Available online: journal.ipb.ac.id/index.php/jphpi

DEGRADASI HIDROTERMAL Kappaphycus alvarezii: KARAKTER HIDROLISAT DAN KAPABILITAS SEBAGAI PREBIOTIK

Mutmainnah*, Desniar, Joko Santoso

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Jalan Lingkar Akademik Kampus IPB, Kecamatan Dramaga, Kabupaten Bogor 16680

Diterima: 11 Oktober 2022/Disetujui: 25 Januari 2023 *Korespondensi: utmamutmainnah@apps.ipb.ac.id

Cara sitasi (APA Style 7th): Mutmainnah, Desniar, & Santoso, J. (2023). Degradasi hidrotermal *Kappaphycus alvarezii*: Karakter hidrolisat dan kapabilitas sebagai prebiotik. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 26(1), 13-24. http://dx.doi.org/10.17844/jphpi.v26i1.43568

Abstrak

Rumput laut Kappaphycus alvarezii sebagai sumber polisakarida memiliki kemampuan sebagai prebiotik. Penelitian bertujuan menentukan pengaruh suhu dan waktu pemanasan terhadap hidrolisat, serta mengkaji pengaruh penambahan hidrolisat dan lama fermentasi terhadap karakteristik produk sinbiotik rumput laut berbasis fermentasi. Penelitian ini terdiri dari dua tahap yaitu proses hidrolisis secara konvensional pada suhu 80, 90, dan 100°C selama 1, 2, dan 3 jam; fermentasi susu dengan penambahan hidrolisat 0 dan 0,2% selama 24 jam menggunakan starter Lactobacillus plantarum IFO 3074. Proses hidrolisis menggunakan rancangan acak lengkap faktorial dengan analisis sidik ragam dilanjutkan uji Tukey, sementara fermentasi menggunakan uji T. Proses hidrolisis menghasilkan perlakuan terbaik pada pemanasan suhu 100°C selama 3 jam dengan jumlah gula pereduksi sebagai indikator hidrolisis tertinggi yaitu 0,31 g/100 mL. Pada tahapan fermentasi dengan penambahan hidrolisat terpilih, diperoleh hasil fermentasi dengan karakteristik mikrobiologi (jumlah koloni) dan kimiawi (total asam tertitrasi, pH, dan gula pereduksi) yang umumnya berbeda secara signifikan antara perlakuan tanpa dan dengan penambahan hidrolisat yang nilainya secara berturut-turut adalah 9,40 log cfu/mL; 0,28%; 4,63 dan 66,78 g/100 mL. Adanya peningkatan karakteristik dari hasil fermentasi dengan penambahan hidrolisat membuktikan bahwa proses hidrolisis dapat mendegradasi rumput laut menjadi molekul sederhana (prebiotik) yang dapat dimanfaatkan oleh bakteri probiotik, sehingga berpeluang dikembangkan sebagai pangan fungsional berbasis sinbiotik dengan biaya produksi rendah.

Kata kunci: hidrolisis, *Lactobacillus plantarum*, produk sinbiotik

Hydrothermal Degradation of *Kappaphycus alvarezii*: Hydrolysate Characteristics and Capabilities as Prebiotics

Abstract

Seaweed *Kappaphycus alvarezii* as the largest source of polysaccharides from the sea can be a source of prebiotics but is still underutilized. Therefore, this study aimed to determine the effect of heat treatment on the hydrolysate of *K. alvarezii* and the effectiveness of the addition of the hydrolysate on the characteristics of synbiotic products based on milk fermentation with *Lactobacillus plantarum* IFO 3074. This study consisted of two stages, namely hydrolysis using a temperature factor (80, 90 and 100°C) and time (1, 2, and 3 hours) and the production of synbiotics based on milk fermentation with the addition of 0.2% seaweed hydrolysate. The results of the first stage of the study showed that the best treatment was 100°C for 3 hours with the highest amount of reducing sugar as an indicator of hydrolysis, which was 0.31 g/100 mL. Then the fermentation stage with addition of hydrolysate obtained microbiological characteristics (number of colonies) and chemical (total titrated acid, pH, and reducing sugar) which are generally significantly different and the value is 9.40 log cfu/mL; 0.28%; 4.48 and 66.78 g/100 mL. The increase in the characteristics of the fermented product with the addition of hydrolysate proves that the hydrolysis process can degrade seaweed

polysaccharides into simple molecules (prebiotics) that can be utilized in the growth of probiotics, so that the addition of *K. alvarezii* hydrolysate has the potential to be developed as a synbiotic-based functional food with low production costs.

Keyword: hydrolisis, Lactobacillus plantarum, synbiotic product

PENDAHULUAN

Rumput laut sebagai komoditas unggulan perikanan di Indonesia memiliki pengembangan dan pemanfaatan yang relatif rendah. Total produksi rumput laut dilaporkan lebih dari 10.456.000 yang ton, umumnya diperdagangkan bentuk bahan baku (Peraturan Presiden [Perpres] 2019). Berdasarkan data Badan Pusat Statistik [BPS] (2022), volume ekspor rumput laut Indonesia pada tahun 2021 mencapai 225.612.160 kg dan umumnya berasal dari rumput laut merah yaitu Kappaphycus alvarezii (dalam perdagangan disebut K. cottonii) yang berada dalam bentuk kering.

Komponen utama dari K. alvarezii yang menjadi target market adalah polisakaridanya berupa karagenan. Kandungan karagenan pada K. alvarezii berkisar antara 26,40-50,20% berdasar pada umur panen (Asikin & Kusumaningrum, 2019), metode ekstraksi (Fateha et al., 2019) dan lokasi pertumbuhan (Simatupang et al., 2021). Pengaplikasian Κ. alvarezii umumnya dikembangkan pada berbagai bidang seperti pangan (Roohinejad et al., 2017), nutrasetika (Pangestuti & Kim 2014), farmasetika dan biomedik (Xu et al. 2017; Sudirman et al., 2018) serta sebagai pupuk atau fertilizer (Suriyani et al., 2018) namun di Indonesia sebagian besar pemanfaatannya terbatas pada produk pangan sebagai bahan fortifikasi dan diversifikasi, yaitu pada pembuatan jeli (Eveline et al., 2011; Trilaksani et al., 2015), mi (Halimah et al. 2016), pasta (Firdaus et al. 2017) serta puding (Sukotjo et al., 2020). Riset terbaru menunjukkan bahwa polisakarida tersebut memiliki peran bagi kesehatan. Efektivitas dari K. alvarezii dalam menunjang kesehatan karena mampu berperan sebagai prebiotik dan kemampuan tersebut diperoleh ketika polimer dalam bentuk yang sederhana (Permatasari, 2018). Keberadaan prebiotik sebagai serat di dalam tubuh dapat

meningkatkan penyerapan glukosa di dalam usus, meningkatkan kelangsungan bakteri baik di dalam usus sehingga pemanfaatannya dapat dikembangkan sebagai antioksidan dan alternatif penanganan pada penderita diabetes melitus tipe 2 (DMT2) (Decroli, 2019).

