi optimum terhadap kadar asam laktat dalam fermentasi susu dilakukan pada konsentrasi alginat 3% dan kitosan 1,5% dengan diamati pada berbagai variasi waktu inkubasi yaitu 1, 2, 3, 4, 5, dan 6jam, dengan suhu inkubasi 45°C. Pada Gambar 4.3 dan Tabel 4.3 dapat dilihat kadar asam laktat yang dihasilkan dalam variasi waktu.



Gambar 4.3 Grafik Penentuan Waktu inkubasi Optimum *Lactobacillus bulgaricus* Amobil

Berdasarkan Gambar 4.3 terlihat bahwa kadar asam laktat tertinggi dihasilkan pada waktu inkubasi 4 jam dengan kadar asam laktat 0,045%. Berdasarkan hasil analisis statistik yang dapat dilihat pada lampiran Tabel L.6.2.1 menunjukkan bahwa ada pengaruh nyata (taraf nyata $\alpha = 0,05$) pada variasi waktu inkubasi terhadap kadar asam laktat *Lactobacillus bulgaricus* dimana $F_{hitung} > F_{tabel}$. Hal ini juga didukung dengan uji beda nyata terkecil (BNT) pada Tabel L.6.2.1 yang menunjukkan bahwa perlakuan waktu inkubasi 4 jam berbeda nyata dengan perlakuan waktu inkubasi 1-3 jam, tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan waktu inkubasi 5-6 jam, sehingga 4 jam dipilih sebagai waktu inkubasi optimum.

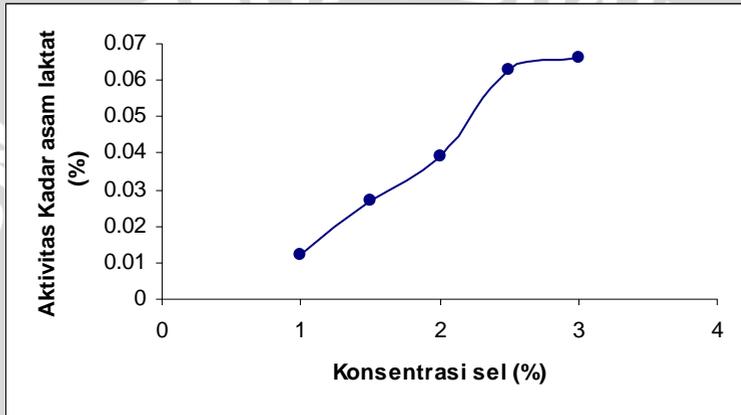
Tabel 4.3 Kadar asam laktat *Lactobacillus bulgaricus* amobil dalam berbagai waktu inkubasi dengan konsentrasi Na-Alginat 3% dan konsentrasi kitosan 1,5 % pada suhu 45 °C

Waktu (Jam)	Kadar asam Laktat rata-rata (%)	Notasi
1	0,02±0,004	a
2	0,02±0,003	a
3	0,03±0,003	b
4	0,05±0,003	b
5	0,05±0,003	c
6	0,05±0,004	c

Berdasarkan Tabel 4.3 dan Gambar 4.3 diketahui bahwa waktu inkubasi 1-4 jam, terjadi peningkatan konsentrasi asam laktat. Hal ini disebabkan oleh waktu inkubasi yang belum maksimal karena reaksi antara substrat dengan bakteri belum optimum sehingga produk yang dihasilkan masih sedikit. Sedangkan waktu inkubasi 4-6 jam menunjukkan kadar asam laktat yang dihasilkan tidak mengalami peningkatan yang banyak. Kondisi ini disebabkan karena substrat sudah habis difermentasi sehingga dengan peningkatan waktu inkubasi maka konsentrasi asam laktat yang dihasilkan akan tetap.

4.2.3 Pengaruh Konsentrasi Sel Amobil Terhadap Aktivitas *Lactobacillus bulgaricus* Amobil

Untuk menentukan pengaruh konsentrasi *Lactobacillus bulgaricus* amobil, maka dilakukan variasi konsentrasi 1%,1,5%,2%,2,5%,3%(b/v) dengan konsentrasi sel dalam Ca-alginat 3% dan kitosan 1,5% dengan suhu inkubasi optimum 45°C dan waktu inkubasi 4 jam..



Gambar 4.4 Grafik Penentuan Konsentrasi *Lactobacillus bulgaricus* Amobil

Pada Gambar 4.4 dan Tabel 4.4 menunjukkan bahwa konsentrasi starter dari 1-2,5% menunjukkan terjadinya peningkatan jumlah kadar asam laktat yang terbentuk. Hal ini disebabkan karena jumlah enzim laktase yang dihasilkan untuk mengubah laktosa menjadi asam laktat paling banyak, sehingga kadar asam laktat yang dihasilkan tinggi, sedangkan pada konsentrasi sel 2,5%-3% menunjukkan kadar asam laktat yang dihasilkan tidak mengalami peningkatan yang banyak.

Tabel 4.4 Aktivitas *Lactobacillus bulgaricus* amobil dalam berbagai konsentrasi dengan konsentrasi Na-Alginat 3% dan konsentrasi kitosan 1,5 % pada suhu 45 °C pada waktu 4 jam

Konsentrasi Bakteri <i>Lactobacillus Bulgaricus</i>	Kadar asam Laktat rata-rata (%)	Notasi
1%	0,01±0,006	a
1,5%	0,03±0,005	b
2%	0,04±0,003	c
2,5%	0,06±0,005	d
3%	0,07±0,005	d

Berdasarkan analisis stastitik yang terdapat pada Tabel L.6.4 ini menunjukkan bahwa terdapat pengaruh nyata (taraf nyata $\alpha = 0,05$) variasi konsentrasi *Lactobacillus bulgaricus* amobil terhadap kadar asam laktat *Lactobacillus bulgaricus* dimana $F_{hitung} > F_{tabel}$. Hal ini menunjukkan peningkatan konsentrasi sel tidak diikuti dengan peningkatan konsentrasi kadar asam laktat, disebabkan peningkatan jumlah konsentrasi sel tidak diikuti dengan peningkatan konsentrasi jumlah substrat yang lebih banyak, sehingga pada akhirnya menyebabkan tidak terjadi peningkatan perombakan laktosa menjadi asam laktat.

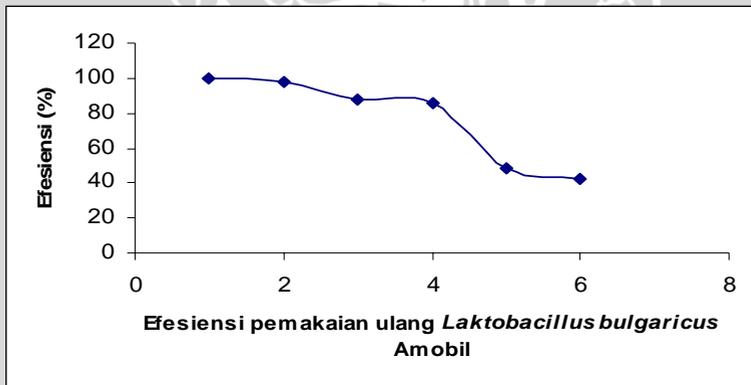
Uji BNT pada Tabel L.6.4.1 mendukung bahwa perlakuan konsentrasi 2,5% sama dengan perlakuan konsentrasi starter 3% dan 3,5% tapi berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi starter 1,5 % dan perlakuan konsentrasi starter 2%. Semakin tinggi konsentrasi starter, maka semakin cepat kecepatan reaksi enzimatik juga meningkat sampai mencapai kecepatan yang tetap. Kemudian kecepatan reaksi tidak dipengaruhi lagi oleh kenaikan konsentrasi starter, karena enzim menjadi jenuh oleh substratnya. Sehingga dapat disimpulkan bahwa konsentrasi *Lactobacllus bulgaricus* amobil optimum adalah 2,5%.

4.3 Efisiensi Pemakaian Ulang *Lactobacillus bulgaricus* Amobil

Penentuan efisiensi pemakaian ulang *Lactobacillus bulgaricus* dilakukan pada kondisi optimum yang diperoleh dari data sebelumnya yaitu pada suhu 45°C waktu inkubasi 4 jam dan konsentrasi *Lactobacillus bulgaricus* amobil 2,5 %.

