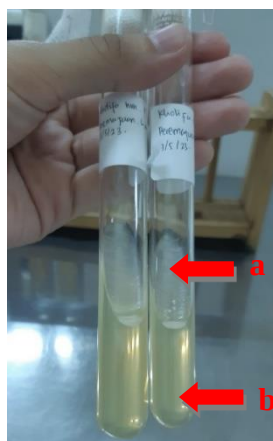


BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Identifikasi Morfologi Isolat *L.acidophilus*

Uji konfirmasi penumbuhan bakteri menggunakan media selektif MRSA, penggunaan media selektif MRSA yaitu untuk mengoptimalkan pertumbuhan bakteri di suhu 37°C dan melalui proses inkubasi selama 24 jam. Pada isolat *L.acidophilus* tumbuh secara signifikan ditandai dengan adanya kekeruhan di permukaan agar. Secara makroskopis, hasil yang didapatkan dapat dilihat pada **Gambar V.1**



Gambar V.1 Hasil Peremajaan Bakteri

(a) Bakteri *L.acidophilus*, (b) media MRSA

Selain uji konfirmasi penumbuhan bakteri menggunakan media selektif MRSA, identifikasi morfologi dilakukan dengan uji konfirmasi pewarnaan Gram bakteri dari isolat murni bakteri *L.acidophilus*. Tujuan pewarnaan Gram adalah untuk melihat morfologi koloni secara mikroskopis dan membedakan bakteri Gram-negatif dan Gram-positif. Bakteri yang menyerap metilen biru setelah dicuci dengan alkohol tetap berwarna ungu disebut bakteri Gram-positif, sedangkan bakteri yang warna ungunya memudar jika dicuci dengan alkohol menyerap pewarna *fuchsin* dan berubah menjadi merah muda disebut bakteri Gram-negatif. Struktur dinding sel juga menentukan reaksi pewarnaan. Bakteri gram positif yang dinding selnya paling banyak mengandung peptidoglikan menangkap warna ungu (Putri et al., 2018). Hal ini dapat dilihat secara mikroskopis menggunakan hasil pewarnaan Gram pada **Gambar V.2**



Gambar V.2 Hasil Uji Pewarnaan Gram Perbesaran 100x

Berdasarkan hasil pewarnaan Gram terlihat berbentuk batang dan termasuk golongan Gram-positif. Hal ini sesuai dengan pandangan Putri (2018) bahwa BAL biasanya berbentuk batang, Gram-positif dan nonspora biasanya tergolong BAL (Putri *et al.*, 2018). Abedi & Hashemi (2020) juga menyatakan bahwa BAL merupakan bakteri gram positif, tidak membentuk spora, tumbuh pada lingkungan oksigen dan dapat menghasilkan asam laktat jika difermentasi dengan karbohidrat (glukosa, laktosa) (Abedi & Hashemi, 2020).

5.2 Rancangan Formulasi

Pada penelitian ini formula yang digunakan sebagai bahan aktif yaitu bakteri *Lactobacillus aciophilus*. Penentuan konsentrasi bakteri yang digunakan yaitu sesuai dengan penelitian Gantini (2016) yang memformulasikan bakteri *Lactobacillus casei* yang dibuat menjadi granul instan. Dimana konsentrasi bakteri yang digunakan yaitu 3% (Gantini & Widayanti, 2016).

Bahan asam yang digunakan menggunakan dua bahan asam yaitu asam sitrat dan asam tartrat. Dimana campuran antara asam sitrat dan asam tartrat paling umum digunakan sebagai bahan asam dari sediaan *effervescent*. Kombinasi 2 bahan asam ini ditujukan untuk memperbaiki hasil uji sifat fisik granul *effervescent*. Hal ini sejalan dengan penelitian Syahrina (2021), dimana menyebutkan bahwa dua asam (asam sitrat dan asam tartart) dikombinasikan pada pembuatan formulasi granul *effervescent* akan memudahkan dalam proses pembuatannya serta meningkatkan kelarutan pada saat diformulasikan menjadi tablet *effervescent*. Syarat penting pada sediaan *effervescent* yaitu dapat menimbulkan reaksi *effervescent* yang cepat. Sehingga untuk memenuhi syarat tersebut yaitu kelarutan pada zat aktif maupun zat tambahan yang di formulasikan harus memiliki kelarutan yang baik terhadap air (Syahrina *et al.*, 2021).

Bahan basa yang digunakan yaitu natrium bikarbonat. Pemilihan bahan basa natrium bikarbonat sesuai dengan penelitian Setiana (2018), natrium bikarbonat digunakan sebagai pembentuk reaksi basa dan bertindak dalam menetralsir asam sitrat dan asam tartrat serta dapat menghasilkan buih dan membebaskan karbon dioksida serta larut sempurna dalam air (Setiana & Kusuma, 2018).

