

BAB IV

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

4.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah susu UHT *Full Cream* “Ultra Milk” Ultra Jaya, kultur bakteri *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051, akuades, larutan NaCl merk Riedel-de Haën 31434 0,85%, larutan Na-sitrat 0,1 M teknis, Na-Alginat murni merk Zigma A2033-100G, larutan CaCl₂ 1% teknis, air pepton 0,1% (Peptone from meat merk “MERCK 1.07224.1000”), NaOH 0,1 N (p.a.), asam oksalat 0,1 N, indikator *phenolphthalein* 1%, alkohol 96%, larutan Crystal Violet modifikasi Hucker, larutan iodin, larutan alkohol aseton, larutan Safranin Gram Stain, minyak immerse, kertas lensa, sumbat kapas, aluminium foil, kertas coklat dan korek api.

Media yang digunakan untuk analisa mikrobiologi adalah deMan, Rogosa, Sharpe bouillon (yang selanjutnya disebut MRS) Broth (Pronadisa Cat. 1215.00), Bacto Agar (MERCK 214010), dan MRS Agar (Pronadisa Cat. 1043.00). Komposisi dan cara pembuatan media dan larutan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran A.

4.2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlenmeyer, beker glass, tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan petri, pipet ukur, kawat ose, batang pengaduk, sendok porselen, sendok plastik, thermometer 0-100°C, bunsen, kaki tiga, kassa asbes, penangas air, sumbat kapas, spiritus, syring “Termuno”, spuit injeksi “Terumo Needle” single use (1,20x38mm), cup plastik PP Lionstar kapasitas 145 mL, plastik PP Lionstar kapasitas 100 mL, cup plastik PP Lionstar kapasitas 45 mL, enkast, timbangan digital

“Mettler Toledo GB 1302”, vortex “ThermolyneSybron Type 37.600 mixer”, inkubator “WTB Binder” dan “Memmert”, autoklaf “All American Model No.25X”, oven “WTB Binder”, *laminar flow* “Telstar AV-100”, lemari es “Rotary Compressor Mitsubishi”, Mikroskop “Nikon”, Mikrometer “Link’s Brand”, pH meter (merk “Trans Instrument” TI-2100), buret (merk “Assistent”), statif, corong,

kertas saring kasar, botol timbang (merk ”RRC)Texture Profile Analyzer “Stable Micro Systems Texturometer model TA-XT2i”. Spesifikasi cup dan cara sterilisasi cup dapat dilihat pada Lampiran B.

4.3. Waktu dan Tempat Penelitian

4.3.1. Waktu Penelitian

Penelitian pendahuluan dilaksanakan pada bulan Juni 2013 sampai dengan bulan November 2013. Penelitian utama akan dilaksanakan pada bulan November 2013 sampai dengan bulan Desember 2013.

4.3.2. Tempat Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Industri Pangan, Laboratorium Kimia, Laboratorium Teknologi Pengolahan Pangan, Laboratorium Analisa Pangan, Laboratorium Biokimia Pangan dan Gizi Pangan, dan Laboratorium Penelitian Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

4.4. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) desain faktorial yang terdiri dari dua faktor yaitu konsentrasi Na alginat yang terdiri dari 3 (tiga) level dan lama penyimpanan yang terdiri dari 3 (tiga) level, sehingga diperoleh 9 kombinasi perlakuan.

Masing-masing kombinasi perlakuan akan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali sehingga akan diperoleh total 27 unit eksperimen. Rancangan penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Parameter yang akan diuji adalah jumlah sel yang terlepas, pH dan total asam. Data yang diperoleh dari masing-masing pengujian akan dianalisa secara statistik menggunakan uji ANOVA (*Analysis of Varians*) pada $\alpha=5\%$, untuk mengetahui apakah perlakuan memberikan pengaruh nyata pada setiap parameter pengujian. Apabila hasil uji ANOVA menunjukkan perbedaan nyata, maka dilanjutkan dengan uji beda jarak nyata Duncan (*Duncan's Multiple Range Test/ DMRT*) pada $\alpha = 5\%$ untuk menentukan taraf perlakuan mana yang memberikan perbedaan nyata.

Tabel 4.1. Rancangan Penelitian Pembuatan Sel Imobil

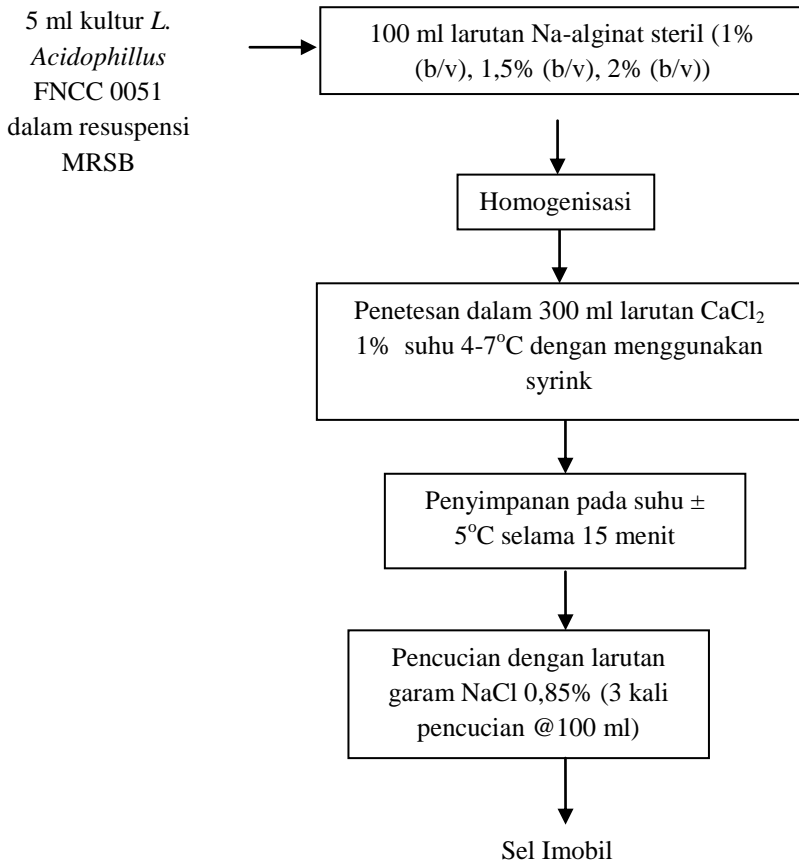
Perlakuan		Konsentrasi Na alginat (A)		
		A ₁	A ₂	A ₃
Lama penyimpanan (L)	L ₁	L ₁ A ₁ (1)	L ₁ A ₂ (1)	L ₁ A ₃ (1)
		L ₁ A ₁ (2)	L ₁ A ₂ (2)	L ₁ A ₃ (2)
		L ₁ A ₁ (3)	L ₁ A ₂ (3)	L ₁ A ₃ (3)
	L ₂	L ₂ A ₁ (1)	L ₂ A ₂ (1)	L ₂ A ₃ (1)
		L ₂ A ₁ (2)	L ₂ A ₂ (2)	L ₂ A ₃ (2)
		L ₂ A ₁ (3)	L ₂ A ₂ (3)	L ₂ A ₃ (3)
	L ₃	L ₃ A ₁ (1)	L ₃ A ₂ (1)	L ₃ A ₃ (1)
		L ₃ A ₁ (2)	L ₃ A ₂ (2)	L ₃ A ₃ (2)
		L ₃ A ₁ (3)	L ₃ A ₂ (3)	L ₃ A ₃ (3)