Proses produksi turunan polisakarida secara umum dilakukan melalui proses hidrolisis secara kimiawi, biologis (enzimatis), fisik ataupun kombinasinya. Pemanfaatan bahan kimiawi dan enzimatis yang mudah diterapkan umumnya menghasilkan banyak residu dan memiliki biaya produksi yang tinggi, sehingga menurut Ervantes-Cisneros et al. (2017) proses yang mempertimbangkan efek terhadap lingkungan dan kelayakan ekonomi sehingga mendukung keberlanjutan produk adalah dengan proses fisik secara hidrotermal atau pemanasan. Hidrolisis pemanasan dengan menggunakan depolimerisasi sebagai pelarut untuk turunan polisakarida saat ini telah banyak dikembangkan dan diterapkan pada berbagai rumput laut, antara lain: Mastocarpus stellatus (Gómez-Ordóñez et al., Gelidium sesquipedale (Martínez-Sanz et al., 2019), Gelidium amansii (Yu et al., 2021), Undaria pinnatifid (Saravana et al., 2018), Sargassum multicum (Balboa et al. 2013) dan Sargassum glaucescens (Huang et al., 2016), namun masih sangat terbatas pada K. alvarezii sebagai spesies budi daya, yang umumnya diperdagangkan dalam bentuk bahan baku dan diproses dengan asam untuk menghasilkan karagenan sebagai produk komersial.

Pengujian efektivitas hidrolisat rumput laut *K. alvarezii* sebagai prebiotik dapat dilakukan melalui pengembangan fungsional berupa produk sinbiotik. Produk sinbiotik merupakan produk yang terdiri atas prebiotik dan probiotik yang dapat diperoleh melalui fermentasi dan nonfermentasi. Penambahan rumput laut pada minuman berbasis susu fermentasi ditemukan tidak memengaruhi kualitas dan

umur simpan secara negatif (O'Sullivan et al., 2016), bahkan produk berbasis fermentasi menjadi tren karena mampu meningkatkan nilai tambah pada produk. Berbeda dengan produk nonfermentasi, Moody et al. (2019) menemukan tidak adanya peningkatan kualitas pada produk minuman sinbiotik akibat tidak adanya aktivitas dari BAL. Hal ini dibuktikan dengan nilai pH dan total BAL produk setelah ditambah kultur BAL terenkapsulasi yang tidak berubah dari sebelumnya yaitu 7,3 dan 10,4 log CFU/mL. Oleh karena itu produk berbasis sinbiotik melalui proses fermentasi perlu dikaji, khususnya dengan pengembangan K. alvarezii sebagai prebiotik menggunakan metode pemanasan sebagai proses sederhana menjadi suatu peluang dalam meningkatkan konsumsi dan mendukung keberlanjutan sinbiotik dari rumput laut sebagai pangan fungsional.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan menentukan efektivitas pemanasan (pengaruh suhu dan waktu) terhadap hidrolisat rumput laut *K. alvarezii*, kemudian mengkaji kemampuan hidrolisat sebagai prebiotik melalui kemampuannya dalam meningkatkan karakteristik mikrobiologis dan kimiawi hasil fermentasi.

BAHAN DAN METODE Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan antara lain rumput laut *K. alvarezii* yang diperoleh dari kawasan budi daya Kabupaten Takalar, Sulawesi Selatan, *Lactobacillus plantarum* IFO 3074 yang merupakan bakteri probiotik koleksi Pusat Unggulan Probiotik Universitas Gadjah Mada, akuades, maltodekstrin, DNS/3,5-Dinitrosalisilat (Merck), MRSA/ *de Man Rogosa Sharpe agar* (Merck), *Man Rogosa Sharpe Broth*/MRSB (Merck) dan indikator fenolftalein (Merck).

Alat yang digunakan adalah oven (Faithful), inkubator (Faithful), *laminar air flow* (Biobase), erlenmeyer, gelas kimia, gelas ukur, autoklaf (Biobase), pH meter, pipet ukur, tabung reaksi, cawan petri, vortex, lempeng hangat, *centifuge*, timbangan analitik dan spektrofotometer *Uv-Visible* (Shimadzu).

Metode Penelitian Preparasi sampel

Penelitian ini terdiri atas tiga tahap yaitu hidrolisis dengan pemanasan dan produksi sinbiotik dengan fermentasi. Tahap satu bertujuan mendapatkan hidrolisat menggunakan metode sederhana (pemanasan). Tahapan ini meliputi preparasi bahan baku rumput laut segar menjadi bahan baku kering (Gereniu et al., 2018) lalu hidrolisis (Kartik et al., 2021 yang dimodifikasi) dengan pemanasan suhu 80, 90, dan 100°C dan waktu 1, 2 dan 3 jam kemudian dianalisis gula pereduksi dengan metode DNS (Miller, 1959) untuk menentukan perlakuan terbaik. Penelitian tahap kedua bertujuan membuat produk sinbiotik yang terdiri atas L. plantarum IFO 3074 sebagai probiotik dan hidrolisat rumput laut sebagai prebiotik. Tahapan ini meliputi fermentasi rumput laut dengan penambahan hidrolisat 0,2% pada lama fermentasi 24 jam (Adhani, 2021). Hasil fermentasi dianalisis secara mikrobiologis berupa jumlah koloni BAL (Badan Standardisasi Nasional [BSN], 2009) dan kimiawi berupa analisis gula pereduksi dengan metode DNS (Miller, 1959); TAT (BSN, 2009); pH (Association of Official Analytical Chemists [AOAC], 2005). Rancangan penelitian pada tahapan hidrolisis menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RALF) menggunakan analisis ragam dengan faktor suhu (80, 90, dan 100°C) dan waktu hidrolisis (1, 2, dan 3 jam) kemudian dilanjutkan dengan uji Tukey, sementara pada hasil fermentasi dianalisis dengan uji T.