Bahan pengikat yang digunakan yaitu PVP. Pemilihan PVP sebagai bahan pengikat merupakan bahan pengikat yang paling umum digunakan, sesuai dengan penelitian Rahmatullah (2023) menyebutkan bahwa granul dengan bahan pengikat PVP memiliki sifat alir yang baik, sudut diam yang minimum, menghasilkan fines lebih sedikit dan daya kompaktibilitasnya lebih baik (Rahmatullah, Pambudi, Permadi & Hikmah, (2023).

Bahan pengisi yang digunakan yaitu laktosa. Laktosa merupakan bahan yang paling umum digunakan dalam pembuatan sediaan granul maupun tablet. Sesuai dengan penelitian Manno (2021), menyebutkan bahwa laktosa merupakan bahan pengisi yang kompatibel jika dicampurkan dengan bahan lainnya. Sehingga laktosa dipilih sebagai bahan pengisi pada pembuatan granul *effervescent* pada penelitian ini.

5.3 Pembuatan Granul *Effervescent* dan Hasil Evaluasi Sediaan Granul

Pembuatan granul *effervescent* dilakukan secara duplo untuk setiap *batch* nya. Pengoptimasian formulasi bahan asam sitrat dan asam tartrat menggunakan *software design expert* dan didapatkan lima formula dan terpilih tiga formulasi sebagai batas atas, tengah dan batas bawah. Proses pembuatan granul *effervescent* bakteri *L.acidophilus* tertera pada **bab IV poin 4.5**. Setelah pembuatan granul *effervescent*, uji evaluasi sifat fisik yang dilakukan meliputi uji organoleptik, uji laju alir, uji sudut diam, uji kompresibilitas, uji LOD, uji waktu larut, uji pH, uji tinggi buih dan uji viabilitas BAL. Hasil uji evaluasi sifat fisik granul *effervescent* sebagai berikut:

5.3.1 Uji Organoleptik

Pada uji organoleptik sediaan granul *effervescent* yang dibuat diamati bentuk, warna dan aroma. Secara organoleptik pada ke tiga formula yang dibuat menghasilkan warna putih, mempunyai rasa asam dan relatif tidak beraroma. Pada warna yang dihasilkan dalam sediaan bahan aktif bakteri *L.acidophilus* yang dimasukkan kedalam formula tidak mempengaruhi pada warna sehingga warna yang dihasilkan warna putih. Hasil sediaan granul *effervescent* bakteri *L.acidophilus* dapat dilihat pada **Gambar V.3**



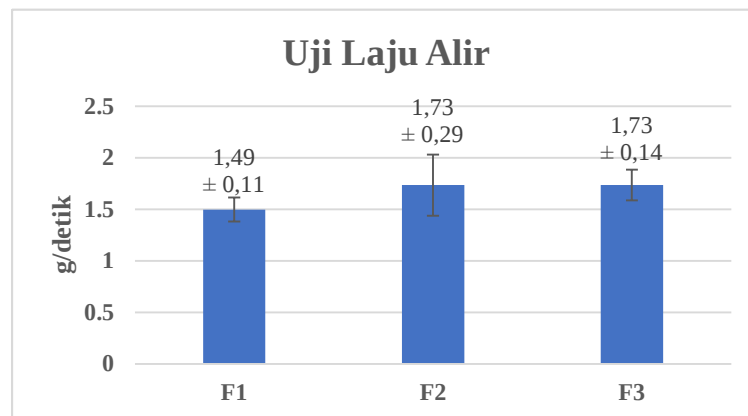
Gambar V.3 Sediaan Granul *Effervescent* Bakteri *L.acidophilus*

5.3.2 Uji Laju Alir

Uji laju alir serbuk bertujuan untuk mengetahui kualitas granul *effervescent*, karena pada proses pencetakan tablet daya alir serbuk/granul sangat dipengaruhi oleh uji laju alir (Putra, 2019). Kecepatan alir dikatakan baik jika memiliki kecepatan alir tidak kurang dari 10 g/detik (Syahrina & Noval, 2021).

