

**AKTIVITAS ANTIMIKROBA *EDIBLE*
FILM KASEIN-KITOSAN YANG
DITAMBAH TITANIUM DIOKSIDA
DENGAN LEVEL BERBEDA**

SKRIPSI

Oleh :

Iffah Syarifah

NIM. 175050101111140



**PROGRAM STUDI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2021



**AKTIVITAS ANTIMIKROBA *EDIBLE*
FILM KASEIN-KITOSAN YANG
DITAMBAH TITANIUM DIOKSIDA
DENGAN LEVEL BERBEDA**

SKRIPSI

Oleh :

Iffah Syarifah

NIM. 175050101111140

Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Peternakan pada Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

**PROGRAM STUDI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2021**

**AKTIVITAS ANTIMIKROBA *EDIBLE*
FILM KASEIN-KITOSAN YANG
DITAMBAH TITANIUM DIOKSIDA
DENGAN LEVEL BERBEDA**

SKRIPSI

Oleh :

Iffah Syarifah

NIM. 175050101111140

Telah dinyatakan lulus dalam ujian Sarjana

Pada Hari/Tanggal : Rabu, 14 Juli 2021

Mengetahui,
Dekan Fakultas Peternakan
Universitas Brawijaya

Menyetujui,
Dosen Pembimbing



Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Suyadi,
MS., IPU., ASEAN Eng.

Dr. Khothibul Umam
AI Awwaly, S.Pt., M.Si.

NIP. 19620403 198701 1 001

NIP. 19740314 199903 1 004

Tanggal :

Tanggal :

ANTIMICROBIAL EDIBLE FILMS ACTIVITY OF CASEIN-CHITOSAN PLUS TITANIUM DIOXIDE WITH DIFFERENT LEVEL

Iffah Syarifah¹, Khothibul Umam Al Awwaly²

¹Student, Faculty of Animal Science, Brawijaya University,
Malang

²Lecturer, Faculty of Animal Science, Brawijaya University,
Malang

Email : halloiffah@gmail.com

ABSTRACT

The purpose of this research was to find out the best level dioxide of casein-chitosan plus titanium in the manufacture of edible film so that could produced the best antimicrobial activity towards *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* and *Lactobacillus bulgaricus*. The material that used was edible film casein-chitosan plus titanium dioxide with different level. This research method was laboratory experimental with Completely Randomized Design with 4 treatments and 3 replications. The variable that measured was antimicrobial activity of edible film towards *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* and *Lactobacillus bulgaricus*. Data were analysed using Analysis of Variance (ANOVA), and continued with Duncan's Multiple Range Test (DMRT) if there were significant difference or highly significant difference. The results showed that there was highly significant difference ($P < 0.01$) on antimicrobial activity towards *Staphylococcus aureus*, but there was no significant difference ($P > 0.05$) on antimicrobial activity towards *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* dan *Lactobacillus bulgaricus*. Conclusion of this research was the best level of



casein-chitosan plus titanium dioxide in the manufacture of edible film casein-chitosan : titanium dioxide 5%

Keywords : *edible film*, antimicrobial activity, casein-chitosan, titanium dioxide



AKTIVITAS ANTIMIKROBA *EDIBLE FILM* KASEIN-KITOSAN YANG DITAMBAH TITANIUM DIOKSIDA DENGAN LEVEL BERBEDA

Ifah Syarifah¹, Khothibul Umam Al Awwaly²

¹Mahasiswa, Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya,
Malang

²Dosen, Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang

Email : halloiffah@gmail.com

RINGKASAN

Produk bidang peternakan baik mentah maupun olahan sangat mudah mengalami kerusakan apabila tidak ditangani dengan baik karena faktor fisik, kimia dan biologi. *Edible film* dapat digunakan sebagai bahan pengemas yang mampu melindungi kemungkinan kerusakan akibat lingkungan, mikroba dan memiliki sifat alami, ramah lingkungan serta aman dikonsumsi oleh manusia. Kasein merupakan salah satu protein yang dapat digunakan sebagai bahan pembuatan *edible film*, tetapi kelemahan kasein tidak memiliki sifat antimikroba. Kitosan merupakan polisakarida yang dapat membentuk *film* kuat dan mempunyai sifat antimikroba tingkat tinggi. Selain kitosan bahan yang dapat ditambahkan dalam pembuatan *edible film* adalah TiO_2 (Titanium dioksida). TiO_2 memiliki aktivitas antimikroba terhadap berbagai organisme termasuk bakteri, jamur dan sel kanker.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui level terbaik penambahan TiO_2 pada pembuatan *edible film* kasein-kitosan sehingga dihasilkan aktivitas antimikroba terbaik

terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* dan *Lactobacillus bulgaricus*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai level terbaik penambahan TiO_2 pada pembuatan *edible film* kasein-kitosan.

Materi yang digunakan adalah *edible film* kasein-kitosan yang ditambah TiO_2 dengan level berbeda sesuai perlakuan. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah percobaan laboratorium dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 3 ulangan, *edible film* kasein-kitosan untuk perlakuan 1 (P1), *edible film* kasein-kitosan : TiO_2 1% untuk perlakuan 2 (P2), *edible film* kasein-kitosan : TiO_2 3% untuk perlakuan 3 (P3), *edible film* kasein-kitosan : TiO_2 5% untuk perlakuan 4 (P4). Variabel yang diamati adalah aktivitas antimikroba *edible film* kasein-kitosan yang ditambah TiO_2 dengan level berbeda pada bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* dan *Lactobacillus bulgaricus*. Data yang diperoleh dianalisis dengan Analisis Variasi (ANOVA) dan dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan (UJBD) apabila terdapat perbedaan yang nyata maupun sangat nyata.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pembuatan *edible film* kasein-kitosan yang ditambah TiO_2 dengan level berbeda menghasilkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$) pada aktivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus*, dan menghasilkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$) pada aktivitas antimikroba terhadap *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* dan *Lactobacillus bulgaricus*. Rata-rata diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* adalah 14,00 mm untuk P1, 14,01 mm untuk P2, 14,63 mm untuk P3 dan 16,09 mm untuk P4. Rata-rata diameter zona hambat



pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* adalah 21,49 mm untuk P1, 20,80 mm untuk P2, 20,61 mm untuk P3 dan 21,95 mm untuk P4. Rata-rata diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Salmonella sp.* adalah 16,52 mm untuk P1, 15,84 mm untuk P2, 16,14 mm untuk P3 dan 17,12 mm untuk P4. Rata-rata diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* adalah 16,77 mm untuk P1, 16,53 mm untuk P2, 17,59 mm untuk P3 dan 17,89 mm untuk P4.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah pembuatan *edible film* kasein-kitosan yang ditambah TiO_2 dengan level berbeda menghasilkan perlakuan terbaik pada P4 yakni *edible film* kasein-kitosan : TiO_2 5%. Saran yang dapat diberikan adalah untuk membuat *edible film* kasein-kitosan dengan level penambahan TiO_2 5%. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai uji daya umur simpan untuk *edible film* dan penerapan *edible film* ini pada produk olahan maupun bahan pangan segar bidang peternakan seperti sosis, keju, bakso, karkas, daging, telur dan lain-lain

Kata kunci : *edible film*, antimikroba, kasein-kitosan, titanium dioksida



DAFTAR ISI

Halaman

RIWAYAT HIDUP	i
KATA PENGANTAR	ii
ABSTRACT	iv
RINGKASAN	vi
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL	xiv

BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	5
1.5. Kerangka Pikir.....	5
1.6. Hipotesis.....	9

BAB II TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1. <i>Edible film</i>	10
2.2. Kasein.....	11
2.3. Kitosan.....	12
2.4. Titanium Dioksida (TiO ₂).....	12
2.5. Aktivitas Antimikroba.....	15
2.6. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.7. <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	16
2.8. <i>Escherichia coli</i>	17
2.9. <i>Salmonella sp.</i>	18



BAB III MATERI DAN METODE	20
3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian	20
3.2. Materi Penelitian	20
3.2.1. Bahan-bahan Penelitian	21
3.2.2. Alat-alat Penelitian	21
3.3. Metode Penelitian	21
3.4. Prosedur Pembuatan <i>Edible film</i>	22
3.5. Variabel Penelitian	25
3.6. Analisis Statistik	25
3.7. Batasan Istilah	25
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1. Aktivitas Antimikroba <i>Edible film</i> terhadap Bakteri <i>Escherichia coli</i>	28
4.2. Aktivitas Antimikroba <i>Edible film</i> terhadap Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	30
4.3. Aktivitas Antimikroba <i>Edible film</i> terhadap Bakteri <i>Salmonella sp.</i>	33
4.4. Aktivitas Antimikroba <i>Edible film</i> terhadap Bakteri <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	35
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	38
5.1. Kesimpulan	38
5.2. Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	45



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Karakteristik <i>edible film</i> menurut <i>japan industrial standard</i> (JIS).....	11
2. Model tabulasi data penelitian.....	22
3. Rata-rata diameter zona hambat <i>edible film</i> kasein- kitosan yang ditambah titanium dioksida (TiO ₂) dengan level berbeda terhadap pertumbuhan bakteri <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> <i>sp.</i> dan <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	27

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kerangka pikir	8
2. Diagram alir pembuatan <i>edible film</i>	24
3. Diameter zona hambat <i>edible film</i> pada pertumbuhan bakteri <i>Escherichia coli</i>	29
4. Diameter zona hambat <i>edible film</i> pada pertumbuhan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	32
5. Diameter zona hambat <i>edible film</i> pada pertumbuhan bakteri <i>Salmonella sp.</i>	34
6. Diameter zona hambat <i>edible film</i> pada pertumbuhan bakteri <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	35



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

Halaman

1. Prosedur uji aktivitas antimikroba <i>edible film</i>	45
2. Penyiapan media tumbuh bakteri	46
3. Data dan hasil analisis statistika uji aktivitas antimikroba <i>edible film</i> kasein-kitosan yang ditambah TiO ₂ (Titanium dioksida) dengan level berbeda pada <i>Escherichia coli</i>	48
4. Data dan hasil analisis statistika uji aktivitas antimikroba <i>edible film</i> kasein-kitosan yang ditambah TiO ₂ (Titanium dioksida) dengan level berbeda pada <i>Staphylococcus aureus</i>	50
5. Data dan hasil analisis statistika uji aktivitas antimikroba <i>edible film</i> kasein-kitosan yang ditambah TiO ₂ (Titanium dioksida) dengan level berbeda pada <i>Salmonella sp.</i>	53
6. Data dan hasil analisis statistika uji aktivitas antimikroba <i>edible film</i> kasein-kitosan yang ditambah TiO ₂ (Titanium dioksida) dengan level berbeda pada <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	55
7. Dokumentasi penelitian	57



DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL

ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
CFU	: <i>Coloni Forming Unit</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
RNA	: <i>Ribonucleic acid</i>
DMRT	: <i>Duncan's Multiple Range Test</i>
UJBD	: <i>Uji Jarak Berganda Duncan</i>
RAL	: <i>Rancangan Acak lengkap</i>
SNI	: <i>Standar Nasional Indonesia</i>
JIS	: <i>Japan Industrial Standard</i>
mm	: <i>milimeter</i>
ml	: <i>mililiter</i>
g	: <i>gram</i>
<i>sp.</i>	: <i>spesies</i>
<i>dkk</i>	: <i>dan kawan-kawan</i>
<i>et al</i>	: <i>et alii (and others)</i>
°C	: <i>derajat celcius</i>
%	: <i>persen</i>



BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Produk olahan bidang peternakan seperti sosis, keju, bakso dan *yoghurt* maupun bahan pangan segar seperti karkas, daging, telur, susu dan ikan memiliki sifat mudah rusak (*perishable food*) mengakibatkan penggunaan kemasan untuk melindungi produk olahan dan bahan pangan tersebut sangat penting dalam kehidupan sehari-hari agar terhindar dari mikroba perusak dan menjaga kualitas dari produk olahan maupun bahan pangan. Salah satu syarat dari suatu kemasan pangan (*food grade*) yang dapat digunakan adalah tanpa adanya pengaruh kontaminasi kemasan terhadap produk yang dikemas, sehingga aman bagi kesehatan manusia. Selain itu, kemasan sebaiknya bersifat ramah lingkungan (*biodegradable*) yang dapat terurai oleh organisme hidup dalam tanah sehingga tidak menambah persoalan pada waktu yang akan datang. Seiring dengan meningkatnya perkembangan IPTEK muncul berbagai inovasi pengemas yang berbahan dasar *renewable* (dapat diperbarui), *biodegradable* (dapat dihancurkan secara alami) dan ekonomis, salah satu jenis kemasan tersebut adalah *edible film* (Coniwanti, Pertiwi dan Pratiwi, 2014). Manab, Sawitri dan Al Awwaly (2017) menjelaskan bahwa fungsi *edible film* yaitu sebagai *barrier* terhadap transfer massa, sebagai *carrier* bahan makanan, dapat memperpanjang umur simpan produk dan menghambat pertumbuhan mikroba patogen dibagian permukaan produk. *Edible film* merupakan lapisan tipis dan kontinyu terbuat dari bahan yang dapat dimakan seperti protein, polisakarida, lemak yang berguna



melapisi bahan pangan (*coating*) dan juga dapat ditempatkan antara komponen bahan pangan (*film*).

Protein yang sering digunakan sebagai bahan pembuatan *edible film* salah satunya adalah kasein. *Edible film* berbahan dasar protein lebih efisien digunakan sebagai bahan pengemas makanan, karena protein dapat menghambat uap air, gas dan lebih *biodegradable* sehingga mengurangi kerusakan lingkungan. Kasein merupakan protein utama dalam susu dan termasuk golongan dari hidrokoloid yang dapat digunakan sebagai pembuatan *edible film*. Protein ini memiliki sifat istimewa karena sukar terpecah oleh panas yang tinggi. Oleh karena keistimewaan tersebut, kasein sangat baik digunakan sebagai bahan dasar dalam pembuatan *edible film* (Maruddin, Ako, Hajrawati dan Taufik, 2017). *Edible film* kasein memiliki kekuatan sangat baik terhadap daya permeabilitas oksigen yang rendah dan dapat membentuk pelindung yang baik pada molekul nonpolar karena kasein mempunyai banyak gugus fungsi polar, seperti gugus hidroksil dan amino. Bonnaille *et al.*, (2014) menjelaskan bahwa kasein memungkinkan untuk dikombinasikan dengan bahan lain sebagai pembentuk kemasan *edible* dan melindungi produk yang rentan terhadap oksidasi.

Keamanan, kualitas dan umur simpan makanan siap saji *ready-to-eat* (RTE) ditentukan oleh jenis, jumlah patogen dan bakteri pembusuk yang ada dipermukaan makanan (Cagri, Ustunol and Ryser, 2004). Bakteri yang dapat tumbuh di permukaan bahan pangan yakni *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Salmonella sp.* dan *Escherichia coli*. *Lactobacillus bulgaricus* merupakan bakteri Gram positif nonpatogen, *Escherichia coli* dan *Salmonella sp.* merupakan bakteri Gram negatif patogen, *Staphylococcus aureus*

merupakan bakteri Gram positif patogen. Thohari, Mustakim, Padaga dan Rahayu (2017) menyatakan *Lactobacillus bulgaricus* dapat mengakibatkan kerusakan fermentasi pada bahan pangan dengan cara memfermentasi karbohidrat atau mengubah gula menjadi asam laktat bersamaan dengan hidrogen dan karbondioksida, sehingga menjadikan perubahan *flavor* dan pembentukan gas yang akhirnya terjadi dalam bahan pangan. Berdasarkan SNI 7388:2009 (batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan) menjelaskan *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Salmonella sp.* jenis bakteri yang dapat tumbuh dan mengontaminasi produk pangan segar maupun olahan serta dapat menyebabkan penyakit pada manusia.

Tujuan dari pelapisan bahan pangan dan produk olahan dengan *edible film* yaitu mencegah akibat mikroba perusak patogen maupun nonpatogen, sehingga mempunyai umur simpan panjang dan tetap aman untuk dikonsumsi manusia. Salah satu bahan pembuatan *edible film* yang memiliki sifat antimikroba adalah kitosan. Kitosan merupakan polisakarida yang mempunyai sifat antimikroba tingkat tinggi dan dapat membentuk *film* yang kuat. Damayanti, Rochima dan Hasan (2016) menyatakan bahwa kitosan dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Mekanisme bakterisidal antimikroba diperlihatkan dengan aktivitasnya dalam merusak struktur membran dan dinding sel mikroba.

Selain kitosan bahan yang dapat dijadikan sebagai antimikroba adalah Titanium dioksida (TiO_2) atau Titania. Senyawa ini dapat dimanfaatkan secara luas sebagai pigmen, bakterisida, pasta gigi, fotokatalis dan elektroda dalam sel surya. Nanopartikel TiO_2 telah digunakan sebagai agen



antibakteri yang efektif karena ketersediaannya luas, antibiotik spektrum luas dan biaya rendah. Titania memiliki sifat fisika-kimia yang sangat baik, daya oksidasi kuat, kecepatan *transfer* elektron cepat dan biokompatibilitas yang baik (Kustiningsih *et al.*, 2019). Maharani, Cahyaningrum, Amaria dan Rusmini (2012) menyebutkan bahwa kitosan dapat dikompositkan dengan silika dan material anorganik lainnya seperti titania untuk meningkatkan sifat fisik maupun kimia dari kitosan. Komposit kitosan titania dapat diaplikasikan sebagai bahan antibakteri untuk berbagai keperluan industri seperti industri tekstil, medis dan makanan. Level dalam penambahan TiO₂ (Titanium dioksida) pada *edible film* kasein-kitosan yang terbentuk diharapkan dapat memberikan aktivitas antimikroba terbaik pada *edible film* yang terbentuk.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut maka rumusan masalah yang dapat diidentifikasi adalah berapa level terbaik penambahan TiO₂ (Titanium dioksida) pada pembuatan *edible film* kasein-kitosan sehingga dihasilkan aktivitas antimikroba terbaik terhadap *Salmonella sp.*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui level terbaik penambahan TiO₂ (Titanium dioksida) pada pembuatan *edible film* kasein-kitosan sehingga dihasilkan aktivitas antimikroba terbaik terhadap *Salmonella sp.*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.



1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat, antara lain :

1. Bagi Penulis dapat menambah wawasan dan keahlian tentang pembuatan *edible film*, khususnya mengenai aktivitas antimikroba *edible film* kasein-kitosan yang ditambah TiO₂ (Titanium dioksida) dengan level berbeda.
2. Bagi Pembaca dapat menambah wawasan terhadap level terbaik penambahan TiO₂ (Titanium dioksida) berbeda pada pembuatan *edible film* kasein-kitosan
3. Bagi instansi yang terkait dapat menambah ilmu pengetahuan khususnya pada bidang teknologi pembuatan *edible film* kasein-kitosan yang ditambah TiO₂ (Titanium dioksida) dengan level berbeda ditinjau dari aktivitas antimikroba terhadap *Salmonella sp.*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

1.5. Kerangka Pikir

Produk yang dihasilkan oleh bidang peternakan baik mentah maupun olahan sangat mudah mengalami kerusakan apabila tidak ditangani dengan baik karena faktor fisik, kimia dan biologi. *Edible film* merupakan salah satu bahan pengemas yang bersifat alami, ramah lingkungan dan aman untuk dikonsumsi manusia, selain itu manfaat lain dari *edible film* mampu melindungi kemungkinan kerusakan akibat lingkungan dan mikroba. Bahan dasar penyusun *edible film* adalah polimer alami seperti protein, polisakarida dan lemak (Manab dkk., 2017). Kasein merupakan salah satu protein yang dapat digunakan sebagai bahan pembuatan *edible film*. Kasein memiliki kekuatan sangat baik terhadap daya permeabilitas oksigen yang rendah, tahan terhadap suhu panas dan dapat

membentuk perlindungan yang baik pada molekul nonpolar (Bonnaille *et al.*, 2014).

Kelemahan kasein sebagai bahan pembuatan *edible film* adalah tidak memiliki sifat aktivitas antimikroba. Bakteri yang dapat tumbuh dipermukaan bahan pangan yakni *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Salmonella sp.* dan *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif fakultatif anaerob (Ngajow, Abidulu dan Kamu, 2013), *Lactobacillus bulgaricus* merupakan bakteri Gram positif anaerob (Hardiningsih, Napitupulu dan Yulineri, 2006), *Salmonella sp.* merupakan bakteri Gram negatif fakultatif anaerob (Tamimi, Agustina dan Komariah, 2017) dan *Escherichia coli* merupakan bakteri Gram negatif fakultatif anaerob (Sulistyoningrum, Suprijanto dan Sabdono, 2013).

Bahan lain yang dapat ditambahkan yaitu kitosan dalam *edible film* yang dapat bertindak sebagai antimikroba. Kitosan adalah polisakarida yang dapat membentuk *film* yang kuat dan mempunyai sifat antimikroba tingkat tinggi (Cagri *et al.*, 2004). Kitosan memiliki banyak gugus amina disepanjang rantainya (bersifat kationik). Gugus $-NH_2$ pada kitosan ketika direaksikan dengan asam berubah menjadi $-NH_3^+$. Muatan positif dari gugus NH_3^+ pada kitosan dapat berinteraksi dengan muatan negatif pada permukaan sel bakteri, yaitu asam tekoat pada bakteri Gram positif dan lipopolisakarida pada bakteri Gram negatif.

Selain kitosan ada bahan lain yang dapat digunakan sebagai antimikroba yakni TiO_2 (Titanium Dioksida) dengan penambahan level berbeda pada *edible film*. TiO_2 adalah logam oksida, tidak beracun, melimpah dan murah. Selain itu juga banyak digunakan dalam produksi antimikroba *film*



nanokomposit. TiO_2 memiliki aktivitas antimikroba terhadap berbagai mikroba termasuk bakteri, jamur dan sel kanker (Luo, Qin, and Ye, 2015). Titania memiliki sifat fisika-kimia yang sangat baik, daya oksidasi kuat, kecepatan *transfer* elektron cepat dan biokompatibilitas yang baik (Kustiningsih *et al.*, 2019). Interaksi ini diperkirakan akan mengganggu pembentukan peptidoglikan sehingga sel tidak mempunyai selubung yang kokoh dan mudah mengalami lisis sehingga aktivitas antimikroba akan terhambat dan pada akhirnya mengalami kematian secara sempurna (Kusumawati, Supomo dan Libiyah, 2017). Kerangka pikir penelitian dapat dilihat pada Gambar 1.



