

**PENGARUH PENAMBAHAN SUKROSA PADA AIR KELAPA DAN
LAMA FERMENTASI TERHADAP PRODUKSI EKSOPOLISAKARIDA
OLEH *Leuconostoc mesenteroides***

SKRIPSI

Oleh:

FATHIA RAHMATUL AZIZAH

NIM. 14630053



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019**

**PENGARUH PENAMBAHAN SUKROSA PADA AIR KELAPA DAN
LAMA FERMENTASI TERHADAP PRODUKSI EKSPOLISAKARIDA
OLEH *Leuconostoc mesenteroides***

SKRIPSI

Oleh:

**FATHIA RAHMATUL AZIZAH
NIM. 14630053**

Diajukan Kepada:

**Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019**

**PENGARUH PENAMBAHAN SUKROSA PADA AIR KELAPA DAN
LAMA FERMENTASI TERHADAP PRODUKSI EKSPOLISAKARIDA
OLEH *Leuconostoc mesenteroides***

SKRIPSI

Oleh:
FATHIA RAHMATUL AZIZAH
NIM. 14630053

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 08 Mei 2019

Pembimbing I

Anik Maunatin, S.T, M.P
NIDT. 197601052018012 2 248

Pembimbing II

M. Imamudin, Lc, M.A
NIP. 19740602 200901 1 010

Mengetahui,
Ketua Jurusan



Elok Kamilah Hayati, M. Si
NIP. 19790620 200604 2 002

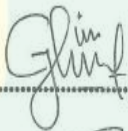
**PENGARUH PENAMBAHAN SUKROSA PADA AIR KELAPA DAN
LAMA FERMENTASI TERHADAP PRODUKSI EKSOPOLISAKARIDA
OLEH *Leuconostoc mesenteroides***

SKRIPSI

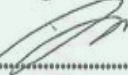
Oleh:
FATHIA RAHMATUL AZIZAH
NIM. 14630053

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 08 Mei 2019

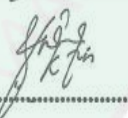
Penguji Utama : A. Ghanaim Fasya, M.Si
NIP. 1982066 200604 1 002

()

Ketua Penguji : Dr. Akyunul Jannah, S.Si., M.P
NIP. 19750410200501 2 009

()

Sekretaris Penguji : Anik Maunatin, S.T., M.P
NIDT. 197601052018012 2 248

()

Anggota Penguji : M. Imamudin, Lc, M.A
NIP. 197406022009011010

()

Mengetahui,
Ketua Jurusan



Elok Kamilah Hayati, M. Si
NIP. 19790620 200604 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : FathiaRahmatulAzizah

NIM : 14630053

Jurusan : Kimia

Fakultas : SainsdanTeknologi

Judul Penelitian : Pengaruh Penambahan Sukrosa pada Air Kelapa dan Lama Fermentasi terhadap Produksi Eksopolisakarida oleh *Leuconostoc mesenteroides*

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan maka saya bersedia menerima sanksi perbuatan tersebut.

Malang, 23 Mei 2019

Yang membuat pernyataan



Fathia Rahmatul Azizah
NIM. 14630053

HALAMAN PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan kepada:

- 1) Allah *Subhanahu wa Ta'ala* yang selalu memberikan rahmat dan ridho-Nya dalam mempermudah proses menuntut ilmu
- 2) Ayah (Drs.H.Zainul Arifin, M.Pd.i) dan ibu (Dra.Hj.Siti Cholifah, M.Pd) yang kasih sayangnya tidak pernah putus dan selalu ikhlas mendukung proses belajar serta adik (Rafiqah Choridatuz Zahroh) sebagai pemberi semangat kedua dan efek *sibling power* dan juga kakak *non-biologis* (Fauzana Maulida Nurrahma) yang menyemangati dan mengibur dikala penat
- 3) Pembimbing (Anik Maunatin, S.T., M.P) dan konsultan (Dr.Akyunul Jannah, S.Si., M.P) yang selalu sabar dalam mengajar, membimbing dan membagikan ilmu pengetahuan yang beliau miliki
- 4) Sahabat biokimia (Puja, Maya, Citra, Dian) yang mengajarkan kesabaran dan arti perjuangan yang tidak akan sia-sia serta menginginkan satu sama lain berkembang dan sukses

Motto

“Berbuat baiklah kepada sesama sekalipun kepada orang yang membencimu, maka kebaikan yang ditanam akan menuai hasil baik kelak dikemudian hari”

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Puji syukur kehadiran Allah yang maha pengasih lagi maha penyayang, atas segala nikmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Penambahan Sukrosa pada Air Kelapa dan Lama Fermentasi terhadap Produksi Eksopolisakarida oleh *Leuconostoc mesenteroides*”** dengan sebaik mungkin. Shalawat serta salam selalu penulis haturkan pada Nabi Muhammad ﷺ, yang menjadi suri tauladan bagi kita semua.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini tidak akan terwujud tanpa adanya bantuan dan dorongan dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Ayah dan Ibu tercinta. Terimakasih atas segala do'a, kepercayaan, cinta kasih yang tiada henti diberikan kepada penulis, dan senantiasa memberikan motivasi yang luar biasa sehingga mampu memberikan motivasi dan semangat yang sangat berarti bagi penulis.
2. Ibu Anik Maunatin, S.T.,M.P, Ibu Dr.Akyunul Jannah,S.Si.,M.P, dan BapakM.Imamudin, Lc, M.Aselaku dosen pembimbing dan konsultan yang telah memberikan banyak arahan, masukan, serta motivasi dalam membimbing penulis untuk dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
3. Bapak A.Ghanaim Fasya, M.Si, selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan masukan dan saran, sehingga skripsi ini bisa menjadi lebih baik.
4. Seluruh dosen Jurusan Kimia yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat bagi penulis.
5. Seluruh laboran dan staf administrasi kimia atas segala kontribusinya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.

6. Teman–teman mahasiswa angkatan 2014, terutama teman-teman “*Biokim Squad*” yang telah banyak membantu penulis dan memberikan dukungan dalam menyusun skripsi ini.
7. Kepada semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa moril maupun materil.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh sebab itu saran dan kritik yang bersifat membangun sangat penulis harapkan demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat menjadi sarana pembuka tabir ilmu pengetahuan baru dan bermanfaat bagi kita semua, Amin.

Malang, Mei 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
LEMBAR ORISINALITAS	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
ABSTRAK	xiii
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.4 Batasan Masalah.....	6
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Air Kelapa	7
2.2 Pengukuran Kadar Gula Metode Sulfat-Fenol	9
2.3 Bakteri Asam Laktat (BAL)	10
2.4 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	14
2.5 Eksopolisakarida (EPS).....	15
2.6 Fermentasi Eksopolisakarida.....	20
2.7 Biosintesis Eksopolisakarida	25
2.8 <i>Fourier Transform Infrared</i> (FTIR)	28
 BAB III METODOLOGI	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	30
3.2 Alat dan Bahan	30
3.2.1 Alat	30
3.2.2 Bahan.....	30
3.3 Rancangan Penelitian	31
3.4 Tahapan Penelitian	32
3.5 Pelaksanaan Penelitian	32
3.5.1 Sterilisasi Alat	32
3.5.2 Preparasi Air Kelapa	33
3.5.3 Pembuatan Media	33
3.5.3.1 Pembuatan Media MRSA (<i>de Man Rogosa and Sharpe Agar</i>)	33
3.5.3.2 Pembuatan Media MRSB (<i>de Man Rogosa and Sharpe Broth</i>).....	34
3.5.4 Regenerasi <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	34
3.5.5 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri	34

3.5.6 Pembuatan Inokulum.....	34
3.5.7 Produksi Eksopolisakarida	35
3.5.7.1 Pengaruh Penambahan Sukrosa dan Lama Fermentasi terhadap Produksi Eksopolisakarida dari Air Kelapa	35
3.5.8 Pengukuran <i>Total Plate Count</i> (TPC)	35
3.5.9 Ekstraksi Eksopolisakarida dari Media Fermentasi Air Kelapa.....	35
3.5.10 Penentuan <i>yield</i> Eksopolisakarida	36
3.5.11 Uji Kadar Total Gula dengan Metode Sulfat Fenol H ₂ SO ₄	36
3.5.11.1 Pembuatan Kurva Standar dengan Metode Fenol H ₂ SO ₄ 36	
3.5.11.2 Penetapan Kadar Total Gula dengan Metode Fenol H ₂ SO ₄	36
3.5.12 Identifikasi Gugus Fungsi pada EPS dengan FTIR.....	37
3.5.13 Analisis Data	37
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Preparasi Air Kelapa	38
4.2 Pembuatan Media	40
4.3 Regenerasi <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	40
4.4 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri	42
4.5 Pembuatan Inokulum.....	44
4.6 Pengaruh Penambahan Sukrosa dan Lama Fermentasi terhadap Produksi EPS dari Air Kelapa	45
4.7 Viabilitas Bakteri <i>Leuconostoc mesenteroides</i> setelah Fermentasi dengan Metode <i>Total Plate Count</i> (TPC)	51
4.8 Kadar Total Gula Eksopolisakarida	52
4.9 Kadar Gula Terpakai selama Fermentasi	54
4.10 Hasil Analisis dengan Spektrofotometer FTIR	57
4.11 Pemanfaatan Air Kelapa untuk Produksi Eksopolisakarida dalam Perspektif Islam.....	58
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1 Kesimpulan.....	65
5.2 Saran	66
DAFTAR PUSTAKA	67
LAMPIRAN	77

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Komposisi air buah kelapa	8
Tabel 3.1 Kombinasi perlakuan antara konsentrasi sukrosa (b/v) dan lama fermentasi	31
Tabel 4.1 Kadar total gula	39
Tabel 4.6 Rata-rata jumlah bakteri	47
Tabel 4.7 Rata-rata kadar eksopolisakarida	49
Tabel 4.8 Rata-rata kadar total gula EPS	54
Tabel 4.9 Rata-rata kadar gula terpakai fermentasi	56
Tabel 4.9.1 <i>Yield</i> fermentasi eksopolisakarida	57
Tabel 4.10. Gugus fungsi dari spektra FTIR perlakuan K ₃ L ₃	59
Tabel L.4.1 Data absorbansi glukosa	87
Tabel L.5.1 Kadar total gula bahan baku	88
Tabel L.5.2.1 Absorbansi sampel sebelum fermentasi	89
Tabel L.5.2.2 Kadar gula total awal sebelum fermentasi	92
Tabel L.5.3.1 Absorbansi gula total setelah fermentasi	93
Tabel L.5.3.2 Kadar total gula setelah fermentasi	103
Tabel L.5.4.1 Kadar gula terpakai pada proses fermentasi ulangan 1	104
Tabel L.5.4.2 Kadar gula terpakai pada proses fermentasi ulangan 2	104
Tabel L.5.4.3 Kadar gula terpakai pada proses fermentasi ulangan 1	105
Tabel L.5.4.4 Kadar gula terpakai rata-rata	105
Tabel L.6.1 Rata-rata berat EPS	106
Tabel L.6.2 Kadar rata-rata eksopolisakarida	106
Tabel L.7.1 Data absorbansi total gula eksopolisakarida	107
Tabel L.7.2 Rata-rata total gula eksopolisakarida	108
Tabel L.8.1 Absorbansi suspensi bakteri pada media air kelapa dan mrsb	109
Tabel L.9 Jumlah bakteri	110

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Reaksi dehidrasi karbohidrat.....	10
Gambar 2.2 (a) Pentosa, (b) Heksosa, (c) 6-dioksiheksosa, (d) keto-heksosa	10
Gambar 2.3 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	14
Gambar 2.4 Struktur dekstran	16
Gambar 2.5 Struktur gellan	17
Gambar 2.6 Struktur kefiran	18
Gambar 2.7 Struktur curdlan.....	18
Gambar 2.8 Struktur xanthan	19
Gambar 2.9 Struktur alginat.....	19
Gambar 2.10 Struktur pullulan.....	20
Gambar 2.11 Jalur biosintesis EPS	26
Gambar 2.12 Spektra FTIR Eksopolisakarida dari <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ..	28
Gambar 4.5 Kurva pertumbuhan <i>L.mesenteroides</i>	45
Gambar 4.6 Eksopolisakarida hasil fermentasi.....	46
Gambar 4.10 Spektra FTIR perlakuan konsentrasi sukrosa 3% selama 48 jam ...	58
Gambar L.4.1 Kurva standar glukosa	87

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan penelitian.....	77
Lampiran 2 Skema Kerja	78
Lampiran 3 Pembuatan larutan	84
Lampiran 4 Kurva standar glukosa	86
Lampiran 5 Kadar gula metode sulfat fenol.....	88
Lampiran 6 Analisis rendemen eksopolisakarida	106
Lampiran 7 Analisis kadar total gula eksopolisakarida	107
Lampiran 8 Kurva pertumbuhan bakteri	109
Lampiran 9 Perhitungan jumlah bakteri menggunakan metode TPC	110



ABSTRAK

Azizah, F. R. 2019. **Pengaruh penambahan sukrosa pada air kelapa dan lama fermentasi terhadap produksi eksopolisakarida oleh *Leuconostoc mesenteroides***. Skripsi. Jurusan Kimia. Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Anik Maunatin, S.T., M.P. Pembimbing II: M.Imamudin,Lc, M.A. Konsultan: Dr.Akyunul Jannah, S.Si., M.P.

Eksopolisakarida (EPS) adalah suatu polisakarida yang diproduksi dan disekresikan oleh mikroba ke lingkungan dalam bentuk polimer biosintetik. EPS memiliki berbagai manfaat yakni sebagai stabilisator, pengental, pembentuk gel pada makanan, selain itu EPS yang diproduksi oleh bakteri asam laktat berfungsi sebagai pangan fungsional yang memberikan manfaat kesehatan seperti dalam bidang biofarmaka. EPS dapat dihasilkan oleh bakteri asam laktat (BAL). Air kelapa merupakan salah satu medium fermentasi BAL yang kaya akan nutrisi yang dapat menghasilkan EPS dengan penambahan sukrosa. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan sukrosa pada air kelapa dan lama fermentasi terhadap produksi eksopolisakarida oleh *Leuconostoc mesenteroides*.

Produksi EPS dilakukan dengan pengendapan filtrat hasil fermentasi menggunakan alkohol etanol 95% selama 24 jam, dan dikeringkan endapan yang didapat menggunakan *freeze dry*. Produk EPS dilakukan beberapa uji, yakni pengukuran rendemen, dan uji kadar total gula dengan metode sulfat fenol H_2SO_4 . Hasil produksi EPS yang terpilih diidentifikasi gugus fungsinya menggunakan FTIR. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok Faktorial (RAKF) yang terdiri dari dua faktor, yaitu konsentrasi sukrosa (1, 2, dan 3% b/v) dan lama fermentasi (24, 32 dan 48 jam). Masing-masing perlakuan dilakukan tiga kali ulangan. Data kadar EPS, kadar total gula EPS dan kadar gula terpakai selama fermentasi dianalisis menggunakan *Two Way ANOVA*.

Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi sukrosa berpengaruh nyata terhadap kadar eksopolisakarida sedangkan lama fermentasi tidak berpengaruh nyata terhadap kadar EPS. Diperoleh kadar EPS tertinggi 0,36% pada perlakuan K_3L_3 , kadar total gula EPS tertinggi 72,94% pada perlakuan K_3L_2 , dan kadar gula terpakai tertinggi 3,94% pada perlakuan K_3L_3 . Spektra hasil analisis FTIR menunjukkan bahwa terdapat serapan -OH alkohol pada bilangan gelombang 3421 cm^{-1} . Serapan -C-H pada bilangan gelombang 2927 cm^{-1} . Serapan gugus -CO terdapat pada bilangan gelombang 1650 cm^{-1} . Serapan -C-H dan -CH₂ terdapat pada bilangan gelombang 1384 cm^{-1} , dan adanya vibrasi kovalen dari ikatan -C₄-O₄H pada bilangan gelombang 1154 cm^{-1} , serta terdapat ikatan $\alpha(1,6)$ glikosidik pada bilangan gelombang 1017 cm^{-1} yang mengindikasikan eksopolisakarida jenis dekstran.

Kata kunci: Eksopolisakarida, *Leuconostoc mesenteroides*, FTIR.

ABSTRACT

Azizah, F. R. 2019. **Effect of sucrose addition on coconut water and fermentation time on exopolysaccharide production by *Leuconostoc mesenteroides*.** Thesis. Department of Chemistry Faculty of Science and Technology State Islamic University Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: Anik Maunatin, S.T., M.P. Supervisor II: M. Immudin, Lc, M.A. Consultant: Dr.Akyunul Jannah, S.Si., M.P.

Exopolysaccharide (EPS) is a polysaccharide that is produced and secreted by microbes into the environment in the form of biosynthetic polymers. EPS has various benefits, namely as a stabilizer, thickener, gelling agent in food, besides that EPS produced by lactic acid bacteria functions as functional food that provides health benefits such as in the field of biopharmaca. EPS can be produced by lactic acid bacteria (LAB). Coconut water is one of fermentation medium that is rich in nutrients that can produce EPS with the addition of sucrose. The purpose of this study was to determine the effect of adding sucrose to coconut water and the length of fermentation to exopolysaccharide production by *Leuconostoc mesenteroides*.

EPS production was carried out by deposition of fermented filtrate using 95% ethanol alcohol for 24 hours, and dried deposits obtained using freeze dry. EPS products are carried out several tests, namely measurement of yield, and test of total sugar content by sulfate phenol H₂SO₄ method. The selected EPS production was identified as functional groups using FTIR. This study used a Factorial Randomized Group Design (RAKF) consisting of two factors, namely sucrose concentration (1, 2, and 3% b / v) and fermentation time (24, 32 and 48 hours). Each treatment was repeated three times. EPS level data, total EPS sugar levels and used sugar levels during fermentation were analyzed using Two Way ANOVA.

The results showed that sucrose concentration significantly affected exopolysaccharide levels while fermentation duration did not significantly affect EPS levels. The highest EPS level was 0.36% in K₃L₃ treatment, the highest total sugar EPS level was 72.94% in K₃L₂ treatment, and the highest used sugar content was 3.94% in K₃L₃ treatment. The spectra of FTIR analysis showed that there was absorption of -OH alcohol at wave number 3421 cm⁻¹. Absorption -C-H at wave number 2927 cm⁻¹. The absorption of the -CO group is at the wave number 1650 cm⁻¹. Absorption -CH and -CH₂ is obtained at wave number 1384 cm⁻¹, and there is a covalent vibration of -C₄-O₄H bond at wave number 1154 cm⁻¹, and there is an α (1,6) glycosidic bond at wave number 1017 cm⁻¹ indicates exopolysaccharide type dextran.

Keywords: Exopolysaccharide, *Leuconostoc mesenteroides*, FTIR.

ملخص البحث

عزيزة ، ف. ر. ٢٠١٩. تأثير إضافة السكر في ماء النارجيل ووقت التخمر على إنتاج إكسوفوليسكاريد بليوجونوستوق ميسنترويديس (*Leuconostoc mesenteroides*) البحث الجامعي. شعبة الكيمياء. كلية العلوم والتكنولوجيا مولانا مالك إبراهيم مالانج. المشرفة الأولى: أنيك مؤونة، الماجستير المشرف الثاني: محمد إمام الدين، الماجستير، المستشار: الدكتورة أكين الجنة، الماجستير

إكسوفوليسكاريد (EPS) هو فوليسكاريد الذي يصنع ويتغلغل بالميكروبات في البيئة على شكل بوليمرات حيوية صناعية. تحتوي إكسوفوليسكاريدا على الفوائد ، مثل كموازن ومثخن وصانع الجيل في الطعام ، بجانب أن إكسوفوليسكاريد الناتج عن بكتيريا حمض اللبنيك يعمل كغذاء وظيفي الذي يوفر فوائد صحية كما هو الحال في مجال الأدوية الحيوية. يمكن ان ينتج إكسوفوليسكاريد بكتيريا حمض اللبنيك (BAL) ماء النارجيل هو واحد من وسائل التخمر الغنية بالمواد المغذية التي تمكن أن تنتج إكسوفوليسكاريد مع إضافة السكر. هدف هذا البحث هي تحديد تأثير إضافة السكر في ماء النارجيل ووقت التخمر على إنتاج إكسوفوليسكاريد بليوجونوستوق ميسنترويديس

يقيم إنتاج إكسوفوليسكاريد من خلال ترشيح المخمر باستخدام كحول الإيثانول ٩٥ ٪ لمدة ٢٤ ساعة، وجففت الودائع باستخدام تجفيد الجافة. تُنفذ منتجات إكسوفوليسكاريد باختبارات، وهي قياس العائد ، واختبار المحتوى الكلي للسكر بطريقة كبريتات الفينول H_2SO_4 حدد إنتاج إكسوفوليسكاريد المحدد كمجموعات وظيفية باستخدام تحليل الطيفيا لأشعة تحت الحمراء للتحويل الفورييه FTIR استخدم هذا البحث تصميم مجموعة عشوائية العاملية (RAKF) الذي يتكون من عاملين ، وهما تركيز السكر (١، ٢، ٣ ٪ الوزن لكل حجم) ووقت التخمر (٢٤، ٣٢، ٤٨ ساعة). تكرر كل علاج ثلاث مرات. حللت بيانات مستوى إكسوفوليسكاريد، مستوى السكر الإجمالي إكسوفوليسكاريد ومستوى السكر المستخدمة أثناء التخمر باستخدام اتجاهين أنوفا (Two Way ANOVA)

دلت النتائج البحث أن تركيز السكر يؤثر كبيرا على مستوى إكسوفوليسكاريد ولا يؤثر وقت التخمر كبيرا على مستوى إكسوفوليسكاريد وأعلى مستوى إكسوفوليسكاريد هو 0.36 ٪ في علاج K_3L_3 ، و أعلى مستوى إجمالي السكر إكسوفوليسكاريد هو 72.94 ٪ في علاج K_3L_2 ، و أعلى محتوى السكر هو ٣.٩٤ ٪ في علاج K_3L_3 . أظهر أطباء تحليل الطيفيا لأشعة تحت الحمراء للتحويل الفورييه أنه كان هناك امتصاص للكحول-OH في الموجة ٣٤٢١ سم^{-١}. الامتصاص C-H- في الموجة هو ٢٩٢٧ سم^{-١}. يقع امتصاص مجموعة CO- عند الموجة ١٦٥٠ سم^{-١}. يقع الامتصاص CH- و CH_2 - عند الموجة ١٣٨٤ سم^{-١} ، وموجود اهتزاز تساهمي من الرابطة C_4-O_4H - عند الموجة ١١٥٤ سم^{-١} ، وهناك رابطة $\alpha(1.6)$ جلاليكوزية في الموجة ١٠١٧ سم^{-١} الذي يشير إلى إكسوفوليسكاريد للنوع ديستران.

الكلمات الرئيسية: إكسوفوليسكاريد، *Leuconostoc mesenteroides*، تحليل الطيفيا لأشعة تحت الحمراء للتحويل الفورييه

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Eksopolisakarida (EPS) adalah suatu polisakarida yang diproduksi dan disekresikan oleh mikroba ke lingkungan dalam bentuk polimer biosintetik (Tallon, dkk., 2006). EPS banyak diteliti karena memiliki banyak potensi di berbagai bidang seperti bidang pangan dan kesehatan. EPS di dalam makanan bermanfaat sebagai stabilisator, pengental, emulgator, pembentuk gel, dan memiliki kemampuan mengikat air yang baik sehingga dapat mempertahankan tekstur agar tetap lembut selama penyimpanan (Zubaidah, 2008). EPS dihasilkan oleh bakteri yang memiliki manfaat positif bagi tubuh seperti bakteri asam laktat (BAL). EPS yang dihasilkan oleh BAL memiliki potensi sebagai bahan aditif yang aman untuk memperbaiki tekstur dan viskositas produk susu fermentasi alami dan dapat memberikan manfaat kesehatan bagi konsumen. EPS dalam dunia kesehatan dapat berfungsi sebagai immunostimulator, antitumor, antibakteri dan aktivasi makrofage untuk meningkatkan daya tahan tubuh (Sutherland, 1998). Beberapa EPS yang telah banyak digunakan dalam bidang kesehatan diantaranya β -glukan, β -mannan, xanthan, curdlan, gellan, dan dekstran (Malik, dkk., 2008).

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan salah satu organisme yang dapat memfermentasi bahan pangan melalui fermentasi karbohidrat dan umumnya menghasilkan sejumlah besar asam laktat (Rahayu, 2003). EPS yang diproduksi BAL berfungsi sebagai bentuk perlindungan sel bakteri terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim dan bentuk pertahanan diri dari sel lain dan bakteriofag.

EPS dari BAL dapat diaplikasikan pada makanan karena BAL aman dikonsumsi manusia (dalam kata lain *Generally Recognize as Safe-GRAS*). EPS yang diproduksi oleh BAL mempunyai banyak potensi untuk dikembangkan sebagai bahan makanan fungsional yang baik dan berguna bagi kesehatan (Amalia, 2012). Sebagian besar BAL yang telah diteliti untuk produksi EPS seperti *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, dan *Lactobacillus casei* (Tallon, dkk., 2006). BAL dapat menghasilkan EPS dengan membutuhkan substrat yang mengandung glukosa, sukrosa, dan fruktosa demi menunjang hasil fermentasi (Fifendy, dkk., 2013). Salah satu bahan dengan kandungan glukosa yang tinggi dan nutrisi yang kompleks adalah air kelapa.

Air kelapa adalah salah satu bagian dari tanaman kelapa yang memiliki banyak kegunaan. Air kelapa mengandung gula, protein, asam amino, vitamin dan mineral yang cocok digunakan sebagai bahan dasar fermentasi (Saraswati, 2014). Air kelapa memiliki nutrisi yang kompleks, sehingga dapat digunakan sebagai penyedia makronutrien bagi *Leuconostoc mesenteroides* (Kusmiati, 2006). Air kelapa dapat memberikan dampak positif bagi tubuh. Air kelapa dianalisis oleh Chang dan Wu (2011) dan untuk pertama kalinya dilaporkan adanya (+)-katekin dan (-)-epikatekin. Menurut Nurulain (2006) dalam Prado, dkk., (2015) katekin memiliki aktivitas antioksidan, antimikroba dan antikanker. Tersedianya air kelapa di Indonesiadalam jumlah besar, yakni berdasarkan laporan Statistik Perkebunan Indonesia 2015-2017 yang diterbitkan oleh Direktorat Jenderal Perkebunan dan Kementrian Pertanian Indonesia, jumlah rata-rata air kelapa

sebesar 600 juta liter merupakan potensi yang belum dimanfaatkan secara maksimal. Air kelapa banyak dibuang langsung ke lingkungan sebagai limbah rumah tangga, limbah pasar dan limbah industri (Widayati, dkk., 2002). Sehingga limbah ini menyebabkan permasalahan di lingkungan yakni pencemaran lingkungan. Pencemaran lingkungan yang disebabkan oleh limbah yang seharusnya dapat didaur ulang merupakan kejadian darurat. Dibutuhkan berbagai solusi untuk mengatasi kejadian tersebut. Solusi yang dihasilkan merupakan kebijakan dari hasil berpikir. Islam mengharuskan agar berpikir itu diarahkan dalam rangka mengungkap kebenaran yang ada di balik kehidupan dan memahami fungsi alam ini agar manusia mampu menjalani hidupnya seiring dengan fitrahnya yang alami (Vahab, 2004). Air kelapa dapat dijadikan substrat pertumbuhan bakteri asam laktat penghasil eksopolisakarida, dimana eksopolisakarida ini memiliki banyak potensi dalam bidang pangan dan kesehatan, merupakan suatu bukti bahwa segala sesuatu yang Allah ciptakan baik di langit dan di bumi pasti mempunyai manfaat. Dalam firman Allah SWT surat Shaad ayat 27:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَاطِلًا ۚ ذَٰلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا ۖ فَوَيْلٌ لِلَّذِينَ كَفَرُوا مِنَ النَّارِ

Artinya : “dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya tanpa hikmah. Yang demikian itu adalah anggapan orang-orang kafir, maka celakalah orang-orang kafir itu karena mereka akan masuk neraka” (QS. Shaad: 27).

