

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang masalah

Informasi yang berkembang tentang bakteri probiotik pada beberapa dekade terakhir semakin berkembang. Banyak laporan yang mengindikasikan bahwa daya tahan hidup yang sangat rendah dari bakteri probiotik ini dalam makanan. Daya tahan hidup bakteri probiotik dalam saluran pencernaan manusia juga masih menjadi pertanyaan, sehingga kegiatan untuk melindungi bakteri ini menjadi suatu hal yang sangat menarik untuk dikembangkan. Teknologi mikroenkapsulasi dari bakteri probiotik mengalami perkembangan yang awalnya hanya digunakan pada teknologi kultur bakteri berubah menjadi teknologi untuk industri. (Kailasapathy, 2002)

Penelitian tentang mikroenkapsulasi bakteri probiotik masih sangat potensial untuk dikembangkan. Banyak bahan yang bisa digunakan sebagai bahan pengenkapsulat atau sebagai bahan penyalut misalnya kappa-karaginan (Adhikari *et al.*, 2000), alginat, cellar gum dan xanthan gum, chitosan, gelatin serta protein susu. (Burgain *et al.*, 2011)

Karaginan merupakan nama dari polisakarida galaktan yang dapat diekstraksi dari alga merah (Rhodophyceae). Karaginan komersial terbagi menjadi tiga bentuk yaitu kappa, iota dan lambda karaginan (Rasyid, 2003). Menurut Campo *et al.* (2009), karaginan merupakan polisakarida sulfat linier dari D-galaktosa dan 3,6-anhidro-D-galaktosa yang diekstraksi secara khusus dari rumput laut merah kelas Rhodophyceae. Karaginan secara ekstensif digunakan dalam industri makanan sebagai bahan pengental (thickening), bahan penge-gel (gelling), dan agen penggumpal protein serta dalam dunia farmasi sebagai pembentuk pil dan tablet. Berdasarkan pengetahuan yang mendalam dari aktivitas biologi karaginan ini, karaginan memiliki respon terhadap inflamasi dan sistem

imun maka karaginan memiliki potensi untuk digunakan sebagai agen penghambat virus herpes dan HPV karena polisakarida ini diindikasikan mampu melawan virus HPV

Bifidobacterium pertama kali diisolasi oleh Tissier (Institut Pasteur – Perancis) pada tahun 1899 dari bayi sehat yang disusui. Bakteri ini bersifat anaerobik, gram positif, tidak membentuk struktur ganda, berbentuk *pleomorphic* dan diberi nama *Bacillus bifiduss communis*. Bifidus berasal dari bahasa latin yang berarti terbelah menjadi dua (Ishibashi *et al.*, 1997). (Fritzen- freire *et al.*, 2012), melaporkan bahwa *Bifidobacterium* yang terkapsulasi dalam susu skim lebih mampu bertahan hidup dalam kondisi simulasi saluran pencernaan dibandingkan dengan *Bifidobacterium* yang tidak terkapsulasi (bebas).

Berdasarkan laporan Pyar dan Peh (2014), *L. acidophillus* teridentifikasi sebagai bakteri gram positif yang berbentuk coccus (batang), non motil serta bersifat katalase negatif. Bakteri ini dapat memfermentasi maltosa, laktosa, sukrosa dan glukosa akan tetapi tidak dapat memfermentasi arabinosa dan sorbitol. Menurut Kim *et al.* (2008), bakteri *L. acidophillus* yang terkapsulat dalam kalsium alginat mampu bertahan hidup saat di uji cobakan ke dalam saluran intestinal atau saluran usus. Berdasarkan laporan Setijawati *et al.* (2011), *L. acidophillus* yang terkapsulat dalam kappa karaginan mempunyai viabilitas sebesar 10^2 CFU/mL saat diujikan kedalam larutan pH 2 dari kepadatan awal 10^6 CFU/mL. Penggunaan kappa karaginan juga menghasilkan kapsul yang bersifat keras tetapi mudah pecah. Dalam penelitian ini digunakan campuran antara kappa dan iota karaginan untuk memperbaiki struktur mikrokapsul yang dihasilkan. Berdasarkan penelitian Brenner *et al.* (2014), struktur reologi terbaik pada campuran antara gel kappa dan iota karaginan yaitu pada rasio mendekati 1 : 1 (iota : kappa).

Berdasarkan latar belakang masalah tersebut, maka diketahui bahwa belum pernah dilakukan penelitian tentang penggunaan campuran antara *L. acidophilus* dan *B. bifidum* yang terkapsul dalam campuran kappa-iota SRC terhadap viabilitas probiotik dalam simulasi saluran pencernaan manusia. Sehingga dilakukan penelitian tentang pengaruh rasio konsentrasi *L. acidophilus* dan *B. bifidum* yang terkapsul dalam campuran kappa dan iota SRC terhadap viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum* untuk meningkatkan viabilitas probiotik saat di ujikan dalam simulasi saluran pencernaan manusia secara *in vitro*.

1.2 Rumusan masalah

Rumusan masalah yang mendasari penelitian ini adalah, apakah perbedaan rasio *L. acidophilus* dan *B. bifidum* terkapsul dalam campuran kappa-iota *semi refined carageenan* berpengaruh terhadap viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum* pada simulasi saluran pencernaan manusia secara *in vitro*.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini antara lain untuk mengetahui pengaruh rasio *L. acidophilus* dan *B. bifidum* terkapsul dalam campuran kappa-iota *semi refined carageenan* terhadap viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum* dalam simulasi saluran pencernaan manusia secara *in vitro*.

1.4 Hipotesis

Hipotesa yang mendasari penelitian ini adalah:

$H_1 =$ Diduga penggunaan campuran *L. acidophilus* dan *B. bifidum* pada rasio yang berbeda memberikan pengaruh terhadap viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum* pada simulasi saluran pencernaan manusia secara *in vitro*.

H_0 = Diduga penggunaan campuran *L. acidophilus* dan *B. bifidum* pada rasio yang berbeda tidak memberikan pengaruh terhadap viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum* pada simulasi saluran pencernaan manusia secara *in vitro*.

1.5 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi mengenai pengaruh campuran bakteri probiotik *L. acidophilus* dan *B. bifidum* yang terkapsulatkan dalam campuran kappa-iota *semi refined carageenan* terhadap viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum* pada simulasi saluran pencernaan manusia secara *in vitro* sehingga dapat digunakan sebagai pengembangan metode mikroenkapsulasi bakteri probiotik dimasa yang akan datang.

1.6. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian pendahuluan dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang pada bulan Maret – Mei 2014. Pemeliharaan dan penyimpanan kultur bakteri dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pengujian sifat fisik karaginan dilaksanakan di Laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya Malang pada bulan Juni 2014. Pengujian spektrofotometer FT-IR dilakukan di Laboratorium Sentral FMIPA Universitas Negeri Malang (UM) pada bulan Juni 2014. Penelitian utama dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang pada bulan Juni – Agustus 2014. Serta pengamatan dengan menggunakan *Scanning Electron Microscope* dilaksanakan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang pada bulan November 2014.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri probiotik

Bakteri probiotik merupakan bakteri yang berasal dari usus manusia, apabila dikonsumsi per oral akan menimbulkan dampak positif bagi tubuh. Terapi probiotik sebenarnya merupakan metoda tradisional yang digunakan untuk memperkuat daya tahan tubuh dan melawan penyakit. Dalam 10 tahun terakhir ini, penelitian mengenai probiotik dan prebiotik berkembang sangat pesat. Terdapat bukti bahwa probiotik bermanfaat dalam pencegahan dan pengobatan beberapa penyakit saluran cerna, termasuk diare infeksi, diare karena antibiotik, travellers diarrhea dan intoleransi laktosa (Shinta *et al.* 2011). Probiotik mampu mengurangi frekuensi dan durasi diare dengan meningkatkan respon imun, produksi substansi antimikroba dan menghambat pertumbuhan kuman patogen penyebab diare. Probiotik dengan galur spesifik efektif menurunkan frekuensi dan durasi diare. (Firmansyah, 2001)

Tidak semua jenis bakteri bisa digunakan sebagai probiotik. Ada beberapa persyaratan yang harus dipenuhi, diantaranya punya aktivitas antimikroba dan antikarsinogenik, mampu berkoloni dalam saluran pencernaan serta mampu meningkatkan penyerapan usus. Beberapa jenis probiotik yang sering digunakan adalah *Bifidobacterium brevis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, dan *Streptococcus thermophilus*. Di pasaran probiotik ini dijual dalam bentuk susu dan *food supplement*. (O'Grady dan Gibson, 2005)

2.2 Persyaratan bakteri probiotik

Probiotik memberikan efek fisiologis seperti antikolesterol, antihipertensi, intoleran laktosa, anti karsinogenik, gangguan saluran pencernaan serta alergi. Dengan memperhatikan kesehatan inangnya penambahan probiotik harus memperhatikan konsentrasi antara $10^7 - 10^{11}$ CFU/g per hari untuk manusia dan 10^7-10^9 /g per hari untuk binatang, sehingga dapat berperan untuk menurunkan kadar kolesterol. (Ooi dan Liong, 2010)

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

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

2.3 Keamanan bakteri probiotik dalam bahan pangan

Bakteri asam laktat termasuk mikroorganisme yang aman jika ditambahkan dalam pangan karena sifatnya tidak toksik dan tidak menghasilkan toksik, maka disebut *food grade microorganism* atau dikenal sebagai mikroorganisme yang *Generally Recognized As Safe* (GRAS) yaitu mikroorganisme yang tidak beresiko terhadap kesehatan, bahkan beberapa jenis bakteri tersebut berguna bagi kesehatan. BAL bermanfaat untuk peningkatan kualitas higiene dan keamanan

pangan melalui penghambatan secara alami terhadap flora berbahaya yang bersifat patogen. (O'Grady dan Gibson, 2005)

Senyawa yang dihasilkan oleh BAL adalah asam organik, suatu peptida yang bersifat antimikroba, berbagai jenis vitamin, asam folat serta senyawa flavor. BAL juga menurunkan pH lingkungannya dan mengeksresikan senyawa yang mampu menghambat mikroorganisme patogen seperti H₂O₂, diasetil, CO₂, asetaldehid, d-isomer, asam amino dan bakteriosin. Jumlah bakteri juga sangat penting diperhatikan karena berhubungan dengan kemanjuran produk probiotik bersangkutan dan juga untuk mencegah agar tidak terjadi "over dosis" meskipun belum ada laporan mengenai efek samping negatif probiotik dalam konsentrasi tinggi. Jumlah minimal strain probiotik yang ada dalam produk makanan minimum sebesar 10⁷ CFU/g atau jumlah strain probiotik yang harus dikonsumsi setiap hari sekitar 10⁶⁻⁸ CFU/g, dengan tujuan untuk mengimbangi kemungkinan penurunan jumlah bakteri probiotik pada saat berada dalam jalur pencernaan. (Manojlovic *et al.*, 2010)

2.4 Deskripsi *Lactobacillus acidophilus*

L. acidophilus merupakan bakteri asam laktat yang termasuk dalam filum firmicutes dan famili lactobacillales yang mempunyai morfologi berbentuk batang (basil). Menurut (Garrity *et al.*, 2004), klasifikasi bakteri ini adalah :

Domain	: Bacteria
Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Firmicutes
Order	: Lactobacillales
Family	: Lactobacillaceae
Genus	: Lactobacillus
Specific descriptor	: acidophilus
Scientific name	: <i>Lactobacillus acidophilus</i>



