

**KARAKTERISASI EKSPOLISAKARIDA YANG DIHASILKAN OLEH
Weissella confusa DAN POTENSINYA SEBAGAI ANTIBAKTERI
TERHADAP *Salmonella typhi***

SKRIPSI

**Oleh:
MOHAMAD ABDUL CHALIM
15630048**



**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

**KARAKTERISASI EKSPOLISAKARIDA YANG DIHASILKAN OLEH
Weissella confusa DAN POTENSINYA SEBAGAI ANTIBAKTERI
TERHADAP *Salmonella typhi***

SKRIPSI

**Oleh:
MOHAMAD ABDUL CHALIM
15630048**

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

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

**KARAKTERISASI EKSPOLISAKARIDA YANG DIHASILKAN OLEH
Weissella confusa DAN POTENSINYA SEBAGAI ANTIBAKTERI
TERHADAP *Salmonella typhi***

SKRIPSI

**Oleh:
MOHAMAD ABDUL CHALIM
15630048**

**Telah disetujui dan disahkan
Tanggal 19 November 2021**

Pembimbing I



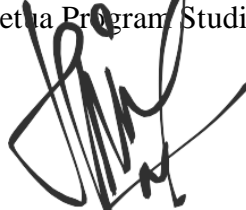
**Anik Maunatin S.T., M.P
NIDT. 197601052018201 2 248**

Pembimbing II



**Dr. H. M. Imamuddin, Lc., M.A
NIP. 19740602 200901 1 010**

Mengetahui
Ketua Program Studi







**Rachmawati Ningsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 2 010**

**KARAKTERISASI EKSPOLISAKARIDA YANG DIHASILKAN OLEH
Weissella confusa DAN POTENSINYA SEBAGAI ANTIBAKTERI
TERHADAP *Salmonella typhi***

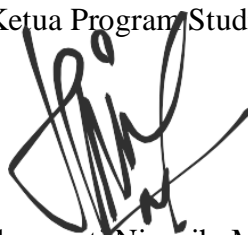
SKRIPSI

**Oleh:
MOHAMAD ABDUL CHALIM
15630048**

**Telah Dipertahankan Di depan Dewan Penguji Skripsi Dan Dinyatakan Diterima
Sebagai Salah Satu Persyaratan Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S. Si)
Tanggal 22 Desember 2021**

Penguji utama	: Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P NIP. 19750410 200501 2 009	
Ketua Penguji	: Ahmad Hanapi, S.Si., M.Sc NIDT. 19851225 20160801 1 069	
Sekretaris penguji	: Anik Maunatin S.T., M.P NIDT. 197601052018201 2 248	
Anggota Penguji	: Dr. H. M. Imamuddin, Lc., M.A NIP. 19740602 200901 1 010	

Mengetahui,
Ketua Program Studi



Rachmawati Ningsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 2 010

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Mohamad Abdul Chalim

NIM : 156300048

Jurusan : KIMIA

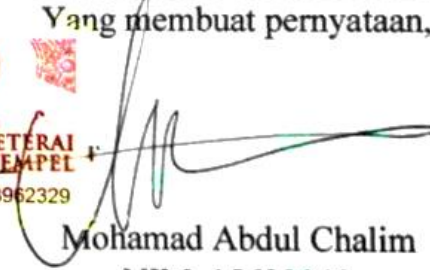
Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul penelitian : KARAKTERISASI EKSOPOLISAKARIDA YANG DIHASILKAN
OLEH *Weissella confusa* DAN POTENSINYA SEBAGAI
ANTIBAKTERI TERHADAP *Salmonella typhi*

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

Malang, 27 Desember 2021
Yang membuat pernyataan,




Mohamad Abdul Chalim
NIM. 15630048

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Wr. Wb.

Puji syukur penulis ucapkan kehadiran Allah SWT karena atas limpahan rahmat, taufik, dan hidayah-Nya sehingga membuat penulis mampu menyelesaikan skripsi dengan judul **KARAKTERISASI EKSOPOLISAKARIDA YANG DIHASILKAN OLEH *Weissella confusa* DAN POTENSINYA SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP *Salmonella typhi*** dengan semaksimal mungkin. Sholawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW. karena telah memberi petunjuk kepada jalan yang diridloi Allah SWT.

Seiring dengan terealisasinya penyusunan skripsi ini, dengan penuh rasa hormat, kesungguhan, dan kerendahan hati, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak dan Ibu tercinta yang selalu memberikan dukungan, usaha, kasih sayang, dan doa yang tiada hentinya sehingga membuat penulis mampu menyelesaikan penyusunan skripsi ini.
2. Ibu Anik Maunatin, S.T., M.P, selaku pembimbing utama yang selalu bersedia meluangkan waktu dan membimbing penulis dalam penyusunan skripsi ini.
3. Dr. H. M. Imamuddin Lc, MA selaku pembimbing agama yang selalu bersedia meluangkan waktu dan membimbing penulis dalam penyusunan skripsi ini.
4. Seluruh dosen Jurusan Kimia yang telah bersedia meluangkan waktu dan membagikan ilmunya serta membimbing penulis selama perkuliahan.
5. Seluruh laboran dan staf administrasi kimia atas segala kontribusinya.
6. Seluruh teman-teman mahasiswa yang selalu memberikan dukungan selama ini.
7. Seluruh Jajaran Sivitas Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
8. Kepada semua pihak yang ikut membantu dalam penyusunan skripsi ini.
9. Kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung terlibat dalam penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, oleh sebab itu penulis berharap kritik dan sarannya untuk memperbaiki skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak dan mampu berkontribusi dalam pengembangan ilmu pengetahuan.

Wassalamualaikum Wr. Wb

Malang, 19 November 2021

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR.....	vxi
DAFTAR LAMPIRAN	ixii
ABSTRAK.....	xiii
ABSTRACT	xi
المخلص.....	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan	4
1.4 Batasan Masalah	4
1.5 Manfaat	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Bakteri Asam Laktat	5
2.2 <i>Weissella confusa</i>	7
2.3 Eksopolisakarida.....	8
2.3.1 Homopolisakarida (HoPS).....	9
2.3.2 Heteropolisakarida (HePS)	12
2.4 Biosintesis Eksopolisakarida	11
2.4.1 Biosintesis HoPS	12
2.4.2 Biosintesis HePS	13
2.5 Produksi Eksopolisakarida	15
2.6 Karakterisasi Eksopolisakarida	18
2.6.1 Karakterisasi secara Fisika.....	18
2.6.2 Karakterisasi secara Kimia.....	19
1 Kadar Gula Total Eksopolisakarida Metode Sulfat-Fenol.....	19
2 Analisa Kadar Protein Eksopolisakarida.....	20
3 Analisa Gugus Fungsi Eksopolisakarida Menggunakan <i>Fourier Transform Infra Red</i> (FTIR).....	20
2.7 Potensi Eksopolisakarida Sebagai Antibakteri.....	21
2.8 Mekanisme Kerja Eksopolisakarida Sebagai Antibakteri.....	22
BAB III METODE PENELITIAN	24
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	24
3.2 Alat dan Bahan.....	24
3.2.1 Alat	24
3.2.2 Bahan.....	24
3.3 Rancangan Penelitian	24

3.4	Tahapan Penelitian	24
3.5	Pelaksanaan Penelitian	25
3.5.1	Sterilisasi alat	25
3.5.2	Pembuatan Media	25
3.5.2.1	Pembuatan media MRSA (<i>de Man Rogosa and Sharpe Agar</i>)...25	
3.5.2.2	Regenerasi <i>Weissella confusa</i>	25
3.5.2.3	Pembuatan media MRS broth (<i>de Man Rogosa and Sharpe Broth</i>) dan MRS broth + sukrosa 5%.....	26
3.5.2.4	Pembuatan Inokulum <i>Weissella confusa</i>	26
3.5.2.5	Produksi Eksopolisakarida	26
3.5.2.6	Ekstraksi Eksopolisakarida	26
3.5.3	Karakterisasi Eksopolisakarida secara Fisik dan Kimia.....	27
3.5.3.1	Kelarutan Eksopolisakarida pada Berbagai Pelarut.....	27
3.5.3.2	Indeks Kelarutan Air dan Daya Ikat Air Eksopolisakarida.....	27
3.5.3.3	Pembuatan Kurva Standar Glukosa	27
3.5.3.4	Analisa Kadar Glukosa pada Eksopolisakarida.....	27
3.5.3.5	Pembuatan Kurva Standar <i>Bovine Serum Albumin (BSA)</i>	28
3.5.3.6	Analisa Kadar Protein Eksopolisakarida	28
3.5.3.7	Analisa Gugus Fungsi Eksopolisakarida Menggunakan <i>Fourier Transform Infra Red (FTIR)</i>	28
3.5.4	Uji Aktivitas Antibakteri.	28
3.5.4.1	Pembuatan Media <i>Nutrien Agar</i>	28
3.5.4.2	Regenerasi <i>Salmonella typhi</i>	28
3.5.4.3	Pembuatan Inokulum <i>Salmonella typhi</i>	28
3.5.4.4	Uji Aktivitas Antibakteri Eksopolisakarida terhadap <i>Salmonella typhi</i>	29
3.5.5	Analisa Data.....	29
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	30
4.1	Sterilisasi Alat dan Media.....	30
4.2	Produksi Eksopolisakarida	31
4.2.1	Regenerasi <i>Weissella confusa</i>	31
4.2.2	Pembuatan Inokulum <i>W. confusa</i>	31
4.2.3	Produksi dan Ekstraksi Eksopolisakarida.....	32
4.3	Karakterisasi Eksopolisakarida secara Fisik.....	35
4.3.1	Kelarutan Eksopolisakarida pada Berbagai Pelarut Organik	36
4.3.2	Indeks Kelarutan Air dan Daya Ikat Air Eksopolisakarida	36
4.4	Karakterisasi Eksopolisakarida secara Kimia.....	38
4.4.1	Analisa Kadar Total Gula Eksopolisakarida	38
4.4.2	Analisa Kadar Protein Eksopolisakarida	39
4.4.3	Analisa Gugus Fungsi Eksopolisakarida Menggunakan <i>Fourier Transform Infra Red (FTIR)</i>	41
4.5	Uji Antibakteri Eksopolisakarida terhadap <i>Salmonella typhi</i>	42
4.5.1	Pembuatan Media <i>Nutrien Agar (NA)</i>	42
4.5.2	Regenerasi <i>Salmonella typhi</i>	42
4.5.3	Pembuatan Inokulum <i>Salmonella typhi</i>	42
4.5.4	Uji Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Agar	43

BAB V PENUTUP.....	47
5.1 Kesimpulan.....	47
5.2 Saran.....	47
DAFTAR PUSTAKA.....	48
LAMPIRAN	55

