

**PENGARUH PERBEDAAN KONSENTRASI KITOSAN MIKROKAPSUL  
*Lactobacillus acidophilus* TERSALUT SEMI REFINED CARAGEENAN (SRC)  
IOTA TERHADAP VIABILITAS**

**SKRIPSI**

Oleh :  
**DEASY EVELIN SICILIA**  
NIM. 135080301111137



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**PENGARUH PERBEDAAN KONSENTRASI KITOSAN MIKROKAPSUL  
*Lactobacillus acidophilus* TERSALUT SEMI REFINED CARAGEENAN (SRC)  
IOTA TERHADAP VIABILITAS**

**SKRIPSI**

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan Di Fakultas  
Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya

Oleh :  
**DEASY EVELIN SICILIA**  
**NIM. 135080301111137**



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

SKRIPSI

PENGARUH PERBEDAAN KONSENTRASI KITOSAN MIKROKAPSUL  
*Lactobacillus acidophilus* TERSALUT SEMI REFINED CARAGEENAN (SRC)  
IOTA TERHADAP VIABILITAS

Oleh :

Deasy Evelin Sicilia  
NIM. 135080301111137

Telah dipertahankan di depan penguji  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

Dr. Ir. Dwi Setijawati, M.Kes  
NIP. 19611022 198802 2 001  
Tanggal: 17 DEC 2018

Dosen Pembimbing II

Hefti Salis Yufidasari, S.Pi., MP  
NIP. 19810331 201504 2 001  
Tanggal : 17 DEC 2018

Mengetahui,  
Ketua Jurusan MSP

Dr. Ir. Muhammad Firdaus, MP  
NIP. 19680919 200501 1001

17 DEC 2018

## LEMBAR KOMISI PENGUJI

Judul : Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Kitosan Mikrokapsul *Lactobacillus acidophilus* Tersalut Semi Refined Carageenan (SRC) Iota terhadap Viabilitas

Nama Mahasiswa : Deasy Evelin Sicilia  
NIM : 135080301111137  
Program Studi : Teknologi Hasil Perikanan

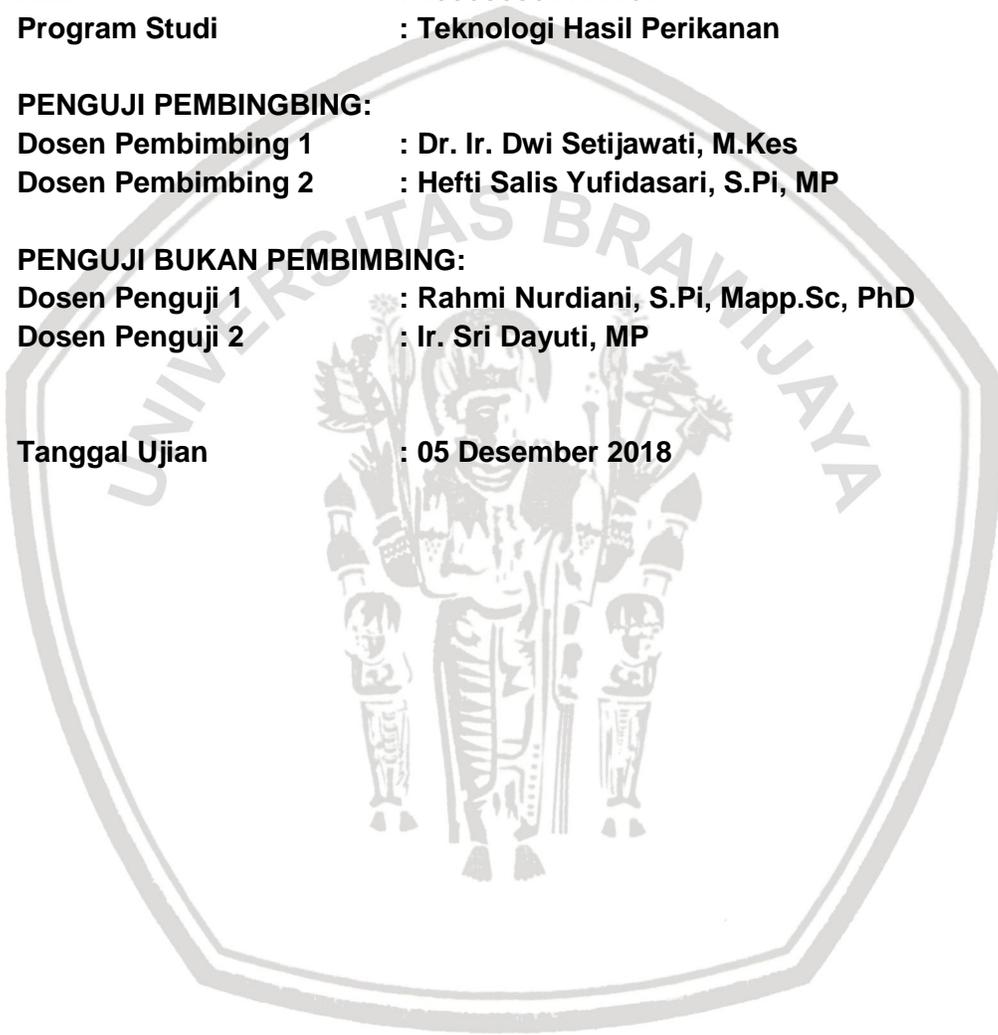
## PENGUJI PEMBINGBING:

Dosen Pembimbing 1 : Dr. Ir. Dwi Setijawati, M.Kes  
Dosen Pembimbing 2 : Hefti Salis Yufidasari, S.Pi, MP

## PENGUJI BUKAN PEMBINGBING:

Dosen Penguji 1 : Rahmi Nurdiani, S.Pi, Mapp.Sc, PhD  
Dosen Penguji 2 : Ir. Sri Dayuti, MP

Tanggal Ujian : 05 Desember 2018



## PERNYATAAN ORISINILITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar benar merupakan hasil karya saya sendiri dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.



Malang, Desember 2018  
Mahasiswa,

Deasy Evelin Sicilia  
NIM. 13508030111137



## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak-pihak yang telah memberikan banyak bantuan, berkontribusi, dukungan, semangat, serta kritik dan saran baik secara langsung maupun tidak langsung dalam membantu kelancaran penelitian hingga penulisan laporan skripsi ini dapat terselesaikan.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya diberikan kepada:

1. Tuhan Yang Maha Esa yang telah berkehendak atas segala kelancaran dan kemudahan yang diberikan dalam penyelesaian penelitian dan penulisan laporan skripsi ini.
2. Kedua orang tua tercinta serta adik penulis Caca, Cia dan Bastian yang telah memberikan doa, dukungan, nasehat, motivasi dan semangat sehingga penulisan laporan skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
3. Ibu Dr. Ir. Dwi Setijawati, M.Kes dan Ibu Hefti Salis Yufidasari, S.Pi, M.P selaku dosen pembimbing atas kesediaan waktunya telah memberikan bimbingan dan bantuan dalam penyelesaian laporan.
4. Ibu Rahmi Nurdiani, S.Pi, Mapp.Sc, PhD dan Ibu Ir. Sri Dayuti, MP selaku dosen penguji atas kesediaan waktu yang telah diberikan.
5. Teman-teman sebimbing dan tim Mikroenkapsulasi, terutama untuk Alim, Indra dan Denmas yang telah banyak membantu mulai dari awal penelitian hingga terselesaikannya penulisan skripsi ini.
6. Yang berjasa Kristopel, Angel Leony, Hafiz, Sarah "Sartip" buat peminjaman laptop yang telah diberikan untuk penulis, sehingga laporan ini dapat terselesaikan.
7. Tim penyemangat Kristopel, Sri, Angel, Meilisa, Tessa, Henny, Ita, Edo, Epan, Jodhy, Putri dan Neny yang telah memberikan semangat, hiburan, motivasi, dukungan serta selalu mendengar keluh kesah penulis.

8. KMKK yang telah mendukung dan memberikan semangat kepada penulis.
9. Keluarga besar Mahasiswa Teknologi Hasil Perikanan angkatan 2013 Program Studi Teknologi Hasil Perikanan.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu, yang telah mendukung dan memberikan bantuan selama penelitian hingga skripsi ini terselesaikan.

Malang, Desember 2018

Penulis



## RINGKASAN

**DEASY EVELIN SICILIA.** Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Kitosan Mikrokapsul *Lactobacillus acidophilus* Tersalut *Semi Refined Carrageenan* (SRC) Iota Terhadap Viabilitas. (dibawah Bimbingan **Dr. Ir. Dwi Setijawati, M.Kes** dan **Hefti Salis Yufidasari, S.Pi., MP**).

Bakteri Asam Laktat merupakan mikroorganisme fermentatif yang dapat hidup pada kisaran pH yang luas contohnya *Lactobacillus* yang lebih toleran terhadap pH rendah. Bakteri probiotik dapat dipertahankan agar tetap aktif sampai ke usus menggunakan teknik mikroenkapsulasi, berbagai teknik telah dilakukan untuk melindungi bahan inti probiotik. Salah satu teknik yang sering digunakan adalah mikroenkapsulasi. Mikroenkapsulasi merupakan suatu proses penyalutan yang secara tipis partikel padat, tetesan cairan dan dispersi zat cair, oleh bahan penyalut. Dalam hal ini, beberapa jenis penyalut digabungkan untuk memaksimalkan fungsi dari pelapis atau *coating* pada mikrokapsul. *Coating* adalah suatu metode pemberian lapisan kedua pada permukaan bahan pangan yang telah diberi *coating* yang berguna untuk menghambat keluarnya zat aktif, sehingga proses penyimpanan dapat bertahan lebih lama. Karena penggunaan bahan penyalut tunggal satu lapis memberikan hasil yang kurang maksimal, maka penggunaan kombinasi berbagai bahan sebagai bahan penyalut telah disarankan. Kombinasi beberapa bahan penyalut digunakan sebagai campuran untuk membuat lapisan multilayer atau double coating. Bahan penyalut yang dapat digunakan untuk mikroenkapsulasi berbagai macam jenisnya seperti alginat, karaginan, maltodekstrin, gum arab, dan kitosan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan kitosan dengan konsentrasi yang berbeda sebagai *double coating* mikrokapsul *Lactobacillus acidophilus* terhadap viabilitas.

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli-Desember 2017 bertempat di Laboratorium Perekayasaan Hasil Penelitian, Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Laboratorium Hidrobiologi, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, dan Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dengan variabel bebas dan variabel terikat. Parameter uji yang digunakan meliputi viabilitas, kadar air, diameter, *water activity*, dan pewarnaan gram mikroenkapsulasi.

Berdasarkan penelitian dengan 5 perlakuan yaitu, 0%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2% dapat diperoleh bahwa pemberian konsentrasi kitosan sebagai *coating* yang berbeda pada mikroenkapsulasi Iota *Semi Refined Carrageenan* (SRC) memberikan pengaruh terhadap viabilitas bakteri *Lactobacillus acidophilus*, kadar air, diameter, *water activity*, dan pewarnaan gram mikroenkapsulasi.

Dari hasil penelitian didapatkan nilai viabilitas, kadar air, diameter, dan *water activity*, terdapat pada konsentrasi kitosan sebesar 2% dengan nilai rata-rata secara berturut-turut adalah 5.07 log CFU/g, 7.02%, 21,37 $\mu$ m, dan 0.76.

Saran yang diberikan pada penelitian selanjutnya yaitu menggunakan konsentrasi kitosan beragam dan memperhatikan kualitas mikroenkapsulasi agar didapatkan hasil yang lebih baik lagi sehingga dapat memenuhi standar probiotik yang diaplikasikan pada produk pangan.

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kepada Tuhan yang Maha Esa yang telah melimpahkan segala rahmat, rezeki serta karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir skripsi dengan judul “Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Kitosan Mikrokapsul *Lactobacillus acidophilus* Tersalut *Semi Refined Carageenan* (SRC) Iota Terhadap Viabilitas”

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan laporan ini masih jauh dari kesempurnaan, ada keterbatasan pengetahuan dan kemampuan. Besar harapan penulis agar kritik serta saran yang membangun dari semua pihak perlu di berikan kepada penulis agar penulisan laporan ini menjadi lebih baik. Penulis berharap agar laporan ini dapat bermanfaat bagi semuanya khususnya bagi para pembaca, serta dapat bermanfaat untuk penelitian kedepannya.

Malang, Desember 2018

Penulis

DAFTAR ISI

<b>SKRIPSI</b> .....	<b>iii</b>
<b>LEMBAR KOMISI PENGUJI</b> .....	<b>iv</b>
<b>PERNYATAAN ORISINILITAS</b> .....	<b>v</b>
<b>UCAPAN TERIMA KASIH</b> .....	<b>vii</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>ix</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>v</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>vi</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>x</b>
<b>1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Hipotesis Penelitian.....	4
1.5 Kegunaan Penelitian.....	4
1.6 Tempat dan Waktu Penelitian.....	5
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>6</b>
2.1 Probiotik .....	6
2.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	7
2.3 Karaginan.....	9
2.3.1 Iota Karaginan.....	10
2.3.2 <i>Semi Refined Carrageenan (SRC)</i> .....	12
2.4 Mikroenkapsulasi.....	13
2.4.1 Metode Mikroenkapsulasi Gel Partikel dengan Oven Vakum.....	14
2.4.2 <i>Double Coating</i> .....	15
2.5 Kitosan .....	16
2.6 Viabilitas Bakteri .....	17
<b>3. METODELOGI PENELITIAN</b> .....	<b>19</b>
3.1 Materi Penelitian.....	19

3.1.1	Alat penelitian .....	19
3.1.2	Bahan Penelitian .....	19
3.2	Metode Penelitian .....	20
3.2.1	Metode .....	20
3.2.2	Variabel Penelitian.....	20
3.2.3	Rancangan Penelitian.....	20
3.3	Prosedur Penelitian .....	22
3.3.1	Penelitian Pendahuluan.....	22
3.3.2	Penelitian Utama .....	25
<b>4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>31</b>
4.1	Penelitian Pendahuluan.....	31
4.1.1	Spektra FT-IR <i>SRCEucheuma spinosum</i> .....	31
4.1.2	Viskositas .....	35
4.1.3	Kekuatan Gel.....	36
4.2	Penelitian Utama .....	37
4.2.1	Viabilitas <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	37
4.2.2	Kadar Air .....	40
4.2.3	<i>Water activity</i> ( $a_w$ ).....	42
4.2.4	Diameter Enkapsulat .....	44
4.2.5	Pewarnaan Gram .....	46
<b>5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>47</b>
5.1	Kesimpulan.....	47
5.2	Saran.....	47
	<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>48</b>
	<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>55</b>

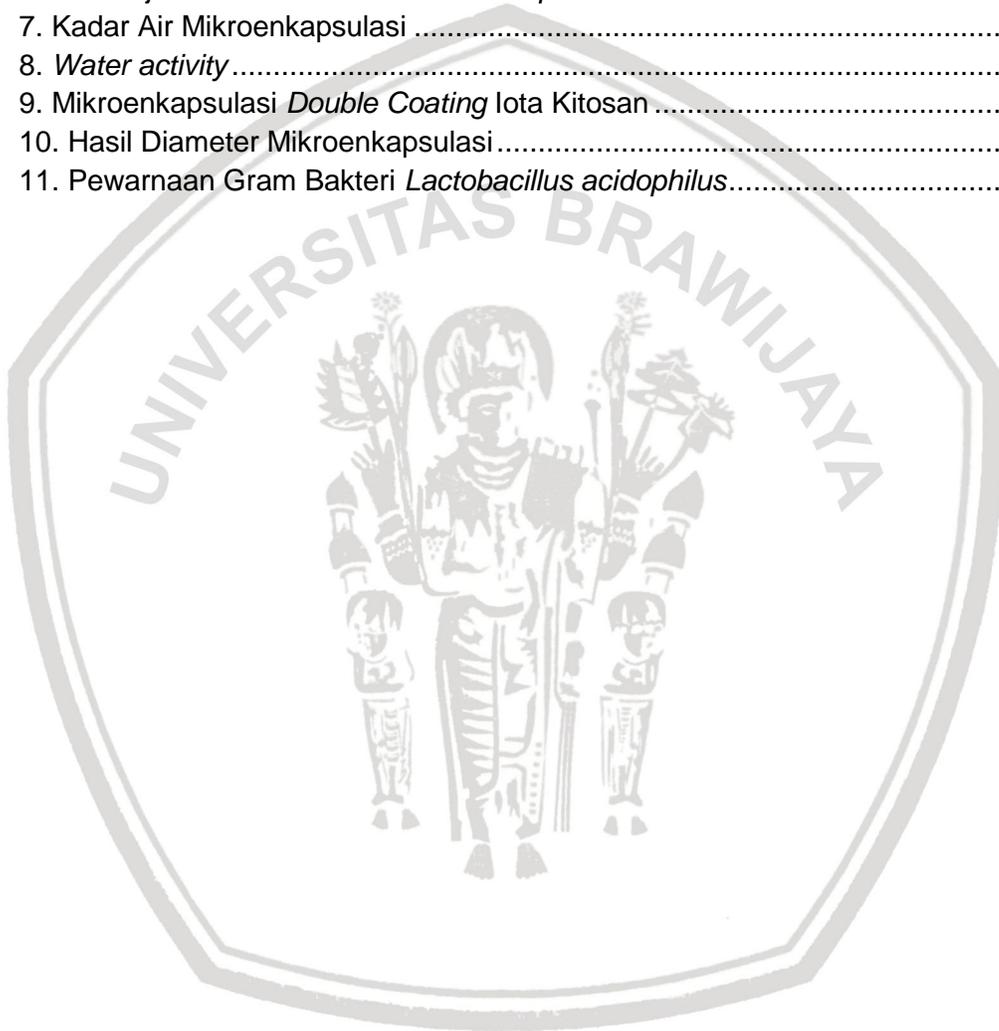
## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Perbedaan Iota Karaginan dan SRC Iota.....	13
2. Rancangan Percobaan Penelitian.....	21
3. Gugus Fungsional Pita Serapan FTIR SRC <i>Eucheuma spinosum</i> .....	32
4. Gugus Fungsi Spektrum Infra Merah pada Kitosan.....	34
5. Hasil Nilai Viskositas SRC Iota dan Kitosan.....	35
6. Kekuatan Gel SRC <i>Eucheuma spinosum</i> dan Kitosan.....	36