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

L. acidophilus merupakan bakteri asam laktat yang berbentuk batang (basil) dan termasuk dalam kelompok *low Gram positive bacteri* atau bakteri yang memiliki lapisan peptidoglikan yang sama dengan bakteri Gram negatif sehingga akan berwarna merah pada saat pewarnaan Gram. Bakteri dari jenis *Lactobacillus* akan tumbuh secara optimum pada pH antara 4,5 – 6,4 dan termasuk golongan *anaerob* fakultatif tetapi terkadang juga diklasifikasikan kedalam golongan *aerotolerant anaerobe* yang secara alamiah ditemukan pada tubuh manusia yaitu dalam mulut, saluran usus dan vagina. Bakteri ini tidak bersifat patogen. (Prescott *et al.*, 2002)

Rangkaian genom lengkap dari *L. acidophilus* telah berhasil ditentukan, akan tetapi hasil pengamatan ini belum banyak dipublikasikan. Beberapa hal terkait *L. acidophilus* yaitu (a) gen yang terkait pencernaan frukto-oligosakarida, (b) gen yang membawa sifat toleransi terhadap kondisi asam, (c) gen yang mempengaruhi lapisan sel, pembelahan sel dan pelekatan sel ke sel Caco-2. Pada akhirnya, hasil penelitian ini akan membantu menjelaskan sifat probiotik dari *L. acidophilus*. (Dellaglio *et al.*, 2007)

2.5 Deskripsi *Bifidobacterium bifidum*

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

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



Gambar 2. *B. bifidum*

Sumber : Prescott *et al.* (2002)

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

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

Permintaan pasar terhadap produk-produk yang mengandung bakteri probiotik semakin meningkat, sehingga bermunculan industri-industri yang memproduksi produk-produk probiotik dalam kemasan untuk memenuhi permintaan pasar tersebut. Salah satu bakteri probiotik yang menjadi target industri saat ini adalah *B. bifidum*. (Meena *et al.*, 2011)

2.6 Metode perhitungan koloni bakteri

Banyak cara yang dapat dilakukan untuk melakukan perhitungan koloni bakteri secara langsung, salah satunya adalah metode perhitungan cawan langsung (*total plate count*) dengan menggunakan pengenceran bertingkat dan metode agar tuang (*pour plate*) serta metode tebar (*spread plate*). Pada metode agar tuang, sebanyak 1 mL atau 0,1 mL larutan bakteri diinokulasikan kedalam cawan petri kosong, kemudian ditambahkan media agar cair lalu diratakan dengan cara cawan petri digerakkan secara zig-zag sampai larutan bakteri menjadi tercampur dengan agar cair dan dibiarkan sampai agar membeku baru kemudian di inkubasi untuk menumbuhkan bakteri inokulan. Koloni bakteri yang bersifat *aerobe* akan berada diatas permukaan agar, sedangkan koloni bakteri yang bersifat *anaerobe* akan tumbuh pada dasar media agar. Koloni bakteri yang tumbuh dinyatakan dalam satuan CFU (*colony forming units*) dengan syarat perhitungan koloni antara 25 – 300 koloni (U.S FDA), akan tetapi para ahli biologi banyak yang menggunakan syarat perhitungan koloni antara 30 – 300 koloni bakteri. (Tortora *et al.*, 2014)

Metode agar tuang digunakan secara luas untuk pengkulturan bakteri dan fungi. Sampel diencerkan secara bertingkat untuk mengurangi kepadatan populasi agar mendapatkan koloni terpisah pada saat ditanam. Sejumlah volume larutan

bakteri dicampur dengan media agar cair dengan suhu sekitar 45°C, lalu dituangkan kedalam cawan petri steril dengan cepat. Cawan yang memiliki jumlah koloni antara 30 – 300 akan dihitung. (Prescott *et al.*, 2002)

Metode perhitungan agar tuang memiliki kelemahan yaitu sensitifitasnya rendah dikarenakan koloni bakteri yang terdapat dalam agar tidak dapat diamati tanpa menggunakan perbesaran pada saat perhitungan koloni dilakukan. (Adams dan Moss, 2000)

2.7 Mikroenkapsulasi

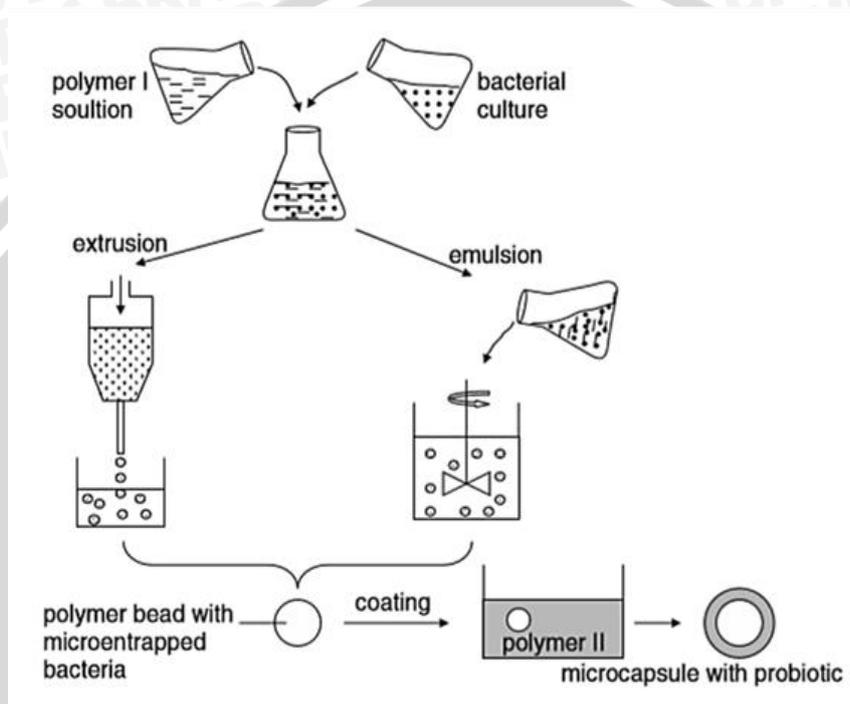
Mikroenkapsulasi merupakan suatu proses pembungkusan partikel padatan kecil, cairan ataupun gas dalam sebuah pembungkus yang berukuran 1 – 1000 μm . Akan tetapi untuk mengembangkan sistem enkapsulasi yang sesuai dengan target, diperlukan suatu pengetahuan yang mendalam tentang sifat-sifat bahan yang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

Teknologi mikroenkapsulasi digunakan untuk menjaga viabilitas bakteri probiotik selama pemrosesan produk dan penyimpanan. Hal terpenting dalam proses mikroenkapsulasi bakteri probiotik adalah mikrokapsul mampu menjaga bakteri probiotik tetap hidup serta melepaskan bakteri probiotik tersebut saat mencapai organ saluran pencernaan yang dituju. (Rokka dan Rantamäki, 2010)

2.7 Pembuatan mikrokapsul dengan metode gel partikel

Menurut Manojlovic *et al.* (2010), metode yang sering digunakan dalam proses pembuatan mikrokapsul bakteri probiotik disebut dengan metode gel partikel yaitu gabungan antara metode ekstruksi dengan metode emulsifikasi. Dalam metode gel partikel ini, kultur murni dari bakteri probiotik akan dicampur dengan larutan polimer (bahan pengkapsulat) kemudian disemprotkan dengan

menggunakan jarum-jarum dengan diameter lubang 0,3 – 3 mm kedalam larutan penjendal (pembentuk gel) sehingga akan menghasilkan butiran-butiran mikro kapsul dengan diameter sesuai dengan ukuran lubang jarum yang digunakan. Proses mikroenkapsulasi dengan metode gel partikel secara lengkap dapat dilihat pada **Gambar 3**.



Gambar 3. Mikroenkapsulasi dengan metode gel partikel

Sumber : Manojlovic *et al.* (2010)

2.9 Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan mikro kapsul

Bahan-bahan yang sering digunakan dalam pembuatan mikro kapsul antara lain kappa-karaginan (Adhikari *et al.*, 2000), alginat, cellar gum dan xanthan gum, chitosan, gelatin serta protein susu (Burgain *et al.* 2011). Bahan pembuat mikro kapsul yang digunakan dalam penelitian ini adalah karaginan yang diekstraksi dari rumput laut jenis *E. cottoni* dan *E. spinosum*.

Karaginan merupakan polisakarida alami yang diperoleh dari rumput laut merah yang dapat dimakan. Kata karaginan berasal dari nama spesies rumput laut *Chondrus crispus* yang dikenal sebagai lumut Carrageen atau lumut Irlandia dalam

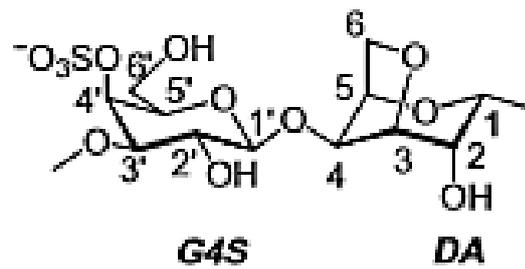
bahasa Inggris, dikenal sebagai Carragin di Irlandia. Karaginan digunakan dalam berbagai aplikasi komersial sebagai *gelling agent*, bahan pengental (thickening) dan bahan penstabil (*stabilizing agent*) terutama dalam produk makanan dan saus. Selain itu karaginan juga digunakan dalam dunia farmasi serta dalam aplikasi industri. (Necas dan Bartosikova, 2013)

Senyawa utama karaginan terdiri dari galaktosa dan 3,6 anhidrogalaktosa yang mengandung ester natrium sulfat, amonium, kalsium, magnesium, dan kalium yang dapat diekstrak dari rumput laut kelas rhodophyceae dari jenis *Eucheuma*, *Chondrus*, *Gigartina*, *Hypnea*, *Iradaea*, *Philophora*, *Furcellaria*, *Gynmogongrus*, *Ahnfeltia*, *Anatheca*, dan *Meristhoteca*. (SNI, 2013)

1). **Kappa karaginan**

Kappa karaginan ditandai dengan adanya gugus D-galaktosa-4-sulfat dengan ikatan β -1,3 dan 3,6-anhidro-D-galaktosa dengan ikatan α -1,4. Pada analisa dengan menggunakan spektrofotometer infra merah, gugus fungsi D-galaktosa-4-sulfat akan muncul pada panjang gelombang 840-840 cm^{-1} , gugus 3,6-anhidro-D-galaktosa akan muncul pada panjang gelombang 928-933 cm^{-1} , gugus 3,6-anhidrogalaktosa-2-sulfat akan muncul pada panjang gelombang 800-805 cm^{-1} serta gugus fungsi ester sulfat akan muncul pada panjang gelombang 1220-1260 cm^{-1} . (FAO, 2001)

Setijawati *et al.* (2011) melaporkan bahwa kappa karaginan dapat digunakan sebagai bahan pengkapsulat karena kappa karaginan memiliki kekuatan gel yang bagus karena adanya gugus fungsi anhidro galaktosa (AG). Dengan adanya gugus fungsi AG ini akan menghasilkan pembentukan gel dengan nilai kekuatan gel yang tinggi seperti yang terjadi pada agar. Struktur kimia kappa karaginan ditunjukkan pada **Gambar 4**.



