

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Probiotik adalah agen mikroba hidup yang mampu memberikan keuntungan bagi inang dengan memodifikasi komunitas mikroba atau berasosiasi dengan inang, untuk memperbaiki nilai nutrisi dan pemanfaatan pakan, meningkatkan respon inang terhadap penyakit, dan memperbaiki kualitas lingkungan ambangnya (Widanarni *et al.*, 2012). Bakteri probiotik yang sering ditemukan dalam produk fermentasi yaitu *Lactobacillus acidophilus*. *L. acidophilus* adalah salah satu bakteri paling penting yang ditemukan dalam saluran usus. Hal ini dikarenakan bakteri *L. acidophilus* membantu menjaga keseimbangan mikroflora di dalamnya (Tenney 1996).

Banyak jenis – jenis makanan yang memanfaatkan *L. acidophilus* sebagai asupan probiotik pada saat ini, contohnya produk susu dan bakso. Selain susu dan bakso, perlu adanya inovasi atau pemikiran baru tentang penambahan *L. acidophilus* pada produk perikanan. Salah satu pemikiran baru tersebut yaitu penambahan *L. acidophilus* pada produk *edible film*, menurut Sudaryati *et al.* (2010), *edible film* merupakan salah satu alternatif kemasan sintetis. *Edible film* memiliki sifat dapat didegradasi yang berasal dari bahan alami seperti protein, lipid, dan polisakarida. Selain itu *edible film* merupakan kemasan pangan dalam bentuk lapisan tipis yang aman untuk dimakan.

Salah satu bahan dasar pembuatan *edible film* yaitu *mix kappa* dan *iota* karaginan. Menurut Sirat dan Sukei (2012), karaginan merupakan suatu zat yang bersifat hidrokoloid. Sifat hidrokoloid tersebut disebabkan oleh adanya ester galaktosa dari natrium, kalium, magnesium, dan kalsium sulfat dan unit 3,6-anhidrogalaktosa. Pada umumnya karaginan yang digunakan sebagai pengental diekstrak dari rumput laut jenis *Kappaphycus alvarezii* (*Euचेuma cottonii*) dan

Eucheuma spinosum ke dalam air atau alkali encer dan diakhiri oleh pengendapan dengan alkohol.

Adanya intrusi kation ke dalam masing-masing karaginan akan mempengaruhi kekuatan gel seperti kappa-karaginan dengan adanya kation K^+ cenderung membentuk gel yang kuat, sedangkan iota dengan adanya kation Ca^{2+} maka akan membentuk gel yang sangat kuat. Pembentukan gel pada hidrokoloid dapat dilakukan dengan meningkatkan atau memperbesar gaya antar molekul terlarut dengan cara menambahkan bahan yang tidak melarutkan koloid, menguapkan zat pelarut dan menambahkan bahan pengikat atau pengatur reaksi kimia yang bertujuan untuk mengurangi kelarutan koloid (Basmal *et al.*, 2003).

Penelitian *edible film* berbahan karaginan sudah pernah dilakukan oleh Maria Apriliani Ariesty yaitu tentang suhu dan lama waktu pengeringan *edible film* dengan penambahan probiotik sebanyak 1%, namun hasil penelitian tersebut masih ada beberapa kekurangan terutama total koloni *Lactobacillus acidophilus* masih rendah. Oleh sebab itu, dengan adanya penelitian ini diharapkan dapat memperbaiki kualitas *edible film* baik secara fisik maupun kimia. Serta *edible film* karaginan yang mengandung probiotik *L. acidophilus* ini dapat memperbaiki nilai gizi suatu produk yang dilapisinya dan memberikan dampak positif bagi kesehatan konsumen terutama anak – anak dalam masa pertumbuhannya.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Bagaimana pengaruh penambahan konsentrasi probiotik *Lactobacillus acidophilus* pada *edible film* berbahan *mix kappa iota* karaginan terhadap kualitas *edible film*.

1.3 Tujuan Penelitian

Secara umum tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari pengaruh penambahan konsentrasi probiotik *Lactobacillus acidophilus* pada *edible film* berbahan *mix kappa iota* karaginan terhadap kualitas *edible film*.

1.4 Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini adalah sebagai berikut:

H_0 : Diduga penambahan konsentrasi probiotik *Lactobacillus acidophilus* tidak dapat mempengaruhi kualitas *edible film*.

H_1 : Diduga penambahan konsentrasi probiotik *Lactobacillus acidophilus* dapat mempengaruhi kualitas *edible film*.

1.5 Kegunaan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai pengaruh penambahan konsentrasi probiotik *Lactobacillus acidophilus* pada *edible film* berbahan *mix kappa iota* karaginan terhadap kualitas *edible film*.

1.6 Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Perekayaan Hasil Perikanan, Laboratorium Nutrisi Ikan, Laboratorium Mikrobiologi Kedokteran, Laboratorium Fisika Material Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Negeri Malang dan Laboratorium Kimia Fakultas Kimia, Institut Teknologi Negeri Malang pada Bulan Februari sampai bulan Agustus 2014.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Probiotik

Probiotik adalah agen mikroba hidup yang mampu memberikan keuntungan bagi inang dengan memodifikasi komunitas mikroba atau berasosiasi dengan inang memperbaiki nilai nutrisi dan pemanfaatan pakan, meningkatkan respon inang terhadap penyakit, dan memperbaiki kualitas lingkungan ambangnya. Berdasarkan pengertian tersebut maka aplikasi probiotik tidak hanya berfungsi sebagai agen biokontrol untuk mengurangi serangan penyakit atau bioremediasi untuk memperbaiki kualitas lingkungan, melainkan dapat pula meningkatkan nilai nutrisi pakan dan laju penyerapan nutrisi sehingga memungkinkan udang mencapai pertumbuhan yang maksimum (Widanarni *et al.*, 2012),.

Menurut Anggriani *et al.* (2012), yang dimaksud probiotik adalah produk yang tersusun oleh biakan mikroba atau pakan alami mikroskopik yang bersifat menguntungkan dan memberikan dampak bagi peningkatan keseimbangan mikroba saluran usus hewan inang. Dalam aplikasinya di dunia perikanan, probiotik sebagai agen pengurai dapat digunakan baik secara langsung dengan ditebarkan ke air atau melalui perantara makanan hidup (*live food*). Proses kerja dari bakteri probiotik yaitu dengan menghasilkan enzim – enzim yang berfungsi untuk mempercepat proses dari pencernaan ikan. Ditambahkan oleh Noland dan Aryana (2012), salah satu bakteri probiotik yang paling efektif adalah *Lactobacillus acidophilus*.

Probiotik kini menjadi sebuah alternatif dalam dunia kesehatan terutama untuk menjaga keseimbangan mikroflora usus. Kini berbagai bahan pangan bahkan disuplementasi dengan jenis pangan fungsional lain sehingga dapat meningkatkan fungsinya terhadap kesehatan (Nisa *et al.*, 2009).

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

2.2 *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus merupakan salah satu genus bakteri asam laktat yang paling banyak dijumpai pada saluran gastro-intestinal baik pada manusia maupun pada hewan. Pada usus halus, jumlahnya dapat mencapai $10^6 - 10^7$ sel/g, sedangkan pada usus besar jumlahnya berkisar antara $10^{10} - 10^{11}$ sel/g. Beberapa spesies *Lactobacillus* telah banyak diisolasi dari saluran usus halus manusia dan hewan. Beberapa diantaranya adalah *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus casei*, dan *Lactobacillus fermentum*. Dari beberapa spesies tersebut diatas, *Lactobacillus acidophilus* merupakan bakteri asam laktat yang paling dominan dan paling banyak dipelajari. Hingga kini, telah berhasil diperoleh 6 galur *Lactobacillus acidophilus*, yaitu *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovarus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, dan *Lactobacillus Johnsonii* (Hassan, 2006).

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

Lactobacillus termasuk golongan bakteri asam laktat yang sering dijumpai pada makanan fermentasi, produk olahan ikan, daging, susu, dan buah – buahan. Sifat yang menguntungkan dari bakteri *Lactobacillus* dalam bentuk probiotik adalah dapat digunakan untuk mendukung peningkatan kesehatan. Bakteri tersebut berperan sebagai flora normal dalam sistem pencernaan. Fungsinya adalah untuk menjaga keseimbangan asam dan basa sehingga pH dalam kolon konstan. *Lactobacillus* mempunyai potensi yang besar sebagai produk probiotik karena keunggulannya dibanding bakteri asam laktat lainnya (Hardiningsih *et al.*, 2006).

Setiap makanan harus melalui proses pemasakan untuk membunuh bakteri patogen atau pembusuk, hal ini tidak menghindarkan bakteri menguntungkan pada makanan tersebut (Kailasapathy, 2002). Pemasakan biasanya dilakukan dengan suhu pasteurisasi (63°C), perebusan (100°C) atau penggorengan (>120°C), yang mana dari suhu tersebut menjadikan *L. Acidophilus* mati. *L. acidophilus* yang tidak terenkapsulasi dan terenkapsulasi setelah melalui suhu 65°C selama 30 menit, jumlah bakteri berkurang dari 2.0×10^7 cfu/g menjadi 3.5×10^4 cfu/g dan dari 1.2×10^7 cfu/g menjadi 2.1×10^5 cfu/g (Kim *et al.* 2007). Untuk lebih jelasnya mengenai bakteri *L. acidophilus* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. *Lactobacillus acidophilus*.

2.3 *Edible Film*

Menurut Kusumawati dan Putri (2013), *edible film* merupakan suatu lapis tipis yang melapisi bahan pangan yang layak dikonsumsi, dan dapat terdegradasi oleh alam secara biologis. Selain bersifat *biodegradable*, *edible film* dapat dipadukan dengan komponen tertentu yang dapat menambah nilai fungsional dari kemasan itu sendiri seperti *edible film* berantioksidan. Dengan kelebihan dan kelemahan menurut Zaidar *et al.* (2003), yaitu kelebihan *edible film* yang dibuat dari hidrokoloid diantaranya memiliki kemampuan yang baik untuk melindungi produk terhadap oksigen, karbondioksida, dan lipida serta memiliki sifat mekanis yang diinginkan dan meningkatkan kesatuan struktur produk. Kelemahannya, *film* dari karbohidrat yang kurang bagus digunakan untuk mengatur migrasi uap air, sementara *film* dari protein sangat dipengaruhi oleh perubahan pH.

Menurut Sudaryati *et al.* (2010), *edible film* merupakan salah satu alternatif kemasan sintetis. Berhubung sifatnya yang dapat didegradasi yang berasal dari bahan alami seperti protein, lipid, dan polisakarida, *edible film* telah mendapat perhatian yang besar. Walaupun *edible film* tidak dapat secara sempurna menggantikan kemasan sintetis, *edible film* dapat memperpanjang umur simpan produk pangan karena sifat mekanisnya dan kemampuannya sebagai *barrier*. *Edible film* merupakan kemasan pangan dalam bentuk lapisan tipis yang aman untuk dimakan.

Perkembangan teknologi pangan yang semakin pesat menimbulkan berbagai produk pangan yang baru. Salah satu alternatif kemasan yang dapat dibuat untuk tujuan mempertahankan mutu bahan pangan dan bersifat ramah lingkungan adalah bahan kemasan *edible film*. *Edible film* merupakan tipe pengemas seperti *film*, lembaran atau lapis tipis sebagai bagian integral dari produk pangan dan dapat dimakan bersama-sama dengan produk yang dikemas. Komponen penyusun *edible film* dapat dibagi menjadi tiga macam yaitu;

hidrokoloid, lipida, dan komposit. Salah satu *edible film* komposit yang dapat dibuat adalah hasil ekstraksi rumput laut (*E. cottonii*) yaitu *semirefined* karaginan (Diova *et al.*, 2013).

2.3.1 Karakteristik *Edible Film*

Menurut Safitri *et al.* (2014), *edible film* yang baik untuk bahan pengemas yaitu *film* yang terbentuk transparan, lunak, tidak memiliki bau dan tidak berwarna. Selain itu, *edible film* yang baik memiliki kemampuan menahan aroma dari produk pangan yang dilapisinya.

Menurut Krochta (1992), *edible film* adalah lapisan tipis dan kontinyu terbuat dari bahan – bahan yang dapat dimakan, dibentuk untuk melapisi komponen makanan (*coating*) atau diletakkan diantara komponen makanan (*film*), serta untuk mempermudah penanganan makanan, dengan adanya persyaratan bahwa kemasan yang digunakan harus ramah lingkungan, maka penggunaan *edible film* adalah sesuatu yang sangat menjajikan, baik yang terbuat dari hidrokoloid, lipid, protein maupun kombinasi ketiganya.

2.3.2 Proses Pembuatan *Edible Film*

Menurut Tamaela dan Lewerissa (2007), langkah – langkah pembuatan *edible film* yaitu pertama ditimbang tepung karagenan masing-masing 2,3 dan 4 gr, masukkan masing-masing kedalam gelas kimia kemudian panaskan dengan 80 ml *aquades* diatas *hot plate stirer* pada suhu 85°C, tambahkan dengan gliserol masing-masing 1, 1,5 dan 2 ml dan volumenya dijadikan 100 ml, lalu panaskan pada suhu 90°C selama 5 menit. Larutan kemudian dituang dalam *plat* plastik selanjutnya dilakukan pengeringan dengan oven pada suhu 50°C selama 24-36 jam. Pengeringan dihentikan setelah *film* mudah lepas dari *plat*. Setelahdikeringkan lalu didinginkan pada suhu ruang selama 15 menit. *Film* kemudian dilepas dari *plat* plastik dandipotong untuk selanjutnya dilakukan pengukuran ketebalan, kelarutan, dan laju transmisi uap air.