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Daftar strain <i>Weissella confusa</i> dan produksi eksopolisakarida	17
Tabel 2.2 Tabel konstanta dielektrik	18
Table 4.1 Karakteristik Fisik Eksopolisakarida.....	35
Tabel 4.2 Karakteristik Kimia Eksopolisakarida.....	38
Tabel 4.3 Gugus fungsi dari spektra FTIR eksopolisakarida <i>W. confusa</i>	41
Tabel 4.4 Aktifitas Antibakteri Eksopolisakarida	44

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Bentuk sel <i>Weissella confusa</i>	9
Gambar 2.2 Klasifikasi homopolisakarida berdasarkan ikatan glikosidik.....	10
Gambar 2.3 Jalur biosintesis HoPS.....	13
Gambar 2.4 Jalur biosintesis HePS	14
Gambar 2.5 Reaksi dehidrasi karbohidrat	19
Gambar 2.6 Turunan furan a) Pentosa, b) Heksosa, c) 6-dioksiheksosa, d) ketokheksosa	19
Gambar 2.7 Spektra FTIR eksopolisakarida	21
Gambar 4.1 Regenerasi <i>W. confusa</i>	31
Gambar 4.2 Inokulum <i>W. confusa</i>	32
Gambar 4.3 Reaksi Protein dengan TCA.....	33
Gambar 4.4 Media Produksi Eksopolisakarida a) sebelum fermentasi b) setelah fermentasi.....	34
Gambar 4.5 Eksopolisakarida Kering	35
Gambar 4.6 Kelarutan eksopolisakarida pada berbagai pelarut a) akuabides, b) kloroform, c) metanol, d) n-heksan.....	36
Gambar 4.3 Kurva Standar Glukosa	38
Gambar 4.7 Kurva Standar BSA	40
Gambar 4.8 Spektra FTIR eksopolisakarida dari <i>W. confusa</i>	41
Gambar 4.9 Aktivitas Antibakteri Eksopolisakarida <i>W. confusa</i> terhadap <i>Salmonella typhi</i>	43

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian	50
Lampiran 2. Skema Kerja.....	51
Lampiran 3. Perhitungan.....	59
Lampiran 4. Dokumentasi	70
Lampiran 5. Keterangan Tambahan.....	72

ABSTRAK

Chalim, Abdul Mohamad. 2021. **KARAKTERISASI EKSPOLISAKARIDA YANG DIHASILKAN OLEH *Weissella confusa* DAN POTENSINYA SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP *Salmonella typhi*.**

Skripsi. Jurusan Kimia. Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Anik Maunatin S.T., M.P. Pembimbing II : Dr. H. M. Imamuddin Lc. MA.

Kata kunci: Karakterisasi, Eksopolisakarida, *Weissella confusa*, antibakteri, *Salmonella typhi*, difusi agar.

Weissella confusa adalah salah satu bakteri asam laktat (BAL) yang dapat memproduksi eksopolisakarida yang telah diketahui mempunyai manfaat dalam bidang kesehatan dan industri makanan. Eksopolisakarida adalah polimer yang disintesis oleh mikroorganisme penghasilnya ke luar selnya, dan setiap strain bakteri menghasilkan eksopolisakarida dengan sifat yang berbeda-beda namun tetap dengan sifat umum dari polisakarida. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengekstrak eksopolisakarida kemudian mengarakterisasi secara fisik dan kimia dan menguji aktifitas antibakterinya terhadap *Salmonella typhi*.

Eksopolisakarida diekstrak dari bakteri *Weissella confusa*, bakteri tersebut ditumbuhkan pada MRS broth dengan penambahan sukrosa 5% dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Isolat *Weissella confusa* ditambahkan TCA 10% dan disentrifugasi pada 5000 rpm selama 20 menit pada suhu 4⁰C, supernatan ditambahkan etanol dingin 95% 2 kali volume sampel dan desentrifugasi kembali sehingga mendapatkan eksopolisakarida kering.

Eksopolisakarida yang dihasilkan memiliki rendemen 11,321 gr/L dengan warna kuning keputih-putihan. Karakter secara fisik (eksopolisakarida larut pada air, tidak larut pada pelarut organik, indeks kelarutan air 30,11 ± 3,47 %, daya ikat air 581,97 ± 93,7%) dan secara kimia (kadar gula total 79,74±3,68%, kadar protein 0.847 ± 0,016 %, analisa gugus fungsi yang terbaca adalah O-H stretching, C-H stretching, C=O stretch, C-H, C-H₂ bending, C-O-C, dan ikatan α-glikosidik). Aktivitas antibakteri eksopolisakarida terhadap *Salmonella typhi* sebesar 5,39 ± 0,58 mm dengan konsentrasi 1,25 mg/mL.

ABSTRACT

Chalim, Abdul Mohamad. 2021. **CARACTERIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDES PRODUCED BY *Weissella confusa* AND IT'S POTENTIAL AS ANTIBACTERIALS AGAINST *Salmonella typhi***. Thesis. Chemistry Department, Faculty Sains and technology. Islamic State University Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: Anik Maunatin, S.T., M.P; Supervisor II: Dr. H. M. Imamuddin Lc. MA.

Keyword: characterization, exopolysaccharides, *Weissella confusa*, antibacterial, *Salmonella typhi*, agar difution.

Weissella confusa is one of the lactic acid bacteria (LAB) that can produce exopolysaccharides which are known to have benefits in the health and food industry. Exopolysaccharides are polymers synthesized by the producing microorganism outside the cell, and each bacterial strain produces exopolysaccharides with different properties but still the general properties of polysaccharides. The purpose of this study was to extract the exopolysaccharide then to characterize it physically and chemically and to test its antibacterial activity against *Salmonella typhi*.

This research was conducted by extracting exopolysaccharide compounds from *Weissella confusa* bacteria, these bacteria were grown on MRS broth with the addition of 5% sucrose and incubated at 37°C for 24 hours. *Weissella confusa* isolate was added with 10% TCA and centrifuged at 5000 rpm for 20 minutes at 4°C, the supernatant was added with 95% cold ethanol 2 times the sample volume and decentrifuged again to obtain dry exopolysaccharides.

The resulting exopolysaccharide has a yield of 11.321 g/L with a whitish yellow color. Characters physically (exopolysaccharides soluble in water, insoluble in organic solvents, water solubility index $30.11 \pm 3.47\%$, water holding capacity $581.97 \pm 93.7\%$) and chemically (total sugar content $79.74 \pm 3.68\%$, protein content $0.847 \pm 0,016\%$, functional group analysis reads O-H stretching, C-H stretching, C=O stretch, C-H, C-H₂ bending, C-O-C, and α -glycosidic bonds). Exopolysaccharide antibacterial activity against *Salmonella typhi* was 5.39 ± 0.58 mm with a concentration of 1.25 mg/mL.

الملخص

حليم ، عبد محمد. 2021. تخصيص إكسوبوليسكاريد التي تنتجها فايسيللا كونفوسا وإمكانية استخدامها كمضادات للبكتيريا على السالمونيلا التيفية.

البحث العلمي. قسم الكيمياء. كلية العلوم والتكنولوجيا جامعة مولانا مالك ابراهيم مالانج الإسلامية الحكومية. المشرفة الأولى: أنيك معوناتين S.T., M.P. و المشرف الثاني: الدكتور الحاج محمد امام الدين. ماجستير.

الكلمات الرئيسية: التخصيص ، إكسوبوليسكاريد، فايسيللا كونفوسا ، مضاد للجراثيم، السالمونيلا التيفية ، انتشار أجار.

فايسيللا كونفوسا هي إحدى بكتيريا حمض اللاكتيت (BAL) التي يمكنها إنتاج إكسوبوليسكاريد المعروفة بفوائدها في مجال الصحة وصناعة الأغذية. إكسوبوليسكاريد عبارة عن بوليمرات يتم تصنيعها بواسطة الكائنات الحية الدقيقة المنتجة خارج الخلية، وتنتج كل سلالة بكتيرية إكسوبوليسكاريد بخصائصها المختلفة ولكنها لا تزال خصائصها العامة للسكريات المتعددة. الهدف من هذا البحث هو استخراج عديد إكسوبوليسكاريد ثم تخصصها فيزيائيا وكيميائيا واختبار نشاطه المضاد للبكتيريا على السالمونيلا التيفية.

تم إكسوبوليسكاريد الخارجية من بكتريا فايسيللا كونفوسا، وتمت هذه البكتيريا في مرق MRS مع إضافة 5% سكروز وحضنت عند 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة. تمت إضافة عزلة فايسيللا كونفوسا بنسبة 10% من TCA وطردها عند 5000 دورة في الدقيقة لمدة 20 دقيقة عند 4 درجة مئوية ، تمت إضافة المادة الطافية بنسبة 95% من الإيثانول البارد 2 ضعف حجم العينة وتم طردها مرة أخرى للحصول على إكسوبوليسكاريد الجافة. ينتج إكسوبوليسكاريد 11.321 gr/L مع لون أصفر مبيض. الخصائص الفيزيائية (إكسوبوليسكاريد قابلة للذوبان في الماء، غير قابلة للذوبان في المذيبات العضوية ، مؤشر القابلية للذوبان في الماء 3.47 ± 30.11 ، سعة تخزين الماء 581.97 ± 93.7 %) وكيميائيا (محتوى السكر الكلي 3.68 ± 79.74 % ، محتوى البروتين 0.847 ± 0.016 ، تحليل المجموعة الوظيفية يقرأ هو O-H stretching, C-H stretching, C=O stretch, C-H, C-H2 bending, C-O-C، و- روابط glycosidic). النشاط المضاد للبكتيريا إكسوبوليسكاريد على السالمونيلا التيفية 0.58 ± 5.39 مم بتركيز 1.25 mg/mL.

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Eksopolisakarida adalah polimer *biodegradable* hasil biosintesis dari organisme dengan berat molekul tinggi. Penelitian terdahulu banyak mengkaji eksopolisakarida yang diproduksi dari bakteri asam laktat (BAL) karena manfaatnya dalam bidang pangan sebagai pengatur tekstur dan reologi, dan dalam bidang kesehatan seperti potensi sebagai imunostimulasi, aktivitas antioksidan, antitumor, dan dapat menurunkan kolesterol darah. Kemampuan adhesi eksopolisakarida digunakan sebagai alternatif pengobatan infeksi pada dinding saluran pencernaan, aktivitasnya sebagai antibakteri, kemampuan membentuk gel dan degradasi polutan (Anindita, 2020). Golongan BAL seperti *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* dan *Weissella* mempunyai kemampuan memproduksi senyawa metabolit sekunder eksopolisakarida yang memiliki banyak manfaat (Sanlibaba dan Gürcü., 2016).