Keterangan:

- A₁ : Konsentrasi Na alginat 1%
- A₂ : Konsentrasi Na alginat 1,5%
- A₃ : Konsentrasi Na alginat 2%
- L₁ : Lama penyimpanan 0 hari
- L₂ : Lama penyimpanan 10 hari
- L₃ : Lama penyimpanan 20 hari
- (1) : Ulangan 1
- (2) : Ulangan 2
- (3) : Ulangan 3

4.5. Pelaksanaan Penelitian

4.5.1 Pembuatan Sel Imobil



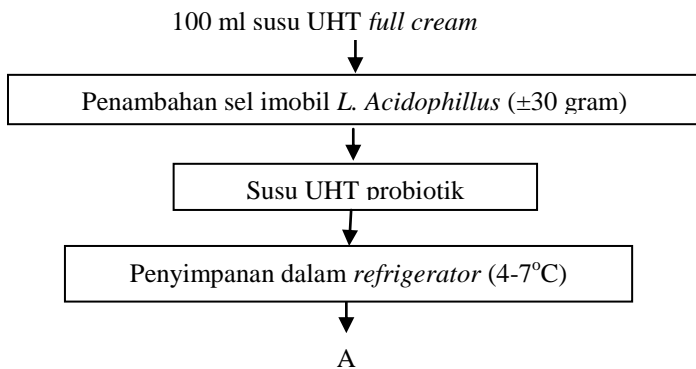
Gambar 4.1. Diagram Alir Pembuatan Sel Imobil dalam Ca-alginat
 Sumber : Sheu and Marshall (1993); Lee and Heo (2000); Klinkenberg, *et al.* (2001)

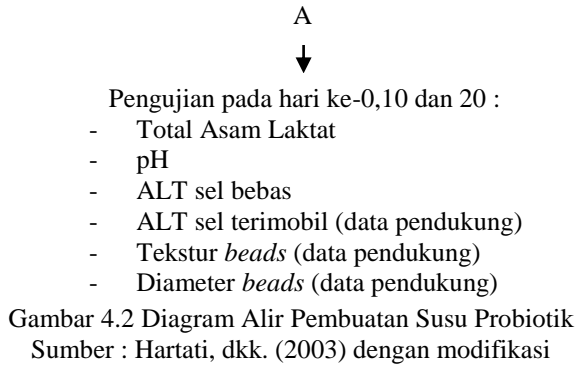
Penjelasan proses :

1. 2 ml kultur *L. acidophilus* FNCC 0051 dalam resuspensi MRSB dihomogenkan dengan menggunakan vortex.

2. Pengendalian jumlah sel agar sama pada setiap resuspensi yang ditambahkan dilakukan dengan memberi perlakuan yang sama pada setiap kali peremajaan kultur (waktu inkubasi, kondisi inkubasi dan jumlah pengambilan kultur *L.acidophilus*).
3. Pencucian menggunakan garam NaCl 0,85% bertujuan untuk :
 - menghilangkan sel-sel yang mungkin menempel pada dinding luar *beads* sehingga data yang teramati sebagai sel bebas nantinya adalah benar-benar sel yang terlepas keluar dari dalam *beads*.
 - menghilangkan sisa CaCl₂ pada *beads* yang tidak diharapkan berada dalam produk (*carrier*)
 - menghilangkan gel yang terbentuk tidak sempurna sehingga tidak mengganggu karakter *carrier*.
4. Pencucian menggunakan garam NaCl 0,85% karena larutan NaCl 0,85% isotonis dengan *beads* sehingga tidak memungkinkan cairan NaCl 0,85% masuk ke dalam *beads* dan mengganggu aktivitas sel yang terjerat dalam *beads* saat pencucian.

4.5.2 Pembuatan susu Probiotik



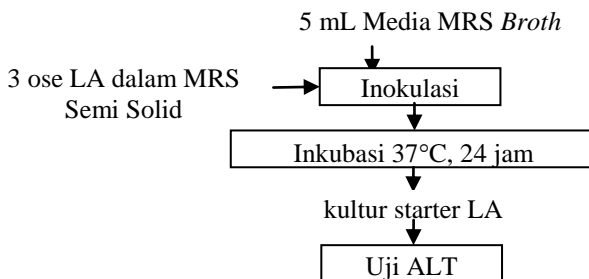


Keterangan :

Total Asam Laktat dan pH diamati karena selama penyimpanan ada aktivitas metabolisme sel yang terlepas dari dalam *beads* dan menghasilkan metabolit yang berpengaruh terhadap pH dan keasaman produk *carrier*. Perubahan pH dan keasaman tersebut diharapkan tidak mempengaruhi konsistensi karakter *carrier* sebagai produk *non fermented food*.

4.5.3 Pembuatan Kultur Starter *Lactobacillus acidophilus* (LA)

Tahapan pembuatan kultur *starter* dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3. Diagram Alir Pembuatan Kultur Starter LA
Sumber: Apriyantono, dkk (1989)

Penjelasan proses:

1. Inokulasi Starter

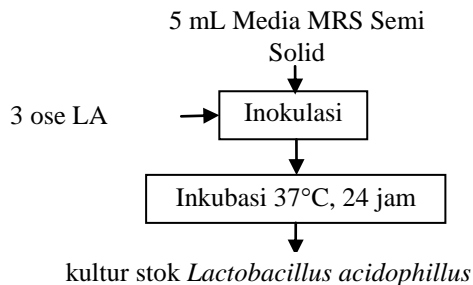
Tahapan ini bertujuan untuk menginokulasikan starter LA ke dalam masing-masing media de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) *broth* dengan menggunakan ose berkolong sebanyak 3 ose. Proses inokulasi dilakukan secara aseptis yaitu dengan dilakukan di dekat nyala api.

2. Inkubasi

Tujuan dari tahapan ini adalah untuk memberi kesempatan bagi LA untuk tumbuh dengan memanfaatkan nutrisi yang ada pada media MRS *broth*. Proses ini dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam karena pada suhu dan waktu ini merupakan suhu dan waktu yang optimal bagi pertumbuhan BAL dan BAL masih berada pada fase log (Hui, 1992).