Gambar 4. Struktur Kappa Karaginan

Sumber : Campo *et al.* (2009)

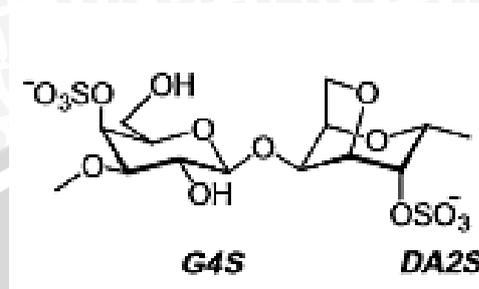
Gugus G4S merupakan singkatan nama IUPAC dari -D-galaktosa-4-sulfat dengan ikatan β -1,3 serta gugus fungsi DA yang merupakan singkatan dari 3,6-anhidrogalaktosa-galaktosa dengan ikatan α -1,4. Adanya gugus anhidrogalaktosa ini menyebabkan kappa karaginan memiliki kekuatan gel yang bagus serta karaginan juga bersifat larut dalam air tetapi tidak larut dalam pelarut organik, minyak ataupun lemak. (Campo *et al.*, 2009)

Kappa karaginan akan membentuk gel dengan tekstur keras dengan adanya ion K^+ (garam kalium), akan tetapi akan membentuk gel dengan sifat rapuh dengan adanya ion kalsium (Ca^{2+}) serta akan mengalami sineresis jika membentuk gel (Hernández-Carmona G. 2013). Kandungan unsur-unsur yang terdapat dalam kappa karaginan antara lain Natrium (Na) sebesar 0,32%, Kalium (K) 9,1%, Kalsium (Ca) 0,88%, Magnesium (Mg) 0,18% dan kandungan Sulfur (S) sebesar 7,7%. (Brenner *et al.*, 2014)

2). Iota karaginan

Iota karaginan merupakan karaginan yang diekstraksi dari rumput laut jenis *Euचेuma spinosum*. Iota karaginan akan menunjukkan beberapa ciri pada saat dilakukan analisa gugus fungsional menggunakan spektrofotometer FT-IR. Gugus ester sulfat akan muncul pada panjang gelombang $1220 - 1260\text{ cm}^{-1}$, gugus fungsi 3,6-anhidrogalaktosa pada panjang gelombang $928-933\text{ cm}^{-1}$, gugus fungsi

galaktosa-4-sulfat akan muncul pada panjang gelombang 840-850 cm^{-1} serta gugus fungsi 3,6-anhidrogalaktosa-2-sulfat akan muncul pada panjang gelombang 800-805 cm^{-1} (FAO, 2001). Struktur iota karaginan dapat dilihat pada **Gambar 5**.



Gambar 5. Struktur Iota Karaginan
Sumber : Campo *et al.* (2009)

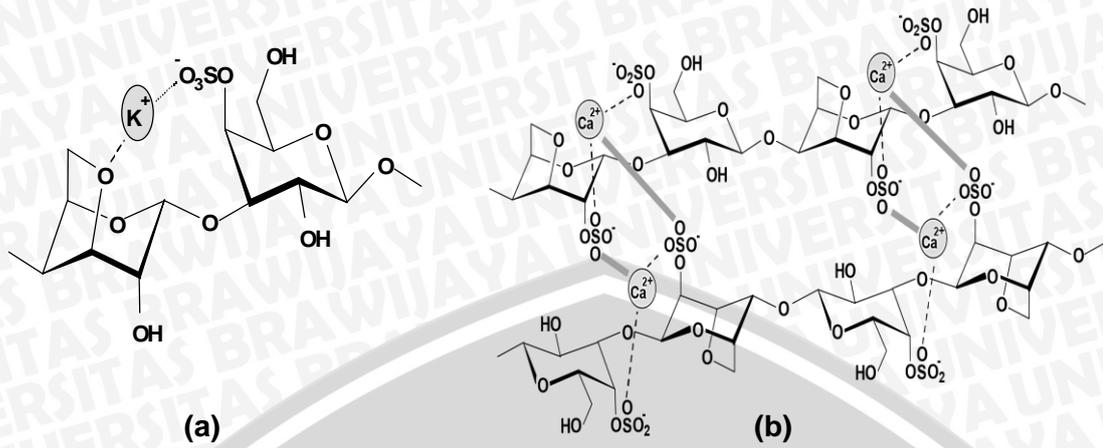
Menurut Campo *et al.* (2009), gugus G4S merupakan singkatan nama IUPAC dari D-galaktosa-4-sulfat dengan ikatan β -1,3 serta gugus fungsi DA2S yang merupakan singkatan dari 3,6-anhidrogalaktosa-2-sulfat dengan ikatan α -1,4. Rasyid (2003) melaporkan bahwa perbedaan antara kappa dan iota karaginan adalah pada proses esterifikasi dengan asam sulfat, dimana kappa karaginan teresterifikasi dengan gugus hidroksil pada C-4 galaktosil dengan kadar sulfat sebesar 25 - 30%. Sedangkan pada iota karaginan, teresterifikasi dengan gugus hidroksil pada C-2 anhidrogalaktosil dengan kadar sulfat sekitar 23 - 35%.

Iota karaginan akan membentuk gel dengan tekstur keras dengan adanya ion Ca^{2+} (garam kalsium), gel yang terbentuk bersifat elastis dan bening, stabil pada saat mengalami *thawing* serta tidak mengalami sineresis saat membentuk gel (Hernández-Carmona G. 2013). Kandungan unsur-unsur yang terdapat dalam kappa karaginan antara lain Natrium (Na) sebesar 0,84%, Kalium (K) 3,3%, Kalsium (Ca) 3,3%, Magnesium (Mg) 0,21% dan kandungan Sulfur (S) sebesar 13,1%. (Brenner *et al.*, 2014)

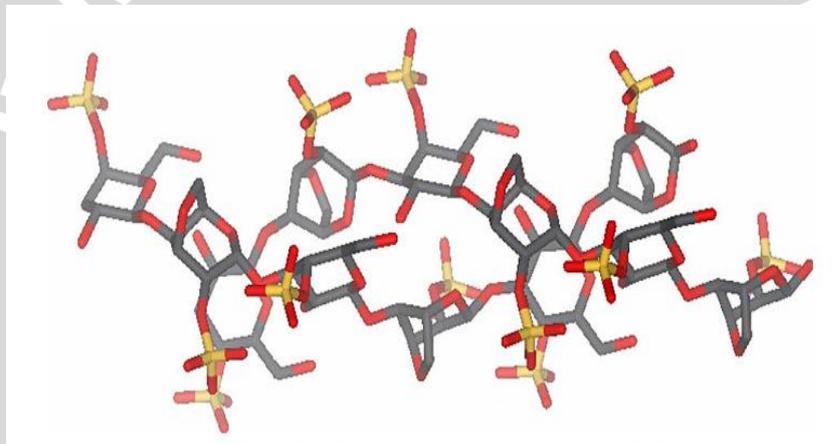
2.10 Mekanisme terbentuknya gel pada kappa dan iota karaginan

Mekanisme terbentuknya gel pada karaginan diawali dengan berubahnya struktur heliks pada karaginan. Kappa dan iota karaginan dapat dibagi dalam dua bentuk yaitu gulungan-gulungan heliks tidak terstruktur yang mengalami peningkatan seiring dengan adanya peningkatan suhu, serta gulungan-gulungan heliks ganda terstruktur yang terbentuk pada saat pendinginan. Proses ini dipengaruhi oleh jumlah kandungan gugus sulfat dalam karaginan, jumlah prekursor serta beberapa faktor eksternal lain misalnya suhu, pH, konsentrasi karaginan dan kecepatan pendinginan.

Pada suhu sekitar 60°C, kappa dan iota karaginan akan berbentuk gulungan-gulungan heliks yang tidak terstruktur. Kemudian akan membentuk rantai heliks ganda yang terstruktur pada saat suhu mencapai sekitar 38°C dan membentuk suatu unit besar yang disebut “serat atau *fiber*”, “kumpulan heliks”, atau “batang-batang heliks”. Ion Kalium (K^+) bertindak sebagai lem intramolekuler membentuk interaksi elektrostatik dengan gugus ester sulfat serta gugus anhidrogalaktosa dan atom oksigen dari kappa karaginan. Sedangkan pada iota karaginan, rantai heliks tunggal akan membentuk rantai heliks ganda dijumpai oleh ion kalsium (Ca^{2+}). Kumpulan-kumpulan heliks yang terbentuk dari iota karaginan tidak sebanyak yang dibentuk oleh kappa karaginan. Lambda karaginan tidak bisa membentuk gel karena lambda karaginan selalu membentuk konformasi heliks acak (Velde, F., Ruiten 2002) Struktur lengkap kappa dan iota karaginan dapat dilihat pada **Gambar 6** serta model heliks ganda dari iota karaginan dapat dilihat pada **Gambar 7**.



Gambar 6. Ikatan intramolekuler dalam karaginan : (a) Ikatan intramolekuler oleh ion K^+ pada kappa karaginan; (b) Jembatan intramolekuler oleh ion Ca^{2+} pada iota karaginan



Gambar 7. Model heliks ganda pada iota karaginan
 Sumber : Campo *et al.* (2009)

Jumlah prekursor pada proses preparasi karaginan mempunyai efek negatif terhadap sifat produk yang dihasilkan misalnya kekuatan gel sehingga industri pengolahan karaginan pada saat ini disarankan untuk menggunakan metode proses alkali yang dikatalisis dengan anion hidroksida (OH^-) untuk menghasilkan ikatan 3,6-anhidrogalaktoza yang terbentuk melalui pemanasan polisakarida dalam larutan alkali panas sehingga 3 gugus OH^- terionisasi dan mengalami pergeseran gugus sulfat pada posisi 6. (Campo *et al.*, 2009)

2.11 Sistem pencernaan manusia

Sistem pencernaan manusia yang dikenal sebagai *digestive tract* atau *GI tract* merupakan suatu rangkaian dari organ yang terhubung satu sama lain dimulai dari mulut sampai dengan anus. Sistem pencernaan berfungsi untuk mendapatkan energi dan nutrisi dari makanan yang kita makan. Sistem pencernaan makanan dapat memiliki panjang sampai 30 kaki atau kurang lebih sekitar 9 meter pada orang dewasa. Sistem ini terbagi menjadi delapan organ utama yaitu mulut, esofagus, lambung, usus kecil, usus besar, serta dibantu dengan hati, pankreas serta kelenjar empedu yang mensekresikan zat untuk membantu proses pencernaan. Organ-organ ini memiliki enam tugas utama yaitu proses pencernaan, sekresi, mendorong makanan, mencerna, menyerap serta pembuangan. (ASGE 2014)

Peran utama dari saluran pencernaan manusia adalah pencernaan dan penyerapan nutrisi. Hal ini memiliki fungsi yang sangat utama dalam menjaga keseimbangan tubuh. Saluran pencernaan juga membentuk suatu pelindung untuk melawan material yang tidak diinginkan melalui proses ekskresi. Selain itu, fungsi imunitas dari saluran pencernaan mampu bertahan untuk melawan infeksi dan mencegah reaksi sensitifitas. Akan tetapi hal ini tergantung pada imunoregulasi pada tingkat mukosa. (Bartlop D. 1990)

2.11.1 Lambung (*Gastric organ*)

Lambung merupakan organ besar yang memiliki struktur tebal serta mensekresikan cairan-cairan pencernaan. Aktifitas sekresi ini dirangsang oleh bau dan rasa makanan serta gerakan mengunyah makanan. Cairan yang disekresikan merupakan enzim pepsin dengan pH 2 yang mengandung asam klorida serta lendir. pH yang sangat asam ini membantu membunuh bakteri-bakteri yang ikut masuk kedalam saluran pencernaan bersama makanan. (Pearce, 1973)