BAL mampu menghasilkan eksopolisakarida dengan rendemen tinggi, dengan menambahkan gula pada media akan meningkatkan rendemen eksopolisakarida. *Lactobacillus casei* lebih efisien memproduksi eksopolisakarida dengan penambahan glukosa, *Lactobacillus rhamnosus* 9595M tidak meningkatkan produksi eksopolisakarida dengan penambahan gula, sedangkan *Weissella confusa* mampu memproduksi eksopolisakarida lebih banyak dengan penambahan sukrosa daripada gula yang lain yakni 40 g/L (Wongsipucat, et. al., 2018).

Penelitian Rajoka, dkk., (2018) melaporkan produksi eksopolisakarida dari *Lactobacilli reuteri* SHA 101 pada media cair MRS dengan penambahan glukosa

20 gr/L selama 48 jam pada 37 °C menghasilkan EPS sebesar 611,2 mg/L, nilai indeks kelarutan air 11,5 %, WHC 525,6 %. Produksi eksopolisakarida oleh *Leuconostoc pseudomesenteroides* YF32 pada media cair MRS dengan penambahan sukrosa 5% selama 48 jam pada 30 °C menghasilkan EPS sebesar 12,5 gr/L indeks kelarutan air 11,5 %, dan WHC 525,6 % (Yang, et. al., 2018).

Eksopolisakarida yang dihasilkan oleh bakteri memiliki karakteristik yang berbeda berdasarkan jenis maupun strain bakteri penghasilnya, sehingga menjadi salah satu faktor yang perlu untuk dikaji selain itu hal tersebut berkenaan juga dengan manfaatnya yang berbeda untuk industri pangan dan farmasi. Karakterisasi eksopolisakarida dapat dilakukan secara fisik maupun kimia. Karakterisasi secara fisik diantaranya indeks kelarutan air dan *water holding capacity* (WHC), sedangkan karakteristik secara kimia antara lain kadar gula total, analisis gugus fungsi, analisis monomer penyusun EPS, struktur ikatan kimia dan berat molekul EPS (Zhou,Q., et. Al., 2017; Adesulu-Dahunsi, et. al.,2018).

Potensi eksopolisakarida yang telah diketahui salah satunya adalah sebagai antibakteri, kemampuan tersebut dapat dikaji lebih dalam sebagai alternatif karena mampu merusak sel bakteri patogen sehingga dapat dijadikan kandidat antibakteri alami. Menggali potensi antibakteri eksopolisakarida merupakan salah satu upaya alternatif dalam bidang pengobatan dan merupakan salah satu kewajiban manusia untuk selalu belajar dari manapun, karena Allah yang menurunkan sebuah penyakit di dunia maka Allah pula yang menurunkan obatnya. Allah berfirman,

وَإِذَا مَرِضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ ٨

Artinya: Dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan aku (asy-Syu 'arā'/26: 80).

Hadist nabi SAW

حَدَّثَنَا هَارُونُ بْنُ مَعْرُوفٍ وَأَبُو الطَّاهِرِ وَأَحْمَدُ بْنُ عَيْسَى قَالُوا حَدَّثَنَا ابْنُ وَهْبٍ أَخْبَرَنِي عَمْرُو وَهُوَ ابْنُ الْحَارِثِ عَنْ عَبْدِ رَبِّهِ بْنِ سَعِيدٍ عَنْ أَبِي الزُّبَيْرِ عَنْ جَابِرٍ عَنْ رَسُولِ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ أَنَّهُ قَالَ لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ (رواه مسلم)

Artinya: Telah menceritakan kepada kami Harun bin Ma'ruf dan Abu Ath Thahir serta Ahmad bin 'Isa mereka berkata; Telah menceritakan kepada kami Ibnu Wahb; Telah mengabarkan kepadaku 'Amru, yaitu Ibnu al-Harits dari 'Abdu Rabbih bin Sa'id dari Abu Az Zubair dari Jabir dari Rasulullah shallallahu 'alaihi wasallam, beliau bersabda: "Setiap penyakit ada obatnya. Apabila ditemukan obat yang tepat untuk suatu penyakit, akan sembuhlah penyakit itu dengan izin Allah 'azza wajalla." (HR Muslim).

Berdasarkan asy-Syu'arā' ayat 80 bahwa segala penyakit yang ada di dunia ini diciptakan oleh Allah SWT dan Dialah juga yang menyembuhkan penyakit tersebut, hal tersebut didukung dengan hadist yang diriwayatkan oleh Muslim, dijelaskan bahwa penyakit akan sembuh jika diberi obat yang tepat atas izin Allah. Infeksi yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen juga memiliki obat yang tepat seperti antibiotik, hampir semua jenis antibiotik yang dikenal dalam dunia pengobatan dihasilkan dari bakteri non-patogen (Lajnah, Litbang dan Kemenag, 2015). BAL dalam beberapa penelitian terdahulu disebutkan dapat menghasilkan beberapa senyawa yang mampu mengontrol sampai mematikan bakteri patogen seperti bakteriosin dan eksopolisakarida (Kusdianawati dkk, 2020 dan Anindita, 2020).

Salmonella typhi merupakan bakteri penyebab demam tifoid dengan ciri-ciri demam yang berlangsung lama, dengan adanya inflamasi yang merusak usus dan organ-organ hati. Demam tifoid merupakan penyakit menular yang tersebar di

seluruh dunia terutama di daerah tropis, di Indonesia kasus demam tifoid sekitar 300-810 setiap 100.000 penduduk per tahun. Beberapa penelitian eksopolisakarida menyebutkan kemampuan sebagai antibakteri dapat diaplikasikan pada *Salmonella typhi* (Cita, 2011).

Rajoka, et. al. (2018) menguji eksopolisakarida dari *Lactobacillus vaginalis* SHA 110 (EPS-lvg) dan *Lactobacillus reuteri* SHA 101 (EPS-lr) sebagai antibakteri terhadap *Salmonella typhi*, hasil zona hambat masing-masing yaitu 15 mm dan 14 mm. Li, S. et. al., (2014) menguji aktivitas anti bakteri eksopolisakarida dari *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 (B-EPS) dan *Lactobacillus plantarum* R315 (L-EPS) terhadap *Salmonella typhi* menghasilkan zona hambat 15 mm dan 14 mm untuk (B-EPS) dan (L-EPS). Aullybux, A. A, et. al., (2019) menguji aktivitas antibakteri eksopolisakarida isolat bakteri dari air laut Mauritius terhadap *Salmonella typhi* memperoleh zona hambat 9,9 mm.

Eksopolisakarida yang dihasilkan oleh BAL mempunyai keragaman jenis berdasarkan bakteri penghasilnya, hal ini menyebabkan perbedaan struktur kimia dan sifat fisik dari eksopolisakarida sehingga akan mempengaruhi pemanfaatan aplikasi eksopolisakarida. Oleh karena itu penelitian ini akan melakukan karakterisasi dari eksopolisakarida yang dihasilkan oleh *W.confusa* dan menguji potensinya sebagai antibakteri terhadap *Salmonella typhi*.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana karakteristik eksopolisakarida dari *W. confusa* secara fisika dan kimia?

2. Bagaimana pengaruh konsentrasi eksopolisakarida dari *W. confusa* sebagai aktivitas antibakteri terhadap *Samonella typhi*?

1.3 Tujuan

1. Untuk mengetahui karakteristik eksopolisakarida dari *W. confusa* secara fisika dan kimia.
2. Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi eksopolisakarida dari *W. confusa* sebagai aktivitas antibakteri terhadap *Samonella typhi*.

1.4 Batasan Masalah

1. *Weissella confusa* penghasil eksopolisakarida merupakan hasil isolasi minuman kacang tanah terfermentasi.
2. Media produksi eksopolisakarida yaitu MRS *broth* yang ditambahkan sukrosa 5%.
3. Karakterisasi eksopolisakarida secara fisika meliputi kelarutan terhadap pelarut organik, indeks kelarutan air dan *water holding capacity* (WHC).
4. Karakterisasi secara kimia meliputi analisa total gula, kadar protein dan gugus fungsi eksopolisakarida.
5. Bakteri patogen yang digunakan untuk uji anti bakteri adalah *Salmonella typhi* menggunakan metode Kirby-Baurer.
6. Konsentrasi eksopolisakarida yang digunakan dalam uji anti bakteri adalah 1,25; 2,5; dan 5 mg/ml dengan control positif sioprofoksin.

1.5 Manfaat

Penelitian ini diharapkan akan menambah wawasan kepada akademisi tentang karakteristik eksopolisakarida dari *W.confusa* dan kemampuannya sebagai antibakteri.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat (BAL) adalah bakteri yang mampu mengubah karbohidrat (glukosa) menjadi asam laktat. Efek bakterisida dari asam laktat berkaitan dengan penurunan pH lingkungan menjadi 3 sampai 4,5 sehingga pertumbuhan bakteri lain termasuk bakteri pembusuk terhambat, secara umum mikroorganisme dapat tumbuh pada pH 6-8 (Wahyudi, M. 2006). BAL yaitu kelompok bakteri gram positif, katalase negatif yang dapat memproduksi asam laktat dengan cara memfermentasi karbohidrat, selnya berbentuk kaku, tersusun berpasangan atau berbentuk rantai, tidak bergerak, tidak berspora, anaerob fakultatif, bersifat non motil dan mesofil (Ray, B. 2001).

BAL yang menghasilkan dua molekul asam laktat dari fermentasi glukosa termasuk di dalam kelompok bakteri asam laktat yang bersifat homofermentatif, sedangkan bakteri asam laktat yang menghasilkan asam laktat dan produk sampingan etanol dan CO₂ dikenal sebagai kelompok BAL heterofermentatif, dalam mekanisme pembentukan asam laktat, keduanya memiliki kesamaan yakni piruvat kemudian diubah menjadi asam laktat dengan proses transfer elektron dari NADH menjadi NAD⁺ (Reddy, et. al, 2008). BAL mampu memproduksi senyawa antibakteri berupa asam organik, bakteriosin, metabolit primer, hidrogen peroksida (H₂O₂), disetil, karbondioksida (CO₂), asetaldehida, menurunkan pH lingkungannya dan eksopolisakarida. Bakteri *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, spesies *Leuconostoc*, dan *Weissella* adalah BAL yang bersifat probiotik yang telah diketahui dapat memproduksi eksopolisakarida yang bersifat antibakteri terhadap bakteri patogen (Tallon, et la., 2003).

BAL adalah mikroorganisme yang dapat menfermentasi bahan makanan berupa karbohidrat untuk menghasilkan asam laktat dan sejumlah senyawa lainnya. Bakteri ini berkontribusi dalam perbaikan rasa, tekstur, dan masa simpan produk fermentasi, bakteri ini mampu tumbuh dalam berbagai substrat organik, dan kondisi asam, basa, suhu rendah, suhu tinggi, kadar garam tinggi, dan anaerob, sehingga menjadikan BAL sebagai kompetitor yang tangguh di semua sektor pengolahan makanan (Daulay, 1992). Selain itu, produk sampingan BAL berupa asam sangat menguntungkan karena mampu menghambat pertumbuhan bakteri lain selama fermentasi (Rahayu, E. S, 2003).

