

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam pembuatan *Semi Refine Carageenan* (SRC) adalah rumput laut *E. cottonii* yang didatangkan dari perairan Sumenep, Madura, Jawa Timur. Pati yang digunakan yaitu menggunakan pati yang berasal dari ubi kayu (*Manihot utilissima*) yang didapatkan dari kota Malang, Jawa Timur.

Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan SRC kappa antara lain air, aquadest, KOH 6% dan kalium klorida (KCl) 1,5%. Bahan yang digunakan dalam pembuatan pati ubi kayu yaitu ubi kayu (*Manihot utilissima*), dan air. Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan mikroenkapsulasi *L. acidophilus* dan *B. bifidum* adalah sol SRC kappa, pati ubi kayu (*Manihot utilissima*), kultur *L. acidophilus* dan *B. bifidum*, KCl 3,9 M, aquades. Bahan yang digunakan untuk *foam-mat drying* adalah mikro kapsulat dan busa putih telur ayam. Bahan yang digunakan untuk uji viabilitas mikro kapsul antara lain adalah mikro kapsulat yang telah diberi perlakuan, aquades, MRSA (deMann Rogosa Sharpe Agar), NaCl steril, alkohol 70%, spirtus, plastik wrap, dan kapas.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada pembuatan SRC kappa adalah baskom, blender, *beaker glass* 1000 mL, gelas ukur 100 mL, *waterbath*, *stopwatch*, spatula, kain saring, timbangan analitik, loyang, pH meter, dan ayakan. Alat yang digunakan pada pembuatan pati ubi kayu (*Manihot utilissima*) yaitu parutan, baskom, saringan, pisau, blender, timbangan analitik, dan ayakan. Alat yang digunakan pada

pembuatan mikroenkapsulasi *L. acidophilus* dan *B. bifidum* adalah *beaker glass* 500 mL, *hotplate*, *magnetic stirrer*, gelas ukur 100 mL, bola hisap, pipet tetes, kulkas, spatula, oven, loyang, *beaker glass* 50 mL serta spuit 50mL dengan jarum berdiameter 1 mm. Alat yang digunakan untuk *foam-mat drying* adalah mixer, oven, baskom, loyang, dan spatula. Alat yang digunakan untuk menganalisa viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum* adalah tabung reaksi, rak tabung reaksi, *beaker glass* 500 mL, cawan petri, mikropipet, *blue tip*, *Laminar Air Flow*, bunsen, *sprayer*, alkohol, vortex mixer, *stirrer incubator*, *colony counter*, timbangan analitik, serta inkubator.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen dengan tujuan untuk mengetahui adanya pengaruh pelapis mix kappa karaginan dan pati ubi kayu dengan konsentrasi berbeda terhadap viabilitas bakteri probiotik *L. acidophilus* dan *B. bifidum*. Penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian. Penelitian eksperimen dimaksudkan untuk mengetahui ada tidaknya akibat dari sesuatu yang dikenakan pada subjek yang diselidiki (Nazir, 2005). 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 di dalam variable terikat. Adapun variabel-variabel dalam penelitian ini adalah :

1. Variabel bebas : Perbedaan volume bakteri probiotik
2. Variable terikat : Viabilitas, Kadar air, Aktivitas water (A_w) mikrokapsul *L. acidophilus* dan *B. bifidum*

3.3 Tahapan Penelitian

3.3.1. Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui perbedaan rasio bahan pelapis mikroenkapsulasi mix kappa karaginan dan pati ubi kayu yang terbaik untuk dilanjutkan ke penelitian utama. Rancangan penelitian pendahuluan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang disusun secara faktorial. Model rancangan percobaan untuk penelitian pendahuluan yang digunakan ditampilkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Model rancangan percobaan dalam penelitian pendahuluan

Rasio	Perlakuan Jenis Bakteri	Ulangan			Total	Rerata
		1	2	3		
A1	B1	A1B1 1	A1B1 2	A1B1 3		
	B2	A1B2 1	A1B2 2	A1B2 3		
A2	B1	A2B1 1	A2B1 2	A2B1 3		
	B2	A2B2 1	A2B2 2	A2B2 3		
A3	B1	A3B1 1	A3B1 2	A3B1 3		
	B2	A3B2 1	A3B2 2	A3B2 3		