Kelenjar dari lapisan mukosa lambung akan mensekresikan cairan pencernaan penting yaitu getah lambung berupa cairan bening tidak berwarna yang mengandung 0,4% asam hidroklorida (HCl). Selain itu dalam lambung juga terdapat enzim pencernaan yaitu pepsin yang berasal dari pepsinogen dalam lingkungan asam hidroklorida dan berfungsi untuk mengubah protein menjadi pepton. (Cook *et al.*, 2012)

2.11.2 Saluran usus (*Intestinal organ*)

Saluran usus terbagi menjadi dua bagian yaitu usus kecil dan usus besar. Usus kecil terbagi lagi menjadi tiga yaitu duodenum, jejunum dan ileum. Fungsi usus kecil antara lain mencerna protein menjadi peptida dan asam-asam amino. Peptida kemudian dipecah menjadi asam amino, lemak dipecah menjadi asam-asam lemak dan gliserol serta karbohidrat dipecah menjadi senyawa gula yang lebih sederhana. (Cook *et al.*, 2012)

Dalam saluran usus kecil, kandungan cairan usus dicampur dengan sekresi sel mukosa serta dengan larutan pankreas dan cairan empedu. Usus kecil mengeluarkan cairan sebanyak 9 liter per hari. 7 liter berasal dari sekresi cairan *gastrointestinal* dan 2 liter cairan berasal dari makanan yang dimakan, akan tetapi hanya 1 – 2 liter yang dikeluarkan melalui kolon. (Ganong, 1983)

Di dalam organ usus terdapat kelompok mikroflora yang komposisinya mirip dengan mikroflora yang ada di kolon (usus besar). Istilah mikroflora usus umumnya diartikan sebagai flora bakteri dari tinja karena flora usus bagian distal (ileum-kolon) hampir identik dengan yang terdapat pada tinja. Tampak bahwa pada saluran cerna bagian proksimal jumlah bakteri relatif sedikit dibandingkan dengan di dalam kolon. Mendekati katup ileosekum, yaitu pada ileum, jumlah bakteri mulai meningkat dan komposisinya juga mirip dengan yang terdapat di

dalam kolon (Firmansyah, 2001). Komponen mikroflora didalam usus manusia dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Komponen mikroflora dalam usus manusia (CFU/g)

Jumlah bakteri	Lambung 0 – 10 ³	Jejunum 0 - 10 ⁴	Ileum 10 ⁵ – 10 ⁸	Kolon 10 ¹⁰ - 10 ¹²
Aerob dan anaerob fakultatif				
• <i>Streptococcus</i>	0 – 10 ³	0 – 10 ⁴	10 ² – 10 ⁵	10 ⁴ – 10 ⁹
• <i>Lactobacillus</i>	0 – 10 ³	0 – 10 ⁴	10 ² – 10 ⁵	10 ⁶ – 10 ¹⁰
• <i>Staphylococcus</i>	0 – 10 ²	0 – 10 ²	10 ² – 10 ⁵	10 ² – 10 ⁵
• <i>Enterobacteria</i>	0 – 10 ²	0 – 10 ³	10 ³ – 10 ⁸	10 ⁵ – 10 ⁸
• Jamur	0 – 10 ²	0 – 10 ²	10 ² – 10 ⁴	10 ⁴ – 10 ⁶
Anaerob				
• <i>Bacteriodes</i>	0	0	10 ³ – 10 ⁷	10 ⁹ – 10 ¹²
• <i>Bifidobacteria</i>	0	0	10 ³ – 10 ⁶	10 ⁸ – 10 ¹⁰
• <i>Clostridium</i>	0	0	10 ² – 10 ⁴	10 ⁸ – 10 ⁹
• <i>Eubacteria</i>	0	0	0	10 ⁹ – 10 ¹²

Sumber : Firmansyah (2001)



3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi penelitian

3.1.1 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam pembuatan SRC adalah rumput laut *E. cottoni* dan *E. spinosum* yang didatangkan dari perairan Kabupaten Sumenep Pulau Madura Jawa Timur berupa rumput laut basah yang dipanen pada umur 45 hari. Sampel rumput laut dibawa dengan menggunakan wadah berupa kardus untuk mencegah bahan mengalami kekeringan selama transportasi.

Bakteri probiotik menggunakan jenis bakteri asam laktat *L. acidophilus* yang diperoleh dari stok laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan *B. bifidum* yang didatangkan dari stok bakteri Universitas Gadjah Mada Daerah Istimewa Yogyakarta. Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan SRC antara lain air, aquadest, CaCl_2 teknis, KOH teknis dan KCl teknis. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan mikrokapsul adalah sol SRC, KCl 0,3 M, aquades serta kertas saring. Pengujian viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum* dalam simulasi pH saluran pencernaan antara lain MRS-Agar, *Bile Salt Oxgall*, NaCl, enzim pepsin, HCl, KCl, CaCl_2 dan NaHCO_3 , Sodium Thiosulphate.

3.1.2 Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan pada pembuatan SRC adalah baskom, blender, *beaker glass* 1000 ml, gelas ukur 100 ml, *waterbath*, *stopwatch*, spatula, kain saring, timbangan analitik, loyang, pH *paper*, dan ayakan. Alat yang digunakan pada pembuatan mikrokapsul adalah *beaker glass* 1000 mL, *hotplate*, *magnetic stirrer*, gelas ukur 100 LI, spatula, oven, loyang, *beaker glass* 50 mL serta spuit 50mL dengan jarum berdiameter 1 mm. Alat yang digunakan untuk menganalisa viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum* adalah tabung reaksi, cawan petri,

mikropipet, *blue tip*, *Laminar Air Flow*, bunsen, *sprayer* alkohol, *stirrer incubator*, *colony counter* serta inkubator dan timbangan sartorius.

3.2 Metode dan rancangan penelitian

3.2.1 Metode *pre-experiment*

Penelitian ini menggunakan merupakan jenis penelitian *pre-experiment* dengan tujuan untuk membuktikan adanya pengaruh perbedaan rasio konsentrasi *L. acidophilus* dan *B. bifidum* yang terkapsulat dalam campuran kappa-iota karaginan pada simulasi saluran pencernaan secara *in vitro*.

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

1. Variabel bebas : Perbedaan rasio probiotik (*L. acidophilus* dan *B. bifidum*)
2. Variabel terikat : viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum* pada simulasi saluran pencernaan secara *in vitro*.

3.2.2 Rancangan penelitian dan teknik analisa data

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Rancangan Acak Lengkap sederhana (tanpa interaksi) dengan 3 perbedaan rasio probiotik dengan 3 kali ulangan. Menurut Nugroho (1990) untuk menentukan banyaknya ulangan ditentukan dengan

$$a(n-1) \geq 10 = \text{db galat}$$

dimana :

n = banyaknya ulangan

a = banyaknya perlakuan

Penelitian ini terbagi menjadi dua macam percobaan yaitu pengujian dalam simulasi lambung (*gastric tract*) pada pH 2 dan pengujian dalam simulasi usus (*intestinal tract*) pada pH 7. Desain rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Model rancangan percobaan

Perlakuan	Rasio probiotik	Ulangan			Rerata
		1	2	3	
pH 2	K	K1	K2	K3	
	A	A1	A2	A3	
	B	B1	B2	B3	
	C	C1	C2	C3	
pH 7	K	K1	K2	K3	
	A	A1	A2	A3	
	B	B1	B2	B3	
	C	C1	C2	C3	

Keterangan :

K = *L. acidophilus* dan *B. bifidum* terkapsulasi (Kontrol)

A = *L. acidophilus* : *B. bifidum* dengan rasio 1 : 1

B = *L. acidophilus* : *B. bifidum* dengan rasio 1 : 3

C = *L. acidophilus* : *B. bifidum* dengan rasio 3 : 1

Model matematis Rancangan Acak Lengkap menurut Tanujaya (2013) adalah

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

Dimana :

Y_{ij} = nilai respon dari perlakuan ke-i pada ulangan ke-j yang teramati

μ = nilai rata-rata umum

α_j = kontribusi perlakuan ke-i

ε_{ij} = sisaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini kemudian dilakukan pengujian normalitas menggunakan metode Kolmogorov-Smirnov, lalu dilanjutkan dengan ANOVA untuk mengetahui besarnya nilai F menggunakan program SPSS V.18. Jika hasil analisis keragaman menunjukkan adanya perbedaan pada taraf 5% maka dilanjutkan dengan uji BNT 5%.

3.3 Prosedur penelitian

3.3.1 Penelitian pendahuluan

3.3.1.1 Pembuatan Semi *Refined Carrageenan* (SRC) *E. cottoni* dan *E. spinosum* (Hernández-Carmona dan Hernández-Garibay 2013)

Rumput laut *E. cottoni* dan *E. spinosum* segar dicuci sampai bersih lalu dijemur sampai kering. Rumput laut *E. cottonii* dan *E. spinosum* yang telah kering ditimbang sebanyak 20 gram kemudian ditambahkan air dengan perbandingan 1 : 20 dan direndam selama 24 jam, lalu dipanaskan dalam *waterbath* selama 30 menit dengan suhu $\pm 80^\circ$ C. Rumput laut yang telah dipanaskan diblender sampai menjadi pasta kemudian diekstraksi. Pasta *E. cottonii* diekstraksi dengan menggunakan KOH dan *E. spinosum* dengan menggunakan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ selanjutnya dipanaskan dengan suhu $\pm 80^\circ$ C selama 2 jam. Pasta yang telah dipanaskan kemudian dinetralkan dengan HCl 0,2 N lalu disaring dengan kain saring sampai didapat residu dan filtrat. Residu *E. cottonii* dicuci dengan KCl 1,5% dan residu *E. spinosum* dicuci dengan CaCl_2 1,5% kemudian didiamkan sampai membentuk gel. Setelah membentuk gel kemudian dijemur sampai kering dan digiling sampai menjadi serbuk lalu didapatkan *Semi Refined Carrageenan* (SRC). Selengkapnya dapat dilihat dalam **Lampiran 1**.

3.3.1.2 Uji *Fourier Transform Infrared Spectrometer* (FT-IR)

Pengujian spektrofotometer FT-IR dilakukan di Laboratorium Sentral FMIPA Universitas Negeri Malang (UM) untuk mengetahui gugus fungsional dari SRC yang dihasilkan dari ekstraksi *E. cottoni* dan *E. spinosum*. Spektrum *infrared* dihasilkan dari pentransmisiian cahaya yang melewati sampel kemudian diplot sebagai intensitas fungsi energi, panjang gelombang (μm) atau bilangan gelombang (cm^{-1}). Analisis gugus fungsi sampel dilakukan dengan membandingkan pita absorbansi yang terbentuk pada spektrum *infrared* menggunakan tabel korelasi dan menggunakan spektrum senyawa pembanding yang sudah diketahui (Ewing,1985)

3.3.1.3 Pengukuran kekuatan gel (Yasin, 2005)

Pengukuran kekuatan gel dilakukan di Laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya Malang untuk mengetahui besarnya kekuatan gel dari SRC yang dihasilkan. Pengukuran kekuatan gel dilakukan dengan menggunakan alat texture analyzer jenis TA-XT2i *Texture Analyzer* (Texture Technologist Corp., Scarsdale NY/Stable Microsystem, Godalmin, Surrey, UK). Nilai kekuatan gel diukur menggunakan probe dengan diameter ¼ inchi yang terbuat dari bahan baja stainless dan kecepatan pengukuran sebesar 10 mm/detik. Nilai kekuatan gel yang dihasilkan dinyatakan dalam satuan Newton (N).

