

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk membuat *Semi Refined Carrageenan* (SRC) adalah rumput laut *E. cottonii* dan *E. spinosum* yang didapat dari perairan Sumenep, Madura, Jawa Timur, air, CaCl_2 6%, KOH 6%, dan kalium klorida (KCl) 1,5 %. Bahan-bahan yang digunakan pada proses mikroenkapsulasi *L. acidophilus* dan *B. bifidum* adalah sol SRC, KCl 3,9 M, kultur bakteri *L. acidophilus* dan *B. bifidum*. Bahan-bahan yang digunakan untuk *foam-mat drying* adalah mikrokapsul dan busa putih telur ayam. Bahan yang digunakan untuk uji viabilitas mikrokapsul antara lain adalah mikrokapsul yang telah diberi perlakuan, aquades, MRS Agar, NaCl steril, alkohol 70%, dan spirtus, Plastik warp, dan kapas.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada pembuatan SRC adalah ayakan, pH meter, *stopwatch*, nampan, timbangan analitik, gelas ukur 100 mL, gunting, baskom, blender, oven, *beaker glass* 600 mL, *waterbath*, spatula, dan kain saring. Alat yang digunakan pada mikroenkapsulasi *L. acidophilus* dan *B. bifidum* adalah *beaker glass* 600 mL, *hotplate*, *magnetic stirrer*, gelas ukur 100 mL, pipet tetes, spatula, oven, loyang, dan termometer. Alat yang digunakan untuk *foam-mat drying* adalah *mixer*, oven, baskom, Loyang, dan spatula, oven. Alat yang digunakan untuk menganalisis viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum* adalah *colony counter*, sprayer, korek api, Bunsen, *beaker glass* 600 mL,

inkubator, laminar flow, keranjang, pipet volume, cawan petri, *waterbath*, gelas ukur 100 mL, spatula, vortex mixer, rak tabung reaksi, dan timbangan analitik.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen. Menurut Nazir (2005) penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol. Penelitian eksperimen dimaksudkan untuk mengetahui ada tidaknya akibat dari sesuatu yang dikenakan pada subjek yang diselidiki. Penelitian eksperimen mencoba meneliti ada tidaknya hubungan sebab akibat. Metode ini dilaksanakan dengan memberikan variabel bebas secara sengaja (bersifat *induce*) kepada objek penelitian untuk diketahui akibatnya didalam variabel terikat. Adapun variabel-variabel dalam penelitian ini adalah :

1. Variabel bebas : Proses *foam-mat drying*
2. Variabel terikat : Viabilitas dan *shelf life* probiotik

3.3 Tahapan Penelitian

3.3.1 Rancangan percobaan

Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) yang disusun secara faktorial adalah mikroenkapsulasi dengan 2 perlakuan yaitu mikroenkapsulasi dengan *foam* (A_1), mikroenkapsulasi tanpa *foam* (A_1) terhadap viabilitas bakteri *B. bifidum* (B_1), *L. acidophilus* (B_2), dan *mix L. acidophilus B. bifidum* (B_3), masing masing dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Model rancangan percobaan yang digunakan di sajikan pada tabel 3.

Tabel 2. Model Rancangan Percobaan

Perlakuan		Ulangan			Total	Rerata
Foam-mat	Jenis Bakteri	1	2	3		
A ₁	B ₁	A ₁ B ₁ 1	A ₁ B ₁ 2	A ₁ B ₁ 3		
	B ₂	A ₁ B ₂ 1	A ₁ B ₂ 2	A ₁ B ₂ 3		
	B ₃	A ₁ B ₃ 1	A ₁ B ₃ 2	A ₁ B ₃ 3		
A ₂	B ₁	A ₂ B ₁ 1	A ₂ B ₁ 2	A ₂ B ₁ 3		
	B ₂	A ₂ B ₂ 1	A ₂ B ₂ 2	A ₂ B ₂ 3		
	B ₃	A ₂ B ₃ 1	A ₂ B ₃ 2	A ₂ B ₃ 3		

Metode yang digunakan untuk analisa ragam RAL adalah :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}, (i = 1,2,3; j = 1,2; k = 1,2,3,4)$$

