

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Permasalahan lingkungan akibat akumulasi limbah plastik berbahan dasar petroleum telah menjadi isu global yang mendesak untuk diatasi. Meskipun plastik konvensional menawarkan keunggulan berupa kekuatan mekanik, bobot ringan, dan biaya produksi yang ekonomis, material ini memiliki kelemahan fundamental yaitu sifatnya yang tidak dapat terdegradasi secara alami (*non-biodegradable*). Kondisi ini menyebabkan penumpukan limbah plastik di berbagai ekosistem, khususnya ekosistem perairan, yang berdampak pada kematian organisme laut akibat ingesti maupun jeratan limbah plastik (Nguyen et al., 2021). Urgensi permasalahan tersebut mendorong pengembangan material kemasan alternatif yang bersifat *biodegradable*, aman untuk kontak pangan, serta ramah lingkungan. *Edible Film* merupakan salah satu solusi inovatif yang dikembangkan sebagai alternatif kemasan plastik sintetis. Material ini berupa lapisan tipis berbahan dasar biopolimer alami yang dapat dikonsumsi bersama produk pangan dan berfungsi sebagai pelindung makanan. Secara fungsional, *Edible Film* mampu mempertahankan mutu pangan melalui mekanisme penghambatan perpindahan gas (oksigen dan karbon dioksida), penurunan laju penguapan air, serta pencegahan kontaminasi aroma dan mikroorganisme dari lingkungan sekitar (Giyatmi et al., 2020). Aplikasi *Edible Film* telah mencakup berbagai produk pangan seperti daging, sosis, buah-buahan segar, dan sayuran, sehingga berpotensi mengurangi ketergantungan terhadap kemasan plastik sintetis secara signifikan. Bahan penyusun *Edible Film* umumnya berasal dari biopolimer alami yang diklasifikasikan menjadi tiga kategori utama, yaitu hidrokoloid, lipid, dan komposit. Di antara ketiga kategori tersebut, hidrokoloid berbasis protein dan karbohidrat merupakan bahan yang paling banyak digunakan karena kemampuannya membentuk film dengan sifat mekanik yang stabil (Giyatmi et al., 2020). Secara spesifik, *Edible Film* berbasis polisakarida diketahui memiliki kemampuan sebagai penghalang oksigen yang baik sehingga berpotensi besar sebagai pengganti kemasan sintetis, salah satunya ialah karagenan. Karagenan dapat membentuk lapisan pelindung di permukaan makanan, menjaga kualitas dan kesegaran produk dengan menghambat oksidasi dan degradasi. Sifat hidrokoloid pada karagenan dapat membuatnya menjadi bahan dasar yang menjanjikan untuk pembuatan *Edible Film*. Karagenan tersusun atas unit D-galaktosa dan 3,6-anhidro-D-galaktosa dengan gugus sulfat yang berperan penting dalam menentukan sifat fisik dan kimianya. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa penggunaan karagenan dalam *Edible Film* mampu meningkatkan sifat mekanik, fleksibilitas, serta mengontrol permeabilitas uap air film (Nasution, 2022).

Karagenan dapat diekstraksi dari rumput laut merah, salah satunya adalah *Eucheuma cottonii* yang merupakan komoditas unggulan Indonesia. Sebagai negara kepulauan dengan garis pantai terpanjang kedua di dunia, Indonesia memiliki potensi

besar dalam pengembangan budidaya rumput laut. *Eucheuma cottonii* tumbuh melimpah di perairan pesisir Indonesia dan memiliki nilai ekonomis tinggi serta telah banyak dimanfaatkan dalam industri pangan. Proses ekstraksi karagenan dari *Eucheuma cottonii* umumnya dilakukan menggunakan perlakuan alkali, namun metode ini masih memiliki keterbatasan berupa rendemen yang belum optimal, hal ini dikarenakan rendemen yang dihasilkan tergolong rendah yang disebabkan oleh degradasi parsial polisakarida dan hilangnya fraksi karagenan selama proses desulfatasi (Nasution, 2019; Liu et al., 2022). Keterbatasan tersebut mendorong perlunya inovasi proses untuk meningkatkan kualitas dan nilai tambah karagenan. Selain inovasi penambahan bahan aktif, pengembangan metode pengolahan rumput laut juga menjadi aspek penting dalam meningkatkan kualitas *Edible Film*. Fermentasi merupakan salah satu pendekatan yang menarik dalam pengolahan karagenan karena mampu meningkatkan kandungan senyawa bioaktif, memperbaiki nilai gizi, serta memodifikasi struktur polisakarida. Fermentasi menggunakan bakteri asam laktat diketahui dapat menghasilkan asam organik dan enzim yang berperan dalam perubahan struktur dinding sel rumput laut, sehingga berpotensi meningkatkan efisiensi ekstraksi karagenan dan karakteristik film yang dihasilkan (Sumardianto et al., 2021). *Lactobacillus plantarum* merupakan salah satu bakteri asam laktat yang paling banyak digunakan dalam proses fermentasi pangan karena kemampuannya memanfaatkan karbohidrat dan menghasilkan asam laktat secara efisien. Bakteri ini juga menghasilkan enzim yang mampu mendegradasi senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana, sehingga berpotensi memperbaiki sifat fungsional bahan hasil fermentasi (Gao et al., 2022).

Beberapa penelitian terdahulu telah melaporkan potensi fermentasi rumput laut dalam meningkatkan kandungan senyawa bioaktif. Ambarsari et al. (2018) melaporkan bahwa fermentasi dengan starter *Lactobacillus plantarum* meningkatkan aktivitas antioksidan dan total fenol rumput laut *Ulva lactuca*. Rianingsih dan Sumardianto (2020) menunjukkan bahwa proses fermentasi menggunakan *Lactobacillus plantarum* dapat meningkatkan aktivitas antioksidan rumput laut *Sargassum* sp. Yue et al. (2021) juga mendemonstrasikan bahwa *Saccharina latissima* dapat difermentasikan dengan *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae* untuk aplikasi hipolipidemia. Meskipun demikian, literatur mengenai pemanfaatan rumput laut sebagai sumber karagenan untuk pengembangan *Edible Film* yang dievaluasi secara komprehensif, khususnya melalui optimasi proses fermentasi dan pengembangan sifat fungsional film, masih terbatas.

Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini difokuskan pada pengembangan *Edible Film* berbasis kappa karagenan yang diekstraksi dari *Eucheuma cottonii* hasil fermentasi menggunakan bakteri asam laktat, serta difortifikasi dengan ekstrak daun sirih hijau sebagai agen aktif. Karagenan hasil fermentasi akan dikarakterisasi menggunakan *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) untuk mengidentifikasi gugus fungsional, kemudian diaplikasikan dalam pembuatan *Edible Film*. Karakterisasi *Edible Film* meliputi pengujian sifat fisik dan kimia (ketebalan,

daya serap air, kuat tarik, elongasi), aktivitas antioksidan dan antibakteri, serta analisis morfologi menggunakan FTIR, *Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive Spectroscopy* (SEM-EDS), dan *X-Ray Diffraction* (XRD). Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam pengembangan kemasan pangan ramah lingkungan yang fungsional dan berkelanjutan.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan Masalah dari penelitian ini, yaitu sebagai berikut:

1. Bagaimana kondisi optimum formulasi fermentasi rumput laut *Eucheuma cottonii* dengan bakteri asam laktat (*Lactobacillus plantarum*) menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM)?
2. Bagaimana karakteristik kimia (FTIR), kadar air, dan kadar abu karagenan *Eucheuma cottonii* hasil fermentasi?
3. Bagaimana pengaruh fortifikasi ekstrak daun sirih terhadap sifat fisik, mekanik, aktivitas antioksidan, dan aktivitas antibakteri *Edible Film* berbasis karagenan hasil fermentasi?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk :

1. Menentukan kondisi optimum fermentasi rumput laut *Eucheuma cottonii* dengan bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum*.
2. Menganalisis karakteristik karagenan yang diekstraksi dari rumput laut hasil fermentasi.
3. Mengevaluasi pengaruh penambahan ekstrak bahan alam, yaitu daun sirih, terhadap karakteristik fisik, kimia, dan biologis dari *Edible Film* yang dihasilkan.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini secara teoritis adalah memberikan informasi ilmiah mengenai fermentasi rumput laut dengan bakteri asam laktat terhadap karakteristik karagenan dan *Edible Film* yang dihasilkan, serta kontribusi ekstrak daun sirih sebagai agen bioaktif dalam kemasan pangan. Manfaat secara praktis adalah menyediakan dasar pengembangan kemasan pangan *biodegradable* yang fungsional sebagai alternatif kemasan plastik sintetis, serta meningkatkan nilai tambah rumput laut *Eucheuma cottonii* dan daun sirih sebagai komoditas lokal Indonesia.

1.5 Landasan Teori

1.5.1 Rumput Laut *Eucheuma cottonii*

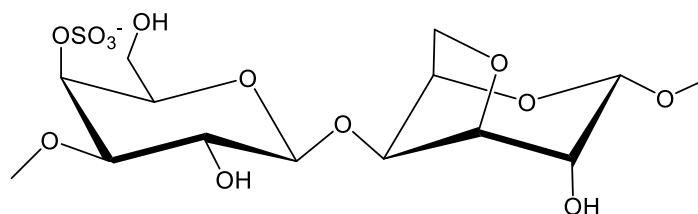
Rumput laut *Eucheuma cottonii* (sinonim: *Kappaphycus alvarezii*) merupakan spesies alga merah (*Rhodophyta*) yang termasuk dalam famili Solieriaceae. Secara taksonomi, *Eucheuma cottonii* diklasifikasikan dalam kingdom Plantae, divisi Rhodophyta, kelas Rhodophyceae, ordo Gigartinales, famili Solieriaceae, genus

Eucheuma, dan spesies *Eucheuma cottonii* (Doty, 1988). Rumput laut ini memiliki karakteristik morfologi berupa talus silindris dengan percabangan yang tidak teratur, berwarna hijau kecokelatan hingga merah keunguan tergantung pada intensitas cahaya dan kedalaman perairan tempat tumbuhnya.

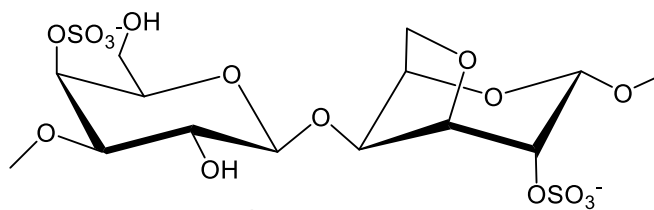
Eucheuma cottonii merupakan salah satu komoditas rumput laut penghasil karagenan terpenting di dunia, khususnya karagenan tipe kappa. Indonesia sebagai negara kepulauan tropis memiliki kondisi geografis dan ekologis yang sangat mendukung budidaya rumput laut ini. Perairan Indonesia dengan suhu 27–30 °C, salinitas 28–34 ppt, dan intensitas cahaya yang cukup merupakan habitat ideal bagi pertumbuhan *Eucheuma cottonii* (Anggadiredja et al., 2006). Secara komposisi, rumput laut *Eucheuma cottonii* kering mengandung karbohidrat 26–33%, protein 5–9%, lemak 0,1–0,5%, serat kasar 2–5%, dan abu 15–25% yang didominasi oleh mineral seperti kalium, natrium, kalsium, dan magnesium (Dewi, 2012).

1.5.2 Karagenan

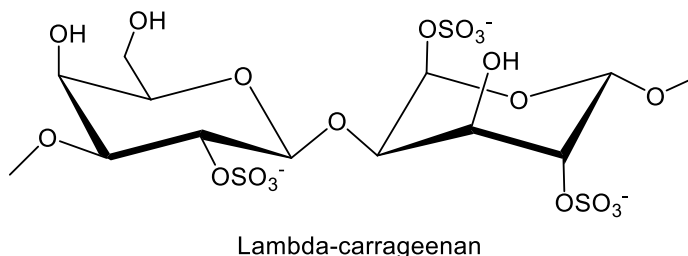
Karagenan merupakan polisakarida sulfat hidrofilik dengan berat molekul tinggi yang diekstraksi dari dinding sel rumput laut merah. Struktur dasar karagenan terdiri atas unit berulang disakarida yang tersusun dari β -D-galaktosa dan α -D-galaktosa atau 3,6-anhidro- α -D-galaktosa (Campo et al., 2009). Berdasarkan jumlah dan posisi gugus sulfat serta ada tidaknya gugus 3,6-anhidro pada residu galaktosa, karagenan diklasifikasikan menjadi tiga tipe utama, yaitu kappa (κ), iota (ι), dan lambda (λ). Kappa karagenan memiliki satu gugus sulfat pada posisi C-4 dari unit 3,6-anhidro-D-galaktosa dan membentuk gel yang kuat serta rapuh. Iota karagenan memiliki dua gugus sulfat pada posisi C-4 dan C-2 yang menghasilkan gel elastis dan lembut. Lambda karagenan memiliki tiga gugus sulfat dan tidak dapat membentuk gel karena tidak memiliki gugus 3,6-anhidrogalaktosa (Necas dan Bartosikova, 2013). *Eucheuma cottonii* merupakan penghasil utama kappa karagenan dengan kandungan karagenan mencapai 50–60% dari berat kering rumput laut.