Tabel 4.5 Tabel Efisiensi Pemakaian Ulang *Lactobacillus bulgaricus* Amobil

Pemakaian Ulang sel Amobil	Kadar asam laktat (%)	Persen Penurunan Kadar asam laktat (%)	Efisiensi (%)	Notasi
I	0,052	0	100	a
II	0,051	2	98	a
III	0,046	12	88	a
IV	0,045	14	86	a
V	0,025	52	48	b
VI	0,022	58	42	b

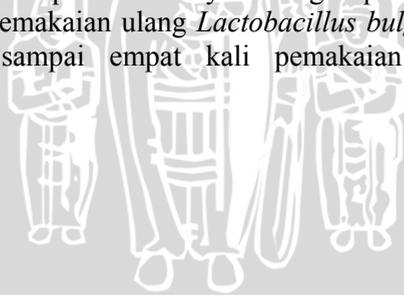


Gambar 4.5 Grafik Efisiensi Pemakaian Ulang *Lactobacillus bulgaricus* Amobil

Pengaruh efisiensi pemakaian ulang *Lactobacillus bulgaricus* amobil terhadap kadar asam laktat menunjukkan bahwa

pemakaian ulang *Lactobacillus bulgaricus* amobil secara berulang menyebabkan terjadinya penurunan kadar asam laktat. Hal ini disebabkan adanya kerusakan pori-pori gel kitosan dan alginat secara bertahap yang diikuti dengan kerusakan sel, karena adanya pengaruh suhu, dimana suhu yang digunakan untuk menentukan kadar asam laktat dalam pemakaian ulang *Lactobacillus bulgaricus* amobil jauh lebih besar dari pada pembentukan manik (dalam ruang). Seiring dengan reaksi pemutusan ikatan glukosa dari reaksi antara alginat-kitosan yang memberikan pengaruh terhadap kekerasan gel alginat-kitosan dan juga dengan pemakaian ulang yang dilakukan memungkinkan adanya sel yang terlepas dari dalam gel, karena berkurangnya kekerasan gel, maka juga berkurang jumlah sel dalam gel Ca-alginat-kitosan menyebabkan jumlah enzim laktase yang dihasilkan oleh sel untuk mengubah laktosa menjadi asam laktat berkurang, sehingga asam laktat yang dihasilkan semakin menurun.

Berdasarkan Tabel 4.5 dan Gambar 4.5 maka *Lactobacillus bulgaricus* amobil dapat digunakan sampai empat kali pemakaian ulang, dilihat dari efisiensi aktivitasnya dimana kadar asam laktat pada pemakaian ulang keempat masih memiliki efisiensi di atas 50%. Hal ini didukung dengan uji beda nyata terkecil (BTN) pada lampiran Tabel L.6.5.1 yang menunjukkan bahwa perlakuan ulangan I tidak berbeda nyata dengan perlakuan ulangan II dan perlakuan ulangan III, dan perlakuan ulangan IV tidak berbeda nyata dengan perlakuan ulangan V tapi berbeda nyata dengan perlakuan ulangan IV. Jadi efisiensi pemakaian ulang *Lactobacillus bulgaricus* amobil dapat digunakan sampai empat kali pemakaian ulang untuk fermentasi susu.



BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- ❖ Meningkatnya konsentrasi kitosan akan meningkatkan kadar asam laktat hasil fermentasi susu menggunakan *Lactobacillus bulgaricus* amobil dalam Ca-alginat-kitosan. Kondisi optimum konsentrasi kitosan dicapai pada konsentrasi kitosan 1,5 %.
- ❖ Kondisi optimum *Lactobacillus bulgaricus* amobil dalam Ca-alginat-kitosan dalam fermentasi susu untuk menghasilkan asam laktat dicapai pada suhu 45°C, waktu inkubasi 4 jam, konsentrasi *Lactobacillus bulgaricus* 2,5 %.
- ❖ Efisiensi *Lactobacillus bulgaricus* amobil dapat dipakai hingga empat kali pemakaian ulang dalam fermentasi susu.

5.2 Saran

Masih perlu dilanjutkan dengan bervariasi konsentrasi kitosan dengan konsentrasi kitosan yang lebih tinggi dari 2% yang dapat digunakan untuk optimasi yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Bernath, F.R., dan Ventasubramanian, K.,1987, **Methods Of Immobilization**, American Society For Microbiology, New York, 230-240.
- Brown,P, Phaneuf, M,Bide,M. dan Burg,K., 2004, **Cells Encapsulation Into Porous Alginate Fibers**, Project M04-C113, National Textile Center Annual Report, Clemson University, 4-5
- Buchanan, R.E., dan N.E. Gibbon, 1974, **Bergeys Manual of Determination Bacteriology**, Eight Edition, The Willian on Wilkins Company, Baltimore.
- Buckle, K.A., R.A.Edward, G.H. Fleet, dan N. Wotton, 1987, **Food Science**, diterjemahkan olah H. Purnomo dan Adiono dalam Ilmu Pangan, UI Press, Jakarta.
- Cao, SG., Yang, L. dan S.Q., 1996 **Enchanching Enzymatic Properties by The Immobilization Methods**, *J. Appl. Biotech and Biochem.*, 191-197, 219.
- Cheetam dan Bucke., 1979, **Immobilization of Microbiology Cells and Their Use in Waste Treatment**, Academic Press Mc, New York, 219-213.
- Chibata, I., Horitsu, H., Adachi,S. dan Takasiho, Y., 1978, **Immobilized Enzymes**, John Willey and Sons Inc., New York, 191-197, 219
- Dautzenberg, H., Jaeger, W.,Kotz, J., Philipp, B., Seidel, Ch, dan Sischerbina, 1994, **D. Polyelectrolytes – Formation, Charaterization and Application Card Hanser Verlag**, Munich, Chapter 2, p. 11-84, chapter 7, p. 272-320
- Dwijoseputro, D., 1998, **Dasar-Dasar Mikrobiologi**, Djambatan, Jakarta, 75-78
- Fardiaz,S., 1988, **Mikrobiologi Pangan I**, Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Pertanian, IPB, Bogor
- Gilliland, S.E., 1985, **Bacterial Starter Cultures for Foods**, CFC Press, Boca Raton, Florida
- Glicksman, M., 1982, **Food Hydrocolloid**, CRC Press Inc, Florida, pp.13-14

- Hadiwiyoto, S., 1993 , **Hasil-Hasil Olahan Susu, Ikan, Daging Dan Telur**, PT. Liberty , Yogyakarta.
- Hawley's.G, 1987, **Hawley's Condensed Chemical Dictionary**, 5th ed., Van Nostrand Reinhold, New York
- Heinemann, M., Buthe, A., Menbeig, H, Koss, H.J., Schumacher M.A., Buchs, J., Brendel, M., Barrow, A., dan Marquah W., **Encapsulated Enzyme System**, <http://www.stb540.rwt.cachen.de/workshop/abstracts/buechs.pdf>
- Judoamidjojo, R.M., A.A. Darwis, dan E.G. Sa'id, 1992, **Teknologi Fermentasi**, Rajawali Press, Jakarta
- Kendel, J., dan L. Mc Kane, 1986, **Microbiology Essensial and Application**, Mac Graw-Hill Book Company Inc., New York.
- Kennedy, J.F., 1985, **Principles Of Immobilized Enzymes**, Ellis Horwood Limited Chihester, England, p.118
- Kosikowski, F., 1982, **Cheese and Fermented milk Foods**, Second edition, F.V kosikowski and Associates, New York.
- Kuswanto, K.R., dan S. Sudarmaji, 1989, **Proses-Proses Mikrobiologi Pangan**, Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, UGM, Yogyakarta
- Lehninger, Al., 1982, **Dasar-Dasar Biokimia**, Jilid I, alih bahasa Thenawidjaja, M., Penerbit Erlangga, Jakarta, 237-246; 256-258.
- Nickersen, J.T. dan Sinskey, Aj., 1997, **Microbiology of Food and Food Processing**, Elsevier North Holland, Inc Amsterdam.
- Panji,T., 1998, **Fermentasi Kontinue Lendir Biji Kakao Menggunakan Tehnik Amobilisasi**, J. Biotehnologi Pertanian., 2.4.
- Pelezar, M.J dan Chan, E.C.S., 1986, **Dasar-dasar Mikrobiologi I**, Alih Bahasa: Hadioetomo, R.S dkk, Universitas Indonesia Press Jakarta.
- Prestikasari, Oktina, 2006, **Amobilisasi *Lactobacillus bulgaricus* Dalam Ca-Alginat**, Skripsi, Universitas Brawijaya, Malang
- Poedjiadi, A., 1994, **Dasar-Dasar Biokimia**, Penerbit UI, Jakarta, 146-176.
- Rahayu, K, 1989, **Enzim Mikroba**, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, hal.79-84