Hidrolisis rumput laut *K. alvarezii* secara hidrotermal Preparasi bahan baku

Tahapan hidrolisis dimulai dengan preparasi bahan baku rumput laut segar menjadi bahan baku kering (Gereniu *et al.* 2018). Proses ini meliputi proses pencucian, perendaman *K. alvarezii* (dengan pergantian air) selama 2x24 jam untuk menghilangkan bahan pengotor. Setelah ditiriskan, rumput laut dikeringkan dengan sinar matahari

hingga diperoleh rumput laut bersih dengan berat kering sebesar 10% dari berat basah dan dilakukan penyerbukan untuk mempermudah proses hidrolisis.

Produksi Hidrolisat dari K.alvarezii

Rumput laut K. alvarezii yang memiliki susunan polisakarida kompleks terlebih dahulu dihidrolisis untuk memperoleh rumput laut dengan struktur molekul yang lebih sederhana. Proses hidrolisis pada penelitian ini dilakukan menggunakan pendekatan konvensional yaitu proses hidrotermal dengan pemanasan menggunakan autoklaf (Kartik et al., 2021) yang dimodifikasi, yaitu merendam sampel kering yang telah diblender dengan akuades selama 2 jam dengan perbandingan 1:40 (b/v). Sampel yang telah mengembang dipanaskan menggunakan autoklaf suhu 80, 90, dan 100°C selama 1, 2, dan 3 jam. Parameter yang diukur dalam penentuan proses hidrolisis terbaik adalah analisis gula pereduksi dengan metode DNS (Miller, 1959). Perlakuan yang memiliki kadar gula tertinggi merupakan perlakuan terpilih dalam proses hidrolisis rumput laut K. alvarezii.

Fermentasi hidrolisat rumput laut K. alvarezii Persiapan kultur starter bakteri probiotik L. plantarum

Starter bakteri probiotik sebagai bakteri asam laktat merupakan kultur yang akan digunakan dalam proses fermentasi dengan media susu. Proses persiapan starter dimulai dengan mengambil sebanyak 1 ose bakteri yang telah tumbuh pada MRSA sebagai media agar selektif bakteri asam laktat, kemudian diinokulasi ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL media MRSB sebagai media cair selektif bakteri asam laktat. Media selanjutnya diinkubasi dalam keadaan anaerob pada inkubator suhu 37°C selama 24 jam sehingga diperoleh kultur cair L. plantarum. Kultur cair yang diperoleh selanjutnya diinokulasikan ke dalam susu sapi segar komersial sebanyak 10% (v/v) dari volume susu dan diinkubasi pada suhu ±30°C selama 24 jam (Adhani, 2021) yang dimodifikasi.

Produksi sinbiotik dengan bakteri *L. plantarum*

Proses fermentasi dilakukan untuk mengetahui kemampuan dari hidrolisat dalam menstimulasi pertumbuhan bakteri probiotik dimulai dengan menambahkan hidrolisat rumput laut sebagai prebiotik pada susu segar komersial sebanyak 0,2% (b/v) kemudian dihangatkan pada penangas air ±40°C. Sampel yang mulai dingin (mendekati suhu ruang) selanjutnya diinokulasikan dengan kultur starter bakteri probiotik L. plantarum sebanyak 10% (v/v). Sampel yang terdiri atas susu, hidrolisat, dan bakteri selanjutnya dihomogenkan secara perlahan dan dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Adhani, 2021) yang dimodifikasi. Sampel hasil fermentasi yang merupakan produk sinbiotik kemudian dianalisis karakteristik mikrobiologi dan kimiawi, meliputi perhitungan total bakteri asam laktat (BAL), gula reduksi, total asam tertitrasi (TAT), dan pengukuran derajat keasaman (pH).

Analisis gula reduksi

Pengujian kandungan gula reduksi metode dilakukan dengan **DNS** (menggunakan reagen 3,5-dinitrosalisilat) yang mengacu pada Miller (1959) yang dimodifikasi. Reagen DNS dibuat dengan cara mencampurkan sebanyak 1,06 g DNS dan 1,98 g NaOH pada 141 mL akuades lalu ditambahkan 30,6 g K-Na Tartarat. Larutan yang telah dibuat selanjutnya ditambahkan dengan larutan fenol yang terdiri atas 0,76 g fenol cair dan 0,83 g Na-Metabisulfat. Larutan standar (galaktosa) yang dibuat dalam 500 ppm selanjutnya dibuat konsentrasi larutan standar 50, 100, 150, 200, 250, dan 300 ppm kemudian masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 1 mL pada tabung reaksi dan ditambahkan 3 mL larutan DNS, di samping itu masing-masing 1 mL larutan sampel pada tabung reaksi ditambahkan 3 mL DNS. Larutan standar dan larutan sampel selanjutnya di-vortex, dan diinkubasi selama 15 menit dan setelah itu diukur absorbansinya spektrofotometer UV-Vis pada dengan panjang gelombang 512 nm.

Analisis total asam tertitrasi

Total asam dihitung sebagai asam laktat yang mengacu pada (Standar Nasional Indonesia [SNI], 2009) dengan larutan NaOH 0,1 N dan larutan indikator fenolftalein (PP) 1%. Larutan NaOH dibuat dengan mengambil 5,3 mL lindi minyak (larutan NaOH 50%) dan dilarutkan pada 1 L air suling sementara larutan indikator PP 1% dibuat dengan melarutkan 1 g serbuk PP dengan alkohol 95% hingga 100 mL. Proses pengukuran dilakukan dengan memipet 5 mL sampel dilarutkan dengan air bebas CO, di dalam erlenmeyer sebanyak 2 kali volume sampel kemudian ditambahkan 2 tetes indikator PP dan dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N hingga terbentuk warna merah muda. Perhitungan total asam dilakukan menggunakan rumus:

Jumlah Asam (%)=
$$\frac{V \times N \times 90}{W}$$
x 100%

Keterangan:

W = Bobot sampel (mL)

V = Volume larutan NaOH (mL) N = Normalitas larutan NaOH 90 = Bobot setara asam laktat

Perhitungan jumlah bakteri asam laktat (BAL)