Al Qur'an menyebutkan minuman yang dibuat dari buah anggur dan kurma, yang mana mengisyaratkan bahwa minuman tersebut melalui proses fermentasi, surah An-Nahl ayat 67:

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

Artinya : *Dan dari buah kurma dan anggur, kamu membuat minuman yang memabukkan dan rezeki yang baik. Sungguh, pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang mengerti. (QS. An-Nahl:67)*

Berdasarkan tafsir Kemenag (2005) Allah SWT meminta para hamba-Nya agar memperhatikan buah kurma dan anggur, dari kedua buah-buahan itu manusia dapat memproduksi sakar, yaitu minuman memabukkan yang diharamkan dan minuman baik yang dihalalkan. Sebuah riwayat dari Ibnu Abbas menjelaskan, “Sakar ialah minuman yang diharamkan yang berasal dari buah kurma dan anggur yakni *khamr*. Rezeki yang baik ialah makanan halal yang bisa diproduksi dari kurma dan anggur.

Jadi dari kurma dan anggur, manusia dapat memproduksi berbagai jenis makanan dan di antaranya ada yang memudaratkan dan ada yang bermanfaat, yang memudaratkan dilarang oleh agama, sedangkan yang bermanfaat dibolehkan untuk diproduksi. Dengan demikian, ayat ini sudah mengandung isyarat bagi mereka yang berpikiran suci bahwa meminum minuman keras haram hukumnya dan tidak boleh diproduksi.

Di akhir ayat, Allah SWT menegaskan bahwa dalam penciptaan kedua macam tumbuh-tumbuhan itu terdapat tanda-tanda yang jelas untuk menunjukkan keesaan Tuhan bagi orang-orang yang mempergunakan pikirannya untuk meneliti, memperhatikan, dan mengambil pelajaran dari penciptaan tumbuh-tumbuhan yang disebutkan dalam ayat itu.

Menurut tafsir al Qurtubi (2009) yang dimaksud سَكْرًا adalah minuman yang baik dari buah kurma dan anggur yang direndam dengan air, jika direndam dalam waktu yang lama akan terjadi proses fermentasi sehingga minuman tersebut dapat memabukkan.

Pemanfaatan BAL selain pada sektor industri makanan, dapat juga digunakan pada sektor farmasi kesehatan. Senyawa yang dihasilkan berupa asam organik, bakteriosin, metabolit primer, hidrogen peroksida, disetil, karbondioksida, asetaldehida, eksopolisakarida diketahui dari penelitian terdahulu mampu menghambat bakteri patogen dan beberapa senyawa dapat membunuh bakteri patogen.

2.2 *Weissella confusa*

Weissella spp. adalah bakteri berbentuk non-spora, hetero-fermentatif,

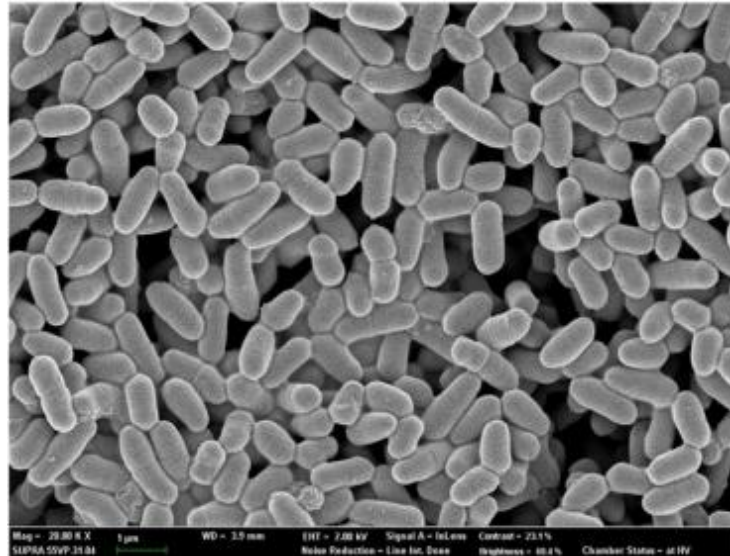
anaerob fakultatif, gram positif, katalase-negatif, alfa hemolitik yang muncul sebagai batang pendek atau coccobacilli berpasangan dan rantai.

Berdasarkan *Taxonomic Outline of the Prokaryotes*, *Weissella confusa* diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
Divisi : Firmicutes
Kelas : Bacilli
Ordo : Lactobacillales
Famili : Leuconostocaceae
Genus : *Weissella*
Spesies : *Weissella confusa*

Weissella confusa merupakan salah satu strain *Weissella spp.* yang telah banyak diisolasi dari berbagai sumber seperti sayuran segar, amilase terfermentasi, daging atau produk daging itu sendiri. *Weissella* yang diisolasi dari gandum telah dilaporkan dapat menghasilkan eksopolisakarida jenis dekstran. Bakteri ini diketahui dapat menghasilkan hidrogen peroksida yang mampu menghambat keputihan isolat vagina *Candida albicans*, dan pertumbuhan *E. coli*, *S. aureus*, *Streptococcus agalctiae*.

Spesies *Weissella* telah digunakan dalam produksi berbagai makanan dan minuman yang difermentasi dan juga akhir-akhir ini digunakan sebagai probiotik. *W. confusa* memiliki potensi antikanker, anti radang, anti bakteri, anti jamur, dan daya tahan tubuh (Kamboj, et. al, 2015). *W. confusa* telah banyak terlibat dalam fermentasi asam laktat dan fermentasi minuman beralkohol dan baru-baru ini menarik perhatian akademisi karena memiliki kemampuan yang tinggi dalam produksi eksopolisakarida (Jin, H. et. al., 2019).



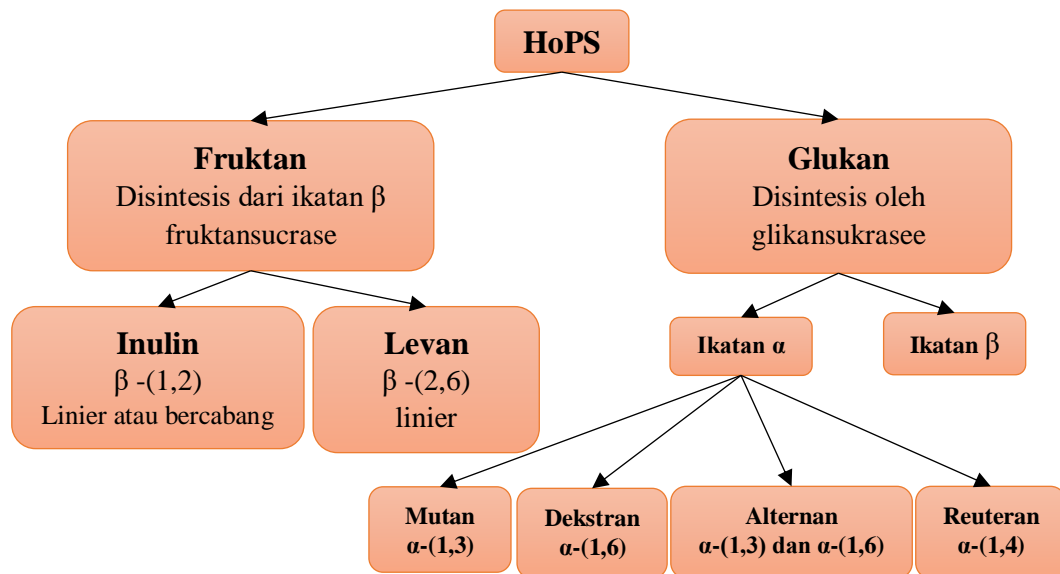
Gambar 2.1 Bentuk sel *Weissella confusa* (Jin, et. al, 2019)

2.3 Ekspolisakarida

Ekspolisakarida adalah polimer gula atau polisakarida yang disekresikan oleh mikroba ke luar sel, polimer ini merupakan salah satu polimer yang dapat disintesis oleh BAL. Ekspolisakarida umumnya terdiri dari monosakarida dan beberapa substituen non-karbohidrat seperti asetat, piruvat, suksinat, dan fosfat, selain itu juga dapat memproduksi biomolekul seperti protein, asam nukleat, lipid, dan zat umat, penelitian lain menyebutkan ekspolisakarida terdiri dari polisakarida dan protein (Nouha, K. et. al. 2017). Ekspolisakarida berperan dalam proses perlindungan sel bakteri penghasilnya dari kekeringan, mempertahankan fungsi seluler primer dan aktivitas anti bakteri terhadap patogen, kemampuan pembentuk gel dan degradasi polutan.

Terdapat dua jenis ekspolisakarida yang dihasilkan BAL berdasarkan komponen penyusun dan mekanisme biosintesisnya yaitu homopolisakarida dan heteropolisakarida. Homopolisakarida (HoPS) diproduksi di media ekstraselular dari satu tipe monosakarida, sedangkan heteropolisakarida (HePS) diproduksi secara

intraselular dari beberapa monosakarida dan kemudian diekspor dari sel (Guerin, M, et. al., 2020).



