



**ENKAPSULASI *Lactobacillus plantarum* DAN *Lactobacillus fermentum*
INDIGENUS KAKAO MENGGUNAKAN BAHAN PENGKAPSUL
SUKROSA DAN LAKTOSA**

SKRIPSI

oleh

Lulus Kartika Ningtias

NIM. 111710101015

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER**

2018



**ENKAPSULASI *Lactobacillus plantarum* DAN *Lactobacillus fermentum*
INDIGENUS KAKAO MENGGUNAKAN BAHAN PENGKAPSUL
SUKROSA DAN LAKTOSA**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan studi pada Program Studi Teknologi Hasil Pertanian (S1) dan mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian

oleh

Lulus Kartika Ningtias

NIM. 111710101015

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER**

2018

PERSEMBAHAN

Skripsi ini penulis persembahkan untuk :

1. Allah SWT, segala puji bagi Allah yang senantiasa melimpahkan nikmat kepada penulis;
2. Ibu tercinta Kusmiati dan Bapak tercinta Muh. Jainuri yang selalu menyayangi dan membimbing penulis;
3. Adik tersayang Imam Makhfudin serta keluarga dan kerabat yang telah mendo'akan dan mendukung penulis;
4. Bapak Sony Suwasono dan Ibu Nurhayati yang selalu memotivasi saya untuk menjadi lebih baik lagi;
5. Bapak Harutoshi Tsuda yang dengan senang hati membantu menjawab kebingungan-kebingungan penulis;
6. Pembimbing dan Penyalur ilmuku guru-guruku sejak Taman Kanak-kanak sampai Perguruan Tinggi;
7. Almamater yang kubanggakan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.

MOTO

Sesungguhnya Allah menyuruh (kamu) berlaku adil dan berbuat kebajikan, memberi kepada kaum kerabat, dan Allah melarang dari perbuatan keji, kemungkaran dan permusuhan. Dia memberi pengajaran kepadamu agar kamu dapat mengambil pelajaran
(terjemahan Surat An Nahl:90)*)

Sesungguhnya Allah mencintai orang-orang yang berperang di jalan-Nya dalam barisan yang teratur, mereka seakan-akan seperti suatu bangunan yang tersusun kokoh
(Terjemahan surat As-saff :04)*)

1

* Departemen Agama Republik Indonesia. 2009. *Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Bandung: PT.Sygma Examedia Arkanleema

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Lulus Kartika Ningtias

NIM :111710101015

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Enkapsulasi *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* Indigenus Kakao Menggunakan Bahan Pengkapsul Sukrosa dan Laktosa” adalah benar-benar karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan serta bersedia mendapatkan sanksi akademik jika dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Juli 2018

Yang menyatakan

Lulus Kartika Ningtias

NIM. 111710101015

SKRIPSI

**ENKAPSULASI *Lactobacillus plantarum* DAN *Lactobacillus fermentum*
INDIGENUS KAKAO MENGGUNAKAN BAHAN PENGKAPSUL
SUKROSA DAN LAKTOSA**

oleh

Lulus Kartika Ningtias

NIM.111710101015

Pembimbing

Dosen pembimbing utama : Dr.Ir. Sony Suwasono. M.App.Sc

Dosen pembimbing anggota : Dr. Nurhayati, S.TP, M.Si

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Enkapsulasi *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* Indigenus Kakao Menggunakan Bahan Pengkapsul Sukrosa dan Laktosa” karya Lulus Kartika Ningtias, NIM 111710101015, telah diuji dan disahkan pada:

Hari, Tanggal :Rabu, 6 Juni 2018

Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Dr.Ir. Sony Suwasono M.App.Sc
NIP.196411091989021002

Dr. Nurhayati S.TP., M.Si
NIP.197904102003122004

Ketua Penguji,

Anggota,

Dr.Ir. Sih Yuwanti.,M.P
NIP. 19650708 199403 2 002

Ir. Giyarto.,M.Sc
NIP. 19660718 199303 1 013

Mengesahkan
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember

Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP. M.Eng.
NIP 19680923 199403 1 009

RINGKASAN

Enkapsulasi *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* Indigenus Kakao Menggunakan Bahan Pengkapsul Sukrosa dan Laktosa; Lulus Kartika Ningtias, 111710101015;2018: 38 halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Fermentasi biji kakao melibatkan banyak jenis mikroorganisme diantaranya adalah bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat yang umumnya terdapat dalam fermentasi biji kakao adalah *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum*, yang memiliki kemampuan sebagai starter untuk memperbaiki kualitas biji kakao. Namun, kedua spesies tersebut kurang dapat bertahan pada kondisi banyak O₂ atau lingkungan terbuka tanpa adanya pelindung. Untuk melindungi *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* dari kondisi lingkungan yang kurang sesuai dapat dilakukan enkapsulasi terhadap keduanya. Enkapsulasi dapat dilakukan dengan berbagai metode namun, *freeze-drying* menjadi metode dengan kemampuan mempertahankan viabilitas sel terbaik. Enkapsulasi, memerlukan bahan pengkapsul seperti disakarida (sukrosa dan laktosa). Bahan tersebut mampu \ memberikan perlindungan yang baik sehingga menghasilkan viabilitas sel yang baik. Sukrosa dan laktosa juga mampu mengurangi stres bakteri selama enkapsulasi. Inkubasi bakteri dan bahan pengkapsul selama satu jam dalam suhu ruang juga mampu mengurangi stres bakteri selama enkapsulasi (pengeringan). Penyimpanan hasil enkapsulasi merupakan hal yang perlu dilakukan untuk mendapatkan ketahanan sel terenkapsulasi.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pengaruh jenis bahan pengkapsul (sukrosa dan laktosa) pada enkapsulasi dengan metode *freeze-dry* terhadap aktivitas *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum*, produksi asam dan viabilitas sel selama penyimpanan suhu 30°C. Produksi asam, dan viabilitas

sel *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* diamati sebelum dan sesudah proses enkapsulasi serta selama penyimpanan 1, 2, 3, dan 4 minggu.

Enkapsulasi *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* menggunakan laktosa menunjukkan viabilitas 93,81 (*Lactobacillus plantarum* A), 93,38 (*Lactobacillus plantarum* B) dan 87,87 (*Lactobacillus fermentum*) yang lebih baik jika dibandingkan dengan menggunakan sukrosa yakni 84,22 (*Lactobacillus plantarum* A), 84,21 (*Lactobacillus plantarum* B) dan 69,12 (*Lactobacillus fermentum*) maupun control 19,23 (*Lactobacillus plantarum* A), 21,64 (*Lactobacillus plantarum* B), 18,36 (*Lactobacillus fermentum*). *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* memiliki viabilitas yang cenderung menurun dan pertumbuhan yang cenderung melambat pada penyimpanan pada suhu 30°C selama 4 minggu namun, memiliki kemampuan produksi asam yang cenderung sama yakni berkisar 3-4 (pH). Viabilitas *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* terenkapsul memiliki viabilitas yang lebih baik jika dibandingkan dengan *Lactobacillus fermentum* terenkapsulasi menggunakan bahan pengkapsul laktosa, sukrosa maupun kontrol (aquades).

SUMMARY

Encapsulation of Indigenous Cacao *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* Using Sucrose and Lactose as Encapsulant. Lulus Kartika Ningtias, 111710101015;2018: 38 pages; Agricultural Product of Technology Department, Faculty of Agricultural Technology, University of Jember.

In the cocoa fermentation there are many microorganism that plays role, one of them is lactic acid bacteria. The common Lactic acid bacteria which plays role in cocoa fermentation are *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*, so they can be used for the cocoa fermentation starter. The problem is that *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* can not stand out by self in O₂ rich places or harsh environment. Encapsulation is one of method that can be used to conduct protection on *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*. there are many method of encapsulation but, freeze-drying is the best method for have good cell viability until today. During encapsulation, encapsulant like disaccharide (ex. sucrose and lactose) is needful. Sucrose and lactose can give good protection for have good cell viability. Beside that, sucrose and lactose can decrease bacterial stress during encapsulation. The decrease of bacterial stress during encapsulation also can be had by incubated bacteria and the encapsulant in room temperature for an hour. After encapsulation, storage condition is the crucial matter for have good viability and activity.

Knowing the effect of the varieties of encapsulant (sucrose and lactose) on encapsulation of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* using freeze-drying method and the effect of storage in $\pm 30^{\circ}\text{C}$ on *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* growth curve, acid production and cell viability were the purpose of this study. growth curve, acid production, and cell viability were observed before and after encapsulation, and after stored for 1,2,3,and 4 weeks.

Encapsulation of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* using lactose show viability better than that encapsulated using sucrose. There are 93,81 (*Lactobacillus plantarum* A), 93,38 (*Lactobacillus plantarum* B) and 87,87 (*Lactobacillus fermentum*) for encapsulation using lactose and 84,22 (*Lactobacillus plantarum* A), 84,21 (*Lactobacillus plantarum* B) and 69,12 (*Lactobacillus fermentum*) for encapsulation using sucrose, for control are 19,23 (*Lactobacillus plantarum* A), 21,64 (*Lactobacillus plantarum* B), and 18,36 (*Lactobacillus fermentum*) During storage, activity and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* using sucrose and lactose got decrease activity and viability, but it did not effect acid production of encapsulated *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* (have pH around 3-4). The viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* have better result than encapsulated *Lactobacillus fermentun* when used sucrose, lactose, and destilated water (control) as encapsulant.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Enkapsulasi *Lactobacillus plantarum* Dan *Lactobacillus fermentum* Indigenus Kakao Menggunakan Bahan Pengisi Sukrosa Dan Laktosa”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh sebab itu penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Bapak Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP. M.Eng selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian;
2. Bapak Dr.Ir.Jayus, selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian;
3. Bapak Dr.Ir.Sony Suwasono M.App.Sc selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Dr. Nurhayati S.TP.,M.Si selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah sabar memberikan bimbingan, nasehat dan arahan selama penelitian berlangsung hingga terselesaikannya skripsi ini;
4. Bapak Assoc.Prof. Harutoshi Tsuda selaku supervisor penulis selama bekerja di *Prefectural University of Hiroshima*, Prof. Dr. Tsutomu Morinaga, Prof. Takashi Oku, assoc. prof. Yoshino Tomoyuki, Assoc. Prof. Nagao Norio, Prof. Hiroyuki Harada, dan Prof. Sakaguchi Toshifumi;
5. Kedua orang tua penulis tercinta Ibu Kusmiati dan Bapak M. Jainuri atas kasih sayang dan pengorbanannya selama ini;
6. Semua dosen-dosen Fakultas Teknologi Pertanian yang selama ini telah membimbing dan memberikan ilmu kepada penulis sampai akhirnya penulis dapat menyelesaikan studi ini;
7. Segenap teknisi Laboratorium Jurusan Teknologi Hasil Pertanian yakni Neni Novita Y., S.Si., Akhmad Mistar, SP., Ni Ketut Leseni, AMd., dan Subekah Nawa K.,SP;

8. Teman-Teman Jurusan Teknologi Hasil Pertanian 2011 yang senasib dan seperjuangan;
9. Teman-Teman kontrakan Darun Najah dan Al-Izzah yang selalu menyemangati penulis dan membawa keceriaan di kosan;
10. Semua pihak yang membantu terselesaikannya penulisan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu.