3.3.1.4 Pembuatan mikrokapsul (Manojlovic *et al.*, 2010 termodifikasi)

Ditimbang sebanyak 2,25 gram SRC (1,125 gram kappa SRC dan 1,125 gram iota SRC) ditambahkan 30 ml akuades kemudian dipanaskan di atas *hot plate* hingga mencapai suhu 97°C, sambil terus diaduk karaginan diangkat dari *hot plate* dan suhunya diturunkan hingga 40-45°C sambil terus diaduk agar tidak cepat membentuk gel. Sebanyak 30 mL kultur *L. acidophilus* dan *B. bifidum* dimasukkan kedalam sol karaginan, dan diaduk hingga homogen dengan menggunakan *magnetic stirrer* pada 1000 rpm. Campuran sel dan sol dimasukkan kedalam larutan 75 ml larutan KCl 0,3 M menggunakan spuit 50 mL dengan jarum berukuran 1 mm, pengadukan dilakukan menggunakan *magnetic stirrer* selama 10 menit, mikrokapsul yang didapat disaring menggunakan kertas saring. Kemudian mikrokapsul dikeringkan dalam oven dengan suhu 40°C selama 48 jam hingga kering dan menjadi serbuk mikrokapsul. Selengkapnya dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

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

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

Keterangan :

N = jumlah sel hidup yang terlepas dari mikrosfer setelah proses pengeringan.

N₀ = jumlah sel hidup yang ditambahkan (kepadatan awal)

3.3.2 Penelitian utama

3.3.2.1 Pengujian mikrokapsul dalam *gastric tract* (Chávarri *et al.*, 2010 termodifikasi)

Larutan simulasi *gastric tract* (*Simulated Gastric Juice / SGJ*) dibuat dari 9 g/L NaCl yang mengandung 3 g/L pepsin dan pH 2 didapatkan dengan menambahkan HCl. Sebanyak 2 g campuran *L. acidophilus* dan *B. bifidum* dimasukkan kedalam 10 mL SGJ lalu di inkubasi pada suhu 37°C selama selama 2 jam dengan pengadukan konstan 50 rpm. Perhitungan viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum* dilakukan dengan menggunakan dua kondisi yaitu kondisi yang dikhususkan untuk mengoptimalkan pertumbuhan *L. acidophilus* dan kondisi kedua dilakukan untuk mengoptimalkan pertumbuhan *B. bifidum*. selengkapnya dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

Perhitungan viabilitas *L. acidophilus* dilakukan dengan menggunakan metode Freire *et al.* (2013) termodifikasi sebagai berikut, sebanyak 1 g mikrokapsul dimasukkan kedalam 10 mL *Peptone Saline* (PS) yang mengandung NaCl 0,9% dan *pepton water* 1% kemudian dihomogenkan dengan *vortex mixer* selama 30 detik. Selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sebanyak 7 kali dan dilakukan penanaman pada pengenceran 10⁻⁴ - 10⁻⁷ secara duplo dalam MRS-Agar dengan menggunakan metode tuang. Lalu di inkubasi dalam inkubator pada

suhu 37°C selama 72 jam. Perhitungan viabilitas dilakukan dengan menggunakan perhitungan *Total Plate Count* (TPC) dalam satuan log CFU/mL.

3.3.2.2 Pengujian Mikrokapsul dalam *Intestinal tract* (Chávvari *et al.*, 2010 termodifikasi)

Simulasi larutan *intestinal tract* (*Simulated Intestinal Juice* / SIJ) dibuat dengan melarutkan 3,0 g/L bile salt pada larutan intestinal (6,5 g/L NaCl, 0,835 g/L KCl, 0,22 g/L CaCl₂ dan 1,386 g/L NaHCO₃) yang memiliki pH 7,5. Selanjutnya sebanyak 2 g sampel campuran *L.acidophilus* dan *B.bifidum* dimasukkan dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan pengadukan konstan 50 rpm. Selengkapnya dapat dilihat dalam **Lampiran 4**.

Perhitungan viabilitas *B. bifidum* dilakukan dengan menggunakan metode Cai *et al.* (2014) yaitu mikrokapsul diambil sebanyak 1 g kemudian dimasukkan kedalam 10 mL larutan PS dan dihomogenkan menggunakan *vortex mixer* selama 30 detik. Kemudian dilakukan pengenceran bertingkat sebanyak 7 kali dan dilakukan penanaman secara duplo pada pengenceran 10⁻⁴ - 10⁻⁷ dengan menggunakan metode tuang dalam media MRS-Agar ditambah dengan Sodium thiosulphate 1%. Lalu diinkubasi dalam kondisi anaerob pada suhu 37°C selama 72 jam. Perhitungan viabilitas dilakukan dengan menggunakan perhitungan *Total Plate Count* (TPC) dalam satuan log CFU/mL.

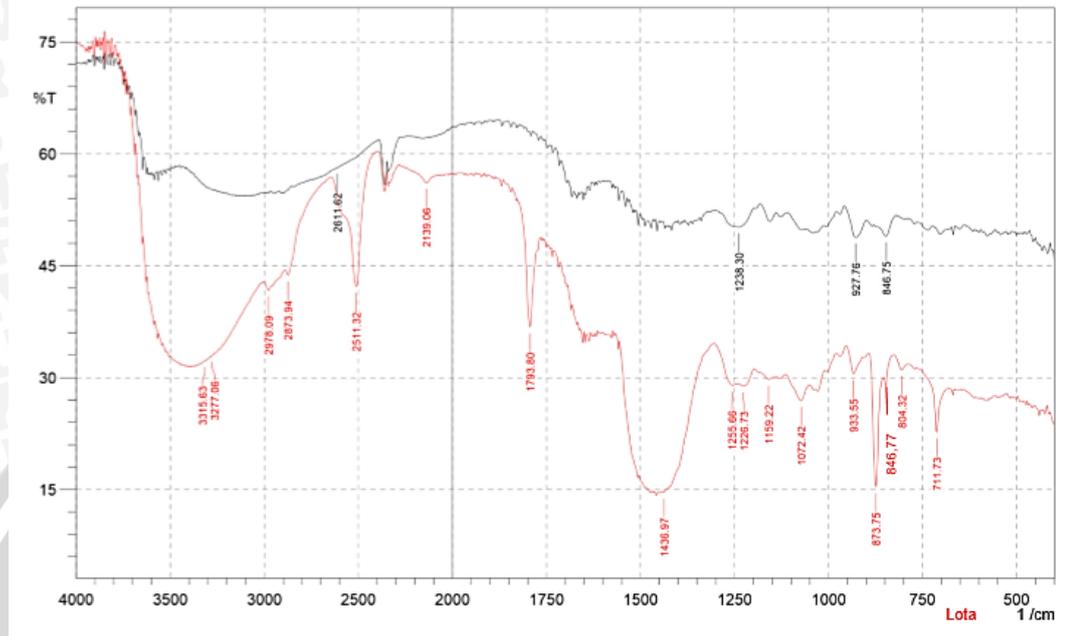
4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Spektra FT-IR SRC *E. cottoni* dan *E. spinosum*

Analisa karaginan dari *E. cottoni* dan *E. spinosum* menggunakan spektrofotometer FT-IR dilakukan untuk mengetahui gugus fungsional dari karaginan yang dihasilkan dengan dari proses semi murni (*semi refined*). SRC dari *E. cottoni* gugus fungsi ester sulfat muncul pada panjang gelombang 1238,3 cm^{-1} . Gugus fungsi 3,6-anhidrogalaktosa muncul pada panjang gelombang 927,76 cm^{-1} . Gugus fungsi galaktosa-4-sulfat muncul pada panjang gelombang 846,75 cm^{-1} . Menurut FAO (2001), kappa karaginan ditandai dengan gugus D-galaktosa-4-sulfat dan 3,6-anhidro-D-galaktosa. Analisa menggunakan spektrofotometer FT-IR, gugus fungsi D-galaktosa-4-sulfat akan muncul pada panjang gelombang 840-850 cm^{-1} , gugus 3,6-anhidro-D-galaktosa akan muncul pada panjang gelombang 928-933 cm^{-1} , gugus 3,6-anhidrogalaktosa-2-sulfat akan muncul pada panjang gelombang 800-805 cm^{-1} serta gugus fungsi ester sulfat akan muncul pada panjang gelombang 1220-1260 cm^{-1} . Sehingga dapat disimpulkan bahwa SRC yang dihasilkan dari *E. cottoni* merupakan kappa karaginan.

SRC dari *E. spinosum* gugus fungsi ester sulfat muncul pada panjang gelombang 1226,73 cm^{-1} , gugus fungsi 3,6-anhidrogalaktosa muncul pada panjang gelombang 933,55 cm^{-1} , gugus fungsi galaktosa-4-sulfat muncul pada panjang gelombang 846,77 cm^{-1} serta gugus fungsi 3,6-anhidrogalaktosa-2-sulfat muncul pada panjang gelombang 804,32 cm^{-1} . Menurut FAO (2001), iota karaginan gugus ester sulfat akan muncul pada panjang gelombang 1220 – 1260 cm^{-1} , gugus fungsi 3,6-anhidrogalaktosa pada panjang gelombang 928-933 cm^{-1} , gugus fungsi galaktosa-4-sulfat akan muncul pada panjang gelombang 840-850 cm^{-1} serta gugus fungsi 3,6-anhidrogalaktosa-2-sulfat akan muncul pada panjang gelombang 800-805 cm^{-1} . Sehingga dapat disimpulkan bahwa karaginan yang

dihasilkan dari *E. spinosum* merupakan iota karaginan. Hasil analisa spektrofotometer FT-IR *E. cottoni* dan *E. spinosum* dapat dilihat pada **Gambar 7**.



Gambar 7. Spektra FT-IR *E. cottoni* dan *E. spinosum*

— : SRC *E. spinosum*

— : SRC *E. cottoni*

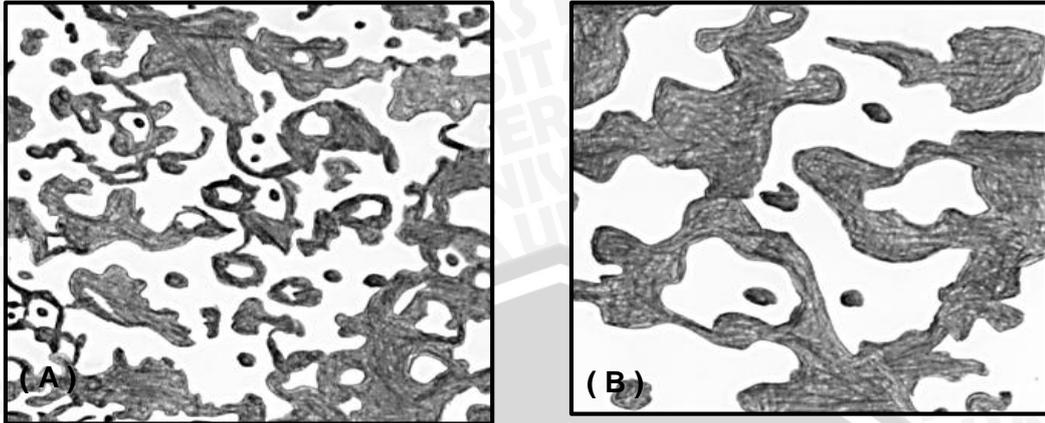
4.2 Karakteristik gel yang dihasilkan dari kappa dan iota SRC

Pada suhu sekitar 60°C, kappa dan iota karaginan akan berbentuk gulungan-gulungan heliks yang tidak terstruktur. Kemudian akan membentuk rantai heliks ganda yang terstruktur pada saat suhu mencapai sekitar 38°C dan membentuk suatu unit besar yang disebut “serat atau *fiber*”, “kumpulan heliks”, atau “batang-batang heliks”. Ion Kalium (K⁺) bertindak sebagai lem intramolekuler membentuk interaksi elektrostatik dengan gugus ester sulfat serta gugus anhidrogalaktosa dan atom oksigen dari kappa karaginan. Sedangkan pada iota karaginan, rantai heliks tunggal akan membentuk rantai heliks ganda dijumpai oleh ion kalsium (Ca²⁺). Kumpulan-kumpulan heliks yang terbentuk dari iota karaginan tidak sebanyak yang dibentuk kappa karaginan. (Velde, F., Ruiten 2002)

Hasil pengujian tekstur SRC dengan proses pembuatan *gel press* dan penjendal KCl 1,5 % untuk kappa SRC dan menggunakan CaCl_2 1,5% serta perbandingan antara rumput laut dan air sebesar 1 : 100 untuk kappa SRC dan menggunakan CaCl_2 1,5% didapatkan hasil bahwa kekuatan gel kappa SRC sebesar 35,8 N dan kekuatan gel iota SRC sebesar 1,2 N. (Rasyid, 2003), melaporkan bahwa perbedaan antara kappa dan iota karaginan adalah pada proses esterifikasi dengan asam sulfat, dimana kappa karaginan teresterifikasi dengan gugus hidroksil pada C-4 galaktosil dengan kadar sulfat sebesar 25 - 30%. Sedangkan pada iota karaginan, teresterifikasi dengan gugus hidroksil pada C-2 anhidrogalaktosil dengan kadar sulfat sekitar 23 - 35%.