4.5.4 Peremajaan Kultur *Lactobacillus acidophilus*

Kultur yang digunakan dalam enkapsulasi sel imobil adalah kultur stok *Lactobacillus acidophilus*. Tahapan peremajaan kultur stok *Lactobacillus acidophilus* adalah sebagai berikut:



Gambar 4.4. Diagram Alir Peremajaan Kultur LA
Sumber: Fardiaz (1989)

Penjelasan proses:

1. Inokulasi

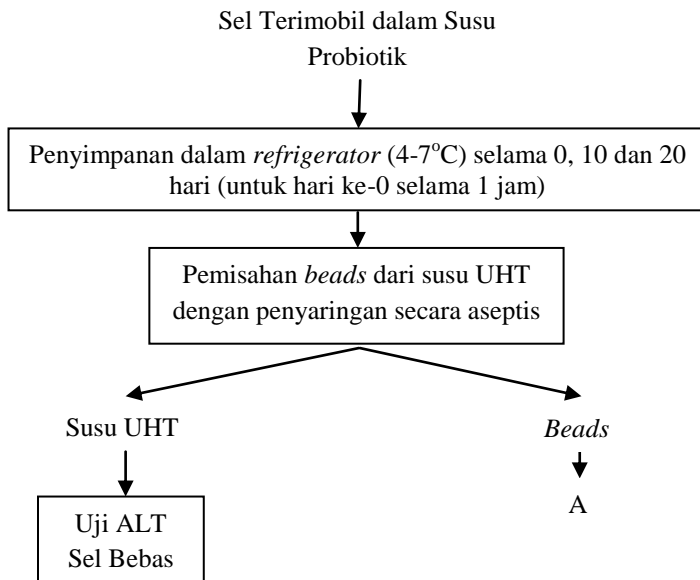
Tahapan ini bertujuan untuk menginokulasikan starter LA ke dalam masing-masing media de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Broth agar dengan menggunakan ose berkolong sebanyak 3 ose. Proses inokulasi dilakukan secara aseptis yaitu dengan dilakukan di dekat nyala api.

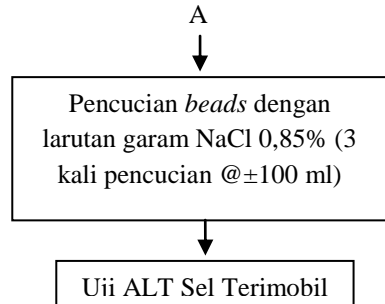
2. Inkubasi

Tujuan dari tahapan ini adalah untuk memberi kesempatan bagi LA untuk tumbuh dengan memanfaatkan nutrisi yang ada pada media MRS agar. Proses ini dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam karena pada suhu dan waktu ini merupakan suhu dan waktu yang optimal bagi pertumbuhan BAL dan BAL masih berada pada fase log (Hui, 1992).

4.6 Pelaksanaan Pengujian

4.6.1 Pemisahan Sel yang Terlepas (Sel Bebas) dengan Sel Terimobil





Gambar 4.5. Teknik memisahkan sel terimobil dengan sel yang terlepas

Keterangan :

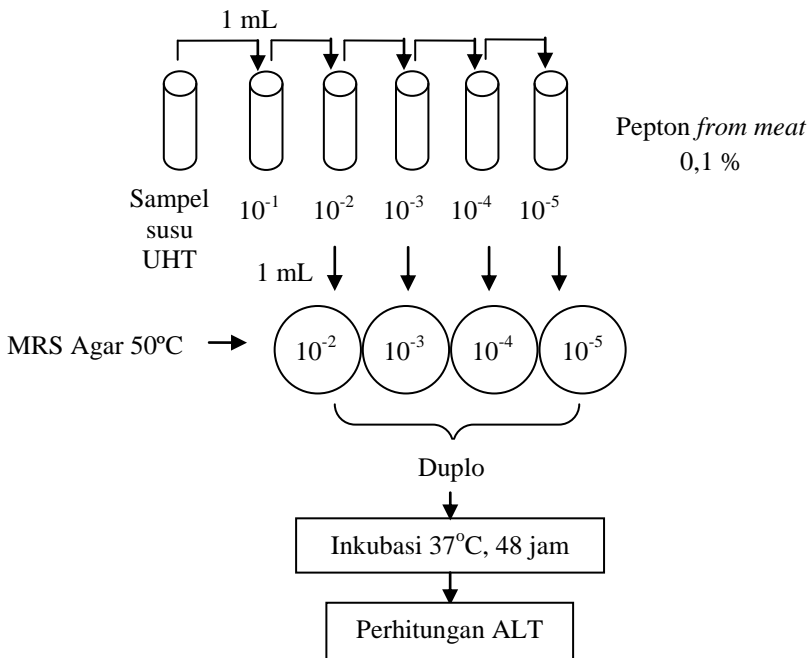
- Pencucian *beads* dengan NaCl 0,85% dilakukan sebanyak 3(tiga) kali karena diharapkan dengan pencucian sebanyak 3(tiga) kali menghilangkan sel-sel yang mungkin menempel pada dinding luar *beads* sehingga data yang teramati sebagai terimobil benar-benar sel yang masih berada di dalam *beads*.
- Susu UHT yang telah dipisahkan dengan *beads* mengandung sel yang terlepas dari dalam *beads* selama penyimpanan dan dinyatakan sebagai sel bebas.

4.6.1.1 Pengujian Total Sel Bebas pada Susu UHT dengan Angka Lempeng Total (ALT) (Fardiaz, 1989).

- a. Pencairan media MRS Agar (agar 1,2%) dengan cara pemanasan pada penangas air, kemudian dilakukan pendinginan pada suhu 50°C selama 5 menit.
- b. Pembuatan *pepton from meat* 0,1% dan dipipet masing-masing 4,5mL ke dalam satu seri tabung reaksi dari pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-5} (untuk pengenceran 10^{-1} dipipet sebanyak 9 ml).
- c. Pemipetan 1 mL sampel susu UHT yang mengandung sel bebas dari dalam wadah lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi pengenceran

10^{-1} dan pipetkan 0,5 mL ke dalam tabung reaksi pengenceran selanjutnya yang telah berisi 4,5 mL pepton *from meat* 0,1% , kemudian dihomogenkan.

- d. Pipetkan 0,5 mL dari tabung pengenceran 10^{-1} lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi berikutnya (pengenceran 10^{-2} dan seterusnya).
- e. Pada pengenceran 10^{-2} sampai dengan 10^{-5} , dilakukan pipetkan 1 mL dari tabung reaksi kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri steril.
- f. Media MRS Agar yang telah bersuhu 50°C dituang ke dalam masing-masing cawan petri, lalu dihomogenkan dengan rotasi angka delapan.