Tafsir ayat tersebut dalam tafsir al Qurthubi (2009) adalah Allah tidak bermain-main dalam menciptakan alam semesta. Tidak ada kesia-siaan dan tanpa

arah tujuan yang benar. Seandainya penciptaan alam ini tanpa tujuan yang haq maka apa yang dilakukan Allah SWT. Yang menyangkut kehidupan dan kematian makhluk, serta penciptaan serta pemusnahannya dilakukan-Nya tanpa tujuan. Tetapi karena memang bertujuan untuk permainan, maka pastilah Allah yang Maha kuasa itu tidak dapat membedakan antara yang berbuat baik dan buruk, lalu memberi ganjaran sesuai amal perbuatan masing-masing.

Kata *baathilaa* mengandung arti sia-sia atau tanpa hikmah jika kita pahami, makna sia-sia atau tanpa hikmah yaitu tidak terdapat manfaat yang diambil, dan hanyalah sebuah sifat yang tidak menguntungkan. Namun ciptaan Allah tidak demikian, Allah SWT menciptakan segala sesuatu di dunia, baik itu makhluk hidup maupun benda mati selalu disertai manfaat yang melekat. Ada kalanya manfaat itu tidak dapat dirasakan secara langsung, namun harus melalui pengolahan akal fikiran manusia dengan memperluas wawasan keilmuan baik secara teoritis maupun eksperimental.

Shivakumar dan Vijayendra, (2006) menggunakan air kelapa sebagai media fermentasi untuk produksi eksopolisakarida oleh bakteri *Agrobacterium* sp.CFR-24. Parameter yang digunakan dalam penelitiannya antara lain adalah pH, waktu inkubasi, dan kinetika produksi EPS. Hasil penelitian menunjukkan pH dan suhu optimumnya adalah 6,0 dan 30°C, dengan EPS sebesar 11,5 g/L untuk EPS yang tidak larut air, dan 4,01 g/L untuk EPS yang larut dalam air setelah dilakukan fermentasi selama 72 dan 96 jam. Beberapa penelitian tentang produksi EPS telah dilakukan dan dapat diketahui bahwa produksi EPS dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti suhu, konsentrasi penambahan sukrosa, konsentrasi substrat, konsentrasi inokulum, lama fermentasi, dan lain-lain. Seesuriyachan,

(2011), melakukan kajian pada air kelapa yang digunakan sebagai sumber alternatif karbon untuk produksi eksopolisakarida oleh *Lactobacillus confusus* TISTR. Hasil penelitian menunjukkan didapat EPS tertinggi sebesar 12,3 g/L dengan memodifikasi media menggunakan penambahan 20 g/L kristal sukrosa. Lama fermentasi juga merupakan parameter lingkungan yang berpengaruh terhadap massa molekul, isi dan komposisi gula pada EPS yang dihasilkan (Lin, 2005). Hasil kajian Zhang, dkk., (2013) menunjukkan produksi EPS oleh *Lactobacillus plantarum* C88 menunjukkan produksi tertinggi pada lama fermentasi 32 jam (ketika baru memasuki fase stasioner) dan suhu 37°C adalah sebanyak 69 mg/L. Haroun, dkk., (2013) melakukan kajian produksi EPS oleh *Lactobacillus plantarum* NRLL-B4496 dengan lama fermentasi 24 jam, hasil penelitian menunjukkan berat eksopolisakarida yang diperoleh sebesar 323 mg/L.

Dari banyak penelitian yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa air kelapa adalah salah satu bahan kaya nutrisi yang cocok untuk digunakan sebagai media fermentasi bakteri penghasil eksopolisakarida. Pembaharuan dalam penelitian ini adalah produksi eksopolisakarida oleh *Leuconostoc mesenteroides* dari air kelapa menggunakan variasi penambahan sukrosa, dan lama fermentasi.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh konsentrasi penambahan sukrosa dan lama fermentasi terhadap produksi eksopolisakarida (EPS) oleh *Leuconostoc mesenteroides*?
2. Bagaimana profil gugus fungsi eksopolisakarida (EPS) terpilih yang dihasilkan oleh *Leuconostoc mesenteroides* dengan identifikasi menggunakan FTIR?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi sukrosa dan lama fermentasi terhadap produksi eksopolisakarida (EPS) dari *Leuconostoc mesenteroides*.
2. Untuk mengetahui profil gugus fungsi eksopolisakarida (EPS) yang dihasilkan dari *Leuconostoc mesenteroides* dengan identifikasi menggunakan FTIR.

1.4 Batasan Masalah

1. Bakteri yang digunakan untuk produksi eksopolisakarida adalah *Leuconostoc mesenteroides* dari hasil isolasi nira siwalan koleksi UIN Malang.
2. Variasi konsentrasi penambahan sukrosa yang digunakan adalah 1, 2, dan 3%
3. Variasi lama fermentasi yang digunakan adalah 24, 32, dan 48 jam.
4. Identifikasi profil gugus fungsi eksopolisakarida menggunakan instrumentasi FTIR.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan pengetahuan bagi masyarakat luas maupun sivitas akademika mengenai produksi eksopolisakarida yang penting untuk kesehatan dan konsumsi pangan dalam kehidupan sehari-hari.
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan bagi masyarakat mengenai struktur eksopolisakarida yang dihasilkan oleh *Leuconostoc mesenteroides* dengan menggunakan instrumen FTIR.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Air Kelapa

Air kelapa adalah salah satu bagian dari pohon kelapa yang merupakan buah tropis yang cukup berlimpah di Indonesia. Air kelapa mempunyai potensi yang baik untuk dijadikan minuman fermentasi karena kandungan gizinya (Yanuar, 2015). Air kelapa kaya akan nutrisi seperti gula, protein, dan lemak sehingga sangat baik untuk pertumbuhan bakteri penghasil produk pangan. Air kelapa merupakan 25% dari komponen buah kelapa (Utami, 2008).

Produksi air kelapa di Indonesia tergolong berlimpah yakni mencapai 4,5 milyar liter per tahun (Barlina, 2007). Akan tetapi pemanfaatannya dalam berbagai bidang industri belum menonjol, sehingga masih banyak air kelapa yang terbuang sia-sia. Buangan air kelapa ini dapat menimbulkan berbagai permasalahan, salah satunya adalah polusi asam asetat, akibat dari proses fermentasi dari limbah air kelapa tersebut (Onifnade, 2003). Air kelapa dapat dengan mudah ditemukan, dan saat ini umumnya dibuang begitu saja bersama limbah rumah tangga yang lain. Air kelapa berpotensi untuk dijadikan bahan fermentasi karena nutrisinya yang kompleks. Di dalam air kelapa, terkandung sejumlah zat gizi, yaitu protein 0,2%, lemak 0,15%, karbohidrat 7,27%, gula, vitamin, elektrolit, dan hormon pertumbuhan. Kandungan gula maksimum 3 gram setiap 100 mL air kelapa. Jenis gula yang terkandung di dalamnya seperti sukrosa, glukosa, fruktosa, dan sorbitol (Warisno, 2004). Selain itu di dalam air kelapa juga terdapat mineral seperti kalium dan natrium yang diperlukan dalam proses metabolisme dan juga dalam pembentukan kofaktor enzim-enzim

ekstraseluler oleh bakteri pembentuk selulosa. Berikut digambarkan pada Tabel 2.1 adalah komposisi air buah kelapa.

Tabel 2.1 Komposisi air buah kelapa (Yong, dkk., 2009)

Konten (g/100g)	Jenis Kelapa				
	Hijau Muda	Hijau Tua	Kopra Tua (autoklaf)	Kopra Muda	Kopra Tua
Berat rata-rata kelapa				565	393
Umur kelapa				6 bulan	12 bulan
Air				94,18	94,45
Kering				5,82	5,55
Protein				0,12	0,52
Total Lemak				0,07	0,15
Abu				0,87	0,47
Karbohidrat, berdasarkan perbedaan				4,76	4,41
Serat, total diet				ND*	ND*
Gula		(mg/mL)		(g/100g)	
Total	9,16	21,68	15,20	5,23	3,42
Sukrosa	0,93	9,18	10,70	0,06	0,51
Glukosa	3,93	7,25	2,02	2,61	1,48
Fruktosa	4,30	5,25	2,48	2,55	1,43
Gula alkohol		(mg/L)			
Manitol		0,80			
Sorbitol		1,00			
Mio-inositol		0,01			
Siklo-inositol		0,05			

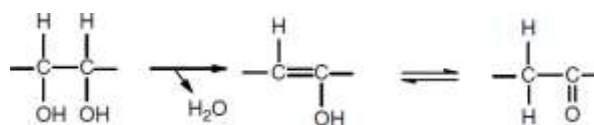
Walaupun air kelapa mengandung zat-zat gizi yang kompleks, akan tetapi pemanfaatannya belum banyak diketahui oleh masyarakat. Air kelapa telah terbukti mampu menunjang pertumbuhan berbagai tanaman, dalam penelitian Mayura, dkk., (2016) menunjukkan bahwa pemberian zat pengatur tumbuh air kelapa konsentrasi 600 cc L⁻¹ dengan frekuensi pemberian satu kali menunjukkan pengaruh terbaik terhadap pertumbuhan vegetatif dibandingkan perlakuan kontrol.

Hasil penelitian Darlina, dkk., (2016) menunjukkan bahwa penyiraman air kelapa 200 mL/L menghasilkan jumlah daun, berat basah, dan berat kering tanaman lada tertinggi. Air kelapa yang sering digunakan untuk media fermentasi seperti pada fermentasi yang menghasilkan *nata* dalam produk nata de coco, didalamnya dibutuhkan nutrisi yang diperlukan bagi pertumbuhan dan perkembangan bakteri *Acetobacter xylinum* (Setiaji, dkk., 2002). Di dalam dunia mikrobiologi terdapat keuntungan-keuntungan yang sekaligus mempermudah proses seperti bahan baku yang tidak selamanya harus menggunakan bahan segar, tetapi dapat juga bahan sisa/limbah atau bahkan bahan buangan sekalipun. Salah satu bahan buangan yang berasal dari limbah rumah tangga yang dapat digunakan sebagai medium untuk pertumbuhan bakteri maupun jamur adalah air kelapa.

2.2 Pengukuran Kadar Gula Total Metode Sulfat-Fenol

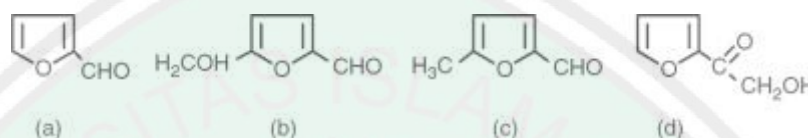
Metode kimia yang diterapkan pada penentuan gula total adalah metode sulfat-fenol dan metode anthron, merupakan metode klasik dengan sejarah yang panjang dalam penggunaannya, walaupun begitu metode sulfat-fenol lebih populer dibanding dengan metode anthron. Metode sulfat-fenol dapat dimanfaatkan untuk menentukan kadar glukosa dalam sampel (Brummer, 2005).

Gula merupakan golongan karbohidrat. Apabila karbohidrat ditambahkan asam kuat dan dipanaskan, karbohidrat tersebut akan mengalami serangkaian reaksi yang mengarah pada pembentukan derivat furan seperti furanaldehid dan hidroksimetil furaldehida. Reaksi awal yaitu reaksi dehidrasi diikuti dengan pembentukan turunan furan (Brummer, 2005). Reaksi dehidrasi karbohidrat digambarkan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Reaksi dehidrasi karbohidrat

Senyawa turunan furan yang terbentuk tergantung pada jenis karbohidrat yang ada. Turunan furan yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 (a) Pentosa, (b) Heksosa, (c) 6-dioksiheksosa, (d) Keto-heksosa

Prinsip dasar dari metode ini adalah bahwa karbohidrat ketika didehidrasi melalui reaksi dengan asam sulfat pekat, menghasilkan turunan furfural. Reaksi selanjutnya antara turunan furfural akan bereaksi dengan fenol menghasilkan warna jingga kekuningan stabil yang dapat dideteksi oleh spektrofotometer UV-Vis (Albalasmeh, dkk., 2013).

2.3 Bakteri Asam Laktat (BAL)

Bakteri asam laktat adalah kelompok bakteri yang mampu mengubah karbohidrat (glukosa) menjadi asam laktat. Efek bakterisidal dari asam laktat berkaitan dengan penurunan pH lingkungan menjadi 3 sampai 4,5 sehingga pertumbuhan bakteri lain termasuk bakteri pembusuk akan terhambat (Amin dan Leksono, 2001). Pada umumnya mikroorganisme dapat tumbuh pada kisaran pH 6-8 (Wahyudi, 2006). Bakteri Asam Laktat (BAL) yaitu kelompok bakteri gram positif, katalase negatif yang dapat memproduksi asam laktat dengan cara

memfermentasi karbohidrat, selnya berbentuk kokus, tersusun berpasangan atau berbentuk rantai, tidak bergerak, tidak berspora, anaerob fakultatif, bersifat non motil dan mesofil (Ray, 2001). Allah SWT telah berfirman dalam Al-Qur'an surat Al-Baqarah ayat 26:

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا فَأَمَّا الَّذِينَ ءَامَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ اللَّهُ بِهَذَا مَثَلًا يُضِلُّ بِهِ كَثِيرًا وَيَهْدِي بِهِ كَثِيرًا وَمَا يُضِلُّ بِهِ إِلَّا الْفَاسِقِينَ ﴿٢٦﴾

Artinya: “sesungguhnya Allah tidak segan-segan membuat perumpamaan nyamuk atau yang lebih rendah dari itu. Adapun orang-orang beriman, maka mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka, tetapi yang kafir mengatakan: “Apakah maksud Allah menjadikan ini untuk perumpamaan? Dengan perumpamaan itu banyak orang yang disesatkan Allah dan dengan perumpamaan itu pula banyak orang yang diberinya petunjuk. Dan tidak ada yang disesatkan Allah kecuali orang-orang yang fasik” (Q.S.Al-Baqarah:26).

Ibnu Katsir menafsirkan pada kata yang bermakna lebih rendah dari itu, menunjukkan bahwa Allah SWT kuasa untuk menciptakan apa saja, yaitu penciptaan apapun dengan objek apa saja, baik yang besar maupun yang kecil. Allah SWT tidak pernah menganggap remeh sesuatu pun yang Dia ciptakan meskipun hal itu kecil. Orang-orang yang beriman meyakini bahwa dalam perumpamaan penciptaan yang dilakukan Allah SWT memiliki manfaat bagi kehidupan manusia (Zaki, 2006). Sebagaimana Allah SWT menciptakan bakteri, meskipun memiliki ukuran yang sangat kecil tetapi keberadaannya memiliki manfaat yang besar bagi kehidupan makhluk hidup termasuk manusia di dalamnya.

Bakteri Asam Laktat yang menghasilkan dua molekul asam laktat dari fermentasi glukosa termasuk didalam kelompok bakteri asam laktat yang bersifat

homofermentatif, sedangkan bakteri asam laktat yang menghasilkan satu molekul asam laktat dan satu molekul etanol serta satu molekul karbondioksida dikenal dalam kelompok bakteri asam laktat yang bersifat heterofermentatif (Reddy *dkk.*, 2008). Bakteri Asam Laktat menghasilkan antibakteri berupa asam organik, bakteriosin, metabolit primer, hidrogen peroksida, diasetil, karbondioksida, asetaldehid dan menurunkan pH lingkungannya dengan mengeskresikan senyawa yang mampu menghambat bakteri patogen. Beberapa bakteri yang memproduksi bakteriosin dan mempunyai aktivitas hambat besar terhadap pertumbuhan beberapa bakteri patogen adalah *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*, dan *Propionibacterium* terdapat di dalam saluran pencernaan (Usmiati, 2012).

Ada 2 kelompok Bakteri Asam Laktat (Prescott *dkk.*, 2002) yaitu:

1. Bakteri homofermentatif yaitu glukosa difermentasi menghasilkan asam laktat sebagai satu-satunya produk. Contoh : *Streptococcus*, *Pediococcus*, dan *Lactobacillus*.
2. Bakteri heterofermentatif yaitu glukosa difermentasikan menghasilkan asam laktat juga memproduksi senyawa-senyawa lainnya seperti etanol, asam asetat dan CO₂.

Bakteri asam laktat merupakan salah satu organisme yang dapat memfermentasi bahan pangan melalui fermentasi karbohidrat dan umumnya menghasilkan sejumlah besar asam laktat. Bakteri ini memberikan kontribusi yang cukup besar terhadap perbaikan rasa, tekstur dan masa simpan produk fermentasi. Bakteri asam laktat mempunyai distribusi yang luas dan kemampuan tumbuh pada berbagai substrat organik dan kondisi seperti kondisi asam, basa, suhu rendah,

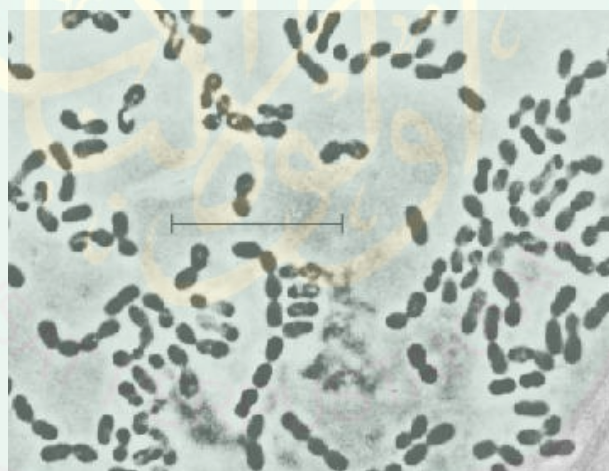
suhu tinggi, kadar garam tinggi, anaerob, sehingga menjadikan bakteri asam laktat sebagai kompetitor yang tangguh di semua sektor pengolahan pangan (Daulay, 1991). Pada berbagai jenis makanan fermentasi, keterlibatan bakteri asam laktat memberikan efek yang menguntungkan karena asam yang dihasilkan dapat mencegah pertumbuhan mikroba lain yang tidak dikehendaki selama proses fermentasi berlangsung (Rahayu,dkk., 2003).

Peran utama bakteri asam laktat dalam industri makanan adalah untuk pengasaman bahan mentah dengan memproduksi sebagian besar asam laktat (bakteri homofermentatif) (Desmazeaud, 1996). Hasil penelitian Misgiyarta dan Sri (2002) mengatakan bahwa BAL dikatakan memiliki kemampuan unggul, apabila BAL dapat menghasilkan asam laktat lebih tinggi selama proses fermentasi. Budiyanto (2005) menjelaskan bahwa prinsip utama pembuatan asam laktat dengan fermentasi adalah pemecahan laktosa menjadi bentuk monosakarida. Monosakarida dibantu oleh aktivitas enzim yang dihasilkan oleh *Lactobacillus bulgaricus* diubah menjadi asam laktat. Pemanfaatan BAL oleh manusia telah dilakukan sejak lama, yakni untu proses fermentasi makanan. Hasil penelitian Zubaidah, (2015) yaitu produksi eksopolisakarida dari kimchi diperoleh EPS tertinggi adalah 427 mg/L dengan konsentrasi kimchi yang digunakan adalah 20% dengan menggunakan *Lactobacillus plantarum* sebagai penghasil EPS.

Bakteri asam laktat terutama dafi *genus Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, dan Streptococcus* telah digunakan secara tradisional sebagai kultur starter untuk fermentasi makanan dan minuman karena kontribusinya terhadap pembentukan citarasa dan aroma serta penghambatan kerusakan (Jenie, 1996).

2.4 *Leuconostoc mesenteroides*

Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* adalah bakteri asam laktat dari famili *Leuconostocaceae*, genus *Leuconostoc*, dan merupakan bakteri gram positif. *Leuconostoc mesenteroides* berbentuk kokus atau batang, tidak membentuk spora, tidak motil, katalase negatif dan oksidasi positif, dan bila dilihat dari kebutuhan O_2 , bakteri ini bersifat anaerob aerotoleran karena dapat tumbuh baik pada lingkungan yang terdapat atau tidak O_2 . Bakteri asam laktat ini mempunyai sifat khusus yaitu mampu hidup pada kadar gula, garam dan alkohol yang tinggi, serta dapat memfermentasi monosakarida dan disakarida. Berdasarkan hasil fermentasinya *Leuconostoc mesenteroides* termasuk dalam kelompok bakteri heterofermentatif yaitu bakteri yang menghasilkan etanol dan senyawa lain seperti karbondioksida dari fermentasi glukosa (Salle, 1979).



Gambar 2.3 *Leuconostoc mesenteroides*

Leuconostoc mesenteroides dapat menghasilkan enzim ekstraselular yang disebut dextransucrase yang berfungsi mengubah glukosa dari molekul sukrosa menjadi dextran dan melepaskan fruktosa ke lingkungan. Dextran merupakan salah satu jenis eksopolisakarida yang dihasilkan oleh *Leuconostoc mesenteroides*

yang banyak dimanfaatkan dalam bidang pangan dan farmasi. Dekstran merupakan produk komersial sejak bertahun-tahun lalu (Malik, dkk., 2008). Berdasarkan *Taxonomic Outline of the Prokaryotes*, *Leuconostoc mesenteroides* diklasifikasikan sebagai berikut:

Kerajaan	: Bacteria
Divisi	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Lactobacillales
Famili	: Leuconostocaceae
Genus	: Leuconostoc
Spesies	: <i>Leuconostoc mesenteroides</i>

2.5 Eksopolisakarida (EPS)

Eksopolisakarida (EPS) adalah suatu polisakarida yang diproduksi dan disekresikan dari mikroba. EPS telah diteliti karena memiliki berbagai macam potensi, antara lain dalam bidang farmasi, pangan dan kesehatan. Dalam makanan EPS bermanfaat sebagai stabilisator, pengental, emulgator, pembentuk gel dan memiliki kemampuan mengikat air yang baik sehingga dapat mempertahankan tekstur agar tetap lembut selama penyimpanan. Beberapa EPS yang telah banyak digunakan dalam bidang kesehatan diantaranya β -glukan, β -mannan, xanthan, curdlan, gellan dan dekstran. Xanthan dan dekstran adalah dua contoh EPS yang telah menjadi produk komersial sejak bertahun-tahun yang lalu. Dalam makanan, EPS memiliki manfaat yakni sebagai stabilisator, pengental, emulgator, pembentuk gel, dan memiliki kemampuan mengikat air yang baik sehingga dapat mempertahankan tekstur agar tetap lembut selama penyimpanan (Malik, dkk., 2008).

EPS umumnya terdiri dari monosakarida dan beberapa substituen non-karbohidrat seperti asetat, piruvat, suksinat, dan fosfat (Van Hijum, dkk., 2002) juga biomolekul seperti protein, asam nukleat, lipid dan zat humat (Vu, dkk., 2009). EPS biasanya dihasilkan oleh bakteri asam laktat yang merupakan ciri kontribusi bakteri ini sebagai probiotik yang memiliki efek positif bagi kesehatan (Suresh dan Mody, 2009). Struktur EPS sangat beragam, beberapa jenis EPS antara lain :

1. Dekstran

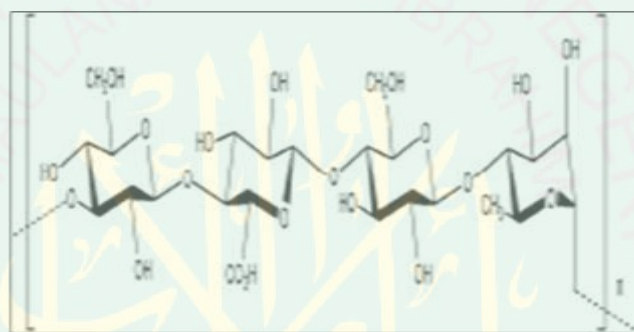


Gambar 2.4. Struktur dekstran (Lapasin, 1999)

Dekstran adalah polimer kompleks dari glukosayang mengalami percabangan dengan membentuk ikatan α -1,6 dan α -1,3 glikosidik. Dekstran yang di biosintesis oleh bakteri asam laktat memiliki berat molekul yang besar antara 10-150 kDa. Pemanfaatan bahan alam yang mengandung nutrisi kompleks seperti air kelapa dan nira sebagai media yang mengandung sukrosa yang baik bagi pertumbuhan sel bakteri *Leuconostoc mesenteroides* (Triantarti dan Hendro, 2007). Dalam bidang kesehatan dekstran memiliki fungsi yang beragam seperti

anti inflamasi, anti trombotik dan anti koagulan. Dekstran merupakan salah satu contoh EPS yang banyak dimanfaatkan. Dekstran telah banyak diteliti di bidang farmasi sebagai salah satu matriks pada sistem penghantaran obat baru berbentuk konjugat (Veronese dan Caliceti, 2006). Dekstran juga dilaporkan memiliki efek farmakologi sebagai anti *platelet*, antifibrin, dan *plasma volume expansion* pada kondisi hipovolemia, serta digunakan pada transplantasi *microvascular* dan *microsurgery* sebagai pelindung pembuluh darah (Malik, dkk., 2008).

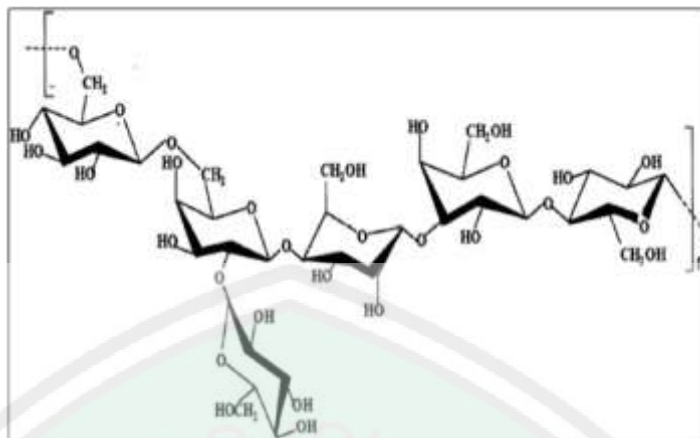
2. Gellan



Gambar 2.5 Struktur gellan (Lapasin, 1999)

Gellan adalah polimer linier yang bermuatan negatif (anionik polisakarida). Polimernya tersusun dari perulangan tetrasakarida unit yang merupakan kombinasi antara dua molekul glukosa dengan asam D-glukoronat atau L-ramnosa. Gellan biasanya digunakan untuk mensubstitusi agar, juga dapat digunakan sebagai eksipien obat sebagai bagian dari drug delivery system (Vu, dkk., 2009, Fialho, dkk., 2008).

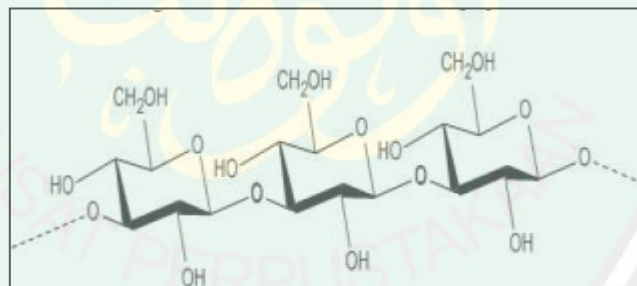
3. Kefiran



Gambar 2.6 Struktur kefiran (Micheli, dkk., 1999)

Kefiran merupakan kapsular polisakarida yang diproduksi oleh strain *Lactobacillus* pada pembuatan susu fermentasi kefir. Struktur polimer kefiran dibentuk dari monomer D-glukosa atau heteropolisakarida D-galaktosa yang mengalami percabangan pada dua unit rantai serta delapan unit rantai. Polimer ini menunjukkan aktivitas anti bakteri, anti jamur dan anti kanker (Vu, dkk., 2009).

4. Curdlan

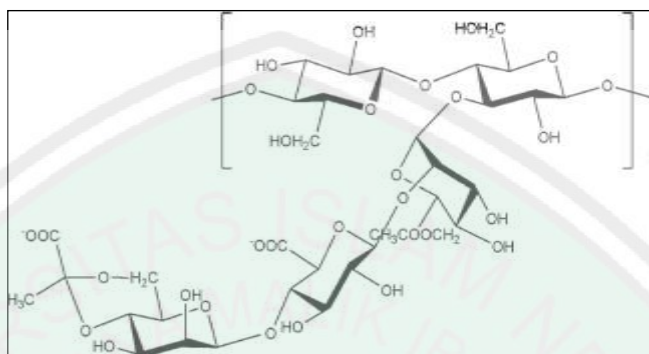


Gambar 2.7 Struktur curdlan (Jin, dkk., 2006)

Curdlan merupakan polimer linier yang terbentuk dari ikatan β -1,3 glikosidik dari D-glukosa. Polimer ini bersifat sangat larut dalam air. Curdlan dapat dihasilkan dari bakteri strain *Alcaligenes faecalis* dan juga *Agrobacterium*. Keunikan curdlan adalah sifat gelnya yang elastis ketika dipanaskan pada suhu diatas 55°C , sehingga sering digunakan untuk memperbaiki tekstur makanan dan

dalam bidang farmasi dijadikan sebagai polimer yang berfungsi sebagai eksipien *drug delivery* (Rehm, 2009; Gumadi, dkk., 2005).