Kappa-carrageenan



Iota-carrageenan



Gambar 1. Struktur dari kappa (κ), iota (ι), dan lambda (λ) karagenan (Jabeen et al., 2025)

Proses ekstraksi karagenan secara konvensional dilakukan melalui perlakuan alkali menggunakan larutan KOH atau NaOH pada suhu 70–90 °C selama 2–3 jam. Perlakuan alkali berfungsi untuk mengkonversi prekursor karagenan (mu-karagenan dan nu-karagenan) menjadi kappa dan iota karagenan melalui eliminasi gugus sulfat pada posisi C-6 dan pembentukan jembatan 3,6-anhidro. Kualitas karagenan ditentukan oleh beberapa parameter, meliputi rendemen, kadar air (<12%), kadar abu (15–40%), kadar sulfat (15–40%), viskositas, dan kekuatan gel (Webber et al., 2012).

1.5.3 Fermentasi Rumput Laut

Fermentasi merupakan proses metabolisme yang mengubah substrat organik menjadi produk yang lebih sederhana melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Dalam konteks pengolahan rumput laut, fermentasi bertujuan untuk memodifikasi struktur polisakarida, meningkatkan ketersediaan senyawa bioaktif, serta memperbaiki karakteristik fungsional bahan (Sumardianto et al., 2021). Proses fermentasi melibatkan pemecahan dinding sel dan depolimerisasi parsial polisakarida yang dapat meningkatkan efisiensi ekstraksi dan menghasilkan oligosakarida dengan aktivitas biologis yang lebih tinggi.

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan kelompok mikroorganisme yang paling banyak digunakan dalam fermentasi pangan karena statusnya yang *Generally Recognized as Safe* (GRAS). BAL menghasilkan asam laktat sebagai produk metabolisme utama dari fermentasi karbohidrat, yang berperan dalam penurunan pH substrat dan menciptakan kondisi yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen dan pembusuk (Gao et al., 2022). Selain asam laktat, BAL juga menghasilkan berbagai metabolit sekunder seperti bakteriosin, eksopolisakarida, dan enzim hidrolitik yang berkontribusi terhadap modifikasi substrat.

1.5.4 *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum merupakan bakteri asam laktat gram positif, berbentuk batang, non-motil, dan bersifat fakultatif anaerob. Bakteri ini termasuk dalam famili Lactobacillaceae dan merupakan salah satu spesies BAL yang paling versatil dengan kemampuan adaptasi terhadap berbagai kondisi lingkungan (Zheng et al., 2020). *Lactobacillus plantarum* memiliki genom yang relatif besar dibandingkan BAL

lainnya, yang memungkinkannya untuk memetabolisme berbagai jenis karbohidrat dan bertahan pada kondisi pH rendah serta konsentrasi garam tinggi.

Dalam proses fermentasi, *Lactobacillus plantarum* menggunakan jalur homofermentatif untuk mengkonversi glukosa menjadi asam laktat dengan efisiensi tinggi. Bakteri ini juga menghasilkan berbagai enzim hidrolitik seperti amilase, protease, dan glikosidase yang mampu mendegradasi senyawa kompleks menjadi molekul yang lebih sederhana (Gao et al., 2022). Lin et al., 2020 mengatakan bahwa *Lactobacillus plantarum* merupakan salah satu bakteri yang dapat melakukan fermentasi galaktosa dan menghasilkan produksi asam laktat terbaik. Kondisi optimal pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* meliputi suhu 30–37 °C, pH awal 6,0–6,5, dan ketersediaan sumber karbon yang cukup. Dalam fermentasi rumput laut, parameter yang perlu dioptimasi meliputi konsentrasi inokulum, waktu fermentasi, dan rasio substrat terhadap medium untuk mencapai hasil fermentasi yang optimal (Ambarsari et al., 2018).

1.5.5 *Edible Film*

Edible Film didefinisikan sebagai lapisan tipis kontinu yang terbuat dari bahan-bahan yang dapat dimakan (*edible*) dan berfungsi sebagai penghalang terhadap transfer massa (uap air, oksigen, karbon dioksida, lipid, dan aroma) serta sebagai pembawa aditif pangan (Giyatmi et al., 2020). Berbeda dengan kemasan konvensional, *Edible Film* dapat dikonsumsi bersama produk pangan atau terdegradasi secara alami tanpa meninggalkan residu yang berbahaya bagi lingkungan. Pembentukan *Edible Film* melibatkan proses pelarutan biopolimer dalam pelarut yang sesuai, penambahan plasticizer untuk meningkatkan fleksibilitas, dan pengeringan untuk menghilangkan pelarut dan membentuk matriks film yang kontinu. Mekanisme pembentukan film pada polisakarida seperti karagenan melibatkan interaksi intermolekular berupa ikatan hidrogen dan interaksi elektrostatik antar rantai polimer yang membentuk jaringan tiga dimensi (Tavassoli-Kafrani et al., 2016).

Karakteristik *Edible Film* yang penting untuk aplikasi kemasan pangan meliputi sifat mekanik (kuat tarik dan elongasi), sifat penghalang (permeabilitas uap air dan gas), sifat optik (transparansi dan warna), serta sifat termal. *Edible Film* berbasis karagenan umumnya memiliki sifat penghalang oksigen yang baik, transparansi tinggi, dan kemampuan membentuk gel yang dapat dimodifikasi melalui penambahan plasticizer dan bahan aditif lainnya (Giyatmi et al., 2020).

1.5.6 *Plasticizer dalam Edible Film*

Plasticizer merupakan molekul kecil dengan titik didih rendah yang ditambahkan ke dalam formulasi *Edible Film* untuk meningkatkan fleksibilitas dan mengurangi kerapuhan film. *Plasticizer* bekerja dengan cara menyisip di antara rantai polimer dan mengurangi gaya intermolekular, sehingga meningkatkan mobilitas rantai dan menurunkan suhu transisi gelas (*glass transition temperature*, T_g) film (Vieira et al., 2011).