- Rahman, A., 1992, **Tehnologi Fermentasi Industrial Produksi Metabolit Primer**, Arcan, Jakarta.
- Rutgers, K., dan Ebing, P., 1995, **Preparation of Dairy Product**, Agrosima, Wageningen, Netherland.
- Salle, A.J., 1961, **Fundamental Principles of Bacteriology**, Fifth Edition, Mac Graw-Hill Book Company Inc , New York.
- Sasmito, 1990, **Enzim Amobil**, Pusat Antar Universitas, Bioteknologi, UGM, Yogyakarta
- Smith, E.J., 1990, **Prinsip Bioteknologi**, Alih Bahasa oleh Usman F., Sumo, dkk, Gramedia, Jakarta, 98;103;121
- Stainer, R.Y., Edward A. Adelberg, dan John L. Ingraham, 1982, **Dunia Mikroba I**, Penerjemah AgustinWydia Gunawan, Sri Lestari Angka, Dipl. Biologi Ko Gin Lioe, Hastowo, dan Bibiana Lay M.Sc. PT. Bhratara Karya Aksara, Jakarta
- Suhartono, TM.,1989,**Enzim Dan Bioteknologi**, Departemen Pendidikan Dan Kebudayaan Dirjen Dikti Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB, Bogor, hal 40-43
- U.K., Centre, 2002, **Starter Cultured Yogurt**, (<http://www.eip.ukcentre.com/yoghurt.htm>), Departement of Food
- Wang, NS, 1996, Exsperiment No.7B, **Protocol Entrapment In Alginate Gel**, <http://www.glue.umd.edu/-hsw/ench485/labTb.htm>
- Widodo, 2003, **Bioteknologi Industri Susu**, Cetakan I, Lacticia Press, Yogyakarta
- Willaert, R.G. dan Baron, 1996, **Immobilized Living Cells System**, John Willey and Sons, New York, 2-12, 197-199
- Winarno, F.G., Srikandi Fardiaz, dan Dedi fardiaz, 1980, **Pengantar Teknologi Pangan**, PT. Gramedia, Jakarta
- Witter, 1993, **Physical Chemistry of Food Process**, Marcel Dekker, Inc, New York.

Lampiran 1

Preparasi Larutan

1.1 Larutan aktivator

- a. $\text{Zn SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ = 0,2200 gram
- b. $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ = 0,0500 gram
- c. $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ = 0,0160 gram

Ke tiga bahan dilarutkan dalam 100 mL akuades.

1.2 Larutan garam mineral

5 gram ekstrak khamir, 5 gram NaCl, 134 gram K_2HPO_4 , 16,8 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mL larutan aktivator , dilarutkan dalam 500 mL akuades.

1.3 Indikator Phenolphatelin 1%

Phenolphatelin 1 % dapat dibuat dengan melarutkan sebanyak 1 gram phenolphatelin dalam 100 mL etanol 70%.

1.4 Buffer Fosfat 0,1 M pH 6

Larutan buffer fosfat pH 6 dibuat dengan menambahkan sedikit demi sedikit larutan KH_2PO_4 0,1 M kedalam gelas kimia berisi larutan K_2HPO_4 0,1M yang telah dipasang elektroda pH meter sampai mencapai pH yang diinginkan .

1.5 Larutan Na-alginat 3%

Ditimbang 3 gram Na-alginat dan dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas kimia 100 mL, kemudian dipanaskan dalam penanggas air yang mendidih sampai semua larut homogen. Setelah larutan dingin, dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

1.6 Larutan kitosan

Larutan kitosan disiapkan dengan cara melarutkan polimer kitosan sebanyak 1 gram kedalam 100ml asam asetat 0,1 M (untuk membuat 1,0 % (b/v).

1.7 Larutan Natrium Tripolifosfat 3%

Larutan Natrium Tripolifosfat dibuat dengan cara melarutkan sebanyak natrium tripolifosfat 3,00 gram dalam 100 mL akuades.

Lampiran 2

Perhitungan Pembuatan Larutan

2.1 Larutan Glukosa 20%

$$[\text{glukosa}] \text{ (b/v)} = \frac{W \text{ glukosa}}{V \text{ larutan}}$$

$$20 \% \text{ g/mL} = \frac{x}{100 \text{ mL}}$$

$$x = 20 \text{ gram}$$

2.2 Larutan KH_2PO_4 0,1M

$$\begin{aligned} \text{mol KH}_2\text{PO}_4 &= \text{KH}_2\text{PO}_4 \times \text{vol larutan} \\ &= 0,1 \text{ M} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,01 \text{ mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} &= \text{mol KH}_2\text{PO}_4 \times \text{Mr. KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} \\ &= 0,01 \text{ mol} \times 228,23 \text{ g/mol} \\ &= 2,2823 \text{ g} \end{aligned}$$

2.3 Larutan K_2HPO_4 0,1M

$$\text{mol K}_2\text{HPO}_4 = \text{K}_2\text{HPO}_4 \times \text{vol larutan}$$

$$\begin{aligned}
 &= 0,1 \text{ M} \times 0,1 \text{ L} \\
 &= 0,01 \text{ mol} \\
 \text{Massa K}_2\text{HPO}_4 &= \text{mol K}_2\text{HPO}_4 \times \text{Mr K}_2\text{HPO}_4 \\
 &= 0,01 \text{ mol/L} \times 136,09 \text{ g/mol} \\
 &= 1,3609 \text{ g}
 \end{aligned}$$

2.4 Larutan Na-alginat 3% (b/v)

$$\begin{aligned}
 [\text{Na-alginat}] \text{ (b/v)} &= \frac{W \text{ Na-alginat}}{V \text{ larutan}} \\
 3 \% \text{ g/mL} &= \frac{x}{100 \text{ mL}} \\
 x &= 3 \text{ gram}
 \end{aligned}$$

2.5 Pembuatan Larutan CaCl₂ 0,1 M

$$\begin{aligned}
 \text{mol CaCl}_2 &= [\text{CaCl}_2] \times \text{vol larutan} \\
 &= 0,1 \text{ M} \times 0,1 \text{ L} \\
 &= 0,01 \text{ mol}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 W \text{ CaCl}_2 &= \text{mol CaCl}_2 \times \text{Mr CaCl}_2 \\
 &= 0,01 \text{ mol} \times 147 \text{ g/mol} \\
 &= 1,47 \text{ g}
 \end{aligned}$$

2.6 Pembuatan NaOH 0,1 N

Berat NaOH yang harus ditimbang untuk membuat NaOH dengan Molaritas 0,1 dapat dihitung sebagai berikut :

$$\text{M NaOH} = \frac{\text{mol}}{\text{Liter}} = \frac{\text{gram}}{\text{berat molekul} \times \text{liter}}$$