Perhitungan jumlah bakteri asam laktat dilakukan berdasar pada BSN (2015) yang menggunakan Diluted Butterfield's Phosphate (DBP) steril dan diinkubasikan pada suhu 37°C. Persiapan pengujian untuk sampel cair dilakukan dengan mengambil 10 mL sampel dan diencerkan dengan 90 mL larutan pengencer DBP pada erlenmeyer. Sampel kemudian dihomogenkan untuk mendapatkan pengenceran 10⁻¹. 1 mL sampel dari pengenceran 10⁻¹ kemudian dipipet dan dimasukkan ke dalam 9 mL larutan DBP lalu di-vortex sehingga didapatkan pengenceran 10⁻². Proses tersebut dilakukan dengan metode yang sama hingga mendapat pengenceran 10⁻⁸. 1 mL sampel dari pengenceran 10⁻⁶, 10⁻ ⁷, dan 10⁻⁸ selanjutnya ditanam pada MRSA dengan metode perhitungan cawan pour plate (agar tuang) karena bakteri yang digunakan tidak dipengaruhi oleh oksigen, yaitu sampel dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang dilakukan secara duplo untuk setiap pengenceran kemudian ditambahkan 15-20 mL MRSA dan dihomogenkan secara perlahan. Sampel selanjutnya diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C pada posisi terbalik selama 48 jam. Seperti halnya dengan sampel bubuk, persiapan pengujian dilakukan dengan melarutkan sampel dengan 1:9 sebagai pengenceran perbandingan 10⁻¹ kemudian dipipet sebanyak 1 mL dan dilarutkan pada 9 mL larutan DBP lalu di-vortex sehingga didapatkan pengenceran 10⁻². Proses tersebut dilakukan dengan metode yang sama hingga pengenceran 10⁻⁷. Sebanyak 1 mL sampel dari pengenceran 10⁻⁵, 10⁻⁶, dan 10⁻⁷ selanjutnya ditanam pada MRSA dengan metode agar tuang. Jumlah bakteri asam laktat kemudian dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$N = \frac{\sum_{c} \sum_{(1 \times ni) + (0, 1 \times nii] \times (d)} \sum_{c} \sum_{c} \sum_{d} \sum_{c} \sum_{c} \sum_{c} \sum_{d} \sum_{c} \sum_{c}$$

Keterangan:

N = jumlah koloni, dinyatakan dalam koloni per mL atau koloni per gram

 Σc = jumlah koloni pada semua cawan yang dapat dihitung

ni = jumlah cawan dari pengenceran pertama yang dihitung

nii = jumlah cawan dari pengenceran kedua yang dihitung

d = pengenceran pertama yang dihitung

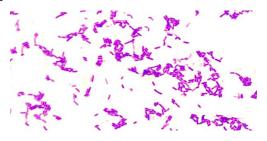
Pengukuran pH

Pengukuran PH dilakukan dengan menggunakan pH meter. Proses tersebut dilakukan dengan mencelupkan elektrode pH meter pada larutan sampel sampai menunjukan angka stabil yang tertera pada layar pH meter. Setelah digunakan, katoda pH meter dibilas dengan akuades dan dikeringkan dengan tisu (AOAC, 2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN Karakteristik Isolat Bakteri *L. plantarum*

Produksi bubuk sinbiotik dari rumput laut yang berbasis fermentasi susu dilakukan menggunakan bakteri asam laktat *L. plantarum* IFO 3074. Hasil peremajaan dari stok kultur yang selanjutnya diinkubasi selama 48 jam menunjukkan morfologi yang berwarna putih susu dan tergolong

sebagai bakteri gram positif. Berdasarkan gambar terlihat bahwa hasil pewarnaan gram menunjukkan bahwa bakteri berupa gram positif yang berbentuk basil. Peneliti di University of California (2018) menyatakan bahwa *L. plantarum* memiliki bentuk batang lurus dan ujung membulat, katalase negatif, dapat hidup soliter ataupun membentuk rantai dengan panjang yang bervariasi dan umumnya bersifat anaerob fakultatif. Hasil pewarnaan gram yang dilakukan ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1 Bakteri *Lactobacillus plantarum* (1000x)

Penambahan bakteri asam laktat pada produk berbasis fermentasi susu, dilakukan dalam bentuk starter yaitu bakteri yang telah diadaptasikan pada media susu. Malo & Urquhart (2015) menyatakan bahwa kultur starter merupakan persiapan kultur mikrobiologi yang akan digunakan dalam proses fermentasi dengan pilihan kultur starter tergantung pada media, substrat atau bahan baku yang difermentasi. Standar susu fermentasi menjelaskan bahwa keberadaan bakteri probiotik minimum 106 CFU/mL (BSN, 2009). Jumlah BAL pada starter yang digunakan penelitian ini sebesar 5,4×108 CFU/mL sehingga starter yang digunakan pada proses fermentasi telah memenuhi kriteria yang ditetapkan.

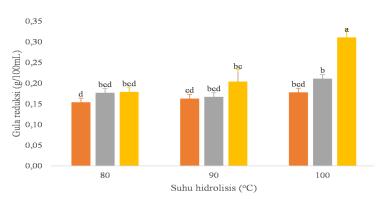
Hidrolisis K. alvarezii secara hidrotermal

Proses depolimerisasi polisakarida laut yang diketahui memiliki aktivitas biologis yang luas dapat diterapkan melalui teknologi hijau sebagai upaya pemeliharaan bioaktivitas, kelayakan ekonomi dalam mengurangi dampak lingkungan dan biaya produksi (Ervantes-Cisneros *et al.*, 2017). Proses hidrotermal, salah satu proses dalam teknologi hijau, merupakan teknologi yang

prinsipnya menguraikan senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan memanfaatkan suhu (Morimoto et al., 2014). Mekanisme hidrotermal yang terjadi pada rumput laut adalah pemanfaatan suhu tinggi yaitu pemanasan, untuk memutus rantai panjang dari rumput laut yang merupakan polisakarida kompleks menjadi gula sederhana yang dapat dikategorikan sebagai gula pereduksi.

Gula reduksi merupakan jenis gula sederhana yang bersifat pereduksi terhadap senyawa penerima elektron karena adanya gugus aldehid atau keton bebas pada ujung monomernya seperti monosakarida (glukosa, galaktosa serta fruktosa) dan disakarida (laktosa dan maltosa), kecuali sukrosa dan pati (polisakarida). Proses analisis gula reduksi merupakan parameter yang menunjukkan pembentukan molekul sederhana pada proses hidrolisis. Pembentukan gula reduksi dapat dilakukan dengan berbagai metode hidrolisis yang salah satunya dengan pemanasan (Morimoto et al., 2014). Proses hidrolisis yang dilakukan pada penelitian ini adalah pemanasan menggunakan autoklaf dengan suhu 80°C, 90°C dan 100°C selama 1, 2, dan 3 jam. Berikut hasil hidrolisis setiap perlakuan ditunjukkan pada Gambar 2.