Gliserol merupakan *plasticizer* yang paling umum digunakan dalam *Edible Film* berbasis polisakarida karena kompatibilitasnya yang baik dengan matriks hidrofilik,

ketersediaan yang melimpah, dan harga yang ekonomis. Gliserol memiliki tiga gugus hidroksil yang dapat membentuk ikatan hidrogen dengan gugus hidroksil pada rantai polisakarida, sehingga efektif dalam meningkatkan fleksibilitas film. Konsentrasi gliserol yang digunakan umumnya berkisar antara 20–50% dari berat polimer, di mana konsentrasi yang terlalu rendah menghasilkan film yang rapuh sedangkan konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menurunkan kuat tarik dan meningkatkan permeabilitas uap air film (Vieira et al., 2011).

1.5.7 Daun Sirih Hijau (*Piper betle* Linn.)

Daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) merupakan tanaman merambat dari famili Piperaceae yang banyak dibudidayakan di wilayah Asia Tenggara, termasuk Indonesia. Tanaman ini memiliki sejarah panjang dalam pengobatan tradisional untuk berbagai keperluan terapeutik seperti antiseptik, antiinflamasi, dan penyegar mulut (Dwivedi dan Tripathi, 2014). Secara morfologi, daun sirih berbentuk jantung dengan permukaan mengkilap, berwarna hijau tua, dan memiliki aroma khas yang tajam.

Daun sirih mengandung berbagai senyawa bioaktif yang bertanggung jawab atas aktivitas farmakologisnya. Komponen utama meliputi minyak atsiri (0,8–1,8%) yang mengandung kavikol, kavibetol, eugenol, dan metil eugenol; senyawa fenolik seperti hidroksikavikol dan alilpirocatekol; serta flavonoid, tanin, dan alkaloid (Fazal et al., 2014). Hidroksikavikol merupakan senyawa fenolik dominan yang memberikan aktivitas antioksidan dan antibakteri yang kuat. Mekanisme antibakteri senyawa fenolik daun sirih melibatkan denaturasi protein membran sel bakteri, gangguan permeabilitas membran, dan inhibisi enzim intraseluler (Dwivedi dan Tripathi, 2014).

1.5.8 Aktivitas Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat atau memperlambat oksidasi substrat dengan cara menetralkan radikal bebas dan spesies oksigen reaktif. Dalam konteks kemasan pangan, antioksidan berperan penting dalam mencegah oksidasi lipid yang menyebabkan ketengikan dan penurunan kualitas sensoris produk pangan (Nguyen et al., 2021). Mekanisme antioksidan dapat dibedakan menjadi dua kategori utama: antioksidan primer yang bekerja dengan mendonasikan atom hidrogen atau elektron kepada radikal bebas, dan antioksidan sekunder yang bekerja dengan mengkelat ion logam pro-oksidan atau mendekomposisi hidroperoksida.

Senyawa fenolik dalam ekstrak daun sirih bertindak sebagai antioksidan primer melalui mekanisme *hydrogen atom transfer* (HAT) dan *single electron transfer* (SET). Gugus hidroksil pada cincin aromatik senyawa fenolik dapat mendonasikan atom hidrogen kepada radikal bebas, menghasilkan radikal fenoksil yang relatif stabil karena delokalisasi elektron pada sistem cincin aromatik (Rice-Evans et al., 1996). Aktivitas antioksidan dapat diukur menggunakan berbagai metode, di antaranya uji DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), dan FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

1.5.9 Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antibakteri merujuk pada kemampuan suatu senyawa untuk menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri. Dalam aplikasi kemasan aktif, agen antibakteri ditambahkan ke dalam matriks film untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan pembusuk pada permukaan produk pangan, sehingga memperpanjang umur simpan dan meningkatkan keamanan pangan (Appendini dan Hotchkiss, 2002). Mekanisme kerja agen antibakteri dapat meliputi gangguan integritas membran sel, inhibisi sintesis dinding sel, gangguan sintesis protein, dan inhibisi sintesis asam nukleat.

Senyawa bioaktif dalam daun sirih menunjukkan aktivitas antibakteri spektrum luas terhadap bakteri gram positif maupun gram negatif. Hidroksikavikol dan eugenol merupakan komponen utama yang bertanggung jawab atas aktivitas antibakteri daun sirih. Mekanisme kerja senyawa-senyawa ini melibatkan interaksi dengan lipid bilayer membran sel bakteri yang menyebabkan peningkatan permeabilitas membran, kebocoran konstituen intraseluler, dan pada akhirnya kematian sel (Datta et al., 2011). Aktivitas antibakteri dapat diuji menggunakan metode difusi agar (*disc diffusion* atau *well diffusion*) dan metode dilusi untuk menentukan konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM).

1.5.10 Karakterisasi *Edible Film*

Karakterisasi *Edible Film* mencakup pengujian berbagai parameter untuk mengevaluasi kesesuaian film sebagai material kemasan pangan. Parameter-parameter tersebut meliputi sifat fisik, mekanik, penghalang, dan fungsional. Ketebalan merupakan parameter fundamental yang mempengaruhi seluruh sifat film lainnya. Ketebalan film diukur menggunakan mikrometer digital pada beberapa titik untuk memperoleh nilai rata-rata. *Edible Film* untuk aplikasi kemasan pangan umumnya memiliki ketebalan 0,1–0,3 mm (Rusli et al., 2017).

Kuat tarik (*tensile strength*) mengindikasikan kekuatan maksimum film dalam menahan gaya tarikan sebelum putus. Parameter ini diukur menggunakan *universal testing machine* (UTM) sesuai standar ASTM D882. Kuat tarik yang tinggi diperlukan agar film dapat menahan tekanan mekanis selama penanganan dan penyimpanan produk pangan. Elongasi (*elongation at break*) menunjukkan kemampuan film untuk meregang sebelum putus, yang mengindikasikan fleksibilitas film. Elongasi yang tinggi menunjukkan film yang lebih fleksibel dan tidak mudah retak. Daya serap air (*water absorption*) mengukur kemampuan film dalam menyerap air dari lingkungan. Parameter ini penting untuk mengevaluasi stabilitas film dalam kondisi kelembaban tinggi. Permeabilitas uap air (*water vapor permeability*, WVP) mengukur laju transmisi uap air melalui film per satuan luas dan waktu pada gradien tekanan uap tertentu. WVP yang rendah diperlukan untuk melindungi produk pangan dari penguapan air atau penyerapan kelembaban (Santi et al., 2024).