Dimana :

$$\text{Berat molekul NaOH} = 40,00 \text{ g/mol}$$

$$\text{Volume akuades 1000mL} = 1\text{L}$$

$$\text{Gram NaOH} = \text{BM} \times \text{liter} \times \text{MNaOH}$$

$$\text{M NaOH} = 0,1 \text{ mol/L}$$

$$\text{Sehingga gram NaOH} = 40 \text{ gram/ mol} \times \text{liter} \times 0,1 \text{ mol/liter}$$

$$= 4 \text{ gram}$$

2.7 Pembakuan Larutan NaOH 0,095 M

A. Larutan Asam Oksalat

$$\begin{aligned} \text{Mol as. Oksalat} &= \frac{W \text{ asam oksalat}}{\text{Mr as. oksalat}} \\ &= \frac{0,6300 \text{ g}}{126 \text{ g/mol}} \\ &= 0,005 \text{ mol} \\ [\text{oksalat}] &= \frac{0,005 \text{ mol}}{0,1 \text{ L}} \\ &= 0,05 \text{ M} \end{aligned}$$

B. Standarisasi NaOH

$$\begin{aligned} \text{Vol. as. oksalat} &= 10 \text{ mL} \\ \text{Vol. titrasi NaOH} &= 10,1 \text{ mL} \\ &= 9,9 \text{ mL} \\ &= 10,0 \text{ mL} \\ \text{Rata-rata volume titrasi NaOH} &= 10,0 \text{ mL} \end{aligned}$$

Reaksi asam oksalat dengan NaOH :



1 mol asam oksalat bereaksi dengan 2 mol NaOH

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

$$\begin{aligned} [\text{NaOH}] &= \frac{2 \times \text{vol as. oksalat} \times [\text{as. oksalat}]}{\text{Vol. NaOH}} \\ &= \frac{2 \times 10 \text{ mL} \times 0,05}{10,5 \text{ mL}} \\ &= 0,1 \text{ M} \end{aligned}$$

a. Pembuatan Larutan CH₃COOH 0,1 M dari Larutan CH₃COOH 17,6 M

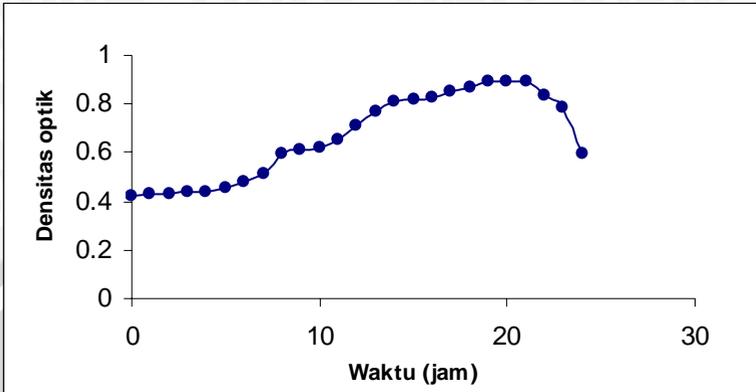
$$\begin{aligned} V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\ V_1 \cdot 17,6 \text{ M} &= 100 \text{ mL} \times 0,1 \text{ M} \\ V_1 &= 0,57 \text{ mL} \end{aligned}$$

Lampiran 3

Pembuatan kurva pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus*

Tabel L.3.1 Densitas optic sel *Lactobacillus bulgaricus* pada interval 0-24 jam

Jam ke	I	II	III	Rata-rata
0	0,408	0,420	0,431	0,419
1	0,408	0,420	0,468	0,428
2	0,435	0,440	0,420	0,431
3	0,435	0,441	0,432	0,436
4	0,443	0,446	0,432	0,440
5	0,444	0,481	0,444	0,456
6	0,495	0,481	0,469	0,482
7	0,583	0,495	0,509	0,514
8	0,658	0,585	0,553	0,598
9	0,658	0,585	0,602	0,615
10	0,699	0,602	0,589	0,623
11	0,619	0,585	0,745	0,649
12	0,745	0,699	0,710	0,710
13	0,824	0,796	0,796	0,768
14	0,824	0,824	0,783	0,810
15	0,770	0,854	0,824	0,816
16	0,824	0,839	0,809	0,824
17	0,854	0,824	0,886	0,855
18	0,869	0,869	0,854	0,865
19	0,886	0,903	0,903	0,892
20	0,903	0,886	0,903	0,892
21	0,903	0,903	0,886	0,892
22	0,824	0,824	0,854	0,834
23	0,770	0,770	0,796	0,787
24	0,658	0,585	0,553	0,598



Gambar L.3.1 Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus*

Lampiran 4

Penentuan Konsentrasi sel Na- Alginat

Tabel L.4.1 Jumlah sel *Lactobacillus bulgaricus* terjebak pada berbagai konsentrasi Na-Alginat

Konsentrasi Na-alginat (%)	Jumlah sel awal (10^9 sel/mL)	Jumlah sel terlepas (10^7 sel/mL)	Jumlah sel terjebak (10^9 sel/mL)
1	5,68	8,82	5,58
2	5,68	2,90	5,68
3	5,68	1,23	5,72

Perhitungan jumlah sel

$$\text{Jumlah sel/mL} = \frac{\text{jumlahsel}}{1/16 \text{ mm}^2 \times 0,2 \text{ mm}} \times 1000$$

Tabel L.4.2 Kadar asam laktat *Lactobacillus bulgaricus* amobil dalam konsentrasi Na-Alginat 3% dan berbagai konsentrasi kitosan

Konsentrasi Dalam Na-Alginat 3%-Kitosan	(V1) volume titrasi NaOH pada sample (ml)	(V2) volume titrasi NaOH pada blanko (ml)	(V3) $V_3=V_1V_2$ (ml)	Kadar asam Laktat (%)	Kadar asam Laktat rata-rata (%)
0,5%	2,00	1,90	0,10	0,009	0,012
	2,10	1,90	0,20	0,018	
	2,00	1,90	0,10	0,009	
1%	2,00	1,90	0,10	0,009	0,018
	2,10	1,90	0,20	0,018	
	2,20	1,90	0,30	0,027	
1,5%	2,50	1,90	0,60	0,054	0,052
	2,45	1,90	0,55	0,049	
	2,50	1,90	0,60	0,054	
2%	2,50	1,90	0,60	0,054	0,055
	2,50	1,90	0,60	0,054	
	2,55	1,90	0,65	0,058	

$$\% \text{asam laktat} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}} \times B_{\text{Masam laktat}}}{W_{\text{sampel}} \times 1000}$$

$$\% \text{asam laktat} = \frac{0,10 \text{ mL} \times 0,1 \text{ mol/L} \times 90 \text{ g/mol} \times 100\%}{2,5 \text{ gl} \times 1000}$$

$$\% \text{asam laktat} = 0,009 \%$$

Contoh : Perhitungan kadar asam laktat *Lactobacillus bulgaricus*

Asam laktat yang dihasilkan, ditentukan dengan titrasi asam basa.



Dari persamaan reaksi tersebut jumlah asam laktat akan setara dengan jumlah NaOH yang digunakan untuk titrasi.

$$\% \text{asam laktat} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}} \times B_{\text{Masam laktat}}}{W_{\text{sampel}} \times 1000}$$

$$\% \text{asam laktat} = \frac{0,10 \text{ mL} \times 0,1 \text{ mol/L} \times 90 \text{ g/mol} \times 100\%}{2,5 \text{ gl} \times 1000}$$

$$\% \text{asam laktat} = 0,009\%$$

Lampiran 5

Penentuan Kondisi Optimum *Lactobacillus bulgaricus* amobil

Tabel L.5.1 Kadar asam Laktat sebelum amobil

Perlakuan	V1 (mL)	V2 (mL)	V3 (mL)	Kadar asam laktat (%)	Kadar asam laktat rata-rata (%)
Suhu 45°C	3,15	2,50	0,65	0,058	0,057
Waktu inkubasi 4jam	3,15	2,50	0,65	0,058	
Konsentrasi starter 2,5 %	3,10	2,50	0,60	0,054	

Ket :

V₁ = Volume titrasi NaOH untuk sampel

V₂ = Volume titrasi NaOH untuk blanko

V₃ = V₁ - V₂

$$\% \text{asam laktat} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}} \times B_{\text{Masam laktat}}}{W_{\text{sampel}} \times 1000}$$

$$\% \text{asam laktat} = \frac{0,10 \text{ mL} \times 0,1 \text{ mol/L} \times 90 \text{ g/mol} \times 100\%}{2,5 \text{ gl} \times 1000}$$

$$\% \text{asam laktat} = 0,009\%$$

Tabel L.5.2 Kadar asam laktat *Lactobacillus bulgaricus* amobil dalam berbagai suhu dengan konsentrasi Na-Alginat 3% dan konsentrasi kitosan 1,5 % selama 4 jam