Proses pembuatan *edible film* menurut Prasetyaningrum *et al.* (2010) meliputi persiapan bahan, pembuatan larutan *film*, pencetakan *edible film*, dan pengujian *edible film*. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada proses berikut:

a. Bahan

Bahan yang digunakan adalah *Sodium Alginate* atau selanjutnya disebut alginat yang merupakan hidrokoloid yang berasal dari alga coklat. Alginat ini diperoleh dari hasil ekstraksi alga coklat. Gliserol yang berfungsi sebagai *plasticizer* atau bahan dengan berat molekul yang rendah yang berfungsi menambah elastisitas dari *film* yang nantinya akan dihasilkan. Aquades sebagai pelarut dalam pembuatan larutan *edible film*. Lilin lebah (*beeswax*) sebagai bahan utama dari lipid yang berfungsi menghambat laju transmisi uap air. Berbentuk pellet dengan diameter ± 5 mm.

b. Pembuatan Larutan *Film*

Pencampuran alginat dan *aquades* (sesuai variabel) menggunakan *hot plate stirrer* hingga mendidih. Masukkan *alginate* sedikit demi sedikit ke dalam *aquades* yang telah dipanaskan sebelumnya untuk mencegah penggumpalan, lakukan hingga semua larut dan larutan mendidih. Kemudian pendinginan larutan hingga suhu 50°C . Lalu penambahan gliserol 2 % berat ke dalam larutan sebagai *plasticizer*. Homogenisasi larutan pada 50°C selama 15 menit menggunakan *hot plate stirrer*. Penambahan lilin lebah (sesuai variabel). Lakukan hingga lilin lebah larut ke dalam larutan. Kemudian pemanasan pada suhu operasi (sesuai variabel). Penyaringan larutan *film* hingga didapatkan larutan *film* yang jernih. Pendinginan larutan hingga suhu ruangan. Perhitungan densitas dan viskositas larutan densitas menggunakan alat *picnometer* dan viskositas menggunakan *Viskosimeter Ostwald*.

c. Pencetakan *Edible Film*

Larutan yang telah disaring dan dihitung viskositas dan densitas siap untuk dicetak. Tuang larutan ke dalam kaca yang telah dibersihkan sebelumnya. Meratakan larutan hingga diperoleh ketebalan yang sama. Kemudian masukkan ke dalam oven suhu 50°C selama 60 menit. Agar hasil lebih sempurna lakukan pengeringan dalam suhu kamar selama 24 jam.

d. Pemamenan *Film*

Menghitung pemanjangan *edible film* dalam cetakan. Kemudian lepaskan *edible film* dari dalam cetakan. Kemudian lakukan uji karakterisasi *edible film* berupa kuat tarik, kuat tekan modulus young dan sifat fisik lain menggunakan alat FG/SPAG 01/2650 *Texture Analyser*.

2.4 Bahan Pembuatan *Edible Film*

2.4.1 *Kappa Dan Iota Karaginan*

Kappa-karaginan merupakan polisakarida yang tersusun dari D-galaktosa-4sulfat dengan ikatan 1,3 dan 3,6-anhidrous-galaktosa dengan ikatan atom C 1,4. *Kappa*-karaginan dari algae laut terbentuk dari mu-karaginan dengan cara menghilangkan sulfat pada atom C-6 dalam galaktosa 6-sulfat dengan ikatan atom C1,4 dan membentuk 3,6-anhidrous-galaktosa. Reaksi pembentukan *kappa*-karaginan dari mu-karaginan dapat dilakukan dengan cara menghilangkan sebagian gugus sulfat (OSO^{3-}) dengan menggunakan borohidrida dalam kondisi alkali. Di samping menggunakan bahan kimia, gugus sulfat dapat pula dihilangkan dengan aktivitas enzim dekinase pada atom C 6 dari mu-karaginan menjadi 3,6 anhidrous-galaktosa pada *kappa*-karaginan (Basmal *et al.*, 2003).

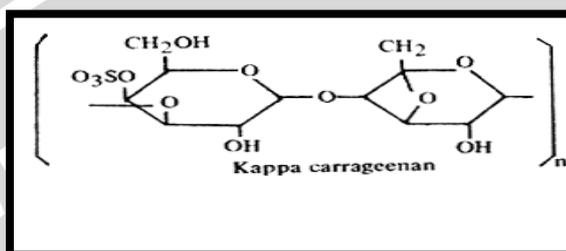
Menurut Sirat dan Sukei (2012), karaginan merupakan suatu zat dengan sifat hidrokoloid yang disebabkan oleh adanya ester galaktosa dari natrium, kalium, magnesium, dan kalsium sulfat dan unit 3,6-anhidrogalaktosa. Karaginan

merupakan senyawa yang berukuran besar, molekul yang fleksibel yang dapat membentuk struktur helix. Karaginan secara luas digunakan pada makanan dan industri-industri lain sebagai pengental dan stabilisator. Kebanyakan karaginan yang digunakan sebagai pengental diekstrak dari rumput laut jenis *Kappaphycus alvarezii* (*Eucheuma cottonii*) dan *Eucheuma spinosum* ke dalam air atau alkali encer dan diakhiri oleh pengendapan dengan alkohol. *Kappaphycus alvarezii* atau yang biasa disebut dengan *Eucheuma cottonii* merupakan salah satu jenis rumput laut (alga) merah yang banyak dikembangkan di daerah tropis seperti Indonesia.

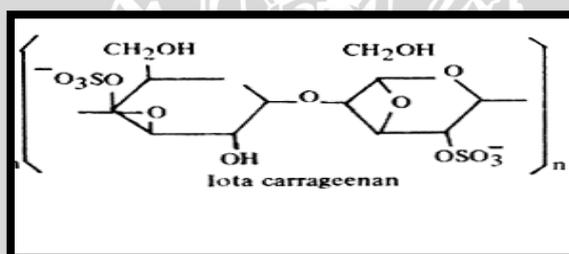
Menurut Diova *et al.* (2013), karaginan dari rumput laut *E. cottonii* yang merupakan jenis kappa karaginan, berpotensi untuk dikembangkan sebagai *edible film* karena sifatnya dapat membentuk gel, bersifat stabil, dapat dimakan dan dapat diperbarui serta banyak mengandung serat. Selain itu juga tidak terlepas dari tingginya produksi rumput laut terutama *E. cottonii* dalam negeri yang dapat diolah menjadi *semirefined* karaginan. Pemanfaatan *semirefined* karaginan menjadi *edible film* diharapkan mampu mendorong berkembangnya sektor pengolahan karaginan di dalam negeri. Selain itu juga karaginan tersedia secara luas, harganya relatif murah dan tidak toksik atau beracun.

Menurut Basmal *et al.* (2003), jenis rumput laut penghasil kappa-karaginan yang banyak terdapat di perairan Indonesia dan telah dibudidayakan secara masal adalah rumput laut jenis *Eucheuma cottonii*. Berdasarkan struktur kimianya karaginan dapat dibagi menjadi: kappa, iota, dan lambda karaginan. Adanya intrusi kation ke dalam masing-masing karaginan tersebut akan mempengaruhi kekuatan gel seperti kappa-karaginan dengan adanya kation K^+ cenderung membentuk gel yang kuat, iota dengan adanya kation Ca^{2+} gel sangat kuat, sedangkan pada lambda karaginan tidak membentuk gel apabila

ditambahkan kation. Pembentukan gel pada hidrokolloid dapat dilakukan dengan meningkatkan atau memperbesar gaya antar molekul terlarut dengan cara: menambahkan bahan yang tidak melarutkan koloid, menguapkan zat pelarut dan menambahkan bahan pengikat atau pengatur reaksi kimia yang bertujuan untuk mengurangi kelarutan koloid. Untuk lebih jelasnya tentang struktur kimia kappa dan iota karagenan dapat dilihat pada Gambar 2 dan Gambar 3.



Gambar 2. Struktur Kimia *Kappa* Karagenan.



Gambar 3. Struktur Kimia *Iota* Karagenan.

2.4.1.1 *Eucheuma cottonii*

Salah satu bahan baku pangan yang mengandung kadar iodium dan serat tinggi adalah rumput laut. Menurut Winarno (1996), kandungan iodium pada rumput laut yaitu 0.1-0.8 % pada ganggang coklat dan 0.1-0.15% pada ganggang merah. Ditambahkan oleh Astawan *et al.* (2004), mengingat demikian pentingnya peranan iodium dan serat pangan, dalam upaya menuntaskan masalah GAKI dan mencegah meluasnya penyakit degeneratif akibat rendahnya mengkonsumsi dietary fiber, maka perlu diupayakan pemanfaatan rumput laut secara optimal, yaitu melalui pendekatan ketersediaan dan konsumsi pangan (*food based approach*).

Penelitian tentang manfaat rumput laut terutama jenis *Eucheuma cottonii* telah banyak dilakukan. Rumput laut telah teridentifikasi dapat meningkatkan daya tahan tubuh, anti kanker, mencegah penuaan dini, menjaga kehalusan kulit. Selain itu, rumput laut juga teridentifikasi mengandung senyawa antioksidan. Antioksidan adalah zat yang dapat menunda, memperlambat, dan mencegah terjadinya proses oksidasi. Antioksidan sangat bermanfaat bagi kesehatan dan berperan penting untuk mempertahankan mutu produk pangan. Manfaat antioksidan bagi kesehatan dan kecantikan, misalnya untuk mencegah penyakit kanker dan tumor, penyempitan pembuluh darah, penuaan dini, dan lain-lain. Antioksidan yang berasal dari sumber alam dapat meningkatkan ketahanan makanan. Oleh karena itu, konsumsi antioksidan dan penambahan antioksidan pada bahan makanan melindungi tubuh dengan baik dari bahan reaktif oksidatif (Sirat dan Sukei, 2012).

Eucheuma cottonii dapat diekstrak untuk menghasilkan karaginan, dengan perlakuan alkali dan metoda proses yang berbeda. *Eucheuma cottonii* akan menghasilkan tipe kappa-caragenan, dengan sifat gel yang keras dan kokoh. Salah satu metoda proses yang umum digunakan untuk mengekstrak adalah metoda pemanasan dengan alkali (Setijawati *et al.*, 2011).

Berdasarkan klasifikasi taksonomi (Cholik *et al.*, 2005), *Eucheuma cottonii* digolongkan ke dalam :

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Rhodophyta
Kelas	: Rhodophyceae
Bangsa	: Gigartinales
Suku	: Solierisceae
Marga	: Eucheuma
Jenis	: <i>Eucheuma cottonii</i> (<i>Kappaphycus alvarezii</i>)

Untuk lebih jelasnya mengenai rumput laut jenis *Eucheuma cottonii* ini dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. *Eucheuma cottonii*.

2.1.2 *Eucheuma spinosum*

Eucheuma spinosum merupakan *algae* makro benthik yang dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan tepung agar-agar, keraginan dan alginat. Bahan baku tersebut dimanfaatkan dalam industri tekstil, kosmetik, dan makanan. Luasnya pemanfaatan hasil olahan rumput laut dalam berbagai industri, mengakibatkan peningkatan kebutuhan *Eucheuma spinosum*. Budidaya *Eucheuma spinosum* yang sudah dilakukan oleh pembudidaya adalah menggunakan metode rakit apung (*floating raft method*), metode lepas dasar (*off bottom method*) dan metode rawai (*long line method*) (Farnani *et al.*, 2013).

Eucheuma spinosum merupakan rumput laut telah dibudidayakan di Indonesia. Rumput laut dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan tepung agar-agar, keraginan dan alginat. Agar-agar, karaginan dan algin (alginat) banyak dimanfaatkan dalam industri tekstil, kosmetik, dan lain-lain. Fungsi utamanya adalah sebagai bahan pemantap, bahan pengemulsi, bahan pengental, bahan pengisi dan bahan pembuat gel (Farnani *et al.*, 2013). Adapun klasifikasi *Eucheuma spinosum* menurut Cholik *et al.* (2005), adalah sebagai berikut:

Phylum : Hallophyta
Kelas : Rhodophyceae
Ordo : Gigartinales
Familia : Soliriaceae
Genus : *Eucheuma*
Spesies : *E. spinosum*.

Untuk lebih jelasnya mengenai rumput laut jenis *Eucheuma spinosum* dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. *Eucheuma spinosum*.