Penulis juga menerima segala bentuk kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi semua pihak. Amin

Jember, Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PERSETUJUAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
<i>SUMMARY</i>	x
PRAKATA.....	xii
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1.PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Bakteri Asam Laktat Pada Fermentasi Kakao	5
2.2 <i>Lactobacillus plantarum</i>	5
2.3 <i>Lactobacillus fermentum</i>	8
2.4 Teknologi Enkapsulasi.....	10
2.5 karakteristik Sukrosa	11
2.6 Karakteristik Laktosa.....	12
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	14

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	14
3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	14
3.3 Metode penelitian	15
3.3.1 Rancangan Penelitian	15
3.3.2 Pelaksanaan Penelitian.....	15
3.4 Parameter pengamatan	20
3.5 Prosedur Pengamatan.....	20
3.5.1 Viabilitas Sel Bakteri Asam Laktat Dalam Kapsul.....	20
3.5.2 <i>Growth Curve</i>	20
3.5.3 Efisiensi Enkapsulasi.....	21
3.5.4 Produksi Asam	21
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	22
4.1 Total bakteri dan viabilitas bakteri terenkapsulasi.....	22
4.1 Pertumbuhan bakteri Terenkapsulasi	25
4.2 Produksi Asam Bakteri Terenkapsulasi	31
BAB 5. PENUTUP.....	33
5.1 Kesimpulan	33
5.2 Saran	33
DAFTAR PUSTAKA	34
LAMPIRAN-LAMPIRAN	39

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 <i>Lactobacillus plantarum</i>	6
2.2 Lapisan Enkapsulasi.....	8
2.3 Struktur Kimia Sukrosa.....	10
2.4 Struktur kimia (a) α -Laktosa (b) β -Laktosa	11
3.1 Alur pelaksanaan penelitian	16
3.2 Diagram alir pembiakan sel bakteri asam laktat	17
3.3 Diagram alir pemisahan sel bakteri asam laktat dengan media MRSB	18
3.4 Diagram alir enkapsulasi bakteri <i>L. plantarum</i> dan <i>L. fermentum</i>	19
4.1 Polulasi bakteri asam laktat terenkapsulasi menggunakan metode freeze-dry	23
4.2 Viabilitas bakteri asam laktat sesaat setelah enkapsulasi menggunakan metode <i>freeze-dry</i>	24
4.3 Viabilitas bakteri asam laktat terenkapsulasi dengan metode <i>freeze-dry</i> selama penyimpanan 4 minggu	25
4.4 Kurva pertumbuhan <i>L. plantarum</i> A terenkapsulasi menggunakan (a) aquades (kontrol), (b) sukrosa, dan (c) laktosa selama penyimpanan 4 minggu	26
4.5 Kurva pertumbuhan <i>L. plantarum</i> B terenkapsulasi menggunakan (a) aquades (kontrol), (b) sukrosa, dan (c) laktosa selama penyimpanan 4 minggu	28
4.6 Kurva pertumbuhan <i>L. fermentum</i> terenkapsulasi menggunakan (a) aquades (kontrol), (b) sukrosa, dan (c) laktosa selama penyimpanan 4 minggu	30
4.7 Kemampuan bakteri <i>L. plantarum</i> A, <i>L. plantarum</i> B, dan <i>L. fermentum</i> dalam memproduksi asam laktat (pH) sebelum, setelah enkapsulasi dan selama penyimpanan 1,2,3,4 minggu pada suhu 30°C	31

- 4.8 Kemampuan bakteri *L. plantarum* A dan *L. plantarum* B dan *L. fermentum* dalam memproduksi asam sebelum, setelah enkapsulasi, dan selama penyimpanan 1,2,3,4 minggu pada suhu 30°C 32



DAFTAR LAMPIRAN

	halaman
4.1 Pertumbuhan <i>Lactobacillus platarum</i> dan <i>Lactobacillus fermentum</i> sebelum dan setelah enkapsulasi.....	39
4.2 Total dan viabilitas <i>Lactobacillus platarum</i> dan <i>Lactobacillus fermentum</i> sebelum dan setelah enkapsulasi	48
4.3 Produksi asam dan pH <i>Lactobacillus platarum</i> dan <i>Lactobacillus fermentum</i> sebelum dan setelah enkapsulasi.....	50

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kakao merupakan salah satu komoditi non-migas Indonesia yang menjadi penyumbang devisa negara cukup besar. Kakao tersebut banyak dihasilkan dari perkebunan rakyat, namun kualitas dari biji kakao kering Indonesia masih kalah bersaing dengan biji kakao kering dari negara-negara penghasil kakao lainnya. Hal ini banyak dipengaruhi oleh kurang terbentuknya prekursor flavor kakao dan beragamnya mutu kakao, sehingga akan banyak berpengaruh pada karakteristik flavor produk kakao yang dihasilkan. Biji kakao kering dari perkebunan rakyat di Indonesia jarang ada yang menerapkan metode fermentasi yang baik dalam proses pengolahan biji kakao kering atau fermentasi tersebut kurang optimal. Contohnya pada keberagaman kualitas kakao yang dihasilkan di Bali, dimana Bali memiliki 14.865 Ha lahan kakao yang dapat menghasilkan kakao kering sebanyak 6.152 ton dan hanya 3,2% saja yang difermentasi (Dinas Perkebunan Bali,2012).

Pada umumnya proses fermentasi kakao dilakukan selama 5-6 hari dengan metode fermentasi spontan. Pada penelitian sebelumnya digunakan starter cair, dimana fermentasi dengan penambahan starter terbukti mampu untuk mempercepat proses fermentasi. Selain itu dengan penambahan starter cair, aktivitas mikroorganisme semakin tinggi, disertai aerasi yang baik, suhu optimum akan tercapai. Pada kondisi tersebut biji kakao akan lebih cepat mati dan warna kotiledon akan semakin cepat berwarna coklat (Kustyawati dan Sri. 2008). Penggunaan starter cair ini mengalami kendala, yaitu kurang praktisnya starter tersebut apabila dibawa atau diaplikasikan, sehingga perlu adanya suatu inovasi untuk mengemas starter ini menjadi lebih praktis tanpa merusak starter tersebut. Salah satu metode yang dapat digunakan adalah dengan melakukan enkapsulasi pada starter tersebut.

Pada fermentasi biji kakao, terdapat banyak mikroorganisme yang terlibat di dalamnya. salah satu jenis mikroba yang berperan dalam proses ini adalah bakteri asam laktat. Fermentasi dengan kondisi yang berbeda akan mempengaruhi kondisi bakteri asam laktat yang tumbuh. Pada umumnya jenis bakteri yang ditemukan

pada semua metode fermentasi biji kakao (menggunakan box maupun timbunan) adalah *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* (Meersman *et al.* 2013). Dengan demikian penggunaan kedua bakteri tersebut sebagai starter diharapkan mampu untuk meningkatkan kualitas dari biji kakao.

Ada beberapa metode yang sering digunakan dalam enkapsulasi bakteri seperti metode ekstrusi, emulsi, pengeringan (*freeze-drying* dan *spray-drying*) (Mortazavian *et al.* 2007). Umumnya pengeringan merupakan metode yang lebih banyak digunakan dalam enkapsulasi skala besar, karena penanganan yang lebih cepat serta mendapatkan ukuran partikel yang lebih kecil. Metode pengeringan yang mampu mempertahankan sel mikroba yang baik adalah *freeze-drying*. Hal ini dikarenakan metode pengeringan dengan menggunakan panas akan mampu merusak dinding sel mikroba selama enkapsulasi (Mansouripour *et al.* 2013).

Selain metode enkapsulasi, bahan pengisi juga merupakan variabel yang mampu menentukan viabilitas mikroba yang dienkapsulasi. Terdapat berbagai bahan pengkapsul yang umumnya digunakan dalam enkapsulasi mikroba baik berupa karbohidrat maupun protein. Dalam enkapsulasi mikroba menggunakan metode *freeze-drying*, karbohidrat (seperti sukrosa dan laktosa) maupun protein (seperti susu skim) sering digunakan.

1.2 Rumusan Masalah

Enkapsulasi bakteri asam laktat umumnya ditujukan untuk produksi biomasa maupun sebagai probiotik yang mampu bertahan dalam lingkungan yang kurang mendukung bagi pertumbuhan bakteri (Anal dan Singh, 2007). Dalam enkapsulasi terdapat beberapa metode yang sering digunakan seperti *freeze drying*, *spray drying*, dan emulsi. Diantara semua metode tersebut metode *freeze drying* memiliki kemampuan mempertahankan sel bakteri yang baik karena selama prosesnya menggunakan suhu rendah. Dengan demikian kematian sel bakteri akibat suhu tinggi dapat dihindari.

Dalam enkapsulasi bakteri dikenal istilah enkapsulan atau protektan, yaitu bahan penyalut yang akan memberikan perlindungan kepada bakteri dari lingkungan yang ekstrim. Enkapsulan pada bakteri asam laktat dapat

menggunakan berbagai bahan seperti natrium alginat, karagenan, pati resistan, *whey* protein, susu skim, sukrosa, monosodium glutamat, dan laktosa. Sukrosa dan laktosa merupakan 2 disakarida yang banyak ditemukan secara komersial. Zhang *et al* (2012) melaporkan bahwa enkapsulasi bakteri *Oenococcus oeni* menggunakan sukrosa dan laktosa memiliki viabilitas yang baik yakni $50,8 \pm 1,2$ % dan $58,9 \pm 1,8$ %, sedangkan aquades hanya $12,1 \pm 1,8$. Penggunaan Sukrosa dan laktosa juga mampu mengurangi stress pada sel bakteri selama proses enkapsulasi (pengeringan) karena mampu meningkatkan tekanan turgor (Abee dan Wouters,1999). Pada enkapsulasi bakteri, konsentrasi laktosa yang dapat digunakan berkisar 1-10% (median 8%) dan konsentrasi sukrosa yang dapat digunakan berkisar 1-68% (median 10%) (Hubalek. 2003).

Selama enkapsulasi, sel bakteri sering mengalami stress karena penambahan enkapsulan dengan konsentasi tinggi serta adanya proses pengeringan. Untuk mengurangi stress tersebut dapat dilakukan pendiaman sel bakteri bersama dengan bahan pengkapsul selama satu jam pada suhu ruang (Conrad *et al.*,2000). Pendiaman ini dilakukan untuk menyetimbangkan antara cairan dalam sel dengan lingkungan (konsentrasi enkapsulan). Waktu satu jam dipilih karena hal ini cukup efisien apabila dilakukan pada skala industri (Carvalho *et al.*,2002; Carvalho *et al.*,2004).

Lingkungan penyimpanan bakteri terenkapsulasi juga merupakan hal yang perlu diperhatikan, dimana penyimpanan suhu dingin memerlukan biaya yang tinggi. Indonesia terkenal sebagai negara tropis dengan suhu harian dapat mencapai suhu $\pm 30^{\circ}\text{C}$. Pada suhu tersebut, bakteri akan bermetabolime, sehingga bakteri akan cepat berada pada fase stasioner atau bahkan kematian. Dengan demikian untuk menggunakannya kembali membutuhkan proses adaptasi yang lebih panjang. Oleh sebab itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh sukrosa dan laktosa pada sel bakteri dalam proses enkapsulasi dan viabilitasnya pada suhu lingkungan.

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah :

- a. mengetahui pengaruh bahan pengkapsul sukrosa dan laktosa terhadap aktivitas bakteri asam laktat, produksi asam dan viabilitas sel;
- b. mengetahui pengaruh suhu penyimpanan $\pm 30^{\circ}\text{C}$ terhadap aktivitas bakteri asam laktat, produksi asam dan viabilitas sel.

1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan memberikan manfaat diantaranya:

- a. memberikan informasi mengenai pengaruh bahan pengkapsul terutama sukrosa dan laktosa terhadap bakteri asam laktat;
- b. memberi informasi mengenai bahan pengkapsul yang mampu melindungi bakteri asam laktat dari kondisi lingkungan tanpa mempengaruhi kinerja bakteri asam laktat selama proses fermentasi kakao;
- c. mampu membantu dalam memecahkan permasalahan keanekaragaman kualitas fermentasi kakao di Indonesia;
- d. memberi pijakan pada peneliti lain untuk dapat mengembangkan kajian enkapsulasi bakteri yang berperan dalam fermentasi kakao.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Asam Laktat Pada Fermentasi Kakao

Fermentasi pada biji kakao merupakan proses yang sangat penting. Proses ini umumnya dilakukan secara spontan. Mikroba yang berperan dalam proses ini merupakan mikroba yang alami berasal dari pulp kakao yang mengelilingi biji kakao. Dalam fermentasi, mikroba ini aktif dalam memecah senyawa makromolekul dan menghasilkan metabolit seperti alkohol dan asam organik. Alkohol dan asam organik tersebut akan masuk ke dalam biji kakao dan akan membunuh biji serta merangsang terjadinya reaksi biokimia dalam proses pembentukan warna, flavor dan aroma (Sulaiman *et al.* 2014).

Bakteri asam laktat merupakan salah satu bakteri yang berperan penting dalam fermentasi biji kakao. Selama fermentasi biji kakao, bakteri asam laktat terdeteksi dari awal fermentasi (Ouattara *et al.* 2014), walaupun spesies dan jumlah bakteri asam laktat yang terdeteksi berbeda-beda selama proses fermentasi. Sebagai contoh *Lactobacillus fermentum* dan *Lactobacillus plantarum* tumbuh sejak awal proses fermentasi sedangkan *Lactobacillus brevis* mulai tumbuh pada jam ke-24 (Fahrurrozi. 2015). Ardhana dan Fleet (2003) melaporkan bahwa bakteri asam laktat mencapai populasi maksimum pada jam ke 36-48 fermentasi dengan total 10^8 - 10^9 CFU/g. Bakteri asam laktat yang terdeteksi dalam fermentasi biji kakao tersebut lebih banyak tergolong pada bakteri homofermentatif daripada bakteri heterofermentatif. Bakteri asam laktat yang berhasil dideteksi pada fermentasi biji kakao antara lain *L.brevis*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *L. celobiosus*, dan *Lactobacillus hilgardii* (Meersman *et al.* 2013; Ardhana dan Fleet. 2003).