Gambar 4.6. Diagram Alir Pengujian Total Sel Bebas pada Susu UHT dengan Angka Lempeng Total (ALT)

- g. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 48 jam.
- h. Penghitungan hasil ALT yang termasuk ke dalam ciri makroskopis BAL yaitu :
- h.1. Bentuk koloni : bulat
 - h.2. Kenaikan permukaan : rata
 - h.3. Tepi koloni : utuh
 - h.4. Tekstur : halus, basah, opaque
 - h.5. Warna : putih
 - h.6. Ukuran : 0,1-0,3 mm
- i. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu dan merupakan suatu kumpulan koloni besar dapat dihitung sebagai satu koloni.
- j. Suatu deretan koloni yang terlihat sebagai suatu garis tebal dapat dihitung sebagai satu koloni.

Menurut Hadiwiyoto (1994), beberapa syarat untuk perhitungan hasil ALT adalah :

- Pilihlah koloni dengan jumlah antara 30-300, lakukan perbandingan dengan memperhitungkan tingkat pengenceran yaitu jumlah koloni pada pengenceran lebih tinggi dibagi dengan besar tingkat pengenceran lalu dibandingkan dengan jumlah koloni pada pengenceran lebih rendah dibagi dengan besar tingkat pengenceran.
- Apabila hasil perbandingan lebih kecil atau sama dengan 2, maka hitung rata-rata dari kedua jumlah koloni tersebut juga dengan memperhitungkan tingkat pengenceran.
- Apabila hasil perbandingan lebih besar dari 2, maka yang dilaporkan hanya jumlah koloni pada tingkat pengenceran yang lebih rendah dengan memperhitungkan tingkat pengenceran.
- Apabila pada semua pengenceran menghasilkan kurang dari 30 koloni pada cawan petri, hanya jumlah koloni pada pengenceran terendah yang

dihitung. Hasilnya dilaporkan dengan cara jumlah koloni pada pengenceran terendah dibagi dengan besarnya tingkat pengenceran.

- Apabila pada semua pengenceran menghasilkan lebih dari 300 koloni pada cawan petri, hanya jumlah koloni pada pengenceran yang tertinggi yang dihitung. Hasilnya dilaporkan dengan cara jumlah koloni pada pengenceran tertinggi dibagi dengan besarnya tingkat pengenceran.
- Jika digunakan dua cawan petri (duplo) pada setiap pengenceran, maka data yang diambil harus dari kedua cawan.

4.6.2 Pengukuran pH (Apriyantono dkk., 1989)

- a. Kalibrasi pH meter dengan cara mencelupkan elektroda pH meter ke dalam larutan *buffer* pH 4,0 atau *buffer* pH 7,0.
- b. Pencucian elektroda pH meter dengan akuades menggunakan botol semprot.
- c. Pengeringan sisa akuades yang masih menempel pada elektroda dengan menggunakan *tissue*.
- d. Pencelupan elektroda kedalam sampel dan dibiarkan beberapa saat untuk memperoleh hasil pembacaan yang stabil.
- e. Pencatatan data hasil pembacaan.

4.6.3 Pengukuran Total Asam (AOACa.947.05)

Analisa total asam bertujuan untuk mengetahui kadar asam total pada bahan produk. Prosedur pelaksanaan analisa total asam sebagai berikut:

- a. Susu UHT sebanyak 10 ml dipipet dengan pipet volume dan dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml. Kemudian ditambahkan akuades samapai tanda batas di labu takar.

- b. Susu UHT diambil 10 ml dari labu takar dipipet dengan pipet volume ke erlenmeyer 250 mL, tambahkan 2 sampai 3 tetes indikator PP 1%.
- c. Larutan dititrasi dengan menggunakan NaOH 0,1 N sampai tepat timbul warna merah muda.
- d. Larutan NaOH 0,1 N distandarisasi dengan $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0,1 N menggunakan cara sebagai berikut:
 - Membuat larutan $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0,1 N sebanyak 100 ml
 - Larutan $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0,1 N dipipet sebanyak 10 ml dan dimasukkan ke dalam erlemeyer.
 - Larutan dititrasi dengan NaOH 0,1% sampai tepat timbul warna merah muda.
- e. Total asam dinyatakan sebagai % asam dominan dan dinyatakan dengan total asam laktat (BM=90).

$$\text{Kadar asam} = \frac{\text{volume NaOH (mL)} \times \text{N NaOH} \times \text{BM asam laktat} \times \text{FP} \times 100\%}{\text{volume bahan (mL)} \times 1000}$$

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, C. 2009. *The Promising Potential of Prebiotics and Probiotics : Research Reveals Interesting Applications for Probiotic Bacteria and Their Frequent Partners in Health, Prebiotics*. Retrieved Available at : http://www.nutraceuticalsworld.com/issues/2009-05/view_features/the-promising-potential-of-prebiotics-amp-probioti/. [2 September 2013].
- Adhikari, K., A. Mustapha., I.U.Grun and L. Fernando. 2000. *Viability of Microencapsulated Bifidobacteria in Set Yoghurt During Refrigerated Storage*. J. Dairy Sci. 83:1946-1951.
- Aditya, A.M. 2012. *Pengaruh Pemberian Lactobacillus acidophilus terhadap Angka Kuman Usus Halus yang Diinfeksi Shigella dysentriae*. Retrieved Available at : <http://publikasi.umy.ac.id/index.php/pend-dokter/article/view/3931/3264>. [5 September 5 2013].
- Akhlar, N.S.A.M. 2010. *Enhancement of Probiotics Survival by Microencapsulation with Alginate and Prebiotics*. Michigan : MMG 445 Basis Biotechnology 6:13-18.
- Alexandra, Drakoularakou, O. Hasselwander, M. Edinburgh, and A.C. Ouwehand. 2007. *Lactitol, an Emerging Prebiotic: Functional Properties with a Focus on Digestive Health (Abstract)*. USA. *Food Science and Technology Bulletin : Functional Foods* 3 (7) : 73-82.
- Amir, M., S.H. Razavi, M.R. Ehsani, and S. Sohrabvandi. 2007. *Principle and Methods of Microencapsulation of Probiotic Microorganisms. Review Article*. Iran : Department of Food Science and Engineering, University of Tehran.
- Anal, A.K. and H. Singh (2007) *Recent Advances in Microencapsulation of Probiotics for Industrial Applications And Targeted Delivery*. *Trends in Food Science and Technology* 18:240-251.
- AOAC. 1996. *Acidity of Milk*. AOAC Chapter 33 p.7. Maryland: Gaithersburg.