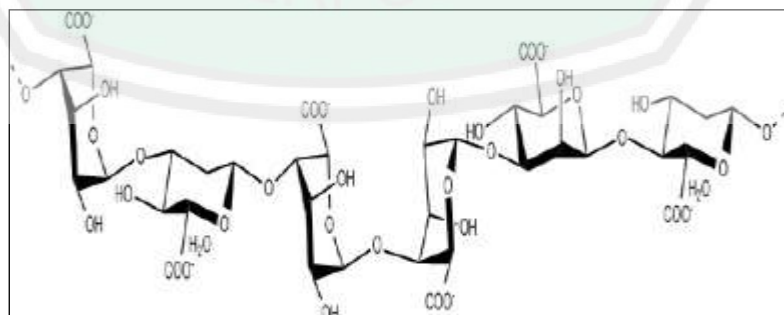
5. Xanthan



Gambar 2.8 Struktur xanthan (Sutherland, 2001)

Xanthan merupakan heteropolimere anionik yang disusun oleh glukosa dengan rantai samping trisakarida dari α -D-manosa yang memiliki gugus asetil. Xanthan diproduksi oleh strain *Xanthomonas* dengan berat molekul yang sangat besar (Rehm, 2009). Sifat yang ditunjukkan xanthan adalah pseudoplastik dan pengemulsi yang stabil, sehingga kegunaannya sangat luas di bidang industri makanan, kosmetik, ataupun farmasi (Sutherland, 1998).

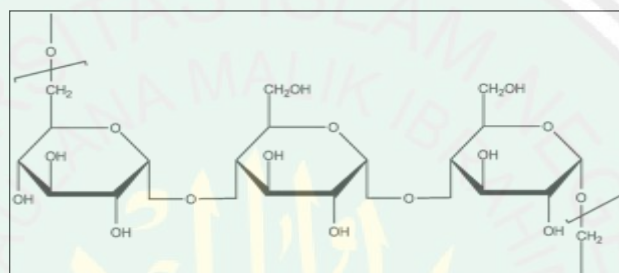
6. Alginat



Gambar 2.9 Struktur alginat (Ertesvag, 1998)

Alginat adalah homopolimer linier dari kopolimer D-manuronat yang membentuk ikatan β -1,4-glikosidik dan epimer α -L-glukoronat. Alginat banyak ditemukan pada tumbuh-tumbuhan terutama rumput laut. Dalam bidang farmasi alginat digunakan untuk eksipien (*gavicsen*, *bisodol*, dan *asilone*) dan dapat membentuk gel yang stabil. Sediaan bahan obat yang beredar di pasaran adalah kalsium alginat (Raymond, 2009).

7. Pullulan



Gambar 2.10 Struktur pullulan (Vu, dkk., 2009)

Pullulan merupakan polimer yang tersusun atas unit maltotriosa. Ikatan yang terdapat pada unit maltotriosa adalah α -1,4-glikosidik, sedangkan unit-unit maltotriosa dihubungkan dengan ikatan α -1,6-glikosidik. Penggunaan pullulan yang paling dikenal adalah pada produk-produk yang berhubungan dengan penyegar dan pembersih mulut (Raymond, 2009).

2.6 Fermentasi Eksopolisakarida

Fermentasi adalah perombakan anaerob karbohidrat yang menghasilkan pembentukan produk fermentasi yang stabil. Contoh produk fermentasi oleh mikroorganisme yang dapat dimanfaatkan meliputi barang-barang seperti etil alkohol, asam laktat, gliserol dan lain-lain (Volk dan Wheeler, 1993). Menurut Afriani (2010), fermentasi adalah suatu aktivitas mikroorganisme baik aerob

maupun anaerob untuk mendapatkan energi diikuti terjadinya perubahan kimiawi substrat organik

Al-Qur'an telah mengisyaratkan istilah fermentasi pada buah-buahan sebagaimana tertulis pada surah An-Nahl ayat 67:

وَمِنْ ثَمَرَاتِ النَّخِيلِ وَالْأَعْنَابِ تَتَّخِذُونَ مِنْهُ سَكَرًا وَرِزْقًا حَسَنًا إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ ﴿٦٧﴾

Artinya: “Dan dari buah korma dan anggur, kamu buat minuman yang memabukkan dan rezeki yang baik. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Allah) bagi orang-orang yang memikirkan” (QS.An-Nahl)

Menurut tafsir al Qurtubi (2009) yang dimaksud *sakaron* dalam ayat ini adalah minuman baik dari kurma maupun anggur yang direndam dengan air, jika telah lama akan mengalami fermentasi sehingga menjadi memabukkan (*sakaron*). Sedangkan menurut Ibnu Abbas yang berkata “ayat ini turun sebelum pengharaman *khamr* dan yang dimaksud dengan sesuatu yang memabukkan adalah *khamr*”.

Proses fermentasi dapat menggunakan perlakuan penambahan inokulum dan ada yang secara alami. Fermentasi homofermentatif akan menghasilkan produk utama berupa asam laktat, sedangkan fermentasi heterofermentatif akan menghasilkan asam laktat dan produk samping yang dapat berupa asam asetat, etanol dan CO₂. Keduanya memiliki kesamaan dalam mekanisme pembentukan asam laktat, yaitu piruvat akan diubah menjadi asam laktat dan diikuti dengan proses transfer elektron dari NADH menjadi NAD⁺. Berikut adalah hal-hal yang dapat mempengaruhi produksi EPS antara lain:

1. Media

Media yang digunakan untuk mengoptimalkan produksi EPS sangat beragam, karena rantai utama dari polimer ini adalah glukosa. Hasil penelitian Lule, dkk., (2014) dengan menggunakan substrat *paneer whey* (0,047 g/L) untuk memproduksi EPS oleh *Leuconostoc mesenteroides* dan menghasilkan EPS sebesar 12,7 g/L. Hasil penelitian Xu, dkk., (2010) menunjukkan dengan menggunakan substrat glukosa sebesar 30 g/L untuk menghasilkan EPS menggunakan isolat *Lactobacillus delbrueckii* B-3.

Bakteri biasanya memperoleh energi dari oksidasi kimia. Kebanyakan bakteri memperoleh nutrisi yang diperlukan selnya untuk mensintesis protoplasma dari berbagai sumber nutrisi, seperti sumber karbon (misalnya karbohidrat), sumber nitrogen (protein atau amoniak), ion-ion anorganik tertentu, metabolit penting (vitamin, mungkin juga asam amino) dan air (Volk dan Wheeler, 1988).

2. Konsentrasi Substrat

Kecepatan reaksi enzimatik pada umumnya tergantung pada konsentrasi substrat. Kecepatan reaksi akan meningkat apabila konsentrasi substrat meningkat. Peningkatan kecepatan reaksi ini akan semakin kecil hingga tercapai suatu titik batas yang pada akhirnya penambahan konsentrasi substrat hanya akan sedikit meningkatkan kecepatan reaksi (Lehninger, 1997). Hal ini disebabkan semua molekul enzim telah membentuk ikatan kompleks dengan substrat yang selanjutnya kenaikan konsentrasi substrat tidak berpengaruh terhadap kecepatan reaksinya (Trenggono dan Sutardi, 1990).

3. Penambahan Sukrosa

Sukrosa merupakan salah satu jenis gula yang dapat dimetabolisme oleh bakteri menjadi asam laktat selama proses fermentasi berlangsung (Anindita, 2002). Sukrosa berpotensi menjadi sumber nutrisi bagi bakteri asam laktat. Semakin banyak sukrosa yang tersedia maka semakin banyak pula substrat yang dapat dirombak oleh bakteri asam laktat menjadi asam piruvat yang selanjutnya dapat diubah menjadi asam-asam organik lainnya. Sebagai sumber karbon, semakin tinggi konsentrasi sukrosa maka konsentrasi eksopolisakarida yang dihasilkan juga semakin tinggi.

4. Lama Fermentasi

Waktu fermentasi sangat mempengaruhi hasil dari produk eksopolisakarida. Hasil penelitian Fitria, (2017) bahwa dengan variasi lama fermentasi 18 jam dan 24 jam, diperoleh hasil EPS tertinggi sebesar 740 mg/L yakni pada lama fermentasi 18 jam. Hasil penelitian Haroun, dkk., (2013) bahwa dengan menggunakan variasi lama fermentasi, 12, 18, 24, 36 dan 48 jam untuk mengetahui pengaruh lama fermentasi terhadap pertumbuhan produksi EPS oleh *Lactobacillus plantarum* NRLL B-4496 dihasilkan EPS sebesar 650 mg/L pada lama fermentasi 24 jam.

5. Konsentrasi Inokulum

Inokulum adalah biakan bakteri yang dimasukkan ke dalam media cair yang siap digunakan untuk fermentasi (Pelczar, dkk., 2007). Kadar inokulum pada fermentasi menunjukkan pengaruh terhadap produk fermentasi, hasil biosintesis EPS dengan variasi inokulum 1,0, 2,5, 5,0, 10, 15, dan 20 mL/L yakni jumlah EPS

tertinggi yaitu sebesar 650 mg/L pada konsentrasi inokulum 10 mL/L (Haroun, dkk., 2013).

6. Suhu

Salah satu faktor penting dalam pertumbuhan mikroba adalah suhu. Suhu fermentasi yang terlalu tinggi akan berpengaruh terhadap mikroba dan enzim yang dihasilkan oleh mikroba itu sendiri. Suhu yang terlalu tinggi akan mengakibatkan denaturasi enzim. Umumnya enzim berkerja sangat lambat pada suhu di bawah titik beku dan kereaktifannya akan meningkat sampai suhu 45°C. Hasil penelitian Haroun, dkk., (2013) bahwa produksi EPS oleh *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 menggunakan variasi suhu 20, 25, 30, 35, dan 40°C dihasilkan EPS maksimum sebesar 650 mg/L pada suhu 30°C.

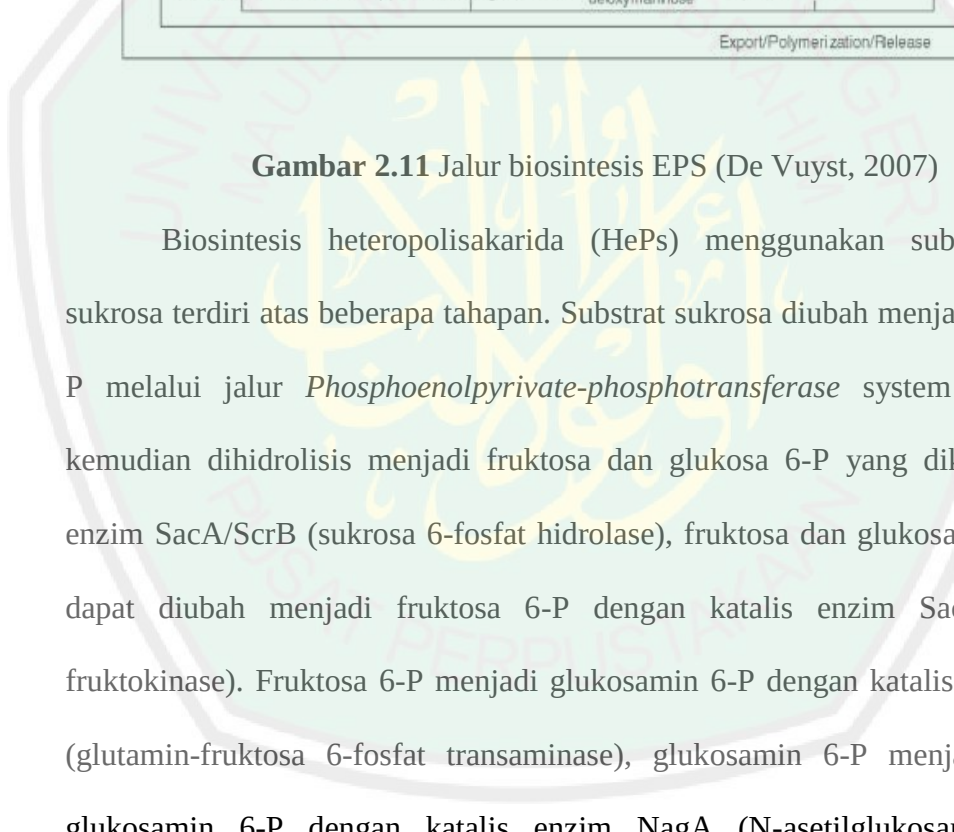
7. pH

pH merupakan salah satu parameter yang penting dan kritis lingkungan yang mempengaruhi total bakteri asam laktat dalam medium fermentasi, total asam laktat dan total eksopolisakarida kasar yang dihasilkan (Zubaidah, dkk., 2008). Hasil penelitian Kimmell, dkk., (1998) bahwa produksi EPS optimum dari isolat *Leuconostoc mesenteroides* adalah pada pH 5,0 dengan hasil EPS kasar sebesar 30 g/L setelah diprediksi sebelumnya sebesar 295 mg/L. Hasil penelitian Zisu dan Shah, (2003) produksi EPS oleh *Streptococcus thermophilus* 1275 pada variasi pH 4,5, 5,5, dan 6,5 menghasilkan EPS tertinggi yakni 458 mg/L pada pH 5,5. Sementara hasil penelitian Zubaidah, dkk., (2008) bahwa produksi EPS oleh *Lactobacillus plantarum* B2 pada produk probiotik berbasis buah murbei menghasilkan jumlah EPS kasar tertinggi yakni 1955,78 mg/L pada pH 4,33.

2.7 Biosintesis Eksopolisakarida

EPS disintesis dalam fase-fase pertumbuhan yang berbeda dengan kondisi yang bervariasi tergantung dari jenis mikroorganismenya. Proses sintesis dapat dibagi menjadi dua prinsip dasar yaitu tempat sintesis dan prekursor alami misalnya sintesis di luar dinding sel atau pada membran sel. Sintesis heteropolisakarida berbeda dengan sintesis monosakarida yang disintesis pada membran sitoplasma dengan memanfaatkan prekursor yang terbentuk intraseluler. Gula nukleotida berperan penting dalam sintesa heteropolisakarida sehingga peranannya dalam iterkonversi monosakarida atau disakarida (gula) sebaik aktivasi gula yang dibutuhkan untuk polimerisasi monosakaria menjadi polisakarida (Cerning, 1990).

EPS disintesis oleh bakteri gram-positif atau gram-negatif melalui dua mekanisme yang berbeda. Bakteri gram-positif (seperti levan, alternan dan dextran) mensintesis dengan proses ekstraseluler (Vanhooren, dkk., 1998), sedangkan bakteri gram-negatif mensintesis EPS secara intraseluler (seperti xanthan, gellan, selulosa, suksinoglukan) (Sutherland, 2001).



Gambar 2.11 Jalur biosintesis EPS (De Vuyst, 2007)

Biosintesis heteropolisakarida (HePs) menggunakan substrat berupa sukrosa terdiri atas beberapa tahapan. Substrat sukrosa diubah menjadi sukrosa 6-P melalui jalur *Phosphoenolpyruvate-phosphotransferase* system (PEP-PTS), kemudian dihidrolisis menjadi fruktosa dan glukosa 6-P yang dikatalisis oleh enzim SacA/ScrB (sukrosa 6-fosfat hidrolase), fruktosa dan glukosa 6-P tersebut dapat diubah menjadi fruktosa 6-P dengan katalis enzim SacK/ScrK (6-fruktokinase). Fruktosa 6-P menjadi glukosamin 6-P dengan katalis enzim Glms (glutamin-fruktosa 6-fosfat transaminase), glukosamin 6-P menjadi N-asetilglukosamin 6-P dengan katalis enzim NagA (N-asetilglukosamin 6-fosfat deasetilase), N-asetilglukosamin 6-P menjadi N-asetilglukosamin 1-P dengan katalis enzim NagM (N-asetilglukosamin fosfomutase), N-asetilglukosamin 1-P menjadi UDP-N-asetilglukosamin dengan katalis enzim GimU (UDP-N-asetilglukosamin pirofosforilase), UDP-N-asetilglukosamin melakukan

pengulangan unit baik rantai maupun cabang dengan bantuan Glikosiltransferase. Setelah terjadi penggabungan, selanjutnya polisakarida yang terbentuk dikeluarkan dari sel dan terlarut di media fermentasi.

Biosintesis HePs melalui perubahan fruktosa 6-P menjadi mannososa 6-P dengan katalis enzim MannA (mannosa 6-fosfat isomerase), kemudian mannososa 6-P menjadi mannososa 1-P dikatalisis oleh enzim MannB (fosfomannomutase), mannososa 1-P menjadi GDP-mannosa dikatalisis oleh enzim Gtp (mannosa 1-fosfat guaniltransferase), GDP-mannosa menjadi GDP-4-dehidro-6-deoksimannosa dikatalisis oleh enzim Gmd (GDP-mannosa-4,6-dehidratase), GDP-4-dehidro-6-deoksimannosa menjadi GDP fukosa dikatalisis oleh enzim GDP-fukosa sintase, kemudian nukleotida gula berupa GTF (glikosiltransferase) berperan untuk menggabungkan monosakarida-monosakarida yang melakukan pengulangan unit hingga membentuk HePs.

Biosintesis intraseluler diatur oleh enzim yang terletak pada berbagai bagian sel. Pada sitoplasma, glukosa-1-fosfat dikonversi ke molekul utama pada sintesis eksopolisakarida, uridin difosfat glukosa (UDP-glukosa). Setelah itu, pada membran periplasmik sel, glikosiltransferase mentransfer gula nukleosida difosfat (NDP) untuk membentuk pengulangan unit melekat pada sebuah lipid pembawa glikosil. Kemudian makromolekul dipolimerisasi dan disekresikan dalam bentuk eksopolisakarida (Kumar, dkk., 2007).

2.8 *Fourier Transform Infrared (FTIR)*

Instrumen ini digunakan untuk mengukur serapan infra merah pada berbagai panjang gelombang. Pancaran infra merah umumnya mengacu pada bagian spektrum elektromagnet yang terletak di antara daerah tampak dan daerah gelombang mikro. Serapan radiasi infra merah oleh suatu molekul terjadi karena interaksi vibrasi ikatan kimia yang menyebabkan perubahan polarisabilitas dengan medan listrik gelombang elektromagnetik. Pancaran infra merah yang kerapatannya kurang dari 100 cm^{-1} (panjang gelombang lebih dari $100\text{ }\mu\text{m}$) diserap oleh sebuah molekul organik diubah menjadi energi putaran molekul. Penyerapan itu tercatu dan demikian spektrum rotasi molekul terdiri dari garis-garis yang tersendiri (Pine, 1980).

Identifikasi pita absorpsi khas yang disebabkan oleh berbagai gugus fungsi merupakan dasar penafsiran spektrum infra merah. Hadirnya sebuah puncak serapan dalam daerah gugus fungsi di sebuah spektrum infra merah merupakan petunjuk pasti bahwa beberapa gugus fungsi tertentu terdapat dalam senyawa cuplikan. (Shingle, 2002).



Gambar 2.12 Spektra FTIR Eksopolisakarida dari *Leuconostoc mesenteroides*
TISTR 053

Nuwan, dkk., (2016) melaporkan bahwa identifikasi eksopolisakarida dari *L.mesenteroides* TISTR 053 ditampilkan bahwa EPS jenis dekstran memiliki serapan pada bilangan gelombang 1018 cm^{-1} dan 1637 cm^{-1} yang menunjukkan adanya kandungan gugus fungsi, unit monomer, dan ikatan α -(1-6) glikosidik yang merupakan ciri khas dari eksopolisakarida dekstran.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus-Januari 2019 di Laboratorium Bioteknologi, Laboratorium Biokimia, Laboratorium Instrumentasi UV-Vis, Laboratorium Instrumentasi FTIR Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya gelas ukur 100 mL, *beaker glass* 500 mL, erlenmeyer 250 mL, gelas arloji, pipet ukur 5 mL dan 10 mL, pipet tetes, labu ukur 10 mL, 25 mL, dan 100 mL, bola hisap, botol semprot, spatula, batang pengaduk, korek api, kawat ose, pembakar spiritus, corong gelas, cawan petri, penangas air, mikro pipet, *blue tip*, *hot plate*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung sentrifuge, *magnetic stirrer*, *autoclave*, *shaker*, *laminar air flow*, *vortex*, *freeze dry*, lemari asap, lemari pendingin, spektrofotometer UV-Vis, dan spektrofotometer FTIR.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya air kelapa yang diperoleh dari limbah penjual kelapa di Pasar Blimbing Kota Malang, *de Mann Rogose Sharpe Agar* (MRSA), *de Mann Rogose Sharpe Broth* (MRSB), etanol PA 96%, alkohol 70% sebagai desinfektan, fenol 5%, H₂SO₄ 98%, HCl, NaOH 0,5 N, NaCl, KBr, aquades, kapas, kertas label, kertas saring halus,

aluminium foil, plastik wrap, plastik, karet, dan starter *Leuconostoc mesenteroides*.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini terdiri dari dua tahap. Pertama adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) faktorial dengan dua variasi yakni variasi konsentrasi sukrosa dari (K1=1%, K2=2%, dan K3=3%). Variasi kedua adalah lama fermentasi yaitu (L1=24 jam, L2=32 jam, L3=48 jam). Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Kombinasi perlakuan konsentrasi sukrosa dan lama fermentasi secara RAK dapat digambarkan pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Kombinasi perlakuan antara konsentrasi sukrosa (b/v) dan lama fermentasi.

Konsentrasi Sukrosa (b/v) %	Lama Fermentasi (jam)		
	L ₁ =24	L ₂ =32	L ₃ =48
K ₁ = 1	K ₁ L ₁	K ₁ L ₂	K ₁ L ₃
K ₂ = 2	K ₂ L ₁	K ₂ L ₂	K ₂ L ₃
K ₃ = 3	K ₃ L ₁	K ₃ L ₂	K ₃ L ₃

Tahap kedua penelitian ini adalah konfirmasi gugus fungsi yang ada pada EPS guna mengetahui komposisi senyawa gula dan struktur dari EPS yang dihasilkan dengan analisis menggunakan instrumentasi FTIR.

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Sterilisasi alat
2. Preparasi air kelapa
3. Pembuatan media

3.1 MRSA

3.2 MRSB

4. Regenerasi *Leuconostoc mesenteroides*

5. Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri

6. Pembuatan inokulum

7. Produksi eksopolisakarida (EPS)

7.1 Pengaruh penambahan sukrosa dan lama fermentasi terhadap produksi EPS dari air kelapa

8. Pengukuran *Total Plate Count* (TPC)

9. Ekstraksi eksopolisakarida dari media fermentasi air kelapa

10. Penentuan *yield* eksopolisakarida

11. Uji Kadar Total Gula dengan Metode Fenol H_2SO_4

11.1 Pembuatan Kurva Standar dengan Metode Fenol H_2SO_4

11.2 Menghitung Total Gula Sampel dengan Metode Fenol H_2SO_4

12. Identifikasi gugus fungsi pada eksopolisakarida dengan FTIR

13. Analisis data

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat

Alat gelas yang akan digunakan dalam penelitian seperti diantaranya gelas ukur 100 mL, *beaker glass* 500 mL, erlenmeyer 250 mL, cawan petri dan tabung reaksi dicuci bersih dan dikeringkan. Kemudian dibungkus dengan kertas dan dimasukkan ke dalam plastik tahan panas. Setelah itu dilakukan sterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 30 menit.

3.5.2 Preparasi Air Kelapa

Air kelapa disaring hingga terpisah dengan residu yang ada. Diukur pH hingga 6,5. Apabila pH air kelapa lebih dari 6,5 maka ditambahkan beberapa tetes asam klorida (HCl) dan jika pH kurang dari 6,5 maka ditambahkan beberapa tetes natrium hidroksida (NaOH) 0,1 N. Kemudian air kelapa disterilisasi menggunakan *autoclave* dan disimpan di *freezer* dalam wadah tertutup.

3.5.3 Pembuatan Media

3.5.3.1 Pembuatan Media MRSA (*de Man Rogosa and Sharpe Agar*) (Fardiaz, 1992)

Media MRSA dibuat dengan ditimbang sebanyak 6,82 gram MRSA, dilarutkan ke dalam 100 mL aquades, dan dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut. Kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL kemudian disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi. Larutan tersebut didinginkan dalam tabung reaksi pada keadaan miring hingga memadat. Media MRSA ini digunakan untuk regenerasi bakteri *Leuconostoc mesenteroides*.

3.5.3.2 Pembuatan Media MRSB (*de Man Rogosa and Sharpe Broth*) (Fardiaz, 1992)

Media MRSB ini dibuat dengan menimbang 5,515 gram MRSB kemudian dilarutkan dengan 100 mL aquades hingga homogen dan dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk hingga larut. Kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL dan disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 30 menit. Media MRSB ini digunakan untuk pembuatan inokulum.

3.5.4 Regenerasi *Leuconostoc mesenteroides* (Kultsum, 2009)

Leuconostoc mesenteroides yang sudah menjadi biakan diambil sebanyak 2 (dua) ose dan diinokulasikan ke media MRSA miring. Diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. *Leuconostoc mesenteroides* yang telah mengalami regenerasi digunakan untuk pembuatan inokulum stok.

3.5.5 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri (Setianingsih, 2010)

Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri ini bertujuan untuk mengetahui fase-fase pertumbuhan dari fase logaritmik hingga awal fase stasioner sebagai dasar penentu lama waktu inkubasi kultur *Leuconostoc mesenteroides*. Pertama diinokulasikan inokulum *Leuconostoc mesenteroides* sebanyak 2% kedalam erlenmeyer yang berisi media air kelapa steril sebanyak 300 mL, dengan ditambah 0,75 gr *yeast extract* dan 2 gr sukrosa secara aseptis. Diamati pertumbuhan bakteri dengan cara menuang 25 mL suspensi bakteri dan dilakukan pengukuran Optical Density (OD) berdasarkan nilai absorbansi setiap 4 jam pengukuran dilakukan sampai 48 jam. Pengukuran dilakukan menggunakan Spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 600 nm. Nilai absorbansi A dikalikan dengan faktor pengenceran *FP*.

$$OD = A \times FP \dots \dots \dots (3.1)$$

3.5.6 Pembuatan Inokulum (Kultsum, 2009 dan Aslim, dkk., 2005)

Pembuatan inokulum ini dilakukan dengan memindahkan 2 (dua) ose biakan *Leuconostoc mesenteroides* ke dalam 100 mL media MRSB, kemudian di *shaker* pada kecepatan 100 rpm selama 18 jam pada suhu 30°C dengan nilai OD (*Optical Density*) 0,5.

3.5.7 Produksi Eksopolisakarida

3.5.7.1 Pengaruh Penambahan Sukrosa dan Lama Fermentasi terhadap Produksi Eksopolisakarida dari Air Kelapa (Trabelsi, dkk., termodifikasi, 2014 dan Seesuriyachan, dkk., 2011)

Sebanyak 100 mL air kelapa yang telah disterilkan, dan memiliki pH 6,5 ditambahkan sukrosa dengan variasi konsentrasi 1%, 2%, dan 3% (b/v). Ditambahkan masing-masing sebanyak 1, 2, dan 3. Ditambahkan *yeast extract* sebanyak 0,25 gr (b/v) disetiap botol sampel. Setelah itu ditambahkan inokulum *Leuconostoc mesenteroides* sebanyak 10% (v/v) kemudian di *shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama waktu inkubasi 24, 32 dan 48 jam pada suhu ruang.