2.2 *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum merupakan salah satu spesies pada genus *Lactobacillus* yang terdiri dari 90 spesies yang telah divalidasi (Kandler dan Weiss.1986). *Lactobacillus* merupakan bakteri berbentuk batang dengan gram

positif seperti **Gambar 2.1**. Bakteri *L. plantarum* memiliki temperatur optimal pertumbuhan lebih rendah dari 37°C. Selain itu *L. plantarum* memiliki sifat katalase negatif, aerob atau fakultatif aerob, mampu mencairkan gelatin, cepat mencerna protein, tidak memproduksi nitrit, dan memproduksi asam laktat. Sedangkan pada media agar, *L. plantarum* membentuk koloni berukuran 2-3 mm, berwarna putih opaque dan konveks (Sudarmadji.1997)



Gambar 2.1 *Lactobacillus plantarum* (Mita.2016)

Bakteri ini memiliki kemampuan dalam memecah senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana, sehingga banyak ditemukan dalam fermentasi. Bakteri ini sering ditemukan dalam

fermentasi buah dan sayur seperti pada fermentasi mentimun dan kubis. Hal ini dikarenakan *L. plantarum* memiliki ketahanan terhadap asam dibandingkan dengan bakteri asam laktat lainnya (Fleming.1982; Pederson dan Albury.1969). Selain itu bakteri *L. plantarum* juga berperan dominan dalam fermentasi daging seperti pada salami (Drosinos *et al.* 2007).

Bakteri *L. plantarum* juga menunjukkan aktivitas menghasilkan bakteriosin, seperti yang dilaporkan oleh Olasupo (1996), sehingga mampu untuk menghalangi aktivitas mikroba tertentu. Sampai saat ini *L. plantarum* diketahui telah mampu memproduksi banyak plantarisin (bakteriosin yang dihasilkan oleh *L. plantarum*) dari berbagai fermentasi menggunakan *L. plantarum*, namun seperti halnya bakteriosin lainnya pada kelas II, plantarisin tahan terhadap panas (hingga diatas suhu 100°C atau autoklaf) dan berukuran kecil (>10Kda) (Todorov SD.2009) karena banyak tersusun atas *double glycin* (G-G), sehingga bakteriosin

jenis ini merupakan bakteriosin yang berpeluang besar digunakan dalam dunia industri.

Terdapat 3 grup *Lactobacillus* yaitu *obligately homofermentative* (Grup 1), *facultatively heterofermentative* (Grup 2) dan *obligately heterofermentatively* (grup 3). *Lactobacillus* pada Grup 1 hanya mampu memetabolisme satu jenis gula heksosa khususnya asam laktat, sedangkan grup 2 mampu untuk memetabolisme pentose dan/atau glukonat sedangkan grup 3 mampu memetabolisme gula heksosa seperti asam laktat, asam asetat dan/atau etanol dan CO₂. Bakteri *L. plantarum* merupakan *Lactobacillus* yang tergolong dalam grup 2 (Kandler dan Weiss., 1986). Bakteri *L. plantarum* memiliki perbedaan jika dibandingkan dengan *Lactobacillus* pada umumnya yaitu *L. plantarum* mampu untuk memetabolisme banyak jenis karbohidrat, membutuhkan manganese dalam jumlah yang banyak (Archibald dan Fridovich., 1981), memiliki toleransi yang tinggi terhadap pH rendah (Deschel dan Nes., 1995), mampu memetabolisme asam fenol dan memiliki tannase (Osawa *et al.* 2000; Vaquero *et al.* 2004; Barthelmebs *et al.* 2000), dan mudah beradaptasi (Kleerebezem *et al.* 2003).

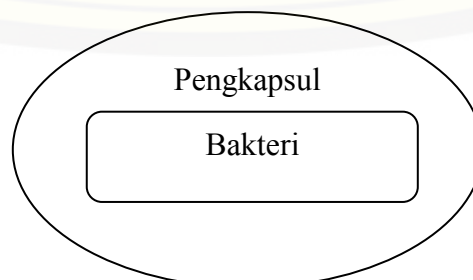
2.3 *Lactobacillus fermentum*

Lactobacillus fermentum (*L. fermentum*) merupakan bakteri yang termasuk dalam genus *Lactobacilli* dimana bakteri ini memiliki ciri-ciri berbentuk basil, gram positif, tidak berspora, non motil, aero toleran, dan katalase negatif (Kandler dan Weiss, 1986). *L. fermentum* memiliki ukuran koloni 1-2 mm, koloni berbentuk bulat, berwarna putih cream, basah, dan opaque (Adebayo *et al.* 2014). *Lactobacillus fermentum* termasuk dalam golongan *Lactobacillus obligate heterofermentatif* dimana mampu memetabolisme gula heksosa seperti asam laktat, asam asetat dan/atau etanol dan CO₂, sehingga sering ditemukan pada fermentasi pada produksi roti gandum dan rye (Kandler dan Weiss. 1986; Spicher dan Schröder. 1978; Grobetti *et al.* 1994; Onno dan Rousel. 1994). Dengan kemampuan tersebut *L. fermentum* juga dapat dijumpai pada fermentasi produk susu kedelai, keju, dan etanol dari tebu (Poullain. 1994; Foschino *et al.* 2001).

Seperti halnya bakteri yang termasuk dalam genus *Lactobacilli*, *L. fermentum* mampu menghasilkan asam laktat dan bakteriosin. Hal inilah yang mampu mengganggu pertumbuhan mikroorganisme seperti kapang dan bakteri pembusuk. Bakteriosin yang diproduksi oleh *L. fermentum* memiliki kemampuan aktif maksimum pada pH 2 dan 4 dengan aktifitas 1600AU/ml melawan *Staphylococcus aureus* (Adebayo *et al.* 2014). Selain itu bakteriosin yang dimiliki oleh *L. fermentum* memiliki aktifitas maksimum setelah pemanasan pada suhu 100°C selama 15 menit (6400AU/ml), dan selanjutnya mengalami penurunan dengan semakin tinggi dan lamanya pemanasan. Ketika dilakukan pemanasan 121°C selama 45 menit, aktifitas dari bakteriosin ini hanya 400AU/ml (Adebayo *et al.* 2014). Bakteriosin ini juga memiliki stabilitas yang baik selama penyimpanan.

2.4 Teknologi Enkapsulasi

Enkapsulasi merupakan suatu metode yang digunakan untuk melindungi suatu komponen yang mudah mengalami kerusakan baik itu dalam bentuk senyawa ataupun mikroorganisme dari kondisi lingkungan yang tidak memungkinkan komponen tersebut bertahan. Pada mikroorganisme, enkapsulasi lebih banyak dilakukan untuk menciptakan lingkungan khusus bagi mikroorganisme untuk bertahan selama proses maupun selama penyimpanan. Enkapsulasi umumnya dilakukan secara fisiko-kimia atau secara mekanik dengan memerangkap komponen aktif dalam suatu cangkang yang dapat melindunginya dari lingkungan seperti pada **Gambar 2.2**. Cangkang tersebut dapat berasal dari polimer, karbohidrat, lemak maupun lilin tergantung jenis komponen yang akan dikapsulkan.



Gambar 2.2. Lapisan enkapsulasi

Pada dasarnya enkapsulasi dapat melindungi komponen aktif dari 4 kondisi yaitu:

- a. Kondisi proses seperti suhu dan oksidasi
- b. *Desiccation*
- c. Kondisi penyimpanan
- d. Degradasi oleh asam

Dalam proses enkapsulasi mikroorganisme banyak digunakan berbagai metode antara lain:

a. *Spray-Freeze Drying*

Metode *Spray-Freeze drying* merupakan penggabungan dari metode *spray drying* dan *Lyophilization*. Metode ini memiliki kelebihan dalam pengontrolan ukuran partikel dan memiliki ketahanan terhadap lingkungan yang sangat baik namun metode ini tergolong mahal. Metode ini dilakukan dengan cara membekukan bersama-sama biakan mikroorganisme dengan bahan pembawa (bahan pengkapsul: laktosa, trehalosa, sorbitol, sukrosa, protein susu dan *skim milk*) pada suhu -20°C sampai -30°C . Proses tersebut disertai dengan proses penyubliman air dalam kondisi vakum pada tekanan 0,05-0,1 mBar, dengan suhu -50°C sampai -30°C . (Semyonov *et al.*2010)

b. Metode emulsi

Metode Emulsi dilakukan dengan suspensi hidrokoloid dan mikroorganisme dengan volume kecil pada minyak sayur sebagai fase pendispersi. Seperti pada emulsi pada umumnya, metode emulsi ini terdapat fase terdispersi (air), emulsifier, dan pendispersi (minyak). Ketika emulsi terbentuk, granula akan terbentuk (mikroorganisme terkapsulkan).

c. Metode *spray-drying*

Metode *Spray-drying* Merupakan metode enkapsulasi yang paling banyak digunakan pada skala industri yang memproduksi dalam jumlah yang besar. Metode ini dilakukan dengan mencampurkan bahan pengkapsul dan

mikroorganisme menjadi satu larutan kemudian dilewatkan pada udara panas menggunakan *nozzle* sehingga ukuran partikel dapat dikendalikan dan seragam.

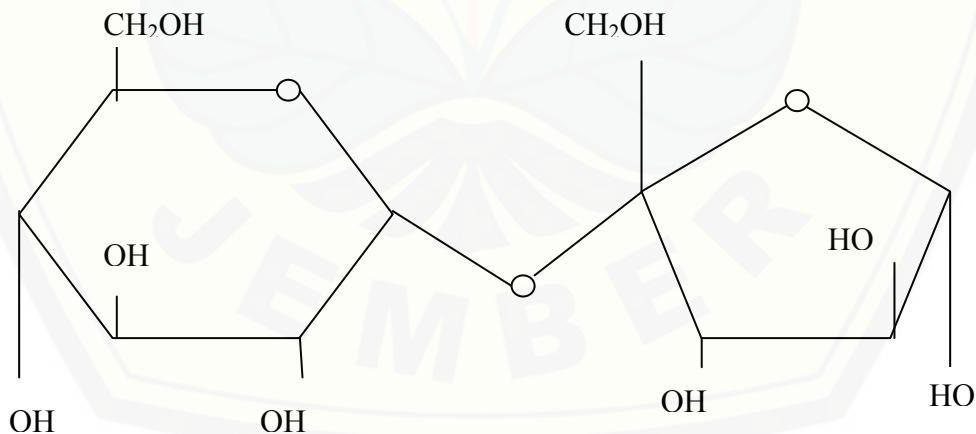
Untuk mendapatkan hasil yang optimal perlu mempertimbangkan:

- Arah aliran udara
- Strain dan kondisi mikroorganisme (Corcoran *et al.*2004)
- Bahan pengikat (bahan pengkapsul)
- Suhu pengeringan dimana harus berada pada suhu 150-170°C pada *inlate* sedangkan suhu lingkungan 80°C.
- Waktu pengeringan

Kondisi penyimpanan : suhu 4°C, AW rendah (>0,25) (Zuidam dan Nedovic, 2010)

2.5 Karakteristik Sukrosa

Sukrosa merupakan gula yang paling umum digunakan sebagai pemanis. Umumnya sukrosa sebagai pemanis dibuat dari tebu dimana memiliki tingkat kemanisan mencapai 1 atau 100%. Sukrosa merupakan gula yang merupakan hasil ikatan dari glukosa dan fruktosa terlihat pada **Gambar 2.3**



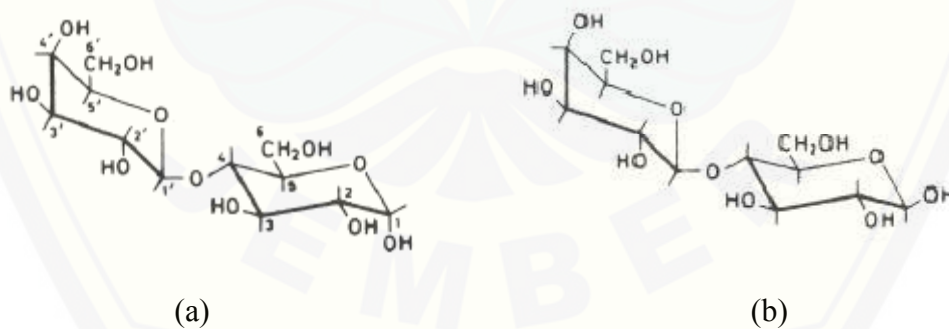
Gambar 2.3. Struktur kimia sukrosa (Kusumaningrum.2010)

Dalam enkapsulasi mikroba, sukrosa dikenal memiliki kemampuan yang cukup baik dalam mempertahankan viabilitas sel baik selama enkapsulasi. Selain karena mampu menggantikan air dalam sel selama pengeringan (enkapsulasi). Kemampuan sukrosa dalam mempertahankan viabilitas bakteri juga tidak terlepas

dari *Water Binding Capacity* (WHC) dan kemampuannya dalam mencegah pembentukan intraselular dan ekstraselular kristal es (Schoug *et al.* 2006). Sukrosa yang merupakan disakarida mampu untuk meningkatkan tekanan turgor selama proses enkapsulasi sehingga stress terhadap perubahan tekanan osmotik dapat ditekan seminimal mungkin (Abee dan Wouters .1999). Kekurangan dari penggunaan sukrosa dalam proses enkapsulasi adalah sukrosa kurang mampu disimpan pada suhu tinggi karena matrik sukrosa memiliki nilai Tg (*glass transition*) berkisar 24,6. Bhandari dan Howes (1999) juga menyebutkan bahwa bakteri yang dienkapsulasi menggunakan sukrosa tidak mampu disimpan pada suhu lebih dari 35°C karena pengurangan total bakteri yang signifikan dalam waktu satu bulan.