Hal ini sesuai dengan hasil analisa gugus fungsional menggunakan FT-IR (**Gambar 7**) bahwa pada kappa SRC hanya terdapat gugus fungsional 3,6-anhidrogalaktosa pada panjang gelombang $927,76 \text{ cm}^{-1}$. Sedangkan pada iota SRC terdapat gugus fungsi 3,6-anhidrogalaktosa-2-sulfat pada panjang gelombang $804,32 \text{ cm}^{-1}$. Menurut Campo *et al.* (2009), adanya gugus ester sulfat pada ikatan 3,6-anhidrogalaktosa dalam iota karaginan akan menyebabkan terjadinya penurunan kekuatan gel yang dihasilkan.

Dalam penelitian ini digunakan campuran antara kappa dan iota SRC sebagai bahan pengkapsulat bakteri probiotik dengan tujuan untuk memperbaiki karakteristik mikrokapsul yang dihasilkan. Brenner *et al.* (2014), melaporkan bahwa struktur reologi terbaik yang dihasilkan pada gel campuran kappa dan iota karaginan yaitu pada rasio mendekati 1:1 yang diikuti dengan penurunan kekuatan gel seiring dengan bertambahnya konsentrasi iota karaginan. Mekanisme berubahnya struktur gel campuran kappa dan iota karaginan dapat dilihat pada **Gambar 8**.



Gambar 8. Struktur gel yang dihasilkan dari campuran kappa dan iota karaginan. (A) struktur gel campuran kappa-iota karaginan; (B) perubahan fase gel (terurai) seiring dengan bertambahnya suhu pada iota karaginan (Brenner *et al.* 2014).

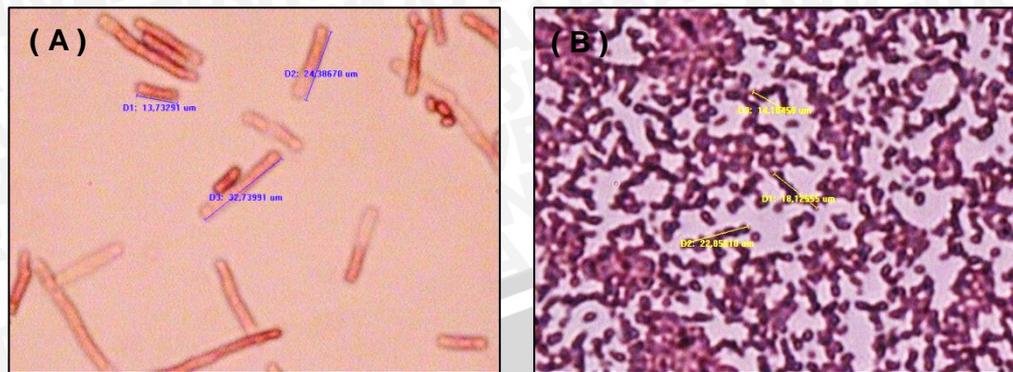
Kappa karaginan akan membentuk gel dengan tekstur keras dengan adanya ion K^+ (garam kalium), akan tetapi akan membentuk gel dengan sifat rapuh dengan adanya ion kalsium (Ca^{2+}) serta akan mengalami sineresis jika membentuk gel. Iota karaginan akan membentuk gel dengan tekstur keras dengan adanya ion Ca^{2+} (garam kalsium), gel yang terbentuk bersifat elastis dan bening, stabil pada saat mengalami *thawing* serta tidak mengalami sineresis saat membentuk gel (Hernández-Carmona G. 2013). Kappa dan iota karaginan akan bersifat stabil apabila berada dalam larutan dengan pH netral atau basa, serta akan terhidrolisis apabila dipanaskan dalam kondisi yang asam, tetapi akan tetap stabil jika sudah membentuk gel. (Kelco)

4.3 Pewarnaan Gram

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

Hasil pewarnaan Gram pada kedua jenis bakteri ini adalah Gram positif, tetapi koloni *L. acidophilus* berwarna ungu kemerah-merahan berbentuk batang sedangkan koloni *B. bifidum* berwarna ungu kehitam-hitaman serta membentuk koloni berangkai yang membentuk huruf (Y). Hal ini sesuai dengan pernyataan Prescott *et al.* (2002), bakteri dari genus *Bifidobacteria* merupakan bakteri yang tergolong dalam *high Gram positive bacteria* karena mampu menyerap pewarna kristal violet dengan sangat kuat pada saat pewarnaan Gram sehingga koloni *Bifidobacteria* akan nampak ungu kehitaman saat pengamatan dengan mikroskop. Bakteri jenis ini tidak bersifat motil, tidak berspora dan berbentuk batang berkelompok (berangkai) dengan bentuk batang bercabang (Y), bersifat *anaerob* serta ditemukan dalam mulut dan saluran usus vertebrata berdarah panas. *L. acidophilus* merupakan bakteri asam laktat yang berbentuk batang (basil) dan termasuk dalam kelompok *low Gram positive bacteri* atau bakteri yang memiliki lapisan peptidoglikan yang sama dengan bakteri Gram negatif sehingga akan berwarna merah pada saat pewarnaan Gram.

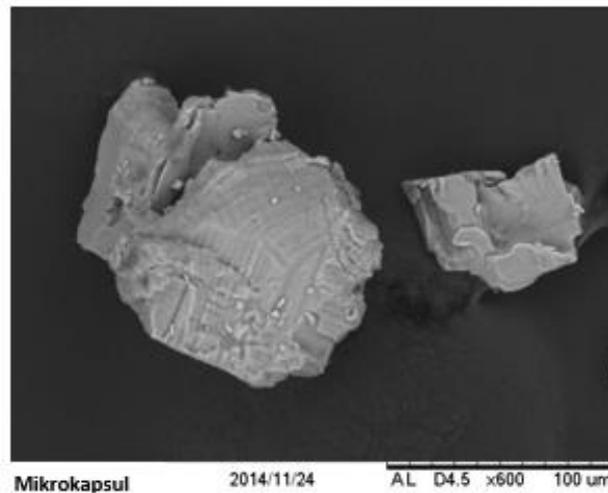
Menurut Tortora *et al.* (2014) bakteri yang tergolong dalam *high G + C ratio bacteria* adalah dari filum Firmicute yang termasuk didalamnya adalah bakteri dari genus *Clostridium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* serta *Lactobacillus*. Bakteri yang tergolong dalam *low G + C ratio bacteria* yaitu bakteri dari filum Actinobacteria yang termasuk didalamnya adalah bakteri dari genus *Mycobacterium*, *Corybacterium*, *Propionibacterium*, *Gardnerella*, *Frankia*, *Streptomyces*, *Actinomyces* dan *Nocardia* serta *Bifidobacterium*. Morfologi koloni *L. acidophilus* dan *B. bifidum* dapat dilihat pada **Gambar 9**.



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

4.4 Yield mikroenkapsulasi

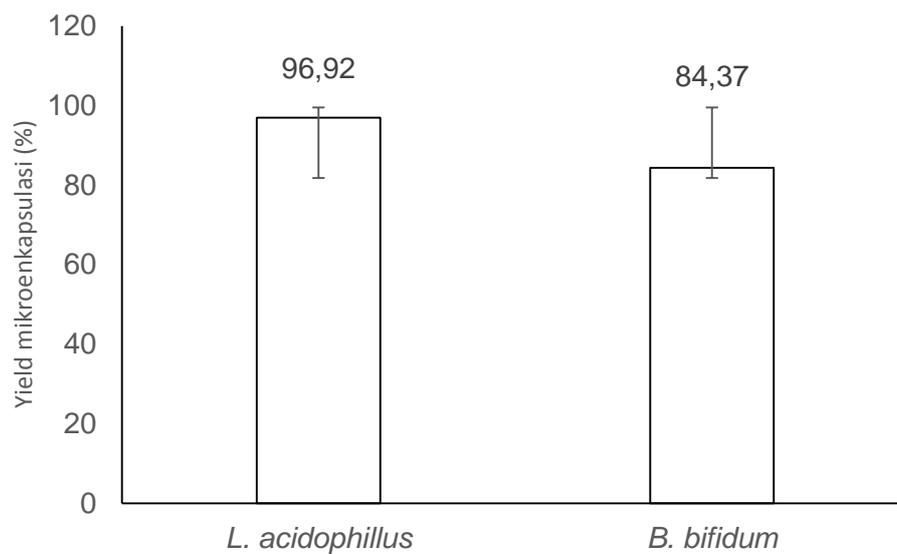
Yield mikroenkapsulasi merupakan persentase perbandingan antara viabilitas sel setelah proses pengeringan mikrokapsul pada suhu 40°C selama 48 jam dengan viabilitas awal sel sebelum proses pengeringan. Yield tertinggi diperoleh pada bahan terkapsulat *L. acidophilus* sebesar 92,96% sedangkan yield *B. bifidum* sebesar 84,37%. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh retaknya matriks mikrokapsul pada saat pengeringan sehingga oksigen masuk ke dalam matriks. *L. acidophilus* merupakan bakteri *anaerob* fakultatif, maka ia akan cenderung bisa bertahan hidup dibandingkan dengan *B. bifidum* yang merupakan bakteri *anaerob* obligat. Hal ini sesuai dengan hasil pengamatan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) bahwasanya terjadi keretakan matriks mikrokapsul setelah proses pengeringan mikrokapsul pada suhu 40°C sehingga oksigen bisa masuk ke dalam mikrokapsul dan menghambat pertumbuhan *B. bifidum*. Struktur matriks mikrokapsul dapat dilihat pada **Gambar 10**.