- Apriyantono, A., D. Fardiaz, N. L., Puspitasari, Sedarnawati, dan S. Budiyo. 1989. *Petunjuk Laboratorium Analisa Pangan*. Bogor: Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Institut Pertanian Bogor.
- Ari, A. 2010. *Encapsulation of Lactobacillus casei Using Extrusion Technique As Starter Culture For Production of Dadih from Cow Milk*. *Skripsi S-1*. Fakultas Teknologi Hasil Pertanian IPB, Bogor.
- Audet, P., C. Paquin, and C. Lacroix. 1988. *Immobilized Growing Lactic Acid Bacteria with K-Carrageenan-Locust Bean Gum Gel*. *Appl Microbiol Biotechnol* 29:11-18.
- Badan Standar Nasional. 1998. SNI Susu UHT (SNI 01-3950-1998). Jakarta: Dewan Standardisasi Nasional.
- Bar, A. 1990. *Factorial Calculation Model for the Estimation of the Physiological Caloric Value of Polyols in Caloric Evaluation of Carbohydrates*. Tokyo: Research Foundation for Sugar Metabolism.
- Bernardeau, M., J. P. Vernoux, S. H. Dubernet, and M. Gueguen. 2008. *Safety Assessment of Dairy Microorganisms: The Lactobacillus Genus*. *International Journal of Food Microbiology* 126:278-285.
- Bolhuis, G.K, E.G. Rexwinkel, and K. Zuurman. 2009. *Polyols as Filler-Binders for Disintegrating Tablets Prepared by Direct Compaction*. Netherlands: *Drug Dev Ind Pharm*. 35(6):671-7.
- Cardenas, A., W.A. Monal, F.M. Goycoolea, I.H. Ciapara, C. Peniche. 2003. *Diffusion Through Membranes of The Polyelec-Trolyte Complex of Chitosan and Alginate, Macromol, Biosci*. 3:535-539.
- Castilla, O.S., C.L. Calleros, H.S.G. Galindo, J.A. Ramirez and E.J.V. Carter. 2010. *Textural Properties Alginate-Pectin Beads and Survivability of Entrapped Lactobacillus Casei in Simulated Gastrointestinal Conditions and Yoghurt*, *Food Res. Int.*, 43: 111-117.
- Chandramouli, V., K. Kailasapathy, P. Peiris, and M.Jones. 2004. *An Improved Method of Microencapsulation and Its Evaluation to Protect*

- Lactobacillus* spp. In *Simulated Gastric Condition*, *J of Microbiol Methods* 56:27–35.
- Chou, L.Z. and B. Weimer. 1999. *Isolation and Characterization of Acid and Bile-Tolerant Isolates From Strains of Lactobacillus acidophilus.*, *J. Dairy Sci.* 82:23-31.
- Claesson, M. J., D. V. Sinderen, and P. W. O'Toole. 2007. *The Genus Lactobacillus– A Genomic Basis for Understanding Its Diversity*, *FEMS Microbiol. Lett.* 269:22-28.
- Collado, M. C., E. Isolauri, S. Salmien, and Y. Sanz. 2009. *The Impact of Probiotic on Gut Health*, *Curr Drug Metab.* 10(1):68-78.
- Crittenden, R.G. 1999. *Prebiotics In: Probiotics: A Critical Review.* Horizon Scientific Press, Wymondham pp. 141 – 156.
- Cummings J.H., G.T. Macfarlane, H.N. Englyst. 2001. *Prebiotic Digestion and Fermentation*, *Am. J. Clin. Nutr* 73, 415S–420S.
- Cui, J., E.H. Holmes, T.G. Greene, P.K. Liu. 2000. *Oxidative DNA Damage Precedes DNA Fragmentation after Experimental Stroke in Rat Brain*, *FASE BJ* 14:955–967.
- Dommels, Y.E.M., R.A. Kemperman, Y.E.M.P. Zebregs, and R.B. Draaisma. 2009. *Survival of Lactobacillus reuteri DSM 17938 and Lactobacillus rhamnosus GG in the Human gastrointestinal Tract with Daily Consumption of A Low-Fat Probiotic Spread*, *Appl. Environ. Microbiol.* 75(19):6198-204.
- Dewi, L. 2005. Sari Buah Nanas Probiotik dengan Teknik Sel Imobil : Kajian Konsentrasi Na-Alginat dan Lama Penyimpanan terhadap Viabilitas Sel *Lactobacillus plantarum* FNCC 213. *Skripsi S-1*. Fakultas Teknologi Pertanian UKWMS, Surabaya.
- Dimantov, A., M. Greenberg, E. Kesselman, and Shimoni. 2003. *Study of High Amylase Corn Starch as Food Grade Enteric Coating in A Microcapsule Model Systems*. *Innov. Food Sci. Eng. Technol.* 5:93-100.

- Eckles, C.H, W.B Comb and H. Macy. 1951. *Milk and Milk Product*. 4th Edition. New York: Mc Graw-Hill Book Company, Inc.
- Effendi, H. M. S. 2009. *Teknologi Pengolahan dan Pengawetan Pangan*. Bandung: Alfabeta.
- Eikmeier, H., H.J. Rehm. 1987. *Stability of Calcium-Alginate During Citric Acid Production of Immobilized Aspergillus niger*, *Appl Microbiol Biotechnol*. 26:105-111.
- Ellenton, J.C. 1998. *Encapsulation Bifidobacteria*. Master Thesis. University of Guelph.
- Evans P.R., C. Piesse C., Y.T. Bak, and J.E. Kellow. 1998. *Fructose-Sorbitol Malabsorption and Symptom Provocation in Irritable Bowel Syndrome: Relationship to Enteric Hypersensitivity and Dysmotility*, *Scand. J. Gastroenterol* 33: 1158–1163.
- FAO. 1990. *Training Manual on Gracilaria Culture and Seaweed Processing in China*. <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB730E/AB730E00.htm>. [16 Desember 2013]
- FAO/WHO. 2001. *Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. American Cordoba Park Hotel, Cordoba, Argentina.
- FAO/WHO. 2002. *Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London.
- FAO/WHO. 2007. *FAO Technical Meeting on Prebiotics*. Italy.
- Fardiaz, S. 1989. *Mikrobiologi Pangan: Penuntun Praktek Laboratorium*. Bogor: IPB Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi.
- Fernandez, B.F., M. E. Pardo, P. Humbert, R.Leon, J.M. Llovet, and M.A. Gassull. 1991. *Role of Fructose-Sorbitol Malabsorption in the Irritable Bowel Syndrome*, *Gastroenterology* 101: 1453–1454.