Produk pangan mentah maupun olahan mudah mengalami kerusakan karena faktor fisik, kimia dan biologis.

Fungsi utama penerapan *edible film* dalam teknologi pangan adalah dapat memperpanjang umur simpan. *Edible film* biasanya dibuat dari polimer alami seperti polisakarida, protein dan lemak (Manab dkk., 2017).

Kasein memiliki sifat yang tahan terhadap panas dan membentuk pelindung dari oksigen (Bonnaille *et al.*, 2014). Kelemahan *edible film* kasein adalah tidak memiliki aktivitas antimikroba.

Kitosan adalah polisakarida yang dapat membentuk *film* yang kuat dan memiliki sifat antimikroba tingkat tinggi (Cagri *et al.*, 2004). Muatan positif kitosan dapat berinteraksi dengan muatan negatif di permukaan sel bakteri, yaitu asam tekoat pada bakteri Gram positif dan lipopolisakarida pada bakteri Gram negatif.

TiO₂ adalah logam oksida, tidak beracun, melimpah dan murah. TiO₂ memiliki aktivitas antimikroba pada berbagai mikroba termasuk bakteri, jamur dan sel kanker. (Luo *et al.*, 2015).

Edible film Kasein-Kitosan ditambah TiO₂ dengan level berbeda

Uji Aktivitas Antimikroba *Edible film* pada bakteri :

1. *Staphylococcus aureus* (bakteri Gram positif)
2. *Lactobacillus bulgaricus* (bakteri Gram positif)
3. *Salmonella sp.* (bakteri Gram negatif)
4. *Escherichia coli* (bakteri Gram negatif)

Gambar 1. Kerangka Pikir

1.6. Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah penambahan TiO_2 (Titanium dioksida) dengan level berbeda pada pembuatan *edible film* kasein-kitosan dapat memberikan aktivitas antimikroba terbaik terhadap bakteri *Salmonella sp.*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Edible film*

Edible film merupakan lapisan dengan ketebalan $<0,25$ mm, dapat dimakan yang memiliki fungsi sebagai *barrier* transfer massa (kelembapan, oksigen, lipid dan zat terlarut). Perbedaan *edible coating* dan *edible film* yaitu terletak pada proses pengaplikasiannya. *Edible coating* langsung dibentuk pada produk atau bahan, sedangkan *edible film* tidak dibentuk secara langsung oleh produk olahan ataupun bahan yang akan dikemas (Dwimayasanti, 2016). *Edible film* dapat diartikan suatu lapisan tipis untuk pengemas bahan pangan atau produk yang layak dikonsumsi dan dapat terdegradasi oleh alam secara biologis. Selain bersifat *biodegradable*, *edible film* dapat dipadupadankan dengan komponen tertentu yang dapat memberikan nilai tambah fungsional dari kemasan itu sendiri (Kusumawati dan Putri, 2013). Fungsi utama dalam penerapan *edible film* dalam teknologi pangan yaitu memperpanjang umur simpan, memperbaiki mutu suatu produk atau bahan dan menghambat pertumbuhan mikroba.

Polimer alami yang biasa digunakan sebagai bahan pembuatan *edible film* meliputi : polisakarida (pati, selulosa, gum gellan, pektin dan kitosan), lemak (lilin lebah, lilin carnauba, lilin candelina, asam lemak dan gliserol) dan protein (zein, kolagen, gluten, protein susu berupa kasein, protein whey dan protein kedelai) (Manab dkk., 2017). Yulianti dan Ginting (2012) menyatakan bahwa pembuatan *edible film* perlu penambahan *plasticizer* untuk membentuk fleksibilitasnya, karena bisa menurunkan gaya intermolekuler pada rantai polimernya, sehingga *film* lentur bila

dibengkokkan. Karakteristik fisik dari *edible film* dipengaruhi juga oleh jenis bahan dan konsentrasi *plasticizer*. *Plasticizer* golongan polihidrik alkohol atau poliol yaitu griserol dan sorbitol. Karakteristik *edible film* menurut *Japan Industrial Standard (JIS)* disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik *edible film* menurut *Japan Industrial Standard (JIS)*

Parameter	Nilai
Ketebalan	Maksimum 0,25 mm
Kuat Tarik	Minimum 0,39 MPa
Elongasi	<10% sangat buruk >50% sangat bagus
Laju Transmisi Uap Air	Maksimum 7 g/m ² /hari

Sumber : *Japan Industrial Standard Z 1707:1975*

2.2. Kasein

Susu memiliki kandungan 3,4% protein yang terbagi menjadi dua jenis yaitu kasein dan whey. Kandungan kasein dalam protein susu adalah 83%, kasein memiliki beberapa kelebihan yaitu sebagai protein utama dalam susu, tidak mahal, tidak beracun dan sangat stabil. Kasein terdiri dari sekitar 94% protein dan 6% senyawa dengan berat molekul rendah yang disebut koloid kalsium fosfat. *Film* yang dibuat dari kasein telah terbukti mempunyai kekuatan tarik tinggi sehingga dapat digunakan sebagai bahan pelapis (*film*) (Neha, Tarun and Ajay, 2012).



Protein dalam susu dapat dibagi dalam dua kategori yaitu protein tidak larut dari kelompok kasein dan protein terlarut (protein whey), yang dapat dijumpai dalam laktoserum. Kelompok kasein dari beberapa tipe yaitu α S1-, α S2, β -, K- and γ -. (Kusumaningtyas, 2013). Kasein terdiri dari α s1-kasein, α s2-kasein, β -kasein dan K-kasein. α s2-kasein banyak mengandung gugus fosfoseril, K-kasein punya satu gugus fosfoseril. β -kasein banyak mengandung gugus prolin yang banyak mempengaruhi struktur kasein (Manab dkk., 2017).

Protein akan mudah mengikat air ketika berada pada pH di atas atau di bawah titik isoelektrik. Kemampuan mengikat air pada protein akan menurun ketika berada pada pH mendekati titik isoelektrik. Titik isoelektrik kasein pada pH sekitar 4,6 – 4,7, pada pH tersebut kasein akan mengendap. pH isoelektrik jumlah muatan positif dan negatif protein seimbang sehingga mengakibatkan protein tidak dapat berinteraksi dengan air dan mengendap. Semakin tinggi nilai pH maka nilai kelarutan protein semakin tinggi menurunkan pengendapan. Semakin banyak penambahan kasein pada *edible film* maka kadar air semakin menurun (Lindriati, Praptiningsih dan Wijayanti, 2014).

Kasein merupakan golongan hidrokoloid yang dapat digunakan dalam pembuatan *edible film*. Kasein merupakan protein utama yang terkandung dalam susu. Protein ini memiliki sifat yang istimewa karena sukar terpecah oleh panas yang tinggi. Oleh karena keistimewaan tersebut, kasein sangat baik digunakan sebagai bahan pembuatan *edible film* (Maruddin dkk., 2017).



2.3. Kitosan

Kitosan merupakan produk deasetilasi dari kitin dengan cara pemanasan dalam larutan basa. Kitin merupakan biopolimer polisakrida $[(C_8H_{11}NO_4)_n]$ dengan rantai lurus yang tersusun dari 2000-3999 monomer (2-asetamida-2-deoksi- β -D-glukosa) yang terangkai dengan ikatan 1,4- β -glukosa) yang terangkai dengan ikatan 1,4- β -glikosida. Senyawa kitin ini bisa diubah menjadi kitosan dengan proses penghilangan mineral (demineralisasi) dan penghilangan protein (deproteinasi) merupakan proses penting dalam tahap perolehan kitin, yang selanjutnya dilakukan proses deasetilasi sehingga diperoleh kitosan. Biopolimer kitosan bersifat mudah terurai, tidak beracun dan mudah mengalami degradasi secara biologis (Nurhayati dan Agusman, 2011).

Selain dapat melindungi dan mencegah kontaminasi produk makanan, kitosan juga dapat mengadsorpsi unsur hara yang digunakan oleh bakteri dan mampu mengikat air yang menghambat sistem enzim beberapa bakteri. Dengan demikian, kitosan dapat memperpanjang umur simpan produk dan mengurangi pertumbuhan patogen pada permukaan makanan. Selain itu, *edible film* kitosan juga aman untuk digunakan karena proses pembuatannya hanya dengan pelarutan asam asetat encer (1%) (Nurhayati dan Agusman, 2011)

2.4. Titanium Dioksida (TiO_2)

Titanium dioksida (TiO_2) adalah material semikonduktor yang termasuk dalam satuan oksida logam. TiO_2 ditemukan pertama kali pada tahun 1821 dan tahun 1916 telah dikomersilkan sebagai zat pewarna putih. TiO_2 telah ditemukan lebih dari 200 tahun dan diteliti sejak tahun 85 lalu,



namun hingga kini penelitian tentang TiO_2 masih aktif untuk dikembangkan. TiO_2 memiliki massa jenis yang rendah, tahan karet, biokompatibilitas tinggi dengan tubuh sehingga dapat digunakan sebagai produk *implant*. Kristal TiO_2 bersifat asam dan tidak larut dalam air, asam klorida, asam sulfat encer dan alkohol namun larut dalam asam sulfat pekat dan asam fluoride.

TiO_2 memiliki 3 kristal polimorfik yaitu rutil (tetragonal), anatase (tetragonal) dan brookite (ortorombik) diantara ketiga bentuk kristal yang memiliki kemampuan fotokatalitik tinggi adalah anatase (Listanti, Taufiq, Hidayat dan Sunaryono 2018). Senyawa TiO_2 biasa digunakan sebagai pigmen pada cat tembok, tabir surya, pasta gigi, solar sel, sensor, perangkat memori serta sebagai fotokatalis (Maharani dkk., 2012). Fotokatalis TiO_2 dapat menjadi fotodegradasi yang baik untuk penetrasi limbah, seperti penumbuhan bakteri *Escherichia coli* melalui bantuan sinar fotokatalis yang telah berhasil dilakukan.

Toniatto *et al.*, (2017) mengembangkan PLA/ TiO_2 berstruktur nano dengan *electrospinning*, hasilnya tidak menunjukkan toksisitas terhadap sel mamalia dan memiliki aktivitas bakterisida dengan muatan TiO_2 yang lebih besar. Xing *et al.*, (2020) juga menyelidiki efek sifat antibakteri secara fisik dan *film* berbasis polietilen PE/ TiO_2 hasilnya menunjukkan nanopartikel TiO_2 memainkan peran penting dalam aktivitas antibakteri dari *film* PE/ TiO_2 lebih berdampak terhadap *staphylococcus aureus* penggunaan TiO_2 pada makanan dan obat serta kosmetik juga dilaporkan oleh American Food and drug ministration (FDA). Menurut FDA TiO_2 bersifat *nontoxic* ketika kontak dengan bahan yang berhubungan langsung dengan manusia.



2.5. Aktivitas Antimikroba

Pertumbuhan bakteri yang terdapat dalam makanan mengakibatkan berbagai pertumbuhan fisik maupun kimiawi yang tidak diinginkan, sehingga bahan pangan tersebut tidak layak untuk dikonsumsi. Keuntungan *edible film* antimikroba adalah agen penghambat yang dapat ditargetkan untuk menghambat kontaminan pada makanan, dengan tingkat difusi antimikroba dalam produk yang berasal dari bahan-bahan yang dimasukkan ke dalam *film*.