Suhu (°C)	(V1) volume titrasi NaOH pada sample (ml)	(V2) volume titrasi NaOH pada blanko (ml)	(V3) $V_3=V_1V_2$ (ml)	Kadar asam Laktat (%)	Kadar asam Laktat rata-rata (%)
30	2,60	2,20	0,40	0,036	0,033
	2,60	2,20	0,40	0,036	
	2,50	2,20	0,30	0,027	
35	2,80	2,30	0,50	0,045	0,039
	2,70	2,30	0,40	0,036	
	2,70	2,30	0,40	0,036	
40	2,85	2,35	0,50	0,045	0,044
	2,85	2,35	0,50	0,045	
	2,80	2,35	0,45	0,040	
45	3,00	2,50	0,50	0,045	0,045
	3,00	2,50	0,50	0,045	
	3,00	2,50	0,50	0,045	
50	2,70	2,45	0,25	0,022	0,019
	2,60	2,45	0,15	0,013	
	2,70	2,45	0,25	0,022	
55	2,30	2,10	0,20	0,018	0,012
	2,20	2,10	0,10	0,009	
	2,20	2,10	0,10	0,018	

$$\% \text{asam laktat} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}} \times B_{\text{Masam laktat}}}{W_{\text{sampel}} \times 1000}$$

$$\% \text{asam laktat} = \frac{0,10 \text{ mL} \times 0,1 \text{ mol/L} \times 90 \text{ g/mol} \times 100\%}{2,5 \text{ g} \times 1000}$$

$$\% \text{asam laktat} = 0,009 \%$$

Tabel L.5.3 Kadar asam laktat *Lactobacillus bulgaricus* amobil dalam berbagai waktu inkubasi dengan konsentrasi Na-Alginat 3% dan konsentrasi kitosan 1,5 % pada suhu 45 °C

Waktu (Jam)	(V1) volume titrasi NaOH pada sample (ml)	(V2) volume titrasi NaOH pada blanko (ml)	(V3) $V_3=V_1V_2$ (ml)	Kadar asam Laktat (%)	Kadar asam Laktat rata-rata (%)
1	2,20	2,00	0,20	0,018	0,015
	2,20	2,00	0,20	0,018	
	2,10	2,00	0,10	0,009	
2	2,20	2,05	0,15	0,013	0,016
	2,30	2,05	0,25	0,022	
	2,20	2,05	0,15	0,013	
3	2,40	2,10	0,30	0,027	0,030
	2,40	2,10	0,30	0,027	
	2,50	2,10	0,40	0,036	
4	3,00	2,50	0,50	0,045	0,045
	3,00	2,50	0,50	0,045	
	3,00	2,50	0,50	0,045	
5	3,50	3,00	0,50	0,045	0,048
	3,60	3,00	0,60	0,054	
	3,50	3,00	0,50	0,045	
6	3,60	3,10	0,50	0,045	0,049
	3,75	3,10	0,65	0,058	
	3,60	3,10	0,50	0,045	

$$\% \text{asam laktat} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}} \times B_{\text{Masam laktat}}}{W_{\text{sampel}} \times 1000}$$

$$\% \text{asam laktat} = \frac{0,10 \text{ mL} \times 0,1 \text{ mol/L} \times 90 \text{ g/mol} \times 100\%}{2,5 \text{ g} \times 1000}$$

$$\% \text{asam laktat} = 0,009 \%$$

Tabel L.5.4 Kadar asam laktat *Lactobacillus bulgaricus* amobil dalam berbagai konsentrasi dengan konsentrasi Na-Alginat 3% dan konsentrasi kitosan 1,5 % pada suhu 45 °C pada waktu 4 jam

Konsentrasi Bakteri <i>Lactobacillus Bulgaricus</i>	(V1) volume titrasi NaOH pada sample (ml)	(V2) volume titrasi NaOH pada blanko (ml)	(V3) $V_3=V_1V_2$ (ml)	Kadar asam Laktat (%)	Kadar asam Laktat rata-rata (%)
1%	2,00	1,90	0,10	0,009	0,012
	2,10	1,90	0,20	0,018	
	2,20	1,90	0,30	0,027	
1,5%	2,20	1,90	0,30	0,027	0,027
	2,30	1,90	0,40	0,036	
	2,10	1,90	0,20	0,018	
2%	2,30	1,90	0,40	0,036	0,039
	2,30	1,90	0,40	0,036	
	2,40	1,90	0,50	0,045	
2,5%	2,50	1,90	0,60	0,054	0,063
	2,70	1,90	0,80	0,072	
	2,60	1,90	0,70	0,063	
3%	2,55	1,90	0,65	0,057	0,066
	2,70	1,90	0,80	0,072	
	2,65	1,90	0,75	0,067	

$$\% \text{asam laktat} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}} \times B_{\text{Masam laktat}}}{W_{\text{sampel}} \times 1000}$$

$$\% \text{asam laktat} = \frac{0,10 \text{ mL} \times 0,1 \text{ mol/L} \times 90 \text{ g/mol} \times 100\%}{2,5 \text{ gl} \times 1000}$$

$$\% \text{asam laktat} = 0,009 \%$$

Tabel L.5.5 Efisiensi Pemakaian Ulang *Lactobacillus bulgaricus* amobil dalam berbagai konsentrasi dengan konsentrasi Na-Alginat 3% dan konsentrasi kitosan 1,5 % pada suhu 45 °C, pada waktu 4 jam, konsentrasi 2,5 %

Efisiensi Pemakaian Ulang	(V1) volume titrasi NaOH pada sample (ml)	(V2) volume titrasi NaOH pada blanko (ml)	(V3) $V_3=V_1V_2$ (ml)	Kadar asam Laktat (%)	Kadar asam Laktat rata-rata (%)
1	3,10	2,50	0,60	0,054	0,052
	3,05	2,50	0,55	0,049	
	3,10	2,50	0,60	0,054	
2	3,05	2,50	0,55	0,049	0,051
	3,10	2,50	0,60	0,054	
	3,05	2,50	0,55	0,049	
3	3,00	2,50	0,50	0,045	0,046
	3,00	2,50	0,50	0,045	
	3,05	2,50	0,55	0,049	
4	3,00	2,50	0,50	0,045	0,045
	3,00	2,50	0,50	0,045	
	2,95	2,50	0,45	0,031	
5	2,85	2,50	0,35	0,031	0,025
	2,80	2,50	0,30	0,027	
	2,85	2,50	0,35	0,031	
6	2,80	2,50	0,30	0,027	0,022
	2,70	2,50	0,20	0,018	
	2,75	2,50	0,25	0,022	

$$\% \text{asam laktat} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}} \times B_{\text{Masam laktat}}}{W_{\text{sampel}} \times 1000}$$

$$\% \text{asam laktat} = \frac{0,10 \text{ mL} \times 0,1 \text{ mol/L} \times 90 \text{ g/mol} \times 100\%}{2,5 \text{ g} \times 1000}$$

$$\% \text{asam laktat} = 0,009 \%$$

Tabel L.5.6 Efisiensi Pemakaian Ulang *Lactobacillus bulgaricus* Amobil.

Pemakaian Ulang sel Amobil	Kadar asam laktat (%)	Persen Penurunan Kadar asam laktat (%)	Efisiensi (%)	Notasi
I	0,052	0	100	a
II	0,051	2	98	a
III	0,046	12	88	a
IV	0,045	14	86	a
V	0,025	52	48	b
VI	0,022	58	42	b

Contoh Perhitungan Efisiensi Pemakaian Ulang *Lactobacillus bulgaricus* Amobil.

$$\text{Efisiensi (\%)} = \frac{\text{Kadar Asam Laktat II}}{\text{Kadar Asam Laktat I}} \times 100 \%$$

$$\text{Efisiensi (\%)} = \frac{0,052}{0,051} \times 100\%$$

$$\text{Efisiensi} = 98 \%$$

Lampiran 6

Analisis Statistika

Data yang diperoleh dianalisa secara statistika. Semua data percobaan diuji dengan tingkat kepercayaan 95% atau beda nyata terkecil (BNT) 5% dan Pola Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hasil penelitian ditulis dalam bentuk table sebagai berikut.