Dimana :

- Y_{ijk} = respon metode yang di amati
- μ = nilai tengah umum
- α_i = pengaruh taraf ke-i dari faktor A
- β_j = pengaruh taraf ke-j dari faktor B
- αβ_{ij} = pengaruh interaksi taraf ke-I dari faktor A dan taraf ke-j dari faktor B
- ε_{ijk} = pengaruh sisa (galat percobaan) taraf ke-I dari faktor A dan taraf ke-j dari faktor B pada ulangan yang ke-k

Hasil penelitian dianalisis menggunakan ANOVA analisis sidik ragam dan dilanjutkan dengan pengujian perlakuan yang menggunakan uji F. Jika hasil analisis keragaman menunjukkan adanya perbedaan ($F_{table} 5\% < F_{hit} < F_{table} 1\%$ atau $F_{hit} > F_{table} 1\%$) maka dilanjutkan dengan uji BNT 5%.

3.3.2. Pembuatan Tepung SRC

Prosedur kerja dalam pembuatan SRC dari jenis rumput laut *E. cottonii* dan *E. spinosum* dilakukan berdasarkan metode penelitian Setijawati *et al.*, (2012) yang termodifikasi sebagai berikut:

- Rumput laut *E. cottonii* dan *E. spinosum* segar dicuci sampai bersih lalu di jemur sampai kering.
- Rumput laut *E. cottonii* dan *E. spinosum* yang telah kering ditimbang sebanyak 20 gr kemudian ditambahkan air dengan perbandingan 1:20 dan direndam selama 24 jam.

- Pemanasan dalam *waterbath* selama 30 menit dengan suhu $\pm 80^{\circ}\text{C}$. Rumput laut yang telah dipanaskan diblender sampai menjadi pasta kemudian diekstraksi. Pasta *E. cottonii* diekstraksi dengan menggunakan KOH 6 % dan *E. spinosum* dengan menggunakan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 6%.
- Pemanasan dengan suhu $\pm 80^{\circ}\text{C}$ selama 2 jam dalam *waterbath*.
- Pasta yang telah dipanaskan kemudian dinetralkan dengan HCl 0,2 N lalu disaring dengan kain saring sampai didapat residu dan filtrat.
- Filtrat *E. cottonii* di cuci dengan KCl 1,5% dan filtrat *E. spinosum* dicuci dengan CaCl_2 1,5% kemudian didiamkan sampai terbentuk gel.
- Setelah terbentuk gel kemudian dijemur sampai kering dan digiling sampai menjadi serbuk didapatkan SRC.

Pengujian yang digunakan pada pembuatan SRC adalah sebagai berikut:

a. Kekuatan Gel

Pengamatan tentang kekuatan gel menggunakan metode FMC Crop (1997) adalah sebagai berikut :

- Larutan karaginan 1,6% dan KCl 0,16% dipanaskan dalam bak air mendidih dengan pengadukan secara teratur sampai suhu 80°C .
- Volume larutan dibuat sekitar 50 mL. Larutan panas dimasukkan ke dalam cetakan berdiameter kira-kira 4 cm dan dibiarkan pada suhu 10°C selama 2 jam.
- Gel yang terbentuk diukur kekuatan gelnya dengan LFRA *Tekstur Analyzer* dengan probe TA 25/100, *distance* 10 mm dan *test speed* 0,5 mm/sec.

f. FTIR (*Fourier Transform InfraRed*)

Spektrofotometer FTIR ini digunakan untuk mengetahui gugus fungsi *crude kappa karagenan murni* dan *iota karagenan murni*. Spektrofotometer FTIR dapat digunakan untuk analisa sampel yang berupa padatan, cairan dan gas.

Spektroskopi FTIR (*Fourier Transform Infrared*) merupakan spektroskopi inframerah yang dilengkapi dengan transformasi Fourier untuk deteksi dan analisis hasil spektrumnya. Inti spektroskopi FTIR adalah interferometer Michelson yaitu alat untuk menganalisis frekuensi dalam sinyal gabungan. Spektrum inframerah tersebut dihasilkan dari pentransmisi cahaya yang melewati sampel, pengukuran intensitas cahaya dengan detektor dan dibandingkan dengan intensitas tanpa sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Spektrum inframerah yang diperoleh kemudian diplot sebagai intensitas fungsi energi, panjang gelombang (μm) atau bilangan gelombang (cm^{-1}).