Mekanisme matinya bakteri adalah pengikatan muatan pada dinding sel yakni protein sehingga terjadi kerusakan dinding sel, akibatnya mengganggu pemasukan nutrisi yang akan masuk ke sel dan mengganggu DNA dan RNA, sehingga terjadi pemutusan dan kematian (Sulistyoningrum dkk., 2013)

Kriteria pembentukan zona hambat antibakteri ada lima kategori diantaranya : tidak ada zona hambat, diameter zona hambat ≤ 5 mm dikategorikan lemah, diameter zona hambat 5-10 mm dikategorikan sedang, diameter zona hambat 10-20 mm dikategorikan kuat dan diameter zona hambat ≥ 20 mm dikategorikan sangat kuat (Malinggas, Pangemanan dan Mariati, 2015)

2.6. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus dapat diisolasi dari berbagai pangan olahan asal hewan. Hal ini kemungkinan karena adanya pencemaran yang berasal dari lingkungan baik berasal dari hewan, manusia maupun alat-alat yang digunakan dalam proses pembuatan makanan. Kondisi penyimpanan makanan yang tidak sesuai kemungkinan besar menyebabkan terjadinya pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Penyakit-penyakit akibat keracunan pangan (*food-borne diseases*) merupakan masalah

utama yang berdampak pada kesehatan masyarakat. *Staphylococcus aureus* berpotensi menghasilkan berbagai jenis penyakit yang berbahaya bagi masyarakat salah satunya keracunan makanan.

Hasil penelitian ini, umumnya bakteri Gram positif lebih sensitif daripada bakteri Gram negatif terhadap efek antibakteri dari TiO₂ nanopartikel dan REO atau ekstrak tumbuhan. Aktivitas antimikroba TiO₂ nanopartikel terkait dengan rasio luas permukaan atau volume yang tinggi (Sani, Ehsani and Hashemi. 2017). Goy, Morais and Assis (2016) menjelaskan pengujian kitosan yang tidak dimodifikasi bekerja lebih kuat pada bakteri Gram negatif dari pada bakteri Gram positif. Efisiensi antibakteri yang lebih baik dikaitkan dengan karakteristik dinding sel bakteri, mengingat dinding sel bakteri Gram negatif lebih tipis dan akibatnya lebih rentan dibandingkan dengan sel bakteri Gram positif.

2.7. *Lactobacillus bulgaricus*

Lactobacillus pada umumnya mengfermentasi gula heksosa menghasilkan asam laktat. Anggota genus *Lactobacillus* tidak dapat bergerak, Gram positif berbentuk batang yang dapat dijumpai secara tunggal, berpasangan atau bentuk rantai. *Lactobacillus bulgaricus* merupakan bakteri probiotik Gram positif, dapat digolongkan dalam kategori bakteri homofermentatif, berbentuk batang. Bakteri ini hanya memproduksi asam laktat dalam fermentasi fakultatif anaerob. *Lactobacillus bulgaricus* termasuk bakteri mesofilik dengan kisaran suhu optimum 35-45°C pH 4-4,5. Asam laktat yang dihasilkan oleh *Lactobacillus bulgaricus* bersifat inhibitor bagi mikroba patogen sehingga memiliki kadar asam laktat yang tinggi dan tahan lebih lama.

Keberadaan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* tidak bersifat patogen dan aman bagi kesehatan manusia sehingga sering digunakan dalam industri pengawetan makanan, minuman dan berpotensi sebagai produk probiotik. Sifat yang menguntungkan dari *Lactobacillus bulgaricus* dalam bentuk probiotik adalah dapat digunakan untuk mendukung peningkatan kesehatan. Bakteri tersebut berperan sebagai flora normal dalam sistem pencernaan. Fungsinya adalah untuk menjaga keseimbangan asam dan basa sehingga pH dalam kolon konstan (Hardiningsih dkk., 2006). Bakteri Gram positif dapat dirusak oleh antimikroba yang bersifat kationik yang memiliki muatan positif seperti kitosan dengan cara merusak dinding sel bakteri (Damayanti dkk., 2016).

2.8. *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif, bersifat aerobik dan anaerobik fakultatif, terdapat secara normal dalam alat-alat pencernaan manusia dan hewan. Bakteri Gram negatif memiliki dinding sel setebal 3 nm terdapat membran luar yang merupakan halangan yang sangat efektif terhadap suatu bahan kimia yang bersifat hidrofobik seperti antibiotik dan senobiotik. Dinding sel bakteri Gram negatif lebih kompleks daripada bakteri Gram positif. Susunan dinding sel bakteri *Escherichia coli* yakni peptidoglikan, lipoprotein, membran luar, dan lapisan lipopolisakarida. Lipoprotein dapat menstabilkan membrane luar yang merupakan *double layer* fosfolipid dimana lapisan luar fosfolipid diganti oleh lipopolisakarida.

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki dinding sel tersusun dari peptidoglikan yang merupakan lipopolisakarida dan asam tekoat yang terdiri dari



alkohol dan fosfat. Membran sitoplasma mengandung protein dan fosfolipida. Adanya fosfat, protein, alkohol dan fosfolipida menyebabkan bakteri memiliki gugus hidrofilik yang cenderung bermuatan negatif dan lebih polar, walaupun dari sisi lain memiliki gugus hidrofobik. Gugus hidrofilik yang cenderung bermuatan negatif mendapat muatan positif pada kitosan. Sehingga kitosan dapat mengganggu metabolisme bakteri dengan melapisi permukaan sel bakteri, mencegah masuknya nutrisi ke dalam sel, berikatan dengan DNA kemudian menghambat RNA dan sintesis protein (Kusumawati dkk., 2017).

Bakteri Gram negatif *Escherichia coli* mengalami proses mekanisme pemblokiran aliran nutrisi oleh kitosan sebagai antimikroba yang akhirnya menyebabkan kematian sel, mekanisme ini menyebabkan kematian sel semakin cepat. Daya hambat antibakteri terhadap bakteri Gram negatif lebih besar pada antibakteri Gram positif disebabkan oleh dinding sel bakteri Gram negatif yang lebih tipis yang terdiri dari peptidoglikan 10% dan kandungan lipid tinggi (11-22%) (Damayanti dkk., 2016). Perubahan inaktivasi bakteri *Escherichia coli* pengaruh fotolisis dan fotokatalis TiO_2 (0,15 g/liter) dengan menggunakan sinar matahari dan sinar UV bahwa daya hambat bakteri terhadap metode fotokatalis lebih baik daripada daya hambat metode fotolisis (Naimah dan Ermawati, 2011).

2.9. *Salmonella sp.*

Salmonella sp. adalah jenis Gram negatif, berbentuk batang, bergerak serta mempunyai metabolisme yang bersifat fakultatif anaerob. Termasuk pada kelompok *Enterobacteriaceae*. Pembawa utama bakteri pada manusia

dapat menyebabkan gastroenteritis, demam, *thipus* dan diare. Bakteri ini sangatlah inaktif yaitu hanya dengan jumlah kurang dari 100 sel sudah cukup untuk menimbulkan penyakit (Purnomo dan Adiono, 2007).

Batasan maksimum cemaran *Salmonella sp.* adalah negatif 25/gram pada susu skim, susu bubuk, semua jenis keju, es krim, pudding matang, pudding dingin, whey bubuk, mentega, margarin, buah, sayuran, daging ayam segar, daging ayam beku, dendeng sapi, dendeng asap, daging olahan, sosis, ikan segar maupun ikan *fillet*, telur segar, telur asin dan lain sebagainya. *Salmonella sp.* berbentuk batang, motil kecuali *Salmonella gallinarum* dan *Salmonella pullorum* yang nonmotil, tidak berspora dan bersifat Gram negatif. Secara umum, bakteri Gram negatif lebih resisten daripada bakteri Gram positif karena adanya perbedaan respon adaptasi antara bakteri yang dipengaruhi oleh perbedaan struktur dan komposisi kimia membran sel (Manab dkk., 2017).

BAB III MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Gedung 4 Laboratorium Teknologi Hasil Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang. Waktu penelitian berlangsung selama 4 bulan yakni pada bulan Agustus – November 2020.

3.2. Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah *edible film* yang dibuat dari kasein-kitosan yang ditambah TiO_2 (Titanium dioksida) dengan level berbeda sesuai dengan perlakuan. Bahan yang digunakan antara lain kasein, kitosan, TiO_2 , bakteri *Lactobacillus bulgaricus*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang didapat dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang, media pertumbuhan bakteri MRS Agar, Salmonella-Shigella Agar, MacConkey Agar dan Nutrient Agar.

3.2.1. Bahan-bahan Penelitian

3.2.1.1. Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan *edible film* adalah kasein (OXOID), kitosan (Panadia), TiO_2 (Titanium dioksida), asam asetat 2% (CH_3COOH), gliserol (Merck), *beeswax* dan akuades.

3.2.1.2. Bahan-bahan yang digunakan dalam uji aktivitas antimikroba adalah *edible film* kasein-kitosan yang ditambah TiO_2 dengan level berbeda sesuai dengan perlakuan, akuades, pepton, media tumbuh bakteri MRS Agar (De Man, Rogosa, Sharpe) (GranuCult),



Salmonella-Shigella Agar (OXOID), MacConkey Agar (HiMedia), Nutrient Agar (OXOID) dan bakteri *Lactobacillus bulgaricus*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

3.2.2. Alat-alat Penelitian

3.2.2.1. Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan *edible film* adalah timbangan analitik, aluminium foil, gelas ukur (Pyrex), *beaker glass* (Pyrex), *magnetic stirrer*, *hot plate* (Ikamag Ret), termometer, *stopwatch*, *hand mixer* (BOSCH), saringan, pisau, kertas label, spatula dan cawan petri (Pyrex).

3.2.2.2. Alat-alat yang digunakan dalam uji aktivitas antimikroba adalah tabung reaksi (Pyrex), rak tabung, aluminium foil, kapas, kasa, autoklaf (Hirayama), benang kasur, kertas coklat/payung, *beaker glass* (Pyrex), timbangan analitik (Mettler Toledo), *hot plate*, *magnetic stirrer*, erlenmeyer (Pyrex), cawan petri (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), mikropipet, kertas label, *latex*, incubator (Memmert), waterbath (Memmert WNB 45), *bunsen*, korek api, batang L, *ose* bulat dan jangka sorong.

3.3. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode percobaan laboratorium dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) (Adinugraha dan Wijyaningrum, 2017). Perlakuan yang diberikan dalam penelitian ini adalah 4 perlakuan dengan 3 kali ulangan. Model tabulasi data penelitian disajikan pada Tabel 2. Perlakuan penelitian terdiri dari P1 *edible film* kasein-kitosan, P2 *edible film* kasein-



kitosan yang ditambah TiO₂ 1%, P3 *edible film* kasein-kitosan yang ditambah TiO₂ 3% dan P4 *edible film* kasein-kitosan yang ditambah TiO₂ 5%.