1. Menghitung Faktor Koreksi

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{\sum_{j=1}^n n_1}$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

a. $JK_{total} = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n Y_{ij}^2 - FK$

b. $JK_{perlakuan} = \frac{\sum_{i=j}^n \left[\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{n_1} - FK$

c. $JK_{galat\ percobaan} = JK_{total} - JK_{perlakuan}$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT) setiap sumber keragaman

a. $KT_{perlakuan} = \frac{JK_{perlakuan}}{dB_{galat\ percobaan}}$

b. $KT_{galat\ percobaan} = \frac{JK_{galat\ percobaan}}{dB_{galat\ percobaan}}$

4. Menghitung nilai F

$$F_{hitung\ perlakuan} = \frac{KT_{perlakuan}}{KT_{galat\ percobaan}}$$

Tabel Analisis Ragam

L.6.1 Penentuan F_{hitung} pada Variasi Konsentrasi Kitosan

Sumber keragaman	dB	JK	KT	F_{hitung}	F_{tabel}	
					0,05	0,01
Perlakuan	3	0,004592	0,001531	50,32	4,07	7,59
Galat	8	0,000243	$3,04 \times 10^{-05}$			
Total	11	0,004836				

L.6.1.1 Uji Beda Nyata Terkecil 5% Pengaruh Konsentrasi Kitosan

$$t(\alpha/2, dBg) = 2,306$$

$$BNT_{(0,05)} = t(\alpha/2, dBg) \times \sqrt{\frac{2KT_g}{n}} = 2,306 \times \sqrt{\frac{2 \times 0,0000304}{3}}$$

Konsentrasi (%)		0.5	1	1.5	2	notasi
		0,012	0,018	0,052	0,055	
0.5	0,012	0				a
1	0,018	0,004	0			a
1.5	0,052	0,040	0,034	0		b
2	0,055	0,043	0,037	0,003	0	b

Keterangan

- ❖ Konsentrasi Kitosan 0,5 % tidak berbeda nyata dengan 1%
- ❖ Konsentrasi Kitosan 1 % berbeda nyata dengan 1,5% dan 2%
- ❖ Konsentrasi Kitosan 1,5 % tidak berbeda nyata dengan 2%

L.6.2 Penentuan F_{hitung} pada Variasi Suhu

Sumber keragaman	dB	JK	KT	F_{hitung}	F_{tabel}	
					0,05	0,01
Perlakuan	5	0,002723	0,000545	28,47	3,11	5,06
Galat	12	0,000229	$1,91 \times 10^{-05}$			
Total	17	0,002952				

L.6.2.1 Uji Beda Nyata Terkecil 5% Pengaruh Variasi Suhu

$$t(\alpha/2, dBg) = 2.179$$

$$BNT_{(0,05)} = t(\alpha/2, dBg) \times \sqrt{\frac{2KT_g}{n}} = 2.179 \times \sqrt{\frac{2 \times 0.0000191}{3}}$$

Suhu (°C)		55	50	30	35	40	45	notasi
		0,012	0,019	0,033	0,039	0,044	0,045	
55	0,012	0						a
50	0,019	0,007	0					a
30	0,033	0,021	0,014	0				b
35	0,039	0,027	0,020	0,006	0			b
40	0,044	0,032	0,025	0,011	0,005	0		c
45	0,045	0,033	0,026	0,012	0,006	0,001	0	c

Keterangan

- ❖ Perlakuan suhu 55°C, tidak berbeda nyata dengan dengan suhu 50°C tapi berbeda nyata dengan suhu 30°C, 35°C, 40°C, dan 45°C
- ❖ Perlakuan suhu 45°C, berbeda nyata dengan dengan suhu 30°C, 50°C, 55 °C tapi tidak berbeda nyata dengan suhu 35°C, 40°C
- ❖ Suhu optimum adalah 45°C

L.6.3 Penentuan F_{hitung} pada Variasi Waktu

Sumber keragaman	dB	JK	KT	F_{hitung}	F_{tabel}	
					0,05	0,01
Perlakuan	5	0,003722	0,000744	26,46	3,11	5,06
Galat	12	0,000337	$2,81 \times 10^{-05}$			
Total	17	0,004059				

L.6.3.1 Uji Beda Nyata Terkecil 5% Pengaruh Variasi Waktu

$$t(\alpha/2, dBg) = 2.179$$

$$BNT_{(0,05)} = t(\alpha/2, dBg) \times \sqrt{\frac{2KT_g}{n}} = 2.179 \times \sqrt{\frac{2 \times 0,0000281}{3}}$$

WAKTU (jam)		1	2	3	4	5	6	notasi
		0,015	0,016	0,030	0,045	0,048	0,049	
1	0,015	0						a
2	0,016	0,001	0					a
3	0,030	0,015	0,014	0				b
4	0,045	0,030	0,029	0,015	0			b
5	0,048	0,033	0,032	0,018	0,003	0		c
6	0,049	0,034	0,033	0,019	0,004	0,001	0	c

Keterangan

- ❖ Perlakuan waktu 5jam tidak berbeda nyata dengan waktu 6 jam tapi berbeda nyata dengan waktu 1jam, 2jam, dan 3jam, 4 jam.
- ❖ Perlakuan waktu 4jam berbeda nyata dengan waktu 1jam, 2 jam dan 3 jam 5 jam dan 6 jam
- ❖ Waktu inkubasi optimum adalah 4 jam

L.6.4 Penentuan F_{hitung} pada Variasi Konsentrasi Sel

Sumber keragaman	dB	JK	KT	F_{hitung}	F_{tabel}	
					0,05	0,01
Perlakuan	4	0,006448	0,001612	30,62	3,48	5,99
Galat	10	0,000527	$5,27 \times 10^{-05}$			
Total	14	0,004059				

L.6.4.1 Uji Beda Nyata Terkecil 5% Pengaruh Konsentrasi Sel

$$t(\alpha/2, dBg) = 2.228$$

$$BNT_{(0,05)} = t(\alpha/2, dBg) \times \sqrt{\frac{2KT_g}{n}} = 2.228 \times \sqrt{\frac{2 \times 0,0000527}{3}}$$

Konsentrasi (%)		1	1.5	2	2.5	3	notasi
		0,012	0,027	0,039	0,063	0,066	
1	0,012	0					a
1.5	0,027	0,015	0				b
2	0,039	0,027	0,012	0			c
2.5	0,063	0,051	0,036	0,024	0		d
3	0,066	0,054	0,039	0,027	0,003	0	d

Keterangan

- ❖ Perlakuan konsentrasi 2,5 % tidak berbeda nyata dengan 3%, tapi berbeda nyata dengan 1%, 1,5% dan 2%
- ❖ Konsentrasi starter optimum 2,5%.