1.5.11 Metode Karakterisasi Instrumental

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) merupakan teknik spektroskopi yang digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsional dalam suatu material berdasarkan absorpsi radiasi inframerah. Setiap gugus fungsional memiliki frekuensi vibrasi karakteristik yang menghasilkan puncak absorpsi pada bilangan gelombang tertentu dalam spektrum FTIR. Dalam karakterisasi karagenan dan *Edible Film*, FTIR digunakan untuk mengidentifikasi gugus sulfat, ikatan glikosidik, dan interaksi antar komponen dalam matriks film (Gómez-Ordóñez dan Rupérez, 2011).

Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive Spectroscopy (SEM-EDS) merupakan teknik mikroskopi elektron yang menghasilkan citra permukaan sampel dengan resolusi tinggi serta analisis komposisi unsur. SEM menggunakan berkas elektron untuk memindai permukaan sampel dan menghasilkan sinyal elektron sekunder yang dikonversi menjadi citra. EDS memanfaatkan sinar-X karakteristik yang diemisikan sampel untuk mengidentifikasi dan mengkuantifikasi unsur-unsur yang terkandung dalam sampel. Dalam karakterisasi *Edible Film*, SEM-EDS digunakan untuk mengamati morfologi permukaan, homogenitas distribusi komponen, dan komposisi unsur film (Simona et al., 2021).

X-Ray Diffraction (XRD) merupakan teknik analisis struktur kristal yang memanfaatkan difraksi sinar-X oleh bidang kristal dalam material. Pola difraksi yang dihasilkan memberikan informasi mengenai kristalinitas, struktur kristal, dan orientasi molekuler dalam sampel. Dalam karakterisasi *Edible Film*, XRD digunakan untuk mengevaluasi tingkat kristalinitas film dan interaksi antar komponen yang dapat mempengaruhi sifat mekanik dan penghalang film (Rhim dan Wang, 2014).

1.5.12 Response Surface Methodology (RSM)

Response Surface Methodology (RSM) merupakan kumpulan teknik matematika dan statistika yang digunakan untuk pemodelan dan analisis permasalahan di mana respons dipengaruhi oleh beberapa variabel independen, dengan tujuan untuk mengoptimasi respons tersebut (Myers et al., 2016). RSM memungkinkan eksplorasi hubungan antara variabel independen dan respons melalui persamaan polinomial, serta penentuan kondisi optimal dengan jumlah eksperimen yang efisien.

Desain eksperimen yang umum digunakan dalam RSM meliputi *Central Composite Design* (CCD) dan *Box-Behnken Design* (BBD). CCD terdiri dari titik faktorial, titik aksial, dan titik pusat yang memungkinkan estimasi efek kuadrat dan interaksi antar variabel. BBD merupakan desain tiga level yang tidak memerlukan titik aksial dan cocok untuk sistem dengan tiga atau lebih variabel independen (Ferreira et al., 2007). Dalam konteks fermentasi rumput laut, RSM dapat digunakan untuk mengoptimasi parameter fermentasi seperti konsentrasi inokulum, waktu fermentasi, suhu, dan pH terhadap respons yang diinginkan seperti aktivitas antioksidan, total fenol, atau karakteristik karagenan yang dihasilkan. Model matematika yang dihasilkan dapat digunakan untuk memprediksi respons pada berbagai kombinasi variabel dan menentukan kondisi optimal yang menghasilkan respons terbaik (Khan et al., 2025).

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi rumput laut *Eucheuma cottonii*, daun sirih hijau (*Piper betle* L.), bakteri *Lactobacillus plantarum* (ATCC-8014). Bahan kimia yang digunakan antara lain padatan KOH (merck), etanol (merck), gliserol, CMC, yeast (merck), pepton (merck), NaCl (merck), ragi (angel), padatan ABTS (himedia), padatan K₂S₂O₈ (merck), akuades, kain saring. Bahan pendukung lainnya meliputi kain saring dan kertas saring.

2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas neraca analitik (Ohaus), hotplate stirrer (Joanlab), shaker waterbath (Daihan Scientific), desikator, spektrofotometer FTIR Prestige-21 (Shimadzu), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), freeze dryer (Thermo Fisher Technology), tensile testing machine (Shimadzu), SEM (Jeol), difraktometer sinar-X (Rigaku), TGA (Mettler Toledo) dan berbagai peralatan gelas lainnya.

2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari hingga Desember 2025 di Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Hasanuddin, Laboratorium Kimia Terpadu FMIPA Universitas Hasanuddin (Pengujian FTIR), Laboratorium Kimia Analitik FMIPA Universitas Hasanuddin (Pengujian TGA), Laboratorium Pengujian Material Politeknik ATI Makassar (Pengujian Mekanik *Edible Film*), Laboratorium Mikrostruktur Universitas Muslim Indonesia (Pengujian SEM), Laboratorium Teknik Kimia PNUP (Freeze dry dan Grinder), dan LPPS FMIPA Universitas Hasanuddin (Pengujian Antibakteri).

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Preparasi Sampel *Eucheuma cottonii*

Sampel *Eucheuma cottonii* diambil dari Takalar, Makassar, Sulawesi Selatan. *Eucheuma cottonii* sebanyak 4 kg dicuci menggunakan air bersih untuk membersihkan kotoran seperti pasir dan garam, kemudian dikeringkan. Proses pengeringan *Eucheuma cottonii* dilakukan dengan menggunakan oven pada suhu 50 °C selama 24 jam. Setelah sampel kering, kemudian dihaluskan dengan menggunakan grinder hingga halus.

2.4.2 Preparasi Bakteri Asam Laktat (*Lactobacillus plantarum*) untuk Proses Fermentasi (Mulyadi et al., 2017)

Pembuatan Media. Media *Nutrient Broth* (NB) disiapkan dengan mencampurkan 0,6 g *yeast extract*, 0,3 g *peptone* dan 0,3 g NaCl, kemudian dilarutkan dalam 60 mL akuades menggunakan erlenmeyer dengan volume 250 mL. Media yang telah homogen selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama

15 menit. Setelah proses sterilisasi, media didinginkan hingga mencapai suhu ruang sebelum digunakan pada tahap selanjutnya

Regenerasi Bakteri. Isolat *Lactobacillus plantarum* diambil dari stok menggunakan ose steril, kemudian diinokulasikan ke dalam media *Nutrient Broth* (NB). Kultur tersebut selanjutnya diinkubasi menggunakan *shaker waterbath* selama 24 jam pada suhu 37 °C. Setelah periode inkubasi selesai, kultur bakteri yang dihasilkan digunakan pada proses fermentasi rumput laut.