Untuk pengambilan spektra IR jumlah sampel yang diperlukan antara 1-5 mg, sedangkan bentuk sampel dapat berupa padatan, cairan atau dalam bentuk gas. Sampel kappa karagenan yang digunakan pada spektroskopi FTIR ini berupa cairan sehingga ditetapkan menggunakan plat NaCl/NaCl sekitar 2-3 tetes selanjutnya diukur serapannya di FT-IR.

Analisis gugus fungsi suatu sampel dilakukan dengan membandingkan pita absorpsi yang terbentuk pada spektrum inframerah menggunakan tabel korelasi dan menggunakan spektrum senyawa pembanding (yang sudah diketahui) (Anam *et al.*, 2007). Menurut Sastrohamidjojo (1991), daerah pada spektrum infra merah diatas 1500 cm^{-1} menunjukkan pita spektrum atau gugus-gugus fungsi dalam molekul kimia, sedangkan daerah dibawah 1500 cm^{-1} menunjukkan daerah sidik jari.

Prinsip kerja spektrofotometri IR adalah sumber radiasi yang dipancarkan oleh sumber sinar (radiasi) akan dilewatkan ke sel sampel, kemudian difokuskan oleh monokromator dan diteruskan ke detektor untuk difokuskan menjadi spektrum dengan panjang gelombang sesuai dengan gugus fungsional yang terdapat didalamnya (Hadi, 2008).

3.3.3. Pembuatan Mikrokapsul

Proses pembuatan mikrokapsul dilakukan dengan 2 perlakuan. Perlakuan pertama mikroenkapsulasi dengan *foam* perlakuan 2 mikroenkapsulasi tanpa *foam*. Adapun proses pembuatan mikrokapsul menggunakan metode Manojlovic *et al.*, (2010) dan Setijawati *et al.*, (2012) adalah sebagai berikut :

❖ Perlakuan 1

- Penimbangan 2,05 gram karaginan (1,025 gram kappa karaginan dan 1,025 gram iota karaginan) Ditambahkan 30 mL akuades.
- Kemudian pemanasan di atas *hot plate* hingga mencapai suhu 97°C dan distirrer dengan kecepatan 500 rpm kemudian diangkat dari *hot plate* dan suhunya diturunkan hingga 40-45°C sambil terus diaduk agar tidak cepat menggelasi.
- Sebanyak 30 mL kultur *L. acidophilus* dan *B. bifidum* di masukan kedalam sol karaginan, dan diaduk hingga homogen.
- Campuran sel dan sol dimasukan kedalam larutan 75 mL larutan KCl 3,9 M menggunakan mikropipet, pengadukan dilakukan menggunakan stirrer selama 10 menit.
- Mikrokapsul yang didapat di saring menggunakan kain saring. Kemudian mikrokapsul dikeringkan dalam oven dengan suhu 40°C hingga kering dan menjadi serbuk mikrokapsul.

❖ Perlakuan 2

Penggunaan kosentrasi busa putih telur dan lama pengeringan yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada penelitian terdahulu oleh Veni (2013) pembuatan mikrokapsul *L. acidophilus* dengan kosentrasi terbaik busa putih telur sebesar 17,5% dan lama pengeringan 2 jam. Prosedur kerja untuk mikrokapsul dengan metode *foam-mat drying* adalah sebagai berikut:

- 1 Buah telur ayam dipisahkan dari kuning telur dan putih telurnya.
- Putih telur dikocok dengan menggunakan mixer hingga membentuk busa putih telur selama \pm 5-7 menit sampai mengembang.
- Busa putih telur ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik
- Disiapkan mikrokapsul yang telah dipanen
- Mikrokapsul dilapisi busa putih telur dengan konsentrasi 17,5% dari total residu
- Pengeringan dengan menggunakan oven dengan suhu \pm 45°C selama 2 jam
- Mikroenkapsulat yang diperoleh dianalisis viabilitas, struktur mikroenkapsulat dan masa simpannya (*shelf life*)

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

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

Keterangan :

N = jumlah sel hidup yang terlepas setelah proses mikroenkapsulasi.