Berdasarkan analisis ragam, kandungan gula reduksi dipengaruhi oleh faktor waktu, suhu dan interaksi keduanya. Hasil uji lanjut Tukey diperoleh bahwa perlakuan terbaik dalam menghasilkan gula reduksi adalah proses hidrolisis dengan suhu 100°C selama 3 jam dengan kandungan gula reduksi tertinggi sebesar 0,31 g/100 mL. Perlakuan tersebut signifikan dengan semua perlakuan, sementara perlakuan 100°C selama 1 dan 2 jam tidak signifikan dengan perlakuan suhu 90°C dan 80°C untuk semua waktu hidrolisis. Gula reduksi dari perlakuan terbaik memiliki nilai yang lebih rendah jika dibandingkan dengan hidrolisis menggunakan asam yaitu 8,0 g/100 mL (Rahim et al., 2014) dan enzim yaitu 1,49 g/100 mL (Zelvi, 2017). Hal tersebut terjadi karena pada penelitian ini diterapkan metode yang paling sederhana untuk mengurangi biaya produksi dan dampak lingkungan sehingga menunjang keberlangsungan produksi jangka panjang.



Gambar 2 Hasil hidrolisis *Kappaphycus alvarezii* (■ 1 jam; ■ 2 jam; ■ 3 jam); huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan faktor interaksi (*p*<0,05)

Konsentrasi gula reduksi dari berbagai perlakuan pengamatan menunjukkan bahwa suhu dan waktu memengaruhi konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan. Morimoto et al. (2014) yang melakukan depolimerisasi sulfated polysaccharides dalam kondisi hidrotermal 120-180°C, dengan waktu 5-60 menit menunjukkan bahwa perubahan nilai berat molekul bergantung pada suhu dan waktu reaksi, selain itu pada penelitian Siregar et al. (2016) yang melakukan degradasi pada K. alvarezii dengan penambahan hidrogen peroksida (H_2O_2) menemukan bahwa perbedaan suhu memberikan perbedaan terhadap terhadap bobot molekul produk yang dihasilkan, yaitu pada suhu 40°C dihasilkan bobot molekul 304,24 kDa sementara pada suhu 80°C diperoleh bobot molekul yang lebih rendah sebesar 286,86 kDa.

Tingginya kandungan gula reduksi pada perlakuan suhu 100 °C selama 3 jam karena proses degradasi yang berupa pemutusan rantai panjang dari polisakarida lebih banyak terjadi, sehingga semakin tinggi suhu dan lama waktu hidrolisis memberikan peluang pembentukan komponen sederhana yang lebih besar. Kandungan gula reduksi umumnya dikaitkan dengan keberadaan karagenan karena pada proses degradasi yang terus terjadi, akan terbentuknya molekul sederhana yang bersifat pereduksi sehingga semakin banyak karagenan yang terbentuk dari suatu proses maka semakin banyak gula reduksi yang dihasilkan. Hal tersebut didukung oleh Duan et al. (2016) yang membandingkan kandungan gula reduksi dari proses hidrolisis menggunakan selulase dengan yang mengombinasikan selulase dan kappa karagenase. Jumlah gula reduksi yang dihasilkan oleh sampel yang dihidrolisis dengan menggunakan selulase terlebih dahulu lalu dilanjutkan dengan κ -karagenase menghasilkan jumlah yang lebih tinggi dibandingkan dengan sampel yang hanya dihidrolisis dengan selulase.

Keberadaan hidrolisat Κ. alvarezii menjadi diharapkan dapat prebiotik (nutrisi) bagi bakteri L. plantarum dalam proses fermentasi. Setyaningsih et al. (2019) menyatakan bahwa kemampuan rumput laut K. alvarezii sebagai prebiotik dapat terjadi ketika polisakarida berada dalam bentuk yang lebih sederhana dengan berat molekul rendah yaitu dalam bentuk oligosakarida. Oligosakarida merupakan oligomer atau karbohidrat dengan berat molekul rendah yaitu 3-10 unit monosakarida dengan derajat polimerisasi (DP) antara 20-25. Penelitian Bouanati et al. (2020) menemukan bahwa pada karagenan yang dihidrolisis dengan microwave menghasilkan DP<25 dengan kandungan oligosakarida sebesar ~20%, atau setara dengan 20 mg oligosakarida dalam 1 g polisakarida. Permatasari (2018) menemukan bahwa jenis prebiotik pada rumput laut tersebut berupa galaktooligosakarida (GOS).

Efektivitas Hidrolisat Rumput Laut terhadap Karakteristik Mikrobiologis dan Kimiawi Hasil Fermentasi

Peningkatan tren pangan fungsional menjadikan variasi bahan tambahan yang bersifat fungsional menjadi lebih meningkat. penambahan mikroorganisme berupa bakteri asam laktat (BAL) atau probiotik menjadi suatu inovasi yang sangat kompetitif karena banyak digemari dan telah terbukti memberi efek kesehatan melalui penyeimbangan mikrobiota usus dalam tubuh seperti susu fermentasi (Surono & Hosono, 2011).

Peningkatan sifat fungsional dari produk yang mengandung probiotik dapat diperoleh dalam bentuk sinbiotik, yaitu produk yang mengandung prebiotik dan probiotik yang dapat diperoleh dari proses fermentasi ataupun nonfermentasi. Fermentasi merupakan proses pemecahan senyawa kompleks menjadi senyawa sederhana secara anaerobik oleh mikroorganisme dengan tujuan meningkatkan sifat fungsional dengan memperpanjang masa simpan produk, meningkatkan sifat sensoris, daya terima, nilai gizi dan keamanan pangan yang dapat memberikan efek kesehatan melalui meningkatkan aktivitas biologis, senyawa metabolit yang dapat berperan dalam detoxifikasi dan peningkatan probiotik dan fungsi kekebalan gastrointestinal (Malo & Urquhart, 2015). Rumput laut K. alvarezii memiliki kemampuan sebagai prebiotik merupakan suatu peluang dalam produksi sinbiotik untuk memperkaya metabolit dari sinergisme antara bakteri (probiotik) dengan prebiotik yang berasal dari K. alvarezii. Perbedaan karakteristik dari hasil fermentasi selama 24 jam ditunjukkan pada Tabel 1.