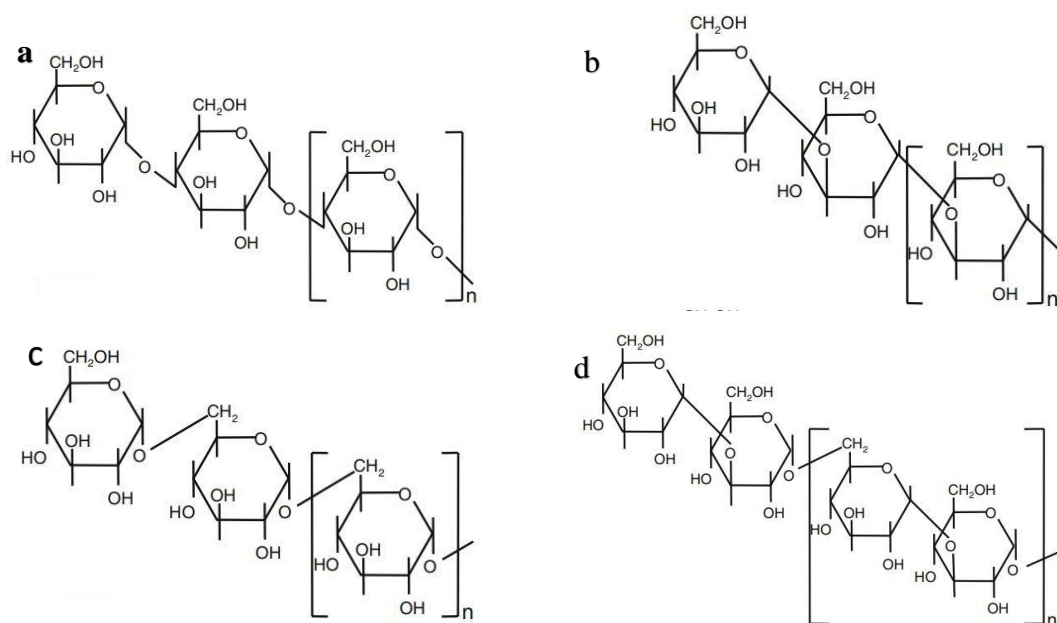
Gambar 2.2 Klasifikasi Homopolisakarida (Guérin, M, et. al., 2020)

2.3.1 Homopolisakarida (HoPS)

HoPS dapat diklasifikasikan berdasarkan jenis monosakarida yang menyusun strukturnya. Glukan yang memiliki ikatan α seperti dekstran yang terdiri hanya dari glukosa, pada fruktan seperti inulin dan levan yang terdiri hanya dari fruktosa, klasifikasinya dapat dilanjutkan berdasarkan ikatan glikosidik, cabang, panjang rantai, berat molekul, dan struktur polimer. BAL yang diketahui dapat memproduksi HoPS adalah *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* dan *Weissella* (Guerin, M, et. al., 2020). HoPS disintesis dari sukrosa yang dibantu oleh enzim glikosiltransferase (glukansucrase), enzim yang terlibat dalam biosintesis glukan dan fruktan adalah glukosiltrasferase (GTF) dan fruktosiltransferase (FTF).

Klasifikasi HoPS dibedakan berdasarkan jumlah atom karbon pada ikatan α dan β . Pada α -D- glukan termasuk dekstran, mutan, reutan, dan alternan diproduksi

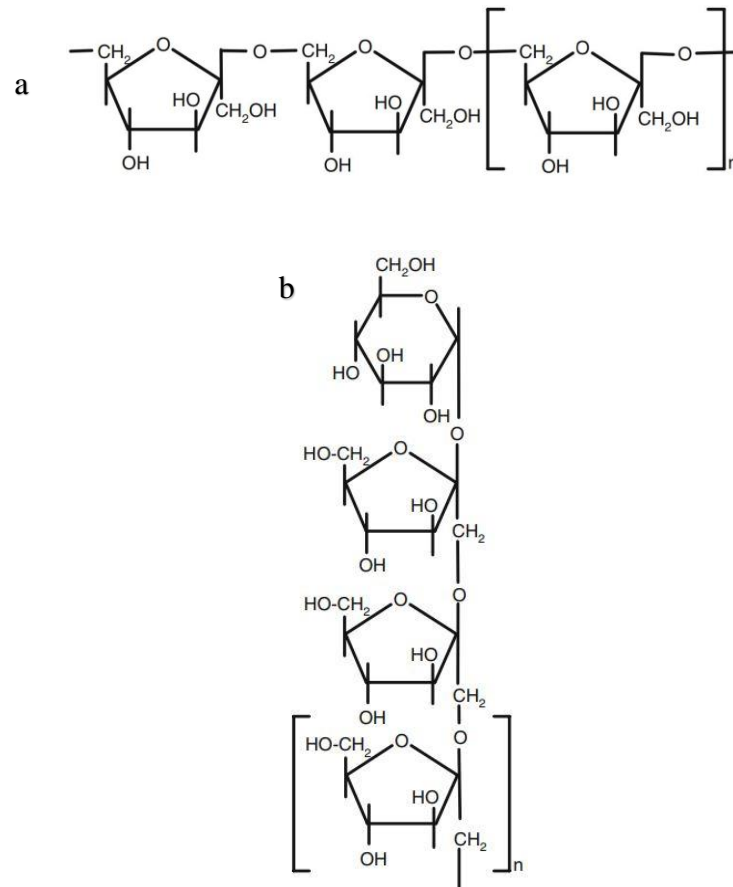
oleh *Lactobacillus*, *Leuconostoc* dan spesies *Streptococcus*, pada spesies *Pediococcus* dapat memproduksi β -glukan. Dekstran terdiri dari unit rantai utama glukosil yang berulang dan dihubungkan oleh ikatan α -(1,6) dan unit sederhana atau rantai cabang dengan ikatan α -(1,2), α -(1,3), atau ikatan α -(1,4). Terlepas dari jumlahnya rantai cabang membentuk struktur yang rapat yang dapat menurunkan viskositas eksopolisakarida. Dekstran memberikan sifat reologi yang berbeda tergantung pada kelarutan dan heterogenitas strukturalnya, dektran juga biasanya digunakan sebagai pengganti plasma, agen pengental, dan pengemulsi. Mutan umumnya dihubungkan oleh ikatan α -(1,3) glikosidik, reutran secara umum dihubungkan oleh ikatan glikosidik α -(1,4), dan alternan dihubungkan secara bergantian oleh α -(1,6) dan α -(1,3). HoPS jenis ini dicirikan oleh kemampuannya untuk berkontribusi pada adhesi mikroba (Guerin. M, et. al., 2020).



Gambar 2.3 Jenis HoPS glukuan a) Reutran, b) Mutan, c) Dekstran, d) Alternan

HoPS jenis fruktan mengandung fragmen fruktosil dengan ikatan β -(2,6) atau β -(2,1). Dari jalur fruktan secara umum menghasikan poliskaarida inulin dan levan,

berdasarkan penelitian terdahulu HoPS jenis ini dihasilkan oleh *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* dan *Weissella*. Levan diproduksi oleh *Lactobacillus reuteri* dan *Lactobacillus sanfranciscensisstrain* yang mana sebagian besar mengandung ikatan β -(2,6), inulin memiliki ikatan β -(2,1) dan rantai percabanga pada posisi β -(2,6) (Guerin. M, et. al., 2020).



Gambar 2.4 Jenis HoPS fruktan a) Levan, b) Inulin

2.3.2 Heteropolisakarida (HePS)

HePS terdiri dari unit berulang dengan derajat polimerisasi yang berbeda dan terdiri dari dua hingga delapan monosakarida yang berbeda seperti glukosa, rhamnosa, galaktosa, fruktosa atau mannose, HePS diproduksi oleh *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* dan *Bifidobacterium*. Struktur HePS tergantung pada

jumlah dan jenis monosakarida dan pada jenis ikatan yang terlibat, struktur yang terbentuk bisa linier atau dengan ikatan bercabang, HePS diproduksi oleh spesies *Lactobacillus* yang terdiri dari unit berulang dari tujuh monosakarida dengan glukosa, galaktosa dan rhamnosa sebagai gula utama (Guerin. M, et. al., 2020).

Saat ini eksopolisakarida telah banyak dimanfaatkan secara luas pada bidang pangan, farmasi dan industri lainnya. Berdasarkan penelitian terdahulu eksopolisakarida memiliki berbagai macam potensi dalam bidang farmasi, pangan, dan kesehatan. Eksopolisakarida yang digunakan dalam bidang kesehatan seperti β -glukan, β -manan, antan, curdlan, gellan, dan dekstran. Dalam bidang pangan eksopolisakarida dimanfaatkan sebagai stabilisator, pengental, emulgator, pembentuk gel, dan memiliki kemampuan mengikat air yang baik sehingga dapat mempertahankan tekstur agar tetap lembut selama penyimpanan (Malik, et. al, 2008). Eksopolisakarida dalam bidang pengobatan dilaporkan memiliki kemampuan untuk menempel pada mukosa usus halus sehingga meningkatkan kemampuan untuk menekan pertumbuhan bakteri patogen, kemampuan tersebut didasarkan pada eksopolisakarida yang memiliki aktivitas anti tumoral, anti ulcer, anti inflamasi, anti infeksi, dan meningkatkan sistem imun tubuh (imunostimulator) (Halim, C. dkk, 2013). Eksopolisakarida telah terbukti memiliki aktivitas fisiologis seperti anti tumor, antivirus dan anti inflamasi, serta menjadi penginduksi interferon, penghambatan agregasi trombosit, sintesis faktor penstimulasi koloni, koagulan dan pelumas (Anindita, 2020). Beberapa bakteri seperti *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, dan *Weissela*, termasuk BAL yang bersifat probiotik dan diketahui dapat memproduksi eksopolisakarida (Sanlibaba dan Gurcu, 2016, Tallon et al, 2003).

2.4 Biosintesis Eksopolisakarida

Biosintesis eksopolisakarida dilakukan pada fase-fase pertumbuhan yang berbeda tergantung jenis mikroorganismenya. Proses sintesis dapat dibedakan menjadi dua prinsip dasar yaitu tempat dan prekursor alami, misalnya sintesis di luar dinding sel atau pada membran sel. Sintesis heteropolisakarida berbeda dengan sintesis monosakarida yang biosintesis pada membran sitoplasma dengan memanfaatkan prekursor yang terbentuk intraseluler. Gula nukleotida berperan penting dalam sintesis heteropolisakarida sehingga perannya dalam interkonversi monosakarida atau disakarida (gula) sebaik aktivitas gula yang dibutuhkan untuk polimerisasi monosakarida menjadi polisakarida (Cerning, et. al 1990).

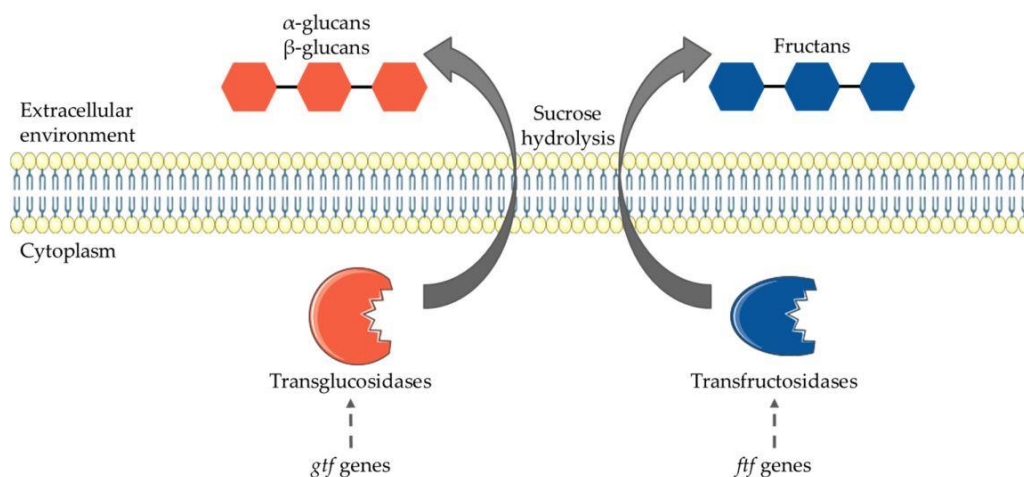
Eksopolisakarida disintesis oleh bakteri gram positif maupun gram negatif melalui dua mekanisme berbeda. Bakteri gram positif mensintesis eksopolisakarida seperti levan, alternan dan sekstan bersintesis dengan proses ekstraselular (Vanhooren, P. and Vandamme, E. J., 1998) sedangkan bakteri gram negatif mensintesis eksopolisakarida seperti xanthan, gelam, selulosa, suksinoglikan secara intraseluler (Shutherland, 2001).