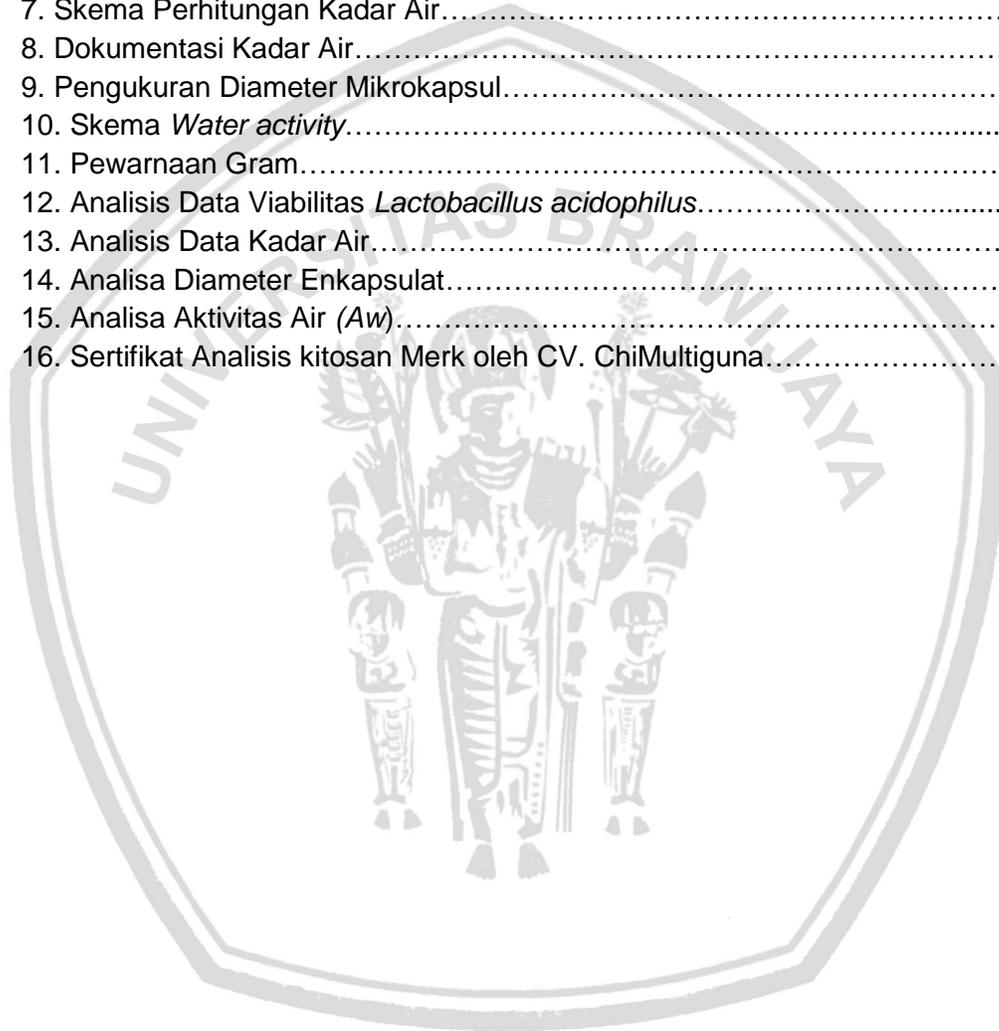
## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	7
2. Struktur kimia iota karaginan.....	12
3. Struktur Kitosan .....	16
4. Hasil Pengukuran Spektra FT-IR <i>Eucheuma spinosum</i> .....	31
5. Hasil Pengukuran Spektra FT-IR Kitosan.....	33
6. Hasil Uji Viabilitas <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	38
7. Kadar Air Mikroenkapsulasi .....	41
8. <i>Water activity</i> .....	43
9. Mikroenkapsulasi <i>Double Coating</i> Iota Kitosan .....	44
10. Hasil Diameter Mikroenkapsulasi.....	45
11. Pewarnaan Gram Bakteri <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	46



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan Semi Refined Carrageenan (SRC) Iota.....	55
2. Dokumentasi Pembuatan SRC Iota.....	56
3. Skema Pembuatan Mikrokapsul <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	58
4. Dokumentasi Pembuatan Mikroenkapsulasi <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	59
5. Skema Pengujian Viabilitas Mikrokapsul <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	61
6. Dokumentasi Viabilitas Mikrokapsul <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	62
7. Skema Perhitungan Kadar Air.....	63
8. Dokumentasi Kadar Air.....	64
9. Pengukuran Diameter Mikrokapsul.....	65
10. Skema <i>Water activity</i> .....	66
11. Pewarnaan Gram.....	67
12. Analisis Data Viabilitas <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	68
13. Analisis Data Kadar Air.....	69
14. Analisa Diameter Enkapsulat.....	71
15. Analisa Aktivitas Air ( <i>Aw</i> ).....	73
16. Sertifikat Analisis kitosan Merk oleh CV. ChiMultiguna.....	75



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Bakteri Probiotik adalah mikroorganisme non patogen yang bila dikonsumsi dapat memberikan pengaruh positif terhadap fisiologi dan kesehatan inangnya. Senyawa hasil metabolisme bakteri probiotik seperti asam laktat, bakteriosin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bersifat antimikroba dan berbagai enzim seperti laktase dapat membantu mengatasi intoleransi terhadap laktosa (Triana., 2006). Efek fungsional probiotik ditunjukkan dengan probiotik yang mencapai saluran pencernaan hingga 10<sup>7</sup> CFU/mL. Mikroflora probiotik yang memproduksi asam laktat biasanya berasal dari golongan *Lactobacilli* (Setijawati *et al.*, 2011).

*Lactobacillus acidophilus* termasuk spesies yang tergolong bakteri probiotik. Genus *Lactobacillus acidophilus* adalah termasuk probiotik yang sering digunakan baik dalam produk makanan, minuman, obat maupun produk farmasi yang lain dan dikenal sebagai bakteri asam laktat (BAL) karena kemampuannya menghasilkan kandungan asam laktat (Rosiana *et al.*, 2008). Bakteri Asam Laktat (BAL) berkontribusi besar memberikan manfaat fungsional bagi tubuh manusia sebagai bakteri probiotik. Dimana bakteri probiotik merupakan mikroorganisme hidup dalam bahan pangan yang memberikan manfaat kesehatan saluran pencernaan. Pada suhu optimum pertumbuhannya berkisar antara 30-40° C, dengan pH pertumbuhan yang optimum ialah pada kisaran 5,5-5,8, tapi pada umumnya dapat tumbuh pada pH di bawah 5, bakteri Asam Laktat merupakan mikroorganisme fermentatif yang dapat hidup pada kisaran pH yang luas contohnya *Lactobacillus* yang lebih toleran terhadap pH rendah (Leoangraini dan Bintang, 2011). Ketahanan terhadap asam lambung merupakan syarat penting suatu Bakteri Asam Laktat (BAL) untuk dapat

menjadi probiotik. Menurut Arslan *et al.*, (2017), bakteri probiotik dapat dipertahankan agar tetap aktif sampai ke usus menggunakan teknik mikroenkapsulasi, berbagai teknik telah dilakukan untuk melindungi bahan inti probiotik. Salah satu teknik yang sering digunakan adalah mikroenkapsulasi.

Mikroenkapsulasi merupakan suatu proses penyalutan yang secara tipis partikel padat, tetesan cairan dan dispersi zat cair, oleh bahan penyalut. Mikrokapsul sebagai hasil dari proses mikroenkapsulasi mempunyai ukuran antara 1-5.000  $\mu\text{m}$ , memiliki kelarutan dan stabilitas yang lebih baik. Mikrokapsul dibuat dari substansi inti tunggal atau lebih dalam padat atau cairan yang dikelilingi oleh dinding kapsul. Dinding kapsul merupakan matriks polimer yang didalamnya dienkapsulasi dengan bahan yang terdispersi secara homogen (Ade Nugraheni *et al.*, 2015). Metode yang biasa digunakan dalam mikroenkapsulasi adalah gel partikel. Metode gel partikel memiliki beberapa cara pengeringan, salah satunya yaitu dengan menggunakan pengering vakum. Mikroenkapsulasi dengan pengering vakum mampu mempertahankan viabilitas *Lactobacillus*. Viabilitas bakteri probiotik merupakan hal penting yang harus diperhatikan agar bakteri probiotik dapat memberikan efek pada tubuh. Untuk dapat bermanfaat pada manusia, probiotik harus dapat bertahan hidup saat melewati lambung dan harus dapat berkoloni di usus (Del Piano, 2011).

Bahan penyalut yang dapat digunakan untuk mikroenkapsulasi berbagai macam jenisnya seperti alginat, karaginan, maltodekstrin, gum arab, dan kitosan. Karaginan merupakan senyawa hidrokoloid yang diperoleh dengan cara mengekstrak rumput laut seperti *Eucheuma spinosum*. Penambahan karaginan pada produk dapat meningkatkan stabilitas emulsi (Purnamayanti *et al.*, 2016). Salah satu karaginan yang digunakan sebagai penyalut mikrokapsul adalah *Semi Refined Carageenan* (SRC) iota. *Semi Refined Carageenan* (SRC) iota merupakan

polisakarida yang diekstraksi dari rumput laut berjenis *Eucheuma spinosum*. Konsentrasi *Semi Refined Carageenan* (SRC) iota yang biasa digunakan sebagai penyalut adalah dari 1% hingga 2% dimana semakin tinggi konsentrasi semakin baik juga bahan itu digunakan sebagai penyalut. Kondisi optimal pembentukan kapsul pada konsentrasi sebesar 1-5% (Bartkowiak dan Hunkeler, 2001; Peranginangin, 2013).

Namun selain karaginan, kitosan juga dapat digunakan sebagai bahan penyalut mikroenkapsulasi. Kitosan juga polimer yang bersifat polikationik. Adanya gugus hidroksil dan amino mengakibatkan kitosan dengan mudah mengikat kation dari zat-zat organik seperti protein dan lemak. Selain itu kitosan juga dapat membentuk sebuah membran yang berfungsi sebagai absorben. Peran kitosan sebagai coating dalam mikroenkapsulasi yaitu dapat memperkuat manik-manik pada lapisan (Sashiwa *et al.*, 2003).

Penelitian sebelumnya dilakukan oleh Charta dan Miko (2017), menyebutkan bahwa konsentrasi 0%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2% kitosan *double coating* mikrokapsul *Bifidobacterium bifidum* tersalut SRC iota dan SRC kappa-iota, mampu melindungi viabilitas sel *Bifidobacterium bifidum*. Berdasarkan uraian tersebut, sehingga perlu dilakukan penelitian tentang mikrokapsul *Lactobacillus acidophilus* tersalut SRC iota terhadap viabilitas dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh perbedaan konsentrasi kitosan pada *double coating* mikrokapsul *Lactobacillus acidophilus* tersalut SRC iota terhadap viabilitas sehingga akan didapatkan konsentrasi dan viabilitas terbaik.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang mendasari penelitian ini adalah apakah

penambahan kitosan sebagai *double coating* dengan konsentrasi yang berbeda mampu berpengaruh terhadap viabilitas mikrokapsul *Lactobacillus acidophilus* tersalut *Semi Refined Carageenan* (SRC) iota.

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan kitosan dengan konsentrasi yang berbeda sebagai *double coating* mikrokapsul *Lactobacillus acidophilus* tersalut *Semi Refined Carageenan* (SRC) iota terhadap viabilitas.

### 1.4 Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang mendasari penelitian ini adalah:

$H_0$  = Diduga Penambahan kitosan sebagai *double coating* mikrokapsul *Lactobacillus acidophilus* yang tersalut SRC iota tidak memberikan pengaruh terhadap viabilitasnya.

$H_1$  = Diduga Penambahan kitosan sebagai *double coating* mikrokapsul *Lactobacillus acidophilus* yang tersalut SRC iota memberikan pengaruh terhadap viabilitasnya.

### 1.5 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi mengenai pengaruh penambahan kitosan sebagai *double coating* Mikrokapsul *Lactobacillus acidophilus* penyalut SRC iota karaginan dengan konsentrasi kitosan yang berbeda terhadap viabilitas. Hasil dari penelitian ini juga dapat diharapkan membantu pengembangan penelitian mikroenkapsulasi dikemudian hari.

### 1.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli-Desember 2017. Pelaksanaan penelitian di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, dan Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.



## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Probiotik

Probiotik merupakan mikroba hidup yang bila dikonsumsi dalam jumlah memadai akan membantu inangnya dalam menjaga flora normal saluran pencernaannya. Bakteri asam laktat (BAL) telah lama digunakan sebagai probiotik, termasuk didalamnya jenis *Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. sporogenes*, *L. casei*, *L. plantarum*, dan *Streptococcus* (Agestiawan *et al.*, 2014).

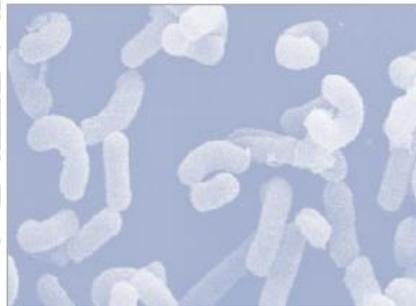
Prinsip kerja probiotik yaitu dengan memanfaatkan kemampuan organisme tersebut dalam menguraikan rantai panjang karbohidrat, protein dan lemak. Kemampuan ini diperoleh karena adanya enzim-enzim khusus yang dimiliki oleh mikroorganisme untuk memecah ikatan. Pemecahan molekul kompleks menjadi molekul sederhana mempermudah penyerapan oleh saluran pencernaan manusia. Di sisi lain, mikroorganisme pemecah ini mendapat keuntungan berupa energi yang diperoleh dari hasil perombakan molekul kompleks (Widiyaningsih, 2011).

Disamping istilah probiotik, sering juga disebut istilah prebiotik. Kedua istilah probiotik dan prebiotik berbeda. Produk-produk makanan dan minuman yang dijual sudah banyak yang menambahkan unsur prebiotik seperti roti biskuit, yoghurt, susu fermentasi. Prebiotik sendiri merupakan karbohidrat yang tidak dicerna oleh tubuh, namun dapat dicerna oleh mikroba yang menguntungkan di dalam tubuh, sehingga meningkatkan kesehatan. Prebiotik yang banyak dikenal dan digunakan adalah oligosakarida kedelai (yang terdiri atas rafinosa dan stakiosa), frukto oligosakarida (disebut juga oligofruktosa), inulin, laktulosa dan laktosukrosa. Inulin dan oligofruktosa memiliki fungsi penting sebagai penyeimbang fungsi gastrointestinal (menyeimbangkan mikroflora kolon). Prebiotik secara alami terdapat pada biji-bijian,

sayuran (asparagus, brokoli), buah-buahan dan bumbu masak seperti bawang putih, bawang merah, daun prei. Produk olahan kedelai seperti susu kedelai, tempe, tahu, dan tauco juga kaya akan prebiotik. Dalam hal ini bisa dikatakan bahwa prebiotik merupakan sumber makanan bagi probiotik (Widiyaningsih, 2011).