Total asam tertitrasi (TAT) merupakan analisis yang menyatakan kandungan asam yang berupa senyawa organik yang diproduksi selama fermentasi dan dinyatakan dalam persen (%). Berdasarkan uji T, kandungan total asam tertitrasi dari hasil fermentasi pada penelitian ini tidak dipengaruhi secara signifikan oleh penambahan hidrolisat.

Nilai %TAT pada sampel yang mengandung hidrolisat memiliki persentase yang lebih rendah yaitu 0,28% sementara yang tidak mengandung hidrolisat sebesar 0,29%. Standar mutu susu fermentasi berdasarkan BSN (2009) menyatakan bahwa kandungan persentase total asam tertitrasi pada susu fermentasi yang baik adalah 0,2–0,9% sehingga hasil penelitian ini masih memenuhi standar baik sampel fermentasi tanpa penambahan hidrolisat maupun produk sinbiotik (yang mengandung hidrolisat).

Peningkatan TAT setelah fermentasi pada sampel tanpa hidrolisat terjadi karena adanya laktosa pada susu terdegradasi oleh laktase dan menjadi glukosa dan galaktosa, kemudian glukosa akan diubah menjadi asam laktat total asam (Permatasari, 2018). Meskipun demikian, pada produk sinbiotik masih terdapat nilai tambah karena dengan adanya hidrolisat akan menghasilkan senyawa-senyawa organik yang memiliki aktivitas biologis yang baik untuk kesehatan seperti asam butirat, asam propanoat (Annunziata et al., 2020).

Nilai pH dipengaruhi oleh persentase TAT. Semakin tinggi TAT maka semakin rendah nilai pH. Hasil pengukuran pH diperoleh bahwa terjadi peningkatan keasaman setelah fermentasi dari menjadi >4. Hal tersebut sesuai dengan Sulaiman (2016) yang menyatakan bahwa penurunan nilai pH yang terjadi setelah fermentasi merupakan efek dari peningkatan kandungan asam selama proses fermentasi yang berlangsung. Pada penelitian ini, berdasarkan uji T diperoleh bahwa perbedaan nilai pH dipengaruhi oleh penambahan hidrolisat. Nilai pH pada perlakuan yang mengandung hidrolisat

Tabel 1 Karakteristik produk setelah fermentasi 24 jam

Parameter	Sebelum fermentasi	Setelah fermentasi	
		Tanpa hidrolisat	Penambahan 0,2% hidrolisat
Asam tertitrasi (%)	0,07	0,29a	0,28ª
рН	6,35	$5,40^{a}$	4,63 ^b
Jumlah BAL (log CFU/mL)	7,89	9,16ª	$9,40^{\rm b}$
Gula reduksi (g/100 mL)	74,73	72,00ª	66,78 ^b

Keterangan: Superscript berbeda dalam baris yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan

lebih rendah yaitu sebesar 4,48 sementara perlakuan tanpa hidrolisat sebesar 5,38. Berdasarkan standar susu fermentasi, nilai pH tersebut tidak memenuhi standar Food Standard Australia New Zealand (2015) yaitu <4,5 namun pH sinbiotik lebih mendekati standar jika dibandingkan dengan sampel tanpa hidrolisat.

Dalam proses fermentasi bakteri asam laktat untuk menghasilkan produk berbasis probiotik dan sinbiotik, jumlah bakteri merupakan salah satu parameter kritis yang ketentuannya diatur dalam SNI. Jumlah bakteri dihitung dalam bentuk koloni dengan satuan CFU (Colony Forming Unit). Pada penelitian ini, jumlah koloni bakteri setelah fermentasi 24 jam menunjukkan bahwa hidrolisat memengaruhi jumlah koloni dari bakteri L. plantarum. Jumlah koloni sebelum fermentasi memiliki rerata 7,90 log CFU/mL dan mengalami peningkatan setelah fermentasi dengan jumlah koloni bakteri sebesar 9,16 log CFU/mL pada hasil fermentasi tanpa hidrolisat dan sebesar 9,40 log CFU/mL pada produk berbasis sinbiotik, yaitu yang mengandung hidrolisat. Pada penelitian ini, jumlah bakteri asam laktat tersebut telah memenuhi standar yang ditentukan SNI yaitu >7 log CFU/g (SNI, 2009). Adanya peningkatan jumlah bakteri setelah fermentasi menunjukkan bahwa terjadi proses pertumbuhan berupa pembelahan sel yang menyebabkan adanya penambahan jumlah bakteri. Peningkatan jumlah bakteri yang lebih tinggi pada sampel sinbiotik terjadi karena adanya pemecahan substrat dari rumput laut maupun laktosa pada susu sementara pada sampel tanpa hidrolisat tidak terjadi pemecahan gula yang diperoleh dari hidrolisat rumput laut. Menurut Permatasari (2018), pada rumput laut K. alvarezii terdapat prebiotik yang berupa galaktooligosakarida (GOS) sehingga dengan penambahan hidrolisat mampu mempromotori pertumbuhan bakteri probiotik.

Konsentrasi gula pereduksi dipengaruhi oleh konsentrasi hidrolisat. Berdasarkan data yang diperoleh, konsentrasi gula pereduksi setelah fermentasi pada sampel yang tidak mengandung hidrolisat menunjukkan rerata sebesar 71,97 g/100 mL dan sampel

yang mengandung hidrolisat sebesar 66,78 g/100 mL. Penurunan gula pereduksi karena gula pereduksi dihidrolisis oleh bakteri selama proses fermentasi. Behera et al. (2018) menyatakan bahwa L. plantarum menghasilkan enzim hidrolase glikosida berupa α-amilase yang berfungsi untuk mendegradasi komponen polisakarida (mentah ataupun terlarut) menjadi gula sederhana. Selain itu bakteri L. plantarum juga mampu memproduksi enzim selulase yang dapat mendegradasi selulosa yang tergolong karagenan yang terekstrak pada hidrolisat rumput laut menjadi gula sederhana, sementara menurut Behera et al. (2018) pada bakteri L. plantarum terdapat sistem enzim yang menghasilkan laktase dehidrogenase, merupakan senyawa yang dapat memecah gula laktosa menjadi asam laktat sehingga menyebabkan kandungan TAT pada saat setelah fermentasi menjadi lebih tinggi.