2.4.1 Biosintesis Homopolisakarida (HoPS)

Biosintesis HoPS terjadi pada *Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* dan *Pediococcus* genera, biosintesis ini dibantu oleh enzim ekstraseluler glukansukrase atau fruktansukrase, enzim tersebut mentransfer monosakarida dari substrat spesifik pada pertumbuhan rantai polisakarida, residu monosakarida yang dihasilkan akan melekat pada rantai aseptor glikan. Enzim-enzim ini termasuk dalam kelompok glikosiltransferase (GTF, EC 2.4xy) dan mengkatalisis hidrolisis gula, dan dapat dikategorikan menjadi transglukosidase (EC 2.4.1.y; glukon-tersintesis dekstran-

sukrases, mutansukrases, dan reuteransukrases) dan transfruktosidase (EC 2.4.1.y atau 2.y; fruktan-terkatalis transfruktosidase levansucrase dan inulosukrase), Glukansukrase bertanggung jawab untuk sintesis glukana dan fruktana termasuk dalam superfamili α -amilase sebagai bagian dari glikosida hidrolase (GH), dalam klan GH-H (Guerin. M, et. al., 2020).

Glukansukrase dicirikan oleh kemampuannya untuk memutuskan ikatan α -glikosidik antara bagian glukosa dan bagian monosakarida yang lain menggunakan domain katalitik $(\beta/\alpha)_8$ -barrel yang menentukan reaksi spesifik, mengenai struktur tiga dimensi glukansukrase, inti katalitik mengandung tiga domain yang dilampirkan dua domain tambahan yakni domain IV dan V. Beberapa domain terdiri dari dua segmen terputus-putus rantai polipeptida dan menghasilkan struktur berbentuk U (Guerin. M, et. al., 2020).

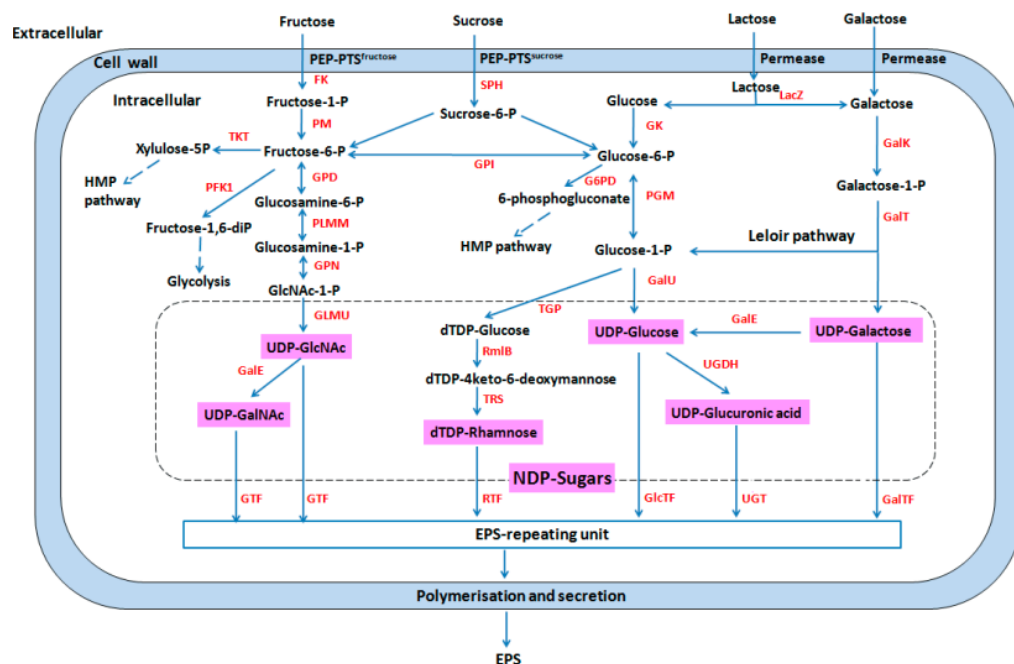


Gambar 2.5 Jalur biosintesis HoPS (Guerin. M, et. al., 2020)

2.4.2 Biosintesis Heteropolisakarida (HePS)

Biosintesis HePS menggunakan substrat sukrosa terdiri atas beberapa tahapan. Substrat sukrosa-6-P melalui jalur fosfoenolpiruvat-fosfotransferase (PEP-PTS), kemudian dihidrolisis menjadi fruktosa-6-P yang dikatalis oleh enzim SacA/

ScrB (sukrosa-6-fosfathidrolase), glukosamin-6-P dengan katalis enzim SacK/ScrK (6-fruktokinase). Fruktosa-6-fosfat menjadi glukosamin-6-fosfat dengan katalis enzim glutaminfruktosa-6-fosfat transaminase, glukosamin-6-fosfat menjadi N-asetil-glukosamin-6-fosfat dengan katalis enzim N-asetilglukosamin-6-fosfat deasetilase, N-asetilglukosamin-6-fosfat menjadi N-asetilglukosamin-1-fosfat dengan katalis enzim N-asetilglukosamin fosfomutase, N-asetilglukosamin-1-fosfat menjadi UDP-N-asetilglukosamin dengan katalis enzim 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 dimedia fermentasi.



Gambar 2.6 Jalur biosintesis HePS (Cui, et. al., 2016)

Biosintesis HePs melalui perubahan fruktosa-6-fosfat menjadi manosa-6-fosfat dengan katalis enzim mannosa-6-fosfat isomerase, kemudian mannosa-6-fosfat menjadi mannosa-1-fosfat dikatalis oleh enzim fosfomannomutase, mannosa

1-fosfat menjadi GDP-mannosa dikatalis oleh enzim mannos-1-fosfat guaniltransferase, GSP-mannosa menjadi GDP-4-dehidro-6-deoksimannosa dikatalis oleh enzim GDP-mannosa-4,6-dehidratase, GDP-4-dehidro-6-deosimanosa menjadi GDP-fruktosa dikatalis oleh enzim GDP-fukosa sintase, kemudian nukleotida gula berupa GTF (glikosiltransferase) berperan untuk menggabungkan 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. Setelah itu, pada membran periplasmatik sel, glikosiltrasnferase mentransfer gula nukleosida difosfat untuk membentuk pengulangan unit melekat pada sebuah lipid pembawa glikosil. Kemudian makromolekul dipolimerisasi dan disekresikan dalam bentuk eksopolisakarida (Kumar, dkk, 2007).

2.5 Produksi Eksopolisakarida

Produksi eksopolisakrida biasanya dilakukan dengan menumbuhkan BAL pada media MRS padat yang dilengkapi dengan gula seperti sukrosa, maltose, fruktosa, glukosa, atau laktosa, produksi eksopolisakarida juga dapat dilakukan pada media cair yang dilengkapi dengan berbagai sumber seperti nitrogen, karbon, dan vitamin. Secara umum koloni yang dihasilkan dari HoPS memiliki penampilan yang kental sedangkan HePS memiliki penampilan mengkilap (Guerin. M, et. al., 2020).

Produksi eksopolisakarida dilakukan melalui proses fermentasi, yang mana merupakan proses perubahan kimia pada substrat organik, baik karbohidrat,

protein, lemak dan lainnya melalui biokatalis dan dikenal sebagai enzim yang dihasilkan oleh jenis mikroorganisme spesifik. Fermentasi dibagi menjadi dua jenis aerob dan anaerob, fermentasi aerob adalah fermentasi yang tidak memerlukan oksigen, sedangkan anaerob adalah fermentasi yang membutuhkan oksigen (Wanto dan Soebagyo, 1980). Konsentrasi gula yang digunakan dalam proses fermentasi adalah 14-18% atau 10-18% (Paturau, 1982; Casida, 1980), jika konsentrasi gula terlalu tinggi dapat menghambat aktivitas khamir dan membuat fermentasi menjadi lebih lama, dan jika konsentrasi gula terlalu rendah dapat mengakibatkan biaya produksi terlalu tinggi (Krik, 1963), Paturau (1982), menyatakan bahwa bahan bergula harus dipasteurisasi dahulu sebelum inokulasi sehingga mikroorganisme yang mengganggu fermentasi alkohol tidak aktif.

Faktor-faktor yang mempengaruhi produksi eksopolisakrida dalam efisiensi fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu: suhu, pH, konsentrasi substrat, konsentrasi inokulum, dan media (Velasco et al, 2006).

1. Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi siklus mikroba dan faktor abiotik yang menentukan keberhasilan fermentasi. Selama proses fermentasi akan mengalami perubahan suhu, dimulai dari suhu rendah sampai tinggi ketika proses eksoteris dan kemudian mengalami penurunan kembali setelah reaksi selesai, kondisi ini terjadi karena kerja khamir (ragi) dalam metabolisme media.

2. pH

Kebanyakan enzim mempunyai pH yang memungkinkan untuk melakukan aktivitas secara maksimal, di bawah atau di atas pH optimum kinerja enzim akan mengalami penurunan. Berdasarkan penelitian Zisu dan Shah (2003), produksi eksopolisakarida dari bakteri *Streptococcus thermophilus* pada pH 5,5 dengan

suplemen *whey protein concentrate* mencapai 1029 mg/L, hasil penelitian Kimmell, S. A. dan Ziegler, G. R. (1998) bahwa produksi eksopolisakarida optimum dari *Leuconostoc mesenteroides* adalah pH 5,0 dengan hasil 30mg/L setelah diprediksi sebelumnya 296 mg/L. Adebayo-Toya, et. al., (2020) menggunakan media MRSB dalam penelitiannya mengekstrak eksopolisakarida dari bakteri *Lactobacillus delbureckii subsp. bulgaricus* liar, hasil ekstrak eksopolisakarida diketahui 5570,34-5910,2 mg/L, Whongsuphachat et. al, (2010) produksi eksopolisakarida dari *Weissella confusa* dengan tambahan sukrosa 2% pada pH 7 menghasilkan 18,08 gr/L.