Keterangan :

A1 = Kappa dan Pati dengan rasio 1 : 1

A2 = Kappa dan Pati dengan rasio 1 : 2

A3 = Kappa dan Pati dengan rasio 2 : 1

B1 = *L. acidophilus*

B2 = *B. bifidum*

3.3.2. Penelitian Utama

Penelitian utama ini merupakan lanjutan dari penelitian pendahuluan, dimana rasio yang terbaik akan diberikan perlakuan dengan menambahkan volume kultur *L. acidophilus* dan *B. bifidum* yaitu 20 mL, 30 mL, 40 mL, dan 50 mL dengan waktu pengeringan 48 jam dan 72 jam. Rancangan penelitian utama yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang disusun secara faktorial. Model rancangan percobaan untuk penelitian utama yang digunakan ditampilkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Model rancangan percobaan dalam penelitian utama

Jenis Bakteri	Perlakuan		Ulangan			Total
	Volume	Waktu	1	2	3	
A1	B1	C1	A1B1C1.1	A1B1C1.2	A1B1C1.3	
		C2	A1B1C2.1	A1B1C2.2	A1B1C2.3	
	B2	C1	A1B2C1.1	A1B2C1.2	A1B2C1.3	
		C2	A1B2C2.1	A1B2C2.2	A1B2C2.3	
	B3	C1	A1B3C1.1	A2B3C1.2	A2B3C1.3	
		C2	A1B3C2.1	A2B3C2.2	A2B3C2.3	
	B4	C1	A1B4C1.1	A1B4C1.2	A1B4C1.3	
		C2	A1B4C2.1	A1B4C2.2	A1B4C2.3	
	A2	B1	C1	A2B1C1.1	A2B1C1.2	A2B1C1.3
			C2	A2B1C2.1	A2B1C2.2	A2B1C2.3
		B2	C1	A2B2C1.1	A2B2C1.2	A2B2C1.3
			C2	A2B2C2.1	A2B2C2.2	A2B2C2.3
B3		C1	A2B3C1.1	A2B3C1.2	A2B3C1.3	
		C2	A2B3C2.1	A2B3C2.2	A2B3C2.3	
B4		C1	A2B4C1.1	A2B4C1.2	A2B4C1.3	
		C2	A2B4C2.1	A2B4C2.2	A2B4C2.3	

Keterangan :

A1 : Probiotik *L. acidophilus*

A2 : Probiotik *B. bifidum*

B1 : Volume 20 mL

B2 : Volume 30 mL

B3 : Volume 40 mL

B4 : Volume 50 mL

C1 : Waktu pengeringan 48 jam

C2 : Waktu pengeringan 72 jam

Model matematis yang digunakan untuk analisa ragam RAL adalah :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \sum_{ijk}$$

Dimana :

Y_{ijk} = respon metode yang diamati

μ = nilai tengah umum

α_i = pengaruh pada taraf ke-i dari faktor A

β_j = pengaruh pada taraf ke-j dari faktor B

- $\alpha\beta_{ij}$ = pengaruh interaksi taraf ke-I dari faktor A dan taraf ke-j dari faktor B
 \sum_{ijk} = pengaruh sisa galat percobaan faktor A taraf ke-I dan faktor B taraf ke-j pada ulangan ke-k

Hasil penelitian dianalisis menggunakan metode *Analysis of Variance* (ANOVA) analisis sidik ragam dan dilanjutkan dengan pengujian perlakuan yang menggunakan uji F. Jika hasil analisis keragaman menunjukkan adanya perbedaan ($F_{\text{tabel } 5\%} < F_{\text{hit}} < F_{\text{tabel } 1\%}$ atau $F_{\text{hit}} > F_{\text{tabel } 1\%}$) maka dilanjutkan dengan uji Duncan.