Tabel 2. Model Tabulasi Data Penelitian

Perlakuan	Ulangan		
	U1	U2	U3
P1	P1U1	P1U2	P1U3
P2	P2U1	P2U2	P2U3
P3	P3U1	P3U2	P3U3
P4	P4U1	P4U2	P4U3

3.4. Prosedur Pembuatan *Edible film*

Prosedur pembuatan *edible film* ini mengacu pada Purbasari, Wulandari dan Marasabessy (2020) dan Kustiningsih *et al.*, (2019) dengan memodifikasi bahan yang digunakan dan proses pembuatan. Penelitian ini menggunakan kasein-kitosan untuk menggantikan tepung kulit pisang, HCl (asam klorida) diganti dengan asam asetat 2% (CH₃COOH). Pembuatan *edible film* kasein-kitosan dengan perbandingan 1:3, yakni kasein 1 dan kitosan 3. Proses pembuatan *edible film* dilakukan dengan melarutkan kitosan menggunakan asam asetat 2% dengan perbandingan 2 : 100 (gram kitosan : ml asam asetat 2%) dan melarutkan kasein menggunakan akuades dengan perbandingan 2,5 : 100 (gram kasein : ml akuades). Pertama larutan kitosan dipanaskan selama 60 menit sedangkan larutan kasein dipanaskan selama 30 menit dengan suhu ≤ 50°C. Larutan kitosan dan larutan kasein masing-masing dipanaskan selama 30 menit dengan suhu ≤ 50°C, selama proses pemanasan ke-dua ditambahkan gliserol 0,28% pada masing-masing larutan. Homogenisasi larutan kitosan



dan larutan kasein selama 60 menit dengan suhu $\leq 60^{\circ}\text{C}$, selama proses pemanasan ke-tiga ditambahkan *beeswax* cair 0,5% ke dalam larutan. Larutan di *handmixer* selama 10 menit. TiO_2 1% (Titanium dioksida) dilarutkan menggunakan akuades dengan perbandingan 1 : 100 (gram TiO_2 : ml akuades). Larutan kasein-kitosan dan larutan TiO_2 diukur sesuai perlakuan kemudian dihomogenisasi selama 10 menit kemudian diukur sebanyak 25 ml dan dicetak pada cawan petri. Larutan *edible film* dalam cawan petri diinkubasi pada suhu ruang selama 14 hari. Diagram alir pembuatan *edible film* disajikan dalam Gambar 2.



Dilarutkan kitosan dengan asam asetat 2% dengan perbandingan 2 : 100 (g kitosan : ml asam asetat 2%), pada suhu $\leq 50^{\circ}\text{C}$ selama 60 menit.

Dilarutkan kasein dengan akuades perbandingan 2,5 : 100 (g kasein : ml akuades), pada suhu $\leq 50^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit.

Dilarutkan TiO_2 1% menggunakan akuades dengan perbandingan 1 : 100 (g TiO_2 : ml akuades), selama 10 menit.

Dipanasakan masing-masing larutan pada suhu $\leq 50^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit dan ditambahkan gliserol 0,28%

Dicampur ke dua larutan kitosan-kasein pada suhu $\leq 60^{\circ}\text{C}$ selama 60 menit, dan ditambahkan *beeswax* cair 0,5%.

Dihomogenkan larutan dengan *handmixer* selama 10 menit.

Ditunggu larutan kasein-kitosan hingga busa menghilang, kemudian disaring

Dicampurkan larutan kasein-kitosan dan larutan TiO_2 diukur sesuai perlakuan kemudian di homogenisasi selama 10 menit.

Diukur sebanyak 25 ml dan dicetak pada cawan petri, diinkubasi pada suhu ruang selama 14 hari.

Edible film dari kasein-kitosan yang ditambah TiO_2 dengan level berbeda

Gambar 2. Diagram alir pembuatan *edible film*



3.5. Variabel Penelitian

Variabel yang diamati adalah aktivitas antimikroba *edible film* kasein-kitosan yang ditambah TiO_2 dengan level berbeda terhadap bakteri *Lactobacillus bulgaricus*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. Pengujian aktivitas antimikroba *edible film* terhadap pertumbuhan bakteri menggunakan metode difusi agar (Apriliyani *et al.*, 2020) dengan sedikit perubahan sebagaimana terlampir dalam Lampiran 1. Penyiapan media pertumbuhan bakteri dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.6. Analisis Statistik

Data yang diperoleh ditabulasi, kemudian *Analysis of Variance* (ANOVA) digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan terhadap variabel yang diamati. *Analysis of Variance* berdasarkan Sudarwati, Natsir dan Nurgiantiningsih (2019) menyatakan bahwa jika terdapat perbedaan nyata atau sangat nyata perlakuan terhadap variabel yang diamati, maka akan dilakukan uji lanjutan dengan menggunakan Uji Jarak Berganda Duncan (UJBD).

3.7. Batasan Istilah

Aktivitas Antimikroba : Kemampuan suatu bahan yang bisa menyebabkan kematian atau terhambatnya pertumbuhan suatu mikroba.

Bakteri Gram Positif : Bakteri yang mempertahankan zat warna kristal violet pada saat pewarnaan Gram, sehingga akan berwarna ungu saat dilihat dengan mikroskop.

Bakteri Gram Negatif : Bakteri yang berwarna merah sewaktu proses pewarnaan Gram.

Edible film : Lapisan tipis yang terbuat dari beberapa bahan yang dapat dimakan dan dapat digunakan untuk melapisi bahan pangan sehingga memperpanjang masa simpan suatu bahan pangan atau produk olahan.

Kasein : Salah satu protein yang berada dalam susu, jumlahnya mendominasi sekitar 83% dari jumlah total.

Kitosan : Produk deasetilasi dari kitin dengan cara pemanasan dalam larutan basa.

TiO₂ (Titanium dioksida) : Logam oksida, tidak beracun, memiliki sifat fotokatalitik dan keberadaannya mudah didapatkan. TiO₂ memiliki aktivitas antimikroba pada berbagai organisme termasuk bakteri, jamur dan sel kanker.

Peptidoglikan : Salah satu komponen dinding sel bakteri yang merupakan polisakarida yang terdiri dari dua gula turunan yaitu asam-N-asetil glukosamin serta asam N-asetilmuramat yang dihubungkan oleh ikatan β -1,4 dan sebuah rantai peptida pendek.

Zona Hambat : Tempat bakteri terhambat pertumbuhannya akibat antimikroba.



BAB VI HASIL DAN PEMBAHASAN

Data analisis ragam dan Uji Jarak Berganda Duncan (UJBH) terhadap aktivitas antimikroba *edible film* kasein-kitosan yang ditambah TiO₂ dengan level berbeda pada setiap perlakuan terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* dan *Lactobacillus bulgaricus* terdapat pada Lampiran 3, 4, 5 dan 6. Rata-rata diameter zona hambat *edible film* kasein-kitosan yang ditambah TiO₂ dengan level berbeda dan hasil Uji Jarak Berganda Duncan (UJBD) terdapat pada Tabel 3.

Tabel 3. Rata-rata diameter zona hambat *edible film* kasein-kitosan yang ditambah TiO₂ dengan level berbeda terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* dan *Lactobacillus bulgaricus*.

Perlakuan	Diameter Zona Hambat (mm)			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
Level 0% TiO ₂	21,49±1,14	14,00±0,41 ^a	16,52±0,53	16,77±0,56
Level 1% TiO ₂	20,85±0,25	14,01±0,20 ^a	15,84±0,49	16,53±0,03
Level 3% TiO ₂	20,61±0,60	14,63±0,36 ^a	16,14±0,64	17,59±0,48
Level 5% TiO ₂	21,95±0,67	16,09±0,42 ^b	17,12±1,01	17,89±0,89

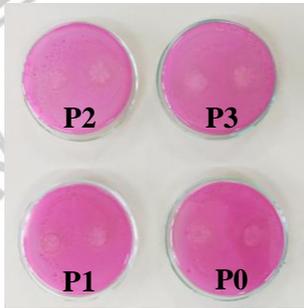


Keterangan : ^{a,b} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$) pada *Staphylococcus aureus*.

4.1. Aktivitas Antimikroba *Edible film* terhadap Bakteri *Escherichia coli*

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa penambahan TiO_2 dengan level berbeda pada pembuatan *edible film* kasein-kitosan setiap perlakuan menghasilkan perbedaan tidak nyata pada ($P > 0,05$) terhadap diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri yang terbentuk rata-rata memeningkat dari perlakuan *edible film* ditambah 0% TiO_2 sampai perlakuan *edible film* ditambah 5% TiO_2 , hal ini diduga karena jumlah pemberian level TiO_2 juga berpengaruh terhadap zona hambat aktivitas antimikroba *edible film* yang terbentuk. Arezoo *et al.*, (2019) menjelaskan *film* pati sagu dengan penambahan konsentrasi TiO_2 berbeda menunjukkan zona hambat aktivitas antibakteri pada pertumbuhan bakteri *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus*. Zona hambat *film* pati sagu yang diberikan TiO_2 level 0%, 1%, 3% dan 5% menunjukkan hasil signifikan peningkatannya terhadap aktivitas antibakteri pada penambahan TiO_2 terbesar, efek yang diberikan dari *film* lebih baik pada bakteri Gram positif daripada bakteri Gram negatif.





Gambar 3. Diameter zona hambat *edible film* pada pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*

Tabel 3 menunjukkan bahwa diameter zona hambat *edible film* terhadap bakteri *Escherichia coli* relatif lebih tinggi dibandingkan dengan diameter zona hambat *edible film* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* dan *Lactobacillus bulgaricus*. Diameter zona hambat *edible film* pada pertumbuhan *Escherichia coli* secara lebih jelas dapat dilihat pada Gambar 3. Hal ini diduga karena *Escherichia coli* merupakan bakteri Gram negatif. Dinding sel bakteri Gram negatif lebih tipis dan mudah mengalami kerusakan daripada bakteri Gram positif, fungsi dari dinding sel adalah untuk mempertahankan keutuhan sel sehingga tidak mudah rusak. Mekanisme kitosan dan TiO_2 dalam menghambat pertumbuhan bakteri yakni dengan merusak struktur membran atau dinding sel bakteri, sehingga mengakibatkan kerusakan dan bakteri mengalami kematian. Goy *et al.*, (2016) menjelaskan pengujian kitosan yang tidak dimodifikasi bekerja lebih kuat pada bakteri Gram negatif dari pada bakteri Gram positif. Efisiensi antibakteri yang lebih baik dikaitkan dengan karakteristik dinding sel bakteri, mengingat dinding sel

bakteri Gram negatif lebih tipis dan akibatnya lebih rentan dibandingkan dengan sel bakteri Gram positif.

4.2. Aktivitas Antimikroba *Edible film* terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa penambahan TiO_2 dengan level berbeda pada pembuatan *edible film* kasein- kitosan setiap perlakuan menghasilkan perbedaan yang sangat nyata pada ($P < 0,01$) terhadap diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Perbedaan yang sangat nyata ini karena kitosan berperan meningkatkan aktivitas antimikroba *edible film* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* sehingga bakteri tersebut tidak dapat tumbuh disekitar *edible film*. Gugus amino muatan positif dari kitosan yang berinteraksi dengan sel bakteri bermuatan negatif pada permukaan sel bakteri *Staphylococcus aureus* yang merupakan bakteri Gram positif, sehingga menyebabkan bakteri mudah lisis, kerusakan protein dan integrasi membran sel rusak. Kusumawati dkk., (2017) menjelaskan kitosan bersifat kationik, gugus amino muatan positif dari gugus NH_3^+ pada kitosan dapat berinteraksi dengan muatan negatif pada permukaan sel bakteri, yaitu asam tekoat pada bakteri Gram positif yang menyebabkan terganggunya pembentukan peptidoglikan sehingga sel tidak mempunyai selubung yang kokoh dan mudah mengalami lisis, menjadikan aktivitas metabolisme akan terhambat pada akhirnya menyebabkan kematian sel bakteri.