Tabel V.1 Hasil Uji Laju Alir

Formula	Laju alir (g/detik)		Rata – rata/SD	Keterangan
	1	2		
I	1,41	1,58	1,49 ± 0,11	Syarat Laju Alir 15 g/detik
II	1,52	1,94	1,73 ± 0,29	
III	1,63	1,84	1,73 ± 0,14	



Gambar V.4 Diagram Batang Hasil Uji Laju Alir

Pada **Tabel V.1**, data evaluasi kecepatan alir granul *effervescent* yang diperoleh menunjukkan formula I, II dan III memiliki perbedaan kecepatan alir. Dari hasil evaluasi laju alir menunjukkan adanya pengaruh dari perbedaan konsentrasi bahan asam yang dapat mempengaruhi laju alir granul *effervescent*. Pada **Tabel V.1** menunjukkan bahwa formula I

memiliki laju alir yang lebih baik dibandingkan formula II dan formula III. Menurut literatur asam tartrat memiliki densitas yang lebih besar sehingga granul yang konsentrasi asam tartrat nya lebih besar akan mempunyai densitas yang lebih besar. Densitas besar menunjukkan bobot molekul yang besar, hal ini dapat menyebabkan granul akan lebih mudah mengalir karena gaya gravitasi yang lebih besar (Egeten *et al.*, 2016). Pada penelitian Zuraidah (2018), menunjukkan hasil uji evaluasi pada laju alir dimana konsentrasi asam tartrat yang lebih besar memiliki laju alir yang lebih baik.

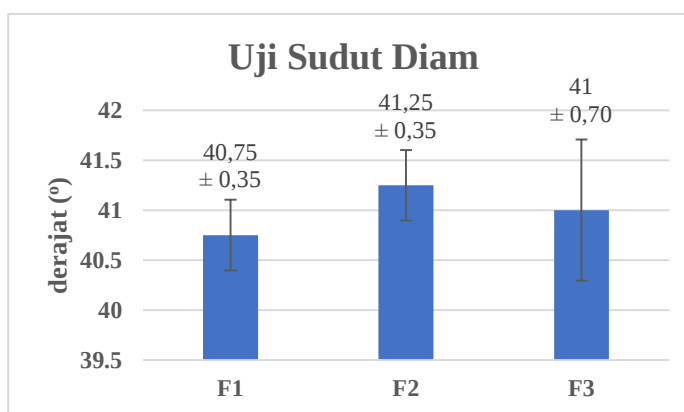
Selain perbedaan konsentrasi bahan asam yang dapat mempengaruhi laju alir, menurut Hermanto (2019), pengaruh dari bentuk dan ukuran granul akan menghasilkan kecepatan alir yang baik (HERMANTO, 2019). Selain itu juga, menurut Syahrina (2021) bahan pengikat yang digunakan juga dapat berpengaruh pada kecepatan alir. Bahan pengikat yang digunakan pada penelitian ini yaitu PVP K30 dimana pada penelitian Syahrina (2021) menggunakan bahan pengikat yang sama yaitu PVP K30. Hasil penelitian Syahrina (2021) melaporkan bahwa PVP K30 dapat menurunkan gaya kohesi sehingga dapat meningkatkan ukuran partikel yang menyebabkan kecepatan alir granul yang dihasilkan baik (Syahrina & Noval, 2021).

5.3.3 Uji Sudut Diam

Uji sudut diam ditujukan untuk mengetahui sifat alir granul. Penentuan sudut diam dapat ditentukan dengan menuangkan sediaan granul ke corong selanjutnya sudut diam akan terbentuk.

Tabel V.2 Hasil Uji Sudut Diam

Formula	Sudut Diam (°)		Rata – rata/SD	Keterangan
	1	2		
I	40,5	41	40,75 ± 0,35	Syarat sudut diam 25 – 40°
II	41	41,5	41,25 ± 0,35	
III	40,5	41,5	41 ± 0,70	