3.5.8 Pengukuran *Total Plate Count* (TPC) (Fardiaz termodifikasi, 1989)

Pengukuran TPC dilakukan dengan metode sebar. Sebanyak 1 mL kultur pada media air kelapa, *yeast extract* dan sukrosa dengan konsentrasi 1, 2 dan 3% diinokulasikan ke dalam cairan NaCl fisiologis 0,89% dengan metode pengenceran bertingkat 10^{-10} . Kemudian penanaman ke media MRSA dimulai dari pengenceran 10^{-7} sampai pengenceran 10^{-10} dan diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam.

$$(\text{CFU/mL}) = \text{jumlah koloni} \times \text{faktor pengenceran (fp)} \dots\dots\dots (3.2)$$

3.5.9 Ekstraksi Eksopolisakarida dari Media Fermentasi Air Kelapa (Zubaidah, termodifikasi, 2015)

Sebanyak 25 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge. Kemudian di sentrifugasi dengan sentrifuge dingin 4°C pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang mengandung EPS diambil dan ditambah etanol dingin 96% (2 kali volume atau 50 mL) dan dibiarkan selama 24 jam dalam

lemari pendingin. Kemudian endapan yang di dapat dipisahkan dengan filtrat. Pelet yang didapat dikeringkan dengan menggunakan *freeze dry* selama 18 jam. Berat eksopolisakarida kering ditentukan dengan menggunakan rumus :

$$\text{Kadar EPS (g/L)} = \frac{\text{Berat eksopolisakarida kering (g)}}{\text{volume (L)}} \dots\dots\dots (3.3)$$

3.5.10 Penentuan *yield* eksopolisakarida ($Y_{p/s}$) (Pramudyanti, dkk., 2004)

Yield eksopolisakarida diperoleh dari perbandingan eksopolisakarida yang dihasilkan dengan konsumsi glukosa.

$$Y_{p/s} = \frac{\text{Produk eksopolisakarida (\%)}}{\text{Konsumsi glukosa sebagai total gula (\%)}}$$

3.5.11 Uji Kadar Total Gula dengan Metode Fenol H_2SO_4

3.5.11.1 Pembuatan Kurva Standar dengan Metode Fenol H_2SO_4 (Dubois, dkk., 1956)

Larutan glukosa standar yang mengandung 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm glukosa dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 2 mL, ditambahkan 1 mL larutan fenol 5% (b/v) dan dikocok. Kemudian 5 mL asam sulfat pekat ditambahkan dengan cepat di lemari asap. Dibiarkan selama 10 menit, dikocok lalu ditempatkan dalam penangas air selama 15 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm.

3.5.11.2 Penetapan Kadar Total Gula dengan Metode Fenol H_2SO_4 (Dubois, dkk., 1956)

Sampel EPS sebanyak 0,01 g dilarutkan ke dalam 250 mL aquades dan dihomogenkan, larutan homogen diambil sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 mL larutan fenol 5% (b/v) dan dikocok. Selanjutnya ditambahkan 5 mL asam sulfat pekat dengan cepat di lemari asap. Dibiarkan

selama 10 menit, dikocok lalu ditempatkan dalam penangas air selama 15 menit dengan suhu 100°C dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm.

3.5.12 Identifikasi Gugus Fungsi pada EPS dengan FTIR (Anton, 2015)

Sampel dibuat dengan menumbuk 250 mg KBr kemudian ditekan dalam cetakan hingga diperoleh pelet KBr. Eksopolisakarida kering ditekan dengan penekan hidrolik dengan frekuensi 4000 - 400 cm⁻¹. Data yang diperoleh melalui uji FTIR adalah data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif yang berupa informasi keberadaan gugus fungsional atau jenis ikatan tertentu pada bilangan gelombang tertentu yang diidentifikasi berdasarkan inframerah yang dihasilkan. Sedangkan data kuantitatif berupa nilai absorbansi dari gugus fungsi yang terdeteksi.

3.5.13 Analisis Data

Data yang diperoleh adalah rendemen kasar eksopolisakarida dan kadar total gula. Data ini kemudian dianalisis dengan ragam varian (*Two Way ANOVA*). Apabila terdapat adanya pengaruh, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan signifikansi 5%.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Air Kelapa

Sampel air kelapa yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Sitiarjo Kabupaten Malang. Preparasi sampel air kelapa meliputi pengukuran pH sampel yakni mengkondisikan pH hingga 6,5 dengan menambahkan beberapa tetes NaOH 0,1 N, sterilisasi menggunakan autoklaf, dan pengukuran total gula pada bahan baku air kelapa dan bahan baku fermentasi. Bahan baku fermentasi yang dimaksud adalah air kelapa steril yang telah dimodifikasi dengan menambahkan sukrosa sebanyak 1, 2 dan 3 % (b/v) dan 0,25 % (b/v) *yeast extract*. Pada prinsipnya, sterilisasi autoklaf menggunakan panas dan tekanan dari uap air. Biasanya untuk mesterilkan media menggunakan temperatur 121°C dengan tekanan 15 selama kurang lebih 15 menit. Penurunan tekanan ada autoklaf tidak dimaksudkan untuk membunuh mikroorganisme, melainkan meningkatkan suhu dalam autoklaf. Suhu yang tinggi inilah yang akan membunuh mikroorganisme (Hartono, dkk., 2016).

Tabel 4.1 Kadar total gula awal

Jenis Sampel	Rata-rata
air kelapa	2,56%
bahan baku fermentasi 1%	3,95%
bahan baku fermentasi 2%	4,39%
bahan baku fermentasi 3%	6,01%

Berdasarkan Tabel 4.1 dapat diketahui bahwa kadar gula bahan baku air kelapa memiliki kadar gula rata-rata sebesar 2,56%. Pada bahan baku fermentasi yang telah ditambahkan dengan sukrosa dengan variasi 1%, 2%, dan 3% (b/v)

didapat kadar total gula rata-rata yang lebih tinggi yakni 3,95%, 4,39%, dan 6,01%. Analisis total gula pada sampel air kelapa perlu dilakukan, guna mengetahui total gula pada sampel yang akan digunakan untuk fermentasi eksopolisakarida. Sampel air kelapa merupakan salah satu produk samping atau bahan baku yang murah dan mudah didapat, serta kaya akan nutrisi seperti berbagai gula, asam organik, dan mineral. Didalam 1L air kelapa, terkandung 10 mg nitrogen yang dapat dibandingkan dengan 1 g nitrogen pada 10 g *yeast extract* (Unagul, P., dkk, 2007). Menurut Zubaidah, dkk., (2008) bahwa unsur nitrogen sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan bakteri yakni sebagai pembentuk dinding sel.

Hartanto (1992) mengatakan bahwa medium yang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme harus dapat memenuhi kebutuhan senyawa karbon dan energi, nutrien sebagai unsur makro seperti P, K dan Mg, unsur mikro dan faktor pertumbuhan seperti vitamin dan asam amino. Ajaban (1961) melaporkan, sumber nitrogen yang merupakan faktor pendukung pertumbuhan aktivitas bakteri asam laktat penghasil eksopolisakarida dapat berasal dari nitrogen organik maupun anorganik. Sumber nitrogen organik diantaranya adalah protein dan *yeast extract*, pepton dan tripton. Sedangkan sumber nitrogen anorganik seperti ammonium fosfat, urea, dan kalium nitrat. Bahan tambahan lain yang diperlukan oleh bakteri yakni sumber karbon. Senyawa karbon yang dibutuhkan dalam fermentasi eksopolisakarida berasal dari monosakarida dan disakarida. Umumnya senyawa sukrosa lah yang digunakan sebagai suplemen dalam fermentasi eksopolisakarida dengan latar belakang harga yang terjangkau dan mudah di dapat.

4.2 Pembuatan Media

Media merupakan campuran beberapa zat makanan untuk pertumbuhan mikroba, serta berfungsi sebagai sumber nutrisi bagi mikroba tersebut. Sutedjo, (1996) menjelaskan bahwa media adalah suatu bahan yang terdiri atas campuran nutrisi (nutrient) yang dipakai untuk menumbuhkan mikroba. Media yang digunakan untuk regenerasi kultur *Leuconostoc mesenteroides* dan membuat inokulum adalah media dari jenis *De Man Rogosa Sharpe* (MRS), yakni MRSA dan MRSB. Dwidjoseputro, (1994) mengatakan bahwa komposisi setiap liter dari *De Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA) terdiri dari 10 g pepton, 10 g *beef extract*, 5 g *yeast extract*, 2 g K_2HPO_4 , 2 g ammonium sitrat, 2 g glukosa, 20 g natrium asetat, 0,58 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,28 g $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, dan 15 g agar. *De Man Rogosa Sharpe Broth* (MRSB) memiliki komposisi yang sama dengan MRSA hanya saja tidak mengandung agar.

Media MRS merupakan media selektif yang mengandung glukosa dan mineral yang disukai oleh BAL. Medium MRSA adalah medium yang digunakan untuk memperkaya, menumbuhkan, dan mengisolasi jenis bakteri asam laktat dalam fase padat, sedangkan MRSB adalah medium yang digunakan untuk perbanyakan bakteri dalam fase cair (Khairunnisa dan Pato, 2016). Kedua media tersebut mengandung polisorbat, asetat, magnesium dan mangan yang diketahui dapat bertindak sebagai faktor penumbuh bagi bakteri asam laktat (Rustan, 2013).

4.3 Regenerasi *Leuconostoc mesenteroides* pada Media MRSA

Regenerasi atau peremajaan isolat *Leuconostoc mesenteroides* bertujuan untuk mendapatkan bakteri dengan kemampuan tumbuh yang lebih baik, dan

memperbarui nutrisi makanan yang terkandung dalam media, sehingga bakteri akan tetap hidup. Mas'ud (2013) menambahkan bahwa tujuan dilakukannya peremajaan pada bakteri adalah untuk mendapatkan biakan yang baru dan muda, sehingga dapat berkembangbiak dengan baik dan dapat digunakan sesuai dengan fungsinya. Isolat *Leuconostoc mesenteroides* diremajakan pada media de Mann Rogosa Sharpe Agar (MRSA) dengan teknik aseptik guna meminimalisir kontaminasi dengan mikroorganisme lain. Hasil dari regenerasi *Leuconostoc mesenteroides* diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam. Waktu 18 jam merupakan waktu dimana bakteri dimungkinkan telah berada pada fase logaritmik atau eksponensial, pada fase tersebut bakteri melakukan pembelahan secara konstan dan jumlah sel meningkat.

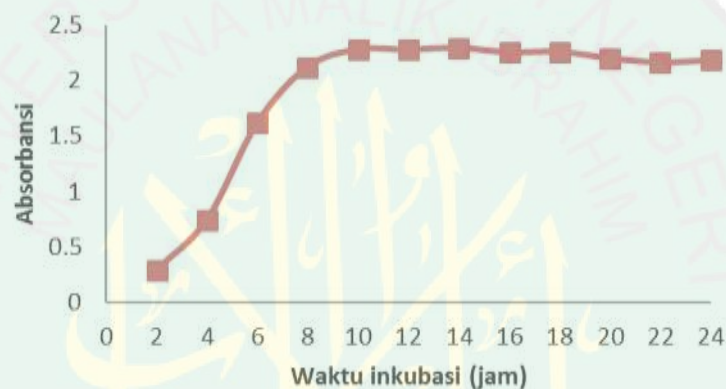
Peremajaan yang dilakukan dengan menggunakan media MRSA memiliki keunggulan untuk bakteri *Leuconostoc mesenteroides* karena nutrisi yang baik terdapat didalamnya, serta sifatnya yang memadat, sehingga koloni bakteri *Leuconostoc mesenteroides* yang diinokulasikan pada permukaan media MRSA miring menggunakan metode gores dapat dengan mudah diamati. Metode inokulasi gores ini merupakan salah satu metode inokulasi bakteri yang praktis. Machmud (2001) mengatakan bahwa teknik peremajaan biakan bakteri merupakan cara paling sederhana dan tradisional yang digunakan peneliti untuk memelihara isolat mikroba di laboratorium dan memberikan penyegaran pada nutrisi yang dibutuhkan mikroba dalam pertumbuhan. Metode pembuatan dan penyimpanan koleksi (preservasi) yang sesuai untuk menjaga agar biakan mikroba tetap hidup, ciri-ciri genetiknya tetap stabil dan tidak berubah, serta hemat biaya dan tenaga. Penyimpanan jangka pendek mikroba dilakukan dengan

memindahkan secara berkala jangka biakan dari media lama ke media baru. Peremajaan secara berkala juga digunakan untuk penyimpanan dan pemeliharaan isolat mikroba yang belum diketahui cara penyimpanan jangka panjangnya. Machmud, (2001) juga menambahkan bahwa teknik peremajaan secara berkala ini memiliki beberapa kendala seperti kemungkinan terjadi perubahan genetik melalui seleksi varian, peluang terjadinya kontaminasi, dan terjadi kekeliruan pemberian label. Akan tetapi, meski demikian, banyak mikroba yang dapat bertahan hidup dalam tabung yang berisi agar miring yang tertutup rapat hingga betahun-tahun, baik di dalam suhu ruang maupun di kulkas.

4.4 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan adalah pertambahan teratur semua komponen suatu mikroorganisme. Konsentrasi sel atau densitas sel (berat kering dari sel-sel persatuan sel biakan) merupakan dasar perhitungan pertumbuhan jasad renik. Khodijah, dkk., (2006) mengatakan bahwa menghitung densitas sel dapat dilihat dari nilai absorbansi suatu biakan. Setiap mikroorganisme termasuk bakteri memiliki kurva standar pertumbuhan bakteri. Metode perhitungan jumlah sel yang digunakan dalam pembuatan kurva pertumbuhan bakteri ini, adalah dengan menggunakan spektrofotometer untuk melihat tingkat kekeruhan (*Optical Density*) yang terbaca melalui nilai absorbansi yang dihasilkan. Pertumbuhan sel bakteri dalam suatu medium cair meningkatkan kekeruhan media, sehingga akan mempengaruhi jumlah sinar yang dapat ditransmisikan menembus medium. Pada penelitian ini inokulum diambil sebanyak 4 mL kemudian diamati menggunakan spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang 600 nm. Berdasarkan hasil uji pendahuluan membuktikan bahwa, pada panjang gelombang ini merupakan

panjang gelombang yang optimal dalam membaca densitas dari suspensi bakteri *Leuconostoc mesenteroides*. Panjang gelombang 600 – 625 nm digunakan untuk melihat tingkat kekeruhan untuk larutan yang berwarna kuning sampai coklat (Febriyansari, 2014). Kurva pertumbuhan bakteri umumnya dapat dibagi dalam empat fase, yaitu fase lag (fase adaptasi), fase log (fase eksponensial), fase stasioner dan fase kematian. Kurva pertumbuhan bakteri didapatkan dengan cara membuat plot antara waktu inkubasi dan absorbansinya. Pada penelitian ini grafik pertumbuhan bakteri *Leuconostoc mesenteroides* dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Kurva Pertumbuhan *L.mesenteroides*

Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* memiliki fase pertumbuhan yang berbeda-beda. *Leuconostoc mesenteroides* tidak mengalami adaptasi, karena inokulum baru dipindahkan ke media yang sama dengan kondisi pertumbuhan yang sama, sehingga dimulai langsung dengan pertumbuhan eksponensial. Fase Eksponensial dimulai pada jam ke-2 sampai jam ke-16. Pada fase ini bakteri mengalami pembelahan secara cepat dan jumlah sel menjadi dua kali lipat. Menurut Pelczar dan Chan (2008), lama fase ini kurang lebih selama 24 jam.

Setelah mengalami fase logaritmik, bakteri akan mengalami fase stasioner atau fase statis. Sumarsih (2003) mengungkapkan, bahwa pada fase stasioner

maksimum, jumlah sel yang mati semakin meningkat sampai terjadi jumlah sel hidup atau hasil pembelahan sama dengan jumlah sel yang mati, sehingga jumlah sel hidup konstan, seolah-olah tidak terjadi pertumbuhan (pertumbuhan nol). Pada penelitian ini fase stasioner pertumbuhan bakteri terjadi pada jam ke-18 sampai jam ke-24. Fase akhir dari pertumbuhan bakteri adalah fase kematian, yaitu fase dimana jumlah sel bakteri mengalami penurunan. Pelczar dan Chan (2008) mengungkapkan bahwa fase kematian bakteri dicirikan dengan kematian sel lebih cepat daripada pertumbuhan sel, laju kematian menjadi lebih cepat, dan semua sel akan mati dalam waktu tertentu sesuai dengan spesiesnya. Kematian sel bakteri pada fase ini disebabkan karena nutrisi dalam media dan energi yang dibutuhkan sudah habis (Waluyo, 2011).

4.5 Pembuatan Inokulum

Inokulum adalah kultur mikroba yang diinokulasikan ke dalam medium pada saat kultur mikroba pada fase pertumbuhan (Suriawiria, 2005). Tujuan utama pembuatan inokulum adalah untuk starter dalam proses fermentasi. Pembuatan inokulum ini dilakukan secara aseptik di dalam *laminar air flow* (LAF). Pembuatan inokulum *Leuconostoc mesenteroides* dilakukan dengan menggunakan media *de Man Rogosa Sharpe Broth* (MRSB) yang berbentuk cair dan memiliki kelebihan yakni jenis dan konsentrasi komponen-komponen medium dapat diatur sesuai dengan yang diinginkan, dapat memberikan kondisi optimum untuk pertumbuhan bakteri, dan pemakaian medium lebih efisien.

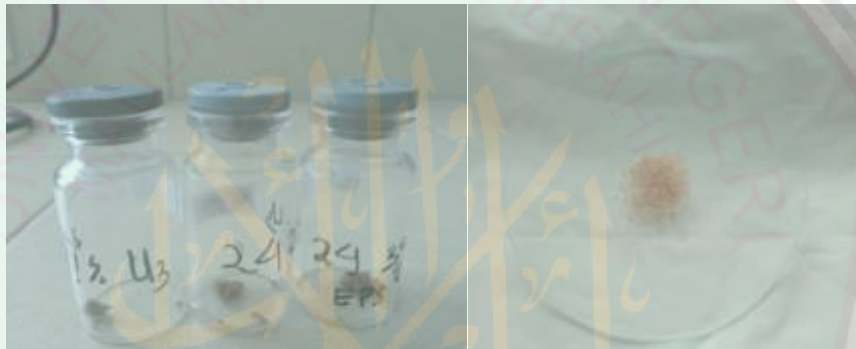
Pembuatan inokulum ini diawali dengan diambil sebanyak dua ose bakteri hasil peremajaan dan dimasukkan ke dalam media MRSB. Kemudian di goyang

pada *shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 18 jam. Pada jam ke 18 merupakan waktu pertengahan dari fase logaritmik atau eksponensial, dimana pada fase ini sel bakteri masih aktif membelah, sehingga pada waktu ini dikatakan merupakan waktu yang tepat untuk pembuatan inokulum. Fase pertumbuhan *Leuconostoc mesenteroides* diketahui kecepatan tumbuh spesifik pada fase logaritmik. Fase logaritmik sendiri ditandai dengan populasi secara signifikan. Hal ini dapat diketahui dengan perubahan yang terjadi pada medium bakteri (Madigan, 2000).

4.6 Pengaruh Penambahan Sukrosa dan Lama Fermentasi terhadap Produksi EPS dari Air Kelapa

Produksi eksopolisakarida (EPS) dari air kelapa oleh *Leuconostoc mesenteroides* dilakukan dengan menggunakan variasi perlakuan konsentrasi penambahan sukrosa dan lama fermentasi. Variasi ini diterapkan dengan tujuan untuk mengetahui konsentrasi penambahan sukrosa dan lama fermentasi optimum dalam produksi eksopolisakarida dari *Leuconostoc mesenteroides*. Air kelapa dipilih sebagai media fermentasi karena selain ketersediaan di alam cukup melimpah dan mudah didapat, di dalam air kelapa terkandung gula, protein, asam-asam amino, bermacam-macam vitamin dan mineral (Woodroof, 1979), selain itu air kelapa juga mengandung karbon yang merupakan salah satu nutrisi yang dibutuhkan *Leuconostoc mesenteroides* untuk memproduksi eksopolisakarida (Unagul, dkk., 2007). Pada proses fermentasi ini, *Leuconostoc mesenteroides* dipilih karena merujuk pada berbagai penelitian terdahulu terhadap kemampuannya dalam memproduksi metabolit sekunder eksopolisakarida. Menurut Van, (2002) *Leuconostoc mesenteroides* telah dikenal memproduksi

dekstran dari gula tebu sejak 1878. Siddiqui, dkk., (2014) mengatakan bahwa eksopolisakarida jenis dekstran dapat diproduksi dalam jumlah yang tinggi oleh *Leuconostoc mesenteroides*. Dekstran yang diproduksi oleh *Leuconostoc mesenteroides* memiliki berat molekul yang tinggi dibanding dengan bakteri yang lain (Cerning, 1995). *Leuconostoc mesenteroides* diketahui aman digunakan untuk fermentasi makanan, dan telah banyak dikaji akan efek kesehatan yang dimiliki, seperti sebagai *blood plasma extender*, agen peningkatan aliran darah, agen penurun kolesterol, dan lain-lain (De Vuyst, dkk., 2001).

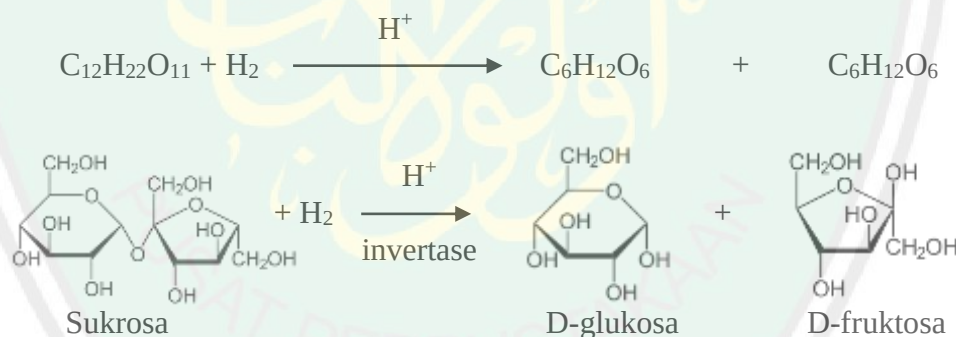


Gambar 4.6 Eksopolisakarida hasil fermentasi

Fermentasi eksopolisakarida dilakukan dengan menambahkan inokulum *Leuconostoc mesenteroides* sebanyak 10% (v/v) ke dalam air kelapa steril yang telah ditambahkan *yeast extract* sebanyak 0,25% (b/v) dan sukrosa dengan variasi konsentrasi 1, 2, dan 3% (b/v), kemudian *dishaker* dengan kecepatan 120 rpm selama waktu fermentasi yakni 24, 32, dan 48 jam pada suhu ruang. Inokulum yang akan digunakan untuk proses fermentasi dihitung jumlah sel bakteri yang ada didalamnya dengan metode *total plate count (TPC)*. Jumlah sel bakteri yang digunakan setara dengan nilai *optical density (OD)* 0,5. Produksi eksopolisakarida melalui proses fermentasi diinduksi oleh adanya sukrosa yang ditambahkan menurut (Monchois, dkk., (1997) bahwa sukrosa dapat mempercepat laju

pertumbuhan *Leuconostoc mesenteroides* dibawah kondisi teraerasi dibandingkan dengan fruktosa dan glukosa. Sukrosa tidak dapat dimanfaatkan langsung oleh *Leuconostoc mesenteroides* dalam pertumbuhannya, sehingga disakarida ini dimanfaatkan melalui proses fermentasi (Dols, 1997).

Proses fermentasi yang berlangsung merupakan sebuah proses penguraian sukrosa (disakarida) menjadi senyawa yang lebih sederhana yaitu ke bentuk glukosa dan fruktosa (monosakarida) yang disebabkan oleh aktivitas *Leuconostoc mesenteroides*, dimana bakteri ini memanfaatkan substrat sukrosa untuk menghasilkan enzim invertase. Hidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa dikatalisis oleh enzim β -fruktofuranosidase atau biasa disebut enzim invertase. Hidrolisis sukrosa dengan mendidihkan asam mineral atau dengan enzim invertase menghasilkan campuran molekul D-glukosa dan D-fruktosa yang sama.



Pertumbuhan *Leuconostoc mesenteroides* melibatkan glukosa dan fruktosa. Selain itu, monosakarida glukosa dan fruktosa juga digunakan untuk metabolisme dan konversi eksopolisakarida. Dekstran merupakan salah satu jenis EPS yang dihasilkan oleh beberapa genus BAL seperti *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, dan *Streptococcus*. Air kelapa telah dianggap sebagai produk samping yang tidak berharga atau biasa disebut sebagai bahan baku murah di sebagian besar negara

dan sebagian besar dibuang karena tidak dimanfaatkan. Air kelapa adalah sumber nutrisi dari berbagai gula, asam organik, dan mineral. Air kelapa mengandung sekitar 10 mg nitrogen per liter, dibandingkan dengan 1g nitrogen dalam 10 g *yeast extract* (Unagul, dkk., 2007). Hasil dari produksi eksopolisakarida selanjutnya dimasukkan ke tabung sentrifugasi sebanyak 25 mL, dan disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit guna memisahkan supernatan dan pelet sel bakteri. Supernatan yang diperoleh diendapkan dengan etanol dingin 95% sebanyak 50 mL atau sebanyak dua kali volume supernatan guna mempermudah laju difusi. Ekstraksi adalah suatu proses penarikan senyawa metabolit sekunder dengan bantuan pelarut. Harmita (2008) mengatakan bahwa maserasi merupakan cara sederhana yang dapat dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisa dalam pelarut. Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat-zat aktif sehingga zat aktif akan terlarut. Etanol dipilih karena merupakan pelarut yang bersifat polar. Selanjutnya pelet yang didapat dikeringkan dengan menggunakan metode *freeze dry* dan dapat ditimbang berat EPS kering serta ditentukan kadarnya dengan metode gravimetri yang merupakan metode analisis kuantitatif berdasarkan berat konstannya.

Tabel 4.6 Rata-rata kadar eksopolisakarida

Perlakuan	Rata-rata (mg/L)
K ₁ L ₁	2393,33
K ₁ L ₂	2462,66
K ₁ L ₃	2505,33
K ₂ L ₁	3246,66
K ₂ L ₂	3090,66
K ₂ L ₃	2658,66
K ₃ L ₁	3160,00
K ₃ L ₂	3378,66
K ₃ L ₃	3569,33

Berdasarkan Tabel 4.6 maka dapat ditentukan kadar rata-rata eksopolisakarida tertinggi (3569,33 mg/L) yakni pada perlakuan K₃L₃ yaitu dengan konsentrasi sukrosa yang ditambahkan sebesar 3% dan lama fermentasi 48 jam, sedangkan kadar rata-rata eksopolisakarida terendah (2393,33 mg/L) dihasilkan dari perlakuan K₁L₁ yaitu pada konsentrasi sukrosa 1% dan lama fermentasi 24 jam. Kadar rata-rata EPS tertinggi yakni sebesar 3569,33 mg/L didapat dengan kondisi fermentasi selama 48 jam yakni dimungkinkan adalah waktu akhir stasioner dari bakteri *Leuconostoc mesenteroides* dimana waktu yang tepat untuk produksi metabolit sekunder dan besarnya konsentrasi sukrosa ini juga dimungkinkan berpengaruh terhadap kadar rata-rata EPS yang dihasilkan, karena pada fermentasi eksopolisakarida dibutuhkan substrat yang kaya akan gula. Kadar rata-rata EPS terendah yang didapat pada perlakuan K₁L₁ yaitu sebesar 2393,33 mg/L dimungkinkan oleh beberapa hal, yakni ketika fermentasi memasuki jam ke-24, bakteri yang bekerja di dalam substrat dimungkinkan masih dalam fase logaritmik, dimana sel bakteri sedang aktif membelah, dan nutrisi di dalam substrat digunakan untuk pertumbuhan bakteri tersebut sehingga metabolit sekunder belum banyak di produksi, selain itu juga dimungkinkan karena konsentrasi sukrosa yang ditambahkan dalam substrat sebanyak 1% dirasa kurang, dan lebih digunakan bakteri untuk proses metabolisme pembentukan metabolit primer, sehingga eksopolisakarida yang terbentuk sedikit.