## 2.2 *Lactobacillus acidophilus*

*Lactobacillus* spp. merupakan kelompok anaerob fakultatif, katalase negatif, gram positif, tidak berspora, berbentuk batang yang tumbuh baik dibawah kondisi mikroaerofilik. Bakteri ini memiliki banyak bentuk, pendek, bulat-batang, panjang, dan silinder. Bentuk koloni sangat bervariasi dari kecil sampai sedang yang berwarna abu-abu. *Lactobacillus* mampu tumbuh pada media MRSA (Goldstein *et al.*, 2015).



**Gambar 1. *Lactobacillus acidophilus***

Sumber : Rahrs (2008)

*L.acidophilus* merupakan mikroflora alami pada saluran pencernaan manusia dan dapat memproduksi asam laktat sebagai hasil utama fermentasi gula. Bakteri ini dapat pula menghasilkan bakteriosin yang dapat merangsang pembentukan antibodi tubuh. Bakteri ini dapat melekat pada sel-sel epitel saluran pencernaan, ditemukan pada usus orang dewasa dan asal mulanya diisolasi dari feses bayi sehat yang berusia 1-2 bulan, dan air susu ibu (Adriani *et al.*, 2008).

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

*L. acidophilus* membantu pencernaan laktosa usus, merangsang respon kekebalan tubuh terhadap mikroorganisme yang tidak diinginkan dan membantu mengendalikan kadar kolesterol darah, serta menghasilkan zat seperti *lactocidine* atau *acidophiline* yang meningkatkan stamina dan kekebalan (Widiyaningsih, 2011). Bakteri *L. acidophilus* dapat menghambat pertumbuhan pada bakteri patogen yang terdapat pada saluran pencernaan dalam memproduksi protein yang disebut bakteriosin (Parameswari *et al.*, 2013)

Menurut Widiyaningsih, (2011), *L. acidophilus* membantu pencernaan laktosa usus, merangsang respon kekebalan tubuh terhadap mikroorganisme yang tidak diinginkan yang membantu mengendalikan kadar kolesterol darah. *L. acidophilus* juga menghasilkan *lactocidine* atau *acidophiline* yang meningkatkan stamina dan kekebalan. *L. acidophilus* akan menimbulkan dampak positif jika dikonsumsi dalam jumlah yang tepat, diperlukan upaya guna melindungi *L. acidophilus* yaitu dengan cara enkapsulasi. Upaya enkapsulasi telah dilakukan oleh Setijawati *et al.*, (2011) dengan menggunakan penyalut karaginan mampu menjaga viabilitas hingga  $10^6$  CFU/mL.

### 2.3 Karaginan

Karaginan merupakan molekul besar yang terdiri dari lebih 1000 residu galaktosa, oleh karena itu variasinya banyak sekali. Berdasarkan stereotip struktur molekul dan posisi ion sulfatnya, karaginan dapat dibedakan menjadi tiga macam yaitu SRC kappa, Iota dan lambda karaginan (Banadib dan Khoiruman, 2010). Jenis kappa karaginan yang dihasilkan dari rumput laut tropis *Kappaphycus alvarezii* atau biasa disebut dengan *E.cottoni*. *E.denticulatum* atau dengan nama dagang *E.spinsum* adalah spesies utama menghasilkan Iota karaginan, sedangkan karaginan lambda di produksi dari spesies *Gigartina* dan *Condrus* (Velde *et al.*, 2002).

Sifat-sifat karaginan meliputi kelarutan, viskositas, pembentukan gel dan stabilitas pH. Kelarutan karaginan dalam air dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya tipe karaginan, temperatur, pH, kehadiran jenis ion tandingan dan zat-zat terlarut lainnya. Karaginan dalam larutan memiliki stabilitas maksimum pada pH 9 dan akan terhidrolisis pada pH dibawah 3,5. Pada pH 6 atau lebih umumnya larutan karaginan dapat mempertahankan kondisi proses produksi karaginan. Hidrolisis asam akan terjadi jika karaginan berada dalam bentuk larutan, hidrolisis akan meningkat sesuai dengan peningkatan suhu. Larutan karaginan akan menurun viskositasnya jika pHnya diturunkan dibawah 4,3. Kappa dan Iota karaginan dapat digunakan sebagai pembentuk gel pada pH rendah, tetapi tidak mudah terhidrolisis sehingga tidak dapat digunakan dalam pengolahan pangan. Penurunan pH menyebabkan terjadinya hidrolisis dari ikatan glikosidik yang mengakibatkan kehilangan viskositas. Viskositas suatu hidrokoloid dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu konsentrasi karaginan, temperatur, jenis karaginan, berat molekul dan adanya

molekul-molekul lain. Jika konsentrasi karaginan meningkat maka viskositasnya akan meningkat (Prasetyowati, 2008).

Pada metode ekstraksi, karaginan terbagi menjadi 2 yaitu *semi refined* dan *refined carrageenan*. Metode ekstraksi karaginan *semi-refined* atau biasa disebut dengan *Alkali Treated Carrageenophyte (ATC)*. *Semi Refined Carrageenan (SRC)* adalah salah satu produk karaginan dengan tingkat kemurnian lebih rendah jika dibandingkan dengan *Refined Carrageenan (RC)*, karena masih mengandung sejumlah kecil selulosa yang ikut mengendap bersama karaginan. SRC secara komersil diproduksi dari rumput *E.cottoni* melalui proses ekstraksi menggunakan larutan alkali (KOH) (Oviantari dan Parwata, 2007). Iota karaginan bersifat tidak keras, lembut, elastis dan memiliki sineresis rendah (Diharmi *et al.*, 2011). Perbedaan utama antara kappa dan iota karaginan adalah adanya gugus 2-sulfat pada gugus 3,6 anhidro D-galaktosa pada iota karaginan yang mempengaruhi sensitivitas terhadap ion kalium.

### **2.3.1 Iota Karaginan**

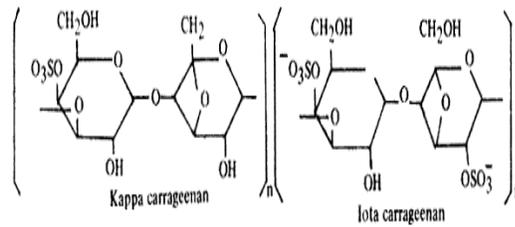
Karaginan merupakan hidrokolid yang terdiri dari kalium, magnesium, kalsium sulfat ester galaktosa dan 3,6 anhidro galaktosa kopolimer. Karaginan dapat diekstraksi dengan menggunakan garam yang dapat bertujuan untuk pembentukan gel. Karaginan juga dapat dimurnikan dengan menggunakan alkohol, etanol dan isopropanol (Genu, 2001). Menurut Setijawati *et al.*, (2011), salah satu sifat fisik yang penting pada SRC adalah kekuatan untuk membentuk gel yang disebut sebagai kekuatan gel. Sifat inilah yang berhubungan dengan kemampuannya sebagai bahan penyalut.

Berdasarkan kandungan sifatnya karaginan dibagi menjadi 2 fraksi yaitu kappa karaginan yang memiliki kandungan sulfat yang kurang dari 28% dan iota lebih dari 30%. Jenis rumput laut menghasilkan karaginan berbeda-beda, seperti *E.cottoni* menghasilkan kappa karaginan, *E.spinosum* menghasilkan iota karaginan dan *Chondrus crispus* menghasilkan lambda karaginan. Iota karaginan memiliki sifat dapat membentuk gel yang elastis dengan garam kalsium, berwarna kuning dan tidak terjadi sineresis, kappa karaginan pembentukan gel yang kuat, berwarna jernih, dan beberapa dapat bersineresis, sedangkan lambda karaginan tidak dapat membentuk gel karena memiliki viskositas yang tinggi (Peranginangin,2013).

Menurut Ewing (1982), iota karaginan merupakan karaginan yang diperoleh dari hasil ekstraksi rumput laut *Eucheuma spinosum*. Iota karaginan memiliki gugus fungsional dapat dilihat ketika dilakukan menggunakan Spektrofotometer FT-IR. FT-IR adalah pengujian yang menghasilkan pentransmisiian cahaya sebagai intensitas fungsi energi dari bahan, panjang gelombang (atau dengan bilangan ( $\text{cm}^{-1}$ )).

Menurut FAO (2001), iota karaginan memiliki gugus ester sulfat, gugus fungsi 3,6-anhidrogalaktosa, galaktosa-4-sulfat dan gugus fungsi 3,6-anhidrogalaktosa-2-sulfat. Struktur kimia iota karaginan sebagai berikut.

Gugus G4S yang merupakan gugus dari D-galaktosa-4-sulfat memiliki ikatan -1,3. Gugus fungsi DA2S merupakan gugus dari 3,6-anhidrogalaktosa-2-sulfat memiliki ikatan -1,4 (Campo *et al.*, 2009). Menurut Hernandez dan Camona (2013), iota karaginan membentuk tekstur keras setelah dicampurkan dengan ion  $\text{Ca}^{2+}$  (garam kalsium) yang memiliki bentuk yang bersifat bening, elastis dan sifat gelasi yang tidak cepat terbentuk. Menurut Betha (2014), ion  $\text{Ca}^{2+}$  adalah ion yang paling umum digunakan untuk tujuan amobilisasi sel karena toksisitasnya paling rendah. Gambar struktur iota karaginan dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2. Struktur kimia iota karaginan**  
(Campo *et al.*, 2009 )

### 2.3.2 Semi Refined Carrageenan (SRC)

*Semi refined carrageenan (SRC)* merupakan produk karaginan yang memiliki tingkat kemurnian lebih rendah dari pada refined carrageenan (RC). Hal ini disebabkan karena masih mengandung sejumlah kecil bagian selulosa yang ikut mengendap bersama karaginan. Secara komersial, *Semi Refined Carrageenan (SRC)* diproduksi dari rumput laut jenis *Eucheuma sp* melalui proses ekstraksi menggunakan larutan alkali (Oviantri *et al.*, 2007).

SRC iota merupakan golongan alga merah berjenis *E. spinosum* yang diperoleh dari ekstraksi rumput laut dengan menggunakan larutan alkali pada temperatur yang tinggi. Perbedaan antara SRC dan iota karaginan adalah pada tingkat kemurniannya. SRC masih mengandung sejumlah kecil selulosa yang ikut mengendap bersama karaginan. Karakteristik SRC iota adalah kenampakan berwarna agak kekuningan, ukuran 100 mesh, total sulfat 15-30%, viskositas >5 mPa.s, kekuatan gel lemah, pH 8-11. Tingkat kekuatan gel dari SRC iota lebih kecil dibandingkan dengan iota karaginan karena SRC merupakan Karaginan Semi murni. Tingkat kemurnian karaginan dapat dilihat pada intensitas yang muncul pada pengujian FTIR (Diharmi *et al.*, 2011). Adapun perbedaan iota karaginan dan SRC iota apabila dilihat dari intensitasnya dapat di lihat pada Tabel 1.

**Tabel 1. Perbedaan Iota Karaginan dan SRC Iota**

Iota Karaginan		SRC Iota	
Panjang gelombang (cm <sup>-1</sup> )	Intensitas	Panjang gelombang (cm <sup>-1</sup> )	Intensitas
3201.83	Sedang	3427.27	Lemah
1222.83	Kuat	1261.36	Lemah
1070	Sedang	1072.35	Lemah
1029.99	Sedang	1031.85	Lemah
964.41	Sedang	970.13	Sedang
933.55	Kuat	931.55	Lemah
852.54	Kuat	848.62	Lemah
806.25	Kuat	804.26	Sedang

Sumber: Gurning *et al.*, (1998)

#### 2.4 Mikroenkapsulasi

Mikroenkapsulasi merupakan suatu proses penyalutan secara tipis partikel padat, tetesan cairan dan dispersi zat cair oleh bahan penyalut. Mikro kapsul sebagai hasil dari proses mikroenkapsulasi mempunyai ukuran antara 1-5.000  $\mu\text{m}$ , memiliki kelarutan dan stabilitas yang lebih baik (Febriyenti *et al.*, 2014). Enkapsulasi merupakan cara untuk melindungi bakteri dari faktor lingkungan yang dapat merusak dan mematikan bakteri tersebut. Enkapsulasi pada bakteri bertujuan mempertahankan viabilitas bakteri selama proses saat berada dalam pencernaan manusia yang memiliki pH rendah. Bakteri akan mudah rusak ketika tidak dilindungi penyalut saat proses dalam usus yang memiliki pH lambung yang rendah karena jumlah bakteri pada saat proses tidak dapat dipertahankan ketika bakteri tidak dilindungi oleh enkapsulat (Chavvari *et al.*, 2010).

Menurut Kailasaphaty (2002), mikroenkapsulasi terdiri atas membran yang kuat dan semipermeabel sehingga bakteri probiotik yang tersalut dapat bertahan dengan mikroenkapsulasi. Membran semipermeabel pada mikro kapsul dapat

mempermudah nutrisi dan metabolit menyebar pada mikrokapsul. Membran tersebut akan mengeluarkan sel yang dapat menurunkan kontaminasi.

Proses pembuatan mikrokapsul diperlukan suatu bahan penyalut. Bahan penyalut yang digunakan sebaiknya mempunyai karakteristik secara kimiawi kompatibel dan tidak bereaksi dengan bahan inti, memiliki kekuatan, fleksibilitas (lembut dan plastis), impermeabilitas (sebagai kontrol pelepasan dalam kondisi tertentu), tidak berasa, tidak higroskopis, viskositas rendah, ekonomis, dapat melarut dalam media pelarut yang sesuai atau dapat melebur, tidak rapuh, keras, tipis dan stabil. Selain itu bahan penyalut mikrokapsul harus dapat digunakan secara luas dalam metode pembuatan mikrokapsul (Srifiana *et al.*, 2014).

#### **2.4.1 Metode Mikroenkapsulasi Gel Partikel dengan Oven Vakum**

Pembentukan gel adalah suatu fenomena penggabungan atau pengikatan silang rantai-rantai polimer sehingga terbentuk suatu jala tiga dimensi bersambungan. Selanjutnya jala ini menangkap atau mengimobilisasi air di dalamnya dan membentuk struktur yang kuat dan kaku. Pembentukan gel dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain jenis dan tipe karaginan, konsistensi, adanya ion-ion serta pelarut yang menghambat pembentukan hidrokoloid (Prasetyowati *et al.*, 2008).

Gel partikel merupakan salah satu metode dalam pembuatan lapisan luar untuk melindungi bakteri di dalamnya. Metode gel partikel dilakukan dengan cara mencampurkan sel bakteri dengan bahan penyalut pada suhu 40 – 45° C, tujuan dari pencampuran sel bakteri dan bahan penyalut ini merupakan sebagai pelindung bakteri dari kondisi lingkungan. Sol yang dihasilkan dari pencampuran antara sel bakteri dan penyalut diambil dengan menggunakan spuit diameter lubang jarum

pada ukuran 0.3 - 3 mm dan disemprotkan kedalam larutan kalium klorida (KCl). Hal ini dilakukan untuk mendapatkan bentukan gel dari sel bakteri yang sudah tersalut dengan penyalut (Manojlovic *et al.*, 2010).

Teknik ekstruksi dilakukan dengan cara mencampurkan hidrokolid dengan sel probiotik, campuran antar sel dan hidrokolid dimasukan ke dalam ekstruder dengan jarum suntik membentuk tetesan dari tekanan jarum dan dimasukan kedalam larutan pembentuk gel, kemudian diaduk secara perlahan (Gbassi *et al.*, 2012). Setelah dilakukan proses ekstruksi dan di dapatkan sel probiotik yang tersalut berupa butiran-butiran, dilakukan pengeringan dengan menggunakan oven vakum suhu 40° C selama 24 jam. Oven vakum berfungsi untuk mengeringkan sel bakteri yang sudah tersalut, cara kerja pada oven vakum yaitu dengan cara menguapkan kadar air dalam bahan dengan cara menekan uap air yang terdapat pada mikrokapsul tersebut (Lachman *et al.*, 1994).