Gambar V.5 Diagram Batang Hasil Uji Sudut Diam

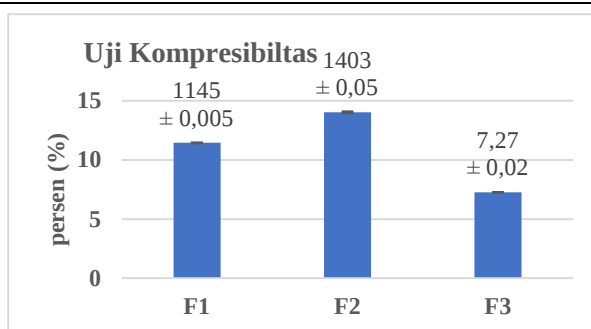
Pada **Tabel V.2** menunjukkan hasil sudut diam yang lebih besar atau sama dengan 40° . Dari data hasil sudut diam menunjukkan bahwa formula I, II dan III memiliki sifat alir yang umumnya kurang baik. Berdasarkan **Tabel V.1** dan **Tabel V.2** hasil laju alir dan sudut diam pada formula I lebih kecil daripada formula II dan formula III. Hal ini sejalan dengan penelitian Zuraidah (2018) dimana melaporkan bahwa variasi konsentrasi pada asam sitrat dan asam tartrat dapat mempengaruhi pada perbedaan besar kecilnya sudut diam pada ke tiga formula. Pada formula I menghasilkan sudut diam yang lebih kecil daripada sudut diam formula II dan formula III. Hal ini dapat disebabkan karena asam tartrat memiliki bobot molekul yang besar dan dapat berpengaruh terhadap ukuran partikel. Dimana kohesivitas partikel akan semakin kecil dan semakin cepat laju alirnya jika ukuran partikelnya semakin besar sehingga dapat menghasilkan sudut diam yang lebih kecil (Zuraidah *et al.*, 2018). Pada penelitian Salmatuzzahro (2022), melaporkan bahwa sudut diam dapat dipengaruhi oleh bentuk, ukuran dan kelembaban granul. Bentuk granul dapat dipengaruhi kemungkinan adanya perbedaan penekanan pada saat proses granulasi yang dapat menyebabkan sudut diam yang dihasilkan terdapat perbedaan (Salmatuzzahro *et al.*, 2022).

5.3.4 Uji Kerapatan Ruahan, Kerapatan Mampat dan Indeks Kompresibilitas

Uji kompresibilitas ditujukan untuk menggambarkan sifat serbuk yang stabil dan kompak saat diberi tekanan pada proses pencetakan tablet, semakin baik kemampuan granul mengalir maka semakin kecil nilai kompresibilitasnya (Noval *et al.*, 2021).

Tabel V.3 Hasil Uji Kompresibilitas

Formula	Kerapatan Nyata (g/mL)	Kerapatan Mampat (g/mL)	Kompresibilitas (%)	Keterangan
I	$0,58 \pm 0,00$	$0,655 \pm 0,03$	$11,45 \pm 0,05$	Syarat kompresibilitas < 20%
II	$0,49 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,08$	$14,03 \pm 0,05$	
III	$0,51 \pm 0,02$	$0,55 \pm 0,02$	$7,27 \pm 0,02$	



Gambar V.6 Diagram Batang Hasil Uji Kompresibilitas

Berdasarkan penelitian, hasil uji kompresibilitas menunjukkan Formula I sebesar 11,45%, Formula II sebesar 14,03%, dan Formula III sebesar 7,27%. Hasil yang diperoleh pada **Tabel V.3** memenuhi persyaratan nilai kompresibilitas yang baik yaitu kurang dari 20% (Noval *et al.*, 2021). Nilai kompresibel tertinggi terdapat pada Formula II. Hal ini disebabkan karena kandungan air pada serbuk dapat mempengaruhi kompresibilitasnya. Granul dengan kandungan air yang tinggi juga mengalami kehilangan volume yang besar ketika terkena tekanan atau getaran, sehingga menghasilkan kompresibilitas yang lebih besar (Fatikha N, 2020). Bentuk dan ukuran partikel granular juga mempengaruhi kompresibilitas; Nilai yang baik ditunjukkan dengan bentuk dan ukuran partikel granul yang seragam sehingga memudahkan pengepresan tablet (HERMANTO, 2019).

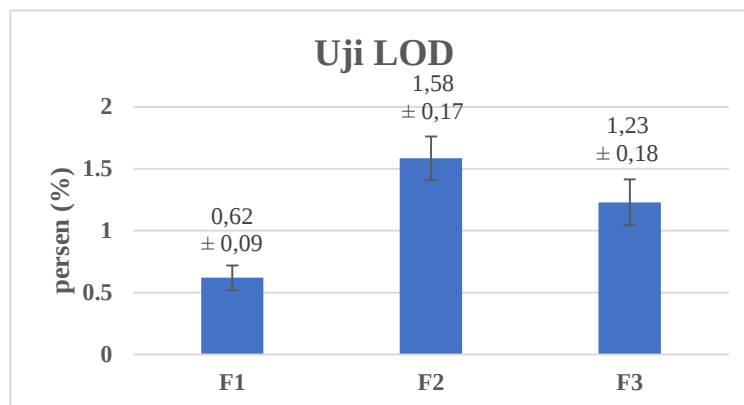
Berdasarkan penelitian hasil uji kompresibilitas menunjukkan pada formula I yaitu 11,45%, formula II yaitu 14,03% dan formula III yaitu 7,27%. Pada **Tabel V.3** hasil yang didapatkan sudah memenuhi persyaratan, nilai kompresibilitas yang baik yaitu kurang dari 20% (Noval *et al.*, 2021). Nilai kompresibilitas tertinggi yaitu pada formula II, hal ini terjadi karena nilai kompresibilitas dapat dipengaruhi oleh kadar air serbuk, suatu granul dengan kadar air yang tinggi apabila diberikan tekanan atau getaran juga akan mengalami kehilangan volume yang besar sehingga menghasilkan kompresibilitas yang lebih besar (Fatikha N, 2020). Bentuk dan ukuran partikel granul juga mempengaruhi nilai kompresibilitas, nilai yang baik ditunjukkan dengan bentuk dan ukuran partikel granul yang seragam sehingga memudahkan proses pencetakan tablet (HERMANTO, 2019).