Gambar 10. Scanning Electron Microscope mikrokapsul *B. bifidum* setelah mengalami proses pengeringan

Menurut Tortora *et al.* (2014) bakteri dari genus *Lactobacillus* merupakan bakteri yang tidak sama dengan bakteri anaerob obligat karena bakteri dari genus *Lactobacillus* merupakan bakteri *aerotolerant* dan mampu tumbuh meskipun dalam kondisi tersedia oksigen. Bakteri anaerob akan mengalami penurunan viabilitas yang sangat nyata apabila pelapis (*coating*) yang digunakan mengalami kerusakan. Akan tetapi coating yang utuh bisa mempertahankan viabilitas bakteri tersebut pada saat penyimpanan. (Thalib *et al.*, 2002)

Viabilitas probiotik terkapsulasi juga dapat mengalami penurunan karena adanya proses pengeringan sampai dengan dua siklus log. Viabilitas probiotik yang terkapsulasi juga dipengaruhi oleh bahan pengkapsulat yang digunakan. Probiotik yang terkapsulasi dalam karaginan proses murni (*Refined Carageenan*) akan menghasilkan viabilitas probiotik yang lebih baik apabila dibandingkan dengan menggunakan karaginan proses semi murni (Setijawati *et al.*, 2012). Yield mikroenkapsulasi dari probiotik dapat dilihat pada **Gambar 11**.



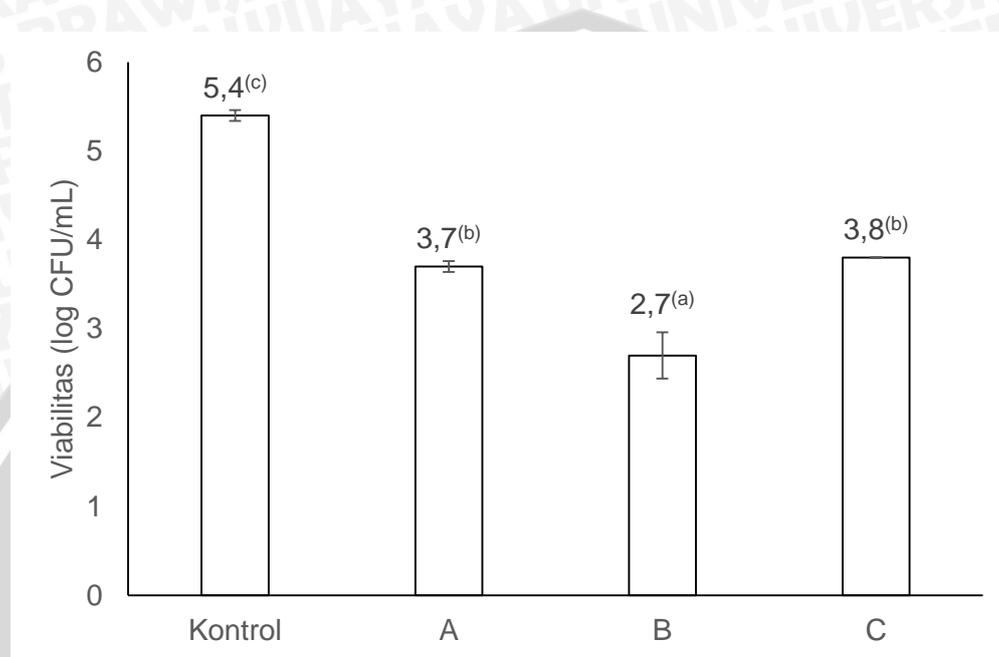
Gambar 11. Yield mikroenkapsulasi setelah proses pengeringan.

Perbedaan yield mikroenkapsulasi ini juga disebabkan karena adanya perbedaan toleransi antara *L. acidophilus* dan *B. bifidum* terhadap toksisitas ion K^+ yang terdapat dalam pengkapsulat kappa SRC. Ion Kalium (K^+) bertindak sebagai lem intramolekuler membentuk interaksi elektrostatis dengan gugus ester sulfat serta gugus anhidrogalaktosa dan atom oksigen dari kappa karaginan (**Gambar 6**). Hal ini sesuai dengan pernyataan Rathore *et al.* (2013), bahwa kelemahan kappa karaginan apabila digunakan sebagai bahan pengkapsulat yaitu adanya sifat toksik dari ion-ion Kalium terhadap sel bakteri.

4.5 Viabilitas probiotik dalam *gastric tract*

Pengujian mikrokapsul bakteri probiotik dalam larutan simulasi *gastric tract* dilakukan untuk mengetahui viabilitas probiotik pada kondisi sangat asam (pH 2) yang disesuaikan dengan pH dalam lambung manusia. Hasil ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang sangat signifikan antar perlakuan dengan $F_{hitung} > F_{tabel}$ (**Lampiran 10**), sehingga disimpulkan bahwa rasio probiotik yang berbeda memberikan pengaruh nyata terhadap viabilitas probiotik dalam simulasi saluran pencernaan. Menurut Arikunto (2010), syarat penerimaan H_1 adalah $F_0 >$

F_{tabel} yang artinya ada perbedaan *mean* yang signifikan. Viabilitas probiotik setelah pengujian dalam *gastric tract* dapat dilihat pada **Gambar 12**.



Gambar 12. Viabilitas probiotik pada rasio yang berbeda dalam *gastric tract*

Viabilitas probiotik mengalami penurunan rata-rata sebesar 2 siklus log setelah diujikan dalam simulasi *gastric tract* dibandingkan dengan kontrol. Setijawati *et al.* (2011) melaporkan bahwa viabilitas *L. acidophilus* mengalami penurunan setelah pengujian dalam pH 2 dengan rata-rata viabilitas sebesar 10^3 CFU/mL dari kepadatan awal 10^6 CFU/mL. Burgain *et al.* (2011) melaporkan bahwa mikrokapsul juga mengalami pengerutan ukuran pada saat diujikan kedalam larutan pH 2 karena mikrokapsul yang dihasilkan dari kappa karaginan bersifat rapuh serta tidak dapat mempertahankan bentuknya apabila mengalami suatu tekanan berupa kondisi yang sangat asam.

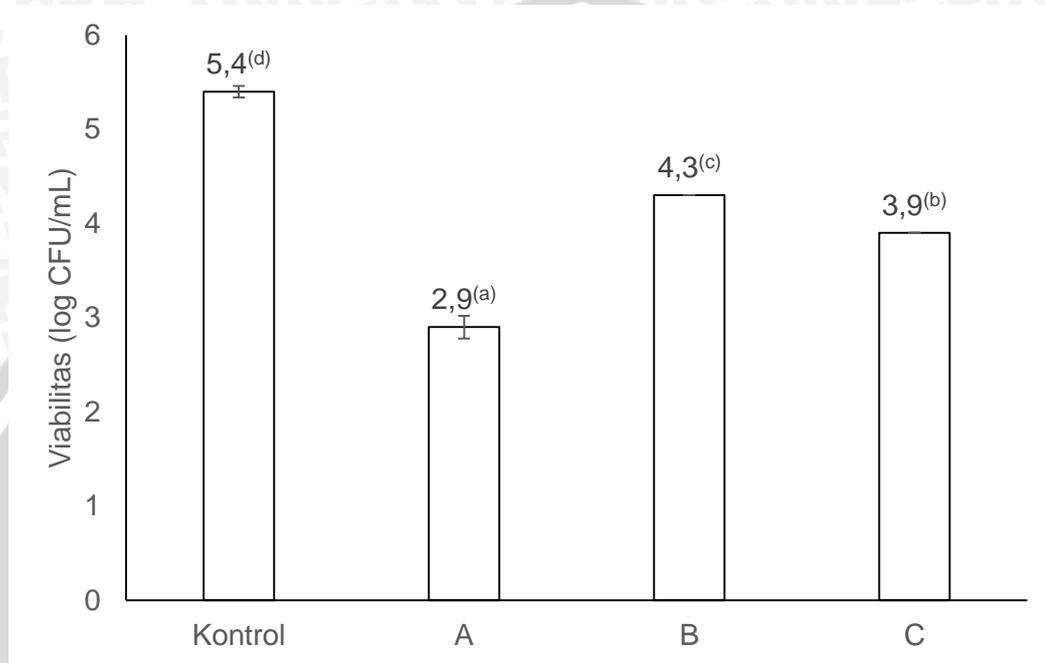
Menurunnya viabilitas probiotik ini juga disebabkan karena bakteri jenis *B. bifidum* merupakan bakteri yang tidak mampu bertahan hidup apabila dipaparkan dalam kondisi pH 2 selama 2 jam. Sanz (2007) menyatakan bahwa bakteri dari spesies *B. bifidum*, *B. animalis*, *B. infantis*, *B. breve* dan *B. adolescentis* tidak memiliki resistansi yang baik pada saat dipaparkan pada pH 2 selama 90 menit. Bakteri-bakteri tersebut hanya memiliki kemampuan 1 % untuk bertahan hidup saat dipaparkan dalam pH 3 selama 2 jam kecuali *B. longum* yang memiliki kemampuan bertahan hidup sebesar 25 % pada kondisi yang sama.

Prakash *et al.* (2011) melaporkan bahwa lambung manusia memiliki pH berkisar antara 1-2 dengan komposisi penyusun utama dari cairan lambung terdiri dari pepsin, amilase serta lendir. Mikrobiota yang hidup dalam lambung ini merupakan bakteri dari genus Lactobacilli dan Streptococci dengan kepadatan sel $<10^3$ sel / g. Dapat disimpulkan bahwa dari hasil penelitian ini mampu meningkatkan viabilitas probiotik dalam simulasi kondisi lambung manusia (*gastric tract*) dengan viabilitas tertinggi sebesar 3,7 log CFU/mL yang terdapat pada rasio probiotik 1 : 1 (*L. acidophilus* : *B. bifidum*). Tetapi hasil penelitian ini belum sesuai dengan persyaratan jumlah minimum bakteri probiotik yang dikemukakan oleh Ooi dan Liong (2010) agar mampu memberikan efek positif bagi kesehatan manusia sebesar 10^7 - 10^{11} CFU/gram makanan.

4.6 Viabilitas probiotik dalam *intestinal tract*

Pengujian mikrokapsul bakteri probiotik dalam larutan simulasi *gastric tract* dilakukan untuk mengetahui viabilitas probiotik pada kondisi basa (pH 7) yang disesuaikan dengan pH dalam saluran usus manusia. Hasil ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang sangat signifikan antar perlakuan dengan $F_{hitung} > F_{tabel}$ (**Lampiran 11**), sehingga dapat disimpulkan bahwa rasio probiotik yang berbeda memberikan pengaruh nyata terhadap viabilitas probiotik dalam simulasi saluran

pencernaan. Menurut Arikunto (2010), syarat penerimaan H_1 adalah $F_0 > F_{\text{tabel}}$ yang artinya ada perbedaan *mean* yang signifikan. Viabilitas probiotik setelah pengujian dalam *gastric tract* dapat dilihat pada **Gambar 13**.



Gambar 13. Viabilitas probiotik pada rasio yang berbeda dalam *intestinal tract*

Viabilitas probiotik mengalami penurunan rata-rata sebesar 2 siklus log setelah pengujian dalam simulasi *intestinal tract* bila dibandingkan dengan kontrol. Setijawati *et al.* (2011) melaporkan bahwa probiotik yang terkapsulasi dalam kappa karaginan mengalami penurunan sampai dengan 4 siklus log dari kepadatan awal 6,3027 log CFU/mL menjadi 2,1915 log CFU/mL setelah dilakukan pengujian dalam larutan pH 7.

Menurut Firmansyah (2001), menurunnya rerata viabilitas probiotik ini disebabkan karenanya matinya *L. acidophilus* pada saat dipaparkan kedalam simulasi *intestinal tract* secara *in vitro* dikarenakan *L. acidophilus* merupakan bakteri *indigenous* dalam lambung manusia dengan jumlah normal sebanyak $0-10^3$ sehingga *L. acidophilus* akan mengalami kematian apabila dipaparkan dalam

kondisi pH 7 yang merupakan kondisi dalam saluran usus manusia. *L. acidophilus* juga memiliki toleransi sebesar 87,4% terhadap konsentrasi *bile salt* 0,1%. Toleransi ini akan semakin menurun seiring dengan bertambahnya konsentrasi *bile salt* (Pyar & Peh 2014).