2.4.3 Optimasi Fermentasi *Eucheuma cottonii* dengan *Response Surface*

Methodology (RSM) *Box-Behnken* (Khan et al., 2025)

Proses optimasi fermentasi rumput laut *Eucheuma cottonii* dengan bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* dilakukan menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM) dengan desain *Box-Behnken*. Penelitian ini menggunakan empat variabel independen, yaitu suhu fermentasi (30-45 °C), waktu fermentasi (24-72 jam), konsentrasi ragi (0,5-2% b/v), dan konsentrasi bakteri *Lactobacillus plantarum* (1-4% v/v). Media fermentasi dibuat dengan komposisi tetap yang terdiri atas inulin 1%, *yeast extract* 1%, pepton 0,5%, dan NaCl 0,5%.

Tabel 1. Data 27 run order fermentasi *Eucheuma cottonii*

Run Order	Konsentrasi		Suhu (°C)	Waktu (jam)
	Ragi (%)	<i>L. plantarum</i> (%)		
1	0,5	1	38	48
2	1,25	4	30	48
3	0,5	2,5	38	72
4	1,25	1	38	24
5	1,25	2,5	30	72
6	0,5	4	38	48
7	0,5	2,5	38	24
8	2	2,5	38	72
9	1,25	1	45	48
10	1,25	1	38	72
11	1,25	4	45	48
12	1,25	4	38	24
13	1,25	4	38	72
14	0,5	2,5	30	48
15	2	2,5	45	48
16	1,25	2,5	30	24
17	1,25	2,5	45	24
18	1,25	2,5	45	72
19	1,25	1	30	48
20	1,25	2,5	38	48
21	2	1	38	48
22	2	4	38	48
23	0,5	2,5	45	48
24	1,25	2,5	38	48
25	1,25	2,5	38	48
26	2	2,5	38	24
27	2	2,5	30	48

Desain percobaan *Box-Behnken* menghasilkan total 27 *run order* untuk masing-masing variabel sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 1. Data hasil pengamatan dari seluruh kombinasi perlakuan kemudian dianalisis menggunakan perangkat lunak Minitab 2.1, dan model matematis yang dihasilkan dievaluasi menggunakan analisis varians (ANOVA). Metode ini dipilih karena dapat mengurangi jumlah set eksperimen tanpa mengorbankan akurasi dibandingkan dengan metode desain faktorial tradisional.

Tahap formulasi dilakukan menggunakan data pada Tabel 1 dengan variabel tetap 4 g *Eucheuma cottonii* dan volume pelarut sebanyak 60 mL. Selanjutnya dihitung persentase rendemen berdasarkan data hasil tahap formulasi dan dilanjutkan dengan tahap analisis respons yang dianalisis menggunakan ANOVA. Hasil ANOVA memberikan kondisi optimum pada fermentasi rumput laut berdasarkan data persentase rendemen. Data optimum yang dihasilkan kemudian digunakan untuk prosedur selanjutnya.

2.4.4 Fermentasi *Eucheuma cottonii* (Silitonga et al. 2022)

Metode fermentasi rumput laut mengacu pada Silitonga et al. (2022) dengan beberapa modifikasi. Proses fermentasi diawali dengan menyiapkan erlenmeyer dengan volume 250 mL, kemudian ditambahkan 1% inulin, 1% *yeast extract*, 0,5% *peptone*, 0,5% NaCl, serta ragi dengan konsentrasi 0,5%-2% sesuai formulasi *run order* pada tabel 1, lalu seluruh bahan dilarutkan dalam 60 mL akuades, kemudian media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit dan didinginkan hingga suhu ruang.

Selanjutnya, kultur *Lactobacillus plantarum* ditambahkan sesuai variasi pada Tabel 1 untuk masing-masing *run order*, diikuti dengan penambahan bubuk rumput laut *Eucheuma cottonii* sebanyak 4 gram. Fermentasi dilakukan menggunakan shaker waterbath dengan variasi suhu 30 °C, 38 °C, dan 45 °C serta variasi waktu fermentasi 24, 48, dan 72 jam. Setelah proses fermentasi selesai, hasil fermentasi disaring dan dikeringkan dalam oven pada suhu 45 °C selama 24 jam. Persentase rendemen dihitung menggunakan persamaan (1).

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{massa rumput laut (g)}}{\text{massa rumput laut kering (g)}} \times 100\% \quad (1)$$

2.4.5 Ekstraksi Karagenan dari *Eucheuma cottonii* (Distantina et al., 2012)

Metode ekstraksi karagenan dari rumput laut *eucheuma cottonii* hasil fermentasi mengacu pada Distantina et al. 2012 dengan beberapa modifikasi. Rumput laut *eucheuma cottonii* hasil fermentasi terlebih dahulu disaring, kemudian dicuci menggunakan akuades sebanyak dua hingga tiga kali untuk menghilangkan sisa media fermentasi. Selanjutnya, sampel ditimbang sebanyak 20 g dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer berkapasitas 250 mL, kemudian ditambahkan larutan KOH 0,6% sebanyak 200 mL. Campuran tersebut direndam selama 30 menit pada suhu

30 °C sambil diaduk menggunakan *hotplate stirrer*. Setelah proses perendaman, rumput laut disaring dan dicuci kembali dengan akuades hingga sisa alkali hilang.

Sampel yang telah dicuci kemudian direndam kembali dalam akuades sebanyak 200 mL dan dipanaskan pada suhu 85 °C selama 60 menit sambil diaduk menggunakan *hotplate stirrer* untuk mengekstraksi karagenan. Setelah pemanasan, campuran disaring untuk memisahkan endapan rumput laut hasil ekstraksi dari larutan. Endapan rumput laut yang telah diperoleh selanjutnya ditambahkan etanol dengan perbandingan 1:3 (endapan rumput laut:etanol), kemudian diaduk dan didiamkan selama 60 menit. Endapan karagenan yang terbentuk selanjutnya disaring dan dikeringkan menggunakan metode *freeze dry* hingga diperoleh karagenan kering.

2.4.6 Uji Karakteristik Karagenan

Uji FTIR. Prosedur uji FTIR dilakukan untuk menganalisis karakteristik gugus fungsi dalam bubuk karagenan dengan mengacu pada metode yang dilakukan oleh Heriyanto et al. (2018). Sampel karagenan ditimbang sebanyak 0,5 g, kemudian ditambahkan kalium bromida (KBr) dengan perbandingan 1:10 (sampel:KBr) dan digerus hingga membentuk serbuk halus. Campuran tersebut selanjutnya dipres dalam vakum dengan tekanan 7-8 ton selama 10-15 menit untuk menghasilkan pelet tipis transparan. Pelet kemudian dimasukkan ke dalam instrumen spektrofotometer FTIR dan dianalisis pada rentang bilangan gelombang 400-4000 cm⁻¹.