5.3.5 Uji *Loss on Drying* (LOD)

Pada saat pengujian kadar air yang dilakukan dengan cara menimbang sejumlah granul dan dimasukkan kedalam *moisture balance*, diperoleh hasil formula I sebesar 0,62%, formula II sebesar 1,54% dan formula III sebesar 1,26%. Dari ketiga hasil pengujian kadar air formulasi II dan III dikatakan tidak memenuhi syarat, karena syarat kadar air untuk granul *effervescent* menurut Fausett (2000) berkisar antara 0,4%- 0,7% (Fausett *et al.*, 2000). Hal ini disebabkan karena konsentrasi asam dan basa dalam formulasi juga suhu ruangan tempat pembuatan sediaan memiliki kelembaban yang cukup tinggi.

Tabel V.4 Hasil Uji LOD

Formula	LOD (%)		Rata – rata/SD	Keterangan
	1	2		
I	0,69	0,55	0,62 ± 0,09	Syarat kadar air granul <i>effervescent</i> 0.4 – 0.7%
II	1,71	1,46	1,58 ± 0,17	
III	1,1	1,36	1,23 ± 0,18	

**Gambar V.7** Diagram Batang Hasil Uji LOD

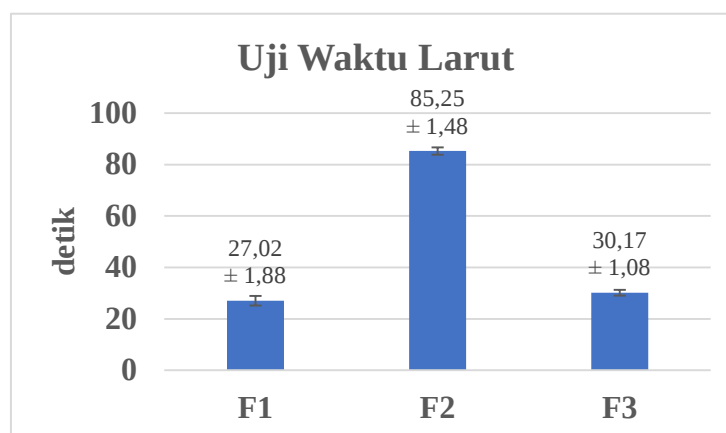
Hasil evaluasi yang diperoleh menunjukkan Formula I memenuhi syarat. Asam sitrat mempunyai sifat yang sangat higroskopis dan dapat menyerap air dari udara. Penelitian ini sesuai dengan laporan Romantika (2017) bahwa semakin banyak asam sitrat yang ditambahkan maka semakin tinggi pula kandungan air soda jeruk baby java (Romantika et al., 2017). Widyaningrum (2015) juga melaporkan bahwa granul *effervescent* daun pandan dengan asam sitrat mencapai kadar air tertinggi (Widyaningrum et al., 2015). Lieberman et al. (1994) menemukan bahwa asam sitrat merupakan pengasaman yang sangat higroskopis, sehingga granul *effervescent* dengan perlakuan penambahan asam sitrat tertinggi selama pembuatannya sangat rentan dalam menyerap air sehingga menghasilkan kadar air yang tinggi.

5.3.6 Uji Waktu Larut

Pengujian waktu larut granul *effervescent* alat yang digunakan yaitu *stopwatch*. Pengujian waktu larut ditandai dengan granul melarut sempurna dalam air hingga terbentuk reaksi asam dan basa yang dapat menghasilkan gas karbondioksida (CO₂). Waktu larut granul *effervescent* yaitu 1-2 menit (Santosa et al., 2017).