2.5 Pengujian *Edible Film*

2.5.1 Kadar Air

Penentuan kadar air menurut Sudarmadji *et al.* (2003) sebagai berikut, sampel seberat 3 gram dimasukkan kedalam cawan alumunium. Kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 4-6 jam. Setelah itu sampel yang kering ditimbang lalu dihitung berat konstannya dan didapatkan hasil kadar air. Adapun rumus perhitungan kadar air adalah sebagai berikut:

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{bobot sampel awal (g)} - \text{bobot sampel akhir (g)}}{\text{bobot sampel (g)}} \times 100\%$$

2.5.2 Transmisi Uap Air

Menurut Tamaella dan Lewerissa (2007), laju transmisi uap air didefinisikan sebagai laju aliran uap air melalui suatu unit area pada waktu tertentu dan pada kondisi tertentu. Pengukuran nilai laju transmisi uap air suatu

bahan merupakan faktor yang penting dalam menilai permeabilitas bahan kemasan *edible film* terhadap air. Nilai laju transmisi uap air dapat digunakan untuk mengetahui permeabilitas *film* terhadap uap air atau kemampuan *film* dalam menghambat uap air (Handito, 2011). Menurut Amaliya dan Putri (2014), analisis laju transmisi uap air dilakukan dengan cara *edible film* dipotong berdiameter ± 5 cm dan diletakkan diantara dua wadah (minuman gelas). Wadah 1 diisi air dan wadah ke 2 diisi dengan silika gel yang telah diketahui beratnya (konstan). Kemudian dibiarkan selama 1 jam dan transmisi uap air dihitung dengan rumus:

$$\text{Transmisi uap air} = \frac{W}{A}$$

Dimana: W = perubahan berat
 A = luas area *film* (cm²).

2.5.3 Tensile Strength

Tensile strength merupakan nilai hasil pengujian kekuatan (daya tahan) maksimum *film* setelah diberikan gaya tarik agar merenggang sampai putus (Handito, 2011). Menurut Amaliya dan Putri (2014), analisis *tensile strength* dan *elongasi* dilakukan dengan menggunakan alat Imada *Force Measurement* tipe ZP-200N. Dengan mengikuti prosedur kerja alat maka akan mendapatkan data untuk *tensile strength* dan *elongasi edible film*. Dari alat tersebut akan didapatkan data untuk gaya (*force*) yang diperlukan untuk memutuskan *edible film* dan perpanjangan *edible film* sampai *edible film* tersebut putus. Berikut ini adalah rumus untuk menghitung *tensile strength* dan *elongasi edible film*:

$$\text{Tensile strength (N/cm}^2\text{)} = \frac{\text{Gaya}}{\text{Satuan luas (cm}^2\text{)}}$$

2.5.4 Elongasi

Elongasi merupakan nilai hasil pengujian kemampuan *film* untuk melakukan perpanjangan (elastisitas) (Handito, 2011). Adapun rumus untuk

menghitung nilai *elongasi edible film* menurut Amaliya dan Putri (2014), adalah sebagai berikut:

$$\text{Elongasi (\%)} = \frac{\text{Perpanjangan edible film (cm)}}{\text{Panjang awal edible film}} \times 100\%$$

2.5.5 Ketebalan

Pengukuran ketebalan *edible film* diukur dengan menggunakan *hand micrometer* dengan ketelitian 0,01 mm pada beberapa titik, kemudian dirata – rata. Ketebalan *film* dinyatakan dalam satuan *micrometer* (μm). Pengukuran ketebalan digunakan untuk menghitung kekuatan renggang putus Pranoto (2007).

Menurut Amaliya dan Putri (2014), ketebalan *edible film* diukur dengan menggunakan mikrometer pada 5 tempat yang berbeda. Kemudian hasil pengukuran dirata – rata sebagai hasil ketebalan *edible film*. Ketebalan dinyatakan dalam mm sedangkan mikrometer yang digunakan memiliki ketelitian 0,01 mm.

2.5.6 Perhitungan *Total Plate Count Lactobacillus acidophilus* pada *Edible Film*

Metode yang digunakan untuk menghitung jumlah total koloni *Lactobacillus acidophilus* adalah dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC). Cara perhitungan TPC menurut Fardiaz (1988), adalah sebagai berikut:

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

Hasil analisa mikrobiologi dengan cara hitungan cawan digunakan suatu standar yang disebut “*Standard Plate Counts*” (SPC) sebagai berikut:

1. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30 dan 300.

2. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan satu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloninya diragukan dapat dihitung sebagai satu koloni.
3. Satu deretan rantai yang terlihat sebagai suatu garis tebal dihitung sebagai satu koloni.

2.6 Standar *Edible Film*

Persyaratan mutu *edible film* sebagai sediaan farmasi belum ditetapkan, oleh karena itu dalam penelitian ini digunakan uji mutu sediaan *edible film* di pasaran sebagai acuannya. Setelah masing-masing respon diplot contour, ditentukan batas maksimum dan minimum dari respon yang diinginkan, berdasarkan persyaratan SNI (Standard Nasional Indonesia) dan hasil pengukuran sediaan dipasaran sebagai pembandingan. Untuk lebih jelasnya tentang standar *edible film* secara umum dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Menurut Amaliya dan Putri (2014), tentang standar *edible film* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Standar *Edible Film* Komersil

Grade	Tensile Strength (N/cm ²)	Elongasi (%)	Transmisi Uap Air (g/cm ² jam)
1	20 min	1000 min	0,1 maks
2	15 min	700 min	0,15 maks
3	10 min	500 min	0,2 maks
4	7,0 min	300 min	0,3 maks
5	5,0 min	100 min	0,5 maks
6	4,0 min	70 min	0,7 maks
7	3,0 min	50 min	1,0 maks
8	2,0 min	30 min	1,5 maks
9	1,5 min	20 min	2,0 maks
10	1,0 min	10 min	2,5 maks
11	0,7 min	5 min	3,0 maks
12	0,5 min	-	4,0 maks
13	0,3 min	-	5,0 maks
14	0,2 min	-	10,0 maks
15	0,1 min	-	20,0 maks

Sumber: Amaliya dan Putri (2014).

Tabel 2. Standar Edible Film

Jenis Standar <i>Edible Film</i>	Standar
Waktu pengeringan di oven pada suhu 40 – 45°C	40 – 72 jam
Kadar air	dibawah 20%
Ketebalan	0,1 – 0,20 cm
Waktu hancur	0,5 – 0,8 menit
Perpanjangan	1 – 1,08 cm

Sumber: Arifin *et al.* (2009).



3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan terdiri dari bahan pembuatan karagenan, *edible film* bahan kultur bakteri dan bahan uji. Bahan untuk pembuatan karagenan antara lain: rumput laut *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum*, KOH 6%, Ca(OH)_2 6%, KCl 1,5%, CaCl₂, aquades, air tawar, *tissue*, koran, kertas label. Bahan untuk pembuatan *edible film* terdiri dari karagenan *mix kappa* dan *iota*, *aquades*, bakteri *Lactobacillus acidophilus*, kertas label, *tissue*, plastik dan air tawar. Bahan yang digunakan dalam proses kultur bakteri antara lain yaitu media MRSA, *aquades*, *tissue*, kertas label, air bersih. Sedangkan bahan untuk pengujian terdiri dari media MRSA, *aquades*, Na fisiologis, kertas label, plastik, air tawar.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari alat proses penelitian dan alat analisa. Alat untuk proses penelitian dibedakan menjadi 3 bagian yaitu alat proses pembuatan karagenan, alat proses pembuatan *edible film* dan alat untuk kultur bakteri. Alat yang digunakan dalam proses pembuatan karagenan antara lain yaitu: baskom, timbangan digital, *beaker glass* 500 ml, *beaker glass* 1000 ml, *waterbath*, *blender*, *spatula*, nampan, sarung tangan, sendok, *oven*, saringan, mekatronik. Alat yang digunakan dalam proses pembuatan *edible film* antara lain: *beaker glass* 500 ml, gelas ukur 100 ml, erlenmeyer 100 ml, timbangan digital, sendok, *magnetic stirrer*, *waterbath*, nampan, *oven*. Sedangkan alat yang digunakan untuk kultur bakteri antara lain: cawan petri, *Bunsen*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, erlenmeyer 250 ml, *autoklaf*, *incase*, *pipet volume* 100 ml.

Alat yang digunakan untuk analisa antara lain: kaca preparat, *cover glass*, silet, gunting. Peralatan untuk uji jumlah total bakteri antara lain: *Bunsen*, cawan petri, *autoklaf, incase, colony counter*, rak tabung reaksi, tabung reaksi, pipet serologis 1 ml, mortar dan alu, spatula, timbangan analitik.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Metode

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen adalah suatu cara atau langkah – langkah yang digunakan peneliti untuk mencari sebab akibat antara dua faktor yang sengaja ditimbulkan oleh peneliti tersebut untuk mengeliminasi atau mengurangi faktor – faktor yang dapat mengganggu. Kemudian untuk mengetahui seberapa besar hubungan sebab akibat tersebut dilakukan dengan cara memberikan perlakuan – perlakuan tertentu pada kelompok percobaan.

3.2.2 Variabel

Variabel – variabel penelitian merupakan gambaran sifat suatu benda dari obyek penelitian dengan bermacam-macam nilai. Variabel dibedakan menjadi 2 antara lain variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas adalah variabel yang dipilih sebagai variabel yang sengaja dipelajari pengaruhnya terhadap variabel terikat, sedangkan variabel terikat adalah variabel yang menjadi pusat percobaan (Nasir, 1988).

Penelitian ini menggunakan variabel bebas meliputi konsentrasi probiotik *Lactobacillus acidophilus*, sedangkan variabel terikatnya adalah proses pembuatan *edible film* dari *kappa* dan *iota* karagenan. Dengan parameter uji meliputi uji mikrobiologi, uji kimia dan uji fisika. Uji mikrobiologi terdiri dari perhitungan total *Lactobacillus acidophilus*. Uji fisika terdiri dari uji perpanjangan,

daya tarik dan uji ketebalan. Sedangkan uji kimia meliputi uji transmisi uap air, uji kelarutan dan uji kadar air.

3.3 Rangkaian Penelitian

3.3.1 Penelitian Pendahuluan

3.3.1.1 Perlakuan dan Rancangan Percobaan

Pada penelitian pendahuluan ini meliputi pembuatan karagenan dari rumput laut kering jenis *Eucheuma cottoni*, *Eucheuma spinosum* dan pembuatan *edible film*. Dengan variasi konsentrasi karagenan pada *edible film* yaitu A_1 (1 : 3); A_2 (1 : 1) dan A_3 (3 : 1). Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Formulasi *edible film kappa* dan *iota* karagenan pada penelitian pendahuluan

Perlakuan (<i>Kappa</i> : <i>Iota</i>)	Formulasi		
	<i>Kappa</i> (gram)	<i>Iota</i> (gram)	<i>Aquades</i> (ml)
(A1) 1 : 3	0,5	1,5	100
(A2) 1 : 1	1	1	100
(A3) 3 : 1	1,5	0,5	100

Sedangkan rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana, menurut Sasrosupadi (2000), RAL yaitu rancangan yang digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau *homogen*, sehingga banyak digunakan untuk percobaan di laboratorium, rumah kaca dan peternakan. Dengan model umum untuk RAL adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}; \begin{matrix} i = 1, 2, \dots, t \\ j = 1, 2, \dots, r \end{matrix}$$

Keterangan:

- Y_{ij} = nilai pengamatan pada perlakuan ke- i dan ulangan ke- j
- μ = nilai tengah umum
- T_i = pengaruh perlakuan ke- i
- ϵ_{ij} = pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke- i dan ulangan ke- j .

Adapun banyaknya ulangan pada penelitian pendahuluan ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\begin{aligned}
 \text{Rumus ulangan} &\longrightarrow (n - 1) (r - 1) \geq 15 \\
 &(5 - 1) (r - 1) \geq 15 \\
 &4 (r - 1) \geq 15 \\
 &4r - 4 \geq 15 \\
 &4r \geq 15 + 4 \\
 &r \geq 19/4 \\
 &r \geq 4,75.
 \end{aligned}$$

Keterangan:

n = perlakuan
r = ulangan.

Jadi, dari hasil perhitungan tersebut dapat diketahui bahwa jumlah ulangan pada penelitian pendahuluan sebanyak 4,75 ulangan atau jika dibulatkan menjadi 5 ulangan. Untuk lebih jelasnya mengenai jumlah ulangan pada penelitian pendahuluan ini dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Rancangan Desain pada Penelitian Pendahuluan

Perlakuan (A)	Ulangan					Total	Rerata
	1	2	3	4	5		
(A ₁)							
(A ₂)							
(A ₃)							
(A ₄)							
(A ₅)							

Keterangan:

- A₁ : Perbandingan karaginan 1 : 3 (kappa 0,5 gram : iota 1,5 gram).
- A₂ : Perbandingan karaginan 2 : 2 (kappa 1 gram : iota 1 gram).
- A₃ : Perbandingan karaginan 3 : 1 (kappa 1,5 gram : iota 0,5 gram).
- A₄ : Perbandingan karaginan 4 : 0 (kappa 2 gram : iota 0 gram).
- A₅ : Perbandingan karaginan 0 : 4 (kappa 0 gram : iota 2 gram).