Keberadaan TiO_2 dalam *edible film* juga meningkatkan kemampuan untuk membunuh bakteri *Staphylococcus aureus* integrasi membran sel rusak sehingga organ di dalam sel bakteri keluar karena ketidak setimbangan tekanan lingkungan

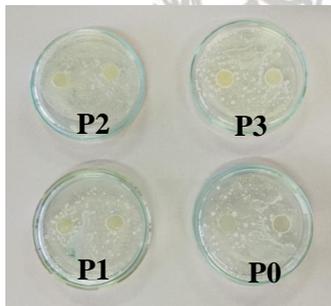


dan tekanan di dalam sel bakteri. Kustiningsih *et al.*, (2019) menjelaskan kelangsungan hidup bakteri *Staphylococcus aureus* secara signifikan terganggu karena penambahan nanopartikel. TiO₂ mampu membunuh bakteri seluruhnya karena muatan positif dari kitosan-TiO₂ berinteraksi dengan membran bakteri lipid bermuatan negatif yang mempengaruhi permeabilitas sel bakteri, menghalangi pertumbuhan kelangsungan hidup sel bakteri sehingga menyebabkan kematian sel. Mikroba biologis dibunuh oleh berbagai reaktif spesies seperti radikal hidroksil, hydrogen peroksida atau superoksida yang dihasilkan dalam proses fotokatalik TiO₂ nanopartikel.

Uji Jarak Berganda Duncan (UJBD) menunjukkan bahwa ada perbedaan yang sangat nyata pada diameter zona hambat *edible film* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* pada perlakuan *edible film* ditambah 0% TiO₂, *edible film* ditambah 1% TiO₂, *edible film* ditambah 3% TiO₂ dengan *edible film* ditambah 5% TiO₂. Hal ini terlihat dari notasi yang ada pada setiap perlakuan, hasil notasi dari ke-4 perlakuan menunjukkan bahwa nilai *edible film* ditambah 0% TiO₂, *edible film* ditambah 1% TiO₂ dan *edible film* ditambah 3% TiO₂ sangat berbeda nyata dengan *edible film* ditambah 5% TiO₂. Hal ini terjadi karena kitosan dan TiO₂ dapat menghambat nutrisi dari luar untuk masuk ke dalam sel bakteri, sehingga bakteri kekurangan nutrisi untuk berkembangbiak. Semakin tinggi jumlah penambahan TiO₂ yang diberikan, aktivitas antimikroba pada *edible film* semakin meningkat. Kumar *et al.*, (2020) menjelaskan ukuran partikel nano mempengaruhi pembangkitan oksigen radikal dari luar dan aktivitas antimikroba. Struktur nano lebih kecil sehingga dapat mudah menembus membran sel dan



penghalang biologis lainnya. Jumlah serapan menurun dengan bertambahnya ukuran partikel, pelepasan ion logam dari nanomaterial dapat bereaksi dengan molekul oksigen dan menghasilkan superoksida yang memberikan efek antimikroba.



Gambar 4. Diameter zona hambat *edible film* pada pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

Rata-rata diameter zona hambat pada Tabel 3 menunjukkan bahwa *Staphylococcus aureus* adalah bakteri yang paling resisten dibandingkan bakteri lain yang digunakan dalam penelitian, ditandai dengan diameter zona hambat *edible film* terhadap *Staphylococcus aureus* relatif lebih sempit dibandingkan dengan diameter zona hambat *edible film* terhadap *Salmonella sp.* dan *Escherichia coli*. Perbedaan diameter zona hambat *edible film* pada pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara lebih jelas dapat dilihat pada Gambar 4. Hal ini diduga karena *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif sedangkan *Escherichia coli* dan *Salmonella sp.* merupakan bakteri Gram negatif. Kitosan dan TiO_2 dapat membunuh bakteri dengan interaksi membran sel bakteri bermuatan negatif dengan gugus amina bermuatan

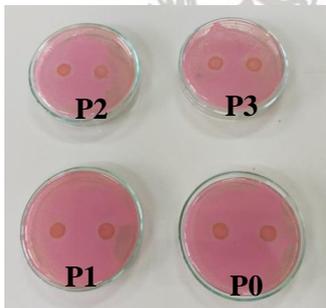
positif pada kitosan dapat mengubah penghalang membran sifat yang menyebabkan kebocoran isi intraseluler dan akhirnya mengalami kematian sel. Bakteri Gram positif memiliki susunan dinding sel yang tebal dari peptidoglikan, berfungsi memberi struktural yang kuat pada bakteri sehingga lebih sukar untuk dirusak. Damayanti dkk., (2016) menjelaskan bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif yang memiliki 30-40 lapisan peptidoglikan, pada kitosan yang bermuatan positif dapat terikat dan menyebabkan distorsi serta pemecahan dinding sel bakteri. Kitosan lebih mudah merusak bakteri Gram negatif daripada bakteri Gram positif, karena bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang tebal terdiri dari 50% peptidoglikan dan 1-4% kandungan lipid.

4.3. Aktivitas Antimikroba *Edible film* terhadap Bakteri *Salmonella sp.*

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa penambahan TiO_2 dengan level berbeda pada pembuatan *edible film* kasein-kitosan setiap perlakuan menghasilkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$) terhadap diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Salmonella sp.* Hemegs (2017) menjelaskan bahwa didalam sel bakteri terjadi pelepasan protein intraseluler nanomaterial antibakteri dapat mengikat secara elektrostatis dengan dinding sel bakteri untuk mengubah potensi membran yang menyebabkan kerusakan membran dan akibatnya gangguan respirasi, ketidak seimbangan transportasi, gangguan transduksi energi dan lisis sel yang pada akhirnya dapat menyebabkan kematian dinding sel, gugus NH_4^+ yang terdapat didalam struktur kitosan dapat mempengaruhi kestabilan elektrik struktur sel bakteri seperti dinding sel dan



sel membran yang terdapat didalam permukaan sel bakteri. Hal tersebut dapat mengubah permeabilitas sel dan menghasilkan kerusakan pada jaringan pengangkut pada sel bagian dalam atau dengan kata lain dapat mengakibatkan terjadinya kebocoran pada biomaterial



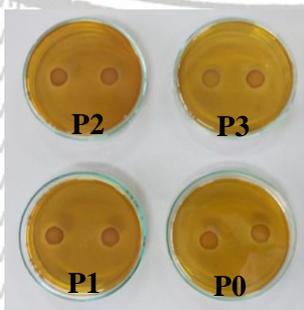
Gambar 5. Diameter zona hambat *edible film* pada pertumbuhan bakteri *Salmonella sp.*

Rata-rata diameter zona hambat *edible film* terhadap bakteri *Salmonella sp.* pada Tabel 3 menunjukkan bahwa TiO_2 dan kitosan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella sp.* karena diameter awal dari *edible film* yang digunakan untuk pengujian adalah 10 mm, sedangkan pada Tabel 3 terlihat bahwa diameter zona hambat *edible film* pada bakteri *Salmonella sp.* adalah lebih dari 10 mm. Diameter zona hambat *edible film* pada pertumbuhan *Salmonella sp.* secara lebih jelas dapat dilihat pada Gambar 5. Hal ini menunjukkan bahwa *edible film* memiliki aktivitas antimikroba pada bakteri *Salmonella sp.* yang ditandai dengan terbentuknya zona hambat. Kitosan dan TiO_2 berhasil menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella sp.* sehingga bakteri tersebut tidak dapat tumbuh disekitar *edible film*. Xing *et al.*, (2020) menjelaskan

mekanisme aktivitas bakterisida kitosan disebabkan oleh gugus amino dalam struktur molekul berpegang pada membran sel melalui gaya elektrostatis, menyebabkan kitosan mengganggu membran luar bakteri. Selain itu, TiO_2 selanjutnya mengganggu penghalang sifat membran luar bakteri melalui oksigen luar yang dapat merusak bakteri secara permanen, serta radikal oksigen yang dihasilkan juga menyerang membran DNA, RNA dan lipid pada akhirnya menyebabkan kematian bakteri.

4.4. Aktivitas Antimikroba *Edible film* terhadap Bakteri *Lactobacillus bulgaricus*

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa penambahan TiO_2 dengan level berbeda pada pembuatan *edible film* kasein-kitosan setiap perlakuan menghasilkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$) terhadap diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Lactobacillus bulgaricus*.



Gambar 6. Diameter zona hambat *edible film* pada pertumbuhan bakteri *Lactobacillus bulgaricus*

Rata-rata diameter zona hambat *edible film* terhadap bakteri *Lactobacillus bulgaricus* pada Tabel 3 menunjukkan bahwa TiO₂ dan kitosan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Lactobacillus bulgaricus*. Diameter zona hambat paling tinggi adalah pada perlakuan *edible film* ditambah 5% TiO₂ yaitu 17,89 mm sedangkan diameter zona hambat paling sempit adalah perlakuan *edible film* ditambah 1% TiO₂ yaitu 16,53 mm dengan penambahan larutan TiO₂ sebesar 1% pada larutan *edible film* kasein-kitosan. Diameter zona hambat *edible film* pada pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus* secara lebih jelas dapat dilihat pada Gambar 6. Hasil ini menunjukkan tidak jauh berbeda dengan diameter zona hambat aktivitas antimikroba bakteri *Staphylococcus aureus*, diduga karena keduanya merupakan bakteri Gram positif. Gohargani *et al.*, (2010) menjelaskan secara keseluruhan *film* komposit menunjukkan penghambat mikroba yang lebih rendah melawan bakteri Gram negatif daripada melawan bakteri Gram positif, disebabkan oleh perbedaan struktural sel dinding bakteri, bakteri Gram negatif memiliki dinding sel yang lebih kompleks dibandingkan dengan dinding sel bakteri Gram positif. Beberapa penelitian juga menunjukkan hasil bahwa aktivitas antimikroba yang tinggi adalah dari bakteri Gram positif dibandingkan dengan bakteri Gram negatif.

Rata-rata diameter zona hambat pada *edible film* kasein-kitosan ditambah TiO₂ dengan level berbeda terhadap *Escherichia coli* 21,23 mm, *Staphylococcus aureus* 14,68 mm, *Salmonella sp.* 16,41 mm dan *Lactobacillus bulgaricus* 17,20 mm. Malinggas dkk., (2015) menjelaskan bahwa terdapat lima kriteria kekuatan efek antibakteri berdasarkan diameter zona hambat yakni : tidak ada zona hambat, diameter zona hambat ≤ 5 mm dikategorikan lemah, diameter zona hambat 5-10 mm



dikategorikan sedang, diameter zona hambat 10-20 mm dikategorikan kuat dan diameter zona hambat ≥ 20 mm dikategorikan sangat kuat. Berdasarkan kategori tersebut, diameter zona hambat pertumbuhan *Escherichia coli* yang terbentuk di sekitar *edible film* dapat dikategorikan sangat kuat dan diameter zona hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* dan *Lactobacillus bulgaricus* yang terbentuk di sekitar *edible film* dapat dikategorikan kuat.



BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pembuatan *edible film* kasein-kitosan yang ditambah TiO_2 dengan level berbeda menghasilkan perlakuan terbaik adalah *edible film* kasein-kitosan : TiO_2 5% dengan rata-rata diameter zona hambat pada pertumbuhan *Escherichia coli* 21,95 mm, *Staphylococcus aureus* 16,09 mm, *Salmonella sp.* 17,12 mm dan *Lactobacillus bulgaricus* 17,89 mm.

5.2. Saran

Disarankan untuk membuat *edible film* kasein-kitosan dengan level penambahan TiO_2 5%. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai uji daya umur simpan untuk *edible film* dan penerapan *edible film* pada produk olahan maupun bahan pangan segar bidang peternakan seperti sosis, keju, bakso, karkas, daging dan telur.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinugraha. B. S. dan T. N. Wijyaningrum. 2017. Rancangan Acak Lengkap dan Rancangan Acak Kelompok pada Bibit Ikan. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Muhammadiyah Semarang. ISBN : 978-602-61599-6-0. 47-56.
- Apriliyani. M. W., Purwadi., A. Manab., B. M. Ahmad. and L. M. Uula. 2019. Physico-chemical and antimicrobial properties of caseinchitosan *edible films* as food quality and food safety. *Earth and Environmental Science*. 443 : 1-10.
- Arezoo. E., E. M. Reza., M. Maryam. dan M. N. Abdorreza. 2019. The synergistic effects of cinnamon essential oil and nano TiO₂ on antimicrobial and functional properties of sago starch *films*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1-9.
- Bonnaillie. L. M., H. Zhang., S. Akkurt., K. L. Yam. and P. M. Tomasula. 2014. Casein Films: The Effects of Formulation, Environmental Conditions and the Addition of Citric Pectin on the Structure and Mechanical Properties. *Polymers*. 6 : 2018-2036.
- Cagri. A., Z. Ustunol. and E. T. Ryser. 2004. Antimicrobial *Edible films* and Coatings. *Journal of Food Protection*. 67 (4) : 833-848.
- Coniwanti. P., D. Pertiwi. dan D. M. Pratiwi. 2014. Pengaruh Peningkatan Konsentrasi Gliserol dan VCO (*Virgin Coconut Oil*) Terhadap Karakteristik *Edible film* dari Tepung Aren. *Teknik Kimia*. 2 (20) : 17-24.



- Damayanti, W., E. Rochima. dan Z. Hasan. 2016. Aplikasi Kitosan sebagai Antibakteri pada Filet Patin selama Penyimpanan Suhu Rendah. *JPHPI*. 19 (3) : 321-328.
- Dwimayasanti. R. 2016. Pemanfaatan Karagenan sebagai *Edible film*. *Osema*. 12 (2) : 8-13.
- Gohargani. M., H. Lashkari. and A. Shirazinejad. 2020. Study on Biodegradable Chitosan-Whey Protein-Based *Film* Containing Bionanocomposite TiO_2 and *Zataria multiflora* Essential Oil. *Journal of Food Quality*. 1-11.
- Goy. R. C., S. T. B. Morais. and O. B. G. Assis. 2016. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 26 : 122–127.
- Hardiningsih. R., R. N. R. Napitupulu. dan T. Yulinery. 2006. Isolasi dan Uji Resistensi Beberapa Isolat *Lactobacillus* pada pH Rendah. *BIODIVERSITAS*. 7 (1) : 15-17.
- Hemeg. H. A. 2017. Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. *International Journal of Nanomedicine*. 12 : 8211–8225.
- Kumar. S., A. Mukherjee. dan J. Dutta. 2020. Chitosan based nanocomposite *films* and coatings: Emerging antimicrobial food packaging alternatives. *Trends in Food Science & Technology*. 97 : 196–209.
- Kustiningsih I., A. Ridwan., D. Abriyani., M. Syairazy., T. Kurniawan. and D. R. Barleany. 2019. Development of Chitosan- TiO_2 Nanocomposite for Packaging *Film* and its Ability to Inactivate *Staphylococcus aureus*. *Oriental Journal Of Chemistry*. 35 (3) : 1132-1137.



- Kusumaningtyas, E. 2013. Peran Peptida Susu sebagai Antimikroba untuk Meningkatkan Kesehatan. *WARTAZOA*. 23 (2) : 63-75.
- Kusumawati, D. H. dan W. D. R. Putri. 2013. Karakteristik Fisik dan Kimia *Edible film* Pati Jagung yang Diinkorporasi dengan Perasan Temu Hitam. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 1 (1) : 90-100.
- Kusumawati, E., Supomo dan Libiyah. 2017. Uji Daya Antibakteri pada Sediaan *Hand Sanitizer* Kitosan Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *PolhaSains Jurnal Sains dan Terapan Politeknik Hasnur*. 05 (1) : 1-8.
- Lindriati, T., Y. Praptiningsih, dan D. F. Wijayanti. 2014. Karakteristik Fisis Gel *Edible film* yang Dibuat dengan Variasi pH dan Rasio Kasein dan Tapioka. *Jurnal Ilmu Dasar*. 15 (1) : 51-58.
- Listanti, A., A. Taufiq., A. Hidayat, dan S. Sunaryono. 2018. Investigasi Struktur dan Energi Band Gap Partikel Nano TiO₂ Hasil Sintesis Menggunakan Metode Sol-Gel. *Journal of Physical Science and Engineering*. 3 (1) : 8-15.
- Luo, Z., Y. Qin, and Q. Ye. 2015. Effect of nano-TiO₂-LDPE packaging on microbiological and physicochemical quality of Pacific white shrimp during chilled storage. *International Journal of Food Science and Technology*. 50 : 1567-1573.
- Maharani, D. K., S. E. Cahyaningrum., Amaria, dan Rusmini. 2012. Preparasi dan Karakterisasi Nano Komposit Kitosan-Silika dan Kitosan-Silika Titania. *Jurnal Manusia dan Lingkungan*. 19 (1) : 52-55.



- Malinggas, F., D. H. C. Pangemanan, dan N. W. Mariati. 2015. Uji Daya Hambat Ekstrak Buah Mengkudu (*M. Citrifolia*, L) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus Mutans* Secara In Vitro. *PHARMACON Jurnal Ilmiah Farmasi*. 4 (4) : 22-26.
- Manab, A., M. E. Sawitri, dan K. U. Al Awwaly. 2017. *Edible film* Protein Whey Penambahan Lisozim Telur dan Aplikasi di Keju. UB Press. Malang. ISBN : 978-602-432-183-3.
- Maruddin, F., A. Ako., Hajrawati, dan M. Taufik. 2017. Karakteristik *Edible film* Berbahan Whey dan Kasein yang Menggunakan Jenis Plasticizer Berbeda. *JITP*. 5 (2) : 97-101.
- Naimah, S. dan R. Ernawati. 2011. Efek Fotokatalis Nano TiO₂ terhadap Mekanisme Antimikroba. *Jurnal Riset Industri*. 5 (2) : 113-120.
- Neha, A., G. Tarun, and B. Ajay. 2012. Review on Casein Production and Casein Based Nano-Formulations. *International Reswarch Journal of Pharmacy*. 3 (1) : 41-45.
- Ngajow, M., J. Abidjulu, dan V. S. Kamu, 2013. Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* secara *In vitro*. *Jurnal MIPA Unsrat Online*. 2 (2) : 128-132.
- Nurhayati, dan Agusman. 2011. *Edible film* Kitosan dari Limbah Udang sebagai Pengemas Pangan Ramah Lingkungan. *Squalen*. 6 (1) : 38-44.
- Purbasari, A., A. A. Wulandari, dan F. M. Marasabessy. 2020. Sifat Mekanis dan Fisis Bioplastik dari Limbah Kulit Pisang ; Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Pemlastis. *Jurnal Kimia dan Kemasan*. 42 (2) : 66-73.



Purnomo. H. dan Adiono. 2007. Ilmu Pangan. Terjemahan dari Food Science oleh Buckle K. A., R. A. Edward., G. H. Flet. and M. Wooton. 1987. UI Press. Jakarta. ISBN : 979-803-409-0.

Sani, M. A., A. Ehsani. dan M. Hashemi. 2017. Whey protein isolate/cellulose nanofibre/TiO₂ nanoparticle/rosemary essential oil nanocomposite *film* : Its effect on microbial and sensory quality of lamb meat and growth of common foodborne pathogenic bacteria during refrigeration. *International Journal of Food Microbiology*. (17) : 1-28.

Standar Nasional Indonesia (SNI). 2009. SNI 7388:2009. Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Pangan. Diakses pada tanggal 1 Desember 2020.

Sudarwati. H., M. H. Natsir. dan V. M. A. Nurgartiningih. 2019. Statistika dan Rancangan Percobaan Penerapan dalam Bidang Peternakan. UB Press. Malang. ISBN : 978-602-432-641-8.

Sulistiyoningrum, R. S., J. Suprijanto, dan A. Sabdono. 2013. Aktivitas Anti Bakteri Kitosan dari Cangkang Kerang Simping pada Kondisi Lingkungan yang Berbeda : Kajian Pemanfaatan Limbah Kerang Simping (*Amusium Sp.*). *Journal of Marine Research*. 2 (4) : 111-117.

Tamimi. S. M., D. Agustina. dan C. Komariah. 2017. Daya Antibakteri Kombinasi Kitosan Cangkang Udang Putih (*Litopenaeus vannamei*) dan Siprofloksasin terhadap *Salmonella typhi*. *e-Jurnal Pustaka Kesehatan*. 5 (2) : 311-315.

Thohari. I., Mustakim., M. C. Padaga. dan P. P. Rahayu. 2017. Teknologi Hasil Ternak. UB Press. Malang. ISBN : 978-602-432-271-7.



- Toniatto, T. V., B. V. M. Rodrigues., T. C. O. Marsi., R. Ricci., F. R. Marciano., T. J. Webster. and A. O. Lobo. 2017. Nanostructured Poly (Lactic Acid) Electrospun Fiber with High Loadings of TiO₂ Nanoparticles: Insights into Bactericidal Activity and Cell Viability. *J. Materials Science and Engineer.* 71 : 381–385.
- Xing, Y., H. Yang., X. Guo., X. Bi., X. Liu., Q. Xu., Q. Wang., W. Li., X. Li., Y. Shui., C. Chenc. and Y. Zheng. 2020. Effect of chitosan/Nano-TiO₂ composite coatings on the postharvest quality and physicochemical characteristics of mango fruits. *Scientia Horticulturae.* 263 : 1-7.
- Yulianti, R. dan E. Ginting. 2012. Perbedaan Karakteristik Fisik *Edible film* dari Umbi-umbian yang Dibuat dengan Penambahan *Plasticizer*. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan.* 31 (2) : 131-136.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Prosedur uji aktivitas antimikroba *edible film* menurut Apriliyani *et al.*, (2020) adalah sebagai berikut:

1. Disiapkan media agar selektif untuk pertumbuhan masing-masing bakteri.
2. Sterilisasi alat dan media agar selektif dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1,5 atm selama 15 menit.
3. Dituang media agar ke dalam cawan petri sebanyak 15 ml, ditunggu hingga memadat.
4. Diinokulasikan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* dan *Lactobacillus bulgaricus* kedalam masing-masing cawan petri yang sudah berisi media agar sebanyak 0,1 ml yang mengandung bakteri sebanyak 10^5 CFU/ml dengan metode *spread plate*.
5. Diletakkan *edible film* berbentuk lembaran bulat dengan diameter 10 mm dipermukaan media agar yang telah diinokulasikan bakteri.
6. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
7. Diukur zona hambat dengan mengukur diameter zona bening (termasuk diameter *edible film*) menggunakan jangka sorong.