Berdasarkan hasil analisis data menggunakan *Two Way ANNOVA* menunjukkan bahwa konsentrasi sukrosa berpengaruh nyata terhadap kadar eksopolisakarida ($\text{sig} < 0,05$) sedangkan lama fermentasi tidak berpengaruh nyata ($\text{sig} > 0,05$) terhadap kadar eksopolisakarida. Aman, dkk., (2012) memaparkan

dalam penelitiannya bahwa kadar EPS tertinggi di dapat pada media yang diperkaya sukrosa 10% yakni sebesar 1,0430 g/cm³, dan EPS tertinggi juga didapatkan sebesar 1,0430 g/cm³ pada waktu fermentasi 18 jam. Jumlah produksi eksopolisakarida sangatlah dipengaruhi oleh *strain* bakteri yang digunakan, dan kondisi kimia maupun fisik seperti pH, temperatur, dan lain sebagainya (De Vuyst, 1998). Berbagai penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa penambahan sukrosa pada media fermentasi bakteri *Leuconostoc mesenteroides* menunjukkan produksi EPS yang lebih banyak dibandingkan dengan media yang tidak dimodifikasi dengan sukrosa.

Han, dkk., (2014) dalam penelitiannya sintesis dekstran oleh *Leuconostoc mesenteroides* BD1710 pada media jus tomat yang diperkaya dengan sukrosa sebanyak 15% menghasilkan dekstran sebesar 32 g/L selama 48 jam fermentasi. Nuwan, dkk., (2016) melaporkan produksi eksopolisakarida dekstran oleh *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053 diperoleh setelah 24 jam waktu inkubasi pada suhu 37 °C, dengan variasi konsentrasi sukrosa yang ditambahkan 100, 150, dan 200 g/L menghasilkan dekstran sebesar 1,25, 1,46, dan 1,88 g/L. Hal ini menunjukkan variasi konsentrasi sukrosa tertinggi lah yang menghasilkan eksopolisakarida dekstran terbanyak. Sementara itu Lin dan Chien (2007) mengkaji produksi EPS tertinggi sebanyak 0,73 g/L oleh *Lactobacillus helveticus* didapat selama 60 jam fermentasi. Produksi EPS optimum terjadi selama produksi sel maksimum (Petry, dkk., 2000), yaitu pada fase stasioner.

Produksi eksopolisakarida dilakukan pada fase stasioner akhir dari bakteri asam laktat. Hal ini dikarenakan EPS yang diproduksi oleh mikroba pada fase stasioner dapat dimanfaatkan kembali sebagai sumber karbon pada fase menjelang

kematian karena adanya enzim yang dihasilkan oleh bakteri itu sendiri yang dapat mendegradasi EPS. Akibat perpanjangan waktu inkubasi akan menurunkan produksi EPS. Dalam Pham, dkk., (2000) menjelaskan bahwa selama fase pertumbuhan eksponensial awal biosintesis EPS tidak terjadi. Produksi terjadi pada fase stasioner menuju fase kematian. Lappan dan Fogler (1994) mengkaji model kinetika pertumbuhan *Leuconostoc mesenteroides* pada media yang diperkaya sukrosa. Hasil percobaan yang menunjukkan konsentrasi sukrosa mempengaruhi tingkat pertumbuhan sel, karena sukrosa digunakan oleh sel sebagai sumber karbon. Menurut Cerning (1990) dan Malaka (2004) faktor lain yang berpengaruh terhadap produksi EPS adalah suhu dan waktu inkubasi dalam proses fermentasi.

4.7 Viabilitas Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* setelah Fermentasi dengan Metode *Total Plate Count* (TPC)

Tujuan dari perhitungan sel bakteri ini adalah untuk mengetahui seberapa banyak jumlah bakteri *Leuconostoc mesenteroides* yang hidup. Jumlah sel bakteri yang digunakan yang setara dengan nilai *optical density* (OD) 0,5 saat sebelum fermentasi, dan akan meningkat seiring dengan waktu fermentasi. Perhitungan jumlah mikroba dengan metode *total plate count* (TPC) merupakan analisis untuk menguji cemaran mikroba dengan menggunakan metode pengenceran dan metode cawan tuang (Dwidjoseputro, 2005). Metode ini dilakukan dengan mengencerkan sumber isolat yang telah diketahui beratnya ke dalam 9 mL larutan garam fisiologis (NaCl) 0,89% yang bertujuan untuk penggiat pertumbuhan mikroba, suspensi bakteri yang digunakan yakni 1 mL. Campuran NaCl dan suspensi bakteri dimasukkan ke dalam cawan petri sebanyak 0,1 mL dan dilanjutkan

dengan menuangkan media MRSA. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, jumlah bakteri yang didapat dihitung menggunakan persamaan 3.2. mikroba hidup yang diperoleh dari hitungan cawan (*Plate Count*) diberi satuan *Coloni Forming Unit* (CFU) per mL koloni yang tumbuh semakin menurun seiring dengan semakin bertambahnya waktu fermentasi, yang dimungkinkan karena kompetisi untuk mendapatkan nutrisi guna bertahan hidup semakin meningkat, sehingga bakteri yang tumbuh semakin berkurang, selain itu juga dapat disebabkan stress lingkungan yang tinggi.

Tabel 4.7 Rata-rata jumlah bakteri

Perlakuan	Rata-rata jumlah bakteri (CFU/mL)
K ₁ L ₁	$4,9 \times 10^{12}$
K ₁ L ₂	$9,0 \times 10^{11}$
K ₁ L ₃	$3,4 \times 10^9$
K ₂ L ₁	$6,5 \times 10^{11}$
K ₂ L ₂	$8,1 \times 10^{11}$
K ₂ L ₃	$9,5 \times 10^8$
K ₃ L ₁	$1,8 \times 10^{11}$
K ₃ L ₂	$4,2 \times 10^8$
K ₃ L ₃	$5,6 \times 10^7$

Berdasarkan Tabel 4.7 rata-rata jumlah bakteri semakin kecil seiring dengan bertambahnya waktu fermentasi dan konsentrasi sukrosa, hal ini dimungkinkan karena kondisi fermentasi, nilai pH dan kompetisi antar bakteri untuk mendapatkan makanan yang semakin besar, sehingga semakin sedikit jumlah bakteri yang tumbuh.

4.8 Kadar Total Gula Eksopolisakarida

Kadar total gula merupakan nilai yang penting untuk diukur guna mengetahui kadar total gula sampel sebelum fermentasi dan kadar total gula sampel setelah fermentasi, sehingga dapat diketahui kadar gula yang terpakai pada proses fermentasi. Pengukuran kadar total gula ini menggunakan metode sulfat

fenol H_2SO_4 . Penambahan fenol berfungsi sebagai pereaksi yang akan membentuk kompleks berwarna jika direaksikan dengan furfural atau derivatnya. Kompleks berwarna jingga terbentuk ketika larutan fenol berada dalam suasana asam dan berkondensasi dengan monomer gula yang dihasilkan dari proses degradasi. Intensitas warna larutan berbanding lurus dengan kandungan gula dalam sel. Selanjutnya penambahan H_2SO_4 pekat memiliki fungsi untuk menghancurkan sel dan mendegradasi polisakarida. Selanjutnya larutan kompleks diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 490 nm sesuai dengan panjang gelombang warna tampak jingga (Rover, 2013).

EPS kering ditimbang sebanyak 0,01 g, kemudian dilarutkan kedalam 250 mL aquades, dan selanjutnya dianalisa total gulanya menggunakan metode sulfat fenol H_2SO_4 . Diperoleh rata-rata kadar total gula EPS sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 4.8

Tabel 4.8 Rata-rata kadar total gula EPS

Perlakuan	Rata-rata (%)
K ₁ L ₁	59,28
K ₁ L ₂	70,02
K ₁ L ₃	72,29
K ₂ L ₁	67,66
K ₂ L ₂	55,20
K ₂ L ₃	60,91
K ₃ L ₁	57,07
K ₃ L ₂	72,94
K ₃ L ₃	70,98

Keterangan simbol K₁=1%, K₂=2%, K₃=3%, L₁=24 jam, L₂=32 jam, L₃=48 jam

Hasil analisis data statistik menggunakan *Two Way ANNOVA* menunjukkan bahwa konsentrasi sukrosa dan lama fermentasi tidak memberikan pengaruh nyata ($\text{sig} > 0,05$) terhadap kadar eksopolisakarida. Hal ini dikarenakan tinggi dan rendahnya kadar total gula EPS sangat ditentukan oleh tinggi rendahnya total gula dalam media fermentasi dan inversi selama fermentasi. Desrosier (1988)

mengatakan bahwa besarnya kadar total gula dipengaruhi oleh adanya dekomposisi sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa oleh mikroba. Han, dkk., (2014) dalam penelitiannya mengatakan bahwa biosintesis eksopolisakarida dekstran oleh *Leuconostoc* sp., dengan sebagian besar fruktosa berasal dari sukrosa yang terakumulasi pada media, sementara glukosa digunakan sebagai substrat untuk sintesis dekstran oleh enzim dekstransukrase. Kadar total gula tertinggi pada EPS adalah 72,94% pada perlakuan K₃L₂ konsentrasi sukrosa 3% dan lama fermentasi 32 jam, sedangkan kadar total gula EPS terendah adalah 55,20% pada perlakuan K₂L₂ dengan konsentrasi sukrosa 2% dan lama fermentasi 32 jam.

4.9 Kadar Gula Terpakai Selama Fermentasi

Gula terpakai merupakan gula yang digunakan *Leuconostoc mesenteroides* untuk tumbuh dan berkembang selama proses fermentasi berlangsung. Proses fermentasi dapat berlangsung secara efisien tergantung pada faktor-faktor yang mempengaruhinya. Seperti kondisi substrat dengan penambahan sukrosa yang dapat digunakan untuk produksi eksopolisakarida. Kadar gula terpakai didapatkan dari hasil analisa sebelum fermentasi dikurangi analisa setelah fermentasi. Rata-rata kadar gula terpakai selama fermentasi ditunjukkan pada Tabel 4.9.1

Tabel 4.9.1 Rata-rata kadar gula terpakai fermentasi

Perlakuan	Rata-rata (%)
K ₁ L ₁	2,46
K ₁ L ₂	2,16
K ₁ L ₃	2,74
K ₂ L ₁	2,30
K ₂ L ₂	1,36
K ₂ L ₃	2,32
K ₃ L ₁	3,52
K ₃ L ₂	2,97
K ₃ L ₃	3,94

Berdasarkan Tabel 4.9.1 nilai kadar gula terpakai paling tinggi adalah 3,94% pada perlakuan K₃L₃ yakni dengan konsentrasi sukrosa 3% dan lama fermentasi 48 jam, sedangkan kadar gula terpakai terendah adalah pada perlakuan K₂L₂ sebesar 1,36% dengan konsentrasi sukrosa sebesar 2% dan lama fermentasi 32 jam. Semakin banyak nilai rata-rata kadar gula terpakai dimungkinkan hasil fermentasi juga semakin banyak, dalam hal ini adalah EPS. Dengan kadar EPS tertinggi ini bersesuaian, akan tetapi pada nilai rata-rata kadar gula terpakai terendah yang justru dijumpai pada perlakuan K₂L₂ sebesar 1,36% tidak bersesuaian dengan rata-rata kadar EPS terendah yang justru ada pada perlakuan K₁L₁. Hal ini dimungkinkan karena faktor kondisi fermentasi, dan lain-lain.

Berdasarkan hasil analisis statistik menggunakan *Two Way ANNOVA* menunjukkan hasil bahwa konsentrasi sukrosa berpengaruh nyata ($\text{sig} < 0,05$) terhadap kadar gula terpakai selama proses fermentasi. Analisa lanjutan menggunakan Tukey HSD^{a,b} menghasilkan 1,9944^a tidak signifikan terhadap 2,4533^{ab}, tetapi ^{ab} signifikan terhadap 3,4800^b, sedangkan lama fermentasi tidak berpengaruh nyata ($\text{sig} > 0,05$) terhadap kadar gula terpakai. Kadar gula terpakai tertinggi berhubungan negatif terhadap kadar EPS tertinggi, karena kadar gula yang terpakai selama proses fermentasi tidak seluruhnya digunakan untuk produksi EPS, akan tetapi digunakan oleh *Leuconostoc mesenteroides* untuk melakukan metabolisme. Han, dkk., (2014) mengatakan bahwa media dengan penambahan sukrosa akan dipecah menjadi glukosa dan fruktosa, akan tetapi adanya fruktosa ini dapat menghambat aktivitas enzim pembentuk EPS dalam hal ini adalah dekstransukrase.

Yield fermentasi merupakan total gula sampel yang dikonversikan bakteri menjadi eksopolisakarida (%). *Yield* merupakan konsentrasi EPS yang dihasilkan dibandingkan dengan konsentrasi gula yang dikonsumsi. Perbedaan besar kecilnya *yield* dapat disebabkan karena penggunaan substrat yang berbeda, pengaruh variasi suhu, penambahan nutrisi dalam fermentasi, dan kondisi-kondisi lain yang berbeda (Farooq, 2012). Nilai *yield* fermentasi eksopolisakarida dapat dilihat pada Tabel 4.9.2.

Tabel 4.9.2 *Yield* fermentasi eksopolisakarida

Perlakuan	Gula Terpakai (%)	Eksopolisakarida (%)	<i>Yield</i> Fermentasi (%)
K ₁ L ₁	2,46	0,24	9,76
K ₁ L ₂	2,16	0,25	11,57
K ₁ L ₃	2,74	0,25	9,12
K ₂ L ₁	2,30	0,32	13,91
K ₂ L ₂	1,36	0,31	22,79
K ₂ L ₃	2,32	0,27	11,64
K ₃ L ₁	3,52	0,32	9,09
K ₃ L ₂	2,97	0,34	11,45
K ₃ L ₃	3,94	0,36	9,14

Berdasarkan Tabel 4.9.2 dapat diketahui *yield* EPS tertinggi yakni pada perlakuan K₂L₂ sebesar 22,79% dan *yield* EPS terendah 9,09% pada perlakuan K₃L₁. Tinggi dan rendahnya nilai *yield* EPS mengindikasikan efisiensi fermentasi. Akan tetapi, dari hasil *yield* fermentasi yang di dapat, terdapat beberapa kemungkinan berkaitan dengan kadar rata-rata EPS, yakni pada kadar EPS tertinggi 0,36% hanya menghasilkan *yield* 9,14 % yang dimungkinkan karena faktor kondisi fermentasi itu sendiri, seperti keasaman, mikroba, suhu, substrat dan nutrisi, dan lain sebagainya. Begitu pula pada kadar rata-rata EPS terendah sebesar 0,24%. Menurut Tsuchiya, dkk., (1955), bahwa pengaruh dari konsentrasi sukrosa sangat mempengaruhi hasil *yield* fermentasi itu sendiri, semakin meningkat konsentrasi sukrosa yang digunakan maka semakin tinggi *yield* fermentasi yang didapat. Semakin tinggi konsentrasi gula maka ketersediaan substrat tinggi sehingga konversi gula menjadi EPS juga tinggi.

Identifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR berguna untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam eksopolisakarida. Eksopolisakarida dengan kadar rendemen tertinggi yakni pada perlakuan K₃L₃ sebesar 3569,33 mg/L menghasilkan spektra seperti Gambar 4.10



Nuwan, dkk., (2016) mengatakan bahwa pita serapan pada 3438 cm^{-1} adalah vibrasi *stretching* gugus hidroksil OH yang melebar dari polisakarida. Menurut Siddiqui, (2014) pita serapan pada 2929 cm^{-1} menunjukkan vibrasi *stretching* gugus C-H yang mengindikasikan adanya senyawa organik seperti protein, gula, dan lain sebagainya. Spektra hasil FTIR pada Gambar 4.10.1 juga menunjukkan adanya serapan gugus -CO dengan vibrasi *stretching* pada bilangan gelombang 1650 cm^{-1} dengan profil tajam. Nuwan, dkk., 2016 menunjukkan serapan gugus -CO *stretching* pada bilangan gelombang 1641 cm^{-1} . Menurut Petrovici, dkk., (2017) mengatakan bahwa pada bilangan gelombang 1455, 1419, dan 1370 cm^{-1}

¹menunjukkan adanya serapan gugus C-H dan CH₂ vibrasi *bending*. Shingel dalam Paulo (2012) mengatakan bahwa pita serapan utama yang mengkarakterisasi dekstran α (1 $\rightarrow$ 6) eksopolisakarida dapat ditemukan pada area bilangan gelombang 1150 cm⁻¹, mengindikasikan adanya tautan glikosida dalam konformasi alfa (α). Sedangkan dalam penelitian Nuwan, dkk., (2016) ikatan α (1,6) glikosidik terserap pada bilangan gelombang 1018 cm⁻¹. Menurut Shingel dalam Paulo (2012) adanya puncak serapan 1010 cm⁻¹ merefleksikan fleksibilitas yang baik dari rantai dekstran.

Tabel 4.10. Gugus fungsi dari spektra FTIR perlakuan K₃L₃

Spektra hasil analisis (cm ⁻¹)	Spektra dari literatur (cm ⁻¹)	Gugus fungsi dari literature	Sumber
3421	3438	-OH <i>stretching</i> alkohol	Nuwan, P., dkk., (2016)
2927	2929	-C-H <i>stretching</i>	Siddiqui, dkk., (2014)
1650	1641	-CO <i>stretching</i>	Nuwan, P., dkk., (2016)
1384	1370-1455	-C-H, -CH ₂ <i>bending</i>	Petrovici, dkk., (2017)
1154	1127	-C ₄ -O ₄ H	Petrovci dkk., (2017)
1017	1018	α (1,6) glikosidik	Nuwan, dkk., (2016)

4.11 Pemanfaatan Air Kelapa untuk Produksi Eksopolisakarida dalam Perspektif Islam

Buangan air kelapa di lingkungan dapat menimbulkan berbagai permasalahan, salah satunya adalah kerusakan lingkungan polusi asam asetat akibat dari proses fermentasi dari limbah air kelapa. Allah telah berfirman dalam surat Al-A'raf ayat 56 yang berbunyi:

وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا وَادْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا إِنَّ رَحْمَتَ اللَّهِ قَرِيبٌ مِّنَ الْمُحْسِنِينَ ﴿٥٦﴾

Artinya: “Dan janganlah kamu membuat kerusakan di muka bumi, sesudah (Allah) memperbaikinya dan berdoalah kepada-Nya dengan rasa takut (tidak akan diterima) dan harapan (akan dikabulkan). Sesungguhnya rahmat Allah amat dekat kepada orang-orang yang berbuat baik”. (Q.S Al-A’raf:56).

Berdasarkan al-Qarni (2007) mengenai tafsir al-Muyassar mengatakan dalam ayat ini bahwa dan janganlah kalian membuat kerusakan di bumi dalam bentuk apapun, setelah Allah memperbaiki (keadaan) dunia dengan mengutus para Rasul (semoga keselamatan menyertai mereka) dan memakmurkannya dengan ketaatan kepada-Nya. Berdoalah kepada-Nya dengan penuh keikhlasan, disertai rasa takut akan siksa dan berharap pahala dari-Nya. Sesungguhnya rahmat Allah sangat dekat kepada orang-orang yang berbuat kebaikan.

ظَهَرَ الْفَسَادُ فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ بِمَا كَسَبَتْ أَيْدِي النَّاسِ لِيُذِيقَهُمْ بَعْضَ الَّذِي عَمِلُوا لَعَلَّهُمْ يَرْجِعُونَ ﴿٤١﴾

Artinya : “telah nampak kerusakan di darat dan di laut disebabkan karena perbuatan tangan manusia, supaya Allah merasakan kepada mereka sebahagian dari (akibat) perbuatan mereka, agar mereka kembali (ke jalan yang benar)” (Q.S Ar-Ruum : 41)

Ayat diatas telah ditafsirkan oleh berbagai mufassir dan salah satunya Thantawi Jauhari yang menjelaskan *fasad* atau kerusakan yang terjadi adalah di darat dan di laut. Ini berarti daratan dan laut menjadi arena kerusakan, misalnya dengan terjadinya pembunuhan dan perampokan di kedua tempat itu. Dan dapat berarti juga bahwa darat dan laut sendiri telah mengalami kerusakan, ketidakseimbangan serta kekurangan manfaat. Laut telah tercemar, sehingga ikan

mati dan hasil laut berkurang. Daratan semakin panas sehingga terjadi kemarau panjang. Akibat keseimbangan lingkungan menjadi kacau.

Kerusakan lainnya yang dapat kita jumpai, di darat adalah pengrusakan terhadap tumbuh-tumbuhan. Banyak kita temukan tangan-tangan jahil yang tidak bertanggung jawab menebangi pohon-pohon yang ada di hutan hanya untuk mendapatkan keuntungan sepihak, yakni untuk dirinya sendiri. Akibatnya hutan menjadi gundul dan bila hujan tiba, tanah tidak mampu menyerap air. Sehingga terjadi banjir yang berimbas pula pada orang lain. Selain itu, penebangan hutan akan merusak ekosistem yang ada di dalamnya. Hewan-hewan menjadi resah karena tidak ada pepohonan untuk dijadikan tempat tinggal sekaligus sumber makanan bagi mereka.

Allah SWT telah menciptakan segala sesuatu di bumi dan seisinya ini dengan penuh manfaat. Tanda-tanda kekuasaan Allah, yang Ia ciptakan di langit dan di bumi dan diantara keduanya, semua itu tidak diciptakan dengan sia-sia, tetapi mengandung tujuan, yaitu untuk kemaslahatan makhluk-makhluk-Nya, sebagai sarana beribadah kepada Allah. Sejatinya seluruh entitas pengetahuan dan ilmu sudah tercipta, di setiap objek-objek yang Allah turunkan. Hanya saja manusia tidak diberikan secara instan tentang pengetahuan itu. Namun manusia lahir dengan bekal yang diberikan Allah untuk menaklukkan segala ketidaktahuannya yang disebut dengan akal pikiran. Bagi manusia yang menggunakan akal pikirannya, maka ia akan mendapatkan hikmah dari segala benda yang ada disekitarnya. Begitu juga sebaliknya, bagi manusia yang enggan berpikir, maka tidak ada baginya pengetahuan mengenai benda apapun sesuai dengan firman Allah pada surat An-Nahl ayat 13:

وَمَا ذَرَأَ لَكُمْ فِي الْأَرْضِ مُخْتَلِفًا أَلْوَنُهُ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَذَّكَّرُونَ ﴿١٣﴾

Artinya: “Dan Dia (menundukkan pula) apa yang Dia ciptakan untuk kamu di bumi ini dengan berlain-lain macamnya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang mengambil pelajaran”(Q.S An-Nahl:13).

Manusia hidup di bumi ini dilengkapi oleh banyak fasilitas yang diberikan Allah. Fasilitas tersebut adalah makanan sebagai sumber energi, bahan-bahan dari alam untuk dijadikan perhiasan, pakaian, menghias diri dan untuk obat-obatan. Dalam Al-Qur'an Surat Abasa ayat 24-32 yang berbunyi:

فَلْيَنْظُرِ الْإِنْسَانُ إِلَى طَعَامِهِ ﴿٢٤﴾ أَأَنَّا صَبَبْنَا الْمَاءَ صَبًّا ﴿٢٥﴾ ثُمَّ شَقَقْنَا الْأَرْضَ شَقًّا ﴿٢٦﴾ فَأَنبَتْنَا فِيهَا حَبًّا ﴿٢٧﴾ وَعَيْنَبًا وَقَضْبًا ﴿٢٨﴾ وَزَيْتُونًا وَنَخْلًا ﴿٢٩﴾ وَحَدَائِقَ غُلْبًا ﴿٣٠﴾ وَفَكْهَةً ﴿٣١﴾ وَأَبَّأًا ﴿٣٢﴾ مَتَّعَّا لَكُمْ وَلِأَنعَمِ لَكُمْ ﴿٣٣﴾

Artinya: “Maka hendaklah manusia itu memperhatikan makanannya. Kamilah yang telah mencurahkan air melimpah (dari langit). Kemudian Kami belah bumi dengan sebaik-baiknya. Lalu di sana Kami tumbuhkan biji-bijian, dan anggur dan sayur-sayuran, dan zaitun dan pohon kurma, dan kebun-kebun (yang) rindang, dan buah-buahan serta rerumputan, (semua itu) untuk kesenanganmu dan untuk hewan-hewan ternakmu”(Q.S Abasa:23-32).

Menurut Shihab (2002) dalam tafsir al-Misbah, bahwa ayat tersebut memberikan isyarat bahwa interaksi tumbuhan dengan makhluk hidup lain seperti hewan dan manusia. Secara ekologis tumbuh-tumbuhan sebagai produsen memiliki peranan yang sangat penting. Kemampuan tumbuhan untuk mengubah energi dari matahari berupa cahaya menjadi energi kimia tidak dapat dilakukan oleh organisme lain. Peristiwa transformasi energi ini adalah fenomena alam yang patut untuk dijadikan bahan renungan akan kebesaran Sang Pencipta dan perenungan betapa pentingnya pelestarian alam termasuk tumbuhan.

Salah satu tumbuhan sebagai sumber daya alam yang dikaruniakan Allah kepada manusia adalah tumbuhan kelapa yang hampir dari seluruh bagiannya memiliki manfaat termasuk adalah air buah kelapa. Air kelapa mempunyai banyak manfaat yang dapat digunakan oleh manusia, akan tetapi masih banyak masyarakat yang belum mengetahui pemanfaatan air kelapa, dan cenderung membuangnya sebagai limbah rumah tangga dan limbah pasar, karena air kelapa tua diketahui tidak memiliki gizi yang baik seperti air kelapa muda. Allah SWT tidak menyukai perbuatan *mubadzir* dalam hal apapun, sesuai dengan firman-Nya dalam surat Al-Isro' ayat 26:

وَعَاتِ ذَا الْقُرْبَىٰ حَقَّهُ وَالْمِسْكِينَ وَابْنَ السَّبِيلِ وَلَا تُبَذِّرْ تَبْذِيرًا

Artinya: “Dan berikanlah kepada keluarga-keluarga yang dekat akan haknya, kepada orang miskin dan orang yang dalam perjalanan dan janganlah kamu menghambur-hamburkan (hartamu) secara boros” (Q.S Al-Isro' : 26).

Tindakan membuang-buang sumber daya alam dalam hal ini adalah air kelapa tua, merupakan salah satu contoh langkah-langkah setan yang dapat menjerumuskan manusia, apabila manusia enggan berpikir tentang pemanfaatannya. Di dalam Al-Qur'an Surat Al-Baqarah ayat 168 Allah ta'ala berfirman:

يَا أَيُّهَا النَّاسُ كُلُوا مِمَّا فِي الْأَرْضِ حَلَالًا طَيِّبًا وَلَا تَتَّبِعُوا خُطُوَاتِ الشَّيْطَانِ إِنَّهُ لَكُمْ

عَدُوٌّ مُّبِينٌ ﴿١٦٨﴾

Artinya: “wahai manusia! Makanlah dari (makanan) yang halal dan baik yang terdapat di bumi, dan janganlah kamu mengikuti langkah-langkah setan. Sungguh setan itu musuh yang nyata bagimu” (Q.S. Al-Baqarah:168).

Ibnu Katsir telah menafsirkan ayat ini manusia diperintahkan untuk memakan yang halal lagi baik dari apa yang terdapat di bumi, dan manusia dilarang untuk mengikuti langkah-langkah setan, karena sesungguhnya setan itu adalah musuh yang nyata bagi manusia. Sesungguhnya setan itu hanya menyuruh kalian berbuat jahat dan keji, dan mengatakan terhadap Allah apa yang tidak kalian ketahui. Setelah Allah SWT menjelaskan bahwa tidak ada Tuhan selain Dia dan bahwa hanya Dia lah yang memberi rezeki semua makhluk-Nya. Untuk itu Allah SWT menyebutkan sebagai pemberi karunia kepada mereka, bahwa Dia memperbolehkan mereka makan dari semua apa yang ada di bumi, yaitu yang diharamkan bagi mereka lagi baik dan tidak membahayakan tubuh serta akal mereka, sebagai karunia dari Allah SWT.

Berdasarkan tafsir surat Al-Baqarah ayat 168 tersebut, maka dalam rangka menghindari langkah-langkah syetan yang termasuk membuang-buang sesuatu yang baik, manusia dapat memanfaatkan air kelapa sebagai substrat bakteri baik seperti *Leuconostoc mesenteroides* untuk di fermentasi sehingga menghasilkan metabolit sekunder berupa eksopolisakarida yang memiliki banyak manfaat bagi manusia. Kondisi berbeda baik dari faktor penambahan sukrosa maupun lama fermentasi dalam suatu fermentasi dapat memberikan hasil yang berbeda pula, karena setiap reaksi memiliki ketetapan masing-masing, seperti halnya kadar eksopolisakarida yang dihasilkan dalam penelitian ini. Allah telah berfirman dalam Surat Al-Qomar ayat 49 yang berbunyi:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾

Artinya: “Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran” (Q.S Al-Qomar: 49).