2.6 Karakteristik Laktosa

Laktosa merupakan salah satu dari gula disakarida yang terbentuk dari ikatan Beta-(1,4) glukosida antara galaktosa dan glukosa. Laktosa banyak ditemukan pada susu, sehingga laktosa lebih sering dikenal sebagai gula susu. Dalam susu terdapat 2 jenis laktosa yaitu α -Laktosa dan β -Laktosa seperti pada **Gambar 2.3**.



Gambar 2.3 Struktur kimia (a) α -Laktosa (b) β -Laktosa (Najihullah.2015)

Perbedaan kedua laktosa tersebut pada grup hidrogen dan hidroksil pada karbon no 1. Kondisi ini erat dipengaruhi oleh suhu, konsentrasi dan pH dari larutan. Komposisi keduanya pada susu juga dipengaruhi oleh suhu. Pada suhu ruang akan terdapat 40% α -Laktosa dan 60% β -Laktosa. α -Laktosa dan β -Laktosa yang memiliki struktur yang berbeda menyebabkan memiliki sifat kristal, dengan morfologi kristal dan *solubility* yang berbeda.

2.7 Enkapsulasi Menggunakan Sukrosa dan Laktosa

Selama enkapsulasi (pengeringan) sangat penting untuk menjaga agar bahan tidak kehilangan air secara keseluruhan untuk menjaga tingkat survival dari bakteri yang dienkapsulkan. Zayed dan Roos (2004) melaporkan bahkan kadar air optimal untuk menjaga tingkat survival *Lactobacillus salivarius* adalah antara 2,8-5,6%.

Bahan pengkapsul umumnya akan berinteraksi dengan membran sel bakteri. Gugus OH⁻ pada bahan pengkapsul akan berikatan dengan lemak pada pospholipida membran sel bakteri (Tsvetkova *et al.* 1998), sehingga bahan pengkapsul tersebut hanya akan menutup pori-pori sel bakteri. Dengan demikian bakteri akan terlindung dari kondisi lingkungan yang kurang mendukung. Selain itu akibat dari reaksi antara gugus OH⁻ pada bahan pengkapsul dan gugus H⁺ pada pospolipida membran sel dapat menggantikan air dalam sel.

Enkapsulasi bakteri menggunakan sukrosa dan laktosa cukup banyak dilaporkan. Zhang *et al* (2012) melaporkan bahwa enkapsulasi bakteri *Oenococcus oeni* menggunakan sukrosa dan laktosa memiliki viabilitas yang baik yakni 50,8±1,2 % dan 58,9±1,8 %, sedangkan aquades hanya 12,1±1,8. Penggunaan Sukrosa dan laktosa juga mampu mengurangi stress pada sel bakteri selama enkapsulasi (pengeringan) karena mampu meningkatkan tekanan turgor (Abee dan Wouters.1999). Kekurangan dari penggunaan sukrosa dan laktosa dalam enkapsulasi adalah sukrosa dan laktosa kurang mampu disimpan pada suhu tinggi karena matrik sukrosa dan laktosa memiliki nilai Tg (*glass transition*) berkisar 23°C dan 25°C. Bhandari dan Howes (1999) juga menyebutkan bahwa bakteri yang dienkapsulasi menggunakan sukrosa tidak mampu disimpan pada suhu lebih dari 35°C karena pengurangan total bakteri yang signifikan dalam waktu satu bulan.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian terdiri atas produksi, enkapsulasi dan analisa. Enkapsulasi dan analisis viabilitas sel serta aktivitas sel (*growth curve*) dilaksanakan di Laboratorium *Animal Food Technology, Faculty of Life and Environmental Sciences, Prefectural University of Hiroshima*. Analisis produksi asam dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Penelitian dilakukan pada bulan Maret 2015 – Agustus 2016.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari kultur bakteri asam laktat, bahan baku dan bahan kimia. Kultur bakteri asam laktat merupakan hasil isolasi dari lendir dan pulp kakao hasil fermentasi kakao di Kebun Kalikempit, Banyuwangi. Kultur *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* tersebut merupakan hasil penelitian dari peneliti Hatiningsih (2015) yang disimpan di Laboratorium Mikrobiologi pangan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember. Kultur tersebut dibiakkan pada media MRS Agar dengan penambahan 1% CaCO₃ kemudian dibiakkan dalam MRS Broth pada suhu 37°C. Sedangkan bahan lainnya meliputi MRS Broth, agar, sukrosa, laktosa, aquades, NaCl, HCl, NaOH, buffer fosfat pH 4 dan 7.

Alat yang digunakan pada penelitian ini terbagi menjadi alat utama dan alat analisa. Alat utama dalam penelitian ini meliputi *Laminer Air Flow* Kenis CB-850K, *Laminer Air Flow (LAF)* CRUMAIR, *Autoclave* Sanyo MLS-3000, *Hot Air Sterilizer* Sakura HE-01, pH meter Horiba F-21, *Sentrifuge* Kubota 2410, *Freeze Dryer* Eyela Tokyo FDU-1200, Inkubator Eyela LTI-1000D dan *Hot plate strirer* merek Misung scientific tipe HS15. Alat untuk analisis dalam penelitian ini meliputi Spektrofotometer merek Shimadzu tipe UV-Mini 1240, Inkubator Hareus Instrument, Inkubator Eyela SLI-600N dan pH meter.

3.3 Pelaksanaan Penelitian

3.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi dengan menggunakan dua variabel yaitu bakteri asam laktat (A) dan bahan pengkapsul (B), sehingga diperoleh kombinasi sebagai berikut:

A1: *Lactobacillus plantarum* A B1: Aquades (Kontrol)

A2: *Lactobacillus plantarum* B B2: Sukrosa 10%

A3: *Lactobacillus fermentum* B3: Laktosa 10%

A1B1 : *Lactobacillus plantarum* A, Aquades (Kontrol)

A1B2 : *Lactobacillus plantarum* A, Sukrosa 10%

A1B3 : *Lactobacillus plantarum* A, Laktosa 10%

A2B1 : *Lactobacillus plantarum* B, Aquades (Kontrol)

A2B2 : *Lactobacillus plantarum* B, Sukrosa 10%

A2B3 : *Lactobacillus plantarum* B, Laktosa 10%

A3B1 : *Lactobacillus fermentum*, Aquades (Kontrol)

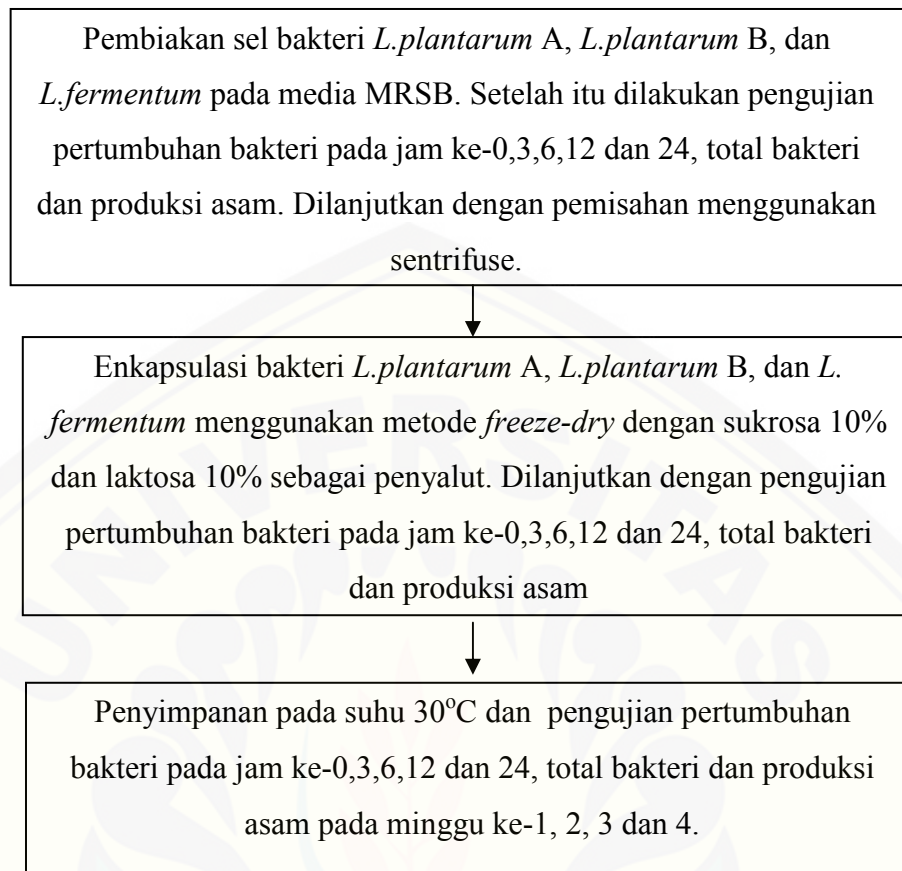
A3B2 : *Lactobacillus fermentum*, Sukrosa 10%

A3B3 : *Lactobacillus fermentum*, Laktosa 10%

Masing-masing kombinasi perlakuan tersebut diulang tiga kali. Hasil pengamatannya diolah menggunakan statistik sederhana seperti rerata dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik.

3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam satu tahap yang dilanjutkan dengan analisa. Tahapan penelitian ini dapat dilihat pada **Gambar 3.1**.

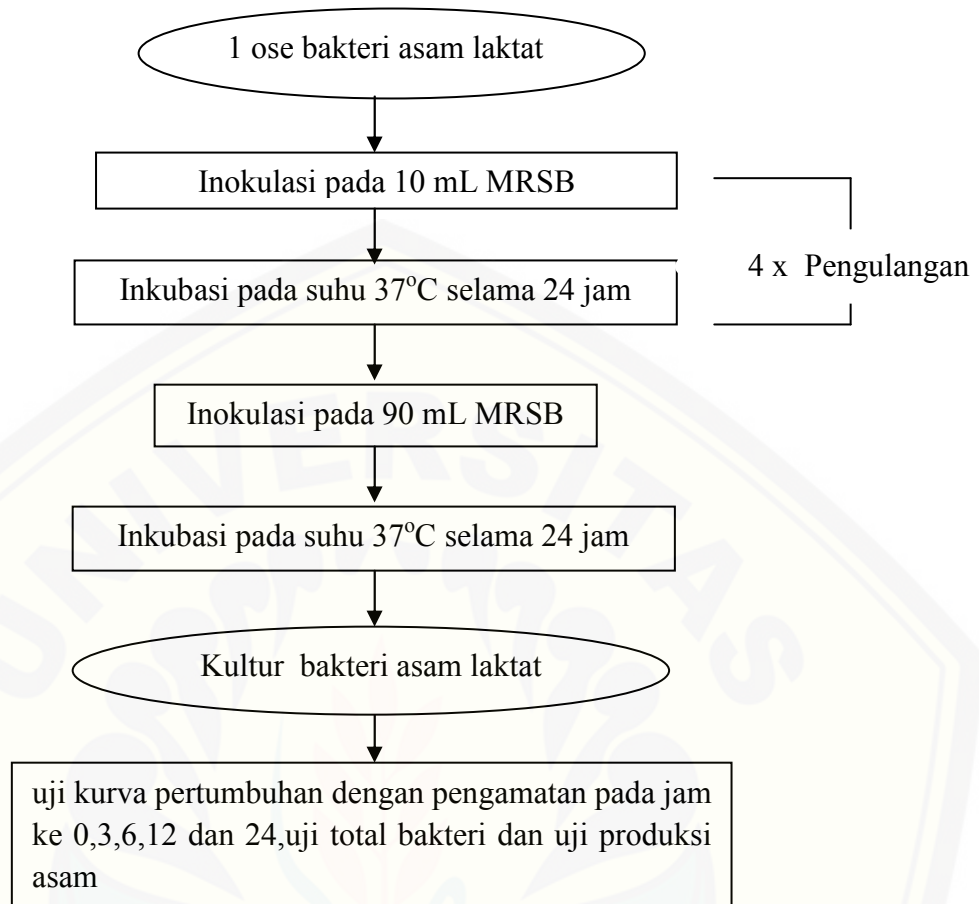


Gambar 3.1 Alur pelaksanaan penelitian

a. Pembiakan sel bakteri asam laktat dalam MRS Broth

Pembiakan sel bakteri asam laktat dimulai dari peremajaan menggunakan MRS Agar (agar tegak) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Media MRS Agar dibuat dengan melarutkan 52,2 gram MRS Broth dan 14 g Agar pada 1 L Aquades dan dikondisikan pada pH 6,2 menggunakan HCl 5M dan NaOH 5M. Media MRS Agar tersebut dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian media tersebut disterilisasi dengan suhu 121°C selama 15 menit dan didinginkan dalam posisi tegak.