3.3.1.2 Prosedur Kerja Penelitian Pendahuluan

Prosedur kerja penelitian pendahuluan terdiri dari pembuatan karagenan dan pembuatan *edible film mix kappa* dan *iota* karaginan. Pembuatan karagenan *Eucheuma cottonii* didasarkan pada metode penelitian Hernandez (2013), yang termodifikasi, yang telah dimodifikasi yaitu, pertama-tama rumput laut jenis dari *E. cottonii* ditimbang sebanyak 20 gram lalu dicuci bersih. Kemudian ditambahkan air dengan perbandingan 1:25 (b/v), lalu dipanaskan pada suhu 80⁰ – 90⁰ C selama 30 menit dengan menggunakan *waterbath*. Rumput laut yang telah dipanaskan, diblender selama 1 menit hingga menjadi pasta dan dilanjutkan

dengan ekstraksi. Rumput laut jenis *E. cottoni* dipanaskan dengan suhu 80°C selama 2 jam dengan penambahan KOH 6%. Hasil ekstraksi kemudian dinetralkan dengan HCl 0,2 N, penetralan HCl 0,2 N kemudian disaring dengan menggunakan kain saring hingga didapatkan residu dan filtrat. Filtrat tersebut ditambahkan dengan KCl 1,5% kemudian dibekukan. Setelah beku kemudian dikeringkan dan digiling sampai menjadi serbuk dan didapatkan *Refine carrageenan*. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Lampiran tentang skema kerja pembuatan karagenan.

Menurut Phillips dan Williams (2001), pembuatan karagenin *Eucheuma spinosum* dengan metode PNG terdiri dari beberapa tahapan. Pertama – tama rumput laut kering jenis *Eucheuma spinosum* ditimbang sebanyak 50 gram. Kemudian ditambahkan air dengan perbandingan 1 : 10 yaitu sebanyak 1.000 ml. Setelah itu, diekstraksi dengan KOH 6% atau sebanyak 30 gram. Hasil ekstraksi kemudian dicuci dengan air tawar bersih dan dipotong agar mempercepat proses pengeringan. Selanjutnya dilakukan pemucatan warna, dan dilakukan pencucian kembali dengan air tawar hingga bersih. Hasil cucian kemudian dikeringkan dengan sinar matahari selama 2 sampai 3 hari. Kemudian dilakukan penggilingan sampai menjadi serbuk dan didapatkan *semi-refine* karagenin.

Sedangkan prosedur pembuatan *edible film* didasarkan pada penelitian Tamaela dan Lewerissa (2007) yaitu, pertama *kappa* dan *iota* karagenin ditimbang sebanyak 2 gram. Kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan ditambahkan 100 ml *aquades*. Selanjutnya dipanaskan di atas *hot plate stirrer* dengan suhu 85°C selama 30 menit atau sampai homogen. Saat dipanaskan, larutan ditambahkan gliserol sebagai *plasticizer* sebanyak 1 ml. Setelah homogen, larutan dicetak pada *plat plastic* dan dikeringkan selama 24 sampai 36

jam dengan suhu 55°C. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Lampiran tentang skema kerja pembuatan *edible film*.

3.3.2 Penelitian Utama

3.3.2.1 Perlakuan dan Rancangan Percobaan

Prosedur penelitian utama ini meliputi pembuatan *edible film kappa* dan *iota* karagenan dengan penambahan konsentrasi bakteri *Lactobacillus acidophilus*. Formulasi pembuatan *edible film* pada penelitian utama didasarkan dari hasil terbaik pada penelitian pendahuluan dan dari penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Maria Apriliani Ariesty, dengan konsentrasi *mix kappa*, *iota* karaginan sebanyak 2 gram yang terdiri dari 1,5 gram *kappa* karaginan dan 0,5 gram *iota* karaginan. Sedangkan rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian utama adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana dengan jumlah variabel bebas sebanyak satu yaitu konsentrasi probiotik *Lactobacillus acidophilus*. Dengan model umum untuk RAL menurut Sasrosupadi (2000), adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}; \begin{matrix} i = 1, 2, \dots, t \\ j = 1, 2, \dots, r \end{matrix}$$

Keterangan:

Y_{ij} = nilai pengamatan pada perlakuan ke- i dan ulangan ke- j

μ = nilai tengah umum

T_i = pengaruh perlakuan ke- i

ϵ_{ij} = pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke- i dan ulangan ke- j .

Data hasil penelitian kemudian dianalisis dengan menggunakan *Analisis of Variance* (ANOVA). Selanjutnya hasil analisis keragaman (sidik ragam) yang menunjukkan adanya pengaruh nyata/sangat nyata maka dilanjutkan dengan perhitungan BNT 5%.

Adapun jumlah ulangan pada penelitian utama dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\begin{aligned} \text{Rumus ulangan} \longrightarrow & (n - 1) (r - 1) \geq 15 \\ & (5 - 1) (r - 1) \geq 15 \\ & 4 (r - 1) \geq 15 \\ & r \geq 5. \end{aligned}$$

Keterangan:

n = perlakuan
r = ulangan.

Dari hasil perhitungan tersebut, maka dapat diketahui bahwa jumlah ulangan pada penelitian utama sebanyak 4 kali ulangan. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Rancangan Desain Penelitian Utama

Perlakuan (A)	Ulangan				Total	Rerata
	1	2	3	4		
A ₁						
A ₂						
A ₃						
A ₄						
A ₅						
A ₆						

Keterangan:

- A₁ : Konsentrasi probiotik 0% terhadap 100 ml *aquades*.
- A₂ : Konsentrasi probiotik 1% terhadap 100 ml *aquades*.
- A₃ : Konsentrasi probiotik 2% terhadap 100 ml *aquades*.
- A₄ : Konsentrasi probiotik 3% terhadap 100 ml *aquades*.
- A₅ : Konsentrasi probiotik 4% terhadap 100 ml *aquades*.
- A₆ : Konsentrasi probiotik 5% terhadap 100 ml *aquades*.

3.3.2.2 Prosedur Penelitian Utama

Prosedur penelitian utama terdiri dari kultur bakteri *Lactobacillus acidophilus* dan pembuatan *edible film mix kappa* dan *iota* karaginan. Kultur *L. acidophilus* berdasarkan penelitian Setijawati *et al.* (2011), adalah sebagai berikut, kultur *L. acidophilus* kering ditumbuhkan dalam 10 mL media MRS *borth steril*, kemudian *L. acidophilus* diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Setelah itu biakan dari media MRS *borth* digoreskan pada media kemudian diinkubasi kembali pada suhu 30°C selama 24 jam. Selanjutnya ditumbuhkan kembali dalam 10 mL media MRS *borth steril* lalu diinkubasi kembali pada suhu 30°C selama 24 jam. Hasil inkubasi dihitung kepadatan bakterinya dengan OD

pada 620 nm menggunakan *spektrofotometer* dan didapatkan biakan bakteri *L. acidophilus*.

Prosedur pembuatan *edible film* didasarkan pada metode penelitian Tamaela dan Lewerissa (2007) yang dimodifikasi, yaitu dengan penambahan probiotik *Lactobacillus acidophilus*. Pertama *kappa* dan *iota* karaginan ditimbang sebanyak 2 gram. Kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan ditambahkan 100 ml *aquades*. Selanjutnya dipanaskan di atas *hot plate stirrer* dengan suhu 85°C selama 30 menit atau sampai homogen. Saat dipanaskan, larutan ditambahkan gliserol sebanyak 1 ml sebagai *plasticizer*. Setelah homogen, suhu diturunkan menjadi 40°C dan ditambahkan probiotik *Lactobacillus acidophilus* dengan konsentrasi berbeda pada masing – masing perlakuan yaitu 0%; 1%; 2%; 3%; 4% dan 5% (0 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml dan 5 ml). Kemudian larutan dicetak pada *plat plastic* dan dikeringkan selama 6 sampai 8 jam dengan suhu 40°C. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Lampiran tentang skema kerja penelitian utama.

3.4 Prosedur Analisis Parameter Uji

3.4.1 Prosedur Analisis Kimia

3.4.1.1 Analisis Laju Transmisi Uap Air (Amaliya dan Putri, 2014)

Analisis laju transmisi uap air dilakukan dengan cara *edible film* dipotong berdiameter ± 5 cm dan diletakkan diantara dua wadah (minuman gelas). Wadah 1 diisi air dan wadah ke 2 diisi dengan silika gel yang telah diketahui beratnya (konstan). Kemudian didiamkan selama 1 jam dan transmisi uap air dihitung dengan rumus:

$$\text{Transmisi uap air} = \frac{W}{A}$$

Dimana: W = perubahan berat
 A = luas area *film* (cm²).

3.4.1.2 Analisis Kadar Air (Sudarmadji *et al.*, 2003)

Penentuan kadar air menurut Sudarmadji *et al.* (2003) sebagai berikut, sampel seberat 3 gram dimasukkan kedalam cawan alumunium. Kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105^oC selama 4-6 jam. Setelah itu sampel yang kering ditimbang lalu dihitung berat konstannya dan didapatkan hasil kadar air.

Rumus perhitungan kadar air menurut Sudarmadji *et al.* (2003), adalah sebagai berikut:

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{bobot sampel awal (g)} - \text{bobot sampel akhir (g)}}{\text{bobot sampel (g)}} \times 100\%$$

3.4.2 Prosedur Analisis Fisika

3.4.2.1 Analisis *Tensile Strength* dan *Elongasi* (Amaliya dan Putri, 2014)

Analisis *tensile strength* dan *elongasi* dilakukan dengan menggunakan alat Imada *Force Measurement* tipe ZP-200N. Dengan mengikuti prosedur kerja alat maka akan mendapatkan data untuk *tensile strength* dan *elongasi edible film*. Dari alat tersebut akan didapatkan data untuk gaya (*force*) yang diperlukan untuk memutuskan *edible film* dan perpanjangan *edible film* sampai *edible film* tersebut putus. Berikut ini adalah rumus untuk menghitung *tensile strength* dan *elongasi edible film*:

$$\text{Tensile strength (N/cm}^2\text{)} = \frac{\text{Gaya}}{\text{Satuan luas (cm}^2\text{)}}$$

$$\text{Elongasi (\%)} = \frac{\text{Perpanjangan edible film (cm)}}{\text{Panjang awal edible film}} \times 100\%$$

3.4.2.2 Pengukuran Ketebalan (Pranoto, 2007)

Pengukuran ketebalan *edible film* diukur dengan menggunakan *hand micrometer* dengan ketelitian 0,01 mm pada beberapa titik, kemudian dirata – rata. Ketebalan *film* dinyatakan dalam satuan *micrometer* (µm). Pengukuran ketebalan digunakan untuk menghitung kekuatan renggang putus.

3.4.3 Prosedur Analisis Mikrobiologi

3.4.3.1 Analisis *Total Plate Count Lactobacillus acidophilus* (Srianta et al., 2007)

Cara perhitungan total koloni *Lactobacillus acidophilus* dilakukan dengan menggunakan media MRS Agar metoda tuang dengan seri pengenceran. Pengujian total koloni *L. acidophilus* menurut Srianta et al. (2007) sebagai berikut:

- L. acidophilus* dituangkan ke dalam MRS Agar.
- Diinkubasi dengan suhu 37°C selama 48 jam.
- Setelah diinkubasi, dilanjutkan dengan perhitungan jumlah total bakteri.

Cara perhitungan TPC menurut Fardiaz (1988), adalah sebagai berikut:

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

Ditambahkan oleh Turkoglu et al. (2003), berdasarkan penelitiannya tentang mikroba, satuan untuk perhitungan TPC adalah log cfu/ml.

3.4.4 Analisa SEM (*Scanning Electron Microscope*)

Analisa SEM (*Scanning Electron Microscope*) pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui mikrostruktur sampel *edible film mix kappa iota* karaginan dengan penambahan probiotik *Lactobacillus acidophilus* pada perlakuan terbaik. Menurut Setiani et al. (2013), analisis morfologi terhadap penampang atas *film* bioplastik dilakukan dengan menggunakan SEM (*Scanning Electron Microscopy*) JEOL JSM-6360LA. Dengan cara sampel *edible film* ditempelkan pada *set holder* dengan perekat ganda, kemudian dilapisi dengan logam emas dalam keadaan vakum. Setelah itu, sampel dimasukkan pada tempatnya di dalam SEM, kemudian Gambar topografi diamati dan dilakukan perbesaran 5000 kali. Adapun prosedur analisa SEM (*Scanning Electron Microscope*) dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.4.5 Pewarnaan Gram

Metode pewarnaan gram merupakan suatu pewarnaan diferensial yang mengelompokkan bakteri menjadi gram positif dan gram negatif bergantung kepada kemampuan bakteri yang bersangkutan untuk menahan pewarna primer (ungu kristal) ketika mengalami perlakuan dengan bahan pemucat (Pelezar dan Chan, 2009). Untuk lebih jelasnya mengenai prosedur pewarnaan gram dapat dilihat pada Lampiran 17.

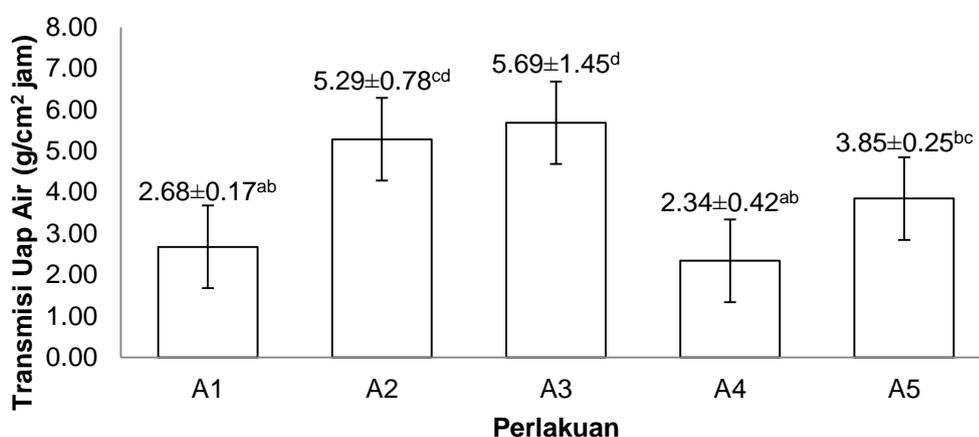


4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penelitian Pendahuluan

4.1.1 Transmisi Uap Air

Analisis sidik ragam pengaruh konsentrasi *kappa* dan *iota* karaginan yang berbeda terhadap nilai laju transmisi uap air (Lampiran 6) menunjukkan hasil yang berbeda sangat nyata. Untuk lebih jelasnya mengenai hasil uji transmisi uap air dapat dilihat pada Tabel 6. Pengaruh konsentrasi *kappa* dan *iota* yang berbeda terhadap transmisi uap air dapat dilihat pada Gambar 6.