3.3.3. Pembuatan Tepung (SRC) *E. cottoni*

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

- Rumput laut *E. cottoni* segar dicuci sampai bersih lalu di jemur sampai kering.
- Rumput laut *E. cottoni* yang telah kering ditimbang sebanyak 25 g 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 diekstraksi dengan menggunakan KOH 6%.
- Pemanasan dengan suhu $\pm 80^{\circ}\text{C}$ selama 2 jam dalam *waterbath*.
- Filtrat *E. cottonii* disaring lalu dicuci dengan KCl 1,5%
- Selanjutnya dijemur sampai kering dan digiling sampai menjadi serbuk lalu didapatkan tepung *Semi Refined Carrageenan* (SRC).

3.3.4. Pembuatan Tepung Pati Ubi Kayu (*Manihot utilissima*)

Prosedur kerja dalam pembuatan Tepung Pati Ubi Kayu dari jenis *Manihot utilissima* dilakukan berdasarkan metode penelitian (Elvis, 2010) sebagai berikut :

- Ubi kayu dikupas lalu dicuci hingga bersih.
- Ubi kayu diparut hingga menjadi bubur umbi, lalu ditambahkan air dengan perbandingan umbi dan air adalah 1:2. Diaduk-aduk agar pati lebih banyak yang terlepas dari sel umbi.
- Disaring adonan pati atau diperas dengan menggunakan kain saring, seperti halnya memeras kelapa.
- Biarkan suspensi pati mengendap di dalam wadah ± selama 3 jam pati akan mengendap sebagai pasta.
- Buang cairan diatas endapan dan pasta dijemur dibawah sinar matahari diatas tampah hingga mengering.
- Pati kasar diblender hingga menjadi halus dan diayak dengan ayakan 60 mesh.

3.3.5. Uji *Fourier Transform Infrared* (FT-IR)

Prinsip kerja spektrofotometer FT-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).

Pengujian spektrofotometer FT-IR dilakukan di Laboratorium Kimia FMIPA Universitas Brawijaya Malang untuk mengetahui gugus fungsional SRC yang dihasilkan dari ekstraksi *E. cottoni* dan Pati Ubi kayu (*Manihot utilissima*).

Spektrofotometer FT-IR dapat digunakan untuk analisa sampel yang berupa padatan, cairan, dan gas. Spektrum *infrared* dihasilkan dari pentransmisi cahaya yang melewati sampel kemudian diplot sebagai intensitas fungsi energi, panjang gelombang (μm) atau bilangan gelombang (cm^{-1}).

Untuk pengambilan spectra FT-IR jumlah sampel yang diperlukan antara 1-5 mg, sedangkan bentuk sampel dapat berupa padatan, cairan atau dalam bentuk gas. Analisis gugus fungsi sampel dilakukan dengan membandingkan pita absorpsi yang terbentuk pada spektrum *infrared* menggunakan tabel korelasi dan menggunakan spektrum senyawa pembanding yang sudah diketahui (Anam *et al.*, 2007). Daerah pada spectrum infra merah diatas 1500 cm menunjukkan pita spektrum atau gugus fungsi dalam molekul kimia, sedangkan daerah dibawah 1500 cm menunjukkan daerah sidik jari (Sastrohamidjojo, 1991).

3.3.6. Pembuatan Mikrokapsul

Prosedur kerja dalam pembuatan mikrokapsul dilakukan berdasarkan metode Manojlovic *et al.*, (2010) dan Setijawati *et al.*, (2012).

- Penimbangan sebanyak 2,05 g SRC (1,025 g kappa SRC dan 1,025 g pati) 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 $35-40^{\circ}\text{C}$ sambil terus diaduk agar tidak cepat membentuk gel.
- Kultur *L. acidophilus* dan *B. bifidum* dimasukkan kedalam mix sol karaginan dan pati ubi kayu, lalu diaduk hingga homogen.