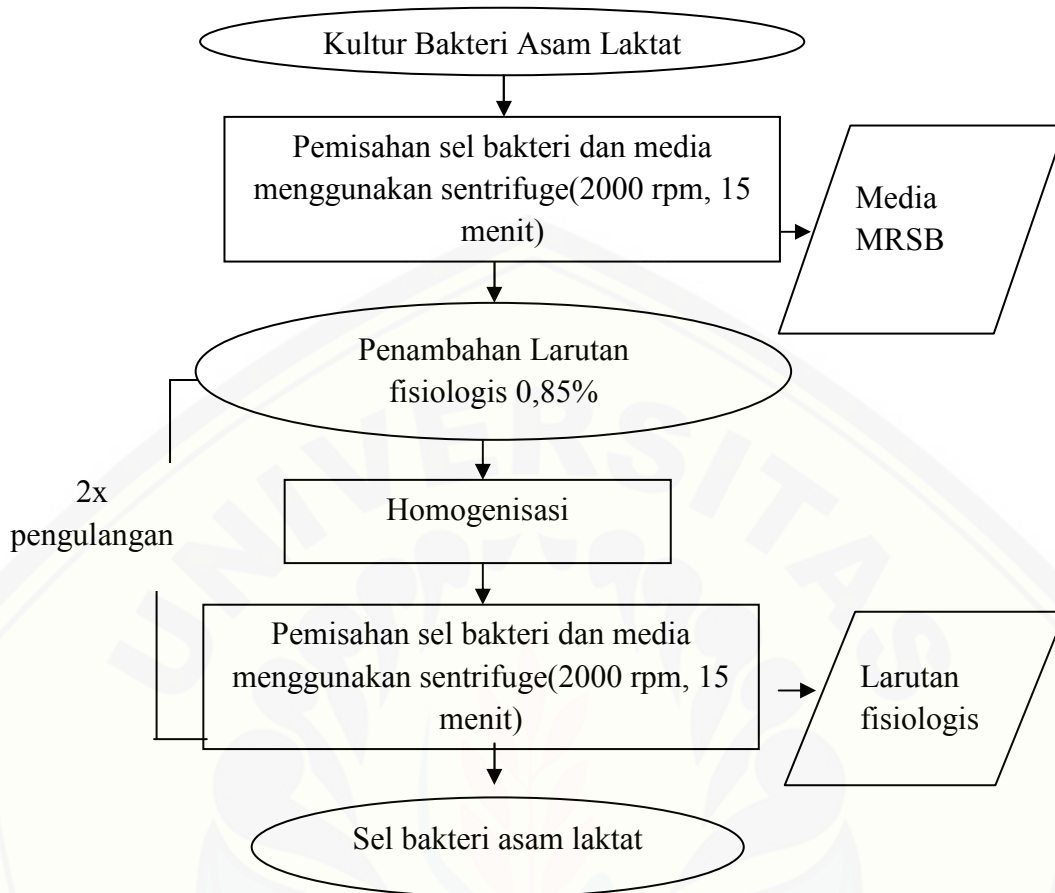
Kultur dari media tegak MRS Agar, diambil 1 ose dan dimasukkan dalam 10 mL media MRS Broth dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pembiakan dalam MRS Broth dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali dengan kondisi sama, kemudian ditambahkan pada 90 mL MRS Broth yang telah dipreparasi dan disterilisasi dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Diagram alir pembiakan sel bakteri asam laktat dapat dilihat pada **Gambar 3.2**.



Gambar 3.2. Diagram alir pembiakan sel bakteri asam laktat

b. Pemisahan sel dari media MRS Broth

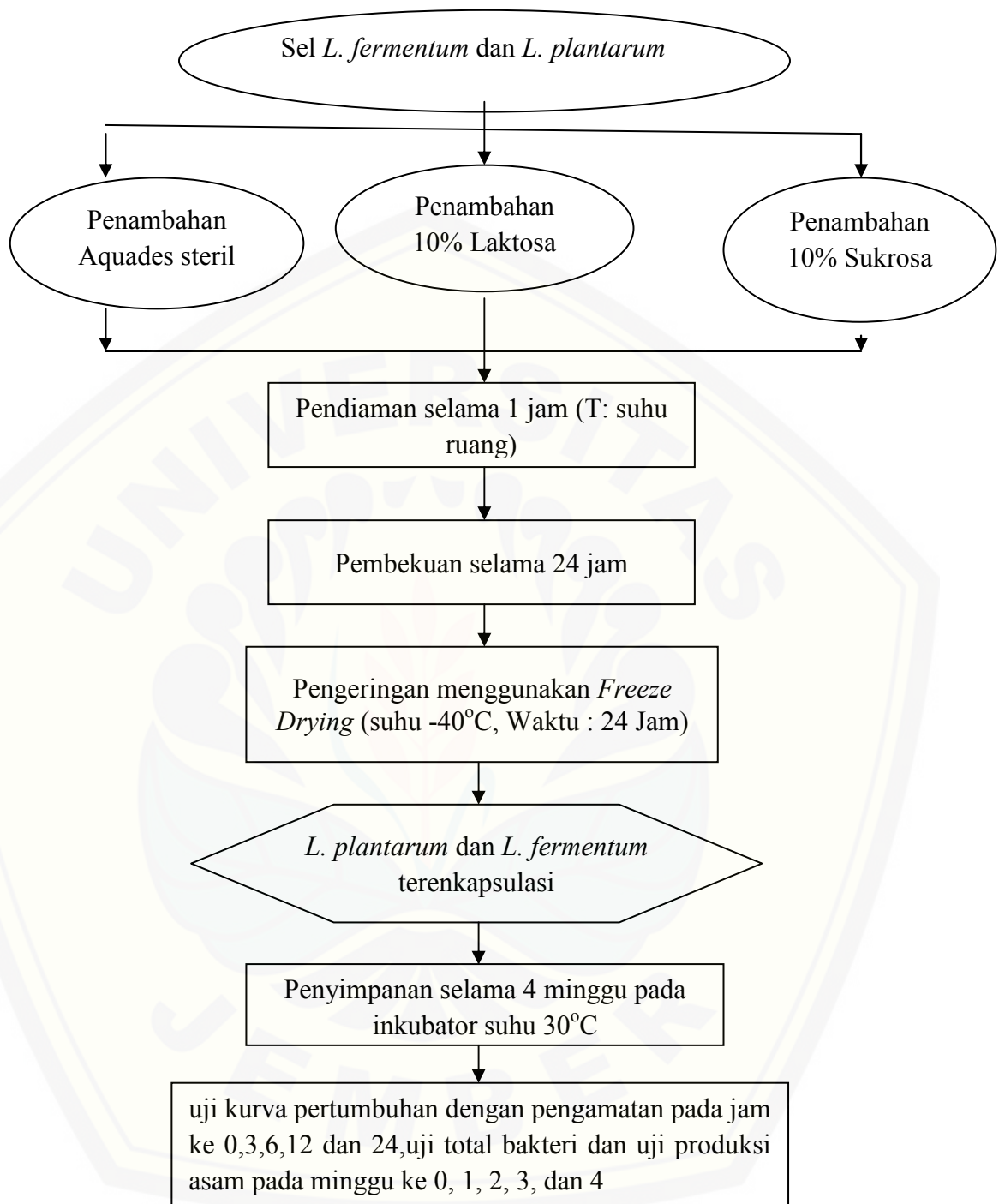
Kultur bakteri asam laktat yang telah ditumbuhkan dalam MRS Broth selama 24 jam pada suhu 37°C disentrifus selama 15 menit pada kecepatan 2000 rpm. Padatan hasil sentrifugasi dipisahkan dengan supernatannya dan dicuci dengan larutan fisiologis NaCl 0,85% sebanyak 2 kali, sehingga didapatkan padatan sel bakteri asam laktat. Diagram alir pemisahan sel bakteri asam laktat dengan media MRSB dapat dilihat pada **Gambar 3.3**.



Gambar 3.3 Diagram alir pemisahan sel bakteri asam laktat dengan media MRSB

c. Enkapsulasi bakteri asam laktat

Enkapsulasi dilakukan menggunakan metode *freeze drying*. Pada metode ini sel bakteri asam laktat ditambah dengan aquades atau larutan sukrosa 10% atau larutan laktosa 10% yang telah disterilisasi sebanyak volume awal media pembiakan sel. Selanjutnya sampel didiamkan selama satu jam sebelum dibekukan dalam *freezer* selama 24 jam, untuk dilanjutkan dengan *freeze drying* selama 24 jam pada suhu dibawah -40°C . Sel mikroba hasil enkapsulasi dianalisis dan disimpan pada suhu 30°C . Diagram alir enkapsulasi bakteri *L. plantarum* dan *L. fermentum* dapat dilihat pada **Gambar 3.4**.



Gambar 3.4 Diagram alir enkapsulasi bakteri *L. plantarum* dan *L. fermentum*

d. Analisa Data

Data yang didapatkan dari hasil pengamatan akan diolah dan dianalisa dari rata-rata tiga ulangan. Untuk mempermudah memahami data maka, data akan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik.

3.4 Parameter pengamatan

Parameter pengamatan dalam penelitian ini meliputi parameter mikroorganisme yang terdiri dari viabilitas sel hasil enkapsulasi menggunakan metode *Total Plate Count*, aktifitas sel mikroba menggunakan metode spektrofotometri, produksi asam, dan efisiensi enkapsulasi.

3.5 Prosedur Pengamatan

3.5.1 Total Bakteri Asam Laktat

Pengamatan terhadap total bakteri asam laktat dilakukan sebelum, sesudah enkapsulasi dan setelah penyimpanan 1,2,3,4 minggu. Hasil enkapsulasi ditambahkan aquades steril sampai volume awal sebelum enkapsulasi. Kemudian diambil 0,5 mL sebagai sampel. Sampel tersebut diencerkan sampai 8 kali menggunakan larutan fisiologis NaCl 0,85%. Diambil 0,1 mL dari 5 pengenceran terakhir dan ditumbuhkan pada cawan petri berisikan MRSA serta diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Total bakteri bakteri asam laktat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Total koloni (CFU/mL)} = \frac{\text{Total mikroba pada cawan petri}}{\frac{1}{\text{pengenceran}}}$$

3.5.2 Kurva Pertumbuhan (*Growth Curve*)

Pengamatan terhadap kurva pertumbuhan dilakukan sebelum dan sesudah enkapsulasi. Pengamatan terhadap kurva pertumbuhan ini dilakukan sampai minggu ke-4 setelah enkapsulasi. Hasil enkapsulasi ditambahkan aquades steril sampai volume awal sebelum enkapsulasi. Diambil 0,5 mL Selanjutnya dilakukan pengenceran menggunakan aquades steril sampai didapatkan tingkat transmittance 80-95%. Hasil pengenceran tersebut diinokulasikan pada 10 mL MRS Broth dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Dilakukan

pengamatan absorbansi pada jam ke 0, 3, 6, 12, dan 24 dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm.