3. Konsentrasi Substrat

Kecepatan reaksi enzimatik umumnya tergantung pada konsentrasi substrat. Kecepatan reaksi akan meningkat seiring dengan naiknya konsentrasi substrat, meningkatnya kecepatan reaksi akan terus terjadi sampai pada titik konstan namun tetap terjadi reaksi dengan kecepatan rendah (Lehninger, 1997), hal ini terjadi karena molekul enzim telah membentuk kompleks dengan substrat yang selanjutnya kecepatan reaksi tidak terpengaruh oleh kenaikan konsentrasi (Trenggono dan Sutardi, 1990).

4. Konsentrasi Inokulum

Inokulum adalah biakan bakteri yang dimasukkan ke dalam media cair yang siap digunakan untuk fermentasi. Kadar inokulum pada fermentasi menunjukkan pengaruh terhadap produk fermentasi, seperti konsentrasi inokulum 10 mL/L dapat menghasilkan eksopolisakarida sebesar 650 mg/L (Haroun, dkk. 2013).

5. Media

Pemilihan jenis media dapat mempengaruhi produksi eksopolisakarida karena rantai utama dari polimer ini adalah glukosa. Xu, et. al., (2010) menyebutkan

bahwa penggunaan substrat glukosa sebesar 30 g/L dapat memproduksi eksopolisakarida dari isolat *Lactobacillus delbrueckii* B-3. Lule, et. al., (2014) menggunakan substrat *paneer whey* 0,047 g/L dalam memproduksi eksopolisakarida dari bakteri *Leuconostoc mesenteroides* dengan randemen 12,7 g/L.

Tabel 2.1 Strain *Weissella confusa* dan produksi eksopolisakarida (Jin, et. al., 2019)

Strain	Sumber	Media	Tipe EPS	Produksi (g/L)	Metode
<i>W. confusa</i> VP30	Feses anak-anak	MRS+10- % sukrosa	Dekstran	60 ±0,9	Asam sulfat fenol
<i>W. confusa</i> KR780676	Adonan Idli	MRS+2% sukrosa 30 °C 48 jam	Galaktan	17,2	Dry Weights
<i>W. confusa</i> NH02	Nham	MRS+4% sukrosa 37 °C 12 jam	-	18,08	

Jin, et. al., (2019) memproduksi eksopolisakarida dari isolat *Weissella confusa* VP30 menggunakan media MRSB dengan penambahan sukrosa 10% (b/v) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam menghasilkan randemen eksopolisakarida sebesar 59,99 g/L, sedangkan pada penelitian Kaviatake, et. al., (2016) strain *Weissella confusa* KR780676 menggunakan media MRSB termodifikasi dengan 2% sukrosa yang diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam menghasilkan randemen 17,2 g/L .

Wongsuphachat, et. al., (2010) dalam penelitiannya memproduksi eksopolisakarida dari *Weissella confusa* NH 02 menggunakan media MRSB dengan penambahan sukrosa 2% dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 12 jam menghasilkan randemen eksopolisakarida sebesar 18,08 g/L. Adesulu-Dahunsi, et. al., (2018) dalam penelitiannya memproduksi eksopolisakarida dari strain *Weissella confusa* OF126 menggunakan media MRSB termodifikasi sukrosa dengan konsentrasi 24 g/L pada suhu 30°C selama 48 jam menghasilkan randemen sebanyak 3,00 g/L.

2.6 Karakterisasi Eksopolisakarida

2.6.1 Karakterisasi secara Fisika

Karakterisasi secara fisika untuk menentukan sifat eksopolisakarida berdasarkan sifat kelarutannya terhadap berbagai pelarut, kadar kelarutan, dan daya ikat air. Kelarutan eksopolisakarida tergantung pada konstanta dielektrik dari pelarut, dimana semakin besar nilai konstanta dielektrik suatu pelarut maka nilai kepolaran semakin tinggi dan kemampuan untuk melarutkan eksopolisakarida semakin tinggi (Mao, H dan Zhengsong, Q., 2016).

Tabel 2.2 Tabel konstanta dielektrik (Kato, C, et. al., 2013)

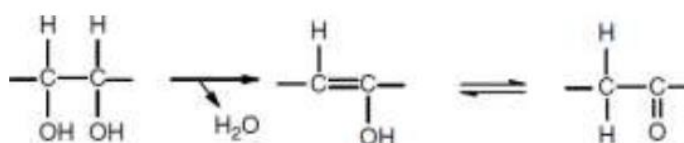
Pelarut	Konstanta Dielektrik (ϵ)	Keterangan
n-heksana	1,9	
Benzena	2,3	
Kloroform	4,7	
Diklorometana	8,9	Konstanta dielektrik
Aseton	20,7	>3,6 sangat polar
Etanol	24,3	2,8-3,6 polar yang lemah
Metanol	32,6	<2,8 non polar
Propilen karbonat	64,4	
Air	78,5	

Kelarutan eksopolisakarida dapat dipengaruhi oleh panjang rantai utama dan cabang, susunan ikatan glikosidik, struktur skunder dan tersier, eksopolisakarida mampu larut dalam air dan sifatnya yang mengikat air dikarenakan adanya struktur matriks berpori yang mampu menahan sejumlah air dengan adanya ikatan hidrogen (Zhou, et. al., 2017).

2.6.2 Karakterisasi secara Kimia

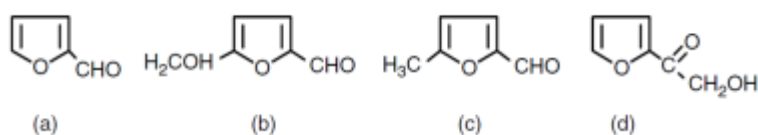
1. Kadar Gula Total Eksopolisakarida Metode Sulfat-Fenol

Metode yang digunakan untuk mengetahui kadar gula salah satunya adalah metode sulfat-fenol. Gula merupakan golongan karbohidrat yang mana ketika ditambahkan asam kuat dan dipanaskan akan mengalami reaksi pembentukan derivat furan seperti furanaldehid dan hidroksimetil furaldehyda. Reaksi yang terjadi diawali dengan dehidrasi dan diikuti dengan pembentukan turunan furan (Brummer, Y. dan Cui., 2005). Turunan furan selanjutnya akan bereaksi dengan fenol menghasilkan warna jingga kekuningan yang stabil, sehingga dapat dideteksi oleh spektrofotometer UV-Vis (Albalasmeh, et. al., 2013).



Gambar 2.7 Reaksi dehidrasi karbohidrat

Senyawa turunan furan yang terbentuk tergantung pada jenis karbohidrat, terdapat beberapa turunan furan dari karbohidrat seperti pada Gambar 2.5.



Gambar 2.8 Turunan furan a) Pentosa, b) Heksosa, c) 6-dioksiheksosa, d) ketokheksosa

Penentuan kadar gula pada eksopolisakarida didasarkan pada kurva standar, karena yang akan dicari adalah kadar gula dalam eksopolisakarida maka membutuhkan kurva standar. Untuk membuat kurva standar setidaknya dibutuhkan tiga konsentrasi senyawa, namun jika lima konsentrasi atau lebih banyak akan lebih ideal untuk kurva yang lebih akurat, konsentrasi harus dimulai tepat di atas dan di bawah konsentrasi sampel yang tidak diketahui. Kurva standar yang diolah dari data penelitian akan menghasilkan persamaan regresi linier dan nilai regresi berupa $y = ax - b$ dan R^2 , keselarasan model regresi dapat diterangkan dari nilai R^2 , ketika nilai tersebut mendekati satu maka seluruh variasi dalam variabel terikat (variabel Y) dapat diterangkan oleh model regresi, jika nilai $R^2 = 0$ maka tidak ada hubungan antara variabel bebas (variabel X) dan variabel terikat (variabel Y) (Pavan dan Andrew,. 2020).

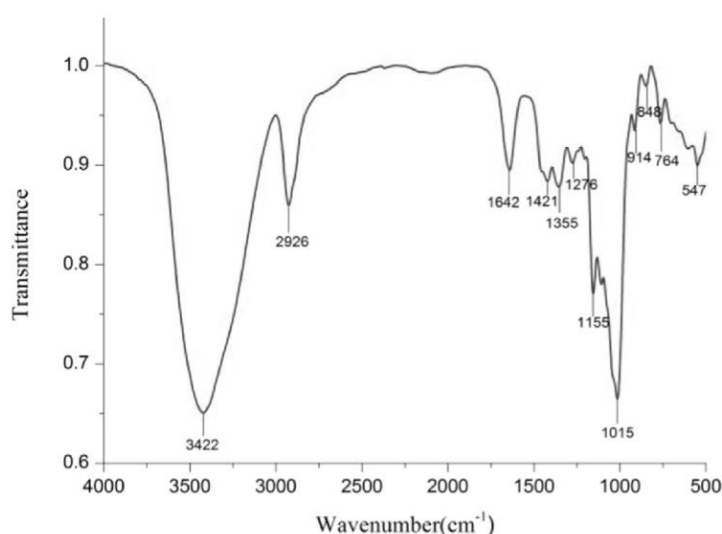
2. Analisa Kadar Protein Eksopolisakrida

Penentuan kadar protein eksopolisakarida menggunakan metode lowry, kadar protein termasuk senyawa yang tidak diinginkan sehingga perlu dipisahkan. Metode lowry secara prinsip menggunakan reagen pendeteksi Folin-ciocalteu, reagen ini biasa digunakan untuk mendeteksi gugus-gugus fenolik. Dalam keadaan basa, ion tembaga divalent (Cu^{2+}) dengan ikatan peptida yang mereduksi Cu^{2+} menjadi tembaga monovalen (Cu^+) (Bintang, 2010). Reagen Folin-Ciocalteu dapat mendeteksi residu oksidasi dimana gugus fenolik tirosin akan mereduksi fosfotungstat dan fosfomolibdat yang terdapat pada reagen tersebut menjadi tungsten dan molibden berwarna biru, hasil reduksi tersebut dapat dianalisa lebih lanjut dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Kadar protein dapat ditentukan dengan membaca kurva standar yang dibuat dengan larutan protein murni yang telah diketahui kadar proteinnya seperti *Bovine Serum Albumin* (BSA) yang memiliki rentang konsentrasi tertentu, kemudian konsentrasi sampel berprotein berada pada rentang tersebut dengan konsentrasi yang semakin menaik (Sudarmadji, Slamet. dkk., 1981).

3. Analisa Gugus Fungsi Eksopolisakarida Menggunakan *Fourier Transform Infra Red* (FTIR)

Penentuan struktur eksopolisakarida dapat dilakukan dengan FTIR dengan mengetahui gugus fungsi khas pada struktur dengan menggunakan sinar infra merah. Ketika sinar infra merah mengenai molekul maka akan terjadi interaksi vibrasi ikatan kimia yang menyebabkan perubahan polaritas dengan medan listrik gelombang elektromagnetik. Pita absorpsi khas muncul karena interaksi sinar infra merah dan gugus fungsi, setiap pita serapan menunjukkan interaksi pada gugus fungsi yang berbeda sehingga dapat digunakan untuk menentukan struktur senyawa eksopolisakarida (Pine, dan Hammond, 1980., Shingle, 2002).