- Gee, J.M., D. Cooke, S. Gorick, G.M. Wortley, R.H. Greenwood, A. Zumbe, and I.T. Johnson. 1991. *Effects of Conventional Sucrose-Based, Fructose-Based and Isomalt-Based Chocolates on Post Prandial Metabolism in Non-Insulin Dependent Diabetics*, *Eur. J. Clin. Nutr.* 45:561–566.
- Gehring, F. and E.J. Karle. 1981. *Sweetening Agent, Palatinit under Specific Consideration as to Microbiological and Caries-Prophylactic Aspects.*, *Z Ernährung swiss* 20:96–106.
- Gouin S (2004). *Microencapsulation-Industrial Appraisal Of Existing Technologies And Trend*, *Trends Food Sci Technol.* 15: 330-347.
- Gostner, A., M. Blaut, et al. 2006. *Effect of Isomalt Consumption on Faecal Microflora and Colonic Metabolism in Healthy Volunteers*. *Br. J. Nutr.* 95 (1): 40-50.
- Granato, D., G.F. Branco, A. G. Cruz, J.D.A.F. Faria, and N.P. Shah. 2010. *Probiotic Dairy Products as Functional Foods*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9: 455–470.
- Hadiwiyoto, S. 1994. *Teori dan Prosedur Pengujian Mutu Air Susu dan Hasil Olahannya*. Yogyakarta : Liberty.
- Haralampu, S.G. 2000. *Resistant Starch-A Review of The Physical Properties And Biological Impact of RS3, Carbohydrate Polymers*. 41: 285-292.
- Hartati,S., E. Harmayani, dan E.S. Rahayu. 2003. Perubahan Kimiawi dan Organoleptik Sari Buah Pepaya Nanas yang Disuplementasi *Lactobacilli* Probiotik selama Penyimpanan. *Seminar Nasional dan Pertemuan Tahunan Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia (PATPI)*: 263-271.
- Harti,A.S, R.A. Samsumaharto, dan Hosea. 2012. Efek Penambahan Chito-Oligosakarida Sebagai Prebiotik Terhadap Pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Secara *In Vitro*. Surakarta, *Jurnal Biomedika* Vol. 5(1) : 2302-1306.

- Helferich, W and D . Westhoff. 1980 . *All About Yoghurt*. Prentice-Hall, Mc. New Jersey : EngelWood-Cliffs.
- Holzapfel, W. H., P. Haberer, R., Geisen, J, Björkroth and U.Schillinger. 2001. *Taxonomy and Important Features of Probiotic Microorganisms in Food and Nutrition (Abstract)*. Am J. Clin. Nutr. 73(2): 365-373.
- Homayouni, A., A. Azizi, M.R. Ehsani, S.H. Razavi, and M.S. Yarmand. 2008. *Effect of Microencapsulation and Resistant Starch on The Probiotic Survival And Sensory Properties of Synbiotic Ice Cream. Food Chemistry* 111 pp. 50-55.
- Hui, Y.H., 1992. *Encyclopedia of Food Science and Technology*. New York: Jhon Wiley and Sons Inc.
- Hutter, R. ,F. Boswart, and K. Irsigler. 1993. *Insulin Verbrauch Von Typ-I-Diabetikern nach Oraler Gabe Von Isomalt. Akt Ernahr* 18:149–154.
- Inukai, M. and Y. Masakatsu. 1999. *Effect of Charge Density on Drug Permeability Trough Alginate Gel Membranes*. Chem. Pharm. Bul.
- ISAPP. 2009. *Clarification of the Definition of a Probiotic*. Retrieved Available at :www.isapp.net. [21 Juni 2013].
- ISAPP. 2005. *Establishing Standards for Probiotic Products*. Retrieved Available at :www.isapp.net. [6 November 2013].
- Jankowski, T., M. Zielinska, and Wysakowska. 1997. *Encapsulation of Lactic and Bacteria with Alginate or Starch Capsules. Biotechnol Technol*. 11:31-34.
- Kailasapathy, K. 2002. *Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology And Potential Application, Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3: 39-48.
- Kebary, K.M.K., S.A. Hussein, and R.M. Badawi. 1998. *Improving Viability of Bifidobacterium and Their Effect on Frozen Ice Milk, J. Dairy Sci*. 26: 319-337.

- Khalil, A.H., E.H. Mansour. 1998. *Alginate Encapsulated Bifidobacteria Survival in Mayonnaise*. *J. Food Sci.* 63:702-705.
- Khazaeli, P., A. Pardakhty, and F. Hassanzadeh. 2008. *Formulation of Ibuprofen Beads by Ionotropic Gelation*, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 7 (3): 163-170.
- Khoriyah, L.K. dan Fatchiyah. 2013. Karakter Biokimia dan Profil Protein Yoghurt Kambing PE Difermentasi Bakteri Asam Laktat (BAL), *J. Exp. Life Sci. Vol.* 3(1): 2338-1655.
- Kim, I.K., Y.J. Baek, and Y.H. Yoon. 1996. *Effects of Dehydration Media and Immobilization in Calcium-Alginate on The Survival of Lactobacillus casei and Bifidobacterium bifidum*, *Korean J Dairy Sci.* 18: 193-198.
- Kimestri and Asma Bio. 2013. Pengaruh Sukrosa terhadap Jumlah Bakteri dan Karakteristik Kimia pada Whey Kerbau Fermentasi. (Retrieved available at : <http://repository.unhas.ac.id/handle/123456789/4770?show=full>). [29 Oktober 2013].
- Kleessen, B., G. Stoof, J. Proll, D. Schmied, J. Noack, and M. Blaut. 1997. *Feeding Resistant Starch Affects Fecal and Microflora and Short Chain Fatty Acid in Rats*, *J Animal Sci.* 75:2453-2462.
- Klien, J., J. Stock, K.D. Vorlop. 1983. *Pore Size and Properties of Spherical Calcium Alginate Biocatalysts*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18:86-91.
- Klingeberg, Michael, Kozyanowski, and Gunhild. 2004. *Use of Isomalt (Mixture of 1,6 gpm and 1,1 gpm) as Prebiotic for the Production of a Medicament Used for the Treatment of Intestinal Diseases, Among Other Things*. United States Patent Application Publication US 2006/0147500 A1.

- Klikenberg, G., K.Q. Lystad, D.W. Levine, and N. Dyrset. 2001. *Cell Release from Alginate Immobilized Lactococcus lactis ssp. Lactis in Chitosan and Alginate Coated Beads*. *J. Dairy Sci.* 84:1118-1127.
- Krasaekoopt W., B. Bhandari, H. Deeth. 2003. *Evaluation of Encapsulation Techniques of Probiotics for Yoghurt*. *Int. Dairy J.* 13: 3-13.
- Krasaekoopt, W., B. Bhandari, H. Deeth. 2004. *The Influence of Coating Materials on Some Properties of Alginate Beads and Survivability of Microencapsulated Probiotic Bacteria*. *Int. Dairy J.* 14:737-743.
- Kritchevsky, D. 1995. *Epidemiology of Fiber, Resistant Starch and Colorectal Cancer*. *Eur J. Cancer Prev.* 4: 345-352.
- Langkilde, A.M., H. Andersson, T.F. Schweizer, and P. Wursch. *Digestion and Absorption of Sorbitol, Maltitol and isomalt from The Small Bowel. A Study In Ileostomy Subjects*. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1994(48):768–775.
- Le Blay, G., C. Michel, H.M. Blottiere, and C. Cherbut. 1999. *Enhancement of Butyrate Production in The Rat Caecocolonic Tract by Long-Term Ingestion O Resistant Potato Starch*. *Brit. J. Nut.* 82:419-426.
- Lee, K.I. and T.R. Heo T.R. 2000. *Survival of Bifidobacterium Longum Immobilized in Calcium Alginate Beads in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 869-973.
- Lisal, J.S. 2005. *Konsep Probiotik dan Prebiotik untuk Modulasi Mikrobiota Usus Besar*. *Medical Nusantara* 26 : 256-262.
- Livesey, G., 2003. *Health Potential of Polyols as Sugar Replacers, with Emphasis on Low Glycaemic Properties*. *Nutrition Research Reviews* 16:163-191.
- Macfarlane, G.T., J.H. Gummings. 1991. *The Colonic Flora, Fermentation and Large Bowel Digestive Function*. In SF Phillips, JH Pemberton And RG Shorter (Eds.). *The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease*. New York: Raven Press.