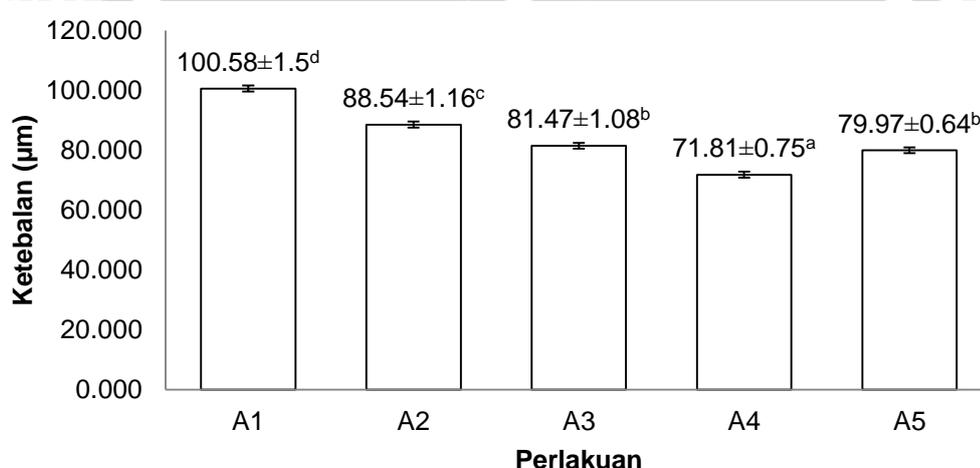


Gambar 6. Laju transmisi uap air pada penelitian pendahuluan.

Gambar 6. menunjukkan nilai transmisi uap air tertinggi sebesar 5.69 pada perlakuan A3 dengan konsentrasi *kappa* : *iota* adalah 3 : 1 (1.5 gram *kappa* : 0.5 gram *iota*). Sedangkan nilai transmisi uap air terendah sebesar 2.34 pada perlakuan A4 dengan konsentrasi *kappa* saja (2 gram *kappa*). Dari Gambar 6. dapat disimpulkan bahwa perbandingan *kappa* dan *iota* dengan konsentrasi yang berbeda dapat berpengaruh terhadap nilai transmisi uap air *edible film mix kappa iota* karaginan. Yaitu semakin tinggi konsentrasi *kappa* dan konsentrasi *iota* semakin kecil maka nilai transmisi uap air *edible film* semakin besar. Sedangkan semakin tinggi konsentrasi *iota* dan konsentrasi *kappa* semakin kecil maka nilai ketebalan *edible film* semakin kecil.

4.1.2 Ketebalan

Analisis sidik ragam pengaruh konsentrasi *kappa* dan *iota* karaginan yang berbeda terhadap ketebalan *edible film* (Lampiran 4) menunjukkan hasil yang berbeda sangat nyata. Untuk lebih jelasnya mengenai hasil uji ketebalan pada penelitian pendahuluan dapat dilihat pada Tabel 6. Pengaruh konsentrasi *kappa* dan *iota* karaginan yang berbeda terhadap ketebalan dapat dilihat pada Gambar 7.



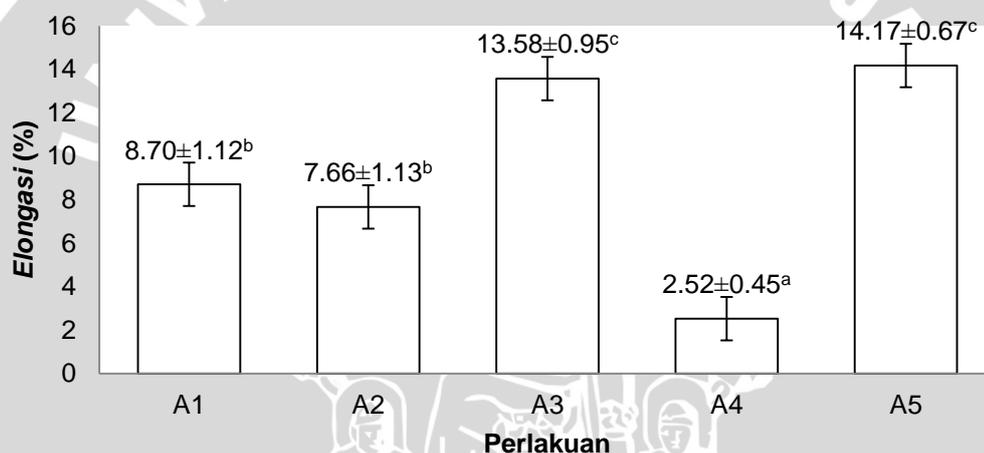
Gambar 7. Ketebalan *edible film* penelitian pendahuluan.

Gambar 7. menunjukkan nilai ketebalan tertinggi sebesar 100.58 µm pada perlakuan A1 dengan konsentrasi *kappa* : *iota* adalah 1 : 3 (1.5 gram *kappa* : 0.5 gram *iota*). Sedangkan nilai ketebalan terendah sebesar 71.81 µm pada perlakuan A4 dengan konsentrasi *kappa* saja (2 gram *kappa*). Dari Gambar 7. dapat disimpulkan bahwa perbandingan *kappa* dan *iota* dengan konsentrasi yang berbeda dapat berpengaruh terhadap ketebalan *edible film mix kappa iota* karaginan. Yaitu semakin tinggi konsentrasi *kappa* dan konsentrasi *iota* semakin kecil maka nilai ketebalan *edible film* semakin kecil. Sedangkan semakin tinggi konsentrasi *iota* dan konsentrasi *kappa* semakin kecil maka nilai ketebalan *edible film* semakin besar. Pada Gambar 7. hasil terendah bukan perlakuan A5 tetapi

perlakuan A4, hal ini diduga kurang meratanya cetakan *edible film* sehingga ketebalan *edible film* juga kurang merata.

4.1.3 Elongasi

Analisis sidik ragam pengaruh konsentrasi *kappa* dan *iota* karaginan yang berbeda terhadap *elongasi edible film mix kappa iota* karaginan (Lampiran 5) menunjukkan hasil yang berbeda sangat nyata. Untuk lebih jelasnya mengenai hasil uji *elongasi* dapat dilihat pada Tabel 6. Pengaruh konsentrasi *kappa* dan *iota* karaginan yang berbeda terhadap *elongasi edible film mix kappa* dan *iota* karaginan dapat dilihat pada Gambar 8.



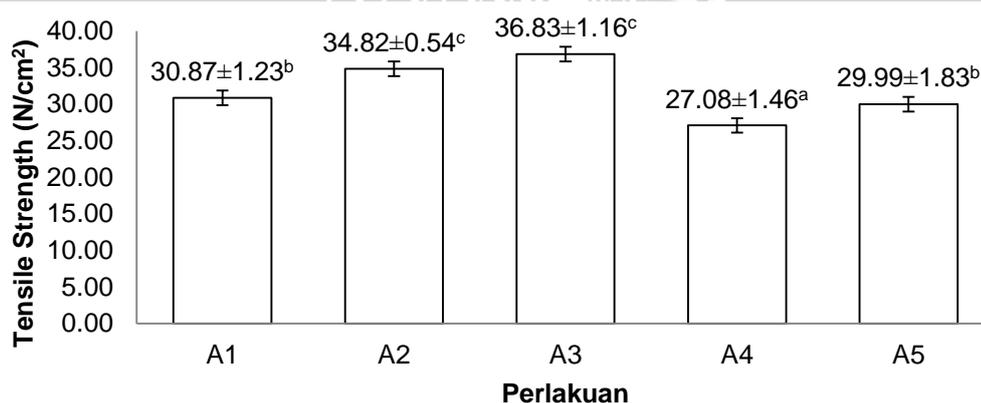
Gambar 8. Elongasi edible film penelitian pendahuluan.

Gambar 8. menunjukkan *elongasi* tertinggi sebesar 14.17 pada perlakuan A5 dengan konsentrasi *iota* saja (2 gram *iota*). Sedangkan *elongasi* terendah sebesar 2.52 pada perlakuan A4 dengan konsentrasi *kappa* saja (2 gram *kappa*). Sedangkan *edible film* untuk bahan *mix kappa iota* karaginan tertinggi pada perlakuan A3 dengan perbandingan *kappa* : *iota* adalah 3 : 1 (1,5 gram *kappa* : 0,5 gram *iota*). Hal ini dapat disimpulkan bahwa perbandingan bahan *kappa* dan *iota* dengan konsentrasi yang berbeda dapat mempengaruhi *elongasi* atau perpanjangan *edible film mix kappa* dan *iota* karaginan. Yaitu semakin tinggi konsentrasi *kappa* maka nilai *elongasinya* semakin kecil, sebaliknya semakin

tinggi konsentrasi *iota* maka nilai *elongasinya* semakin besar. Bahan dengan perbandingan 3 : 1 inilah yang dijadikan sebagai acuan untuk penelitian utama. Perlakuan A4 didapatkan hasil paling rendah karena ketebalan *edible film* juga paling rendah. Menurut Handito (2011), ketebalan *edible film* dapat berpengaruh pada nilai *elongasinya*. Selain itu menurut Basmal *et al.* (2003), kappa karaginan dengan adanya ion K^+ cenderung membentuk gel yang kuat namun *iota* karaginan dengan adanya ion Ca^+ membentuk gel yang sangat kuat, sehingga *edible film* dari bahan *iota* saja hasilnya lebih elastis dan nilai perpanjangannya lebih tinggi daripada *edible film* dari bahan kappa saja.

4.1.4 Tensile Strength

Analisis sidik ragam pengaruh konsentrasi *kappa* dan *iota* karaginan yang berbeda terhadap *tensile strength edible film mix kappa iota* karaginan (Lampiran 3) menunjukkan hasil yang berbeda sangat nyata. Untuk lebih jelasnya mengenai hasil uji *tensile strength* dapat dilihat pada Tabel 6. Pengaruh konsentrasi *kappa* dan *iota* yang berbeda terhadap *tensile strength edible film* dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. *Tensile strength edible film* penelitian pendahuluan.

Gambar 9. menunjukkan hasil uji *tensile strength* tertinggi sebesar 36.83 pada perlakuan A3 dengan konsentrasi *kappa* : *iota* adalah 3 : 1 (1.5 gram *kappa* : 0.5 gram *iota*). Sedangkan *tensile strength* terendah sebesar 27.08 pada

perlakuan A4 dengan konsentrasi *kappa* saja (2 gram *kappa*). Hasil ini menunjukkan bahwa perbandingan *kappa* dan *iota* dengan konsentrasi yang berbeda berpengaruh terhadap *tensile strength edible film mix kappa iota* karaginan. Yaitu semakin tinggi konsentrasi *kappa* nilai *tensile strength* semakin besar dan sebaliknya semakin rendah konsentrasi *kappa* nilai *tensile strength* semakin kecil. Sedangkan untuk konsentrasi *iota* berbanding terbalik yaitu semakin tinggi konsentrasi *iota* nilai *tensile strength* semakin kecil sedangkan semakin rendah konsentrasi *iota* nilai *tensile strength* semakin besar. Hal ini dapat disimpulkan bahwa perbandingan *kappa* dan *iota* terbaik pada perlakuan A3 yaitu 1.5 gram *kappa* dan 0.5 gram *iota* karena dari hasil analisis perlakuan tersebut didapatkan nilai rata – rata *tensile strength* terbesar. Pada perlakuan A4 diketahui nilainya paling rendah karena dipengaruhi oleh ketebalan *edible film* yang rendah. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Handito (2011), ketebalan *edible film* dapat berpengaruh pada nilai *tensile strength edible film*. Semakin tebal *edible film* akan menurunkan nilai *tensile strength* atau kekuatan tariknya.