Kata *qadar* dalam segi bahasa menurut Shihab, (2000) bermakna kadar tertentu yang tidak bertambah atau berkurang, dan dapat diartikan juga sebagai ketentuan dan sistem yang ditetapkan terhadap segala sesuatu. Sedangkan dalam tafsir Ibnu Katsir, firman Allah Subhanahu Wa Ta'ala diatas semakna dengan apa yang disebutkan oleh firman-Nya “dan Dia menciptakan segala sesuatu, dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya (Q.S. Al-Furqaan:2). Yakni Dia telah menentukan ukuran masing-masing makhluk-Nya dan memberi petunjuk kepada semua makhluk-Nya. Karena itulah maka para imam dari kalangan Ahlus Sunnah menyimpulkan dalil dari ayat ini yang membuktikan akan kebenaran dari takdir Allah yang terdahulu terhadap makhluk-Nya. Yaitu pengetahuan Allah SWT akan segala sesuatu sebelum terjadiannya dan ketetapan takdir-Nya terhadap mereka sebelum mereka diciptakan oleh-Nya.

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Konsentrasi sukrosa berpengaruh nyata terhadap kadar EPS, sedangkan lama fermentasi tidak berpengaruh nyata terhadap kadar EPS. Konsentrasi sukrosa berpengaruh nyata terhadap kadar gula terpakai selama fermentasi, sedangkan lama fermentasi tidak berpengaruh nyata terhadap kadar gula terpakai fermentasi. Konsentrasi sukrosa dan lama fermentasi tidak berpengaruh nyata terhadap kadar gula total eksopolisakarida. Kadar rata-rata eksopolisakarida tertinggi 3569,33 mg/L yakni pada perlakuan K₃L₃ yaitu dengan konsentrasi sukrosa yang ditambahkan sebesar 3% dan lama fermentasi 48 jam. Kadar total gula EPS tertinggi 72,94% pada perlakuan K₃L₂. Kadar gula terpakai paling tinggi adalah 3,94% pada perlakuan K₃L₃.
2. Hasil analisis FTIR menunjukkan terdapat serapan –OH alkohol pada bilangan gelombang 3421 cm⁻¹. Serapan –C-H pada bilangan gelombang 2927 cm⁻¹. Serapan gugus –CO terdapat pada bilangan gelombang 1650 cm⁻¹. Serapan –C-H dan –CH₂ terdapat pada bilangan gelombang 1384 cm⁻¹, dan adanya vibrasi kovalen dari ikatan –C₄-O₄H pada bilangan gelombang 1154 cm⁻¹, serta terdapat ikatan $\alpha(1,6)$ glikosidik pada bilangan gelombang 1017 cm⁻¹ yang mengindikasikan eksopolisakarida jenis dekstran.

5.2 Saran

1. perlu adanya penelitian lanjutan dengan penambahan sukrosa dengan konsentrasi yang berbeda selain 1 dan 2% dan lama fermentasi yang berbeda pula guna mengoptimalkan produksi eksopolisakarida
2. perlu diperhatikan dalam meregenerasi bakteri *Leuconstoc mesenteroides* sebaiknya dilakukan setiap seminggu sekali dan analisis lanjutan mengenai morfologi eksopolisakarida menggunakan instrumentasi SEM.



DAFTAR PUSTAKA

- Abid, Y., Casillo, A., Gharsallah, H., Joulak, I., Lanzetta, R., Corsaro, MM., Attia, H., dan Azabou, S. 2018. Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. *International Jornal of Biological Macromolecules* 108:719-728.
- Afriani. 2010. Pengaruh penggunaan starter bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* terhadap total bakteri asam laktat, kadar asam dan nilai pH dadih susu sapi. *Jurnal Imiah Ilmu-ilmu Peternakan*. Vol.XIII (6): 279-285.
- Ajaban, C.A. 1962. Studies on optimum conditions for nata de coco bacterium or formulation in coconut water. *Philipine Agricultural*.
- Albalasmeh, A. A., Asmeret, A. B., Teamrat, A dan Ghezzehei. 2013. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentration using UV spectrophotometry. United State: *Carbohydrate Polymer* 97: 253-261.
- Al-Qarni, A. 2007. *Tafsir Muyassar*. Jakarta: Qisthi Press.
- Al-Qurthubi dan Syaikh. 2009. *Tafsir al-Qurthubi Juz 'Amma*, Jakarta: Pustaka Azzam.
- Amalia, R. D. 2012. Eksplorasi Isolat Bakteri Asam Laktat Penghasil Ekspolisakarida dari Sawi Asin (*Brassica juncea*). *Skripsi*. Universitas Brawijaya: Malang
- Aman, A., Siddiqui, N.N dan Qader, S.A.U. 2012. Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1. *Carbohydrate Polymers* 87:910-915
- Anton, N dan Zubaidah E. 2015. Isolasi bakteri asam laktat penghasil ekspolisakarida dari kimchi. *Jurnal Universitas Brawijaya Malang*. 3 (2). 743-748
- Barlina, R., Karouw, S., Towaha, J dan Hutapea, R. 2007. Pengaruh perbandingan air kelapa dan penambahan daging kelapa muda serta lama penyimpanan terhadap serbuk minuman kelapa. *Jurnal Littri*. Vol. 13 No. 12: 73-80
- Bibra, F. 2015. Pembuatan etanol dari molase secara fermentasi menggunakan el *Saccharomyces cerevisiae* yang terimobilisasi pada kalsium alginat. *Jurnal Teknologi Proses*, Departemen Kimia, Fakultas MIPA Universitas Sumatera Utara, 2(3) 75-80.
- Brummer, Y. dan Cui, W.S. 2005. Food carbohydrates for chemistry, physical properties, and application. *E-book*. 432-439. France: Taylor and francies group, LLC.

- Buckle, K.A dan Edwards, G.H. 1987. Exopolysaccharide production from micro substrate and identified the molecule. 1 (5) 7-9.
- Budiyanto, M.A.K 2005. *Mikrobiologi Umum*. Malang: UMM Press.
- Cerning, J.R., Bouillane, M dan Desmazeaud, M.J. 1990. Comparison of exocellular polysaccharide production by thermophilic lactic acid bacteria. *Science des Aliments*, 10: 443-451.
- Cerning, J., Bouillane dan Landon, M. 1992. Isolation and characterization of exopolysaccharide from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *Journal Dairy Science* 3 (5), 9-12
- Cerning, J. 1995. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. 75: 463-472.
- Chang, W.K., Mclave dan Chao, Y. C. 2004. Enhancing interpretation of gastric residual volume by refractometry. *Journal* 19 (5): 62-72.
- Daulay, D. 1991. *Fermentasi Pangan*. Bogor: Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi: Institut Pertanian Bogor.
- De, Vuyst, L., Vanderveken, F., Van D.S dan Degeest, B. 1998. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *Journal Applied Microbiology*. 84, 1059-1068.
- De, Vuyst, L. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23.153-177
- De, Vuyst, L dan Marshall, V.M., 2001, First Symposium on Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria: from Fundamentals to Applications. In Special Issue of *the International Dairy Journal* ed. De Vuyst, L. And Marshall, V.M/ pp. 111. Oxford, UK: Elsevier Science Ltd
- Desmazeaud, M. 1996. Lactic Acid Bacteria in Food: Use and Safety. *Cashiers Agricultures* 5 (5): 331-342.
- Desrosier, N.W. 1988. *Teknologi Pengawetan Pangan*. Edisi III. Penerjemah Muchdi Mulyohardjo. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Dols, M., Remaud-Simeon, M., & Monsan, P.F. 1997. Dextranucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299: comparison with *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-152F. *Enzyme and Microbial Technology*. 20:523-530.
- Dubois, M.K., Gilles, A., Hamilton, P.A., Rebers dan Fred, S. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *Journal of University of Minnesota* vol 28(3): 350-356.
- Dwidjoseputro, D. 1994. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Djambatan.

- Elida, M. 2002. Profil Bakteri Asam Laktat Dari Dadih yang Difermentasi dalam Berbagai Jenis Bambu dan Potensinya Sebagai Probiotik. *Tesis*. Prgram Pascasarjana. IPB. Jawa Barat.pp:4-21.
- Ertesvag, H dan Valla, S. 1998. Biosynthesis and applications of alginates. *Polym. Degrad. Stab.* 59: 85-91.
- Fardiaz, S. 1992. Mikrobiologi Pangan. *E-Book*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Febriyansari, A.N. 2014. Penerapan model Gompertz pada pertumbuhan bakteri *L.acidophilus* dan *B. Longum* di media adonan es krim (Ice Cream Mix atau ICM0 jenis standar. *Skripsi*. Malang: Universitas Brawijaya.
- Fialho, A.M., Moreira, L.M., Granja, A.T., Popescu, A.O., Hoffmann, I dan Sa-Correia. 2008. Occurence, production, and applications of gellan: current state and perspectives. *App. Microbial. Biotechnol.* 79:1320140.
- Fifendy, M., Eldini dan Irdawati. 2013. Pengaruh Pemanfaatan Molase terhadap Jumlah Mikroba dan Ketebalan Nata pada Teh Kombucha. *Prosiding Seminar Bidang Biologi* ISBN-978-602-98559-2-0.
- Fitria, A. Pengaruh suhu dan lama fermentasi terhadap produksi eksopolisakarida dari tetes tebu oleh *Lactobacillus plantarum* dan identifikasi senyawa gula penyusunnya. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Saintek UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Fridovich, L., Kono, Y. 1983. Isolation and characterization of the pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum*. *Journal. Biol. Chem.* 258(10): 6015-9
- Gummadi, S.N dan Kumar, K. 2005. Production of extracellular water insoluble β -1,3-glucan (curdlan) from *Bacillus* sp. SN07. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 10:546-551.
- Halim, C. N., dan Zubaidah, E. 2013. Studi Kemampuan Probiotik Isolat Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Tinggi Asal Sawi Asin (*Brassica juncea*). *Jurnal Pangan dan Agroindustri* Vol.1 No.1 p.129-137, Oktober 2013.
- Han, J., Hang, F., Guo, B., Liu, Z., You, C., dan Wu, Z. 2014. Dextran synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* BD1710 in tomato juice supplemented with sucrose. *Carbohydrate Polymers* 112.556-562.
- Harmita, R.M. 2008. *Buku Ajar Analisis Hayati Edisi 3*. Jakarta: EGC: 26.
- Haroun, B. M., El-Menoufy, H. A., Amin, H. A. dan El-Waseif, A. A. 2013. Biosynthesis and Morphology of an Exopolysaccharide from a probiotic *Lactobacillus plantarum* under different growth condition. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(2): 1256-1265, 2013.
- Hartono, D.F., Pudji, A., dan Prastawa, A.T.P. 2016. Inkubator bakteri *Bacillus Stearothermophilus* berbasis mikrokontroller untuk tes mikrobiologi

- pada autoklaf. *Seminar Tugas Akhir*. Surabaya:Teknik elektromedik Politeknik Kesehatan Kemenkes Surabaya.
- Jauhari, T.*al-Jawahir fi Tafsir al-Qur'an al-Karim*, Beirut: Musthafa al-Babi al-Halabi wa Auladuhu bi Misra, t.t
- Jenie, S.L., dan Shinta E.R. 1995. Aktivitas antimikroba dari beberaa spesies *Lactobacillus* terhadap mikroba patogen dan perusak makanan. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 7(2), 46-51
- Jin, Y., H. Zhang, Y., Yin, K dan Nishinari. 2006. Conformation of curdlan as observed by tapping mode atomic force microscopy. *Colloid Polym.Sci.*284: 1371-1377.
- Katsir, I.*Tafsir al-Qur'an al-Azim*.Beirut: al-Maktabah al-'Ilmiyyah, t.t
- Khairunnisa, F dan Pato, U. 2016. Perbandingan aktivitas antibakteri antara *Lactobacillus casei* subs R-68 dan *Lactobacillus casei* komersil terhadap *Staphylococcus aureus* FNCC-15 dan *Escherichia coli* FNCC-19. *Jurnal Teknologi Pertanian*. Universitas Riau.
- Khodijah, S., Tuasika, B. J., Sugoro, I dan Yusneti. 2006. Pertumbuhan *Streptococcus agalactiae* sebagai bakteri penyebab mastitis subklinis pada sapi perah. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*.
- Kimmel, S. A., Roberts, R. F dan Ziegler, G. R. 1998. Optimation of Exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 659-664.
- Kultsum, U. 2009. Pengaruh variasi nira tebu dar beberapa varietas penambahan sumber N dari tepung kedelai hitam sebagai substrat terhadap efisiensi fermentasi etanol. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Saintek UIN Malang , 43-47.
- Kusmiati, F., Rachmawati, S., Siregar, S., Nuswantara, dan Malik. 2006. *J. Markara (Seri Sains)* 10 (2006) 24-29.
- Lapasin, R. S. Pricel. 1999. Rheology of industrial polysaccharides: Theory and applications. Aspen Publisher: New Yorll. USA. Pp.1-118.
- Lappan, R.E dan Fogier, H.S. 1994. *Leuconostoc mesenteroides* growth kinetics with application to bacterial profile modification. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol 43, No.9
- Lee, I.Y., Seo, W.T., Kim, G.J., Ahn, S.G., Kwon, G.S dan Park, Y.H. 1997. Optimization of fermentation conditions for production of exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*. *Journal of Bioroces Engineering* 16.
- Lehninger, A. L. 1997. *Dasar-dasar Biokimia Jilid 1*. Jakarta: Erlangga

- Lin, T.Y. M. F dan Chien, C. 2007. Exopolysaccharide Production as Affected by Lactic Acid Bacteria and Fermentation Time. *Food Chemistry* 100 (2007) 1419-1423.
- Liu, C., Chu, F., Chou, C., dan Yu, R. 2011. Genetical Toxicology. *Environment Mutagenecity*. 721 (2011) 157-162.
- Machmud, M. 2001. Teknik penyimpanan dan pemeliharaan mikroba. *Buletin AgroBio* 4(1):24-32.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M dan J.Parker. 2000. *Biology of microorganisms*. 9th Ed. New Jersey: Prentice Hall International Inc.
- Malik, A., Donna, M., Ariesranti, A.N dan Arry, Y. 2008. Skrining Gen Glukonsiltransferase (GTF) dari Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida. 2008. *Markara Sains*, Volume 12, No. 1, April2008: 1-6.
- Marzuki, A., Riyatun dan Sari N.W. 2012. Sensor Fiber Optik dari Bahan Fiber Optik Polimer untuk Pengukuran Refractive Index Larutan Gula. *Indonesian Journal of Applied Physich*. Vol.2. No.1. Surakarta.
- Mayura, E., Yudarfis, NFN., Idris, Herwita., dan Darwati, I. 2016. Pengaruh Pemberian Air Kelapa dan Frekuensi Pemberian Terhadap Pertumbuhan Benih Tanaman Cengkeh (*Szyygium aromaticum*). *Bul.Littro*, Volume 27. No.2 Desember 2016.
- Micheli, L., D. Uccelletti., Palleschi dan Crescenzi. 1999. Isolation amd characterization of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefirin. *Appl. Environ. Microniol*. 53:69-74.
- Misgiyarta dan Sri, W. 2002. Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Indigenus. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman*. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian Bogor.
- Monchois, V., Remaud-Simeon, M., Russel,R.R.,Monsan, P dan Willemot, R.M. 1997. Characterization of *Leuconostoc mesenteroides*NRRL. B-512F dextranucrase and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48(4)465-472.
- Nishimura, J. (2014) Exopolysaccharides produced from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Advances in Microbiology*, 4, 1017-1023.
- Nudyanto, A dan Zubaidah, E. 2015. Isolasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida dari Kimchi. *Jurusan teknologi hasil pertanian, FTP Universitas Brawijaya Malang*. Vol.3 No 2 p.743-748.

- Nuwan, P., Piwpan, P., Jaturapiree, A., dan Jaturapiree, P. 2016. Production of dextran by *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053 in fed batch fermentation. *KKU Res.Journal*.21(2).
- Onifade,A dan Agboola, K. 2003. *Effect of Fungal Infection on Proximate Nutrient Composition of Coconut (Cocos nucifera Linn) fruit*. Food, Agric. Environ 1(2): 141-142
- Ozkaya, F. D., Aslim, B dan Ozkaya, M. T. 2007. Effect of Exopolysaccharides (EPSs) Produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Strain to Bacteriophage and Nisin Sensitivity of the Bacteria. *LWT* 40 (2007) 564-568.
- Palungkun, R. 1992. *Aneka Produk Tanaman Kelapa*. Penebar Swadaya: Jakarta.
- Paulo, E.M.,Boffo, E.F., Branco, A., Valente, A., Melo, I.S., Ferreira A.G., Roque, M., danAssis, S. 2012. Production extraction and characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 strain. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 84(2): 495-507.
- Pedrotti, S.Cdan Dum, C.G. 1981. Industrial microbiology. *Journal* New York: Mc Graw-Hill Book Co. Ltd. 2 (1). 39-46
- Petry, S., S. Furlan, M.J. Crepeau, J. Cerniing, dan Desmazeaud, M. 2000. Factors affecting exoellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp, *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Appl. And Environment. Microbiol*. 66(8): 3427-3431
- Petrovici, A.R.,Rosca, I., Dodi, G., Nicolescu, A., Avadanel, I., Varganci, C.G., dan Ciolacu, D. 2017. Effects of culture medium composition on biosynthesis of exopolysaccharides. *Cellulose Chemistry and Technology*.,51(9-10), 821-830.
- Pham, PL, Dupont, I., Roy, D.. Lapointe, G dan Cerning, J. 2000. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus rhamnosus* and analysisof its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Appl Environ Microbiol*. 66(6): 2302-2310
- Pine, S.H., J.B. Hendrickson, D.J. Cram dan G.S. Hammond. 1980. *Organic Chemistry*.New York:McGraw-Hill Inc.
- Prado, F, C., Lindner, J.D.D., Inaba, J., Soccol, V.T., Brar, S.T dan Soccol, C.R.. 2015. Development and evaluation of fermented coconut water beverage with potential health benefits. *Journal of Functinal Foods* 12 489-497.
- Rahayu, E.S. 2003. Lactic Acid Bacteria in Fermented Foods of Indonesian Origin. *Agritech*. Vol 23(2) 75-84.
- Ray,B. 2001. *Fundamental Food Microbiology 2nd Ed.*, Boca Raton: CRC Press.

- Raymond, R. 2009. Adipic Acid. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Pp. 11-12.
- Reddy, G., Altaf, M.D., Naveena, B.J., Venkateshwar, M dan Kumar, E.V. 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation, a review. *Biotechnology Advances* 26:22-34
- Rehm, B. 2009. Microbial exopolysaccharides: Variety and potential application. In *Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives*. Caister Academic: Norfolk, UK pp. 229-254.
- Rosario, R.R.D. 1978. Composition and utilization of coconut water. *Philippines Coconut Research and Development Foundation*. Los Banos: Laguna.
- Rover, M.R. 2013. Analysis of sugar and phenolic compound in bio-oil. *Thesis*. Iowa: Iowa State University
- Rustan, I.R. 2013. Studi isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat dari fermentasi cabai rawit (*Capsicum frutescens*). *Skripsi*. Makassar: Fakultas Pertanian Universitas Hasanuddin.
- Salle, A.J. 1979. *Fundamental Principle of Bacteriology*. New Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing Company Ltd.
- Saraswati, D. 2014. *Pengaruh konsentrasi air kelapa muda terhadap pertumbuhan Saccharomyces cereviceae*. Jurusan Kesehatan Masyarakat. Universitas Negeri Gorontalo. Gorontalo.
- Seesuriyachan, P., Kuntiya, A., Hanmoungjai, P., dan Techapun, C. 2011. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 using coconut water as an alternative carbon source: the effect of peptone, yeast extract and beef extract. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 33 (4), 379-387.
- Setiaji, B. 2002. Peningkatan Nilai Tambah Krim Santan Kelapa Limbah Pembuatan Minyak Kelapa sebagai Substrat Nata de coco. *Jurnal*. Vol.2. No.3.
- Shihab, M. Q. 2002. *Membumikan al-Qur'an*. Bandung: Mizan
- Shihab, M.Q. *Tafsir al-Misbah (Pesan, Kesan dan Keserasian al-Qur'an)*. Jakarta: Lentera Hati.
- Shingle, K.I. 2002. Determination of structural peculiarities of dextran, pullulan and c-irradiated pullulan by Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydrates Res*. 337: 1445-1451.
- Shivakumar, S., dan Vijayendra, S.V.N. 2006. Production of exopolysaccharides by *Agrobacterium* sp. CFR-24 using coconut water-a byproduct of food industry. *Letters in Applied Microbiology*. ISSN 0266-6254.

- Siddiqui, I. 2010. Polarographic investigation of kinetics of inversion of sucrose. *Rasayan Journal Chemistry*. Vol.3, No.2.
- Siddiqui, N.N., Aman, A., Silipo, A., Qader, S.A. dan Molinaro, A. 2014. Structural analysis and characterization of dextran produced by wild and mutant strains of *Leuconostoc mesenteroides*. *Carbohydrate Polymers* 99:331-338.
- Singh, R.K., Tiwari, S.P., Rai, A.K., dan T.M. Mohapatra. 2011. Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. *J.Antibiotics*. 64: 401-412
- Suresh dan Mody. 2009. *Microbial Exopolysaccharides: Variety and Potential Applications Microbial Production of Biopolymer and Polymer Precursors*. Caister Academic Press. USA.
- Suriawiria, U. 2005. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Papas Sinar Sinanti
- Sutedjo, M. 1996. *Mikrobiologi Tanah*. Jakarta: Rineka Cipta
- Sutherland, I. W. 1998. Microbial Exopolysaccharides-Structural Subtleties and their consequences. *Pure and Application Chemical*. Vol.69 (9): 1911-1917.
- Sutherland, I. W. 2001. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal* 11, 663-674.
- Tallon, R., P. Bressollier dan M.C. Urdaci. 2006. Isolation and Characterization of Two Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus plantarum* EP56
- Trenggono dan Sutardi. 1990. *Biokimia dan Teknologi Pasca Panen*. Yogyakarta: UGM Press.
- Trabelsi, I., Ben Slima, S., Chaabane, H., Salah Riadh, B. 2015. Purification and Characterization of a Novel Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus* sp, Ca6. *International Journal of Biological Macromolecules* 74(2015) 541-546.
- Triantarti., dan Santoso, H. 2007. Pengaruh Substitusi terhadap Sukrosa Murni oleh Nira Tebu sebagai Sumber Karbon pada Fermentasi Produksi Dekstran. *Jurnal Ilmu Dasar*. Vol 8. No. 2 : Pusat Penelitian Perkebunan Gula Surabaya.
- Unagul, P., Asantachai, C., Phadungruengluij, S., Suphantarika, M., Tanticharoen, M., dan Verduyn, C. 2007. Coconut water as a medium additive for the production of docosahexaenoic acid (C22:6 n3) by *Schizoxhytrium mangrovei* Sk-02. *Bioresource Technology*. 98, 281-287.
- Utami, P. 2008. *Buku Pintar Tanaman Obat*. Jakarta: Agromedia Pustaka
- Usmiati, S. 2012. Daging Tahan Simpan dengan Bakteriosin. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian* 34(2) : 12-14.

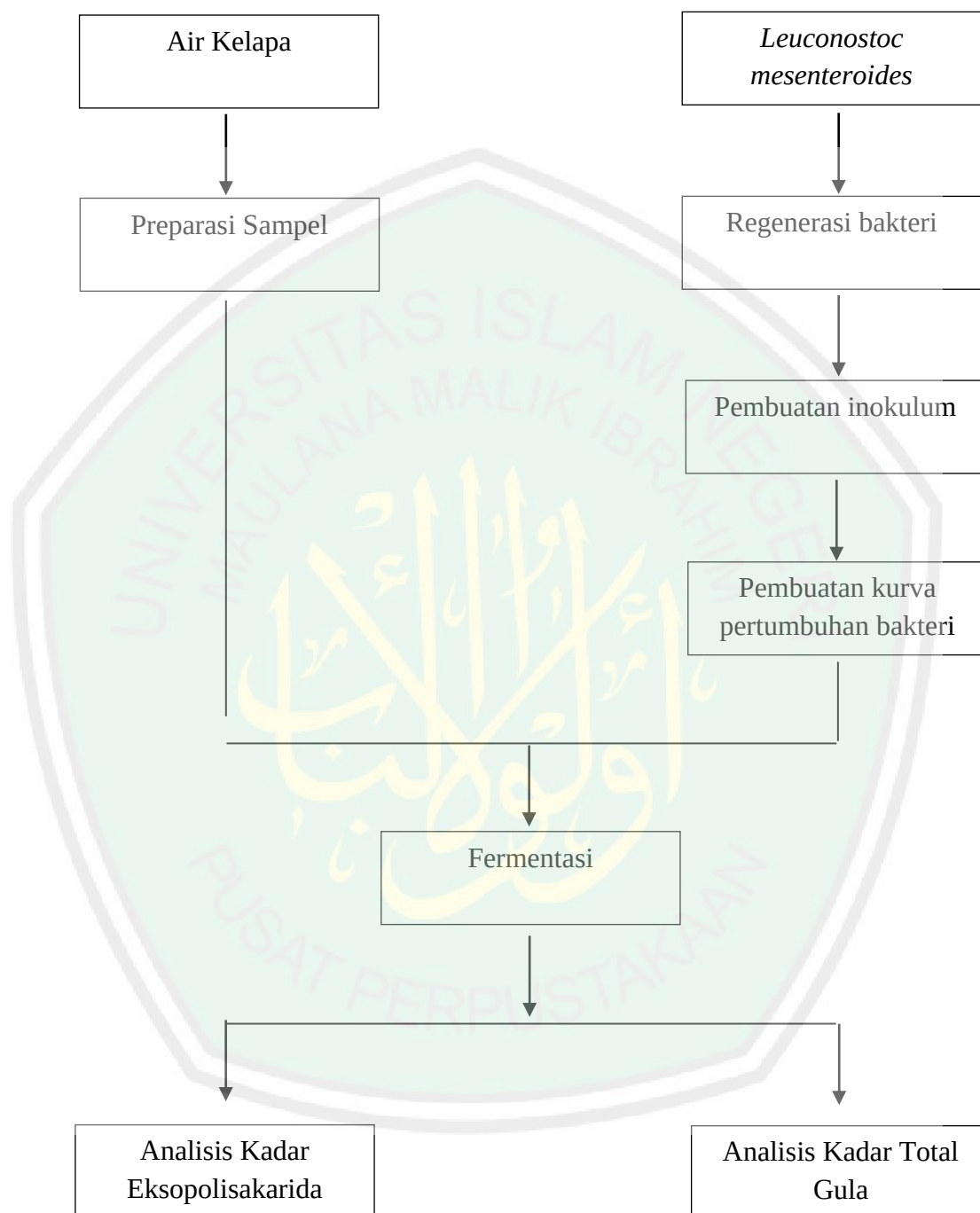
- Vahab, A.A. 1424 H. 2004. *Pengantar Psikologi Islam*. Bandung: Penerbit Pustaka.
- Van, H., Avishek, M dan Arun, G. 2002. Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian Journal Microbiology*, 52(1) 3-12.
- Vanhooren, P dan Vandamme, E.J. 1998. Biosynthesis, physiological role, use and fermentation process characteristics of bacterial exopolysaccharides. *Recent Res. Devel. Fermen. Bioeng.* 1, 253-299.
- Velasco, S., Arskold, E., Paese, M., Grage, H., Irastorza, A., Radstrom, P., Niel, E.W.J.V.2006. Environmental factors influencing growth of and exopolysaccharide formation by *Pediococcus parvulus*. *International Journal of Food Microbiology* 111 (2006) 252-258.
- Veronese, F.M., P. Caliceti. In: Meibohm (Editor). 2006. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Biotech Drugs: Principle and Case Studies in Drug Development. Wiley CH. Weinheim. Pp 272-273
- Vettori, M., Franchetti, S.M.M., dan Contiero, J. 2012. Structural characterization of a new dextran with a low degree of branching produced by *Leuconostoc mesenteroides* FT045B dextranase. *Carbohydrate Polymers* 88. 1440-1444.
- Volk, W.A dan Wheeler, M.F. 1998. *Mikrobiologi Dasar Edisi Kelima*. Jakarta: Erlangga
- Vu, M.H. 2009. The chemistry of rancidity in foods in J.C. Allen and R. J. Hamilton, editor. Rancidity in Foods. London: *Applied Science Publisher*.
- Wahyudi. 1997. Produksi Alkohol oleh *Saccharomyces cerevisiae* dengan Tetes Tebu (Molase) sebagai Bahan Baku Utama. *Skripsi* Diterbitkan. Bogor: Fakultas Teknik Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Waluyo, L. 2007. *Mikrobiologi Umum*. Malang: UPT Penerbit UMM.
- Warisno.2004. *Mudah dan Praktis Membuat Nata De Coco*. Jakarta : Agromedia
- Widayati, E., Sutarno dan Setyaningsih, R. 2002. Seleksi Isolat Bakteri untuk Fermentasi Asam Laktat dari Air Kelapa Varietas Rubescent (*Cocos nucifera* L.var rubescent). *Jurnal Biologi*. Vol 4.No.4 :Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Woodroof, J.G. 1979. Coconut Production Processing Product. AVI Publ. Company. INC., Westport, Connecticut
- Yanuar, S.E dan Sutrisno, A. 2015. Minuman Probiotik dari Air Kelapa Muda dengan Starter Bakteri Asam Laktat *Lactobacillus casei*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* Vol.3 No.3 p.909-917:Universitas Brawijaya Malang.