- Macfarlane G., Steed H., Macfarlane S. 2008. *Bacterial Metabolism and Health Related Effects of Galactooligosaccharides and Other Prebiotics*, *J. Appl. Microbiol.* 104: 305–344.
- Maduningsih, G.L. 2008. Stabilitas Bakteri Probiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacterium longum* dalam Yogurt Susu Kambing di dalam Saluran Pencernaan Tikus. *Skripsi S-I*. Program Studi Teknologi Hasil Ternak, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Makarova, K., A. Slesarev, Y. Wolf, A. Sorokin, B. Mirkin, E. Koonin, A. Pavlov, N. Pavlova, V. Karamychev, N. Polouchine, V. Shakhova, I. Grigoriev, Y. Lou, D. Rohksar, S. Lucas, K. Huang, D. M. Goodstein, T. Hawkins, V. Plengvidhya, D. Welker, J. Hughes, Y. Goh, A. Benson, K. Baldwin, J.-H. Lee, I. Díaz-Muñiz, B. Dosti, V. Smeianov, W. Wechter, R. Barabote, G. Lorca, E. Altermann, R. Barrangou, B. Ganesan, Y. Xie, H. Rawsthorne, D. Tamir, C. Parker, F. Breidt, J. Broadbent, R. Hutkins, D. O'Sullivan, J. Steele, G. Unlu, M. Saier, T. Klaenhammer, P. Richardson, S. Kozyavkin, B. Weimer, and D. Mills. 2006. *Comparative Genomics of The Lactic Acid Bacteria*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103(42): 15611–15616.
- Martinsen, A., C. Skjak-Braek, and Smidsrod. 1989. *Alginate as Immobilization Material: 1. Correlation Between Chemical And Physical Properties of Alginate Gel Beads*, *Biotechnol Bioeng.* 33:79-89.
- Meydani, S.N. and W.K. Ha. 2000. *Immunologic Effects of Yoghurt (Abstract)*, *Am. J. Clin. Nutr.* 71(4):861-72.
- Mohammadi, N., H. Ahari, M. Fahimdanesh, M.A.K. Zanjani, A.A. Anvar, and E. Shokri. 2013. *Survival of Alginate-Prebiotic Microencapsulated Lactobacillus acidophilus in Mayonnaise Sauce*. *Iran, Iranian Journal of Veterinary Medicine* 6(4):259-264.
- Monedero V., G. P. Martines, and M. Yebra. 2010. *Perspectives of Engineering Lactic Acid Bacteria for Biotechnological Polyol*

- Production. Appl. Microbiol (Abstract), Am. J. Biotechnol.* 86: 1003–1015.
- Mortazavian, A., S.H. Razavi, M.R. Ehsani, and S. Sohrabvandi. 2007. *Principles and Methods of Microencapsulation of Probiotic Microorganisms, Iranian Journal of Biotechnology* 5(1) 1-18.
- Mozzi, F., G. Rollan, G.S. Giori, G. F.G. Valdez. 2001. *Effect of Galactose and Glucose on The Exopolysaccharide Production and The Activities of Biosynthetic Enzymes in Lactobacillus casei CRL 87, J. Appl. Microbiol.* 91:160-7.
- Muir, J.G., Z.X. Lu, G.P. Young, D.C. Smith, G.R. Dollier, and D. O'DeaK. 1995. *Resistant Starch in The Diet Increase Breathe Hydrogen and Serum Acetate in Human Subjects, American J. Clin. Nutr.* 61:792-799.
- Murtiari, E. 2012. Total Probiotik Susu Kambing Fermentasi Menggunakan Starter Probiotik *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 Selama Inkubasi. Semarang. *Jurnal Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian Vol. 7(1) : 28-37.*
- Naidu, A. S., and R.A. Clemens. 2000. *Probiotics. In: Naidu A. S. (ed.) Natural Food Antimicrobial Systems.* Florida: CRC Press.
- O'Sullivan, O., J. O'Callaghan, A. S. Vegas, O. McAuliffe, L. Slattery, P. Kaleta, M. Callanan, G. F. Fitzgerald, R. P. Ross, and T. Beresford. 2009. *Comparative Genomics of Lactic Acid Bacteria Reveals A Niche-Specific Gene Set. BMC Microbiol.* 9: 1471-2180.
- Ouwehand, A.C. and Salminen, S.J. 1998. *The Health Effects of Viable and Non-Viablecultured Milk, Intl. Dairy J.* 8: 749–758.
- Petzoldt, R., P. Lauer, M. Spengler, and K. Schoffling. 1982. Palatinite in Type II Diabetics. *Effect on Blood Glucose, Serum-insulin, C-Peptide and Free Fatty Acids. Dtsch. Med. Wochenschr* 107:1910–1913.

- Phillips, J., J.G. Muir, A. Birkett, Z.X. Lu, G.P. Jones, K. O’Dea, and G.P. Young. 1995. *Effect of Resistant Starch on Fecal Bulk and Fermentation-Dependent Events in Human*, *American J. Clin. Nut.* 62:121-130.
- Picot, A. and C. LACROIX. 2004. *Encapsulation of Bifidobacteria in Whey Protein Microcapsules and Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions and in Yoghurt*, *International Dairy Journal* 14:505-515.
- Prangdimurti, E., N.S. Palupi, F.R. Zakaria . 2007. Metode Evaluasi Nilai Biologis Karbohidrat dan Lemak. <http://xa.yimg.com/kq/groups/20875559/932235840/name/modul12.pdf> f diakses tanggal 9 – 10- 2013.
- Prevost H and C. Divies. 1992. *Cream Fermentation By A Mixed Culture of Lactococci Entrapped in Two-Layer Calcium Alginate Gel Beads*. *Biotechnol. Let.* 14 583-588.
- Priadi, A. dan L. Natalia. 2006. Infeksi *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) pada Ayam di Indonesia. *JITV* 11:61-68.
- Rahayu, K. 1989. *Mikrobiologi Pangan*. Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada Press.
- Rahayu, E. S. 2008. *Probiotic for Digestive Health. Food Review-Referensi industri dan teknologi pangan Indonesia*. Retrieved Available at: http://www.food_review.biz/login/preview.php?view&id=55932. [2 September 2013].
- Rahayu, W.P., F. Kusnandar, and W.E. Prayitno. 2011. *Stability of Viable Counts of Lactic Acid Bacteria during Storage of Goat Milk Soft Cheese*. *Bogor, Microbiol.* Vol. 5(4) : 149-153.
- Rokka, S. and P. Rantamaki, 2010. *Protecting Probiotic Bacteria by Microencapsulation: Challenges for Industrial Applications*. *Eur. Food Res. Technol.* 231: 1-12.