Tabel V.5 Hasil Uji Waktu Larut

Formula	Waktu Larut (detik)		Rata – rata/SD	Keterangan
	1	2		
I	25,69	28,36	27,02 ± 1,88	Syarat waktu larut ≤ 2 menit
II	84,2	86,3	85,25 ± 1,48	
III	29,41	30,94	30,17 ± 1,08	

**Gambar V.8** Diagram Batang Hasil Uji Waktu Larut

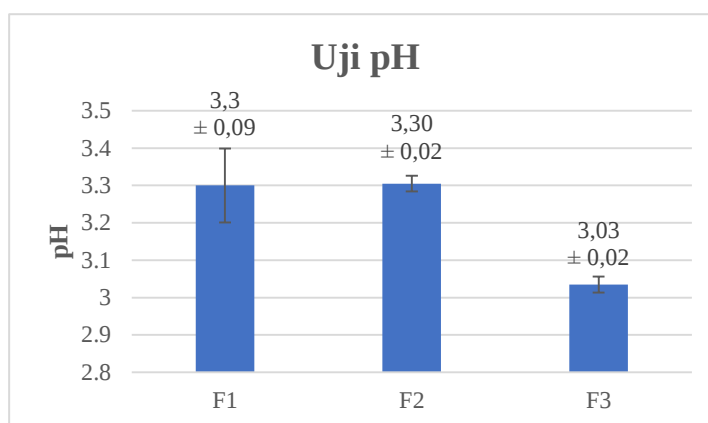
Pada **Tabel V.5** hasil waktu larut formula I lebih cepat dibandingkan dengan formula II dan formula III. Hal ini menunjukkan perbedaan variasi konsentrasi dari bahan asam sitrat dan bahan asam tartart mempengaruhi uji waktu larut granul *effervescent*. Hal ini sesuai dengan penelitian Zuraidah (2018), dimana melaporkan bahwa sifat asam tartrat yang higroskopis dengan konsentrasi yang paling tinggi menyebabkan granul *effervescent* mudah menyerap air dan lebih cepat bereaksi. Pada penelitian Salmatuzzahro (2022) juga menjelaskan bahwa pada formula yang asam sitrat dengan konsentrasi yang paling rendah memiliki waktu larut yang lebih cepat (Salmatuzzahro *et al.*, 2022). Hal ini sejalan dengan penelitian ini dimana hasil formula I mengandung asam sitrat yang konsentrasinya paling rendah dan mengandung asam tartrat yang konsentrasinya paling tinggi yang menghasilkan waktu larut yang paling cepat dibandingkan dengan formula II dan formula III. Karena sifat asam sitrat dan asam tartrat yang higroskopis maka akan menarik air lebih cepat untuk reaksi karbonasi, sehingga reaksi karbonasi antara natrium bikarbonat dengan asam tartrat dan asam sitrat menjadi cepat. Pada **Tabel V.5** menunjukkan bahwa ke tiga formulasi menunjukkan waktu larut yang ≤ 5 menit atau berkisar di antara 1 – 2 menit. Sehingga ketiga formula dapat dikategorikan memenuhi persyaratan pengujian waktu larut.

5.3.7 Uji pH

Pada sediaan *effervescent* tingkat keasaman diukur menggunakan alat pH meter yang telah dilarutkan sebanyak 1 g dalam 9 mL. Pengujian dilakukan sebanyak 2 kali pada setiap formulasi.

Tabel V.6 Hasil Uji pH

Formula	pH		Rata – rata/SD	Keterangan
	1	2		
I	3,23	3,37	3,3 ± 0,09	Syarat pH ≤ 5
II	3,32	3,29	3,30 ± 0,21	
III	3,05	3,02	3,03 ± 0,21	



Gambar V.9 Diagram Batang Hasil Uji pH

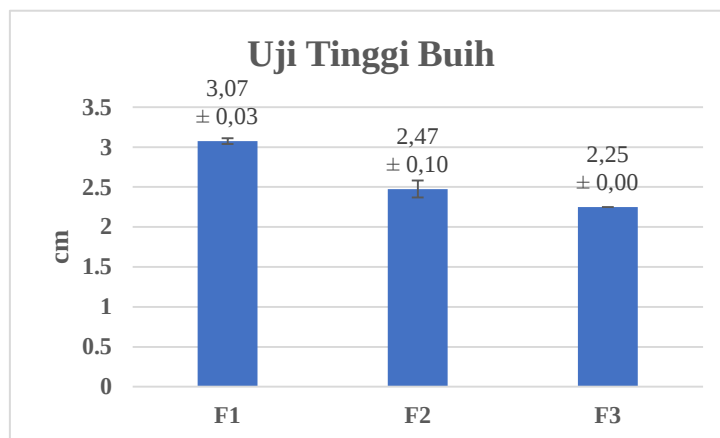
Pada **Tabel V.6** nilai pH formula I tertinggi dibandingkan dengan formula II dan formula III. Hal ini disebabkan karena perbedaan konsentrasi asam sitrat dan asam tartrat dimana konsentrasi asam tartrat pada formula I lebih tinggi sehingga berpengaruh pada nilai pH. Dalam penelitian Kusnadi (2003), CO₂ terbentuk pada saat reaksi 2 *effervescent* dalam air yang sebagian akan larut membentuk asam karbonat akan mengurangi ion H⁺ dalam larutan sehingga menyebabkan keasaman pada larutan dan berakibat nilai pH akan rendah (Astuti & Wahyu, 2016). Selain itu sifat bakteri *L.acidophilus* juga mempengaruhi pH pada sediaan dimana pH pertumbuhan optimum bakteri *L.acidophilus* ≤ 5, sehingga bakteri pada sediaan granul *effervecent* masih terkandung di dalamnya setelah diformulasikan menjadi granul *effervescent*. Dari hasil yang didapatkan dari ketiga formula dikategorikan memenuhi syarat uji pH dikarenakan hasil pH ≤ 5.