#### **2.4.2 Double Coating**

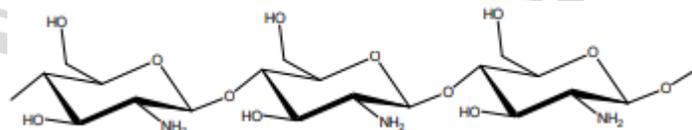
*Double coating* merupakan suatu metode yang digunakan untuk menambah lapisan pada mikrokapsul yang sudah tersalut dengan bahan penyalut sebelumnya. Dalam hal ini, beberapa jenis penyalut digabungkan untuk memaksimalkan fungsi dari pelapis atau *coating* pada mikrokapsul. Karena penggunaan bahan penyalut tunggal satu lapis memberikan hasil yang kurang maksimal, maka penggunaan kombinasi berbagai bahan sebagai bahan penyalut telah disarankan. Kombinasi beberapa bahan penyalut digunakan sebagai campuran untuk membuat lapisan multilayer atau *double coating* (Belmont *et al.*, 2015).

Bahan penyalut yang dapat digunakan untuk mikroenkapsulasi berbagai macam jenisnya seperti alginat, karaginan, maltodekstrin, gum arab, dan kitosan.

Karaginan merupakan senyawa hidrokoloid yang diperoleh dengan cara mengekstrak rumput laut seperti *Eucheuma spinosum*. Penambahan karaginan pada produk dapat meningkatkan stabilitas emulsi (Purnamayanti *et al.*, 2016). Namun selain karaginan, kitosan juga dapat digunakan sebagai bahan penyalut mikroenkapsulasi.

## 2.5 Kitosan

Kitosan merupakan produk hasil turunan kitin dengan rumus N-asetil-D-Glukosamin. Kitosan ini merupakan polimer kationik yang mempunyai jumlah monomer sekitar 2000-3000 monomer, memiliki berat molekul  $\pm 800$  kD, dan tidak bersifat toksik. Pada umumnya, bahan pembuatan kitosan berasal dari limbah industri perikanan seperti udang, rajungan, dan kepiting yang mana dimanfaatkan bagian kepala, kulit ataupun karapasnya (Supitjah *et al.*, 2008). Kitosan menjadi biopolimer alami yang menarik disebabkan adanya gugus amino reaktif dan gugus fungsional hidroksil. Kitosan memiliki karakteristik biokompatibilitas yang diinginkan serta kemampuan untuk meningkatkan permeabilitas membran. Oleh karena kitosan merupakan salah satu matriks imobilisasi yang paling menjajikan karena memiliki kemampuan membentuk membran, sifat adhesi yang baik, harga murah, tidak beracun, kekuatan mekanis dan hidrofilisitas yang tinggi serta perbaikan stabilitas (Irianto dan Muljanah, 2011).



**Gambar 3. Struktur Kitosan**  
(Dompeipen *et al.*, 2016)

Kitosan adalah senyawa yang berbentuk padatan yang tidak memiliki titik lebur yang melebar berwarna putih kekuningan, memiliki sifat polielektrolit. Kitosan biasanya larut dalam asam organik, memiliki pH sekitar 4 sampai 6,5, tidak larut dengan pH yang lebih rendah maupun yang lebih tinggi (Dompeipen *et al.*, 2016).

Pembuatan kitosan meliputi tiga tahap yaitu, deproteinasi, demineralisasi, dan deasetilisasi. Proses deproteinasi bertujuan untuk mengurangi kadar protein dengan menggunakan larutan alkali encer dan pemanasan yang cukup. Proses demineralisasi dimaksudkan untuk mengurangi kadar mineral ( $\text{CaCO}_3$ ) dengan menggunakan asam konsentrasi rendah untuk mendapatkan kitin. Sedangkan proses deasetilisasi bertujuan untuk menghilangkan gugus asetil dan kitin melalui pemanasan dalam larutan alkali kuat dengan konsentrasi tinggi (Rahayu dan Purnavita, 2007).

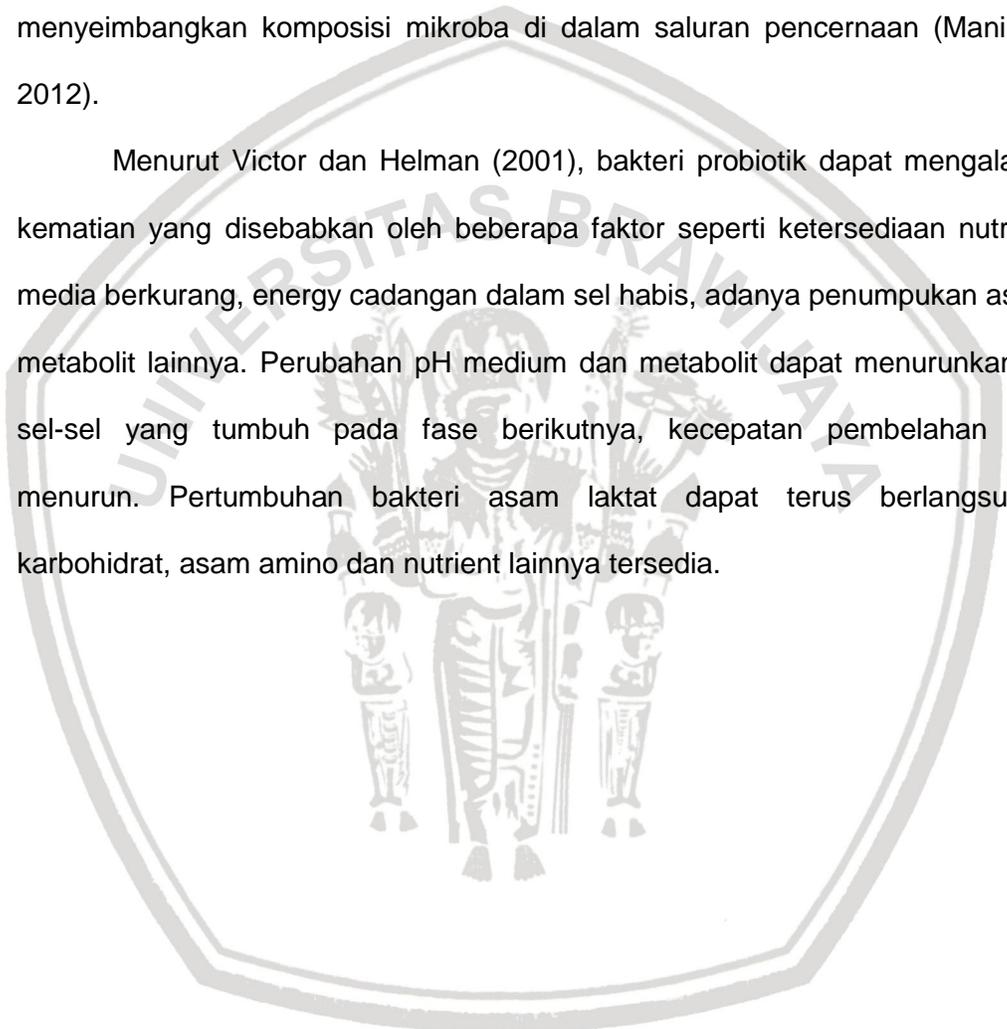
## 2.6 Viabilitas Bakteri

Viabilitas adalah jumlah sel probiotik yang hidup didalam bahan yang menunjukkan ukuran konsentrasi sel. Viabilitas pada sel bakteri probiotik yang bertahan dapat diartikan bahwa probiotik tahan dalam kondisi lingkungan probiotik tersebut, pertahanan probiotik pada kondisi lingkungan untuk hidup memiliki tiga tahap krisis yaitu pada kondisi penyimpanan, proses pengolahan lanjut dan dalam tahap sistem pencernaan yang melewati lambung dan usus kecil. Viabilitas sel bakteri dapat dipengaruhi pada faktor pH, suhu, oksigen, aktifitas air, dan kondisi lingkungan (Yulinery *et al.*, 2006).

Bakteri probiotik dalam tubuh belum mencukupi sehingga diperlukan probiotik dari luar. Namun bakteri probiotik seperti *L. acidophilus* mempunyai daya tahan yang rendah dan rentan terhadap kematian sehingga diperlukan upaya untuk

mempertahankan agar bakteri tetap hidup, salah satu yaitu dengan cara enkapsulasi. Menurut Burgain *et al.*, (2011), bahan-bahan yang digunakan dalam enkapsulasi probiotik antara lain alginate, gellan gum, atau xantan gum, karaginan, selulosa asetat ftalat, kitosan, pati, gelatin dan protein susu. Bakteri probiotik apabila dikonsumsi dengan jumlah yang tepat akan menguntungkan bagi tubuh manusia. Probiotik adalah bukan zat makanan, tetapi hanya merupakan imbuhan untuk menyeimbangkan komposisi mikroba di dalam saluran pencernaan (Manin *et al.*, 2012).

Menurut Victor dan Helman (2001), bakteri probiotik dapat mengalami fase kematian yang disebabkan oleh beberapa faktor seperti ketersediaan nutrisi pada media berkurang, energy cadangan dalam sel habis, adanya penumpukan asam dan metabolit lainnya. Perubahan pH medium dan metabolit dapat menurunkan jumlah sel-sel yang tumbuh pada fase berikutnya, kecepatan pembelahan menjadi menurun. Pertumbuhan bakteri asam laktat dapat terus berlangsung bila karbohidrat, asam amino dan nutrient lainnya tersedia.



### 3. METODELOGI PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam proses pembuatan *Semi Refined Carrageenan* (SRC) dari jenis rumput laut *Eucheuma spinosum* adalah baskom, gelas ukur 100 ml, waterbath, pH papper, ayakan, spatula, beaker glass 1000 ml, oven, loyang, blender, gunting, dan digital. Alat yang digunakan untuk pembuatan mikroenkapsulasi adalah bola hisap, nampan, spatula, magnetic stirrer, hot plate, oven vacum, gelas ukur 100ml, spuit 20ml, beaker glass 1000ml, beaker glass 50ml, dan pipet volume 10ml. Alat yang digunakan untuk pengujian viabilitas *Lactobacillus acidophillus* adalah rak tabung reaksi, tabung reaksi, bunsen, cawan petri, sprayer alkohol, bola hisap, pipet serologis, autoklaf, incubator colony, dan *Laminar air flow*.

##### 3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam pembuatan SRC adalah rumput laut *Eucheuma spinosum* yang didatangkan dari perairan Kabupaten Sumenep Pulau Madura, Jawa Timur. Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan SRC adalah KOH 6%, aquadest, CaCl 1.5%, CaOH<sub>2</sub>6%, lakmus merah, KCl 1.5 %, kertas label, air. Pengujian viabilitas *Lactobacillus acidophilus* dengan Nafis dan MRSA. Bahan utama pembuatan mikroenkapsul *Lactobacillus acidophilus* adalah iota karagenan dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

## 3.2 Metode Penelitian

### 3.2.1 Metode

Penelitian ini dilakukan dengan dua tahapan yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Menurut Hadi (1985), penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan untuk mengetahui akibat yang ditimbulkan dari suatu perlakuan yang diberikan secara sengaja oleh peneliti. Penelitian eksperimen juga merupakan penelitian yang dilakukan secara sengaja oleh peneliti. Penelitian ini dilakukan dengan caranya memberikan *treatment* atau perlakuan tertentu terhadap subjek penelitian guna membangkitkan suatu kejadian atau keadaan yang akan diteliti bagaimana akibatnya. Metode ini dilakukan dengan cara memberikan variabel bebas kepada objek penelitian untuk mengetahui akibatnya terhadap variabel terikat. Variabel-variabel yang digunakan adalah sebagai berikut.

### 3.2.2 Variabel Penelitian

Adapun variabel-variabel dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas: Penambahan kitosan dengan konsentrasi yang berbeda sebagai bahan pengenkapsulat pada *double coating* mikrokapsul *Lactobacillus acidophilus*.

Variable terikat: Pengujian viabilitas *Lactobacillus acidophilus* pengeringan oven vakum.

### 3.2.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian bertujuan untuk mengetahui konsentrasi kitosan terbaik sebagai bahan pengenkapsulat pada *double coating* mikrokapsul *Lactobacillus acidophilus* terhadap viabilitasnya. Rancangan penelitian yang

digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana dengan 5 perlakuan dan 5 kali ulangan dan apabila ada signifikansi dilanjutkan dengan uji BNT. Adapun rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Rancangan Percobaan Penelitian

Perlakuan	Ulangan					Total	Rerata
	1	2	3	4	5		
A	A1	A2	A3	A4	A5		
B	B1	B2	B3	B4	B5		
C	C1	C2	C3	C4	C5		
D	D1	D2	D3	D4	D5		
E	E1	E2	E3	E4	E5		

Keterangan :

- A: Konsentrasi kitosan 0%
- B: Konsentrasi kitosan 0.5%
- C: Konsentrasi kitosan 1%
- D: Konsentrasi kitosan 1.5%
- E: Konsentrasi kitosan 2%

Kemudian dilanjutkan dengan uji viabilitas *Lactobacillus acidophilus*, lalu data diolah dengan Analisa keragaman sidik ANOVA untuk diketahui perlakuan terbaik mikrokapsul yang menghasilkan viabilitas tertinggi dengan uji lanjut BNT dengan taraf 5%.

### 3.3 Prosedur Penelitian

Tahapan penelitian ini dibagi menjadi 2 tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama.

#### 3.3.1 Penelitian Pendahuluan

Pada penelitian pendahuluan yang dilakukan meliputi penelitian eksperimen untuk menentukan konsentrasi bahan yang akan digunakan untuk penelitian utama. Perlakuan pada penelitian pendahuluan meliputi penentuan konsentrasi serbuk *Semi Refined Carrageenan (SRC)* iota, karagenan sebagai bahan penyalut, dan kitosandengan konsentrasi 0%, 0,5%, 1%, 1,5% dan 2% sebagai *double coating* pada pembuatan mikroenkapsulasi. *Double coating* SRC iota dan Kitosan, didapatkan dari penelitian sebelumnya.

Pada penelitian pendahuluan dilakukan pembuatan SRC iota, pengujian *Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR)*, pengujian kekuatan gel, dan pengujian viskositas. Selanjutnya dilakukan pembuatan mikrokapsul dengan konsentrasi bahan SRC iodadengan *coating* kitosan 0%, 0,5%, 1%, 1,5% dan 2% untuk mengetahui perlakuan terbaik.

##### 3.3.1.1 Pembuatan *Semi Refined Carageenan (SRC) Eucheuma spinosum* (Setijawati *et al.*, termodifikasi, 2012)

Rumput laut *Eucheuma spinosum* pertama dicuci sampai bersih dengan air yang mengalir lalu dijemur hingga kering. Rumput laut yang sudah kering kemudian ditimbang 20 gr dengan timbangan digital, disiapkan CaCl 6% yang dilarutkan dalam aquadest 400 mL, lalu diaduk sampai merata menjadi larutan, kemudian rumput laut ditimbang 20 gr lalu diekstraksi kedalam larutan CaCl 6%. Pada proses selanjutnya bahan dipanaskan kedalam waterbath selama 1 jam dengan suhu 74°C. Kemudian

setelah dipanaskan ditambahkan CaCl 3 gr (1,5%), setelah halus dilakukan pencucian pertama dengan CaCl 1,5 gr dilarutkan pada aquadest secukupnya dan disaring. Lalu dilakukan pencucian kedua dengan ditambahkan CaCl 1,5 gr dan dilarutkan kedalam aquadest secukupnya dan disaring. Setelah itu dilakukan pencucian ketiga dengan air mengalir sampai bahan pH netral. Lalu dikeringkan dengan oven dengan suhu 60°C selama 24 jam, kemudian setelah dilakukan pengovenan lalu proses selanjutnya dilakukan penghalusan dengan menggunakan blender. Bahan yang sudah halus kemudian diayak dan menjadi serbuk iota atau *Semi Refined Carrageenan (SRC) Eucheuma spinosum*. *Flow chart* dan dokumentasi pembuatan SRC *Eucheuma spinosum* dapat dilihat pada Lampiran 1 dan 2.