- Campuran sel dan sol dimasukkan kedalam larutan 100 mL larutan KCl 3,9 M menggunakan spuit 50 mL dengan jarum berukuran 1 mm, pengadukan dilakukan menggunakan stirrer selama 10 menit.
- Mikrokapsul yang didapat disaring menggunakan kertas saring.
- Mikrokapsul basah

Yield mikrokapsulasi (efisiensi dari penyalut dengan jumlah bakteri yang mampu bertahan hidup setelah proses mikrokapsulasi) 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 mikrokapsulasi

N₀ = Jumlah sel hidup yang ditambahkan (kepadatan awal)

3.3.7. Analisa Volume Bakteri Probiotik dan lama Pengeringan Mikrokapsul

Prosedur kerja dalam pembuatan mikrokapsul dilakukan berdasarkan metode Manojlovic *et al.*, (2010) dan Setijawati *et al.*, (2012). Proses *foam-mat* berdasarkan penelitian Veni (2013) adalah sebagai berikut :

➤ Perlakuan 1

- Penimbangan sebanyak 2,05 g SRC (1,025 g kappa SRC dan 1,025 g pati) ditambahkan 30 mL akuades.
- Kemudian pemanasan di atas *hot plate* hingga mencapai suhu 97⁰C dan distirrer dengan kecepatan 500 rpm kemudian diangkat dari *hot plate* dan suhunya diturunkan hingga 35-40⁰C sambil terus diaduk agar tidak cepat membentuk gel.

- Masing-masing 20 mL, 30 mL, 40 mL, dan 50 mL kultur *L. acidophilus* dan *B. bifidum* dimasukkan ke dalam mix sol karaginan dan pati ubi kayu, lalu diaduk hingga homogen.
- Campuran sel dan sol dimasukan kedalam larutan 100 mL larutan KCl 3,9 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.
- Mikrokapsul basah

➤ Perlakuan 2

- 1 Buah telur ayam dipisahkan dari kuning telur dan putih telurnya.
- Putih telur dikocok dengan menggunakan mixer hingga membentuk busa 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 sebanyak 17,5 dari total residu%.
- Mikroenkapsulasi dikeringkan dalam oven dengan suhu 45⁰C selama 48 dan 72 jam hingga kering dan menjadi serbuk mikrokapsulasi mengandung probiotik.

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

Prosedur Pengenceran:

- NaCl ditimbang sebanyak 4,05 g dan dihomogenkan dalam aquades sebanyak 450 mL
- Larutan NaCl dimasukkan dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 9 mL kemudian disterilkan sehingga diperoleh Na-fis 0,9% steril
- Na-fis 0,9% steril disiapkan untuk pengenceran 10^1 sampai 10^5
- Tabung reaksi 10^1 diisi sampel mikrokapsul yang telah diberi perlakuan sebanyak 2 g kemudian dihomogenkan dan diulangi prosedur tersebut untuk dimasukkan ke dalam tabung reaksi 10^5 .

Prosedur pembuatan media:

- Media MRSA ditimbang sebanyak 119,232 g dan dihomogenkan dengan akuades sebanyak 1800 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 10^5 dengan cara diambil 1 mL dari tabung reaksi 10^5 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 ± 15 mL ditunggu sampai dingin atau sampai padat lalu diinkubasi selama 3 hari
- Tahap selanjutnya setelah diinkubasi kemudian diamati dengan menghitung jumlah koloni bakteri tertinggi merupakan hasil dari perlakuan yang terbaik.

Mikrokapsul yang telah diberi perlakuan dilakukan pengujian viabilitas. Pengujian viabilitas mikrokapsul menggunakan metode dari penelitian Setijawati (2011) adalah sebagai berikut :

- Sampel sebanyak 2 g dimasukkan ke dalam larutan Na-fis steril 9 mL dan divortex selama 2 menit.
- Diambil 1 mL dan dilakukan pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-5} , diambil 1 mL dan dilakukan penanaman di dalam media MRSA dari pengenceran 10^{-2} sampai 10^{-5} dan seterusnya secara duplo.
- Diinkubasi selama 72 Jam pada suhu $35-37^{\circ}\text{C}$ kemudian dilakukan perhitungan TPC (Total Plate Count) koloni bakteri (cfu/mL) dengan menggunakan rumus (Fardiaz, 1988) :

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

Perhitungan viabilitas *L. acidophilus* dan *B. bifidum* dilakukan dengan menggunakan dua kondisi yaitu kondisi yang dikhususkan untuk mengoptimalkan pertumbuhan *L. acidophilus* (anaerob fakultatif) dan kondisi kedua dilakukan untuk mengoptimalkan pertumbuhan *B. bifidum* (anaerob obligath).