Prakash *et al.* (2011) melaporkan bahwa usus kecil (*small intestine*) yang terdiri dari *duodenum*, *jejunum* dan *ileum* manusia memiliki pH berkisar antara 6-7 dengan komposisi penyusun utama dari cairan usus terdiri dari enzim pankreatik, *bile salt*, asam bikarbonat serta lendir. Mikrobiota yang hidup dalam usus ini merupakan bakteri dari genus *Lactobacilli*, *E. coli* serta *E. faecalis* dengan kepadatan $10^4 - 10^7$ sel / g. Dapat disimpulkan bahwa hasil penelitian ini mampu meningkatkan viabilitas probiotik dalam simulasi kondisi usus manusia (*intestinal tract*) dengan viabilitas tertinggi sebesar 4,3 log CFU/mL yang terdapat pada rasio probiotik 1 : 3 (*L. acidophilus* : *B. bifidum*). Tetapi hasil penelitian ini belum sesuai dengan persyaratan jumlah minimum bakteri probiotik yang dikemukakan oleh Ooi dan Liong (2010) agar mampu memberikan efek positif bagi kesehatan manusia sebesar 10^7 - 10^{11} CFU/gram makanan.

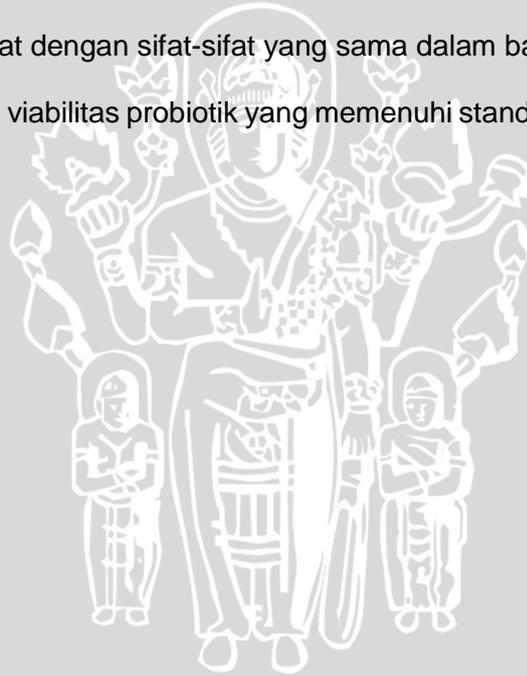
5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa H_1 diterima pada taraf signifikansi 1% dan 5%. Sehingga disimpulkan bahwa rasio probiotik yang berbeda memberikan pengaruh nyata terhadap viabilitas probiotik dalam simulasi saluran pencernaan secara *in vitro*.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang penggunaan campuran dua jenis bakteri asam laktat dengan sifat-sifat yang sama dalam bahan pengkapsulat lain untuk memperoleh viabilitas probiotik yang memenuhi standar minimum dalam bahan pangan.



DAFTAR PUSTAKA

- Adams, M.R., M.O Moss. 2000. Food Microbiology. Second Edition. RSC – Royal Society of Chemistry. pp.479.
- Adhikari, K, A Mustapha, I U Gru, and L Fernando. 2000. "Viability of Microencapsulated Bifidobacteria in Set Yogurt During Refrigerated Storage 1." *Journal Dairy Science*, no. 12999: 1946–51.
- ASGE, American Association for Gastrointestinal Endoscopy. 2014. "ASGE Human Digestive System." Accessed November 20. www.asge.org.
- Bartlop D., Martin J B. 1990. "The Gastrointestinal Tract and Short-Term Toxicity Tests." In *Short-Term Toxicity Test for Non-Genotoxic Effects*, 99–110.
- Brenner, Tom, Rando Tuvikene, Alan Parker, and Shingo Matsukawa. 2014. "Food Hydrocolloids Rheology and Structure of Mixed Kappa-Carrageenan / Iota-Carrageenan Gels." *Food Hydrocolloids* 39. Elsevier Ltd: 272–79. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.01.024.
- Burgain, J, C Gaiani, M Linder, and J Scher. 2011. "Encapsulation of Probiotic Living Cells: From Laboratory Scale to Industrial Applications." *Journal of Food Engineering* 104 (4). Elsevier Ltd: 467–83. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031.
- Campo, Vanessa Leiria, Daniel Fábio Kawano, Dílson Braz Da Silva, and Ivone Carvalho. 2009. "Carrageenans: Biological Properties, Chemical Modifications and Structural Analysis – A Review." *Carbohydrate Polymers* 77 (2). Elsevier Ltd: 167–80. doi:10.1016/j.carbpol.2009.01.020.
- Cook, Michael T., George Tzortzis, Dimitris Charalampopoulos, and Vitaliy V. Khutoryanskiy. 2012. "Microencapsulation of Probiotics for Gastrointestinal Delivery." *Journal of Controlled Release* 162 (1). Elsevier B.V.: 56–67. doi:10.1016/j.jconrel.2012.06.003.
- FAO, Food and Agricultural Organization. 2001. "Description Functional Uses" 9.
- Firmansyah, Agus. 2001. "Terapi Probiotik Dan Prebiotik Pada Penyakit Saluran Cerna Anak." *Sari Pediatri* 2: 210–14.
- Fritzen- freire, Carlise B, Elane S Prudêncio, Renata D M C Amboni, Stephanie S Pinto, Aureanna N Negrão-murakami, and Fabio S Murakami. 2012. "Microencapsulation of Bifidobacteria by Spray Drying in the Presence of Prebiotics." *Food Research International* 45 (1). Elsevier Ltd: 306–12. doi:10.1016/j.foodres.2011.09.020.
- Garrity, George M, Julia A Bell, Timothy G Lilburn, and East Lansing. 2004. *Taxonomic Outline Of The Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer. doi:10.1007/bergeysoutline200405.

- Hernández-Carmona G., E.Hernández-Garibay. 2013. *Conventional and Alternative Technologies for the Extraction of Algal Polysaccharides*. Woodhead Publishing Limited.
- Ishibashi, N, T Yaeshima, and H Hayasawa. 1997. "Bifidobacteria : Their Significance in Human Intestinal Health." *Mal. J. Nutrition* 3: 149–59.
- Kailasapathy, Kaila. 2002. "Highly Recommended Books on Probiotics and Foodborne Pathogens Microencapsulation of Probiotic Bacteria : Technology and Potential Applications." *Curr. Issues Intest. Microbiol* 3 (Intestinal Microbiology): 39–48.
- Kelco, CP. "GENU ® Carrageenan Book." www.cpkelco.com.
- Kim, Se-jin, Seung Yong, Sae Hun, Ok-ja Song, li-shik Shin, Dong Su, and Hyun Jin. 2008. "Effect of Microencapsulation on Viability and Other Characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121." *Food Science and Technology* 41: 493–500. doi:10.1016/j.lwt.2007.03.025.
- Manojlovic, Verica, Viktor A Nedovic, and Kasipathy Kailasapathy. 2010. "Encapsulation of Probiotics for Use in Food Products." In *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, edited by N.J. Zuidam and V.A. Nedovic, 269–302. Springer Science+Business Media. doi:10.1007/978-1-4419-1008-0.
- Meena, Ganga S, Suneel Gupta, Gautam C Majumdar, and Rintu Banerjee. 2011. "Growth Characteristics Modeling of *Bifidobacterium bifidum* Using RSM and ANN." *Brazilian Archive of Biology and Technology An International Journal* 54: 1357–66.
- Nazzaro, Filomena, Pierangelo Orlando, Florinda Fratianni, and Raffaele Coppola. 2012. "Microencapsulation in Food Science and Biotechnology." *Current Opinion in Biotechnology* 23. Elsevier Ltd: 182–86. doi:10.1016/j.copbio.2011.10.001.
- Necas, J, and L Bartosikova. 2013. "Carrageenan : A Review." *Vetrinarni Medicina* 58: 187–205.
- Ooi, Lay-gaik, and Min-tze Liang. 2010. "Cholesterol-Lowering Effects of Probiotics and Prebiotics : A Review of in Vivo and in Vitro Findings." *International Journal of Molecular Science* 11: 2499–2522. doi:10.3390/ijms11062499.
- Prakash, Satya, Catherine Tomaro-duchesneau, Shyamali Saha, and Arielle Cantor. 2011. "The Gut Microbiota and Human Health with an Emphasis on the Use of Microencapsulated Bacterial Cells" 2011. doi:10.1155/2011/981214.
- Pyar, Hassan, and K K Peh. 2014. "Characterization and Identification of *Lactobacillus acidophilus* Using Biolog Rapid Identification System." *Int J Pharm Pharm Sci* 6 (1): 189–93.

- Rasyid, Abdullah. 2003. "Beberapa Catatan Penting Tentang Karaginan." *Oseana* 18 (4): 1–6.
- Reksohadwinoto, Budhi S. 2014. "Mengenal Kinerja Probiotik: Produk, Aplikasi, & Mekanisme Kerja ." *Artikel Sains*.
- Rokka, Susanna, and Pirjo Rantamäki. 2010. "Protecting Probiotic Bacteria by Microencapsulation : Challenges for Industrial Applications." *Eur Food Res Technol* 231: 1–12. doi:10.1007/s00217-010-1246-2.
- Sanz, Yolanda. 2007. "Ecological and Functional Implications of the Acid-Adaptation Ability of Bifidobacterium : A Way of Selecting Improved Probiotic Strains." *International Dairy Journal* 17: 1284–89. doi:10.1016/j.idairyj.2007.01.016.
- Setijawati D., Susinggih W., Aulaniám., Imam S. 2012. "Penggunaan Caragenan Dengan Metode Proses Berbeda (src Dan Rc) Sebagai Bahan Pengenkapsulat." *Jurnal Teknologi Pangan* 3 (1): 1–12.
- Setijawati, Dwi, Susinggih Wijana, and Imam Santosa. 2011. "Viabilitas Dan Struktur Mikrokapsul *Lactobacillus acidophilus* Dengan Bahan Penyalut Karaginan Semi Murni Jenis *Eucheuma Cottoni*." *Jurnal Teknologi Pangan* 2 (1): 50–67.
- Shinta, K., Hartantyo., N, Wijayahadi. 2011. "Pengaruh Probiotik Pada Diare Akut : Penelitian Dengan 3 Preparat Probiotik." *Sari Pediatri* 13 (2): 89–95.
- SNI. 2013. "Cara Uji Kimia – Bagian 12 : Penentuan Rendemen (Yield) Karaginan Rumput Laut."
- Thalib A., H Hamid., B Haryanto. 2002. "Efek Coating Terhadap Kemurnian, Viabilitas Dan Aktivitas Sediaan Bakteri (Probiotik SR) Selama Penyimpanan." In *Seminar Nasional Teknologi Peternakan Dan Veteriner 2002*, 1–4.
- Velde, F., Ruiter, G.A. 2002. "Carrageenan." In *Polysaccharide from Eukaryotes*, edited by E.J. VanDamme A. Steibúehék., S. De Baets., II, 245–74. Weinheim: Wilet-VCH.
- Yasin, Ade W. 2005. *Pengaruh Pengkomposisian Dan Penyimpanan Dingin Daging Lumat Ikan Cucut Pisang (Carcharinus falciformis) Dan Ikan Pari Kelapa (Trygon sephen) Terhadap Karakteristik Surimi Yang Dihasilkan*. Bogor.