#### **3.3.1.2 Prosedur Pengujian *Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR)* (Pereira et al., 2009)**

Pengujian *Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR)* dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Tujuan dari pengujian FT-IR adalah untuk mengetahui gugus fungsional yang terdapat pada SRC iota yang didapatkan dari hasil ekstraksi rumput laut jenis *E. spinosum*. *Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR)* merupakan metode yang digunakan untuk mengetahui hasil spektrum yang dihasilkan oleh transformasi infrared. Sedangkan spektrum infrared sendiri diperoleh dari penstransmisian cahaya yang melewati sampel kemudian diplot sebagai intensitas fungsi energi, panjang gelombang ( $\mu\text{m}$ ) atau bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ ). Prinsip kerja dari spektrofotometer ini adalah dengan menggunakan metode absorpsi dimana berdasarkan pada perbedaan penyerapan radiasi infrared. Spektrum *infrared* ini dapat mencatat gelombang antara  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  pada saat absorpsi. Pita

absorbansi pada spektrum *infrared* yang terbentuk menggunakan tabel korelasi sehingga analisis gugus fungsi sampel dapat dilakukan. Spektrum FTIR dari bahan sampel karginan atau SRC tercatat pada IFS 55 spektrometer. Semua spektrum adalah rata-rata dua pengukuran independen dengan 128 scan masing-masing pada resolusi  $2\text{ cm}^{-1}$ . FT Spektrometer menggunakan laser dengan panjang gelombang eksitasi dari 1064 nm. Setiap spektrum adalah rata-rata dua pengukuran ulang, dengan 150 scan pada resolusi  $2\text{ cm}^{-1}$ . Metode spektroskopi inframerah yang digunakan adalah metode absorpsi dimana terdapat perbedaan penyerapan radiasi inframerah pada hasilnya. Hasil dokumentasi pengujian viabilitas dapat dilihat pada Gambar 4 dan 5.

### 3.3.1.3 Prosedur Pengujian Kekuatan Gel (Novianto *et al.*, 2013)

Pengujian kekuatan gel dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya Malang. Pengujian *gel strength* ini bertujuan untuk mengetahui seberapa besar kekuatan gel bahan penyalut yang digunakan dalam pembuatan mikrokapsul. Pengukuran kekuatan gel dilakukan dengan alat sebuah gelas plastik, 20 mm dan 40 mm tinggi, penuh dengan larutan sampel hangat, dengan hati-hati untuk menghindari gelembung udara, dan kemudian didinginkan pada suhu kamar (sekitar  $29^{\circ}\text{C}$ ) selama sekitar 20 menit. Analisis profil tekstur (TPA) dilakukan dengan *Texture Analyzer* (TA.XT2, Inggris) menggunakan P/50HS dengan plastik hemispherical. Gel dalam cangkir bahan ditempatkan dibawah probe. Kompresi pada 0,5 mm/detik dan probe dimasukkan ke dalam sampel kedalaman  $\pm 30\%$  dari tinggi gelas didalam cangkir. Kekerasan dan pegas diperoleh dari kurva TPA. Pengukuran kekuatan gel yang dihasilkan dinyatakan dalam satuan Newton (N), 3,5 g SRC iota dilarutkan dalam aquades 100

mL. Larutan karaginan lalu dipanaskan dalam beaker glass dengan pengadukan secara teratur menggunakan *stirrer* sampai suhu 80-85°C. Larutan karaginan panas dimasukkan ke dalam gelas plastik *Poly Vinyl Chloride (PVC)* yang berdiameter  $\pm 4$  cm. Cara mengukur kekuatan gel yaitu larutan gel yang berada dalam gelas plastik diuji dengan *Texture Analyzer*, probe ukuran 1 KS, *distance* 25 mm, dan *test speed* 5 mm/sec. Probe diposisikan di tengah wadah plastik larutan gel, probe diaktifkan dan dilakukan pengamatan. Pembacaan nilai dilakukan saat probe memecah permukaan gel.

### **3.3.1.4 Prosedur Pengujian Viskositas**

Pengujian viskositas dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya Malang. Pada pengujian viskositas ini dilakukan untuk dapat mengetahui tingkat kekentalan pada suatu larutan. Satuan yang digunakan untuk viskositas ini adalah centipoises (cPs). Pengukuran viskositas diukur pada 4,8, interval 15, 30 menit menggunakan viscometer (model 9896, Cole Parmer, Vernon Hills, IL). Pada dasarnya prinsip pengukuran viskositas ini mengukur ketahanan gesekan lapisan molekul cairan yang berdekatan (Villanueva *et al.*, 2003)

### **3.3.2 Penelitian Utama**

#### **3.3.2.1 Pembuatan Mikrokapsul (Manojlovic, termodifikasi, 2010)**

Pembuatan mikrokapsul dengan menggunakan metode gel partikel oven vakum dilakukan dengan menimbang iota 3% dengan konsentrasi kitosan A (0.5%), B (1%), C (1.5%), dan D (2%). Setelah ditimbang kemudian disiapkan *beaker glass* 100 mL dan dimasukkan iota yang telah ditimbang dan ditambahkan aquadest

sebanyak 30 mL. Setelah itu larutan diaduk hingga homogen dan dipanaskan diatas *hotplate stirrer* dengan suhu 97°C. Kemudian, *beaker glass* yang berisi larutan diangkat dan hot plate diturunkan suhunya menjadi 45°C dan diaduk, hal itu bertujuan agar larutan tidak cepat membentuk gel. Disiapkan kultur *Lactobacillus acidophilus* padatan dengan cara dimasukan kedalam cuvet kemudian dimasukan ke dalam *sentrifuge* dengan kecepatan 1000 rpm dengan lama waktu 10 menit, setelah di *sentrifuge* didapatkan padatan kemudian dicampurkan NaFis sebanyak 1 mL dan diaduk dengan menggunakan jarum ose sehingga didapatkan kultur bakteri *Lactobacillus acidophilus* kemudian dimasukkan kedalam *beaker glass* yang berisi larutan iota lalu diaduk sampai homogen dengan *magnetic stirrer* kecepatan 1000 rpm. Setelah itu, siapkan larutan KCl 3.9 M sebanyak 75 mL dan masukkan campuran larutan kultur bakteri ke dalam larutan KCl 3.9 M menggunakan *sprit* 50 mL dengan jarum diameter 1 mm. Selanjutnya dilakukan penyaringan dengan kain saring untuk mendapatkan residu dari mikrokapsul. *Flow chart* dan dokumentasi pembuatan mikrokapsul dapat dilihat pada Lampiran 3 dan 4.

#### **3.3.2.2 Prosedur Pembuatan *Double Coating* (Gaserod et al., 1998 termodifikasi)**

Mikrokapsul basah yang berisi bakteri *Lactobacillus acidophilus* Iota Karaginan dimasukkan kedalam larutan kitosan 0%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2% dalam asam asetat 1% sambil diaduk dengan kecepatan 300 rpm dan didiamkan selama 2 jam. Kemudian mikrokapsul disaring dan dikeringkan dalam oven vakum 40°C selama 12 jam. *Flow chart* pembuatan *double coating* kitosan dapat dilihat pada Lampiran 3.

### 3.3.2.3 Prosedur Pengujian Viabilitas Probiotik (Chavarri *et al.*, modifikasi,2010)

Pengujian viabilitas sel dilakukan beberapa proses dengan menggunakan MRS agar sebagai media dengan beberapa pengenceran dan metode tuang. Pengujian dilakukan dengan bahan kering mikroenkapsulasi. Pengujian viabilitas dapat dilakukan dengan cara, pertama diambil mikrokapsul sebanyak 1 g. Kemudian dimasukkan 10 mL larutan NaFis. Lalu dihomogenkan menggunakan vortex mixer selama 30 detik. Selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sebanyak 5 kali dan dilakukan penanaman secara duplo pada pengenceran  $10^{-2}$  hingga  $10^{-5}$  dengan menggunakan metode tuang dalam media MRS-A dan dilakukan penambahan *sodium thiosulfate* 1% untuk mikroenkapsulat *Lactobacillus acidophilus*. Kemudian diinkubasi dalam kondisi anaerob pada suhu 37°C selama 48 jam. Selanjutnya dihitung jumlah total bakteri yang diperoleh. Setelah diinkubasi dapat dilakukan perhitungan jumlah probiotik dengan perhitungan *Total Plate Count* (TPC). Dengan *Total Plate Count* (TPC), kita dapat menghitung sel yang masih hidup, menentukan jenis mikroba yang tumbuh dalam media tersebut serta dapat mengisolasi dan mengidentifikasi jenis koloni mikroba tersebut. *Flow chart* dan dokumentasi pengujian viabilitas dapat dilihat pada Lampiran 5 dan 6.

### 3.3.2.4 Pengujian Kadar Air (Sudarmadji *et al.*, 2007)

Pada analisa kadar air digunakan untuk dapat mengetahui jumlah air yang terkandung dalam suatu bahan dan produk pangan. Pada pengujian kadar air ditimbang bahan yang telah dihaluskan sebanyak 2 g dalam botol timbang yang telah diketahui beratnya, lalu dikeringkan dalam oven dengan suhu 40°C selama 3-5 jam. Setelah itu dikeringkan dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang.

*Flow chart* dan dokumentasi kadar air dapat dilihat pada Lampiran 7 dan 8. Dihitung persentase kadar air dalam bahan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{B-C}{B-A} \times 100\%$$

Dimana:

A = Berat kering botol timbang (g)

B = Berat kering botol timbang dan sampe awal (g)

C = Berat kering botol timbang dan sampel setelah dikeringkan (g).

### 3.3.2.5 Diameter Enkapsulat (Purwaningsih *et al.*, 2010)

Analisa diameter dilakukan dengan menggunakan mikroskop elektron. Langkah-langkah pengujian diameter enkapsulat yang harus dilakukan adalah, *object glass* dan *cover glass* dibersihkan dengan akuades, hal tersebut agar mencegah adanya kotoran pada *object glass* dan *cover glass* yang mempengaruhi hasil perbesaran sampel. Lalu diletakkan serbuk enkapsulat sedikit, kemudian diratakan dengan sendok bahan lalu ditambahkan sedikit akuades. Hal ini dapat bertujuan agar sampel dapat terlihat dengan jelas pada mikroskop. Setelah itu letakkan *cover glass* dengan sudut 45° dengan tujuan agar tidak terjadi gelembung pada preparat, agar tidak terjadi gelembung preparasi. Dan diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400-1000 kali. Pengamatan diameter dilakukan dengan klik “menu” pilih diameter lalu klik “ok”, lalu sampel diamati hingga muncul gambar yang sesuai, lalu atur diameter sampel dengan cara arahkan kursor pada sampel yang akan diukur kemudian klik “ok”. Foto gambar yang akan dipilih dengan tekan tombol “Ekspose” tunggu lampu ekspose tersebut menjadi hijau kemudian foto telah disimpan dan dilakukan pengukuran diameter sampel selanjutnya dengan cara klik mode 3x. *Flow chart* analisa diameter enkapsulat dapat dilihat pada Lampiran 9.

### 3.3.2.6 Pengujian Aktivitas Air ( $a_w$ ) (Susanto, 2009)

Aktivitas air merupakan air bebas yang terkandung dalam bahan yang dapat digunakan untuk pertumbuhan bakteri. Pengukuran aktivitas air dilakukan dengan alat  $a_w$  meter. Dilakukan kalibrasi alat  $a_w$  meter dengan cara memasukkan larutan  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$  dan ditutup kemudian dibiarkan selama 3 menit, lalu dibuka  $a_w$  meter kemudian dimasukkan sampel ke dalamnya dan alat ditutup selanjutnya ditunggu selama 3 menit. Kemudian dibaca dan dicatat skala  $a_w$  meter dengan memperhatikan faktor koreksi dan skala temperatur. Maka pembacaan skala  $a_w$  ditambahkan sebanyak kelebihan temperatur dikalikan faktor koreksi sebesar 0.002, begitu juga dengan temperatur dibawah  $20^\circ C$ . *Flow chart* analisa aktivitas air dapat dilihat pada Lampiran 10.

### 3.3.2.7 Pewarnaan Gram (Ibrahim *et al.*, 2015)

Pada Pengujian pewarnaan gram langkah awal adalah membersihkan preparat glass dengan alkohol 70% kemudian difiksasi diatas bunsen, setelah itu dipijarkan jarumose dan dicelupkan ke aquades lalu diberi juga sedikit akuades pada preparat glass menggunakan jarum ose, lalu jarum ose dipijarkan kembali dan diambil bakteri dari media MRS A yang telah ditumbuhi bakteri lalu diratakan diatas preparat glass, kemudian dikeringkan dan dianginkan preparatnya, dan ditetaskan larutan zat warna *crystal violet* 2-3 tetes dan didiamkan selama 1 menit. Selanjutnya dikeringkan dan dianginkan preparatnya, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan, ditetaskan dengan larutan Lugol dan dibiarkan selama 1 menit lalu dicuci dengan air mengalir dan diangin keringkan. Kemudian dicuci dengan alkohol 95% selama 30 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan, diberi larutan *basic fuchsin* atau safranin selama 2 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikering

inginkan kemudian diamati dibawah mikroskop. *Flow chart* pewarnaan gram dapat dilihat pada Lampiran 11.

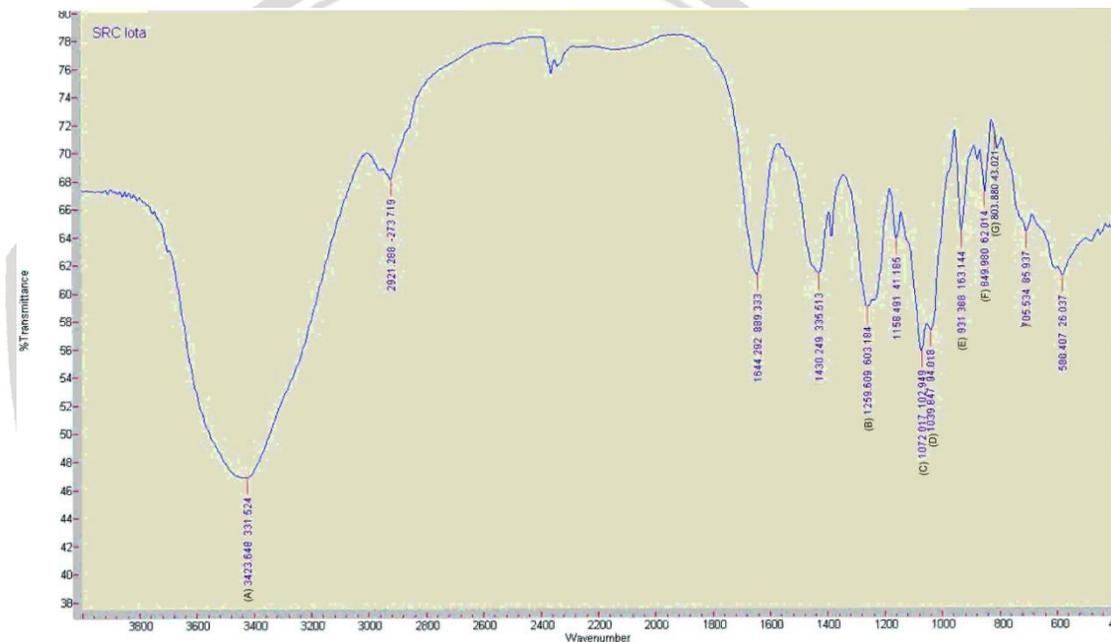


## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Penelitian Pendahuluan

#### 4.1.1 Spektra FT-IR *SRCEucheuma spinosum*

Analisis spectra FT-IR *SRC Eucheuma spinosum* dilakukan untuk mengetahui gugus fungsional dari karaginan yang dihasilkan dari proses semi murni (*semi refined*). Hasil analisis spectra FT-IR *SRC Eucheuma spinosum* dapat dilihat pada Gambar 4.