L.6.5 Penentuan F_{hitung} pada Efesien Pemakaian Ulang *Lactobacillus bulgaricus* Amobil

Sumber keragaman	dB	JK	KT	F_{hitung}	F_{tabel}	
					0,05	0,01
Perlakuan	5	0,002579	0,000516	35,26	3,11	5,06
Galat	12	0,000175	$1,46 \times 10^{-05}$			
Total	17	0,002754				

L.6.5.1 Uji Beda Nyata Terkecil 5% Pengaruh Efesien Pemakaian Ulang *Lactobacillus bulgaricus* Amobil

$$t(\alpha/2, dBg) = 2.179$$

$$BNT_{(0,05)} = t(\alpha/2, dBg) \times \sqrt{\frac{2KT_g}{n}} = 2.179 \times \sqrt{\frac{2 \times 0.0000146}{3}}$$

Koefesien pemakaian ulang		1	2	3	4	5	6	notasi
		0,052	0,051	0,046	0,045	0,025	0,022	
1	0,052	0						a
2	0,051	0,001	0					a
3	0,046	0,006	0,006	0				a
4	0,045	0,007	0,007	0,001	0			a
5	0,025	0,027	0,024	0,021	0,020	0		b
6	0,022	0,030	0,029	0,024	0,023	0,003	0	b

Keterangan

- ❖ Perlakuan V berbeda nyata dengan semua perlakuan efesien
- ❖ Perlakuan I, II, III tidak berbeda nyata dengan perlakuan IV, tapi berbeda nyata dengan perlakuan V, VI
- ❖ Perlakuan V tidak berbeda nyata dengan perlakuan VI, tapi berbeda nyata dengan perlakuan I, II, III dan VI

Lampiran 7

Diagram Alir Penelitian

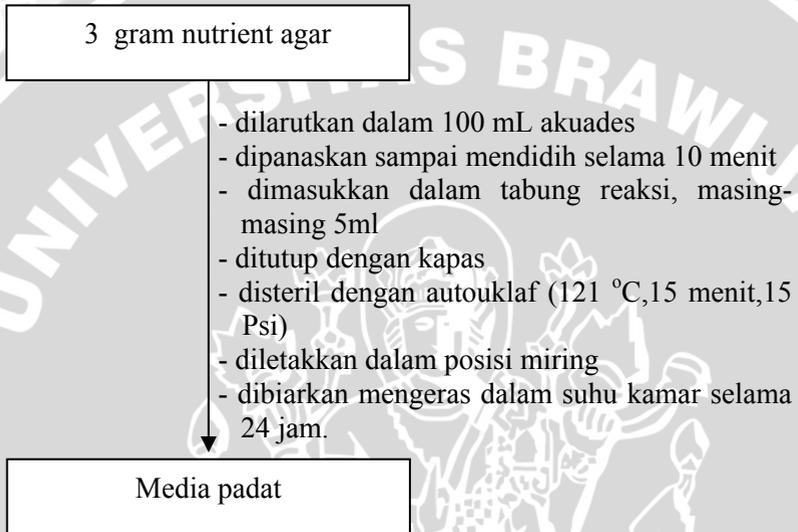


Lampiran 8

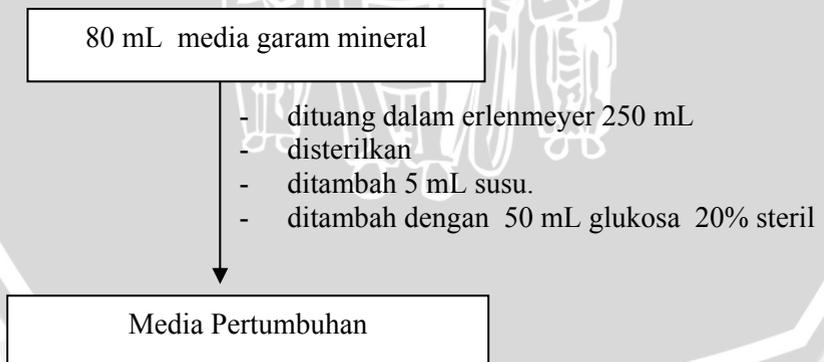
Diagram Kerja Penelitian

L.8.1 Penyiapan Media

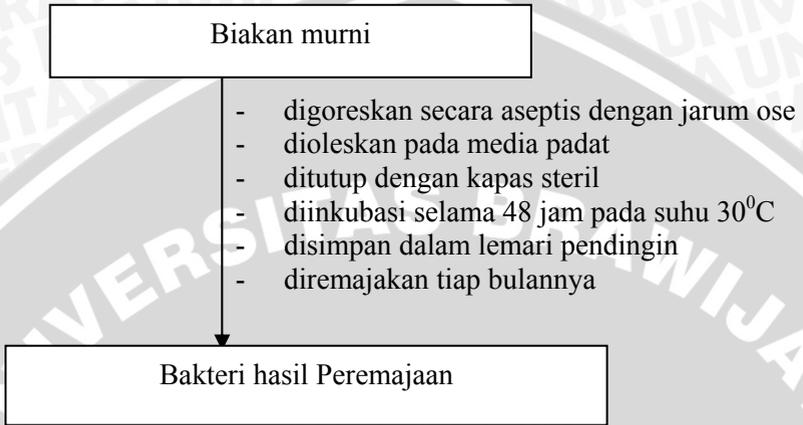
L.8.1.1 Media Padat (Media Pemiakan)



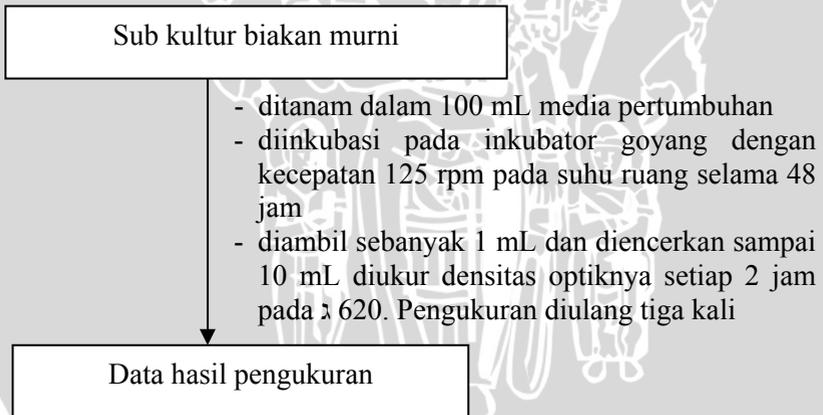
L.8.1.2 Media Pertumbuhan (Media Produksi)



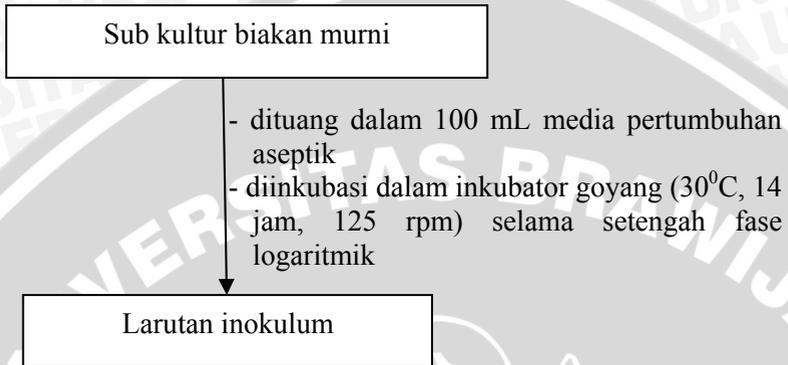
L.8.2 Peremajaan Kultur



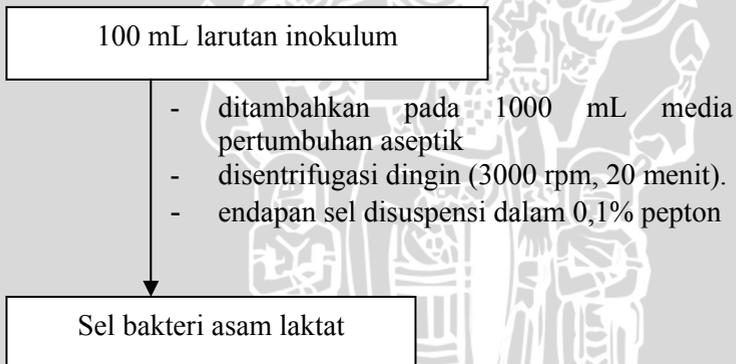
L.8.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan



L.8.4 Pembuatan Biakan Aktif (Larutan Inokulum)