- Zaki, A. 2006. *Pendekatan Strukturalisme Linguistik dalam Tafsir Al-Qur'an Konteporer "ala" M.Shahrur*. Yogyakarta: Elsaq.
- Zhang, L., Liu, C., Li, D., Zhao, Y., Zhang, X., Zeng, X., Yang, Zdan Li, S.2013. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *International Journal of Biological Macromolecules* 54 (2013) 270-275.
- Zhou, K., dkk. 2016. Production Purification and Structural Study of an Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* BC-25. *Carbohydrate Polymers* (16) 30132-1.
- Zubaidah, E., Liasari, Y dan Saparianti, E. 2008. Produksi Eksopolisakarida oleh *Lactobacillus plantarum* B2 pada Produk Probiotik Berbasis Buah Murbei. *Jurnal Teknologi Pertanian* Vol. 9 No.1. 59-68.



LAMPIRAN

Lampiran 1: Rancangan Penelitian



Lampiran 2: Skema Kerja

➤ Sterilisasi Alat

Seperangkat alat gelas

- Dicuci bersih dan dikeringkan
- Dibungkus dengan kertas
- Dimasukkan kedalam plastik tahan panas
- Dilakukan sterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 15 psi selama 15 menit

Hasil

➤ Pembuatan Media

- Media MRSA (*de Man Rogosa and Sharpe Agar*)

MRSA (*de Man Rogosa and Sharpe Agar*)

- Ditimbang sebanyak 6,82 gram
- Dilarutkan dengan 100 mL aquades
- Dipanaskan sampai mendidih dan diaduk
- Dimasukkan kedalam erlenmeyer 250 mL
- Disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 15 psi
- Didinginkan dalam keadaan miring

Hasil

- Media MRSB (*de Man Rogosa and Sharpe Broth*)

MRSB(*de Man Rogosa and Sharpe Broth*)

- Ditimbang sebanyak 5,515 gram
- Dilarutkan dengan 100 mL aquades
- Dipanaskan sampai mendidih dan diaduk
- Dimasukkan kedalam erlenmeyer 250 mL
- Disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 15 psi, selama 15 menit.
- Didinginkan dalam keadaan miring

Hasil

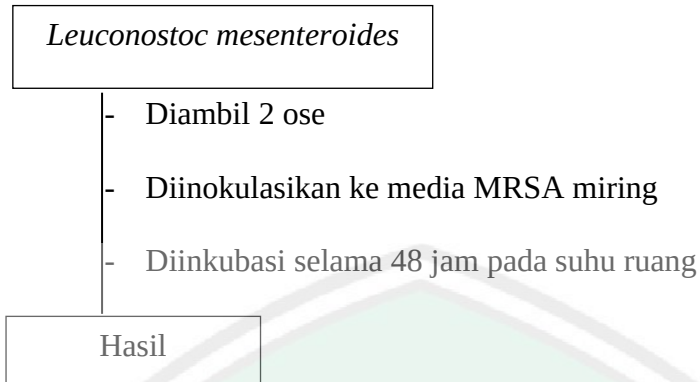
- Preparasi Air Kelapa

Air Kelapa

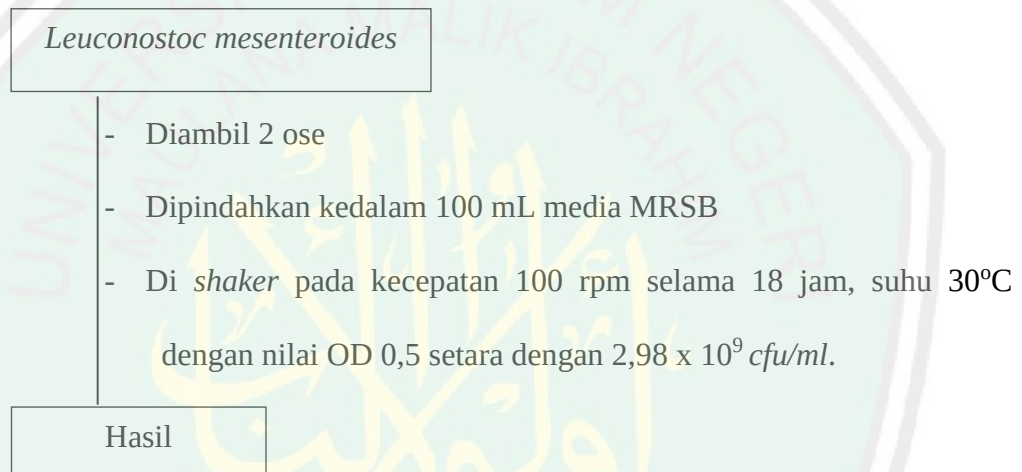
- Disaring hingga terpisah dengan residu
- Diukur pH hingga 6,5
- Apabila pH lebih dari 6,5 ditambahkan beberapa tetes HCl.
Apabila pH kurang dari 6,5 ditambahkan beberapa tetes NaOH
- Dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL
- Disterilisasi dalam *autoclave*
- Disimpan di *freezer* dalam wadah tertutup

Hasil

- Regenerasi *Leuconostoc mesenteroides*



- Pembuatan Inokulum



- Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri

Leuconostoc mesenteroides

- Diinokulasikan inokulum sebanyak 2% ke dalam media yang berisi media MRSB sebanyak 200 mL
- Diamati pertumbuhan bakteri dengan dipipet 4 mL suspensi bakteri
- Dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD) berdasarkan nilai absorbansi setiap 4 jam pengukuran dilakukan selama 48 jam. Pengukuran dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm.

Hasil

- Produksi Eksopolisakarida

- Pengaruh Penambahan Sukrosa dan Lama Fermentasi terhadap Produksi Eksopolisakarida dari Air Kelapa

Air Kelapa

- Disterilkan 100 mL yang sudah di ukur pH menjadi 6,5
- Ditambahkan sukrosa dengan variasi konsentrasi 1%, 2%, dan 3%.
- Ditambahkan masing-masing sebanyak 10% inokulum
- Di *shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama waktu inkubasi 24 jam, 32 jam, dan 48 jam pada suhu ruang.

Hasil

- Ekstraksi Eksopolisakarida dari Media Fermentasi Air Kelapa

Air Kelapa

- Diambil 25 mL dan dimasukkan kedalam sentrifuge
- Disentrifugasi dengan sentrifuge dingin 4°C pada kecepatan 5000 rpm, selama 15 menit.
- Supernatan yang mengandung EPS diambil dan ditambah etanol dingin 96% (2 kali volume atau 50 mL) dan dibiarkan selama 24 jam dalam lemari pendingin.
- Pelet yang didapat dikeringkan dengan menggunakan *freeze dry*
- Ditentukan berat eksopolisakarida kering dengan menggunakan persamaan (3.2)

Hasil

- Uji Kadar Total Gula dengan Metode Fenol H_2SO_4
 - Pembuatan Kurva Standar dengan Metode Fenol H_2SO_4

Larutan Glukosa 0, 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm

- Diambil masing-masing 2 mL
- Dimasukkan kedalam tabung reaksi
- Ditambahkan 1 mL larutan fenol 5% (b/v)
- Ditambahkan 5 mL H_2SO_4 pekat
- Dibiarkan selama 10 menit
- Dikocok, ditempatkan dalam penangas air selama 15 menit
- Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm

Hasil

- Penetapan Kadar Total Gula dengan Metode Fenol H_2SO_4

Air Kelapa

- Diambil 2 mL
- Dimasukkan kedalam tabung reaksi
- Ditambahkan 1 mL larutan fenol 5% (b/v) dan dikocok
- Ditambahkan 5 mL asam sulfat pekat dengan cepat di lemari asap
- Dibiarkan selama 10 menit, dikocok, ditempatkan dalam penangas air selama 15 menit dengan suhu 100°C
- Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm.

Hasil

Lampiran 3: Pembuatan Larutan

1. Pembuatan Larutan NaOH 0,1 N

$$N = M \times \text{Valensi}$$

$$M = \frac{\text{mol}}{V}$$

$$\text{Mol} = \frac{m}{M_r}$$

$$N = \frac{m/M_r}{V}$$

$$0,1 \text{ N} = \frac{m/40}{0,25 \text{ L}}$$

$$0,1 \text{ N} = \frac{m \times 4}{40}$$

$$m = 1 \text{ gr}$$

Ket : m: Massa NaOH

Mr: Massa relative NaOH (40 gr/mol)

Cara pembuatan: Ditimbang 1 gram NaOH dan dimasukkan kedalam *beaker glass* 100 mL kemudian ditambah dengan aquades secukupnya sampai NaOH larut, selanjutnya dimasukkan larutan kedalam labu ukur 250 mL, ditandabatkan dan dihomogenkan.

2. Pembuatan Larutan Fenol 5% (b/v)

$$\text{Fenol } 5\% \text{ (b/v)} = \frac{5 \text{ gram fenol}}{100 \text{ mL akuades}}$$

Cara pembuatan: Sebanyak 5 gram fenol ditimbang menggunakan neraca analitik, kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass* 100 mL, ditambahkan akuades dan diaduk hingga larut. Selanjutnya dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan akuades sampai tanda batas dan dihomogenkan.

3. Pembuatan Larutan NaCl 0,89%

Larutan NaCl 0,89% dibuat dengan menimbang sebanyak 0,89 gram NaCl dan dilarutkan dengan aquades hingga 100 mL.

4. Pembuatan Larutan NaOH 0,5 N

Menghitung normalitas NaOH

$$\text{Normalitas} = M \times v$$

$$\begin{aligned}\text{Molaritas} &= \frac{\text{mol}}{\text{volume (L)}} \\ &= \frac{\frac{m}{M_r}}{v} \times V\end{aligned}$$

Keterangan: M = Molaritas
v = Valensi
m = Massa (gram)
Mr = Massa molekul relatif (g/mol)
V = Volume pelarut (Liter)

$$\text{Normalitas NaOH} = \frac{\frac{m}{40 \text{ g/mol}}}{\frac{1}{4 \text{ L}}} \times \text{valensi NaOH}$$

$$0,5 \text{ N} = \frac{4 \cdot m}{40 \text{ g/mol}} \times 1$$

$$0,5 \text{ N} \times 40 \text{ g/mol} = 4 \cdot m$$

$$m = \frac{0,5 \text{ N} \times 40 \text{ g/mol}}{4}$$

$$= 5 \text{ gram}$$

NaOH dengan konsentrasi 0,5 N dibuat dengan cara ditimbang padatan NaOH sebanyak 5 gram kemudian dilarutkan dengan akuades sampai larut sempurna, selanjutnya dimasukkan ke dalam labu ukur 250 mL, kemudian ditandabatkan dengan aquades dan dihomogenkan.

Lampiran 4. Kurva Standar Glukosa

1. Pembuatan Konsentrasi Glukosa Standar 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm

$$\text{Stok glukosa baku} = \frac{100 \text{ mg glukosa anhidrat}}{0,1 \text{ L akuades}} = 1000 \text{ ppm}$$

Cara pembuatan larutan stok 1000 ppm : ditimbang glukosa sebanyak 100 mg, kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass*, selanjutnya ditambahkan dengan aquades secukupnya sampai glukosa terlarut. Selanjutnya larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, kemudian ditandabatkan dan dihomogenkan. Larutan ini akan digunakan sebagai larutan stok untuk pembuatan larutan glukosa standar.

Pembuatan larutan glukosa 10, 20, 30, 40, 50 dan 60 ppm dapat dilakukan dengan pengenceran larutan stok glukosa baku melalui perhitungan sebagai berikut:

a. Konsentrasi 10 ppm:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 10 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1 \text{ mL}$$

b. Konsentrasi 20 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 20 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 2 \text{ mL}$$

c. Konsentrasi 30 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 30 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 3 \text{ mL}$$

d. Konsentrasi 40 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 40 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 4 \text{ mL}$$

e. Konsentrasi 50 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 50 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 5 \text{ mL}$$

f. Konsentrasi 60 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

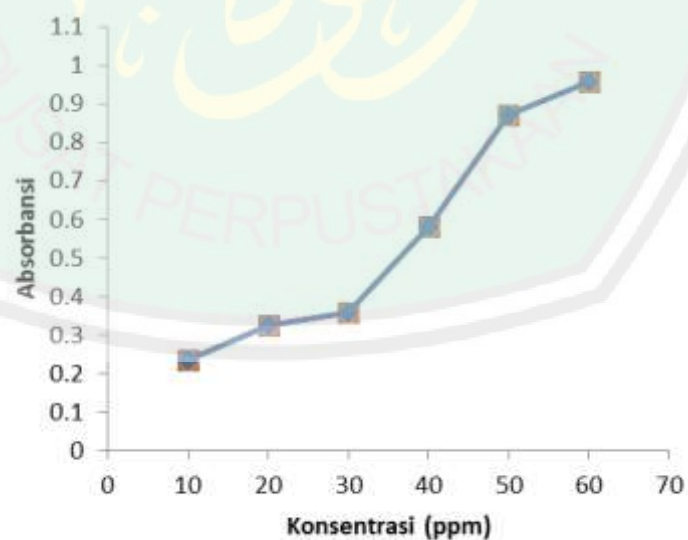
$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 60 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 6 \text{ mL}$$

2. Kurva Standar Glukosa

Tabel L.4.1 Data absorbansi glukosa

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
10	0,2346
20	0,3252
30	0,3593
40	0,5810
50	0,8715
60	0,9578



Gambar L.4.1 Kurva standar glukosa

Lampiran 5. Kadar Gula Metode Sulfat Fenol

1. Analisis Kadar Gula Bahan Baku

Kadar gula total bahan baku air kelapa dianalisis menggunakan metode Sulfat-Fenol dan diukur absorbansinya dengan Spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 490 nm. Data hasil absorbansi yang didapat kemudian diplotkan ke dalam persamaan linier kurva standar glukosa yaitu $y = 0,015x + 0,007$ dengan y adalah absorbansi dan x adalah variabel yang dicari yakni kadar gula total bahan baku air kelapa:

$$y = 0,015x + 0,007$$

$$0,2622 - 0,007 = 0,015x$$

$$0,2522 = 0,015x$$

$$x = 16,81 \text{ ppm}$$

$$\text{Konsentrasi analisa} = 0,1 \text{ gr}/250 \text{ mL}$$

$$= 100 \text{ mg}/0,25 \text{ L}$$

$$= 400 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\ &= \frac{16,81 \text{ ppm} \times 100\%}{400 \text{ ppm}} \\ &= 1,681\% \end{aligned}$$

kadar gula bahan baku dapat dilihat pada Tabel L.5.1 :

Tabel L.5.1 Kadar total gula bahan baku

Sampel	Kadar Total Gula (%)			Rata-rata (%)
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	
Bahan baku air kelapa	1,681	2,816	3,196	2,564

2. Analisis Kadar Gula Awal Sebelum Fermentasi

Analisis kadar total gula sampel sebelum fermentasi dilakukan setelah proses penambahan yeast extract dan sukrosa 1%, 2%, dan 3% (b/v). Hasil absorbansi sampel dapat dilihat pada Tabel L.5.2.1 :

Tabel L.5.2.1 Absorbansi sampel sebelum fermentasi

Konsentrasi Sukrosa	Hasil Absorbansi		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
1% (b/v)	0,2962	0,2338	0,2023
2% (b/v)	0,2716	0,3228	0,2164
3% (b/v)	0,3884	0,4008	0,3133

Data hasil absorbansi yang didapat selanjutnya diplotkan ke persamaan linier kurva standar glukosa yaitu $y = 0,015x + 0,007$ dengan y adalah absorbansi dan x adalah variabel yang dicari yakni kadar gula awal sebelum fermentasi:

Sukrosa 1% Ulangan I

$$y = 0,015x + 0,007$$

$$0,2962 - 0,007 = 0,015x$$

$$0,2892 = 0,015x$$

$$x = 19,28$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi analisa} &= 0,1 \text{ gr}/250 \text{ mL} \\ &= 100 \text{ mg}/0,25 \text{ L} \\ &= 400 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\ &= \frac{19,28 \times 100\%}{400} \\ &= 4,82\%\end{aligned}$$

Sukrosa 1% Ulangan II

$$y = 0,015x + 0,007$$

$$0,2338 - 0,007 = 0,015x$$

$$0,2268 = 0,015x$$

$$x = 15,12$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi analisa} &= 0,1 \text{ gr}/250 \text{ mL} \\ &= 100 \text{ mg}/0,25 \text{ L} \\ &= 400 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{15,12 \times 100\%}{400} \\
 &= 3,78\%
 \end{aligned}$$

Sukrosa 1% Ulangan III

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,2023 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,1953 &= 0,015x \\
 x &= 13,02
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= 0,1 \text{ gr}/250 \text{ mL} \\
 &= 100 \text{ mg}/0,25 \text{ L} \\
 &= 400 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{13,02 \times 100\%}{400} \\
 &= 3,25\%
 \end{aligned}$$

Sukrosa 2% Ulangan I

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,2716 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,2646 &= 0,015x \\
 x &= 17,64
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= 0,1 \text{ gr}/250 \text{ mL} \\
 &= 100 \text{ mg}/0,25 \text{ L} \\
 &= 400 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{17,64 \times 100\%}{400} \\
 &= 4,41\%
 \end{aligned}$$

Sukrosa 2% Ulangan II

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,3228 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,3158 &= 0,015x \\
 x &= 21,05
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi analisa} &= 0,1 \text{ gr}/250 \text{ mL} \\ &= 100 \text{ mg}/0,25 \text{ L} \\ &= 400 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\ &= \frac{21,05 \times 100\%}{400} \\ &= 5,26\%\end{aligned}$$

Sukrosa 2% Ulangan III

$$\begin{aligned}y &= 0,015x + 0,007 \\ 0,2164 - 0,007 &= 0,015x \\ 0,2094 &= 0,015x \\ x &= 13,96\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi analisa} &= 0,1 \text{ gr}/250 \text{ mL} \\ &= 100 \text{ mg}/0,25 \text{ L} \\ &= 400 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\ &= \frac{13,96 \times 100\%}{400} \\ &= 3,49\%\end{aligned}$$

Sukrosa 3% Ulangan I

$$\begin{aligned}y &= 0,015x + 0,007 \\ 0,3884 - 0,007 &= 0,015x \\ 0,3814 &= 0,015x \\ x &= 25,43\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi analisa} &= 0,1 \text{ gr}/250 \text{ mL} \\ &= 100 \text{ mg}/0,25 \text{ L} \\ &= 400 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\ &= \frac{25,43 \times 100\%}{400} \\ &= 6,36\%\end{aligned}$$

Sukrosa 3% Ulangan II

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,4008 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,3938 &= 0,015x \\
 x &= 26,25
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= 0,1 \text{ gr}/250 \text{ mL} \\
 &= 100 \text{ mg}/0,25 \text{ L} \\
 &= 400 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{26,25 \times 100\%}{400} \\
 &= 6,56\%
 \end{aligned}$$

Sukrosa 3% Ulangan III

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,3133 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,3063 &= 0,015x \\
 x &= 20,42
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= 0,1 \text{ gr}/250 \text{ mL} \\
 &= 100 \text{ mg}/0,25 \text{ L} \\
 &= 400 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{20,42 \times 100\%}{400} \\
 &= 5,10\%
 \end{aligned}$$

Kadar gula total sebelum fermentasi dapat dilihat pada Tabel L.5.2.2:

Tabel L.5.2.2 Kadar gula total awal sebelum fermentasi

Konsentrasi Sukrosa	Kadar Gula (%)		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
1% (b/v)	4,82	3,78	3,25
2% (b/v)	4,41	5,26	3,49
3% (b/v)	6,36	6,56	5,10

3. Analisis Kadar Gula Total Setelah Fermentasi

Data absorbansi gula total setelah fermentasi dapat dilihat pada Tabel

L.5.3.1:

Tabel L.5.3.1 Absorbansi gula total setelah fermentasi

Perlakuan	Hasil Absorbansi		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
K ₁ L ₁	0,6341	0,3111	0,4146
K ₁ L ₂	0,6223	0,3304	0,3556
K ₁ L ₃	0,5497	0,5374	0,3426
K ₂ L ₁	0,3766	0,3980	0,7585
K ₂ L ₂	0,3423	0,2805	0,6870
K ₂ L ₃	0,3119	0,3793	0,5150
K ₃ L ₁	0,4968	0,3578	0,9087
K ₃ L ₂	0,8894	0,4851	0,8971
K ₃ L ₃	0,4366	0,3067	0,7101

Data perolehan absorbansi selanjutnya diplotkan ke dalam persamaan linier kurva standar glukosa yakni $y = 0,015x + 0,007$ dengan y adalah absorbansi dan x adalah variabel yang dicari yaitu kadar total gula setelah fermentasi:

K₁L₁ Ulangan I

$$y = 0,015x + 0,007$$

$$0,6341 - 0,007 = 0,015x$$

$$0,6271 = 0,015x$$

$$x = 41,81 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi analisa} &= 0,2 \text{ gr/100mL} \\ &= 200 \text{ mg/0,1 L} \\ &= 2000 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$\text{Kadar gula (\%)} = \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}}$$

$$= \frac{41,81 \times 100\%}{2000}$$

$$= 2,09\%$$

K₁L₂ Ulangan II

$$y = 0,015x + 0,007$$

$$0,6223 - 0,007 = 0,015x$$

$$0,6153 = 0,015x$$

$$x = 41,02 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi analisa} &= 0,2 \text{ gr}/100\text{mL} \\ &= 200 \text{ mg}/0,1 \text{ L} \\ &= 2000 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\ &= \frac{41,02 \times 100\%}{2000} \\ &= 2,05\%\end{aligned}$$

K₁L₃ Ulangan I

$$\begin{aligned}y &= 0,015x + 0,007 \\ 0,5497 - 0,007 &= 0,015x \\ 0,5427 &= 0,015x \\ x &= 36,18 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi analisa} &= 0,2 \text{ gr}/100\text{mL} \\ &= 200 \text{ mg}/0,1 \text{ L} \\ &= 2000 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\ &= \frac{36,18 \times 100\%}{2000} \\ &= 1,81\%\end{aligned}$$

K₂L₁ Ulangan I

$$\begin{aligned}y &= 0,015x + 0,007 \\ 0,3766 - 0,007 &= 0,015x \\ 0,3696 &= 0,015x \\ x &= 24,64 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi analisa} &= 0,1 \text{ gr}/100\text{mL} \\ &= 100 \text{ mg}/0,1 \text{ L} \\ &= 1000 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\ &= \frac{24,64 \times 100\%}{1000} \\ &= 2,46\%\end{aligned}$$

K₂L₂ Ulangan I

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,3423 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,3353 &= 0,015x \\
 x &= 22,35 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= 0,1 \text{ gr/100mL} \\
 &= 100 \text{ mg/0,1 L} \\
 &= 1000 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{22,35 \times 100\%}{1000} \\
 &= 2,24\%
 \end{aligned}$$

K₂L₃ Ulangan I

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,3119 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,3059 &= 0,015x \\
 x &= 20,33 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= 0,1 \text{ gr/100mL} \\
 &= 100 \text{ mg/0,1 L} \\
 &= 1000 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{20,33 \times 100\%}{1000} \\
 &= 2,03\%
 \end{aligned}$$

K₃L₁ Ulangan I

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,4968 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,4898 &= 0,015x \\
 x &= 32,65 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= 0,1 \text{ gr/100mL} \\
 &= 100 \text{ mg/0,1 L} \\
 &= 1000 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{32,65 \times 100\%}{1000} \\
 &= 3,27\%
 \end{aligned}$$

K₃L₂ Ulangan I

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,8894 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,8824 &= 0,015x \\
 x &= 58,83 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= 0,2 \text{ gr/100mL} \\
 &= 200 \text{ mg/0,1 L} \\
 &= 2000 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{58,83 \times 100\%}{2000} \\
 &= 2,94\%
 \end{aligned}$$

K₃L₃ Ulangan I

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,4366 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,4296 &= 0,015x \\
 x &= 28,64 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= 0,1 \text{ gr/100mL} \\
 &= 100 \text{ mg/0,1 L} \\
 &= 1000 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{28,64 \times 100\%}{1000} \\
 &= 2,86\%
 \end{aligned}$$

K₁L₁ Ulangan II

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,3111 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,3041 &= 0,015x \\
 x &= 20,27 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi analisa} &= 0,2 \text{ gr}/100\text{mL} \\ &= 200 \text{ mg}/0,1 \text{ L} \\ &= 2000 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\ &= \frac{29,27 \times 100\%}{2000} \\ &= 1,01\%\end{aligned}$$

K₁L₂ Ulangan II

$$\begin{aligned}y &= 0,015x + 0,007 \\ 0,3304 - 0,007 &= 0,015x \\ 0,3234 &= 0,015x \\ x &= 21,56 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi analisa} &= 0,1 \text{ gr}/100\text{mL} \\ &= 100 \text{ mg}/0,1 \text{ L} \\ &= 1000 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\ &= \frac{21,56 \times 100\%}{1000} \\ &= 2,16\%\end{aligned}$$

K₁L₃ Ulangan II

$$\begin{aligned}y &= 0,015x + 0,007 \\ 0,5374 - 0,007 &= 0,015x \\ 0,5304 &= 0,015x \\ x &= 35,36 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi analisa} &= 0,5 \text{ gr}/100\text{mL} \\ &= 500 \text{ mg}/0,1 \text{ L} \\ &= 5000 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\ &= \frac{35,36 \times 100\%}{5000} \\ &= 0,71\%\end{aligned}$$

K₂L₁ Ulangan II

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,3980 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,391 &= 0,015x \\
 x &= 26,07 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= 0,2 \text{ gr/100mL} \\
 &= 200 \text{ mg/0,1 L} \\
 &= 2000 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{26,07 \times 100\%}{2000} \\
 &= 1,30\%
 \end{aligned}$$

K₂L₂ Ulangan II

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,2805 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,2735 &= 0,015x \\
 x &= 18,23 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= 0,1 \text{ gr/250mL} \\
 &= 100 \text{ mg/0,25 L} \\
 &= 400 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{18,23 \times 100\%}{400} \\
 &= 4,56\%
 \end{aligned}$$

K₂L₃ Ulangan II

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,3793 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,3723 &= 0,015x \\
 x &= 24,82 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= 0,1 \text{ gr/100mL} \\
 &= 100 \text{ mg/0,1 L} \\
 &= 1000 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{24,82 \times 100\%}{1000} \\
 &= 2,48\%
 \end{aligned}$$

K₃L₁ Ulangan II

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,3578 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,3508 &= 0,015x \\
 x &= 23,39 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= 0,2 \text{ gr/100mL} \\
 &= 200 \text{ mg/0,1 L} \\
 &= 2000 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{23,39 \times 100\%}{2000} \\
 &= 1,17\%
 \end{aligned}$$

K₃L₂ Ulangan II

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,4851 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,4781 &= 0,015x \\
 x &= 31,87 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= 0,1 \text{ gr/100mL} \\
 &= 100 \text{ mg/0,1 L} \\
 &= 1000 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{31,87 \times 100\%}{1000} \\
 &= 3,19\%
 \end{aligned}$$