**Gambar 4. Hasil Pengukuran Spektra FT-IR *Eucheuma spinosum***

**Keterangan: A (O-H), B (C-H), C Ulur), D (S=O), E (C-O), F (C-H), G dan H (C=C)**

Hasil yang didapatkan dari pengujian FTIR untuk *SRC Eucheuma spinosum* yaitu pada bilangan gelombang  $1259\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus ester sulfat, pada bilangan gelombang  $931\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus fungsi 3,6-anhidro-D-galaktosa, pada bilangan gelombang  $849\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus D-galaktosa-4-sulfat, dan pada bilangan gelombang  $803\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya

gugus 3,6-anhidro-D-galaktosa-2-sulfat. Hasil gugus fungsional pita serapan FTIR iota dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3. Gugus Fungsional Pita Serapan FTIR SRC *Eucheuma spinosum***

Gugus Fungsional	Hasil (cm <sup>-1</sup> )*	Diharmi <i>et al.</i> , 2011 (cm <sup>-1</sup> )**
3,6-anhidro-D-galaktosa	931	923-933
D-galaktosa-4-sulfat	849	840-850
3,6-anhidro-D-galaktosa-2-sulfat	803	800-805
Ester sulfat	1259	1210-1260

Keterangan:

\*Hasil penelitian

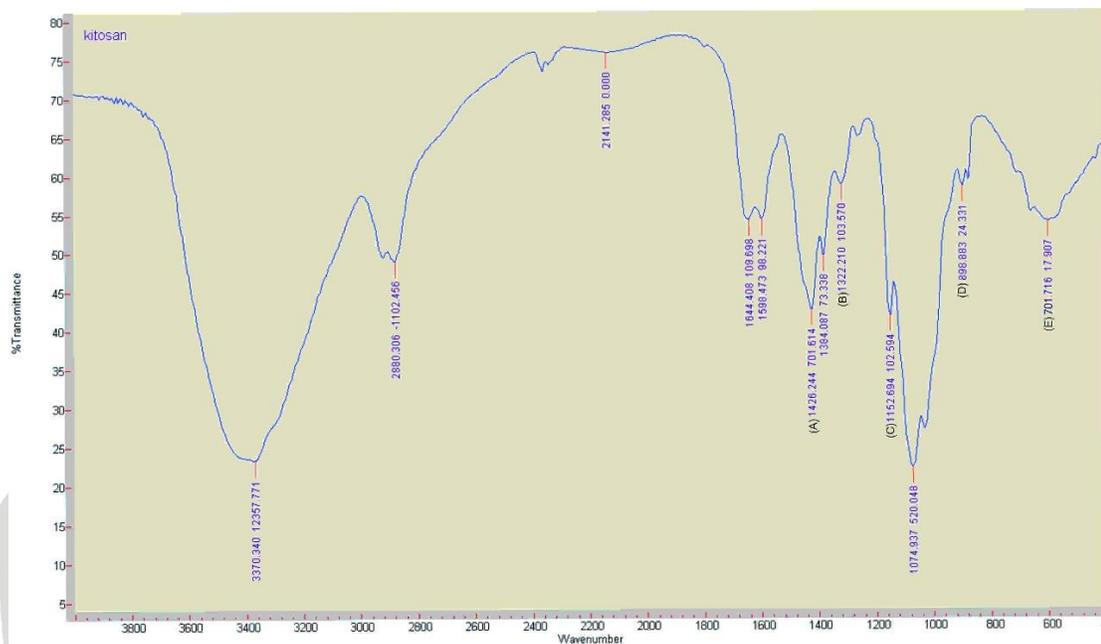
\*\*Diharmi *et al.*, 2011

Menurut Diharmi *et al.*, (2011), absorbansi SRC *Eucheuma spinosum* pada gugus ester sulfat akan muncul pada bilangan gelombang 1210-1260 cm<sup>-1</sup>, pada gugus fungsi 3,6-anhidro-D-galaktosa akan muncul pada bilangan gelombang 923-933 cm<sup>-1</sup>, gugus D-galaktosa-4-sulfat akan muncul pada bilangan gelombang 840-850 cm<sup>-1</sup>, serta gugus fungsi 3,6-anhidro-D-galaktosa-2-sulfat muncul pada bilangan gelombang 800-805 cm<sup>-1</sup>.

Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa karaginan yang dihasilkan merupakan *Semi Refined Carrageenan* (SRC) *Eucheuma spinosum* (SRC Iota) karena memiliki gugus fungsi ester sulfat, 3,6-anhidro-D-galaktosa, D-galaktosa-4-sulfat, dan 3,6-anhidro-D-galaktosa-2-sulfat. Sehingga hasil penelitian pendahuluan ini dapat digunakan sebagai bahan pada penelitian utama.

#### 4.1.1.1 Spektra FT-IR Kitosan

Kitosan yang dihasilkan dari cangkang udang yang dibuat oleh CV. ChiMultiguna dikarakterisasi dengan spektroskopi infra merah. Spectrum FT-IR kitosan dapat dilihat pada Gambar 5.



**Gambar 5. Hasil Pengukuran Spektra FT-IR Kitosan**  
Keterangan: A (NO<sub>2</sub>), B (C-N), C (C-O), D (C-H Alkena), E (C-H Cincin Aromatik).

Berdasarkan hasil karakterisasi dengan FTIR kitosan pada Gambar 5, muncul puncak pada serapan  $1322,210 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya gugus C-N amina/amida, muncul puncak pada serapan  $898 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya gugus C-H alkane tetapi dengan intensitas yang lemah, ini menunjukkan telah terjadinya proses deasetilasi yang menyebabkan hilangnya sebagian besar gugus metil,  $-\text{CH}_3$ , serta muncul puncak serapan  $3370,1 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya gugus O-H alkohol ikatan hydrogen. Pita serapan  $-\text{CH}_3$  pada bilangan gelombang  $1384,1 \text{ cm}^{-1}$  masih muncul tetapi dengan intensitas yang lebih lemah, hal ini

menunjukkan telah terjadinya proses deasetilasi yang menyebabkan hilangnya sebagian besar gugus metil –CH<sub>3</sub>.

Kitosan yang digunakan sebagai bahan pengenkapsulat untuk *double coating* mikroenkapsul probiotik adalah kitosan komersial. Kitosan ini diuji bertujuan mengetahui gugus fungsi yang terdapat pada kitosan tersebut. Pada Kitosan yang dibuat oleh CV. ChiMultiguna didapatkan (DD) 94,88% sesuai dengan Lampiran 15. Gugus fungsi pada spektrum FTIR yang dilakukan pada kitosan CV. ChiMultiguna sebagai bahan penelitian yang dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Setijawati (2017), tentang FT-IR kitosan didapatkan hasil Gugus Fungsi Spektrum Infra Merah pada Kitosan dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4. Gugus Fungsi Spektrum Infra Merah pada Kitosan**

Gugus Fungsi	Panjang Gelombang (cm <sup>-1</sup> )*	Panjang Gelombang (cm <sup>-1</sup> **
NO <sub>2</sub>	1426	1500-1570
C-H Alkena	898	675-995
C-N Amina/amida	1322	1180-1360
C-H Cincin <i>Aromatic</i>	701	690-900
C-O	1152	1050-1300

Keterangan:

\*Hasil penelitian

\*\*Setijawati (2017)

Berdasarkan Tabel 4 dapat disimpulkan bahwa kitosan komersial dari CV. ChiMultiguna adalah kitosan, hal ini dikarenakan kitosan memiliki gugus C-O pada bilangan gelombang 1152 cm<sup>-1</sup> dan C-N amina/amida pada bilangan gelombang 1322 cm<sup>-1</sup>.

#### 4.1.2 Viskositas

Viskositas adalah ukuran resistensi dari larutan yang memiliki ketebalan atau gesekan internal. Viskositas merupakan ukuran kekentalan pada suatu larutan. Hasil nilai viskositas iota dapat dilihat pada Tabel 5.

**Tabel 5. Hasil Nilai Viskositas SRC Iota dan Kitosan**

Larutan	Viskositas (cP)
SRC Iota	124
Kitosan	11

**Sumber:** Hasil Penelitian

Nilai SRC Iota karaginan adalah sebesar 124 cP dan nilai untuk kitosan adalah 11 cP. Hasil dari pada penelitian ini telah memenuhi standart yang telah ditetapkan oleh FAO yaitu minimal 5 cP. Menurut Guiseley *et al.*, (1980), viskositas karaginan berkisar antara 5-800 cP yang diukur pada konsentrasi 1,5% dan suhu 75°C dengan menggunakan *viscometer brookfield*.

Nilai viskositas Iota karaginan lebih tinggi dibandingkan viskositas pada kitosan, hal ini dapat dipengaruhi karena kandungan sulfat yang dapat menyebabkan larutan menjadi kental. Sulfat dapat mempengaruhi adanya gaya tolak menolak antar kelompok ester yang bermuatan sama dengan molekul air yang terikat dalam karaginan. Menurut Winarno (2006), kadar sulfat merupakan parameter yang digunakan untuk berbagai jenis polisakarida yang terdapat pada alga merah. Viskositas kitosan sangat dipengaruhi oleh suhu proses pembuatan. Melalui suhu proses yang tinggi (sekitar 140°C) dapat diperoleh kitosan yang mempunyai viskositas rendah, berarti polimer yang terbentuk adalah pendek-pendek, sedangkan kitosan yang diproduksi dengan suhu dibawah 140°C (biasanya waktu proses lebih lama) akan diperoleh nilai viskositas yang lebih besar (lebih

besar dari 200 cP), bahkan bisa mencapai ribuan. Nilai viskositas *double coating* kitosan yang digunakan termasuk tergolong rendah, yaitu dibawah 200 cP. Pada viskositas kitosan yang rendah diperlukan untuk industri makanan, karena akan dapat mempermudah difusi kitosan ke dalam bahan pangan (Renur 2014).

Kandungan ester sulfat iota karaginan yang lebih tinggi mempengaruhi kekuatan gel dan viskositas karaginan tersebut. Menurut Suryaningrum (1989), kandungan sulfat dipengaruhi oleh tipe karaginan, konsentrasi, kadar air, dan jenis karaginan. Tingginya kadar sulfat disebabkan oleh kurang sempurnanya proses pada eliminasi sulfat sehingga tidak semua sulfat dapat dikonversi. Selain itu diduga adanya endapan lain yang ikut mempengaruhi berat sulfat tersebut.

#### 4.1.3 Kekuatan Gel

Kekuatan gel merupakan kemampuan suatu bahan dalam pembentukan gel. Hasil nilai kekuatan gel iota karaginan dan kitosan dapat dilihat pada Tabel 6.

**Tabel 6. Kekuatan Gel SRC *Eucheuma spinosum* dan Kitosan**

Bahan	Kekuatan Gel (N)
Iota	2,8
Kitosan	0

**Sumber:** Hasil Penelitian

Hasil analisis pada kekuatan gel SRC *Eucheuma spinosum* adalah 2.8 N dan kekuatan gel kitosan adalah 0 N. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ula (2017) bahwa untuk SRC kappa didapatkan *gel strenght* sebesar 35,8 N dan SRC iota sebesar 1,2 N. Sedangkan untuk kitosan tidak memiliki *gel strenght* karena kitosan tidak memiliki rantai heliks. Kekuatan gel dilakukan pada mikroenkapsulasi karena untuk mengetahui kemampuannya untuk membentuk gel sehingga dapat menjerap sel (Gbassi dan Vandamme, 2012). Menurut Andrawulan *et al.*, (2011), karaginan jenis *E. spinosum* tidak memiliki *gel strenght* yang tinggi dibandingkan pada

gel strenght *E. cottoni*. Gel strenght pada karaginan *E. spinosum* sesuai pada sifatnya bahwa gelnya tidak keras, lembut, elastis dan cenderung stabil.

Menurut Mc Hugh (2003), kekuatan gel dipengaruhi oleh kandungan sulfat dan kandungan 3,6-anhidro-D-galaktosa. Kandungan sulfat dapat menghambat pembentukan gel sehingga polimer terdapat dalam bentuk sol, sedangkan kandungan 3,6-anhidro-D-galaktosa menyebabkan sifat beraturan dalam polimer dan akan meningkatkan potensi pembentukan *double helix*.

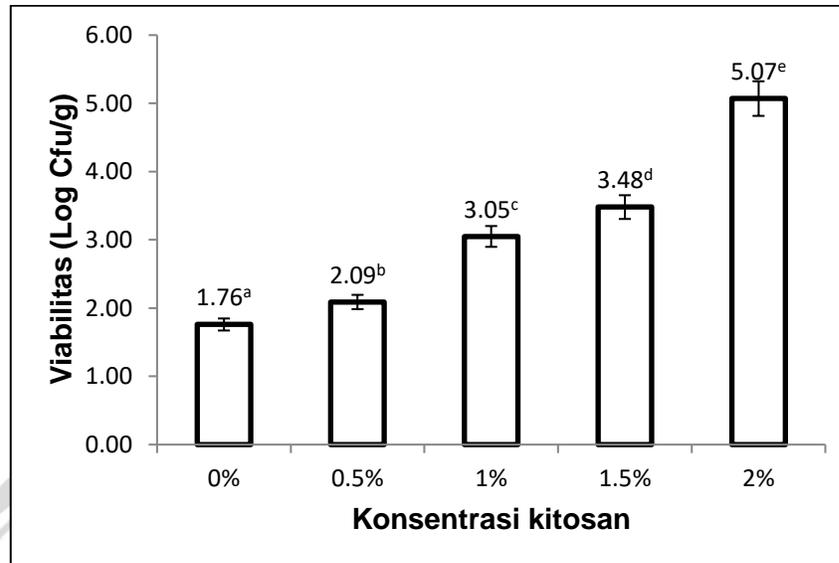
Kekuatan gel dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya yaitu penggunaan alkali, suhu, dan lama waktu ekstraksi (Yasita dan Rachmawati, 2009). Penggunaan waktu ekstraksi yang berbeda dapat mempengaruhi jumlah kandungan sulfat. Semakin lama waktu ekstraksi maka kandungan sulfat semakin kecil, sebaliknya jika semakin cepat waktu ekstraksi maka kandungan sulfat akan semakin banyak. Jika kandungan sulfat semakin sedikit maka kekuatan gel akan semakin tinggi, begitu juga sebaliknya jika kandungan sulfat semakin banyak maka kekuatan gel akan semakin rendah (Ega *et al.*, 2015).

## 4.2 Penelitian Utama

### 4.2.1 Viabilitas *Lactobacillus acidophilus*

Data pengamatan dan analisa data viabilitas probiotik mikrokapsul dapat dilihat pada Lampiran 11. Berdasarkan tabel sidik ragam (ANOVA) viabilitas *Lactobacillus acidophilus* dengan konsentrasi *double coating* kitosan yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan sangat nyata dengan (F hitung > dari F tabel 5%). Sehingga dapat disimpulkan bahwa konsentrasi kitosan yang berbeda sebagai

*double coating* memberikan pengaruh nyata terhadap viabilitasnya. Nilai viabilitas *Lactobacillus acidophilus* dapat dilihat pada Gambar 6.



**Gambar 6. Hasil Uji Viabilitas *Lactobacillus acidophilus***

Pada Gambar 6, dapat dilihat viabilitas sel yang dilakukan pada perlakuan *coating* akan lebih besar nilai viabilitasnya dari pada viabilitas sel yang tidak *dicoating*, terbukti pada mikroenkapsulasi yang tidak dilapisi kitosan yaitu pada konsentrasi 0% mendapatkan nilai rata-rata sebesar 1.76 log CFU/g sedangkan mikroenkapsulasi yang dilapisi kitosan yaitu pada konsentrasi 2% mendapatkan nilai rata-rata sebesar 5.07 log CFU/g. Hal ini karena semakin tinggi konsentrasi penyalut yang digunakan maka viabilitas sel yang didapat akan tinggi juga, hal ini dikarenakan tingginya penyalut akan mampu melindungi sel dari kondisi lingkungan. Purwandhani (2007), menyatakan bahwa adanya enkapsulasi dua sebagai pelindung akan menghasilkan jumlah sel yang lebih banyak jika dibandingkan dengan enkapsulasi satu lapis, hal ini disebabkan pada penyalut pertama yaitu SRC iota membentuk gel yang kuat dan stabil pada ion  $Ca^{2+}$  yang mengakibatkan terjadinya cross-linked melalui proses gelasi eksternal. Kandungan ester sulfat pada

iota karaginan pada hasil penelitian didapatkan kandungan sulfat iota karaginan rendah sehingga dapat mempengaruhi kekuatan gel dan viskositas, dengan kadar sulfat yang rendah sehingga dapat menaikkan gelasi pada struktur mikrokapsul.

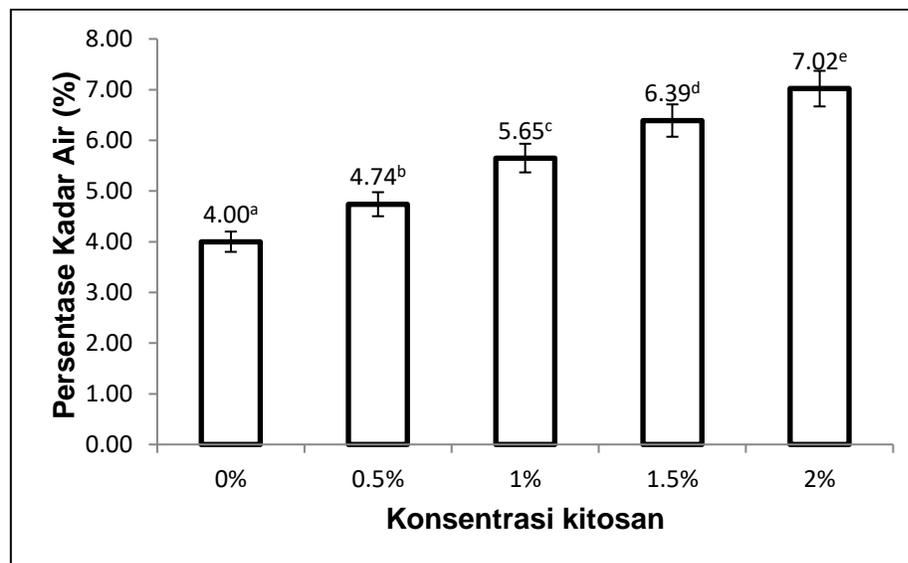
Menurut Wang *et al.*, (2014), semakin tingginya gelasi maka akan meningkatkan pepadatan dari struktur mikrokapsul serta dapat mengurangi kebocoran sel dan untuk meningkatkan perlindungan terhadap sel didalamnya. Untuk meminimalisir kebocoran sel pada mikrokapsul ditambahkan kitosan sebagai *double coating*. Kitosan dengan adanya gugus amino reaktif dan gugus fungsional hidroksil. Kitosan memiliki karakteristik biokompatibilitas yang diinginkan serta kemampuan untuk meningkatkan permeabilitas membran. Kitosan merupakan salah satu matriks imobilisasi yang paling menjanjikan karena memiliki kemampuan membentuk membran (Irianto dan Muljanah, 2011).