3.5.3 Viabilitas bakteri terenkapsulasi

Pengujian ini menggunakan metode Donthidi *et al.* (2010) dimana menggunakan rumus:

$$\text{Viabilitas bakteri terenkapsulasi (\%)} = \frac{\text{bakteri yang terenkapsulasi} \times 100}{\text{bakteri yang dienkapsulasi}}$$

3.5.4 Produksi Asam

Pengamatan terhadap produksi asam dilakukan sebelum enkapsulasi, sesudah enkapsulasi, dan setelah penyimpanan 1, 2, 3 dan 4 minggu setelah enkapsulasi. Hasil enkapsulasi ditambahkan aquades steril sampai volume awal sebelum enkapsulasi, kemudian diambil 0,5 mL dan diinokulasikan pada 4,5 mL MRS Broth. Campuran diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diukur pH setelah fermentasi. Sebagai pembading dilakukan pengukuran total asam menggunakan titrasi asam-basa. Pengujian dilakukan dengan cara menginokulasikan 50µL sampel pada tabung eppendorf 1-1,5 mL berisikan 950µL media MRSB yang kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Media MRSB yang telah ditumbuhi oleh bakteri asam laktat tersebut disentrifuse selama 10 menit pada kecepatan 2000 rpm, yang bertujuan untuk memisahkan sel bakteri asam laktat dengan hasil metabolit. Sebanyak 1 mL supernatan hasil sentrifuse diencerkan dalam 50mL aquades, lalu ditambah 2-3 tetes indikator fenolftalin 1% kemudian dititrasi menggunakan NaOH 0,01 N sampai titik titrasi tercapai, yaitu terbentuk warna merah muda yang tidak memudar (tetap). Jumlah ml NaOH yang digunakan setara dengan total asam yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat sampel. Total asam dapat dihitung sebagai persen asam laktat menggunakan rumus:

$$\% \text{ asam laktat} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH (mol/L)} \times 1 \text{ L}/1000 \text{ ml} \times \text{BM Laktat} \times \text{FP} \times 100\%}{\text{ml sampel}}$$

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah:

1. Enkapsulasi *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* menggunakan laktosa memiliki viabilitas 93,81 (*Lactobacillus plantarum* A), 93,38 (*Lactobacillus plantarum* B) dan 87,87 (*Lactobacillus fermentum*) yang lebih baik jika dibandingkan dengan menggunakan sukrosa yakni 84,22 (*Lactobacillus plantarum* A), 84,21 (*Lactobacillus plantarum* B) dan 69,12 (*Lactobacillus fermentum*) maupun control 19,23 (*Lactobacillus plantarum* A), 21,64 (*Lactobacillus plantarum* B), 18,36 (*Lactobacillus fermentum*)
2. Viabilitas *Lactobacillus plantarum* terenkapsul memiliki viabilitas yang lebih baik jika dibandingkan dengan *Lactobacillus fermentum* terenkapsulasi menggunakan bahan pengkapsul laktosa, sukrosa maupun kontrol (aquades)
3. *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* terenkapsulasi menggunakan laktosa, sukrosa, dan aquades(kontrol) mengalami penurunan viabilitas serta memiliki pertumbuhan yang cenderung melambat pada penyimpanan suhu 30°C selama 4 minggu.
4. *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* terenkapsulasi menggunakan laktosa, sukrosa, dan aquades(kontrol) memiliki kemampuan produksi asam yang cenderung sama yakni berkisar 3-4 (pH) setelah penyimpanan pada suhu 30°C selama 4 minggu.

5.2 Saran

Perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut mengenai enkapulasi menggunakan bahan lain seperti protein dan gula alkohol yang memiliki nilai T_g lebih tinggi. Selain itu perlu dilakukan juga penelitian lebih lanjut mengenai kondisi penyimpanan bakteri terenkapsulasi untuk mendapatkan aktivitas bakteri dan viabilitas yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Abee T dan Wouters JA. 1999. Microbial Stress Response in Minimal Processing. *International Journal of Food Microbiology*. 50:65-91.
- Adebayo FA., OR afolabi., AK Akintokun. 2014. Antimicrobial Properties of Purified Bacteriocins Produces From *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* Against Selected Pathogenesis Microorganisms. *British journal of Medicine and Medical Research*. 4(18): 3415-3431.
- Archibald, F. and Fridovich, I. 1981. Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria, *J. Bacteriol.* 146: 928-936.
- Ardhana, M.M. and G.H. Fleet, 2003. The Microbial Ecology Of Cocoa Bean Fermentations In Indonesia. *International Journal Food Microbiol.* 86: 87-99.
- Barthelmebs, L., Divies, C., and Cavin, J-F. 2000. Knockout of the p-coumarate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum* reveals the existence of two other inducible enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism, *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3368-3375.
- Bhandari BR dan Howes T.1999.Implication of Glass Transition for The drying and Stability of Dried Food. *Journal of Food Engineering* 40:71-79.
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata F.X, Gibbs P.2002. Survival of Freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* During Storage in The Preceence of Protectants. *Biothechnology letters* 24:1587-1591.
- Carvalho AS., Silva J, Ho P., Malcata FX., Gibbs P.2004. Effects of Various Sugars Added to Growth and Drying Media Upon Thermotolerance and Survival Throughout Strorage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*. *Biotechnology progress* 20:248-254.
- Castro H P, P M Teixeria dan R Kirby.1997. Evidence of Membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying. *Journal of Applied Thecnology*. 82:87-94.
- Conrad PB., Miller DP., Cielenski PR., de Pablo JJ. 2010. Stabilization and Preservation and Evaluation of Controlled-release Formulations of 2,6-dichlorobenzonitrile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 14:519-528.

- Corcoran BM., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Stanton C.2004. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal Application Microbiology*. 96:1024-1039.
- Daeschel, M.A. and Nes, I.F.1995. *Lactobacillus plantarum*: physiology, genetics and applications in foods, in *Food Biotechnology Microorganisms*, Hui, Y.H. and Khachatourians, G.G., Eds., VCH Publishers, Inc., New York, chap. 21, pp. 721-743.
- Dianawati D.2014. *Survival of encapsulated probiotic bacteria during storage at low water activity at ambient temperature*. Disertasi. Victoria: Victoria university
- Dinas Perkebunan Bali.2012. *Kakao fermentasi berpotensi hasilkan nilai tambah Rp23 milyar*. Dinas Perkebunan Provinsi Bali.
- Drosinos, EH., Paramithiotis S., Kolovos G, Tsikouras I, Metaxopoulus I. etal.2007 Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiology*. 24:260-270.
- Fahrurrozi. 2015. *Microbiological And Biochemical Investigations Of Cocoa Bean Fermentation*. Dissertation. Hamburg: Universitas Hamburg
- Fleming, H.P., 1982. Fermented vegetables. In: Rose, A.H. (Ed.), *Economic Microbiology*. Fermented Foods. 7: 227– 258. Academic Press. New York.
- Foschino.,C Picozzi., A Galli. 2001. Comparative study of nine *Lactobacillus fermentum* bacteriophage. *Journal of Applied Microbiology* 91:394-403.
- Foster KD, John EB, dan AHJ Tony P. 2005. Glass Transition Related Cohesion Of Amorphous Sugar Powders. *Journal of food Engineering*. 77:997- 1006.
- Frarisa R.,2013. *Air Dalam Bahan Pangan*. [Http://risnafranisa.blogspot.co.id/2013/02/air-dalam-bahan-pangan.html](http://risnafranisa.blogspot.co.id/2013/02/air-dalam-bahan-pangan.html) (Diakses pada 19 April 2016)
- Hatiningsih. 2015. *Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat penghasil senyawa antikapang dari fermentasi kakao varietas forastero di PTPN XII Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi*. Skripsi. Jember:Universitas Jember.
- Held B W, JA Jurgens, BE Erenz, SM Duncan, RL Farrel, RA Blanchette. 2005. Environmental Factor Influencing Microbial Growth Inside The Historic Expedition Huts Of Ross Island , Antartica. *Journal International Biodeteration & Biodegradation*. 55:45-53.

- Hubalek Z. 2013. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Review. *Cryobiology*. 46:205-229.
- Kleerebezem, M., Moekhorst J., Van K.R., Molenaar D., Kuipers O.P., Leer R., Stiekema W., Lankhorst R.M.K., Bron P.A., Hoffer S.M., Groot M.N.N., Kerkhove R., de Vries M., Ursing B., de Vos W.M., dan Siezen R.J. 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 1990-1995.
- Krasaekoopt W, Bhandari W, Deeth H .2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *Int. Dairy J.* 13:3-13.
- Kustyawati ME dan Sri S. 2008. Pengaruh Penambahan Inokulum Campuran Terhadap Perubahan Kimia dan Mikrobiologi Selama Fermentasi Coklat. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*.13:2.
- Kusumaningrum. 2010. *Sukrosa*. <http://panji-kusuma.blogspot.com/2010/11/sukrosa.html> (diakses tanggal 19 Juli 2018)
- Mansouripour S, Esfandiari Z, dan Nateghi L. 2013. The Effect of Heat process on the survival and increased viability of prebiotic by microencapsulation. Review. *Annals of Biological Research*. 4(4):83-87.
- Meersman , Jan S., Melissa M., Pieter-jan W., Veerle S., Nore S., Herwig B., Gino V., Kevin JV. 2013. Detailed Analysis Of The Microbial Population In Malaysian Spontaneous Cocoa Pulp Fermentations Reveals A Core And Variable Microbiota. *PLoS ONE*. 8(12):e81559.
- Mille Y., Beney L., Gervais P . 2005. Compared Tolerance to Osmotic Stress in Various Microorganisms: Towards a Survival Prediction Test. *Biotechnology and Bioengineering*. 92:479-484.
- Mita.2016. *Lactobacillus plantarum-stiven mita*. <https://fermentationstations.wordpress.com/2016/09/26/lactobacillus-plantarum-stiven-mita/>. (diakses pada 19 Juli 2018)
- Mortazavian A ., Razavi S.H., Ehsani M.R., dan Sohrabvandi S . 2007. Principles and Methods of microencapsulation probiotic microorganism. Review. *Iranian Journal of Biothechnology*. 5:1.
- Najihullah.2015. *Percobaan VII senyawa bio organik:karbohidrat (kimia dasar I)*. <http://najihullah.blogspot.com/2015/09/percobaan-vii-senyawa-bio-organik.html>. (diakses tanggal 19 Juli 2018)
- Onno, B. and Roussel, P. 1994. *Technologie et microbiologie de la panification au levain*. In *Bacteries Lactiques, Aspects Fondamentaux et*

- Technologiques Vol 2: 293-321, eds De Roissart, H. and Luquet, F.M. Uriage, France: Lorica.
- Osawa, R., Kuroiso K., Goto S., Shimzu A. 2000. Isolation of tannin-degrading lactobacilli from humans and fermented foods, *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3093-3097.
- Ouattara D.H., Hanore G.O., Bernadette G.G., Liliana M.K., dan Sebatiën L.N. 2014. Biochemical And Funcional Properties Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Ivorian Cocoa Fermenting Beans. *Journal of Applied Bioscience.* 77:6489-6499.
- Pederson, C.S., Albury, M.N., 1969. *The sauerkraut fermentation.* NY State Agric. Exp. Sta. Tech. Bull. No. 824. Geneva, NY.
- Poullain, F. 1994. Fermentation des laits veÂgeÂtaux. In BacteÂries Lactiques, Aspects Fondamentaux et Technologiques Vol. 2:245-256 eds De Roissart, H. and Luquet, F.M. Uriage, France: Lorica.
- Rault, A., Béal, C., Ghorbal, S., Ogier, J.-C. and Bouix, M. 2007. Multiparametric Flow Cytometry Allows Rapid Assessment and Comparison of Lactic Acid Bacteria Viability after Freezing and during Frozen Storage. *Cryobiology.* 55:35-43.
- Schoug A., Olsson J., Carlfors J., Schuner J., Hakanson S. 2006. Freeze-Drying of *Lactobacillus coryniformis* Si3-effect of Sucrose Concentration, Cell Density, and Freezing Rate on cell survival and Thermophysical properties. *Cryobiology.* 53:119-127
- Semyonov D., Ory R., Luba L., Nadya G., dan Eyal S. 2010. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food Research International.* 43:193-202.
- Serna-Cock.L dan Vallejo-Castillo V. 2013. Probiotic encapsulation review. *African Journal of Microbiology.* 7 (40):4743-4753.
- Spicher, G. and SchroÈder, R. 1978. The microflora of sourdough. IV Communication: bacterial composition of sourdough starters (Genus *Lactobacillus* Beijerinck). *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 167:342-354.
- Sudarmadji, S,m Haryono, B., dan Suhardi. 1997. *Prosedur Analisa Bahan Makanan.* Yogyakarta: Liberty.
- Sulaiman KB, Wan Aidah WI, dan Tajul AY. 2014. Effect fermentation duration using shallow box on pH, equivalent percent fully brown and flavour

attributes of Malaysian cocoa beans. *Journal of Applied science and agriculture*. 9(11):104-108.

Thompson S.S., Miller K.B., Lopez A.S.2001. Cocoa and coffee. In Doyle MJ, Beuchat LR, Montville TJ (eds) *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 2nd (edn). ASM Press, Washington, DC.

Tsvetkova N.M., Brian L.P., Lois M.C., John H.C dan Subhash H.R.1998.Effect of Sugars on Headgroup Mobility in freeze-Dry Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayers: Solid-State ³¹P NMR and FTIR Studies. *Biophysical Journal*. 75:2947-2955.

Vaquero, I.Marcobal A., dan Munoz R. 2004. Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology*. 96: 199-204.

Zayed G dan Roos YH.2004. Influence of Trehalose and Moisture Content on Survival of *Lactobacillus salivarius* Subjected to Freeze-drying and Storage. *Process Biochemistry*. 39:1081-1086.

Zhang G., Mingtao F., Yahui L., Panxue W., dan Qian L. 2012. Effect of Growth phase, protective agents, rehydration media and stress pretreatments on viability of *Oenococcus oeni* subjected to freeze-drying. *African Journal Of Microbiology Research*.6(7):1479-1484.