Tabel 6. Hasil Penelitian Pendahuluan

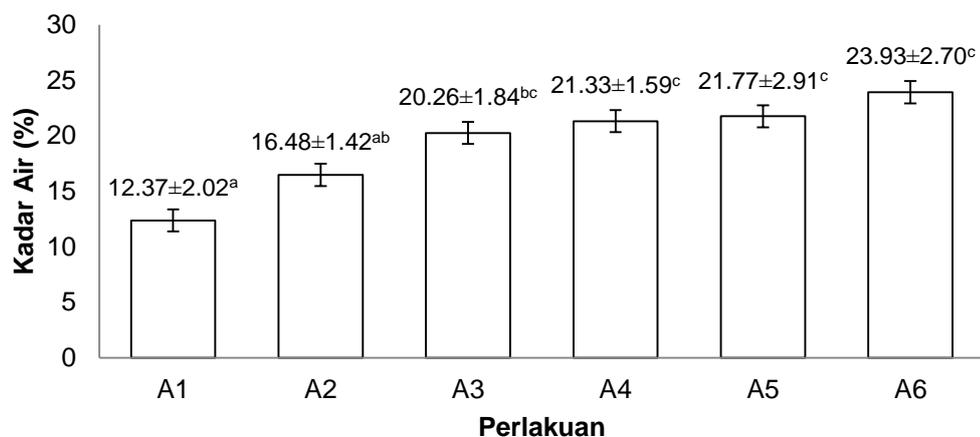
Perlakuan	Transmisi Uap Air (g/cm ² jam) (SD ± Rerata)	Ketebalan (µm) (SD ± Rerata)	Elongasi (%) (SD ± Rerata)	Tensile Strength (N/cm ²) (SD ± Rerata)
A1	(2.68 ± 0.17) ^{ab}	(100.58 ± 1.50) ^a	(8.70 ± 1.12) ^a	(30.87 ± 1.23) ^a
A2	(5.29 ± 0.78) ^{cd}	(88.54 ± 1.16) ^b	(7.66 ± 1.13) ^b	(34.82 ± 0.54) ^b
A3	(5.69 ± 1.45) ^d	(81.47 ± 1.08) ^b	(13.58 ± 0.95) ^b	(36.83 ± 1.16) ^b
A4	(2.34 ± 0.42) ^{ab}	(71.81 ± 0.75) ^c	(2.52 ± 0.45) ^c	(27.07 ± 1.46) ^c
A5	(3.85 ± 0.25) ^{bc}	(79.97 ± 0.64) ^d	(14.17 ± 0.67) ^c	(29.99 ± 1.83) ^c

Dari Tabel 6 dapat diketahui bahwa perlakuan A3 dengan konsentrasi *kappa* : *iota* yaitu 3 : 1 (1.5 *kappa* dan 0.5 *iota*) digunakan sebagai acuan untuk penelitian utama. Selain hasil tersebut, hasil terbaik penelitian yang telah dilakukan oleh Maria A. A. Wasa juga digunakan sebagai acuan yaitu perlakuan suhu 40^o selama 3 jam.

4.2 Penelitian Utama

4.2.1 Kadar Air

Analisis sidik ragam pengaruh penambahan konsentrasi probiotik *L. acidophilus* terhadap kadar air *edible film mix kappa iota* karaginan (Lampiran 11) menunjukkan hasil yang berbeda nyata. Pengaruh penambahan konsentrasi probiotik *L. acidophilus* terhadap ketebalan *edible film mix kappa iota* karaginan dapat dilihat pada Gambar 10.



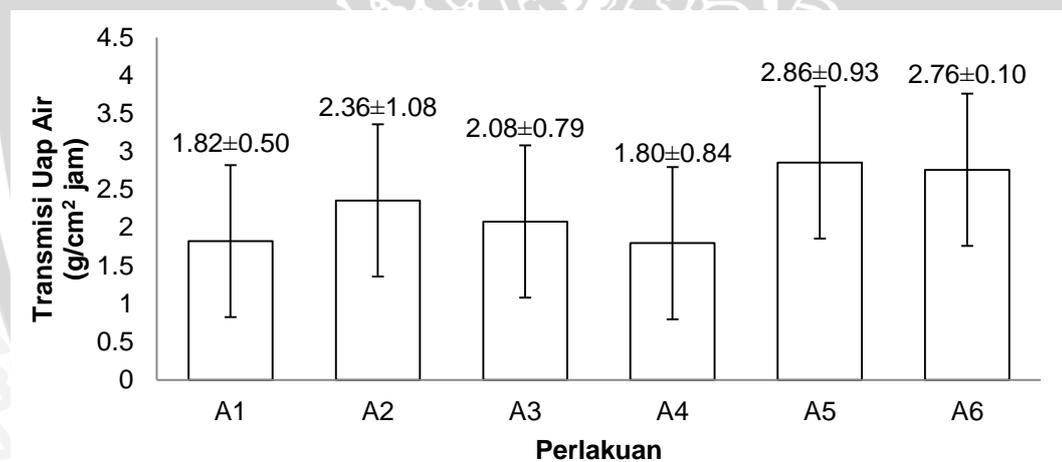
Gambar 10. Kadar air *edible film* dalam berbagai konsentrasi *L. acidophilus*.

Gambar 10. menunjukkan kadar air tertinggi sebesar 23,93% pada perlakuan A6 dengan konsentrasi probiotik 5%. Sedangkan kadar air terendah sebesar 12,37% pada perlakuan A1 dengan konsentrasi probiotik 0%. Hasil ini menunjukkan bahwa penambahan probiotik *L. acidophilus* dengan konsentrasi yang berbeda (0%, 1%, 2%, 3%, 4% dan 5%) dapat memberikan pengaruh terhadap kualitas kimia (kadar air) *edible film mix kappa iota* karaginan. Yaitu semakin tinggi konsentrasi probiotik *L. acidophilus* maka kadar air *edible film* juga semakin tinggi. Dan sebaliknya, semakin rendah konsentrasi probiotik *L. acidophilus* maka kadar air *edible film* semakin rendah. Hal ini karena probiotik *L. acidophilus* yang ditambahkan pada pembuatan *edible film* dalam bentuk cair. Tingginya nilai kadar air disebabkan karena konsentrasi probiotik yang semakin tinggi. Nilai kadar air pada *edible film* ini dapat mempengaruhi nilai transmisi uap

air, ketebalan, *elongasi* dan juga *tensile strength*. Dari hasil uji kadar air perlakuan A1, A2 dan A3 sudah memenuhi standar yang ditetapkan pada penelitian Arifin *et al.* (2009), yaitu kadar air maksimal 20% dan *edible film* dikatakan baik bila nilai kadar air dibawah 20%. Untuk lebih jelasnya mengenai standar *edible film* dapat dilihat pada Tabel 8. Hal ini dipengaruhi karena *edible film* dikeringkan pada suhu dan lama waktu yang sama.

4.2.2 Transmisi Uap Air

Analisis sidik ragam pengaruh penambahan konsentrasi probiotik *L. acidophilus* terhadap laju transmisi uap air *edible film mix kappa iota* karaginan menunjukkan tidak berbeda nyata dapat dilihat di Lampiran 10. Sedangkan pengaruh penambahan konsentrasi probiotik *L. acidophilus* pada *edible film mix kappa iota* karaginan dapat dilihat pada Gambar 11.



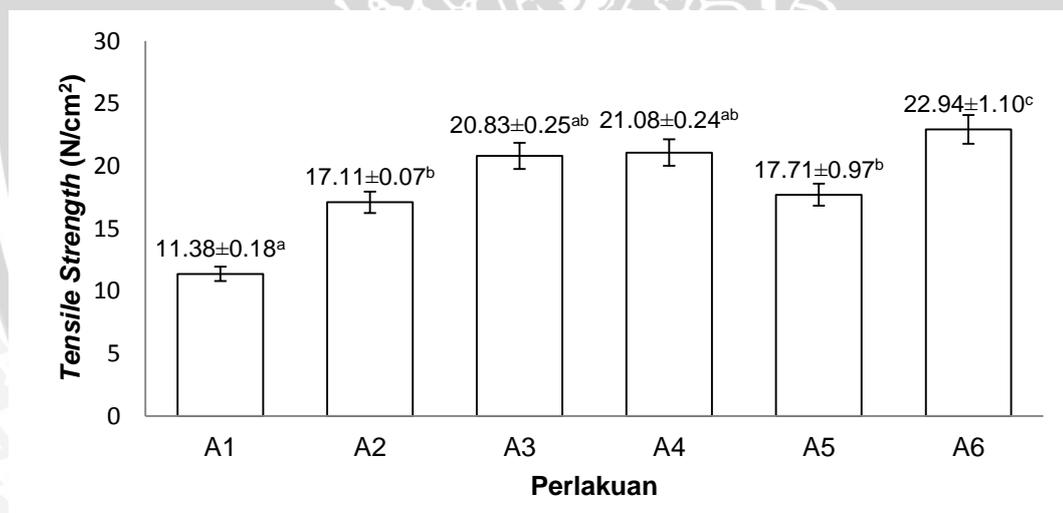
Gambar 11. Laju transmisi uap air *edible film* dalam berbagai konsentrasi *L. acidophilus*.

Gambar 11. menunjukkan transmisi uap air tertinggi sebesar 2.86 pada perlakuan A5 dengan konsentrasi *L. acidophilus* 5%. Transmisi uap air terendah pada perlakuan A4 sebesar 1.80 dengan konsentrasi *L. acidophilus* 2%. Hasil analisis ini menunjukkan bahwa penambahan probiotik *Lactobacillus acidophilus* dengan konsentrasi yang berbeda tidak memiliki pengaruh terhadap laju transmisi uap air *edible film mix kappa* dan *iota* karaginan. Selain itu, dari

Gambar 11. dapat diketahui bahwa hasil pengujian transmisi uap air tidak konstan Hasil penelitian ini bertolak belakang dengan pendapat Handito (2009), yang menyatakan bahwa nilai transmisi uap air *edible film* dipengaruhi oleh ketebalan. Semakin tebal *edible film*, membuat laju transmisi uap air menjadi rendah. Hal ini diduga karena tidak meratanya permukaan *edible film*, sehingga meskipun nilai ketebalan konstan tetapi nilai transmisi uap air tidak konstan.

4.2.3 Tensile Strength

Hasil analisis sidik ragam pengaruh penambahan konsentrasi probiotik *Lactobacillus acidophilus* yang berbeda pada *edible film mix kappa iota* karaginan (Lampiran 7) menunjukkan berbeda sangat nyata. Pengaruh penambahan konsentrasi probiotik *Lactobacillus acidophilus* pada *edible film mix kappa iota* karaginan dapat dilihat pada Gambar 12.



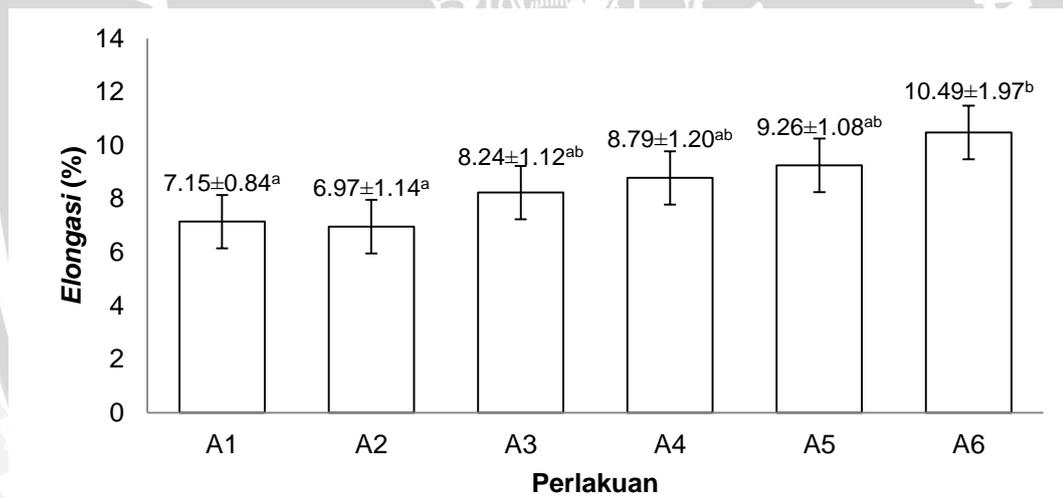
Gambar 12. Tensile strength edible film dalam berbagai konsentrasi probiotik *L. acidophilus*.

Pada Gambar 12. menunjukkan bahwa hasil analisis *tensile strength* tertinggi sebesar 22,94 N/cm² pada perlakuan A6 yaitu konsentrasi probiotik *L. acidophilus* 5%. Sedangkan *tensile strength* terendah sebesar 11,38 N/cm² pada perlakuan A1 yaitu konsentrasi probiotik *L. acidophilus* 0% (tanpa penambahan probiotik). Hasil analisis *tensile strength* tersebut menunjukkan perbedaan sangat

nyata, maka dapat disimpulkan bahwa konsentrasi probiotik *L. acidophilus* dapat memberikan pengaruh terhadap *tensile strength edible film mix kappa iota* karaginan. Hasil penelitian ini menunjukkan semakin tinggi konsentrasi probiotik hasil *tensile strength* yang didapatkan cenderung naik. Hal ini bertolak belakang dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh.

4.2.4 Elongasi

Hasil analisis sidik ragam pengaruh penambahan konsentrasi probiotik *Lactobacillus acidophilus* terhadap *elongasi edible film mix kappa iota* karaginan (Lampiran 8), menunjukkan berbeda nyata. Pengaruh penambahan konsentrasi probiotik *Lactobacillus acidophilus* pada *edible film mix kappa dan iota* karaginan dapat dilihat pada Gambar 13.