Nilai viabilitas ini masih sangat kecil untuk dapat mencapai standart nilai viabilitas yang ditetapkan oleh FAO (2001), untuk diaplikasikan pada pangan. Standart untuk semua makanan kesehatan yang mengandung probiotik harus mengandung kurang lebih  $10^6$  -  $10^7$  CFU/gr. Oleh karna itu dapat disimpulkan bahwa kitosan ini mampu melindungi viabilitas sel *Lactobacillus acidophilus* terlihat dari penelitian, meskipun belum memenuhi standart FAO secara maksimal untuk diaplikasikan pada produk pangan. Menurut Boyaval (1989), menyatakan bahwa K<sup>+</sup> adalah nutrisi utama untuk mikroorganismenya dan memiliki jumlah yang sama bahkan lebih besar dari pada fosfor. Ion K<sup>+</sup> terdapat pada kappa karaginan, adanya ion K<sup>+</sup> pada kappa karaginan dapat juga berpengaruh terhadap viabilitas *L. acidophilus*. Adanya ion K<sup>+</sup> akan mempertahankan kelangsungan hidup dari probiotik. Hal ini dikarenakan kalium merupakan salah satu nutrisi yang diperlukan oleh semua jenis

mikroba termasuk jenis bakteri asam laktat. umumnya lebih besar terdapat pada bakteri gram positif dari pada bakteri gram negatif. Ion  $K^+$  dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri *Lactobacillus sp.* Kalium adalah kofaktor dari banyak enzim dan banyak terdapat pada sitoplasma sel untuk proses sintesis protein, dan mengendalikan pH sitoplasma. Sedangkan adanya ion  $Ca^{2+}$  pada penelitian ini, tidak penting untuk pertumbuhan pada bakteri *Lactobacillus acidophilus*. Oleh karena itu salah satu penyebab hasil viabilitas mikroenkapsulasi *Lactobacillus acidophilus* tersalut SRC iota rendah.

#### 4.2.2 Kadar Air

Berdasarkan tabel sidik ragam (ANOVA) kadar air dengan konsentrasi coating kitosan yang berbeda memberikan pengaruh nyata ( $F$  hitung  $>$  dari  $F$  tabel 5%) dari masing-masing perlakuan, sehingga perlu ke uji lanjut BNT. Hasil analisa keragaman uji kadar air mikroenkapsulasi dapat dilihat pada Lampiran 12, sedangkan nilai kadar air mikroenkapsulasi dapat dilihat pada Gambar 7.



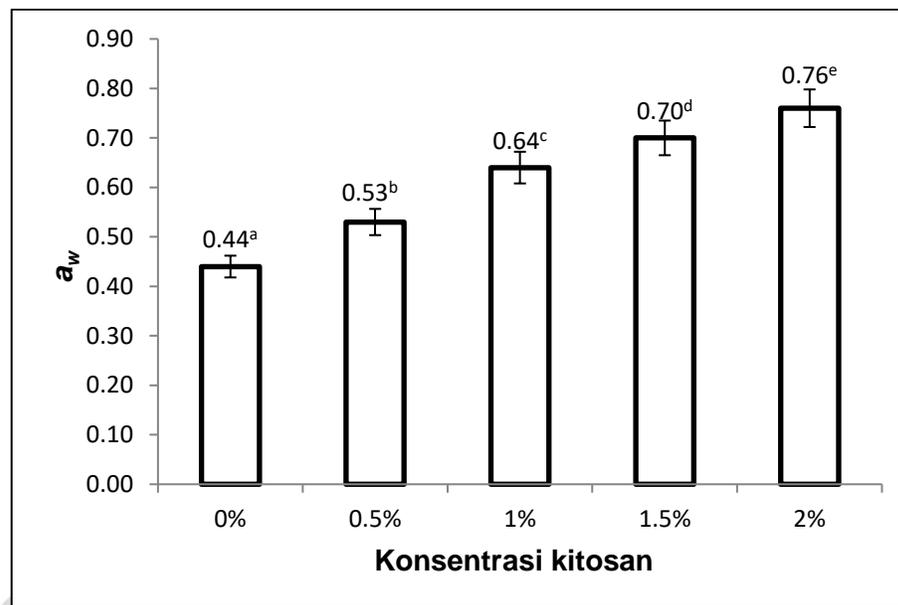
**Gambar 7. Kadar Air Mikroenkapsulasi**

Pada Gambar 7, dapat dilihat nilai kadar air yang mendapatkan perlakuan *coating* akan lebih besar nilai kadar air dari pada yang tidak *dicoating*, terbukti pada mikroenkapsulasi yang tidak dilapisi kitosan yaitu pada konsentrasi 0% mendapatkan nilai rata-rata sebesar 4.00% sedangkan mikroenkapsulasi yang dilapisi kitosan yaitu pada konsentrasi 2% mendapatkan nilai rata-rata sebesar 7.02%. Pengujian kadar air dilakukan untuk mengetahui kandungan kadar air yang terkandung dalam bahan. Kadar air pada konsentrasi kitosan 2% lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya, hal ini diduga karena rasio konsentrasi *coating* kitosan yang lebih banyak sehingga pada tingkat gelas dari SRC *iota coating* kitosan tersebut lebih tinggi dari pada konsentrasi lainnya, karena pada konsentrasi kitosan yang lebih tinggi akan meminimalisir kehilangan air akibat transpirasi, sehingga kadar air dengan konsentrasi kitosan yang tinggi akan lebih tinggi nilainya dari pada konsentrasi kitosan yang lebih rendah. Menurut Sitorus *et al.*, (2014) pada konsentrasi kitosan yang tinggi maka kehilangan air akibat

transpirasi dapat dicegah sehingga presentase kadar air lebih tinggi dari pada yang tidak terlapsi kitosan pada konsentrasi lebih rendah. Semakin tinggi konsentrasi kitosan maka kadar air pada mikrokapsul akan semakin besar karena proses kehilangan air saat proses penguapan akan semakin susah. Menurut Tripathi dan Giri, (2014), bahwa tingginya kekentalan akan menyebabkan air yang terperangkap dalam struktur mikrokapsul semakin tinggi sehingga akan sulit menguap pada proses pengeringan. Apabila kadar air yang dihasilkan terlalu rendah maka dapat menyebabkan terbentuknya rongga pada dinding mikrokapsul sehingga dapat menurunkan laju viabilitas.

#### 4.2.3 *Water activity* ( $a_w$ )

Berdasarkan tabel sidik ragam (ANOVA) *water activity* ( $a_w$ ) dengan konsentrasi *coating* kitosan yang berbeda memberikan pengaruh nyata (F hitung > dari F tabel 5%) dari masing-masing perlakuan. Sehingga diperlukan uji lanjut BNT. Hasil analisa keragaman uji *water activity* ( $a_w$ ) mikroenkapsulasi dapat dilihat pada Lampiran 14, sedangkan nilai *water activity* ( $a_w$ ) mikroenkapsulasi dapat dilihat pada Gambar 9.



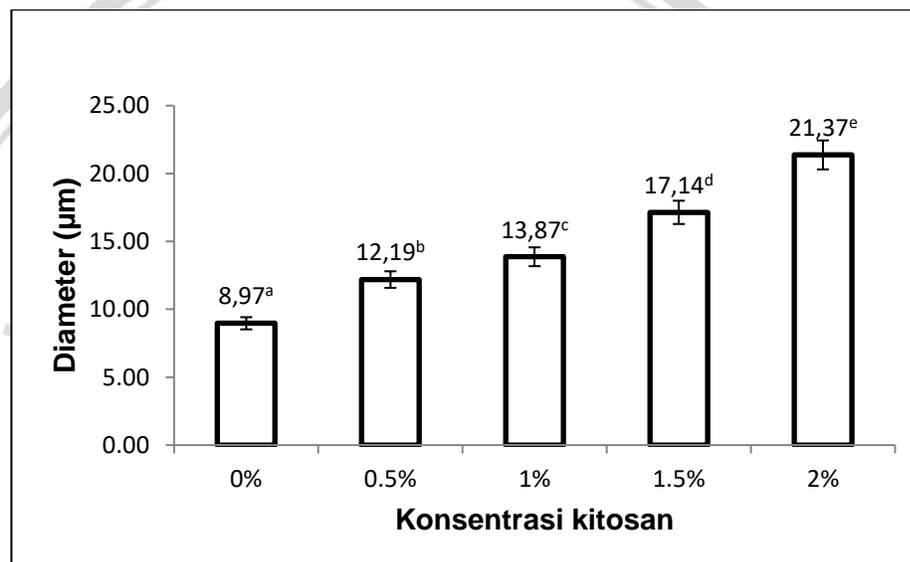
**Gambar 8. Water activity**

Pada Gambar 8, *water activity* ( $a_w$ ) *double coating* iota kitosan didapatkan rata-rata hasil yang tertinggi pada konsentrasi 2% yaitu, 0.76%, sedangkan hasil rata-rata yang terendah pada konsentrasi 0% yaitu, 0.44 %. Dapat dijelaskan bahwa semakin tinggi konsentrasi kitosan yang ditambahkan maka nilai *water activity* ( $a_w$ ) akan semakin tinggi juga. Sebaliknya, semakin rendah konsentrasi kitosan yang ditambahkan maka nilai *water activity* ( $a_w$ ) akan semakin rendah. Hasil terendah didapat dikarenakan ketika bahan yang tidak di *double coating*, air bebas yang terdapat pada bahan tersebut akan lebih mudah keluar dari pada bahan yang di *double coating* dengan konsentrasi tinggi. Hal ini sesuai dengan pendapat Supriyadi dan Rujita (2013), yang menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi bahan didalam emulsi maka akan semakin tinggi nilai aktivitas airnya, begitu juga sebaliknya semakin rendah konsentrasi bahan dalam emulsi maka nilai aktivitas air akan semakin rendah. Produk dengan bahan inti tinggi, air yang ada lebih susah

diapkan selama proses pengeringan. Sebagai akibatnya kadar air produk dan nilai  $a_w$  menjadi lebih tinggi.

#### 4.2.4 Diameter Enkapsulat

Berdasarkan tabel sidik ragam (ANOVA) diameter mikroenkapsulasi dengan konsentrasi *coating* kitosan yang berbeda memberikan pengaruh nyata (F hitung > dari F tabel 5%) dari masing-masing perlakuan. Sehingga diperlukan uji lanjut BNT. Hasil analisa keragaman uji diameter mikroenkapsulasi dapat dilihat pada Lampiran 13, sedangkan nilai diameter mikroenkapsulasi dapat dilihat pada Gambar 10.



**Gambar 9. Mikroenkapsulasi *Double Coating* Iota Kitosan**

Pada Gambar 9, diameter enkapsulat *double coating* Iota kitosan didapatkan rata-rata hasil yang tertinggi pada konsentrasi 2% yaitu, 21,37 µm, sedangkan hasil rata-rata yang terendah pada konsentrasi 0% yaitu, 8,97 µm. Hal ini dikarenakan jumlah penyalut yang tinggi sehingga menghasilkan diameter yang besar dan dengan hasil rata-rata yang tinggi dia mampu melindungi sehingga memberikan hasil viabilitas yang tinggi. Menurut Burgain *et al.*, (2011) enkapsulasi dengan

menggunakan teknik emulsi akan menghasilkan ukuran mikrokapsul yang bervariasi, antara 0,1-5000  $\mu\text{m}$ . Menurut Risch dan Reineccius (1995) dalam Setijawati *et al.*, (2011), mikroenkapsulat dibagi menjadi 3 macam berdasarkan ukurannya, yaitu nano mikroenkapsulat ( $<0,2 \mu\text{m}$ ), mikro enkapsulat (0,2-5000  $\mu\text{m}$ ) dan makro enkapsulat ( $>5000 \mu\text{m}$ ). Bentuk mikrokapsul yang dihasilkan keseluruhan berbentuk bulat, hal serupa juga dilaporkan oleh Fahimdanesh *et al.*, (2012) yang melaporkan bahwa ciri fisik mikrokapsul adalah bulat. Mikrokapsul yang dihasilkan yang dihasilkan dalam penelitian cenderung tidak seragam. Dikarenakan hasil perbedaan ukuran diameter disebabkan karena meningkatnya jumlah konsentrasi kitosan yang digunakan, ukuran jarum yang digunakan, jarak antara jarum dengan larutan pengeras, jumlah sel probiotik yang terjerap pada mikroenkapsulasi dan dapat disebabkan oleh nilai viskositasnya (Pradikaningrum, 2015). Mikrokapsul yang terbentuk dapat berupa partikel atau bentuk agregat, dan biasanya memiliki rentang ukuran partikel antara 5 – 5000  $\mu\text{m}$ . Hasil uji diameter mikroenkapsulasi *Lactobacillus acidophilus* dapat dilihat pada Gambar 10.



**Gambar 10. Hasil Diameter Mikroenkapsulasi**

#### 4.2.5 Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram merupakan pewarnaan dengan menggunakan satu macam zat warna dengan tujuan hanya untuk melihat bentuk sel bakteri dan untuk mengetahui morfologi dan susunan selnya. Pewarnaan ini dapat menggunakan pewarnaan basa pada umumnya antara lain kristal violet, metylen blue, karbol, fuchsin, dan safranin. Hasil uji pewarnaan gram bakteri *Lactobacillus acidophilus* dapat dilihat pada Gambar 11.



**Gambar 11. Pewarnaan Gram Bakteri *Lactobacillus acidophilus***

Berdasarkan hasil uji pewarnaan gram pada Gambar 11 diperoleh bentuk batang (basil). Berdasarkan hasil uji pewarnaan gram diperoleh bentuk batang (basil). Bakteri asam laktat berbentuk batang warna koloni yang terbentuk berwarna ungu yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut dapat menyerap warna kristal violet secara maksimal, hal ini didukung dengan pernyataan dari (Goldstein *et al.*, 2015) bahwa bakteri *Lactobacillus spp*, merupakan jenis bakteri gram positif. Hal serupa juga diungkapkan oleh (Bull *et al.*, 2013) yang menyatakan bahwa bakteri *Lactobacillus acidophilus* termasuk bakteri gram positif.

## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang didapat dari hasil penelitian yaitu konsentrasi kitosan yang berbeda sebesar 0%, 0,5%, 1%, 1,5%, dan 2% pada *double coating* mikrokapsul *Lactobacillus acidophilus* tersalut SRC Iota berpengaruh dan mampu melindungi viabilitas sel *Lactobacillus acidophilus* meskipun belum memenuhi standart FAO  $10^6$ - $10^7$  CFU/gr secara maksimal untuk diaplikasikan pada produk pangan. Viabilitas sel tertinggi terdapat pada perlakuan 2% yaitu sebesar 5,07 log cfu/g.