Lampiran 2. Penyiapan media tumbuh bakteri untuk uji aktivitas antimikroba *edible film* dan penghitungan jumlah total koloni bakteri adalah sebagai berikut:

a. Media MRS Agar (De Man, Rogosa, Sharpe) (GranuCult) untuk *Lactobacillus bulgaricus*

1. 13,02 g MRS Agar dilarutkan ke dalam 210 ml akuades
2. Dididihkan hingga larut
3. Disterilkan dengan autoklaf 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1,5 atm.

b. Media Salmonella-Shigella Agar (SS Agar) (OXOID, 2006) untuk *Salmonella sp.* :

1. 13,23 g SS Agar dilarutkan dalam 210 ml akuades
2. Dididihkan hingga larut
3. Diturunkan suhu hingga 50°C.
4. Tidak perlu diautoklaf

c. Media Nutrient Agar (NA) (OXOID, 2006) untuk *Staphylococcus aureus*

1. 5,88 g NA dilarutkan ke dalam 210 ml akuades
2. Dididihkan hingga larut
3. Disterilkan dengan autoklaf 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1,5 atm.

d. MacCONKEY Agar (HiMedia) untuk *Escherichia coli*

1. 10,40 g MacCONKEY Agar dilarutkan dalam 210 ml akuades
2. Didihkan sampai larut sepenuhnya.
3. Disterilkan dengan autoklaf 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1,5 atm.



Lampiran 3. Data dan hasil analisis statistika uji aktivitas antimikroba *edible film* kasein-kitosan yang ditambah TiO₂ (Titanium dioksida) dengan level berbeda pada *Escherichia coli*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rataan	SD
	1	2	3			
1	22,74	21,22	20,50	64,46	21,49	1,14
2	21,00	20,99	20,56	62,55	20,85	0,25
3	20,08	21,26	20,49	61,83	20,61	0,60
4	21,44	22,71	21,70	65,85	21,95	0,67
Total				254,69		

1. Analisis Ragam

a. Faktor Koreksi (FK)

$$\begin{aligned}
 FK &= \frac{y^2}{tr} \\
 &= (254,69)^2 / (4 \times 3) \\
 &= 5405,48
 \end{aligned}$$

b. Jumlah Kuadrat Total

$$\begin{aligned}
 JK \text{ Total} &= \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^r Y_{ij}^2 - FK \\
 &= (22,74^2 + \dots + 21,70^2) - 5405,48 \\
 &= 7,71
 \end{aligned}$$

c. Jumlah Kuadrat Perlakuan

$$\begin{aligned}
 JK \text{ Perlakuan} &= \sum \frac{y_i^2}{r} - FK \\
 &= (64,46^2 + \dots + 65,85^2) / 3 - 5405,48 \\
 &= 3,35
 \end{aligned}$$



d. Jumlah Kuadrat Galat

$$\begin{aligned} \text{JK Galat} &= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} \\ &= 7,71 - 3,35 \\ &= 4,36 \end{aligned}$$

2. Tabel Analisis Ragam

SK	df	JK	KT	F hitung	F 0,05	F 0,01
Perlakuan	3	3,35	1,11	2,04	4,07	7,59
Galat	8	4,36	0,54			
Total	11	7,71				

F hitung < F tabel 0,05 dan F tabel 0,01 sehingga dapat disimpulkan bahwa penambahan TiO_2 dengan level berbeda pada *edible film* kasein-kitosan tidak berbeda nyata terhadap zona hambat bakteri *Escherichia coli*

Lampiran 4. Data dan hasil analisis statistika uji aktivitas antimikroba edible film kasein-kitosan yang ditambah TiO₂ (Titanium dioksida) dengan level berbeda pada *Staphylococcus aureus*.

Perlakuan	Ulangan			Total	Rataan	SD
	1	2	3			
1	13,92	14,44	13,63	42,00	14,00 ^a	0,41
2	14,04	13,80	14,19	42,03	14,01 ^a	0,20
3	14,90	14,22	14,77	43,89	14,63 ^a	0,36
4	16,32	15,60	16,34	48,27	16,09 ^b	0,42
Total				176,19		

1. Analisis Ragam

a. Faktor Koreksi (FK)

$$\begin{aligned}
 FK &= \frac{y^2}{tr} \\
 &= (176,19)^2 / (4 \times 3) \\
 &= 2587,01
 \end{aligned}$$

b. Jumlah Kuadrat Total

$$\begin{aligned}
 JK \text{ Total} &= \sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^r Y_{ij}^2 - FK \\
 &= (13,92^2 + \dots + 16,34^2) - 2587,01 \\
 &= 9,73
 \end{aligned}$$

c. Jumlah Kuadrat Perlakuan

$$\begin{aligned}
 JK \text{ Perlakuan} &= \sum \frac{y_i^2}{r} - FK \\
 &= (42,00^2 + \dots + 48,27^2) / 3 - 2587,01 \\
 &= 8,70
 \end{aligned}$$



d. Jumlah Kuadrat Galat

$$\begin{aligned} \text{JK Galat} &= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} \\ &= 9,73 - 8,70 \\ &= 1,03 \end{aligned}$$

2. Tabel Analisis Ragam

SK	df	JK	KT	F hitung	F 0,05	F 0,01
Perlakuan	3	8,70	2,90	22,46	4,07	7,59
Galat	8	1,03	0,13			
Total	11	9,73				

F hitung > F tabel 0,05 dan F tabel 0,01 sehingga dapat disimpulkan bahwa penambahan TiO₂ dengan level berbeda pada *edible film* kasein-kitosan berbeda sangat nyata terhadap zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus*

3. Uji Jarak Berganda Duncen

a. SE $= (\sqrt{KT \text{ galat} / r})$
 $= (\sqrt{0,13 / 3})$
 $= 0,16$

b. Table JND dan JNT

	2	3	4
JND 1%	4,745	4,939	5,056
JNT 1%	0,762	0,794	0,812



c. Hasil Notasi

Perlakuan	Rataan	Notasi
1	14,00	A
2	14,01	A
3	14,63	A
4	16,09	B



Lampiran 5. Data dan hasil analisis statistika uji aktivitas antimikroba *edible film* kasein-kitosan yang ditambah TiO₂ (Titanium dioksida) dengan level berbeda pada *Salmonella sp.*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rataan	SD
	1	2	3			
1	17,07	16,01	16,49	49,57	16,52	0,53
2	15,32	16,30	15,89	47,51	15,84	0,49
3	15,84	15,66	16,92	48,42	16,14	0,64
4	17,89	17,51	15,97	51,37	17,12	1,01
Total				196,89		

1. Analisis Ragam

a. Faktor Koreksi (FK)

$$\begin{aligned}
 FK &= \frac{y^2}{tr} \\
 &= (196,89)^2 / (4 \times 3) \\
 &= 3230,39
 \end{aligned}$$

b. Jumlah Kuadrat Total

$$\begin{aligned}
 JK \text{ Total} &= \sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^r Y_{ij}^2 - FK \\
 &= (17,07^2 + \dots + 15,97^2) - 3230,39 \\
 &= 6,81
 \end{aligned}$$

c. Jumlah Kuadrat Perlakuan

$$\begin{aligned}
 JK \text{ Perlakuan} &= \sum \frac{y_i^2}{r} - FK \\
 &= (49,57^2 + \dots + 51,37^2) / 3 - 3230,39 \\
 &= 2,77
 \end{aligned}$$



d. Jumlah Kuadrat Galat

$$\begin{aligned} \text{JK Galat} &= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} \\ &= 6,81 - 2,77 \\ &= 4,03 \end{aligned}$$

2. Tabel Analisis Ragam

SK	df	JK	KT	F hitung	F 0,05	F 0,01
Perlakuan	3	2,77	0,92	1,83	4,07	7,59
Galat	8	4,03	0,50			
Total	11	6,81				

F hitung < F tabel 0,05 dan F tabel 0,01 sehingga dapat disimpulkan bahwa penambahan TiO₂ dengan level berbeda pada *edible film* kasein-kitosan tidak berbeda nyata terhadap zona hambat bakteri *Salmonella sp.*



Lampiran 6. Data dan hasil analisis statistika uji aktivitas antimikroba edible film kasein-kitosan yang ditambah TiO₂ (Titanium dioksida) dengan level berbeda pada *Lactobacillus bulgaricus*.

Perlakuan	Ulangan			Total	Rataan	SD
	1	2	3			
1	16,67	16,27	17,37	50,32	16,77	0,56
2	16,51	16,52	16,56	49,59	16,53	0,03
3	18,12	17,46	17,18	52,76	17,59	0,48
4	16,86	18,37	18,42	53,66	17,89	0,89
Total				206,34		

1. Analisis Ragam

a. Faktor Koreksi (FK)

$$\begin{aligned}
 FK &= \frac{y^2}{tr} \\
 &= (206,34)^2 / (4 \times 3) \\
 &= 3548,14
 \end{aligned}$$

b. Jumlah Kuadrat Total

$$\begin{aligned}
 JK \text{ Total} &= \sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^r Y_{ij}^2 - FK \\
 &= (16,67^2 + \dots + 18,42^2) - 3548,14 \\
 &= 6,42
 \end{aligned}$$

c. Jumlah Kuadrat Perlakuan

$$\begin{aligned}
 JK \text{ Perlakuan} &= \sum \frac{y_i^2}{f} - FK \\
 &= (50,32^2 + \dots + 53,66^2) / 3 - 3548,14 \\
 &= 3,75
 \end{aligned}$$



d. Jumlah Kuadrat Galat

$$\begin{aligned} \text{JK Galat} &= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} \\ &= 6,42 - 3,75 \\ &= 2,67 \end{aligned}$$

2. Tabel Analisis Ragam

SK	df	JK	KT	F hitung	F 0,05	F 0,01
Perlakuan	3	3,75	1,25	3,74	4,07	7,59
Galat	8	2,67	0,33			
Total	11	6,42				

F hitung < F tabel 0,05 dan F tabel 0,01 sehingga dapat disimpulkan bahwa penambahan TiO₂ dengan level berbeda pada *edible film* kasein-kitosan tidak berbeda nyata terhadap zona hambat bakteri *Lactobacillus bulgaricus*

Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian



Larutan *edible film* kasein-kitosan yang ditambah TiO_2 dengan level berbeda



Proses pencetakan dan pengeringan *edible film* pada suhu ruang selama 14 hari



Edible film setelah di kelurkan dari cetakan



Sterilisasi alat dan bahan dengan autoklaf untuk uji aktivitas antimikroba



Media selektif untuk tumbuh bakteri