- Roy, D., J. Goulet, A. Leduy. 1987. *Continues Production of Lactic Acid from Whey Permeate by Free and Calcium-Alginate Entrapped Lactobacillus helveticus*, *J. Dairy Sci.* 70: 506-513.
- Rumessen J.J., Gudmand-Hoyer E. 1998. *Fructans of Chicory: Intestinal Transport and Fermentation of Different Chain Lengths and Relation to Fructose and Sorbitol Malabsorption (Abstract)*, *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 357–364.
- Sarmiento, *et al.* 2007. *Alginate or Chitosan Nanoparticles are Effective for Oral Insulin Delivery*. *Pharmaceutical research* 24(12): 2198-2206.
- Saunders D.R., Wiggins H.S. 1981. *Conservation of Mannitol, Lactulose, and Raffinose by the Human Colon (Abstract)*, *Am. J. Physiol.* 241: G397–G402.
- Science Photo Library. 2013. *Lactobacillus achidophilus*. Retrieved available at : <http://sciencephotolibrary.tumblr.com/post/33441648147/lactobacillus-achidophilus-is-a-lactic-acid>. [1 September 2013].
- Senok, A.C. 2009. *Probiotics in the Arabian Gulf Region*. *Food & Nutrition Research*. Retrieved Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC_2651754/pdf/FNR-53-1842.pdf. [2 September 2013].
- Shafiei, Y., Razavilar, V., Javadi, A., Mirzaei,. 2012. *Survivability of Free and Microencapsulated Lactobacillus nplantarum with Alginate and Resistant Starch in Simulated Gastrointestinal Conditions*, *J. Food, Agriculture and Environment* 10 (3&4): 207-212.
- Shah, N.P. dan R.R. Rarula. 2000. *Microencapsulation of Probiotic Bacteria and Their Survival in Frozen Fermented Dairy Desserts*. *Aust. J. Dairy Technol.* 55: 139-144.
- Shah, N. P. 2007. *Functional Cultures and Health Benefits*, *Int. Dairy J.* 17:1262-1277.

- Sheu, T.Y., R.T. Marshall. 1991. *Improving Culture Viability Infrozen Dairy Desserts by Microencapsulation*, *J. Dairy Sci.* 74: 107-111.
- Sheu, T.Y., R.T. Marshall. 1993. *Microentrapment of Lactobacilli In Calcium Alginate Gel*, *J. Food Sci.* 54(3): 557-561.
- Shitandi, A., M. Alfred, and M. Symon. 2007. *Probiotic Characteristic Of Lactococcus Strain From Local Fermented Amaranthus Hybrydus And Solanum Nigrum*. *African Crop Science Confrence Proceedings* 8:1809-1812.
- Silvester, K.R., H.N. Englyst, and J.H. Gummings. 1995. *Recovery of Starch From Whole Diets Containing Resistant Starch Measured in Vitro and Fermentation of Effluent*, *American J. Clin. Nut.* 62: 403-411.
- Smidsrod, O. and G. Skjak-Braek. 1990. *Alginate for Cell Immobilization*. *Trends in Food Sci Technol.*8:71-75.
- Sultana, K., G. Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris, and K. Kailasapathy. 2000. *Encapsulation of Probiotic Bacteria with Alginate-Starch and Evaluation of Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions and in Yoghurt*, *Int. J. Food Microbiol.* 62: 47-55.
- Sun, W. and M.W. Griffiths. 2000. *Survival of Bifidobacteria In Yogurt And Simulate Gastric Juice Following Immobilization In Gellanxanthan Beads*, *Int. J. Food Microbiol.* 61: 17-25.
- Surono, I.S. 2004. *Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan*. Jakarta : Yayasan Pengusaha Makanan dan Minuman Seluruh Indonesia (YAPMMI).
- Suskovic,J., K.Blazenka, G.Jadranka and M.Srecko. 2001. *Role of Lactic Acid Bacteria And Bifidobacterium In Symbiotic Effect*, *Food Technol.. Biotechnol.* 39 :227-235.

- Tamime, A. Y. dan R. K. Robinson. 2007. *Tamime and Robinson's Yogurt Science and Technology (third edition)*. Cambridge England : Woodhead Publishing Limited.
- Tanaka H., M. Masatose, I.A. Veleky. 1984. *Diffusion Characteristics of Substrates in Calcium-Alginate Beads*, *BiotechnolBioeng*. 26: 53-58.
- Thompson, D.B. 2000. *Strategies for The Manufacture of Resistant Starch*. *Trends in Food Sci. Technol*. 11: 245-253.
- Truelstrup-Hansen, L., P.M. Allan-Wojtas, Y.L. Jin, and A.T. Paulson. 2002. *Survival of Free and Calcium-Alginate Microencapsulated Bifidobacterium spp. in Simulated Gastro-Intestinal Conditions*, *Food Microbiol*. 19: 35-45.
- Vidyalakshmi R, Paranthaman R, Muruges S, Singaravadivel K. 2009. *Stimulation of Monascus Pigments by Invention of Different Nitrogen Sources*, *Global J Biotechnol Biochem* 4(1): 25-28.
- Weichselbaum, E. 2009. *Probiotics and Health: A Review of The Evidence*, *Nutrition Bulletin* 34: 340-73.
- Widodo, S. dan E. Wahyuni. 2003. Bioenkapsulasi Probiotik (*Lactobacillus casei*) dengan Pollard dan Tepung Terigu serta Pengaruhnya terhadap Viabilitas dan Laju Pengasaman. *J.Tek. dan Industri Pangan* 14:98-106.
- Willaert, R. and Nedovic, V. 2004. *Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology*. USA : Kluwer Academic Publisher.
- Winarno, F. G. dan I. E. Fernandez. 2007. *Susu dan Produk Fermentasinya*. Bogor: M-BRIO Press.
- Winarti, S., E. Harmayani, Y. Marsono, and Y. Pranoto. 2013. *Effect of Inulin Isolated from Lesser Yam (Dioscorea esculenta) on the Growth of Probiotics Bacteria and SCFA Formation during Fermentation*. Yogyakarta. *Inter. Research Journ. Of Microbio*. Vol. 4(2):53-63.

Yusmarini, R. Indrati, T. Utami, dan Y. Marsono. 2010. *Aktivitas Proteolitik Bakteri Asam Laktat Dalam Fermentasi Susu Kedelai*. *J. Tek. dan Industri Pangan* Vol. 21(2).