KESIMPULAN

Proses hidrolisis secara sederhana dengan pemanasan dipengaruhi secara nyata oleh interaksi suhu dan waktu. Hidrolisat terbaik pada suhu 100°C selama 3 jam, menghasilkan konsentrasi gula pereduksi 0,31 g/100 mL. Penambahan hidrolisat berpengaruh terhadap karakteristik produk sinbiotik jika dibandingkan dengan kontrol (sampel tanpa penambahan hidrolisat). Keberadaan hidrolisat pada produk mampu meningkatkan parameter mikrobiologis dan kimiawi produk sinbiotik yang dihasikan sehingga diharapkan memiliki sifat fungsional yang lebih baik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Keuangan Republik Indonesia yang telah memberikan dana penelitian melalui Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP).

DAFTAR PUSTAKA

Adhani, S. W. (2021). Karakteristik yoghurt spirullina dengan starter *Lactobacillus plantarum* SK (5) pada perbedaan konsentrasi biomassa dan waktu inkubasi [skripsi]. Institut Pertanian Bogor.

Annunziata, G., Arnone, A., Ciampaglia, R,

- Tenore, G. C., & Novellino, E. (2020). Fermentation of foods and beverages as a tool for increasing availability of bioactive compounds: Focus on short-chain fatty acids. *Foods*. 9(8). doi:10.3390/foods9080999
- Asikin, A. N., & Kusumaningrum, I. (2019). Karakteristik fisikokimia karaginan berdasarkan umur panen yang berbeda dari perairan Bontang, Kalimantan Timur. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 22(1). doi:10.17844/jphpi. v22i1.25890
- Association Official Analytical Chemistry. (2005). Official method of analysis. 18th Ed. AOAC International
- Badan Pusat Statistik. (2022). Statistik ekspor hasil perairan tahun 2017-2022. Diolah Direktorat Jenderal Penguatan Daya Saing Produk Kelautan dan Perikanan, Kementerian Kelautan dan Perikanan. Badan Pusat Statistik.
- Badan Standardisasi Nasional. (2009). Minuman Susu Fermentasi Berperisa. SNI 7552-2009.
- Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolec, N. (2018). Lactobacillus plantarum with functional properties: An approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. Biomed Res Int, 2018. doi:10.1155/2018/9361614
- Balboa, E. M., Rivas, S., Moure, A., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2013). Simultaneous extraction and depolymerization of fucoidan from *Sargassum muticum* in aqueous media. *Mar Drugs*. 11(11), 4612–4627. doi:10.3390/md11114612
- Bouanati, T., Colson, E., Moins, S., Cabrera, J. C., Eeckhaut, I., Raquez, J. M., & Gerbaux, P. (2020). Microwave-assisted depolymerization of carrageenans from *Kappaphycus alvarezii* and *Eucheuma spinosum*: Controlled and green production of oligosaccharides from the algae biomass. *Algal Res*, 51. doi:10.1016/j. algal.2020.102054
- Cervantes-Cisneros, D. E., Arguello-Esparza D, Cabello-Galindo A, Picazo B, Aguilar CN, Ruiz HA, Rodriguez-Jasso RM. (2017). Hydrothermal processes for extraction of macroalgae high value-added compounds. In: Ruiz, H.,

- Hedegaard Thomsen, M., & Trajano, H. (eds) Hydrothermal Processing in Biorefineries. Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-319-56457-920
- Decroli, E. (2019). Diabetes melitus tipe 2. Ed ke 1. Pusat Penerbitan Bagian Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran. Universitas Andalas.
- Duan, F., Yu, Y., Liu, Z., Tian, L., & Mou, H. (2016). An effective method for the preparation of carrageenan oligosaccharides directly from *Eucheuma cottonii* using cellulase and recombinant κ-carrageenase. *Algal Research*, 15, 93–99. doi:10.1016/j.algal.2016.02.006
- Eveline, Santoso, J., & Widjaja, I. (2011). Kajian konsentrasi dan rasio gelatin dari kulit ikan patin dan kappa karagenan pada pembuatan jeli. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 14(2), 98–105. doi:10.17844/jphpi.v14i2.5318
- Fateha, Wibowo, S., Santoso, J., Agusman, & Uju. (2019). Optimization of processing conditions of alkali treated cottonii (ATC) from sap-free *Eucheuma cottonii*. Squalen *Bull. of Mar. and Fish. Postharvest and Biotech.* 14(2), 65-72. doi:10. 15578/squalen.v14i2.397
- Firdaus, M., Yahya, Nugraha, G. R. H., & Utari D. D. (2017). Fortification of seaweed (*Eucheuma cottonii*) flour on nutrition, iodine, and glycemic index of pasta. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*, 89(1). doi:10.1088/1755-1315/89/1/012011
- Gereniu, C. R. N., Saravana, P. S., & Chun, B. S. (2018). Recovery of carrageenan from Solomon Islands red seaweed using ionic liquid-assisted subcritical water extraction. *Sep Purif Technol*, 196, 309–317. doi:10.1016/j.seppur.2017.06.055
- Gómez-Ordóñez, E., Jiménez-Escrig, A., & Rupérez, P. (2014). Bioactivity of sulfated polysaccharides from the edible red seaweed *Mastocarpus stellatus*. *Bioact Carbohydrates Diet Fibre*. 3(1), 29–40. doi:10.1016/j.bcdf.2014.01.002
- Halimah, S. N., Suryani, R. A., Wijayanti, S. W., Pangestu, R. A., Deni, G. D., & Romadhon. (2016). Fortification seaweed noodles [*Euchema cottonii* (Weber-van Bosse, 1913)] with nano-calcium from

- bone catfish [*Clarias batrachus* (Linnaeus, 1758)]. *Aquat Procedia*, 7, 221–225. doi:10.1016/j.aqpro.2016.07.030
- Huang, C. Y., Wu, S. J., Yang, W. N., Kuan, A. W., & Chen, C. Y. (2016). Antioxidant activities of crude extracts of fucoidan extracted from *Sargassum glaucescens* by a compressional-puffing-hydrothermal extraction process. *Food Chem*, 197, 1121–1129. doi:10.1016/j.foodchem. 2015.11.100
- Kartik, A., Akhil, D., Lakshmi, D., Panchamoorthy Gopinath, K., Arun, J., Sivaramakrishnan, R., & Pugazhendhi, A. (2021). A critical review on production of biopolymers from algae biomass and their applications. *Bioresour Technol.* 329, 124868. doi:10.1016/J. BIORTECH.2021.124868
- Malo, P. M., & Urquhart, E. A. (2015). Fermented foods: Use of starter cultures. *Encyclopedia of Food and Health*. 681-685, doi: 10.1016/B978-0-12-384947 2.00282-8
- Martínez-Sanz, M., Gómez-Mascaraque, L. G., Ballester, A. R., Martínez-Abad, A., Brodkorb, A., & López-Rubio, A. (2019). Production of unpurified agar-based extracts from red seaweed *Gelidium sesquipedale* by means of simplified extraction protocols. *Algal Res*, 38,101420. doi:10.1016/j.algal.2019.101420
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 31(3), 426–428. doi:10.1021/ac60147a030
- Moody, S. D., Hanidah, I. I., Kayaputri, I. L., Rialita, T., Sukarminah, E., & Zakaria, R. A. P. (2019). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with freeze drying method and application to synbiotic beverage of banana corm stone. *Int J Adv Sci Eng Inf Technol*, 9(2), 532–537. doi:10.18517/ijaseit.9.2.7903
- Morimoto M, Takatori M, Hayashi T, Mori D, Takashima O, Yoshida S, Sato K, Kawamoto H, Tamura JI, Izawa H, et al., (2014). Depolymerization of sulfated polysaccharides under hydrothermal conditions. *Carbohydr Res*, 384, 56–60. doi:10.1016/J.CARRES. 2013.11.017