### 5.2 Saran

Saran yang diberikan pada penelitian selanjutnya yaitu menggunakan konsentrasi kitosan beragam dan memperhatikan kualitas mikroenkapsulasi agar didapatkan hasil yang lebih baik lagi sehingga dapat memenuhi standar probiotik yang diaplikasikan pada produk pangan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adriani, L., N. Indrayati., U. H. Tanuwiria., dan N. Mayasari. 2008. Aktivitas *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacterium* Terhadap Kualitas Yoghurt dan Penghambatannya Pada *Helicobacter pylori*. *Jurnal Bionatura*. **10**(2): 129-140.
- Agestiawan, I. G. A. M., D. A. Swastini., dan Y. Ramona. 2014. Uji Ketahanan Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Kimchi Terhadap pH Rendah. Universitas Udayana. Bali.
- Andarwulan, N., F. Kusnandar, dan D. Herawati. 2011. Analisis Pangan. PT Dian Rakyat, Jakarta.
- Arslan, S., M. Erbas., dan Tontul. 2017. Microencapsulation of Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* with different wall materials by spray drying. *Food Science and Technology*. **81**:160-169.
- Bartkowiak dan Hunkeler. 2001. *Carrageenan-oligochitosan Microcapsule: Optimization of The Formation Process*. *Colloids and Surfaces* **21**: 285-298.
- Banadib, A. dan Khoiruman. 2010. Optimasi pengeringan pada Pembuatan Karaginan dengan Proses Ekstraksi dari Rumpun Laut Jenis *Eucheuma cottoni*. Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Diponegoro. Semarang.
- Belmont, I. A. F., P. Enrique., L. M. Aurelio., dan T. J. Maria. 2015. Simple and Double Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with Chitosan Using Spray Drying. *International Journal of Food Studies*. **4**: 188-200.
- Betha, O. S. 2014. Uji Aktivitas Enzim Protease Dari Bakteri Amobil *Bacillus licheniformis*. F 11.4. *JML* **11**(1): 98-101.
- Bull, M., S. Plummer., J. Marchesi., dan E. Mahenthiralingam. 2013. The Life History of *Lactobacillus acidophilus* as A Probiotic: A Tale of Revisionary Taxonomy, Misidentification and Commercial Success. *FEMS Microbiol Lett*. **349**: 77-87.
- Burgain, J., Gaiani., dan M, J. Scher. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. *J Food Eng*. **104**: 467-483.
- Boyaval, P. 1989. Lactic Acid Bacteria and Metal Ions. *Lait*. **69** (2): 87-113
- Campo, V.L., Kawano., S. Junior, dan D.B., Carvalho, I. 2009, Carrageenans: Biological Properties, Chemical Modifications And Structural Analysis", *Carbohydrate Polymers*, **77**, 167-180.
- Chartusi C. 2017. Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Kitosan Pada *Double Coating*

Mikrokapsul *Bifidobacterium bifidum* Tersalut *Semi Refined Carrageenan* Iota-Kappa Terhadap Viabilitas. *Skripsi*.

- Chávarri, M., I. Marañón., R. Ares., Ibáñez, F. C., Marzo., dan Villarán. 2010. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*. **142**(1–2): 185–189.
- Diharmi, A., D. F., N. A., dan Endang. 2011. Karakteristik Karagenan Hasil Isolasi *Eucheuma spinosum* (Alga merah) dari Perairan Sumenep Madura. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. **16**(1): 117-124.
- Dompeipen, E. J., M. Kaimudin., & Dewa, R. P. 2016. Isolasi kitin dan kitosan dari limbah kulit udang. *Majalah BIAM*, **12**(1): 32–38.
- Ega, L., C. G. C. Lopulalan., dan R. Rangkoratat. 2015. Studi Lama Waktu Ekstraksi Terhadap Mutu Karagenan (*Eucheuma cottoni*). *Jurnal Agroforestri*. **10**(3): 227-238.
- Ewing, W. G. 1982. Instrumental Methods of Chemical Analysis. *Fifth Edition*. New York: Mc Graw-Hill Book Company.
- Fahimdanesh, M. 2012 Effect of Microencapsulation Plus Resistant Starch On Survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum* in Mayonnaise sauce , *African Journal of Microbiology Research*, **6**(40): 6853–6858.
- FAO. 2001. Carrageenan. 9. Prepared at the 57th JECFA.
- Febriyenti, Z . Addina, dan. H. Auza..2014. Mikroenkapsulasi Karbamazepin dengan Penyalut Alginat Menggunakan Metode Emulsifikasi Penguapan Pelarut. Prosiding Seminar Nasional dan Workshop “Perkembangan Terkini Sains Farmasi dan Klinik IV”.
- Gåserød, O., Smidsrød., dan Skjåk-Bræk. 1998. Microcapsules of Alginate- Chitosan I A Quantitative Study of the Interaction Between *Alginate* and *Chitosan*. *Biomaterials*. **19**: 1815-1825.
- Gbassi, G.K. dan Vandamme. 2012. Probiotic Encapsulation Technology: from Microencapsulation to Release in to the Gut. *Pharmaceutics*, **4**. 149-163.
- Genu. 2001. Carrageenan. CO Kelko. Denmark.
- Goldstein, E. J. C., K. L. Tyrrell., dan D. M. Citron. 2015. *Lactobacillus* Species: Taxonomix Complexity and Controversial Susceptibilities. Sumpplement Article.
- Guiseley, K. B., N. F. Stanley dan P. A. Whitehouse. 1980. Carragenan Hand Book of Water Soluble Gums and Resins R. L. Davidson (ed). Mc Graw Hill Book Company. N. Y. New York.

- Gurning, A, P., P. Cairns., A.R. Kirby., A.N. Round., H.J. Bixler dan V. J. Morris 1998. Characterising Semi-refined Iota-carrageenan Networks by Atomic Force Microscopy. *Carbohydrate Polymers* **36**: 67-72.
- Hernandez, P. C., A Lopez-Malo., dan M T Jimenez-Munguia. 2013. Microencapsulation Quality and Efficiency of *Lactobacillus casei* by Spray Drying Using Maltodextrin and Vegetable Extracts. *Journal of Food Research*, **3**(1): 61-69.
- Ibrahim, A., Aditya., dan Fila. 2015. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Buah Mangga (*Mangifera indica* L.). *Jurnal Ilmiah Manuntung*. **1**(2): 159-163.
- Irianto, H. E. dan M. Ijah. 2011. Proses dan aplikasi nanopartikel kitosan sebagai penghantar obat. *Squalen*. **6** (1-8).
- Kailasapathy, K. 2002. Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Current Issues Interest of Microbiology*. **3**(2): 39–48.
- Lachman, L., H. Lieberman. A., dan Kanig. (1994). Teori dan praktek industri farmasi. (Edisi 3). Penerjemah: S. Suyatmi. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Leoanggraini, I.U., I. Bintang., dan I. Muhadi. 2011. Fermentasi Mikroaerofilik *Lactobacillus acidophilus* untuk Produksi Probiotik. pp.188–192.
- Manin, F., E Hendalia., dan Yusrizal. 2012. Potensi Bakteri *Bacillus* dan *Lactobacillus* Sebagai Probiotik Untuk Mengurangi Pencemaran Amonia pada Kandang Unggas. Fakultas Peternakan Universitas Jambi. **14**(2): 360-367.
- Manojlovic, V., Nedovic., Kailasapathy., dan Zuidam. 2010 Encapsulation of Probiotics for use in Food Products. In: Zuidam N., Nedovic V. (eds) Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Springer. New York.
- Mariana, E., dan Hilda. 2012. Pengaruh Supplementasi Tepung Terigu Terhadap Pertumbuhan dan Laju Pengasaman Probiotik *Lactobacillus acidophilus*. *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia*. **4**(3): 14-19.
- McHugh, D. J. 2003, *A guide to Seaweed Industry*, Food and Agric. ORG. Of the UN, Rome.
- Novianto., Y. Dinarianasari., dan Prasetyaningrum. 2013. Pemanfaatan Membran Mikrofiltrasi untuk Pembuatan Refined Carrageenan dari Rumput Laut Jenis *Eucheuma cottonii*. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*, **2**(3): 109–114.

- Nugraheni, N., N. Yunarto., dan N. Sulistyningrum. 2015. Optimasi Formula Mikroenkapsulasi Ekstrak Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.dengan Penyalut Berbasis Air. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. **5**(2).
- Nurjatmiko, M. 2017. Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Kitosan Pada *Double Coating* Mikrokapsul *Bifidobacterium bifidum* Tersalut *Semi Refined Carrageenan* Kappa Terhadap Viabilitas. *Skripsi*.
- Oviantri, Vivi, dan Parwata. 2007. Optimalisasi Produksi *Semi Refined Carrageenan* (SRC) dari Rumput Laut *Eucheuma cottoni* dengan Variasi Teknik Pengeringan dan Kadar Air Bahan Baku. Lembaga Penelitian Universitas Pendidikan Ganesha Bali.
- Parameswari, A., Kuntari, dan S. Herawati. 2013. Daya Hambat Probiotik Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*. Fakultas Kedokteran Gigi. Univesritas Airlangga, Surabaya.
- Peranginangin, R., E. Sinurat dan M. Darmawan. 2013. Memproduksi Karaginan dari Rumput Laut. PS : Jakarta.
- Pereira, L, Amado., Critley., Van de Velde., and Ribeiro-Calro. 2009. Identification of Selected Seaweed Polysaccharides (Phycocolloids) by Vibrational Spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman), *Food Hydrocolloids*, 1-7.
- Piano D., dan Mario. 2011. *Is Microencapsulation The Future of Probiotic Preparations The Increased Efficacy of Gastro-Protected Probiotics*. *Gut Microbes* **2**(2), 120-123.
- Pradikaningrum, H. 2015. Uji Viabilitas Mikroenkapsulasi *Lactobacillus casei* Menggunakan Matrik Kitosan. Univeritas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Prasetyowati, C. J. A., dan A. Devy. 2008. Pembuatan Tepung Karaginan dari Rumput Laut (*Eucheuma cottoni*) Berdasarkan Perbedaan Metode Pengendapan. *Jurnal Teknik Kimia*. **15**(2): 27-33.
- Purnamayanti, L., E.N. Dewi., dan R.A. Kurniasih. 2016. Karakteristik Fisik Mikrokapsul Fikosianin *Spirulina* Pada Konsentrasi Bahan Penyalut Yang Berbeda. Prog studi Tekonologi Hasil Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro.
- Purwandhani, Made Suladra, E. S. R. 2007. Stabilitas Thermal Agensi Probiotik *L. acidophilus* SNP 2 Terenkapsulasi Metode Ekstruksi Dan Emulsi, 2007 (November), 1–6.
- Purwaningsih, W., Rochmadi., A. Prasetya dan W. Hasokowati. 2010. Pembuatan Mikrokapsul dari Urea-formaldehid: Pengaruh Waktu dan Perbandingan Reaktan Pada Pembuatan ResinTerhadap Proses Mikroenkapsulasi. Seminar Rekayasa Kimia dan Proses.

- Rahayu, L. H dan S. Purnavita. 2007. Optimasi Pembuatan Kitosan dari Kitin Limbah Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) Untuk Adsorben I Logam Merkuri. *Jurnal Reaktor*. **11**(11).
- Rahrs, E. 2008. *L.acidophilus* Ls-14 - a. Probiotic With Proven Efficacy. Danisco DK-Brabrand, Brabrand : Denmark.
- Renur, N. M. 2014. Aplikasi Edible Coating Berbahan Kitosan Dan Ekstrak Lemon Cina (*Citrus mitis*) Pada Fillet Ikan Cakalang (*Katsuwonus pelamis*). Pasca Sarjana IPB.
- Risch dan Reineccius. 1995. Encapsulation&Controlled Release Of Food Ingredients. ACS Symposium Series 590.
- Rosiana, A. D., E. Noor., dan Isnaeni. 2008. Pengaruh Asam-asam Organik Terhadap Pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, dan *Lactobacillus casei* (Bakteri Asam Laktat). *Majalah Farmasi Airlangga*. **6**(2): 53-56.
- Sashiwa, H., Y.N. Ichinose., Y. Sunamoto., J., dan Aiba. 2003. Chemical Modification of Chitosan, 17a Michael Reaction of Chitosan with Acrylic Acid in Water. *Macromolecular Bioscience*. **3**(5), 231–23.
- Setijawati, D., Susinggih., Aulaniam., dan Imam . 2011. Viabilitas dan Struktur Mikrokapsul *Lactobacillus acidophilus* dengan Bahan Penyalut Karaginan Semi Murni Jenis *Eucheuma cottoni*. *Jurnal Teknologi Pangan*. **2**(1): 50-67.
- Setijawati, Dwi., S. Wijana., Aulani'am., dan I. Santosa. Juni, 2012. Penggunaan *Carageenan* dengan Metode Proses Berbeda (SRC dan RC) sebagai Bahan Pengenkapsulat *Lactobacillus acidophilus* terhadap Viabilitas dan Struktur Mikrokapsul secara in Vitro. *Jurnal Teknologi Pangan***3**(1).Universitas Brawijaya, Malang.
- Setijawati, D. 2017. Penggunaan *Eucheuma Spdan* Cithosan Sebagai Bahan Edible Film Terhadap Kualitasnya, Progam Studi Teknologi Hasil Perikanan . 6–14. Universitas Brawijaya, Malang.
- Sitorus, R. F., T. Karo-karo., Z. Lubis. 2014. Pengaruh Konsentrasi Kitosan Sebagai *Edible Coating* dan Lama Penyimpanan Terhadap Mutu Buah Jambu Biji Merah. *Jurnal Rekayasa Pangan*. **2**(1): 37-46.
- Srifiana, Y., Silvia., dan Arry. 2014. Mikroenkapsulasi Ketoprofen dengan Metode Koaservasi dan Semprot Kering Menggunakan Prigelatinisasi Pati Singkong Ftalat sebagai Eksipien penyalut. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. **12**(2): 162-169.
- Sudarmadji, S., B. Harono., dan Suhardi. 2007. Analisis Bahan Makanan dan Pertanian. Liberty. Yogyakarta.

- Supitjah, Pipih, Y. Gushagia, D.R. Sukarsa. 2008. Kajian Efek Daya Hambat Kitosan Terhadap Kemunduran Mutu Fillet Ikan Patin (*Pangasius hypothalmus*) pada Penyimpanan Suhu Ruang. *Buletin teknologi hasil perikanan*. **9** (2).
- Supriyadi and Rujita A. S. 2013. Karakteristik Mikrokapsul Minyak Atsiri Lengkuas dengan Maltodekstrin sebagai Enkapsulan. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, **24** : 201-208.
- Suryaningrum, Th.D. 1989. Kajian Sifat-sifat Mutu Komoditi Rumput Laut Budidaya Jenis *Eucheuma cottoni* dan *Eucheuma spinosum*. Tesis. Program Pascasarjana. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. IPB, Bogor.
- Susanto, A., 2009. Uji Korelasi Kadar Air, Kadar Abu, Water activity dan Bahan Organik pada Jagung di Tingkat Petani, Pedagang pengumpul dan Pedagang Besar. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Hal 835.
- Triana, E. 2006. Viability of encapsulated *Lactobacillus sp.* Mar 8. *Biodiversitas, Journal of Biological Diversity*, **7**(2), 114–117.
- Tripathi, M. K., and S. K. Giri. 2014. Probiotic Functional Foods: Survival of Probiotics during Processing and Storage. *Journal of Functional Foods*, **9**(1): 225–41.
- Ula, Nimatul. 2016. Pengaruh Konsentrasi *Semi Refined Carrageenan* Iota dan Maltodekstrin Pada Pembuatan Mikrokapsul Terhadap Viabilitas *Bifidobacterium bifidum*. Skripsi: Universitas Brawijaya Malang.
- Velde, F.V.D., Knutsen, S.H. Usov, A.I. Rollema, H.S. dan Cerezo, A.S. Hand C High Resolution NMR Spectroscopy of Carrageenans: Application In Research and Industry. *Trends in Food Science and Technology*. **13**: 73-92.
- Victor, R.P. and D.R. Heldman. 2001. *Introduction to Food Engineering*. 3<sup>rd</sup> ed. London: Academic Press.
- Villanueva RD., Sousa., Goncalves., Nilson., L. Hilliou. 2003. Production and properties of agar from the invasive marine alga, *Gracilaria vermiculophylla* (*Gracilariales, Rhodophyta*).
- Wang, R., Tian, Z. and Chen, L. 2014. A Novel Process for Microencapsulation of Fish Oil with Barley Protein. *Food Research International* **44**(9): 2735-2741.
- Widiyaningsih, E. N. 2011. Peran Probiotik untuk Kesehatan. *Jurnal Kesehatan*. **4**(1): 14-20.
- Winarno, F.G. 2006. Kimia Pangan dan Gizi: Edisi Terbaru. Jakarta. Gramedia Pustaka Utama.

Yasita, D dan I. D. Rachmawati. 2009. Optimasi Proses Ekstraksi Pada Pembuatan Karaginan dari Rumput Laut *Eucheuma cottoni* untuk Mencapai FoodGrade. Jurusan Teknik Kimia. Universitas Diponegoro. Semarang.

Yulinery, T., E. Yulianto., N. Nurhidayat. 2006. Uji fisiologis probiotik *Lactobacillus* sp. Mar 8 yang telah dienkapsulasi dengan menggunakan Spray Dryer untuk menurunkan kolesterol. *Biodiversitas*, **7**(2): 118-122.