5.3.8 Uji Tinggi Buih

Uji tinggi buih dilakukan berdasarkan tinggi buih yang dihasilkan oleh sampel. Uji evaluasi tinggi buih dilakukan dengan cara melarutkan 1 gram sampel granul *effervescent* dan tinggi buih akan terlihat pada saat proses netralisasi.

Tabel V.7 Hasil Uji Tinggi Buih

Formula	Tinggi Buih (cm)		Rata – rata/SD	Keterangan
	1	2		
I	3,05	3,1	3,07 $\pm$ 0,03	Syarat Tinggi Buih Granul <i>Effervescent</i> < 3 cm
II	2,4	2,55	2,47 $\pm$ 0,10	
III	2,25	2,25	2,25 $\pm$ 0	

**Gambar V.10** Diagram Batang Hasil Uji Tinggi Buih

Rata-rata tinggi buih yang diperoleh adalah 2-3 cm. Tinggi busa Formula I 3,1 cm, Formula II 2,55 cm, dan Formula III 2,25 cm. Hasil terbaik dalam tinggi busa dicapai oleh mereka yang memiliki perbedaan terkecil dengan standar tinggi buih *effervescent effervescent* yang ada dipasaran yaitu ± 3 cm. Brayant (1970) menjelaskan bahwa buih terdiri dari ribuan gelembung kecil yang berasal dari suatu cairan dan terbentuk melalui reaksi kimia (pengasaman dan karbonat) atau perlakuan mekanis (pencampuran). Saat gelembung tumbuh dan dengan cepat terkumpul di permukaan cairan, buih pun terbentuk. Dan melimpahnya buih pada penelitian ini disebabkan oleh sifat asam tartrat yang memiliki rendemen pembentukan karbon dioksida paling tinggi dibandingkan asam lainnya, namun waktu penguraianya lebih lama.

Hasil rata-rata tinggi buih yang diperoleh dari granul *effervescent* bakteri *L.acidophilus* antara 2-3 cm. Tinggi buih formula I yaitu 3,1 cm, formula II 2,55 cm dan formula III 2,25 cm. Hasil tinggi buih terbaik merupakan yang memiliki selisih terkecil dengan standar *effervescent* dipasaran sekitar 3 cm. Brayant (1970) menjelaskan bahwa buih terdiri atas ribuan gelembung kecil yang bersumber dari cairan dan terbentuk dari hasil reaksi kimia (asidulan dan karbonat) atau perlakuan secara mekanik (pengadukan). Ketika gelembung bertumbuh dan berakumulasi dengan cepat pada permukaan cairan maka ketika itulah buih terbentuk. Dan terjadinya buih yang banyak pada penelitian ini disebabkan sifat asam tartrat

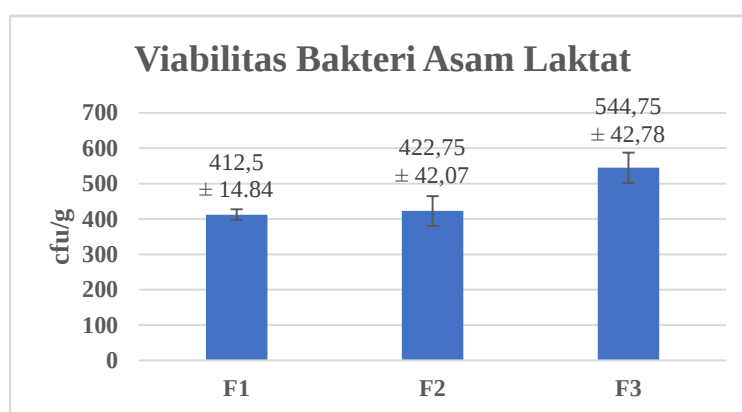
yang mana dalam perbandingan pembentukan karbondioksida menunjukkan hasil yang terbanyak dibanding asam – asam lain, akan tetapi memiliki waktu disintegrasi lebih lama.