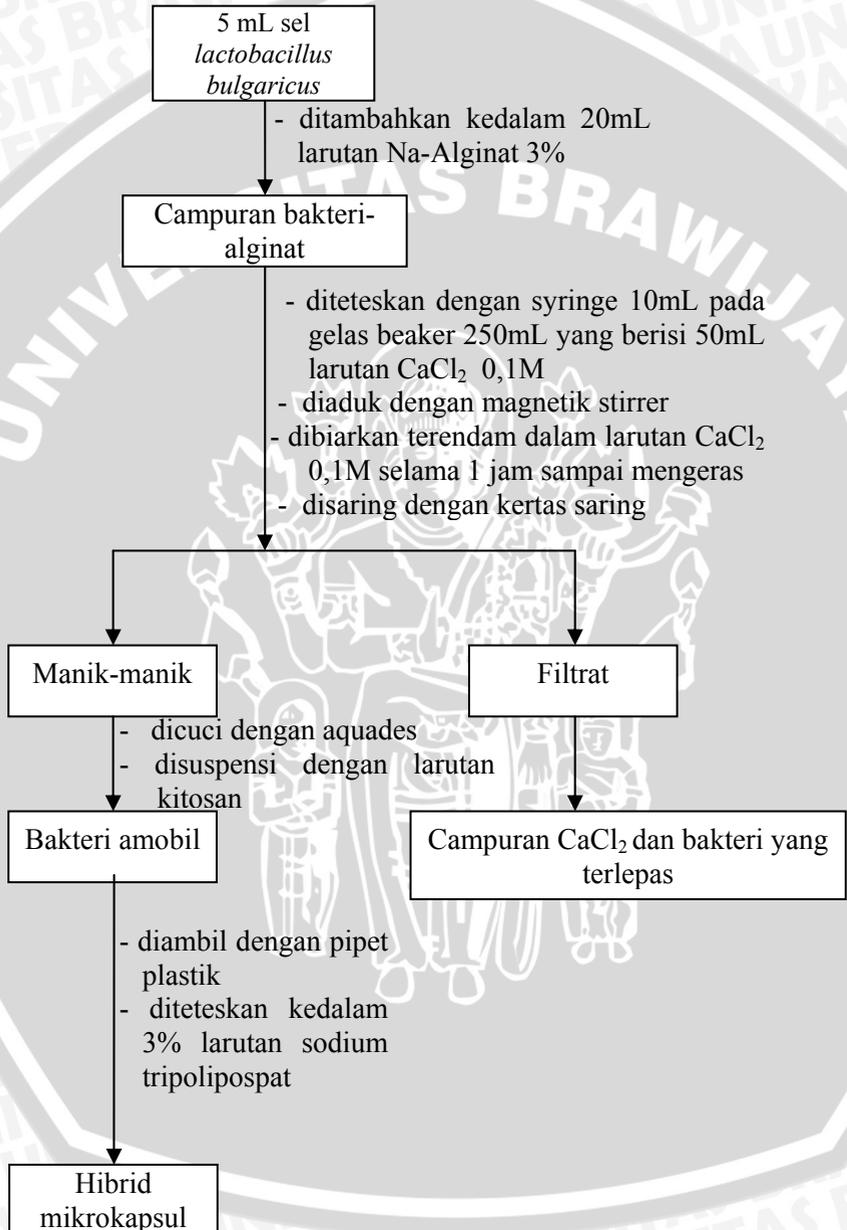


L.8.5 Produksi Sel *Lactobacillus bulgaricus*

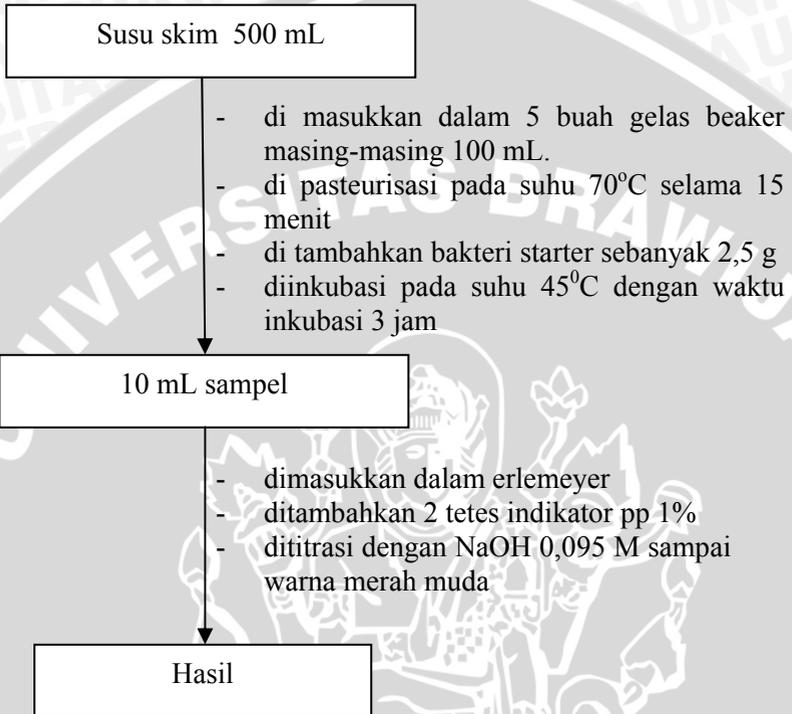


L.8.6 Amobilisasi Ktosan Alginat Mikro kapsul

L.8.6.1 Hibrid Mikro kapsul

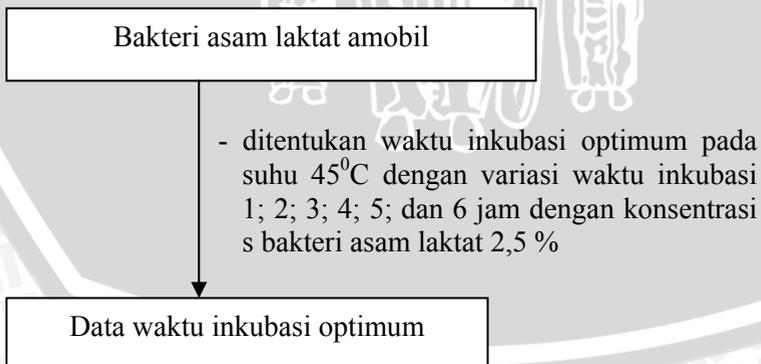


L.8.7 Penentuan Kadar Asam Laktat Hasil Fermentasi Susu oleh Bakteri Asam Laktat

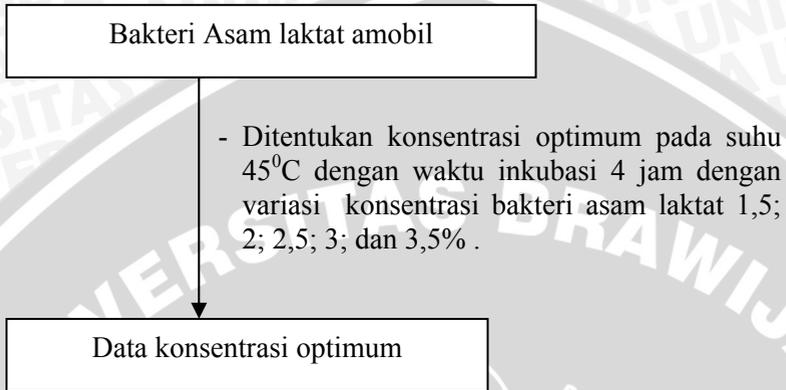


L.8.8 Penentuan Kondisi Optimum

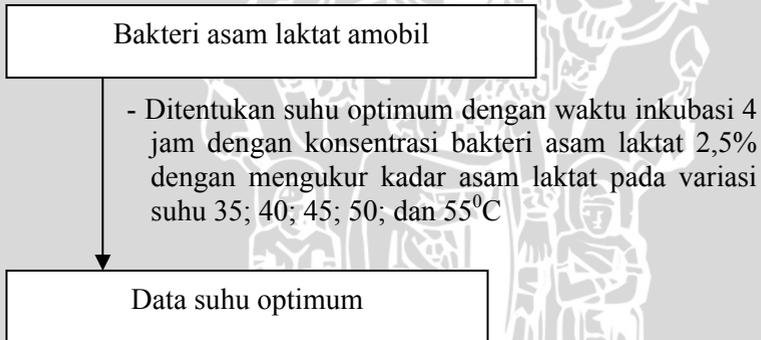
L.8.8.1 Waktu Inkubasi Optimum



L.8.8.2 Penentuan Konsentrasi Bakteri Asam Laktat Optimum



L.8.8.3 Suhu Optimum



L.8.9 Efisiensi Pemakaian Ulang Bakteri Asam Laktat amobil