Uji Kadar Air. Pengujian kadar air pada karagenan hasil fermentasi dilakukan dengan mengacu pada metode yang ditetapkan oleh *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1995). Cawan porselen terlebih dahulu dikeringkan dalam oven pada suhu 105 °C selama 1 jam, kemudian didinginkan di dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang. Sebanyak 0,5 g karagenan hasil fermentasi (A) dimasukkan ke dalam cawan tersebut dan ditimbang untuk memperoleh bobot awal (B). Selanjutnya, cawan berisi karagenan dikeringkan dalam oven pada suhu 105 °C selama 4 jam hingga diperoleh berat konstan. Setelah pengeringan, cawan didinginkan kembali di dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang untuk memperoleh bobot akhir (C). Kadar air sampel dihitung menggunakan persamaan (2).

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{B-C}{A} \times 100\% \quad (2)$$

Uji Kadar Abu. Pengujian kadar abu pada karagenan hasil fermentasi dilakukan mengacu pada metode yang ditetapkan oleh *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1995). Cawan porselen terlebih dahulu dikeringkan dalam oven pada suhu 105 °C selama 1 jam, kemudian didinginkan dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang untuk memperoleh bobot awal (B). Selanjutnya, sebanyak 0,5 g sampel karagenan hasil fermentasi (A) dimasukkan ke dalam cawan porselen tersebut. Cawan berisi sampel kemudian dipanaskan dalam tanur listrik

(*furnace*) pada suhu 600 °C selama 6 jam hingga seluruh komponen organik teroksidasi dan tersisa residu berupa abu. Setelah proses pengabuan selesai, cawan didinginkan di dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang untuk memperoleh bobot akhir (C). Kadar abu sampel dihitung menggunakan persamaan (3).

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \frac{C-B}{A} \times 100\% \quad (3)$$

Keterangan: A adalah massa awal sampel karagenan (gram), B adalah bobot awal cawan (gram), dan C adalah bobot akhir cawan setelah pemanasan (gram).

2.4.7 Ekstraksi Daun Sirih dengan Akuades (Kusuma et al., 2017)

Sampel daun sirih dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel, kemudian ditiriskan. Daun sirih selanjutnya dipotong menjadi ukuran lebih kecil dan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50 °C selama 24 jam. Setelah, proses pengeringan, daun sirih dihaluskan dan ditimbang sebanyak 20 g dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan akuades sebanyak 200 mL, dipanaskan pada suhu 80 °C selama 30 menit sambil diaduk menggunakan *hotplate stirrer*. Setelah pemanasan selesai, larutan didinginkan hingga suhu ruang dan disaring untuk memisahkan residu daun sirih dari filtrat. Filtrat yang diperoleh selanjutnya disimpan pada suhu 20 °C untuk penggunaan jangka panjang.

2.4.8 Sintesis *Edible Film* dengan Fortifikasi Ekstrak Daun Sirih (Manzoor et al., 2023; Nasution et al., 2022)

Sintesis *Edible Film* dilakukan dengan menggunakan karagenan hasil fermentasi rumput laut *Eucheuma cottonii* yang difortifikasi ekstrak daun sirih untuk meningkatkan sifat fungsional *film*. Sebanyak 60 mL akuades dipanaskan dalam gelas kimia hingga mencapai suhu 60 °C, kemudian karagenan hasil fermentasi sebanyak 0,6 g ditambahkan secara bertahap sambil diaduk menggunakan *hotplate stirrer* hingga larut sempurna. Setelah karagenan larut, suhu larutan diturunkan hingga 50 °C, kemudian ditambahkan *Carboxymethylcellulose* (CMC) sebanyak 0,5 g sambil terus diaduk hingga larut.

Selanjutnya, gliserol sebanyak 0,6 mL ditambahkan sebagai *plastisizer* dan campuran diaduk hingga tercampur merata. *Film Forming Solution* (FFS) yang telah larut sempurna didinginkan hingga suhu di bawah 50 °C, selanjutnya ditambahkan ekstrak daun sirih dengan variasi konsentrasi 0%, 30%, dan 50%, lalu diaduk selama 30 menit hingga tercampur merata. FFS selanjutnya dituangkan ke dalam cawan petri dan dikeringkan dalam oven pada suhu 50 °C selama 24 jam hingga terbentuk film tipis.

2.4.9 Uji Aktivitas Antioksidan *Edible Film* 30%

Pembuatan Larutan ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)). Larutan ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) disiapkan dengan melarutkan 0,0071 g serbuk ABTS dan 0,003 g kalium persulfat masing-masing dalam 5 mL akuades. Kedua larutan tersebut kemudian dicampur dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL. Campuran tersebut diinkubasi selama 12 jam dalam kondisi gelap. Setelah inkubasi selesai, volume larutan dicukupkan hingga mencapai tanda batas menggunakan metanol p.a (Modifikasi Anugraini et al., 2024).

Pembuatan Larutan Pembanding Asam Askorbat (Vitamin C). Sebanyak 0,01 g asam askorbat ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian dilarutkan dengan metanol p.a hingga mencapai tanda batas sehingga diperoleh larutan baku dengan konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya, larutan baku 1000 ppm dipipet sebanyak 1 mL ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan metanol p.a hingga tanda batas untuk menghasilkan larutan baku berkonsentrasi 100 ppm. Larutan baku 100 ppm tersebut kemudian diencerkan kembali dengan memipet 1 mL ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan asam askorbat dengan konsentrasi 10 ppm, yang digunakan sebagai larutan baku pembanding. Selanjutnya, larutan baku 10 ppm tersebut dipipet masing-masing sebanyak 0,125 mL; 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL dan 2 mL, lalu masing-masing diencerkan dengan metanol p.a hingga mencapai volume 4 mL sehingga diperoleh larutan standar dengan konsentrasi berturut-turut 0,25; 0,5; 1; 2; dan 4 ppm (Modifikasi Sakka dan Muin, 2022).