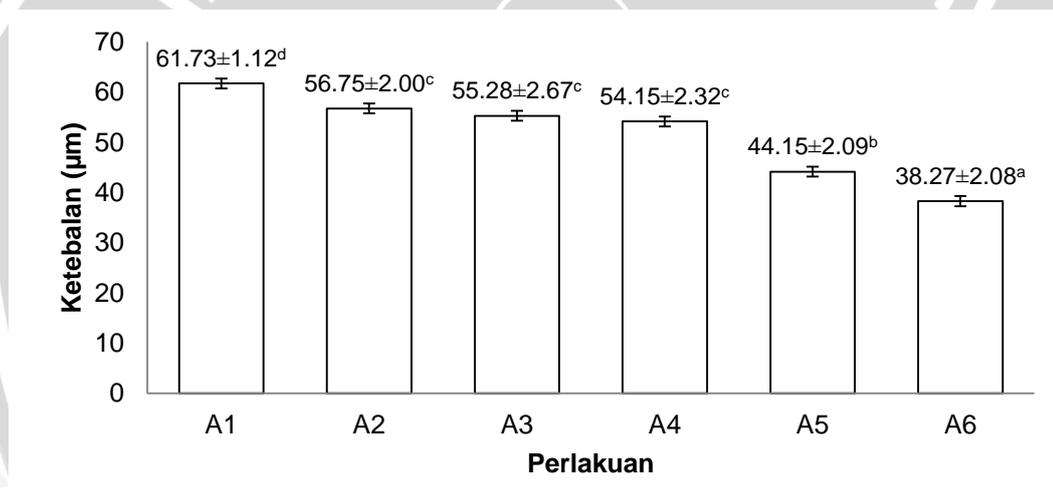
Gambar 13. *Elongasi edible film* dalam berbagai konsentrasi probiotik *L. acidophilus*.

Gambar 13. menunjukkan bahwa *elongasi* tertinggi sebesar 10,4875% pada perlakuan A6 dengan penambahan probiotik *Lactobacillus acidophilus* sebanyak 5%. Sedangkan *elongasi* terendah sebesar 6,965% pada perlakuan A2 dengan penambahan probiotik *Lactobacillus acidophilus* sebanyak 1%. Hasil analisis ini dapat disimpulkan bahwa penambahan konsentrasi probiotik *Lactobacillus acidophilus* dapat memberikan pengaruh pada *elongasi edible film*

mix kappa dan *iota* karaginan. Semakin rendah konsentrasi *L. acidophilus* maka nilai ketebalan *edible film* semakin tinggi dan nilai *elongasinya* semakin rendah. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Handito (2009), bahwa semakin tebal *edible film* maka akan menurunkan nilai perpanjangan.

4.2.5 Ketebalan

Hasil analisis sidik ragam pengaruh penambahan konsentrasi probiotik *Lactobacillus acidophilus* terhadap ketebalan *edible film mix kappa iota* karaginan (Lampiran 9) menunjukkan hasil yang berbeda nyata. Pengaruh penambahan konsentrasi probiotik *Lactobacillus acidophilus* terhadap ketebalan *edible film mix kappa iota* karaginan dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Ketebalan *edible film* dalam berbagai konsentrasi probiotik *L. acidophilus*.

Pada Gambar 14. menunjukkan bahwa ketebalan tertinggi sebesar 61,73 µm pada perlakuan A1 dengan konsentrasi probiotik *L. acidophilus* 0%. Sedangkan ketebalan terendah sebesar 38,27 µm pada perlakuan A6 dengan konsentrasi probiotik *L. acidophilus* 5%. Hasil analisis ini menunjukkan tidak berbeda nyata, maka dapat disimpulkan bahwa penambahan probiotik *Lactobacillus acidophilus* dengan konsentrasi yang berbeda (0%, 1%, 2%, 3%, 4% dan 5%) tidak memberikan pengaruh terhadap ketebalan *edible film mix kappa* dan *iota* karaginan. Namun pada gambar ditunjukkan bahwa semakin

tinggi konsentrasi probiotik *L. acidophilus* maka *edible film* yang dihasilkan semakin tipis (ketebalannya rendah), dan sebaliknya semakin rendah konsentrasi probiotik *L. acidophilus* maka *edible film* yang dihasilkan semakin tebal (ketebalannya tinggi). Menurut Tamaela dan Lewerissa (2007), ketebalan merupakan parameter penting yang berpengaruh terhadap penggunaan *film* dalam pembentukan produk yang dikemasnya. Menurut Handito (2009), ketebalan *edible film* dapat berpengaruh pada nilai renggang putus, perpanjangan dan laju transmisi uap air. Berikut adalah standar sifat fisik *edible film*:

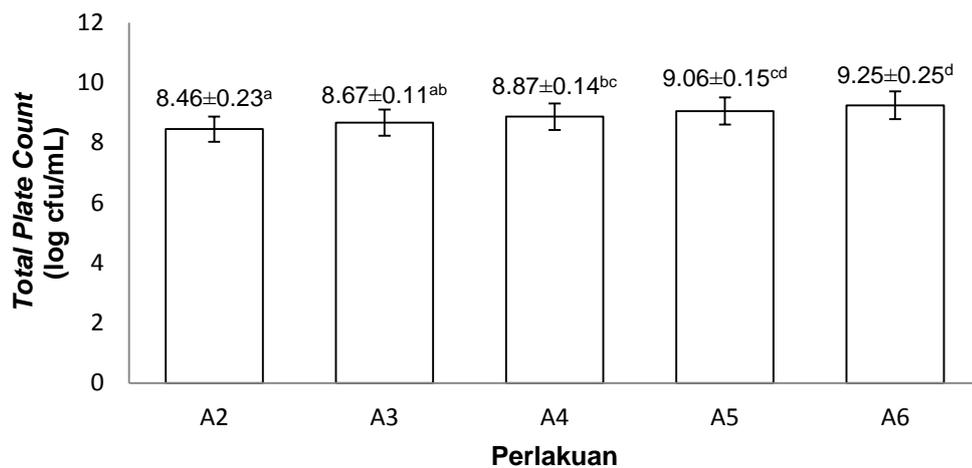
Tabel 7. Klasifikasi Standar Sifat Fisik *Edible Film*

Jenis Standar <i>Edible Film</i>	Standar
Waktu pengeringan di oven pada suhu 40 – 45°C	40 – 72 jam
Kadar air	dibawah 20%
Ketebalan	0,1 – 0,20 cm
Waktu hancur	0,5 – 0,8 menit
Perpanjangan	1 – 1,08 cm

Sumber: Arifin *et al.* (2009).

4.2.6 *Total Plate Count Lactobacillus acidophilus*

Analisis sidik ragam pengaruh penambahan konsentrasi *Lactobacillus acidophilus* terhadap *Total Plate Count L. acidophilus* pada *edible film mix kappa iota karaginan* (Lampiran 12) menunjukkan hasil yang berbeda sangat nyata. Pengaruh penambahan konsentrasi *L. acidophilus* terhadap *Total Plate Count L. acidophilus* dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Total Plate Count *Lactobacillus acidophilus* dalam berbagai konsentrasi.

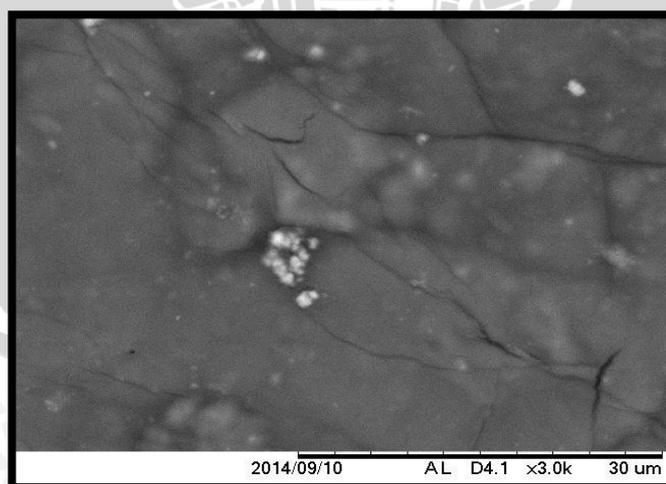
Gambar 15. ini menunjukkan bahwa *Total Plate Count* tertinggi sebesar 9.25 log cfu/ml (2.1×10^7 cfu/mL) yaitu pada perlakuan A6 dengan konsentrasi *L. acidophilus* 5%. Hasil ini menunjukkan perbedaan sangat nyata maka dapat disimpulkan bahwa penambahan *L. acidophilus* dengan konsentrasi yang berbeda dapat mempengaruhi *Total Plate Count* *L. acidophilus*, yaitu semakin tinggi konsentrasi probiotik maka *Total Plate Count*nya juga semakin tinggi dan sebaliknya semakin rendah konsentrasi probiotik maka *Total Plate Count*nya juga semakin rendah. Hal ini karena pada konsentrasi 5% volume bakteri lebih banyak dari pada 1%. Selain itu, hasil pengujian *Total Plate Count* menunjukkan nilai yang sangat tinggi karena suhu pengeringan yang digunakan adalah suhu optimum pertumbuhan *L. acidophilus* yaitu 40°C. Menurut Pelezar dan Chan (2009), suhu optimum pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* adalah 30°C sampai dengan 40°C. Ditambahkan oleh Moir (2001), *Lactobacillus* merupakan bakteri asam laktat yang tumbuh baik pada suhu mesofilik yaitu antara 20°C dan 45°C. Berdasarkan hasil perhitungan TPC, nilai 9.25 log cfu/ml (2.1×10^7 cfu/mL) sudah memenuhi standar untuk bisa dicerna di dalam usus. Menurut Hassan (2006), pada usus halus jumlahnya dapat mencapai $10^6 - 10^7$ sel/mL.

4.2.7 Hasil Perlakuan Terpilih

Penentuan perlakuan terpilih didasarkan pada hasil terbaik di setiap analisis baik fisika kimia maupun mikrobiologi. Berdasarkan hasil perhitungan pada setiap analisis, didapatkan perlakuan terpilih pada perlakuan A4 yaitu *edible film mix kappa iota* karaginan dengan penambahan probiotik *Lactobacillus acidophilus* sebanyak 3% atau 3 ml. Perlakuan A4 dijadikan sebagai perlakuan terpilih karena pada setiap perlakuan terdapat hasil analisis yang sudah memenuhi standar dan ada juga yang belum memenuhi standar. Hasil perhitungan tersebut yaitu kadar air 21,33%, transmisi uap air 1,80 g/cm² jam, *tensile strength* 21,08 N/cm², *elongasi* 8,79%, ketebalan 54,15 μm, dan nilai *Total Plate Count* 8,871 log cfu/mL.

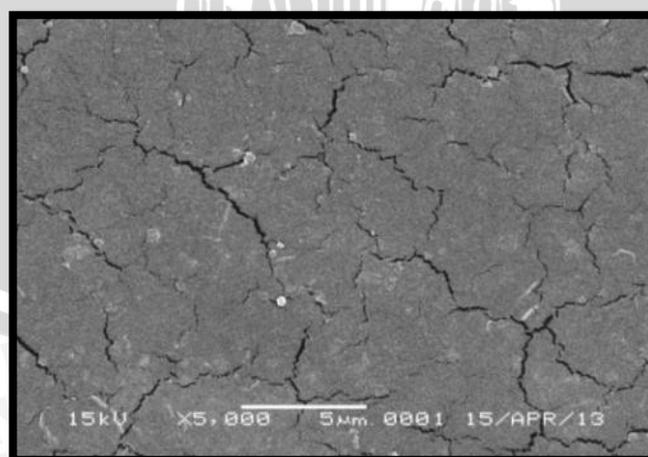
4.2.8 Hasil Analisa *Scanning Electronic Microscope* (Perlakuan Terpilih)

Analisa *Scanning Electronic Microscope* pada produk *edible film mix kappa iota* karaginan dengan berbagai konsentrasi *Lactobacillus acidophilus* bertujuan untuk mengetahui mikrostruktur dari *edible film*. Berdasarkan analisa menggunakan alat SEM, diperoleh hasil mikrostruktur *edible film* yang ditunjukkan pada Gambar 16.



Gambar 16. Mikrostruktur *Edible Film Mix Kappa Iota* Karaginan dengan Konsentrasi Probiotik *L. acidophilus* 3% (3 ml). Perbesaran 3000X.

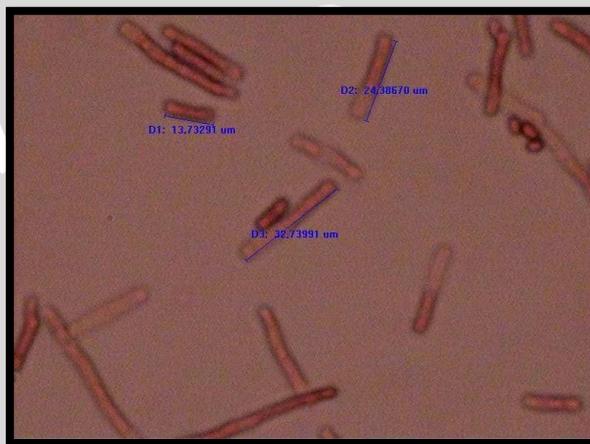
Berdasarkan Gambar 20. dapat diketahui bahwa pada hasil perlakuan terbaik yaitu *edible film mix kappa iota* karaginan dengan ditambahkan probiotik *Lactobacillus acidophilus* sebanyak 2% (2 ml) menunjukkan tidak adanya rongga dan teksturnya kompak dalam *edible film*, selain itu struktur *edible film* terlihat lebih halus serta lebih rapat bila dibandingkan dengan hasil SEM sampel *edible film* pada Gambar 17. dari penelitian yang dilakukan oleh Setiani *et al.* (2013). Hal ini dapat disimpulkan bahwa penambahan probiotik dengan konsentrasi 2% (2 ml) dapat meningkatkan kerapatan mikrostruktur *edible film mix kappa iota* karaginan. Menurut Setiani *et al.* (2013), berdasarkan hasil uji SEM dengan komposisi variabel pati sukun-kitosan-sorbitol (6:4:30%) terlihat bahwa permukaan struktur molekul *edible film* pati sukun terlihat tidak rapat. Retakan yang terjadi pada *edible film* tersebut diduga diakibatkan oleh serat kitosan yang ukuran partikelnya cukup besar yaitu 20-30 *mesh* sehingga tidak terlarut sempurna. Dengan kurang rapatnya struktur atau retakan dari serat-serat tersebut menyebabkan air akan terserap lebih banyak. Gambar 17. juga menunjukkan permukaan yang kurang halus dan berpori. Permukaan yang tidak halus tersebut mengindikasikan bahwa *film* kurang homogen.