Zuidam NJ, Nedovic VA. 2010. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer. USA.

Lampiran 4.1. Pertumbuhan *Lactobacillus platarum* dan *Lactobacillus fermentum* sebelum dan setelah enkapsulasi

Sebelum Enkapsulasi						
Sempel	Ulangan ke-	Jam ke-				
		0	3	6	12	24
<i>Lactobacillus platarum</i> A-Kontrol	1	0,21	0,23	0,33	0,49	0,59
	2	0,24	0,25	0,37	0,59	0,62
	3	0,19	0,23	0,33	0,49	0,63
	4	0,24	0,26	0,36	0,59	0,63
	5	0,21	0,23	0,34	0,62	0,59
	6	0,24	0,25	0,37	0,62	0,64
	Rata-Rata		0,23	0,25	0,35	0,57
<i>Lactobacillus platarum</i> B-Kontrol	1	0,13	0,24	0,40	0,53	0,59
	2	0,19	0,25	0,48	0,63	0,64
	3	0,12	0,17	0,28	0,50	0,59
	4	0,20	0,23	0,37	0,58	0,60
	5	0,14	0,18	0,28	0,60	0,59
	6	0,20	0,23	0,37	0,58	0,60
	Rata-Rata		0,17	0,22	0,37	0,57
<i>Lactobacillus fermentum</i> -Kontrol	1	0,11	0,18	0,38	0,63	0,59
	2	0,20	0,22	0,46	0,69	0,64
	3	0,11	0,18	0,39	0,62	0,60
	4	0,22	0,23	0,46	0,66	0,64
	5	0,22	0,23	0,35	0,63	0,59
	6	0,24	0,25	0,46	0,64	0,65
	Rata-Rata		0,19	0,22	0,42	0,65

Sempel	Ulangan ke-	Jam ke-				
		0	3	6	12	24
Setelah enkapsulasi						
<i>Lactobacillus plantarum</i> A-Kontrol	1	0,21	0,23	0,29	0,56	0,56
	2	0,29	0,32	0,33	0,53	0,53
Rata-Rata		0,54	0,27	0,31	0,55	0,55
<i>Lactobacillus plantarum</i> A-Sukrosa	1	0,21	0,25	0,34	0,57	0,57
	2	0,28	0,31	0,37	0,54	0,54
Rata-Rata		0,25	0,28	0,35	0,55	0,55
<i>Lactobacillus plantarum</i> A-Laktosa	1	0,21	0,25	0,37	0,57	0,57
	2	0,28	0,33	0,37	0,56	0,56
Rata-Rata		0,25	0,29	0,37	0,57	0,58
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-Kontrol	1	0,21	0,21	0,28	0,55	0,58
	2	0,29	0,31	0,34	0,47	0,53
Rata-Rata		0,25	0,26	0,31	0,56	0,56
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-Sukrosa	1	0,21	0,23	0,38	0,56	0,62
	2	0,28	0,31	0,38	0,55	0,58
Rata-Rata		0,25	0,27	0,38	0,55	0,60
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-Laktosa	1	0,21	0,24	0,41	0,56	0,65
	2	0,28	0,31	0,26	0,55	0,61
Rata-Rata		0,25	0,27	0,38	0,56	0,63

Sempel	Ulangan ke-	Jam ke-				
		0	3	6	12	24
<i>Lactobacillus fermentum</i> -Kontrol	1	0,20	0,21	0,32	0,56	0,57
	2	0,29	0,31	0,33	0,48	0,53
Rata-Rata		0,25	0,26	0,32	0,52	0,55
<i>Lactobacillus fermentum</i> -Sukrosa	1	0,21	0,23	0,37	0,56	0,58
	2	0,30	0,32	0,36	0,52	0,54
Rata-Rata		0,26	0,27	0,37	0,54	0,56
<i>Lactobacillus fermentum</i> -Laktosa	1	0,22	0,22	0,42	0,60	0,62
	2	0,29	0,31	0,38	0,55	0,58
Rata-Rata		0,25	0,26	0,40	0,57	0,60
Penyimpanan 1 Minggu						
<i>Lactobacillus plantarum</i> A-Kontrol	1	0,35	0,26	0,38	0,48	0,59
	2	0,23	0,24	0,27	0,41	0,61
		0,29	0,25	0,33	0,44	0,60
<i>Lactobacillus plantarum</i> A-Sukrosa	1	0,25	0,25	0,29	0,52	0,60
	2	0,22	0,27	0,33	0,54	0,62
		0,24	0,26	0,31	0,53	0,61
<i>Lactobacillus plantarum</i> A-Laktosa	1	0,24	0,27	0,29	0,52	0,60
	2	0,23	0,26	0,27	0,52	0,59
		0,23	0,27	0,28	0,52	0,60

Sempel	Ulangan ke-	Jam ke-				
		0	3	6	12	24
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-Kontrol	1	0,25	0,26	0,27	0,51	0,59
	2	0,23	0,23	0,25	0,41	0,58
Rata-Rata		0,24	0,25	0,26	0,47	0,58
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-Sukrosa	1	0,25	0,26	0,29	0,52	0,60
	2	0,23	0,24	0,26	0,53	0,63
Rata-Rata		0,24	0,25	0,27	0,53	0,62
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-Laktosa	1	0,25	0,27	0,29	0,53	0,62
	2	0,23	0,26	0,27	0,54	0,64
Rata-Rata		0,24	0,26	0,28	0,53	0,63
<i>Lactobacillus fermentum</i> -Kontrol	1	0,29	0,26	0,28	0,52	0,59
	2	0,26	0,24	0,27	0,51	0,61
Rata-Rata		0,28	0,25	0,27	0,52	0,60
<i>Lactobacillus fermentum</i> -Sukrosa	1	0,26	0,32	0,28	0,50	0,58
	2	0,23	0,27	0,27	0,53	0,57
Rata-Rata		0,24	0,29	0,28	0,51	0,57
<i>Lactobacillus Fermentum</i> -Laktosa	1	0,24	0,28	0,33	0,56	0,59
	2	0,23	0,27	0,30	0,59	0,58
Rata-Rata		0,23	0,27	0,32	0,57	0,58

Sempel	Ulangan ke-	Jam ke-				
		0	3	6	12	24
Penyimpanan 2 Minggu						
<i>Lactobacillus plantarum</i> A-Kontrol	1	0,25	0,26	0,27	0,30	0,57
	2	0,19	0,22	0,22	0,47	0,53
Rata-Rata		0,22	0,24	0,25	0,38	0,55
<i>Lactobacillus plantarum</i> A-Sukrosa	1	0,26	0,26	0,28	0,55	0,57
	2	0,20	0,22	0,23	0,53	0,58
Rata-Rata		0,23	0,24	0,25	0,54	0,57
<i>Lactobacillus plantarum</i> A-Laktosa		0,25	0,25	0,26	0,56	0,59
		0,19	0,23	0,23	0,57	0,59
Rata-Rata		0,22	0,24	0,25	0,57	0,59
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-Kontrol		0,21	0,22	0,26	0,30	0,51
		0,22	0,22	0,24	0,25	0,53
Rata-Rata		0,21	0,22	0,25	0,27	0,52
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-Sukrosa		0,24	0,25	0,27	0,54	0,64
		0,21	0,22	0,32	0,57	0,63
Rata-Rata		0,25	0,23	0,29	0,55	0,64
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-Laktosa		0,25	0,26	0,27	0,56	0,70
		0,22	0,22	0,31	0,60	0,64
Rata-Rata		0,23	0,24	0,29	0,58	0,67

Sempel	Ulangan ke-	Jam ke-				
		0	3	6	12	24
<i>Lactobacillus fermentum</i> -Kontrol		0,22	0,22	0,25	0,40	0,56
		0,21	0,22	0,22	0,36	0,54
		0,21	0,22	0,23	0,38	0,55
<i>Lactobacillus fermentum</i> -Sukrosa		0,22	0,25	0,28	0,53	0,58
		0,21	0,22	0,32	0,57	0,61
		0,22	0,23	0,30	0,55	0,59
<i>Lactobacillus fermentum</i> -Laktosa	1	0,25	0,26	0,26	0,58	0,58
	2	0,21	0,22	0,22	0,58	0,65
Rata-Rata		0,23	0,24	0,24	0,58	0,62
Penyimpanan 3 Minggu						
<i>Lactobacillus plantarum</i> A-Kontrol	1	0,22	0,23	0,26	0,32	0,59
	2	0,22	0,22	0,23	0,36	0,55
Rata-Rata		0,22	0,23	0,24	0,34	0,57
<i>Lactobacillus plantarum</i> A-Sukrosa	1	0,21	0,23	0,24	0,58	0,59
	2	0,22	0,23	0,23	0,51	0,55
Rata-Rata		0,21	0,23	0,24	0,54	0,57
<i>Lactobacillus plantarum</i> A-Laktosa	1	0,21	0,25	0,32	0,60	0,69
	2	0,22	0,22	0,31	0,56	0,63
Rata-Rata		0,22	0,23	0,32	0,58	0,66

Sempel	Ulangan ke-	Jam ke-				
		0	3	6	12	24
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-Kontrol		0,21	0,23	0,26	0,34	0,59
		0,22	0,22	0,23	0,23	0,53
		0,22	0,23	0,24	0,28	0,56
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-Sukrosa		0,21	0,24	0,25	0,5	0,6
		0,22	0,23	0,24	0,5	0,57
		0,21	0,23	0,24	0,5	0,58
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-Laktosa	1	0,23	0,25	0,27	0,58	0,62
	2	0,23	0,22	0,24	0,54	0,63
Rata-Rata		0,22	0,23	0,25	0,56	0,62
<i>Lactobacillus fermentum</i> -Kontrol	1	0,23	0,24	0,25	0,33	0,49
	2	0,22	0,23	0,23	0,33	0,53
Rata-Rata		0,22	0,23	0,24	0,33	0,51
<i>Lactobacillus fermentum</i> -Sukrosa	1	0,22	0,23	0,24	0,56	0,59
	2	0,22	0,23	0,24	0,51	0,54
Rata-Rata		0,22	0,23	0,24	0,53	0,56
<i>Lactobacillus fermentum</i> -Laktosa	1	0,23	0,24	0,33	0,59	0,60
	2	0,22	0,23	0,23	0,60	0,64
Rata-Rata		0,22	0,24	0,28	0,59	0,62

Sempel	Ulangan ke-	Jam ke-				
		0	3	6	12	24
Penyimpanan 4 Minggu						
<i>Lactobacillus plantarum</i> A-Kontrol		0,34	0,35	0,37	0,38	0,51
		0,23	0,23	0,24	0,26	0,55
		0,28	0,29	0,30	0,32	0,53
<i>Lactobacillus plantarum</i> A-Sukrosa		0,33	0,35	0,36	0,49	0,53
		0,22	0,22	0,23	0,55	0,65
		0,27	0,28	0,29	0,52	0,59
<i>Lactobacillus plantarum</i> A-Laktosa	1	0,34	0,35	0,36	0,49	0,64
	2	0,22	0,23	0,23	0,55	0,67
Rata-Rata		0,28	0,29	0,30	0,52	0,65
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-Kontrol	1	0,34	0,36	0,36	0,42	0,50
	2	0,22	0,23	0,23	0,25	0,56
Rata-Rata		0,28	0,29	0,30	0,33	0,53
<i>Lactobacillus plabtarum</i> B-Sukrosa	1	0,34	0,359	0,36	0,48	0,54
	2	0,22	0,23	0,23	0,48	0,57
Rata-Rata		0,28	0,29	0,30	0,48	0,56
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-Laktosa	1	0,32	0,35	0,35	0,51	0,56
	2	0,22	0,22	0,24	0,58	0,63
Rata-Rata		0,27	0,28	0,30	0,55	0,59

Sempel	Ulangan ke-	Jam ke-				
		0	3	6	12	24
<i>Lactobacillus fermentum</i> -Kontrol		0,33	0,36	0,37	0,46	0,53
		0,23	0,22	0,22	0,24	0,55
		0,28	0,29	0,30	0,35	0,54
<i>Lactobacillus fermentum</i> -Sukrosa		0,33	0,35	0,37	0,40	0,54
		0,22	0,23	0,23	0,52	0,57
		0,27	0,29	0,30	0,46	0,55
<i>Lactobacillus fermentum</i> -Laktosa	1	0,34	0,36	0,30	0,52	0,54
	2	0,22	0,23	0,37	0,55	0,61
Rata-Rata		0,28	0,29	0,24	0,53	0,58

Lampiran 4.2 Total dan viabilitas *Lactobacillus platarum* dan *Lactobacillus fermentum* sebelum dan setelah enkapsulasi