- O'Sullivan, A. M., O'Grady, M. N., O'Callaghan, Y. C., Smyth, T. J., O'Brien, N. M., & Kerry, J. P. (2016). Seaweed extracts as potential functional ingredients in yogurt. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 37 PB, 293–299. doi:10.1016/j.ifset.2016.07.031
- Pangestuti, R., & Kim, S. K. (2014). Biological Activities of Carrageenan. Ed ke-1. Volume ke-72. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-800269-8.00007-5#
- Peraturan Presiden Republik Indonesia. (2019). Peta Panduan (Road Map) Pengembangan Industri Rumput Laut Nasional Tahun 2018-2021. Indonesia: Sekretariat Kabinet RI, Deputi Bidang Kemaritiman.
- Permatasari, V. R. (2018). Pemanfaatan rumput laut *Eucheuma cottonii* untuk memproduksi galakto-oligosakarida [tesis]. Institut Pertanian Bogor.
- Rahim, F. A., Wasohm H., Zakaria, M. R., Ariff, A., Kapri, R., Ramli, N., & Siew-Ling, L. (2014). Production of high yield sugars from *Kappaphycus alvarezii* using combined methods of chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Hydrocolloids*, 42(2), 309-315. doi:10.1016/j. foodhyd.2014.05.017
- Roohinejad, S., Koubaa, M., Barba, F. J., Saljoughian, S., Amid, M., & Greiner, R. (2017). Application of seaweeds to develop new food products with enhanced shelf-life, quality and health-related beneficial properties. *Food Res Int*, 99, 1066–1083. doi:10.1016/j.foodres. 2016.08.016
- Saravana, P. S., Cho, Y. N., Patil, M. P., Cho, Y. J., Kim, G. D., Park, Y. B., Woo, H. C., & Chun, B. S. (2018). Hydrothermal degradation of seaweed polysaccharide: Characterization and biological activities. *Food Chem*, 268 January, 179–187. doi:10.1016/j. foodchem.2018.06.077
- Setyaningsih, D., Musdaniaty, D., & Muna, N. (2019). Produksi bubuk sinbiotik dari hidrolisat *Eucheuma cottonii* menggunakan spray drying. *J Teknol Ind Pertan*, 29(3), 233–239. doi:10.24961/j. tek.ind.pert.2019.29.3.233
- Simatupang, N. F., Pong-Masak, P.R., Ratnawati, P., Agusman, Paul, N. A., & Rimmer, M. A. (2021). Growth and product quality of

- the seaweed *Kappaphycus alvarezii* from different farming locations in Indonesia. *Aquaculture reports.* doi: 10.1016/j.aqrep.2021.100685
- Siregar, R. F., Santoso, J., & Uju, U. (2016). Physico chemical characteristic of kappa carrageenan degraded using hydrogen peroxide. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 9(3). doi:10.17844/jphpi.v19i3.15085
- Sudirman, S., Hsu, Y. H., He, J. L., & Kong, Z. L. (2018). Dietary polysacchariderich extract from *Eucheuma cottonii* modulates the inflammatory response and suppresses colonic injury on dextran sulfate sodiuminduced colitis in mice. *PLoS One*, 13(10), 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0205252
- Sukotjo, S., Syarafina, A., & Irianto, H. (2020). The effect of seaweed (*Eucheuma cottonii*) and tofu dregs formula on chocolate pudding. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*, 439(1), 012052. doi:10.1088/1755-1315/439/1/012052
- Sulaiman, N. B. (2016). Kualitas sosis fermentasi domba dengan penambahan probiotik *Lactobacillus plantarum* IIA-2C12 atau *Lactobacillus acidophilus* IIA-2B4 [tesis]. Institut Pertanian Bogor.
- Suriyani, S., Yusuf, R., & Syakur, A. (2018). Waste application of seaweed (*Eucheuma cottonii*) on plant growth and results of mustard (*Brassica juncea* L.). *Agrol Agric Sci J*, 4(2), 83. doi:10.22487/j24077593.2017.v4.i2.9543

- Surono, I. S., & Hosono, A. (2011). Fermented milks: types and standards of identity. Encycl Dairy Sci Second Ed. December 2011: 470–476. doi:10.1016/B978-0-12-374407-4.00180-1
- Trilaksani, W., Setyaningsih, I., & Masluha, D. (2015). Formulation of red seaweed and spirulina platensis based jelly drinks. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 18(1). doi: 10.17844/jphpi. v18i1.9565
- University of Calivornia Davis. (2018). Lactobacillus plantarum. Department of Viticulture and Enology. https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/bacteria/lactobacillus-plantarum
- Yu, G., Zhang, Q., Wang, Y., Yang, Q., Yu, H., Li, H., Chen, J., & Fu, L. (2021). Sulfated polysaccharides from red seaweed *Gelidium amansii*: Structural characteristics, anti-oxidant and antiglycation properties, and development of bioactive films. *Food Hydrocoll*. 119 March, 106820. doi:10.1016/j. foodhyd.2021.106820
- Zelvi, M. (2017). Hidrolisis *Eucheuma cottonii* dengan enzim κ-karagenase dalam menghasilkan gula reduksi untuk produksi bioetanol [tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

FIGURE AND TABLE TITLES

- Figure 1 Bacteria of Lactobacillus plantarum (1000x)
- Figure 2 Hydrolizate of Kappaphycus alvarezii
- Table 1 Characteristic products after 24 hours' fermentation