3.3.8. Kadar Air

Prinsip penentuan kadar air dengan metode *Thermogravimetri* yaitu menguapkan air yang ada dalam bahan pangan dengan cara pemanasan. Metode ini dilakukan dengan menguapkan air yang ada dalam bahan dengan pemanasan dengan suhu 105°C selama 3 jam kemudian menimbang bahan sampai didapat berat konstan yang berarti air yang ada dalam bahan telah diuapkan semua

(Sudarmadji *et al.*, 2010) . Prosedur kerja dari analisis kadar air adalah sebagai berikut :

- Timbang bahan sebanyak 2 g dalam botol timbang yang telah diketahui beratnya
- Dimasukkan dalam oven bersuhu 100 – 105 °C selama 3 – 5 jam. Kemudian didinginkan dalam eksikator 15 menit dan ditimbang.
- Pengurangan berat bahan merupakan banyaknya air dalam bahan. Persentase kadar air dalam bahan dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Berat basah \% WB} = \frac{(A+B) - C}{B} \times 100\%$$

Keterangan :

A : berat botol timbang

B : berat sampel

C : berat akhir (botol timbang + sampel) yang telah dikeringkan

3.3.9. Activity Water (A_w)

Prinsip A_w menyatakan rasio tekanan uap air pada kondisi kesetimbangan produk pangan dengan tekanan uap air jenuh pada temperatur yang sama. Nilai A_w tersebut menggambarkan tingkat keterikatan air pada sistem pangan yang dapat digunakan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhannya. Oleh sebab itulah A_w dapat dijadikan indikator untuk memprediksi stabilitas dan keamanan produk pangan. Penggunaan prinsip A_w banyak diadaptasi dalam regulasi pangan diantaranya yang menyangkut pertumbuhan dan perkembangan mikroorganisme, standar beberapa produk pangan awetan, dan persyaratan pengemasan.

Nilai A_w diperoleh dengan membandingkan tekanan uap air pada produk pangan (P) terhadap tekanan uap air murni (P_0) pada temperatur tertentu yang

diberikan. Pengalihan A_w dengan 100 akan memberikan persen equilibrium relative humidity (ERH) atmosfer pada kondisi kesetimbangan pangan.

A_w pada bahan pangan pada umumnya sangat mudah untuk dibekukan maupun diuapkan. Hubungan kadar air dengan A_w ditunjukkan dengan kecenderungan bahwa semakin tinggi kadar air maka semakin tinggi pula nilai A_w . Kadar jair dinyatakan dalam persen (%) pada kisaran skala 0-100, sedangkan nilai A_w dinyatakan dalam angka desimal pada kisaran skala 0-1,0 (Legowo dan Nurwanto, 2004).

3.3.10 SEM (Scanning Electron Microscope)

SEM adalah jenis mikroskop elektron yang menghasilkan gambar dari sampel dengan memindai dengan sinar terfokus elektron. Elektron berinteraksi dengan atom dalam sampel, memproduksi berbagai sinyal yang dapat dideteksi dan yang berisi informasi tentang sampel topografi permukaan dan komposisi.

Berkas elektron umumnya dipindai dalam pola raster scan, dan posisi balok yang dikombinasikan dengan sinyal yang terdeteksi untuk menghasilkan gambar. Diameter dan bentuk dari mikrokapsul diperiksa dengan *Scanning Electron Microscope*, dengan cara mikrokapsul ditempatkan merata pada aluminium stubs yang berupa lempengan berdiameter 6 mm kemudian divakum dengan gas argon sampai stabil dan dilapisi emas dengan *sputter coater* selama 20 detik. Selanjutnya aluminium stubs yang berisi sampel dimasukkan pada alat *electron microscope* dan diamati diameter mikrokapsul serta bentuk mikroskopis dari mikrokapsul (Lian *et al.*, 2002).