Kontrol									
Masa Penyimpanan	Populasi bakteri (CFU/ml)						Viabilitas sel (%)		
	<i>L. plantarum</i> A		<i>L. plantarum</i> B		<i>L. fermentum</i>		<i>L. plantarum</i> A	<i>L. plantarum</i> B	<i>L. fermentum</i>
Sebelum enkapsulasi	1.3 x 10 ⁸	1.4 x 10 ⁸	3.1 x 10 ⁸	2.2 x 10 ⁸	3.4 x 10 ⁸	2.6x10 ⁸	100	100	100
Rata-rata	1,31 x 10 ⁸ ±0,07		2,7 x 10 ⁸ ±0,59		3,01x 10 ⁸ ±0,55				
Setelah enkapsulasi	1.1x 10 ⁷	3.9 x10 ⁷	7,4 x 10 ⁷	4.2 x 10 ⁷	9.2x 10 ⁷	1.8x 10 ⁷	19.23	21,64	18,36
Rata-rata	2.51 x 10 ⁷ ±1,96		5,8 x 10 ⁷ ±2,26		5,52 x 10 ⁷ ±5,20				
1 Minggu	3.5 x10 ⁵	7.3 x10 ⁵	5.8 x 10 ⁵	5.7 x 10 ⁵	3.6 x 10 ⁶	7.2x10 ⁶	0.41	1,17	1,79
Rata-rata	5.4 x 10 ⁶ ±2,69		3,14 x 10 ⁶ ±3,62		5,4 x 10 ⁶ ±2,55				
2 Minggu	1.2 x 10 ⁵	1.0x10 ⁵	5.1 x 10 ⁵	2.7 x 10 ⁴	3.6 x 10 ⁵	4.2x10 ⁴	0,08	0,10	0,06
Rata-rata	1,15 x 10 ⁵ ±0,13		2,68 x 10 ⁵ ±3,41		2,01 x 10 ⁵ ±2,25				
3 Minggu	9.8 x 10 ⁴	4.6 x 10 ⁴	4.5 x 10 ³	2.0 x 10 ⁴	1.3x10 ⁴	1.2x10 ⁴	0,05	0.0046	0,004
Rata-rata	7.2 x 10 ⁴ ±3,68		1,25 x 10 ⁴ ±1,14		1,3 x 10 ⁴ ±0,03				
4 Minggu	5.3 x 10 ²	6.3 x10 ²	2.0 x 10 ⁴	1.9 x 10 ³	4.4x10 ³	5.0x10 ³	0,0004	0,0041	0,001
Rata-rata	5,81 x 10 ² ±0,71		1.11 x 10 ⁴ ±1,30		4,7 x 10 ³ ±0,42				
Sukrosa									
Sebelum enkapsulasi	5.5x 10 ⁸	1.2x10 ⁸	2.7x10 ⁸	1.0x10 ⁸	7.5x10 ⁸	1.4x10 ⁸	100	100	100
Rata-rata	3,36 x 10 ⁸ ±3,02		1,9 x 10 ⁸ ±1,24		4.47 x 10 ⁸ ±1,38				
Setelah enkapsulasi	4.8x10 ⁸	8.6x10 ⁷	1.3x10 ⁸	1.8x10 ⁸	1.0x10 ⁸	5.1x10 ⁸	84,22	84,21	69,12
Rata-rata	2,83 x 10 ⁸ ±2,78		1,6 x 10 ⁸ ±0,39		3,09 x 10 ⁸ ±2,84				

Masa Penyimpanan	Populasi bakteri (CFU/ml)						Viabilitas sel (%)		
	<i>L. plantarum</i> A		<i>L. plantarum</i> B		<i>L. fermentum</i>		<i>L. plantarum</i> A	<i>L. plantarum</i> B	<i>L. fermentum</i>
1 Minggu	9.2x10 ⁷	6.7x10 ⁷	6.9x10 ⁷	5.7x10 ⁷	7.3x10 ⁷	7.6x10 ⁷	23,66	33,15	16,66
Rata-rata	7,95 x 10 ⁷ ±1,77		6,3 x 10 ⁷ ±0,85		7,45 x 10 ⁷ ±0,21				
2 Minggu	3.0x10 ⁷	5.3x10 ⁶	1.4x10 ⁷	1.6x10 ⁷	2.0x10 ⁷	1.3x10 ⁷	5,25	8.00	3,83
Rata-rata	1,77 x 10 ⁷ ±1,75		1.52 x 10 ⁷ ±0,11		1,17 x 10 ⁷ ±0,46				
3 Minggu	7.4x10 ⁶	8.0x10 ⁶	1.0x10 ⁷	4.3x10 ⁶	7.9x10 ⁶	2.2 x 10 ⁶	2,29	3,84	1,13
Rata-rata	7,0 x 10 ⁶ ±0,42		7,3 x 10 ⁶ ±4,24		5.08 x 10 ⁶ ±3,98				
4 Minggu	1.8x10 ⁶	1.7x10 ⁶	4.4x10 ⁶	5.4x10 ⁶	9.4x10 ⁵	8.6x10 ⁵	0,53	2,57	0,002
Rata-rata	1,79 x 10 ⁶ ±0,04		4,9x 10 ⁶ ±0,71		9,0 x 10 ⁵ ±0,57				
Laktosa									
Sebelum enkapsulasi	5.5x10 ⁸	1.9x10 ⁸	3.5x10 ⁸	1.7x10 ⁸	1.2x10 ⁸	7.5x10 ⁸	100	100	100
Rata-rata	3.7 x 10 ⁸ ±2,51		2,65 x 10 ⁸ ±1,20		4.36 x 10 ⁸ ±4,44				
Setelah enkapsulasi	5,6x10 ⁷	1.3x10 ⁸	3.7x10 ⁸	1.2x10 ⁸	9.6x10 ⁷	6.7x10 ⁸	93,81	93,38	87,84
Rata-rata	3,49 x 10 ⁸ ±2,98		2,47 x 10 ⁸ ±1,73		3, 83 x 10 ⁸ ±4,05				
1 Minggu	3.8x10 ⁸	1,27x10 ⁸	1.1x10 ⁸	3.6x10 ⁸	3.5x10 ⁷	3.8x10 ⁸	68,14	90,17	47,59
Rata-rata	2,53x 10 ⁸ ±1,79		2,39 x 10 ⁸ ±1,72		2,07 x 10 ⁸ ±2,44				
2 Minggu	4.5x10 ⁷	3.0x10 ⁷	5.2x10 ⁷	3.9x10 ⁷	2.9x10 ⁷	2.5x10 ⁷	10,08	17,20	6,30
Rata-rata	3.8 x 10 ⁷ ±1,06		4,5 x 10 ⁷ ±0,92		2,75 x 10 ⁷ ±0,23				
3 Minggu	1.1x10 ⁷	4.7x10 ⁷	3.4x10 ⁷	1.5x10 ⁷	1.9x10 ⁷	2.2x10 ⁷	7,91	9,39	4,83
Rata-rata	2,94 x 10 ⁷ ±2,48		2,48 x 10 ⁷ ±1,29		2,11 x 10 ⁷ ±0,25				
4 Minggu	7.9x10 ⁶	6,3x10 ⁶	2.0x10 ⁷	1.9x10 ⁷	1.0x10 ⁷	9.7x10 ⁶	1,90	7,67	2,27

Rata-rata	7,1 x 10 ⁶ ±1,13	2,03 x 10 ⁷ ±0,08	9,90 x 10 ⁶ ±0,28		
-----------	-----------------------------	------------------------------	------------------------------	--	--

Lampiran 4.3 Produksi asam dan pH *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* sebelum dan setelah enkapsulasi

Kontrol												
Masa Penyimpanan	Total Asam Laktat (%)						pH					
	<i>L. plantarum</i> A		<i>L. plantarum</i> B		<i>L. fermentum</i>		<i>L. plantarum</i> A		<i>L. plantarum</i> B		<i>L. fermentum</i>	
Sebelum enkapsulasi	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,18	4,1	4	4,3	4	4,24	4,34
Rata-rata	0,17±0,0		0,17±0,0		0,17±0,0		4,05±0,07		4,15±0,21		4,29±0,07	
Setelah enkapsulasi	0,21	0,21	0,22	0,22	0,22	0,21	4,04	4,04	3,8	4,09	3,86	3,62
Rata-rata	0,21±0,0		0,22±0,0		0,22±0,01		4,04±0,00		4,01±0,21		3,74±0,17	
1 Minggu	0,19	0,19	0,21	0,22	0,21	0,20	3,8	3,67	3,89	3,8	3,69	3,78
Rata-rata	0,19±0,00		0,22±0,01		0,21±0,01		3,73±0,09		3,84±0,06		3,73±0,06	
2 Minggu	0,19	0,20	0,16	0,17	0,02	0,21	3,13	3,83	3,8	3,61	3,8	3,65
Rata-rata	0,19±0,0		0,16±0,0		0,11±0,14		3,48±0,49		3,70±0,13		3,72±0,11	
3 Minggu	0,08	0,19	0,17	0,16	0,17	0,17	3,24	3,24	3,94	3,30	3,57	3,32
Rata-rata	0,18±0,01		0,16±0,01		0,17±0,0		3,24±0,00		3,62±0,45		3,44±0,18	
4 Minggu	0,20	0,20	0,16	0,17	0,19	0,20	3,99	3,61	3,58	3,78	3,56	3,66
Rata-rata	0,20±0,0		0,17±0,01		0,19±0,01		3,8±0,27		3,68±0,14		3,61±0,07	
Sukrosa												
Sebelum enkapsulasi	0,17	0,17	0,17	0,16	0,19	0,19	4,4	4,2	4,1	3,8	4,03	4,20
Rata-rata	0,17±0,0		0,17±0,01		0,19±0,0		4,3±0,14		3,95±0,21		4,11±0,12	
Setelah enkapsulasi	0,20	0,19	0,21	0,22	0,20	0,21	3,94	4,09	3,89	3,95	3,87	3,63

Masa Penyimpanan	Total Asam Laktat (%)						pH					
	<i>L. plantarum</i> A		<i>L. plantarum</i> B		<i>L. fermentum</i>		<i>L. plantarum</i> A		<i>L. plantarum</i> B		<i>L. fermentum</i>	
1 Minggu	0,21	0,22	0,20	0,20	0,20	0,20	3,79	4,22	4,45	4,00	4,84	3,6
Rata-rata	0,21±0,0		0,20±0,0		0,20±0,01		4,00±0,30		4,22±0,32		4,22±0,88	
2 Minggu	0,21	0,22	0,19	0,19	0,20	0,20	4,16	4,53	4,43	4,35	3,19	4,2
Rata-rata	0,21±0,01		0,19±0,01		0,20±0,01		4,34±0,26		4,39±0,06		3,69±0,71	
3 Minggu	0,21	0,21	0,16	0,16	0,17	0,16	3,09	3,25	3,92	4,55	3,62	3,13
Rata-rata	0,21±0,0		0,16±0,0		0,17±0,0		3,17±0,11		4,23±0,45		3,37±0,35	
4 Minggu	0,19	0,19	0,18	0,19	0,19	0,19	4,05	3,83	3,57	3,78	3,27	3,66
Rata-rata	0,19±0,0		0,19±0,0		0,19±0,0		3,94±0,16		3,67±0,15		3,46±0,28	
Laktosa												
Sebelum enkapsulasi	0,18	0,19	0,16	0,16	0,20	0,19	4,30	3,90	3,70	3,80	4,11	3,89
Rata-rata	0,19±0,01		0,16±0,00		0,20±0,01		4,10±0,28		3,75±0,07		4,00±0,16	
Setelah enkapsulasi	0,20	0,19	0,21	0,21	0,21	0,21	3,90	3,87	3,51	3,50	3,67	3,70
Rata-rata	0,20±0,01		0,21±0,0		0,21±0,0		3,88±0,02		3,50±0,01		3,68±0,02	
1 Minggu	0,23	0,23	0,18	0,19	0,21	0,20	3,69	3,70	3,76	3,67	3,68	3,68
Rata-rata	0,23±0,0		0,19±0,0		0,21±0,01		3,69±0,01		3,71±0,06		3,68±0,00	
2 Minggu	0,19	0,18	0,18	0,19	0,17	0,18	3,73	3,65	2,97	4,30	3,51	3,52
Rata-rata	0,18±0,0		0,19±0,0		0,18±0,0		3,69±0,06		3,60±0,94		3,51±0,01	
3 Minggu	0,21	0,21	0,24	0,23	0,17	0,17	3,18	3,36	3,14	3,28	3,27	3,19
Rata-rata	0,21±0,0		0,23±0,01		0,17±0,0		3,27±0,13		3,21±0,10		3,23±0,06	
4 Minggu	0,21	0,20	0,20	0,20	0,19	0,20	3,94	3,67	3,68	3,94	3,84	3,70
Rata-rata	0,21±0,01		0,20±0,0		0,19±0,01		3,80±0,19		3,81±0,18		3,77±0,10	
Rata-rata	0,20±0,01		0,21±0,0		0,20±0,0		4,01±0,11		3,92±0,04		3,75±0,17	