5.3.9 Uji Viabilitas Bakteri Asam Laktat Granul *Effervescent L.acidophilus*

Pengujian viabilitas sediaan granul probiotik merupakan pengujian yang perlu diperhatikan sehingga bakteri probiotik yang terkandung dalam sediaan granul dapat memberikan efek terapeutik.

Tabel V.8 Hasil Uji Viabilitas BAL Sediaan Granul

Formula	Viabilitas Bakteri Asam Laktat (cfu/g)		Rata – rata/SD	Keterangan
	1	2		
I	402	423	412,5 ± 14,84	Syarat Viabilitas Sediaan Probiotik 10 ⁷ cfu/g
II	393	452,5	422,75 ± 42,07	
III	514,5	575	544,75 ± 42,78	



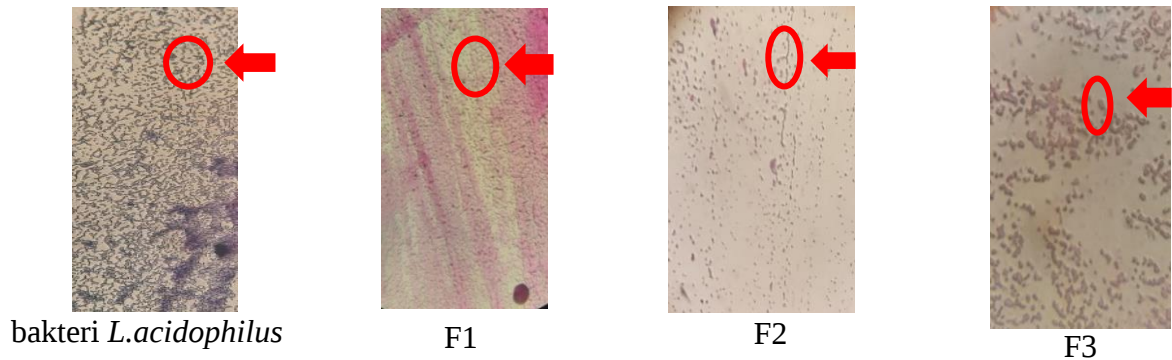
Gambar V.11 Diagram Batang Hasil Uji Viabilitas BAL Sediaan Probiotik

Pengujian viabilitas BAL produk probiotik menggunakan metode *spread -method* (cawan sebar). Metode *spread -method* merupakan teknik menumbuhkan mikroorganisme dalam media agar dengan cara menyebarkan sediaan pada media agar yang sudah memadat (Damayanti *et al.*, 2020).

Pada penelitian Gantini (2016), kondisi optimal suhu dan waktu pengeringan pada suhu 45°C selama 2 jam mendapatkan hasil viabilitas BAL granul instan probiotik 7,43 cfu/g. Pada penelitian ini suhu yang digunakan yaitu pada suhu 40°C selama 3 jam. Pada **Tabel V.8** rata – rata viabilitas BAL granul *effervecent* pada formula I 412,5 x 10¹ cfu/g, formula II 422,7 x 10¹ cfu/g dan formula III 544,7 x 10¹ cfu/g. Pada hasil yang didapatkan bakteri *L.acidophilus* yang terkandung pada sediaan granul *effervescent* tetap hidup dan dapat dikategorikan semua formula tidak memenuhi persyaratan viabilitas BAL produk probiotik menurut WHO. Hal ini

dapat dipengaruhi oleh faktor waktu pengeringan sehingga berpengaruh pada viabilitas BAL. Menurut Gantini (2016), penurunan viabilitas bakteri ditunjukkan pada lamanya waktu pengeringan granul. Hal ini menunjukkan bahwa peluang bakteri dapat bertahan hidup atau dapat mengalami kematian akibat waktu pengeringan (Gantini & Widayanti, 2016).

Uji pewarnaan gram pada sediaan granul *effervescent* ditunjukkan untuk mengkonfirmasi bakteri yang terkandung pada sediaan granul *effervescent* yang telah dibuat merupakan bakteri *L.acidophilus*.



Gambar V.11 Hasil Uji Konfirmasi Pewarnaan Gram Pada Sediaan Granul *Effervescent*

Pada **Gambar V.11** hasil uji konfirmasi pewarnaan Gram pada formula I, II dan III yaitu menunjukkan mengandung bakteri gram positif yang mempertahankan warna ungu dan berbentuk batang. Bakteri yang terkandung pada sediaan granul *effervescent* pada formulasi I, II dan III merupakan bakteri *L.acidophilus* karena menunjukkan hasil yang sama dengan uji konfirmasi bakteri murni *L.acidophilus*.