N₀ = jumlah sel hidup yang ditambahkan (kepadatan awal)

Pengujian viabilitas mikrokapsul dilakukan segera setelah proses enkapsulasi selesai. Uji viabilitas menggunakan metode dari penelitian Fardiaz (1989) adalah sebagai berikut:

Prosedur Pengenceran:

- NaCl ditimbang sebanyak 1,44 gr dan dihomogenkan dalam akuades sebanyak 160 mL.
- Larutan NaCl dimasukan dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 9,9 mL kemudian disterilisasi sehingga diperoleh Na-fis 0,9% steril.

- Na-fis 0,9% steril disiapkan untuk pengenceran 10^1 sampai 10^4 .
- Tabung reaksi 10^1 diisi sampel mikrokapsul yang telah diberi perlakuan sebanyak 2 gr kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex mixer*.
- Tabung reaksi 10^1 yang berisi sampel diambil 1 ml untuk dimasukkan ke dalam tabung reaksi 10^2 lalu dihomogenkan dan diulangi prosedur tersebut untuk dimasukkan ke dalam tabung reaksi 10^4 .

Prosedur pembuatan media:

- Media MRSA ditimbang sebanyak 35,2 gr dan dihomogenkan dengan akuades sebanyak 640 mL.
- Larutan MRSA dipanaskan pada hotplate selama 15 menit.
- Larutan MRSA yang telah mendidih disterilisasi sehingga diperoleh media MRSA steril.

Prosedur penanaman:

- Penanaman dilakukan pada tingkat pengenceran 10^4 dengan cara diambil 1 mL dari tabung reaksi 10^4 untuk dimasukkan ke dalam cawan petri secara duplo yaitu masing-masing pada dua cawan petri diisi sampel sebanyak 1 mL.
- Cawan petri yang telah diberi sampel kemudian diberi media \pm 15 mL ditunggu sampai dingin atau sampai padat lalu diinkubasi selama 3 hari.
- Tahap berikutnya setelah penginkubasian kemudian diamati dengan menghitung jumlah koloni bakteri dengan jumlah tertinggi merupakan hasil dari perlakuan yang terbaik.

3.3.4 Analisa *Shelf life*

Daya simpan (*shelf life*) ini berdasarkan hasil dari perlakuan terbaik. Hasil dari uji daya simpan terhadap sel terenkapsulasi yang dihasilkan kemudian dilakukan uji viabilitas dan dihitung dengan menggunakan persamaan masa simpan. Prosedur uji daya simpan dengan menggunakan penelitian Veni (2012) adalah sebagai berikut :

- mikroenkapsulat disimpan selama 14 hari pada suhu 5°C dan suhu 37°C.
- mikroenkapsulat yang telah disimpan selama 14 hari dihitung berdasarkan persamaan Sakane dan Kuroshima (1997) adalah sebagai berikut :

$$T = \frac{8 \log S_0}{(\log S_0 - \log S_{ac})}$$

S_0 adalah *survival rate* segera setelah proses pembuatan mikrokapsul dan S_{ac} adalah *survival rate* setelah disimpan selama dua minggu.

Mikrokapsul yang telah dilakukan dengan perlakuan *shelf life* dilakukan pengujian viabilitas. Adapun prosedur kerja adalah sebagai berikut:

Pengujian viabilitas mikrokapsul menggunakan metode dari penelitian Setijawati (2011) adalah sebagai berikut:

- Sampel sebanyak 2 gram dihaluskan kemudian ditambahkan ke dalam Na-fis steril 9 mL dan divortex selama 2 menit.
- Diambil 1 mL dan dilakukan pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-7} , diambil 1 mL dan dilakukan penanaman di dalam Media MRSA dari pengenceran 10^{-2} sampai 10^{-4} dan seterusnya secara duplo
- Diinkubasi selama 3 hari pada suhu 35-37°C kemudian dilakukan perhitungan koloni bakteri (cfu/mL) dengan menggunakan rumus (Fardiaz, 1988) :

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