Penyiapan Larutan Sampel *Edible Film*. Sebanyak 0,05 g sampel *Edible Film*, kemudian dilarutkan dalam 50 mL akuades di dalam gelas kimia. Larutan dihomogenkan menggunakan pengaduk hingga seluruh sampel terdispersi secara merata, menghasilkan larutan dengan konsentrasi akhir sebesar 1000 ppm. Selanjutnya larutan tersebut dipipet masing-masing sebanyak 0,05 mL; 0,1 mL; 0,2 mL; 0,4 mL dan 0,8 mL dan masing-masing diencerkan dengan metanol p.a hingga mencapai volume 4 mL sehingga diperoleh larutan standar dengan konsentrasi berturut-turut 10; 20; 40; 80; dan 160 ppm (Modifikasi Hayati et al., 2020).

Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Reagen ABTS. Larutan pembanding asam askorbat, larutan sampel dan larutan kontrol masing-masing ditambahkan sebanyak 1 mL ABTS, kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex* dan diinkubasi dalam kondisi gelap selama 30 menit. Setelah inkubasi, absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 742 nm. Persentase penghambatan radikal bebas dihitung menggunakan persamaan (4).

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\% \quad (4)$$

Konsentrasi sampel dan persentase inhibisinya diplot dalam bentuk kurva absorbansi, dengan konsentrasi sampel pada sumbu x dan persen inhibisi pada

sumbu y. Kurva tersebut dianalisis menggunakan persamaan regresi linear. Dari hasil analisis, IC_{50} setiap sampel dapat ditentukan dengan mencari nilai x yang sesuai dengan nilai y sebesar 50 (Modifikasi Anugraini et al., 2024).

2.4.10 Uji Aktivitas Antibakteri *Edible Film* (Chana-Thaworn et al., 2011)

Pengujian aktivitas antibakteri pada *Edible Film* dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan bakteri *Escherichia coli* sebagai mikroorganisme uji. Sampel *Edible Film* dipotong berbentuk cakram dengan diameter 6 mm, kemudian diletakkan pada permukaan media agar (Luria Bertani/LB). Media agar sebelumnya telah diinokulasi dengan 0,1 mL suspensi bakteri *Escherichia coli* dengan konsentrasi sekitar 10^5 - 10^6 CFU/mL. Selanjutnya, media diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Aktivitas antibakteri ditentukan berdasarkan terbentuknya zona hambat yang diukur dari diameter daerah bening di sekitar cakram *Edible Film*.

2.4.11 Uji Mekanik *Edible Film*

Uji Kuat Tarik. Pengujian kuat tarik *Edible Film* dilakukan menggunakan *Universal Testing Machine* (UTM 200) mengacu pada metode ASTM D882. Sampel *Edible Film* dipotong dengan ukuran 5 × 2,5 cm, kemudian dipasang pada penjepit (*probe*). Selanjutnya, pengujian dilakukan hingga sampel *Edible Film* mengalami pemutusan untuk memperoleh nilai kuat tarik (Arisyida et al., 2024). Nilai kuat tarik dihitung menggunakan Persamaan (5).

$$\text{Kuat Tarik (MPa)} = F / (e \times w) \quad (5)$$

Keterangan: F adalah tegangan maksimum sampel (N), e adalah rata-rata ketebalan sampel (mm), dan w adalah lebar awal *Edible Film* (cm).

Uji Elongasi. Pengujian elongasi *Edible Film* dilakukan menggunakan *Universal Testing Machine* (UTM 200) mengacu pada metode ASTM D882, yang dilakukan secara bersamaan dengan pengujian kuat tarik. Nilai elongasi ditentukan berdasarkan perubahan panjang sampel selama pengujian (Arisyida et al., 2024). Nilai elongasi dihitung menggunakan Persamaan (6).

$$\text{Elongasi (\%)} = \frac{\text{panjang akhir (cm)} - \text{Panjang awal (cm)}}{\text{panjang awal (cm)}} \times 100\% \quad (6)$$

Uji Ketebalan. Pengukuran ketebalan *Edible Film* diukur dengan menggunakan jangka sorong digital dengan tingkat ketelitian 0,01 mm. Pengukuran dilakukan pada 5 titik yang berbeda pada setiap sampel *Edible Film*, kemudian nilai ketebalan yang diperoleh dirata-ratakan dan digunakan sebagai nilai ketebalan film (Arisyida et al., 2024).

2.4.12 Uji Karakteristik *Edible Film*

Uji FTIR. Analisis *Fourier Transform Infrared* (FTIR) dilakukan dengan mengacu pada metode Santi et al. 2024 dengan beberapa modifikasi. Sampel *Edible Film* yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 0,01 gram kemudian ditambahkan KBr pada perbandingan 1:10 (sampel:KBr). Campuran tersebut selanjutnya dipress hingga terbentuk pelet transparan. Spektra FTIR sampel direkam pada suhu ruang dengan rentang bilangan gelombang 400-4000 cm^{-1} .

Uji SEM. Analisis morfologi permukaan *Edible Film* dilakukan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM). Sampel *Edible Film* dipotong dengan ukuran $1 \times 1 \text{ cm}$, kemudian ditempatkan pada dudukan sampel (*stub*) aluminium menggunakan perekat karbon. Sebelum pengamatan, sampel dilapisi dengan lapisan tipis emas menggunakan *sputter coater* untuk meningkatkan konduktivitas permukaan. Pengamatan SEM dilakukan pada kondisi vakum dengan tegangan percepatan 15 kV pada perbesaran $\times 300$, $\times 500$, $\times 1000$, $\times 2000$, $\times 5000$ (Modifikasi Alves et al., 2023; Alimi et al., 2021).

Uji XRD. Analisis *X-ray Diffraction* (XRD) dilakukan untuk menganalisis perbedaan struktur kristal pada sampel *Edible Film* yang dihasilkan. Preparasi sampel dilakukan dengan cara memotong *Edible Film* sesuai dengan ukuran dudukan sampel berbentuk persegi, kemudian sampel dipasang pada sampel *holder*. Pengukuran XRD dilakukan pada suhu 25 °C dengan sudut difraksi (2θ) pada rentang 0°-60° dengan kecepatan scan 0,02° per detik (Modifikasi Kaur et al., 2019; Tran et al., 2021).

Uji TGA-DSC. Analisis thermogravimetri (TGA) merupakan salah satu metode *Thermal Analysis* yang digunakan untuk mengetahui massa sampel yang hilang selama proses pemanasan (Prasetyo et al., 2024). *Edible Film* dipotong, dan ditimbang sebanyak 20 mg, kemudian *Edible Film* dimasukkan ke dalam cawan aluminium (*crucible*). Kemudian sampel dipanaskan dengan suhu pemanasan diatur dari 30 °C hingga 600 °C, dan laju pemanasan diatur pada 20 °C/menit di bawah atmosfer nitrogen (Mofikasi Surya et al., 2021).