K₃L₃ Ulangan II

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,3067 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,2997 &= 0,015x \\
 x &= 19,98 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= 0,2 \text{ gr/100mL} \\
 &= 200 \text{ mg/0,1 L} \\
 &= 2000 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{19,98 \times 100\%}{2000} \\
 &= 0,99\%
 \end{aligned}$$

K₁L₁ Ulangan III

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,4146 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,4076 &= 0,015x \\
 x &= 27,17 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= 0,2 \text{ gr/100mL} \\
 &= 200 \text{ mg/0,1 L} \\
 &= 2000 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{27,17 \times 100\%}{2000} \\
 &= 1,36\%
 \end{aligned}$$

K₁L₂ Ulangan III

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,3556 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,3486 &= 0,015x \\
 x &= 23,24 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= 0,2 \text{ gr/100mL} \\
 &= 200 \text{ mg/0,1 L} \\
 &= 2000 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{23,34 \times 100\%}{2000} \\
 &= 1,16\%
 \end{aligned}$$

K₁L₃ Ulangan III

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,3426 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,3356 &= 0,015x \\
 x &= 22,37 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= 0,2 \text{ gr/100mL} \\
 &= 200 \text{ mg/0,1 L} \\
 &= 2000 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{22,37 \times 100\%}{2000} \\
 &= 1,12\%
 \end{aligned}$$

K₂L₁ Ulangan III

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,7585 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,7515 &= 0,015x \\
 x &= 50,1 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= 0,2 \text{ gr/100mL} \\
 &= 200 \text{ mg/0,1 L} \\
 &= 2000 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{50,1 \times 100\%}{2000} \\
 &= 2,50\%
 \end{aligned}$$

K₂L₂ Ulangan III

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,6870 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,68 &= 0,015x \\
 x &= 45,33 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi analisa} &= 0,2 \text{ gr/100mL} \\ &= 200 \text{ mg/0,1 L} \\ &= 2000 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\ &= \frac{45,33 \times 100\%}{2000} \\ &= 2,27\%\end{aligned}$$

K₂L₃ Ulangan III

$$\begin{aligned}y &= 0,015x + 0,007 \\ 0,5150 - 0,007 &= 0,015x \\ 0,508 &= 0,015x \\ x &= 33,87 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi analisa} &= 0,2 \text{ gr/100mL} \\ &= 200 \text{ mg/0,1 L} \\ &= 2000 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\ &= \frac{33,87 \times 100\%}{2000} \\ &= 1,69\%\end{aligned}$$

K₃L₁ Ulangan III

$$\begin{aligned}y &= 0,015x + 0,007 \\ 0,9087 - 0,007 &= 0,015x \\ 0,917 &= 0,015x \\ x &= 60,11 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi analisa} &= 0,2 \text{ gr/100mL} \\ &= 200 \text{ mg/0,1 L} \\ &= 2000 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\ &= \frac{60,11 \times 100\%}{2000} \\ &= 3,01\%\end{aligned}$$

K₃L₂ Ulangan III

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,8971 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,8901 &= 0,015x \\
 x &= 59,34 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= 0,2 \text{ gr/100mL} \\
 &= 200 \text{ mg/0,1 L} \\
 &= 2000 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{59,34 \times 100\%}{2000} \\
 &= 2,97\%
 \end{aligned}$$

K₃L₃ Ulangan III

$$\begin{aligned}
 y &= 0,015x + 0,007 \\
 0,7101 - 0,007 &= 0,015x \\
 0,7031 &= 0,015x \\
 x &= 46,87 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= 0,2 \text{ gr/100mL} \\
 &= 200 \text{ mg/0,1 L} \\
 &= 2000 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{46,87 \times 100\%}{2000} \\
 &= 2,34\%
 \end{aligned}$$

kadar total gula setelah fermentasi dapat dilihat pada Tabel L.5.3.2:

Tabel L.5.3.2 Kadar total gula setelah fermentasi

Perlakuan	Kadar Gula (%)			Rata-rata (%)
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	
K ₁ L ₁	2,09	1,01	1,36	1,49
K ₁ L ₂	2,05	2,16	1,16	1,79
K ₁ L ₃	1,81	0,71	1,12	1,21
K ₂ L ₁	2,46	1,30	2,50	2,09
K ₂ L ₂	2,24	4,56	2,27	3,02
K ₂ L ₃	2,03	2,48	1,69	2,07
K ₃ L ₁	3,27	1,17	3,01	2,48
K ₃ L ₂	2,94	3,19	2,97	3,03
K ₃ L ₃	2,86	0,99	2,34	6,19

4. Analisis Kadar Gula Terpakai pada Proses Fermentasi

Analisis kadar gula setelah fermentasi dapat diketahui dari pengurangan kadar total gula awal sebelum fermentasi dengan kadar gula setelah fermentasi. Perolehan kadar gula yang terpakai saat proses fermentasi ditunjukkan pada Tabel L.5.4.1:

Tabel L.5.4.1 Kadar gula terpakai pada proses fermentasi ulangan 1

Perlakuan	Kadar Gula Sebelum Fermentasi (%)	Kadar Gula Sesudah Fermentasi (%)	Kadar Gula Terpakai (%)
K ₁ L ₁	4,82	2,09	2,73
K ₁ L ₂	4,82	2,05	2,77
K ₁ L ₃	4,82	1,81	3,01
K ₂ L ₁	4,41	2,46	1,95
K ₂ L ₂	4,41	2,24	2,17
K ₂ L ₃	4,41	2,03	2,38
K ₃ L ₁	6,36	3,27	3,09
K ₃ L ₂	6,36	2,94	3,42
K ₃ L ₃	6,36	2,86	3,50

Tabel L.5.4.2 Kadar gula terpakai pada proses fermentasi ulangan 2

Perlakuan	Kadar Gula Sebelum Fermentasi (%)	Kadar Gula Sesudah Fermentasi (%)	Kadar Gula Terpakai (%)
K ₁ L ₁	3,78	1,01	2,77
K ₁ L ₂	3,78	2,16	1,62
K ₁ L ₃	3,78	0,71	3,07
K ₂ L ₁	5,26	1,30	3,96
K ₂ L ₂	5,26	4,56	0,70
K ₂ L ₃	5,26	2,48	2,78
K ₃ L ₁	6,56	1,17	5,39
K ₃ L ₂	6,56	3,19	3,37
K ₃ L ₃	6,56	0,99	5,57

Tabel L.5.4.3 Kadar gula terpakai pada proses fermentasi ulangan 3

Perlakuan	Kadar Gula Sebelum Fermentasi (%)	Kadar Gula Sesudah Fermentasi (%)	Kadar Gula Terpakai (%)
K ₁ L ₁	3,25	1,36	1,89
K ₁ L ₂	3,25	1,16	2,09
K ₁ L ₃	3,25	1,12	2,13
K ₂ L ₁	3,49	2,50	0,99
K ₂ L ₂	3,49	2,27	1,22
K ₂ L ₃	3,49	1,69	1,80
K ₃ L ₁	5,10	3,01	2,09
K ₃ L ₂	5,10	2,97	2,13
K ₃ L ₃	5,10	2,34	2,76

Tabel L.5.4.4 Kadar gula terpakai rata-rata

Perlakuan	Ulangan I (%)	Ulangan II (%)	Ulangan III (%)	Jumlah (%)	Rata-rata (%)
K ₁ L ₁	2,73	2,77	1,89	7,39	2,46
K ₁ L ₂	2,77	1,62	2,09	6,48	2,16
K ₁ L ₃	3,01	3,07	2,13	8,21	2,74
K ₂ L ₁	1,95	3,96	0,99	6,90	2,30
K ₂ L ₂	2,17	0,70	1,22	4,09	1,36
K ₂ L ₃	2,38	2,78	1,80	6,96	2,32
K ₃ L ₁	3,09	5,39	2,09	10,57	3,52
K ₃ L ₂	3,42	3,37	2,13	8,92	2,97
K ₃ L ₃	3,50	5,57	2,76	11,83	3,94

Lampiran 6. Analisis Rendemen Eksopolisakarida

1. Perhitungan Berat Eksopolisakarida

Hasil produksi eksopolisakarida dari fermentasi dalam 25 mL media air kelapa ditunjukkan pada Tabel L.6.1:

Tabel L.6.1 Rata-rata berat EPS

Perlakuan	Berat EPS kering (mg)			Rata-rata (mg)
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	
K ₁ L ₁	59,6	58,5	61,4	59,8
K ₁ L ₂	72,7	64,1	47,9	61,6
K ₁ L ₃	69,6	61,2	57,1	62,6
K ₂ L ₁	95,3	81,0	67,2	81,2
K ₂ L ₂	92,3	71,9	67,6	77,3
K ₂ L ₃	58,0	83,0	58,4	80,6
K ₃ L ₁	93,3	77,4	66,3	79,0
K ₃ L ₂	92,0	85,6	75,8	84,5
K ₃ L ₃	110,3	87,9	69,5	89,2

$$\text{Kadar eksopolisakarida (mg/L)} = \frac{\text{Berat EPS kering (mg)}}{\text{Volume media (L)}}$$

Misal pada perlakuan K₁L₁ ulangan I:

$$\begin{aligned} \text{Kadar eksopolisakarida (mg/L)} &= \frac{59,6 \text{ mg}}{0,025 \text{ L}} \\ &= 2384 \text{ mg/L} \end{aligned}$$

Tabel L.6.2 Kadar rata-rata eksopolisakarida

Perlakuan	Kadar Eksopolisakarida (mg/L)			Rata-rata (mg/L)
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	
K ₁ L ₁	2384	2340	2456	2393,33
K ₁ L ₂	2908	2564	1916	2462,66
K ₁ L ₃	2784	2448	2284	2505,33
K ₂ L ₁	3812	3240	2688	3246,66
K ₂ L ₂	3692	2876	2704	3090,66
K ₂ L ₃	2320	3320	2336	2658,66
K ₃ L ₁	3732	3096	2652	3160,00
K ₃ L ₂	3680	3424	3032	3378,66
K ₃ L ₃	4412	3516	2780	3569,33

Lampiran 7. Analisis Kadar Total Gula Eksopolisakarida

Analisis kadar total gula eksopolisakarida dilakukan dengan metode sulfat fenol. Sebelum dilakukan analisa, preparasi sampel yang dilakukan yakni dengan melarutkan 0,01 gr EPS kering ke dalam 250 mL aquades dan dihomogenkan. Data absorbansi total gula EPS dapat dilihat pada Tabel L.7.1:

Tabel L.7.1 Data absorbansi total gula eksopolisakarida

Perlakuan	Absorbansi		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
K ₁ L ₁	0,3396	0,3789	0,3695
K ₁ L ₂	0,4418	0,4720	0,3675
K ₁ L ₃	0,4916	0,4527	0,3780
K ₂ L ₁	0,4244	0,3942	0,4202
K ₂ L ₂	0,2518	0,4553	0,3075
K ₂ L ₃	0,3844	0,3795	0,3535
K ₃ L ₁	0,4261	0,3819	0,2403
K ₃ L ₂	0,5091	0,4705	0,3544
K ₃ L ₃	0,4583	0,4826	0,3577

Data absorbansi dari tabel diatas kemudian diplotkan ke dalam persamaan regresi linier kurva standar glukosa yaitu $y = 0,015x + 0,007$ dengan nilai y adalah absorbansi bahan baku dan x merupakan variabel yang dicari yakni konsentrasi gula yang terkandung dalam hasil eksopolisakarida, misalnya pada perlakuan K₁L₁ ulangan I:

$$y = 0,015x + 0,007$$

$$0,3396 = 0,015x + 0,007$$

$$0,3396 - 0,007 = 0,015x$$

$$x = 22,17 \text{ ppm}$$

$$\text{konsentrasi analisa} = 0,01 \text{ gr/250 mL}$$

$$= 10 \text{ mg/0,25 L}$$

$$= 40 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva} \times 100\%}{\text{Konsentrasi analisa}} \\
 &= \frac{22,17 \times 100\%}{40} \\
 &= 55,43\%
 \end{aligned}$$

Tabel L.7.2 Rata-rata total gula eksopolisakarida

Perlakuan	Kadar Gula (%)			Rata-rata (%)
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	
K ₁ L ₁	55,43	61,98	60,42	59,28
K ₁ L ₂	72,47	77,50	60,08	70,02
K ₁ L ₃	80,77	74,28	61,83	72,29
K ₂ L ₁	69,57	64,53	68,87	67,66
K ₂ L ₂	40,80	74,72	50,08	55,20
K ₂ L ₃	62,90	62,08	57,75	60,91
K ₃ L ₁	69,85	62,48	38,88	57,07
K ₃ L ₂	83,68	77,25	57,90	72,94
K ₃ L ₃	75,22	79,27	58,45	70,98

Lampiran 8. Kurva Pertumbuhan Bakteri

Hasil dari pengukuran *Optical density* (OD) pada suspensi bakteri dengan media air kelapa dan MRSB dapat dilihat sebagai berikut:

Tabel L.8.1 Absorbansi Suspensi Bakteri pada Media Air Kelapa dan MRSB

Jam ke	Air Kelapa	MRSB
	Absorbansi	Absorbansi
4	1,6938	1,8528
8	2,0887	2,3161
12	2,1492	2,3556
16	2,1453	2,2959
20	2,0461	2,2960
24	2,0423	2,2770
28	2,1110	2,3302
32	2,1179	2,4249
36	2,0927	2,3446
40	2,1518	2,3562
44	2,0582	2,3420
48	2,0591	2,3625

Lampiran 9. Perhitungan Jumlah Bakteri Menggunakan Metode TPC

Tabel L.9 Jumlah bakteri

Perlakuan	Ulangan	Jumlah Koloni	Jumlah Bakteri (CFU/mL)	Rata-rata (CFU/mL)
K ₁ L ₁	U1	148	$1,48 \times 10^{13}$	$4,9 \times 10^{12}$
	U2	133	$1,33 \times 10^9$	
	U3	83	$8,30 \times 10^7$	
K ₁ L ₂	U1	270	$2,70 \times 10^{12}$	$9,0 \times 10^{11}$
	U2	277	$2,77 \times 10^9$	
	U3	254	$2,54 \times 10^9$	
K ₁ L ₃	U1	95	$9,50 \times 10^8$	$3,4 \times 10^9$
	U2	106	$1,06 \times 10^9$	
	U3	83	$8,30 \times 10^9$	
K ₂ L ₁	U1	194	$1,94 \times 10^{12}$	$6,5 \times 10^{11}$
	U2	57	$5,70 \times 10^6$	
	U3	48	$4,80 \times 10^8$	
K ₂ L ₂	U1	148	$1,48 \times 10^{12}$	$8,1 \times 10^{11}$
	U2	95	$9,50 \times 10^{11}$	
	U3	116	$1,16 \times 10^8$	
K ₂ L ₃	U1	120	$1,20 \times 10^9$	$9,5 \times 10^8$
	U2	164	$1,64 \times 10^9$	
	U3	215	$2,15 \times 10^7$	
K ₃ L ₁	U1	54	$5,40 \times 10^{11}$	$1,8 \times 10^{11}$
	U2	50	$5,00 \times 10^8$	
	U3	113	$1,13 \times 10^7$	
K ₃ L ₂	U1	112	$1,12 \times 10^9$	$4,2 \times 10^8$
	U2	141	$1,41 \times 10^8$	
	U3	57	$5,70 \times 10^6$	
K ₃ L ₃	U1	169	$1,69 \times 10^7$	$5,6 \times 10^7$
	U2	149	$1,49 \times 10^8$	
	U3	44	$4,40 \times 10^6$	

Perhitungan jumlah bakteri = jumlah koloni x faktor pengenceran (fp)
 $= 148 \times 10^{10} \text{ CFU}/0,1 \text{ mL}$
 $= 1,48 \times 10^{13} \text{ CFU/mL}$

Pengaruh konsentrasi sukrosa dan lama fermentasi terhadap kadar EPS

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Konsentrasi Sukrosa	1	1%	9
	2	2%	9
	3	3%	9
Lama Fermentasi	1	24 jam	9
	2	32 jam	9
	3	48 jam	9

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Kadar EPS

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	222877632,000 ^a	8	27859704,000	1,302	,303
Intercept	404422741,333	1	404422741,333	18,908	,000
konsentrasi	72007811,556	2	36003905,778	1,683	,214
fermentasi	45207882,667	2	22603941,333	1,057	,368
konsentrasi *	105661937,778	4	26415484,444	1,235	,331
fermentasi					
Error	385009834,667	18	21389435,259		
Total	1012310208,000	27			
Corrected Total	607887466,667	26			

a. R Squared = ,367 (Adjusted R Squared = ,085)

Post Hoc Tests**Konsentrasi Sukrosa****Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Kadar EPS

	(I)	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
	Konsentrasi Sukrosa	Sukrosa				Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	1%	2%	-544,8889	2180,18528	,966	-6109,0775	5019,2998
		3%	-3704,4444	2180,18528	,233	-9268,6331	1859,7442
	2%	1%	544,8889	2180,18528	,966	-5019,2998	6109,0775
		3%	-3159,5556	2180,18528	,338	-8723,7442	2404,6331
	3%	1%	3704,4444	2180,18528	,233	-1859,7442	9268,6331
		2%	3159,5556	2180,18528	,338	-2404,6331	8723,7442
LSD	1%	2%	-544,8889	2180,18528	,805	-5125,2882	4035,5104
		3%	-3704,4444	2180,18528	,107	-8284,8437	875,9549
	2%	1%	544,8889	2180,18528	,805	-4035,5104	5125,2882
		3%	-3159,5556	2180,18528	,164	-7739,9549	1420,8437
	3%	1%	3704,4444	2180,18528	,107	-875,9549	8284,8437
		2%	3159,5556	2180,18528	,164	-1420,8437	7739,9549

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 21389435,259.

**Univariate Analysis of Variance
Homogeneous Subsets****Kadar EPS**

	Konsentrasi Sukrosa	N	Subset
			1
Tukey HSD ^{a,b}	1%	9	2453,7778
	2%	9	2998,6667
	3%	9	6158,2222
	Sig.		,233

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 21389435,259.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

b. Alpha = 0,05.

Lama Fermentasi**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Kadar EPS

	(I) Lama Fermentasi	(J) Lama Fermentasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
		i				Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	24 jam	32 jam	-44,0000	2180,18528	1,000	-5608,1887	5520,1887
		48 jam	-2766,6667	2180,18528	,430	-8330,8553	2797,5220
	32 jam	24 jam	44,0000	2180,18528	1,000	-5520,1887	5608,1887
		48 jam	-2722,6667	2180,18528	,441	-8286,8553	2841,5220
	48 jam	24 jam	2766,6667	2180,18528	,430	-2797,5220	8330,8553
		32 jam	2722,6667	2180,18528	,441	-2841,5220	8286,8553
LSD	24 jam	32 jam	-44,0000	2180,18528	,984	-4624,3993	4536,3993
		48 jam	-2766,6667	2180,18528	,221	-7347,0660	1813,7326
	32 jam	24 jam	44,0000	2180,18528	,984	-4536,3993	4624,3993
		48 jam	-2722,6667	2180,18528	,228	-7303,0660	1857,7326
	48 jam	24 jam	2766,6667	2180,18528	,221	-1813,7326	7347,0660
		32 jam	2722,6667	2180,18528	,228	-1857,7326	7303,0660

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 21389435,259.

Homogeneous Subsets

Kadar EPS			
	Lama Fermentasi	N	Subset
			1
Tukey HSD ^{a,b}	24 jam	9	2933,3333
	32 jam	9	2977,3333
	48 jam	9	5700,0000
	Sig.		,430

Kadar total gula EPS

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Konsentrasi Sukrosa	1	1%	9
	2	2%	9
	3	3%	9
Lama Fermentasi	1	24 jam	9
	2	32 jam	9
	3	48 jam	9

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Kadar Total Gula EPS

Konsentrasi Sukrosa	Lama Fermentasi	Mean	Std. Deviation	N
1%	24 jam	59.2767	3.42141	3
	32 jam	70.0167	8.96539	3
	48 jam	72.2933	9.62502	3
	Total	67.1956	9.07892	9
2%	24 jam	67.6567	2.73030	3
	32 jam	55.2000	17.53004	3
	48 jam	60.9100	2.76718	3
	Total	61.2556	10.47687	9
3%	24 jam	57.0700	16.17827	3
	32 jam	72.9433	13.41874	3
	48 jam	70.9800	11.03863	3
	Total	66.9978	14.03837	9
Total	24 jam	61.3344	9.67578	9
	32 jam	66.0533	14.48452	9
	48 jam	68.0611	9.19925	9
	Total	65.1496	11.29845	27

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Kadar Total Gula EPS

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1177.448 ^a	8	147.181	1.237	.334
Intercept	114600.805	1	114600.805	963.221	.000
Konsentrasi	204.887	2	102.444	.861	.439
Fermentasi	214.641	2	107.321	.902	.423
Konsentrasi * Fermentasi	757.919	4	189.480	1.593	.219
Error	2141.580	18	118.977		
Total	117919.832	27			
Corrected Total	3319.027	26			

a. R Squared = ,355 (Adjusted R Squared = ,068)

Estimated Marginal Means

Grand Mean

Dependent Variable: Kadar Total Gula EPS

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
65.150	2.099	60.739	69.560

Post Hoc Tests

Konsentrasi Sukrosa

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kadar Total Gula EPS

	(I) Konsentrasi Sukrosa	(J) Konsentrasi Sukrosa	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	1%	2%	5.9400	5.14191	.494	-7.1830	19.0630
		3%	.1978	5.14191	.999	-12.9252	13.3208
	2%	1%	-5.9400	5.14191	.494	-19.0630	7.1830
		3%	-5.7422	5.14191	.516	-18.8652	7.3808
	3%	1%	-.1978	5.14191	.999	-13.3208	12.9252
		2%	5.7422	5.14191	.516	-7.3808	18.8652
LSD	1%	2%	5.9400	5.14191	.263	-4.8628	16.7428
		3%	.1978	5.14191	.970	-10.6050	11.0005
	2%	1%	-5.9400	5.14191	.263	-16.7428	4.8628
		3%	-5.7422	5.14191	.279	-16.5450	5.0605
	3%	1%	-.1978	5.14191	.970	-11.0005	10.6050
		2%	5.7422	5.14191	.279	-5.0605	16.5450

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 118,977.

Homogeneous Subsets

Kadar Total Gula EPS

	Konsentrasi Sukrosa	N	Subset
			1
Tukey	2%	9	61.2556
	3%	9	66.9978
HSD ^{a,b}	1%	9	67.1956
Sig.			.494

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 118,977.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

b. Alpha = ,05.

Lama Fermentasi**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Kadar Total Gula EPS

	(I) Lama Fermentasi	(J) Lama Fermentasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	24 jam	32 jam	-4.7189	5.14191	.636	-17.8419	8.4041
		48 jam	-6.7267	5.14191	.409	-19.8497	6.3963
	32 jam	24 jam	4.7189	5.14191	.636	-8.4041	17.8419
		48 jam	-2.0078	5.14191	.920	-15.1308	11.1152
	48 jam	24 jam	6.7267	5.14191	.409	-6.3963	19.8497
		32 jam	2.0078	5.14191	.920	-11.1152	15.1308
LSD	24 jam	32 jam	-4.7189	5.14191	.371	-15.5216	6.0839
		48 jam	-6.7267	5.14191	.207	-17.5294	4.0761
	32 jam	24 jam	4.7189	5.14191	.371	-6.0839	15.5216
		48 jam	-2.0078	5.14191	.701	-12.8105	8.7950
	48 jam	24 jam	6.7267	5.14191	.207	-4.0761	17.5294
		32 jam	2.0078	5.14191	.701	-8.7950	12.8105

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 118,977.

Homogeneous Subsets**Kadar Total Gula EPS**

	Lama Fermentasi	N	Subset
			1
Tukey HSD ^{a,b}	24 jam	9	61.3344
	32 jam	9	66.0533
	48 jam	9	68.0611
	Sig.		.409

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 118,977.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

b. Alpha = ,05.

Kadar Gula Terpakai Fermentasi EPS

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Konsentrasi Sukrosa	1	1%	9
	2	2%	9
	3	3%	9
Lama Fermentasi	1	24 jam	9
	2	32 jam	9
	3	48 jam	9

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Kadar Gula Terpakai

Konsentrasi Sukrosa	Lama Fermentasi	Mean	Std. Deviation	N
1%	24 jam	2.4633	.49692	3
	32 jam	2.1600	.57819	3
	48 jam	2.7367	.52624	3
	Total	2.4533	.52626	9
2%	24 jam	2.3000	1.51562	3
	32 jam	1.3633	.74541	3
	48 jam	2.3200	.49275	3
	Total	1.9944	.99900	9
3%	24 jam	3.5233	1.69214	3
	32 jam	2.9733	.73078	3
	48 jam	3.9433	1.45651	3
	Total	3.4800	1.24787	9
Total	24 jam	2.7622	1.29719	9
	32 jam	2.1656	.91762	9
	48 jam	3.0000	1.09243	9
	Total	2.6426	1.12782	27

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Kadar Gula Terpakai

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	14.127 ^a	8	1.766	1.678	.172
Intercept	188.549	1	188.549	179.144	.000
Konsentrasi	10.414	2	5.207	4.948	.019
Fermentasi	3.327	2	1.663	1.580	.233
Konsentrasi * Fermentasi	.385	4	.096	.092	.984
Error	18.945	18	1.053		
Total	221.621	27			
Corrected Total	33.072	26			

a. R Squared = ,427 (Adjusted R Squared = ,173)

Estimated Marginal Means

Grand Mean

Dependent Variable: Kadar Gula Terpakai

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
2.643	.197	2.228	3.057

Post Hoc Tests
Konsentrasi Sukrosa

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kadar Gula Terpakai

	(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
	Sukrosa	Sukrosa				Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	1%	2%	.4589	.48362	.617	-.7754	1.6932
		3%	-1.0267	.48362	.113	-2.2609	.2076
	2%	1%	-.4589	.48362	.617	-1.6932	.7754
		3%	-1.4856*	.48362	.017	-2.7198	-.2513
	3%	1%	1.0267	.48362	.113	-.2076	2.2609
		2%	1.4856*	.48362	.017	.2513	2.7198
	1%	2%	.4589	.48362	.355	-.5572	1.4749
		3%	-1.0267*	.48362	.048	-2.0427	-.0106
LSD	2%	1%	-.4589	.48362	.355	-1.4749	.5572
		3%	-1.4856*	.48362	.007	-2.5016	-.4695
	3%	1%	1.0267*	.48362	.048	.0106	2.0427
		2%	1.4856*	.48362	.007	.4695	2.5016

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1,053.

*, The mean difference is significant at the ,05 level.

Homogeneous Subsets

Kadar Gula Terpakai

	Konsentrasi Sukrosa	N	Subset	
			1	2
Tukey HSD ^{a,b}	2%	9	1.9944	
	1%	9	2.4533	2.4533
	3%	9		3.4800
	Sig.		.617	.113

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1,053.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

b. Alpha = ,05.

Lama Fermentasi**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Kadar Gula Terpakai

	(I) Lama Fermentasi	(J) Lama Fermentasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	24 jam	32 jam	.5967	.48362	.449	-.6376	1.8309
		48 jam	-.2378	.48362	.876	-1.4721	.9965
	32 jam	24 jam	-.5967	.48362	.449	-1.8309	.6376
		48 jam	-.8344	.48362	.223	-2.0687	.3998
	48 jam	24 jam	.2378	.48362	.876	-.9965	1.4721
		32 jam	.8344	.48362	.223	-.3998	2.0687
LSD	24 jam	32 jam	.5967	.48362	.233	-.4194	1.6127
		48 jam	-.2378	.48362	.629	-1.2538	.7783
	32 jam	24 jam	-.5967	.48362	.233	-1.6127	.4194
		48 jam	-.8344	.48362	.102	-1.8505	.1816
	48 jam	24 jam	.2378	.48362	.629	-.7783	1.2538
		32 jam	.8344	.48362	.102	-.1816	1.8505

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1,053.

Homogeneous Subsets**Kadar Gula Terpakai**

	Lama Fermentasi	N	Subset
			1
Tukey HSD ^{a,b}	32 jam	9	2.1656
	24 jam	9	2.7622
	48 jam	9	3.0000
	Sig.		.223

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1,053.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

b. Alpha = ,05.