Gambar 17. Penampang *Edible Film* Pati Sukun-Kitosan Formulasi 6:4, Konsentrasi Sorbitol 30 % dengan Perbesaran 5000X (Setiani *et al.*, 2013).

4.2.9 Hasil Analisa Pewarnaan Gram

Analisa pewarnaan gram dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri yang tumbuh pada sampel *edible film mix kappa iota* dengan berbagai konsentrasi probiotik benar – benar *Lactobacillus acidophilus*. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa bakteri yang tumbuh adalah *L. acidophilus*. Untuk lebih jelasnya mengenai bentuk *Lactobacillus acidophilus* yang dihasilkan dari analisis pewarnaan gram dapat dilihat pada Gambar 18.



Gambar 18. *Lactobacillus acidophilus* dengan perbesaran 1000X.

Bakteri yang diwarnai dalam pewarnaan gram, dibagi menjadi dua kelompok, salah satunya gram positif yang mempertahankan zat warna ungu kristal dan karenanya tampak ungu tua kelompok lain. bakteri gram negatif kehilangan ungu kristal ketika dicuci dengan alkohol dan waktu diberi pewarnaan tandingan dengan safranin yang bewarna merah (Purwohadisantoso *et al.*, 2009). Menurut Pelezar dan Chan (2009), *Lactobacillus acidophilus* merupakan bakteri gram positif lurus atau lengkung, nonmotil, anaerobik atau aerobik fakultatif, persyaratan gizi rumit, dijumpai di dalam mulut, vagina, saluran pencernaan. Untuk morfologi bakteri *L. acidophilus* antaran lain adalah dalam bentuk batang, bervariasi dari panjang dan ramping sampai kokobaksilus pendek. Beberapa galur memperlihatkan tubuh – tubuh bipolar, granulasi internal atau penampilan seperti batang dengan reaksi gram atau pewarna biru metilen.

5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pengaruh penambahan konsentrasi probiotik *Lactobacillus acidophilus* pada *edible film* berbahan *mix kappa iota* karaginan terhadap kualitas *edible film* yaitu dapat meningkatkan nilai kadar air dengan nilai tertinggi sebesar 23,93%, meningkatkan nilai transmisi uap air dengan nilai tertinggi sebesar 2.86 g/cm² jam, meningkatkan nilai *tensile strength* dengan nilai tertinggi sebesar 22.94 N/cm², meningkatkan nilai *elongasi* dengan nilai tertinggi sebesar 10.49% dan menurunkan nilai ketebalan dengan nilai terendah sebesar 38,27 µm. Semakin tinggi konsentrasi probiotik *Lactobacillus acidophilus* maka *Total Plate Count*nya juga semakin tinggi. Konsentrasi *Lactobacillus acidophilus* sebanyak 6% atau 5 mL menghasilkan *Total Plate Count* tertinggi yaitu sebesar 9,25 log cfu/mL.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, diketahui masih ada beberapa kekurangan. Oleh sebab itu, perlu adanya penelitian lanjutan agar dilakukan pengukuran viskositas dan dilakukan pengujian organoleptik pada sampel *edible film mix kappa iota* karaginan dengan penambahan probiotik.

DAFTAR PUSTAKA

- Amaliya, R. R. dan W. D. R. Putri. 2014. Karakterisasi edible film dari pati jagung dengan penambahan filtrat kunyit putih sebagai antibakteri. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. **2** (3): 43 – 53.
- Anggriani, R., Iskandar dan A. Taofiqurrohman. 2012. Efektivitas penambahan *Bacillus sp.* Hasil isolasi dari saluran pencernaan ikan patin pada pakan komersial terhadap kelangsungan hidup dan pertumbuhan benih ikan nila merah (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. **3** (3): 75 – 83.
- Arifin, F., L. Nurhidayati, Syarmalina dan Rensy. 2009. Formulasi edible film ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) antihalitosis. *Kongres Ilmiah ISFI XVII*: 1 – 12.
- Astawan, M., S. Koswara dan F. Herdiana. 2004. Pemanfaatan rumput laut (*Eucheuma cottonii*) untuk meningkatkan kadar iodium dan serat pangan pada selai dan dodol. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. **15** (1): 61 – 69.
- Basmal, J., Syarifudin dan W. F. Ma'ruf. 2003. Pengaruh konsentrasi larutan potasium hidroksida terhadap mutu κ -karaginan yang diekstraksi dari *Eucheuma cottonii*. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. **9** (5): 95 – 103.
- Cholik, F., A. G. Jagatraya, R. P. Poernomo dan A. Jauzi. 2005. *Akuakultur*. PT. Victoria Kreasi Mandiri: Jakarta. hal. 381.
- Diova, D. A., Y. S. Darmanto dan L. Rianingsih. 2013. Karakteristik edible film komposit semirifine karaginan dari rumput laut *Eucheuma cottonii* dan beeswax. *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan*. **2** (3): 1 – 10.
- Fardiaz, S. 1989. *Mikrobiologi Pangan*. IPB: Bogor. hal. 104 – 105.
- Farnani, Y. H., N. Cokrowati dan N. Farida. 2013. Pengaruh kedalaman tanam terhadap pertumbuhan *Eucheuma spinosum* pada budidaya dengan metode rawai. *Jurnal Kelautan*. **6** (1): 75 – 86.
- Handito, D. 2011. Pengaruh konsentrasi karagenan terhadap sifat fisik dan mekanik edible film. *Agroteksos*. **21** (2-3): 151 – 157.
- Hardiningsih, R., R. N. R. Napitupulu dan T. Yulinery. 2006. *Jurnal Biodiversitas*. **7** (1): 15 – 17.
- Harmayani, E., Ngatirah, E. S. Rahayu dan T. Utami. 2001. Ketahanan dan *Total Plate Count* probiotik bakteri asam laktat selama proses pembuatan kultur kering dengan metode freeze dan spray drying. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. **12** (2): 126 – 133.

- Hassan, Z. H. 2006. Isolasi *Lactobacillus*, Bakteri asam laktat dari feses dan organ saluran pencernaan ayam. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. **3**: 735 – 738.
- Hernandez, G. 2013. Conventional and alternative technologies for the extraction of algal polysaccharides. Woodhead Publishing Limited: Mexico. p. 475 – 516.
- Kailasapathy, K. 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *J. Microbiol.* **3**: 39 – 48.
- Kim, S. J., S. Y. Cho, S. H. Kim, O. J. Song, I. S. Shin, D. S. Cha dan H. J. Park. 2008. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J. Microbiol.* **3**: 39 – 48.
- Krochta, J.M., 1992. Control of Mass Transfer in Food with Edible Coatings and Film. *Advances in Food Engineering*. CRC Press, Boca Raton, F.L. p. 517 – 538.
- Kusumawati, D. H. dan W. D. R. Putri. 2013. Karakteristik fisik dan kimia edible film pati jagung yang diinkorporasi dengan perasan temu hitam. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. **1** (1): 90 – 100.
- Mariana, E. dan H. Susanti. 2012. Pengaruh suplementasi tepung terigu terhadap pertumbuhan dan laju pengasaman probiotik *Lactobacillus acidophilus*. *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia*. **4** (3): 14 – 19.
- Moir, C. J. 2001. Spoilage of Processed Foods: Causes and Diagnoses. AIFST Inc. (NSW Branch): Australia. p. 341 – 347.
- Nisa, F. C., J. Kusnadi dan R. Chrisnasari. 2009. Total Plate Count dan deteksi subletal bakteri probiotik pada susu kedelai fermentasi instan metode pengeringan beku (kajian jenis isolate dan konsentrasi sukrosa sebagai krioprotektan). *Jurnal Teknologi Pertanian*. **9** (1): 40 – 51.
- Noland, E. dan K. J. Aryana. 2012. Influence of micro-encapsulated probiotic *Lactobacillus acidophilus* R0052 on the characteristics of plain yogurt. *Advances in Microbiology*. **2**: 364-367.
- Pelezar, M. J. dan Chan, E. C. S. 2009. Dasar – Dasar Mikrobiologi. UI – Press: Jakarta. hlm. 553.
- Phillips, G. O. dan P. A. Williams. 2001. Handbook Of Hydrocolloids. CRC Press: New York Washington. p. 426 – 427.
- Pranoto, Y. 2007. Kajian sifat fisik – mekanik dan mikrostruktur edible film alginat dan kitosan dengan penambahan gliserol. *Seminar Nasional PATPI*, Bandung: 1065 – 1078.

- Prasetyaningrum, A., N. Rukhati, D. T. Kinasih dan F. D. Novia. 2010. Karakteristik bioactive edible film dari komposit alginat dan lilin lebah sebagai bahan pengemas makanan biodegradable. *Seminar Rekayasa Kimia dan Proses*. **2**: 1 – 6.
- Purwohadisantoso, K., E. Zubaidah dan E. Saparianti. 2009. Isolasi bakteri asam laktat dari sayur kubis yang memiliki kemampuan penghambatan bakteri patogen. *Jurnal Teknologi Pertanian*. **10** (1): 19 – 27.
- Rizqiati, H., B. S. L. Jenie, N. Nurhidayat dan C. C. Nurwitri. 2009. Karakteristik mikrokapsul probiotik *Lactobacillus plantarum* yang dienkapsulasi dengan susu skim dan gum arab. *J. Indon. Trop. Anim. Agric.* **34** (2): 139 – 143.
- Safitri, I. Thohari dan Purwadi. 2014. Karakteristik sifat fisiko-mekanis edible film komposit dengan rasio protein whey dan tepung porang (*Amorphophallus oncophyllus*) yang berbeda. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang: 1 – 8.
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Bidang Pertanian. Kanisius: Yogyakarta. hlm. 102.
- Setiani, W., T. Sudiarti dan L. Rahmidar. 2013. Preparasi dan karakterisasi edible film dari poliblend pati sukun – kitosan. *Jurnal Valensi*. **3** (2): 100 – 109.
- Setijawati, D., S. Wijana, Aulaniam dan I. Santosa. 2011. Total Plate Count dan struktur mikrokapsul *Lactobacillus acidophilus* dengan bahan penyalut karaginan semi murni jenis *Eucheuma cottonii*. *Jurnal Teknologi Pangan*. **2** (1): 50 – 67.
- Sirat D. W. dan Sukesu. 2012. Antioksidan dalam bakso rumput laut merah *Eucheuma cottonii*. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. **1** (1): 1 – 4.
- Srianta, N. Kusumawati dan W. Effendi. 2007. Pengaruh perbedaan jumlah santan dan lama penyimpanan beku terhadap Total Plate Count *Lactobacillus acidophilus* dalam es krim nabati probiotik. *Jurnal Teknologi Pangan dan Gizi*. **6** (2): 9 – 12.
- Sudarmadji, S., B. Haryono dan Suhardi. 2003. Penerbit Liberty: Yogyakarta. hlm. 64.
- Sudaryati H. P., T. Mulyani S. dan E. R. Hansyah. 2010. Sifat fisik dan mekanis edible film dari tepung porang (*Amorphophallus oncophyllus*) dan karboksimetil selulosa. *Jurnal Teknologi Pertanian*. **11** (3): 196-201.
- Tamaela, P. dan S. Lewerissa. 2007. Karakteristik edible film dari karagenan. *Jurnal Ichthyos*. **7** (1): 27 – 30.
- Tenney, D. 1996. *Acidophilus*. Woodland Publishing: United States. p. 1 – 26.
- Turkoglu, H., Z. G. Ceylan dan K. S. Dayisoğlu. 2003. The microbiological and chemical quality of orgu cheese produced in Turkey. *Journal of Nutrition*. **2** (2): 92 – 94.

Widanarni, D. Wahjuningrum dan F. Puspita. 2012. Aplikasi bakteri probiotik melalui pakan buatan untuk meningkatkan kinerja pertumbuhan udang windu *penaeus monodon*. *Jurnal Sains Terapan*. 2 (1): 32 – 49.

Winarno, 1996. Kimia pangan dan Gizi. Sinar Pustaka Harapan: Jakarta. hlm. 1 – 112.

Zaidar, E., R. Bulan, Z. Alvian, S. Taurina R. S. dan D. Lestari, A. 2013. Pembuatan edible film dari campuran tepung rumput laut (*Eucheuma sp*), dengan gliserol dan kitosan. *FMIPA USU*: 125 – 130.