Gambar 2.9 Spektra FTIR eksopolisakarida (Zhou, et. al., 2017)

Menurut Adesulu-Dahnusi, et. al. (2018) eksopolisakarida memiliki gugus fungsi yang khas seperti O-H pada spektra 3287 cm^{-1} , C-H *stretching* pada pita serapan 2980 cm^{-1} , C=O pada pita serapan 1651 cm^{-1} , C-O-C *stretching* pada pita serapan 1009 cm^{-1} , α -glikosidik pada pita serapan 914 cm^{-1} .

2.7 Potensi Eksopolisakarida Sebagai Antibakteri

Spesies *W. confusa* telah dilaporkan secara ekstensif dalam menghasilkan eksopolisakarida khususnya dekstran yang umum digunakan dalam industri makanan dan kosmetik. Bakteri tersebut diketahui penghasil eksopolisakarida yang tinggi dan menunjukkan resistensi asam sehingga menjadikannya kandidat probiotik yang bagus dalam melewati saluran pencernaan untuk menuju saluran gastrointestinal. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa eksopolisakarida mampu menjadi agen terapeutik yang mana dapat menangkal radikal bebas untuk pencegahan kerusakan oksidatif, selain itu eksopolisakarida juga dapat berperan sebagai antioksidan dan antibakteri dengan fungsi yang hampir sama dengan obat antioksidan dan antibakteri sintesis namun memiliki efek samping yang minimal (Adesulu-Dahunsi, et. al, 2018).

Penelitian terdahulu melaporkan tentang antibakteri eksopolisakarida yang diekstrak dari BAL seperti penelitian Patel, et. al., (2018) menyebutkan bahwa senyawa eksopolisakarida yang diekstrak dari bakteri golongan *Bacillus spp* dan *Pseudomonas spp* yang diisolasi dari tanah ladang tebu dan dibiakkan menggunakan media *Nutrient Agar*, kemudian diuji aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *B. subtilis* menggunakan metode difusi agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-2 hari, didapatkan diameter zona bening yang dihasilkan ekstrak

eksopolisakarida konsentrasi 7,5 mg/ml pada *E. coli* adalah 6 mm, eksopolisakarida dengan konsentrasi yang sama pada *B. subtilis* adalah 9 mm.

2.7 Mekanisme Kerja Eksopolisakarida Sebagai Antibakteri

Mekanisme penghambatan eksopolisakarida terhadap bakteri patogen pada umumnya interaksi antar eksopolisakarida dengan dinding sel bakteri. Eksopolisakarida mampu menghambat bakteri patogen karena perbedaan muatan positif pada eksopolisakarida dan bakteri patogen yang bermuatan negatif, hal tersebut menimbulkan interaksi elektrostatik yang mengganggu permeabilitas dinding sel bakteri patogen dan menyebabkan terhidrolisis yang selanjutnya berakibat bocornya sel dan mematikan sel. Penghambatan pertumbuhan tersebut efektif pada bakteri gram negatif karena bakteri tersebut memiliki dinding sel yang lebih tipis daripada gram positif, kecuali bakteri *S. aureus* yang memiliki dinding rentan (Aullybux, et. al., 2019).

1. Mengganggu metabolisme sel mikroba

Pada umumnya mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya yang disintesis dari asam amino para benzoat (PABA) (Ganiswara. 2012). Antimikroba bersifat sebagai antimetabolit dimana antimikroba bekerja memblok terhadap metabolit spesifik mikroba, seperti sulfonamida. Sulfonamida menghambat pertumbuhan sel dengan menghambat sintesis asam folat oleh bakteri. Sulfanamida secara struktur mirip dengan asam folat, asam amino para benzoat (PABA), dan bekerja secara kompetitif untuk enzim-enzim yang langsung mempersatukan PABA dan sebagian petidin menjadi asam dihidrofolat (Djide dan Sartini,2008).

2. Penghambatan terhadap sintesis dinding sel

Dinding sel bakteri terdiri dari peptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida. Beberapa antibiotik seperti sikloserin menghambat reaksi paling dini dari proses sintesis dinding sel diikuti oleh basitrasin, vankomisin dan diakhiri oleh penisilin dan sefalosporin yang menghambat reaksi terakhir (transpeptidasi) (Ganiswara. 2012).

3. Penghambatan terhadap fungsi membran sel.

Antimikroba bekerja secara langsung pada membran sel yang mempengaruhi permeabilitas dan menyebabkan keluarnya senyawa intraseluler mikroorganisme. Membran sel adalah lapisan di bawah dinding sel yang mempunyai sifat permeabilitas selektif dan berfungsi mengontrol keluar masuknya substansi dari dalam dan luar sel, serta memelihara tekanan osmotik internal dan ekskresi. Beberapa antibiotik bersatu dengan membran yang berfungsi sebagai *ionophores* yaitu senyawa yang memberi jalan masuknya ion abnormal. Proses ini dapat mengganggu biokimia sel, misalnya gramisidin. Antibiotik polimiksin dapat merusak membran sel setelah bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sel. Polimiksin lebih aktif terhadap bakteri gram negatif (Djide. 2008).

4. Penghambatan terhadap sintesis protein

Hidupnya suatu sel tergantung pada terpeliharanya molekul-molekul dalam keadaan alamiah. Suatu kondisi atau substansi mengubah keadaan ini yaitu mendenaturasi protein dengan merusak sel tanpa dapat diperbaiki kembali. Suhu tinggi atau konsentrasi beberapa zat dapat mengakibatkan koagulasi kerusakan total komponen seluler yang vital.

5. Penghambatan terhadap sintesis asam nukleat

Asam nukleat merupakan bagian yang sangat vital bagi perkembangbiakan sel. Untuk pertumbuhannya, kebanyakan sel tergantung pada sintesis DNA,

sedangkan RNA diperlukan untuk transkripsi dan penentuan informasi sintesis protein dan enzim. Begitu pentingnya DNA dan RNA dalam proses kehidupan sel. Hal ini berarti bahwa gangguan apapun yang terjadi pada pembentukan atau pada fungsi zat-zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel. Dalam hal ini mempengaruhi metabolisme asam nukleat, seperti berikatan dengan enzim DNA dependen RNA polimerase bakteri, memblokir helix DNA. Contohnya seperti antibiotik quinolon, pirimetamin, sulfonamida, trimetoprim, dan trimetrexat, sedangkan metronidazole menghambat sintesis DNA (Djide, 2008 dan Pelczar, dan E.C.S.Chan., 1996).

BAB III METODOLOGI

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Februari-April 2021.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *laminar air flow*, spektrofotometer UV-Vis, *Fourier Transform Infra Red (FTIR)*, neraca analitik, *hot plate*, autoclave, *shaker*, sentrifus, pipet mikro, pipet ukur, vorteks, erlenmeyer, tabung reaksi, cawan petri, inkubator, batang pengaduk, *blue tip*, *yellow tip*, *rotary evaporator*, tabung sentrifugasi, termometer, rak tabung reaksi, gelas beker, jarum ose, pipet tetes, spatula, *stirrer*, gelas ukur, aluminium foil, kapas, plastik tahan panas, bunsen, korek api, jangka sorong.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian kali ini meliputi *Weissella confusa*, *Salmonella typhi*, MRSA (*De Man Rogosa Sharpe Agar*) (Merck), MRSB (*De Man Rogosa Sharpe Broth*) (Pronadisa), NA (*Nutrien Agar*) (Merck), *Nutrien Broth* (NB) (Merck), NaOH (Merck), akuabides steril, spiritus, NaCl, etanol PA 96% (Merck), alkohol 70% (Onemed), akuades (water one), kemas cakram (Oxoid).

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara deskriptif kuantitatif dan kuantitatif terdiri dari 2 tahap. Penelitian tahap I yaitu karakterisasi fisik dan kimia dari eksopolisakarida

yang dihasilkan oleh *W. confusa* dan tahap II yaitu uji aktivitas antibakteri eksopolisakarida. Karakterisasi fisik eksopolisakarida terdiri dari uji kelarutan eksopolisakarida terhadap pelarut organik yaitu akuabides, metanol, kloroform, dan n-heksan, kemudian uji indeks kelarutan air, dan uji daya ikat air. Karakterisasi secara kimia terdiri dari analisis kadar gula total, kadar protein, dan gugus fungsi eksopolisakarida. Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut,

3.4.1 Sterilisasi Alat dan Media

3.4.2 Produksi Eksopolisakarida

3.4.2.1 Pembuatan Media MRSA

3.4.2.2 Regenerasi *Weissella confusa*

3.4.2.3 Pembuatan MRSB dengan penambahan Sukrosa 5%

3.4.2.4 Pembuatan inokulum *Weissella confusa*

3.4.2.5 Produksi dan Ekstraksi Eksopolisakarida

3.4.3 Karakterisasi Eksopolisakarida secara Fisik dan Kimia

3.4.3.1 Kelarutan Eksopolisakarida

3.4.3.2 Indeks Kelarutan Air dan Daya Ikat Air Eksopolisakarida

3.4.3.3 Analisa Kadar Glukosa Eksopolisakarida

3.4.3.4 Analisa Kadar Protein Eksopolisakarida

3.4.3.5 Analisa Gugus Fungsi Eksopolisakarida Menggunakan *Fourier Transform Infra Red (FTIR)*

3.4.4 Uji Aktivitas Antibakteri

3.4.5.1 Pembuatan Media Nutrien Agar (NA)

3.4.5.2 Regenerasi *Salmonella typhi*

3.4.5.3 Pembuatan Inokulum *Salmonella typhi*

3.4.5.4 Uji Aktivitas Antibakteri

3.4.5.5 Analisis Data

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat (Fauzi, 2013)

Alat kaca yang akan digunakan dicuci, ditutup dengan aluminium foil, dan dibungkus menggunakan plastik tahan panas, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121⁰C.

3.5.2 Produksi Ekspolisakarida

3.5.2.1 Pembuatan media *de Man Rogosa and Sharpe Agar (MRSA)*

Media MRSA ditimbang sebanyak 13,64 gr dan dihomogenkan dengan 200 ml akuades, campuran dipanaskan sampai mendidih, kemudian media dimasukkan dalam erlenmeyer dan ditutup kapas, erlenmeyer dibungkus menggunakan plastik tahan panas dan diautoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit dan tekanan 15 psi.

3.5.2.2 Regenerasi *Weissella confusa* (Kultsum, 2009)

Regenerasi bakteri dilakukan dengan cara diambil 2 ose biakan *Weissella confusa* dan dimasukkan ke dalam media MRS agar miring, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C.

3.5.2.3 Pembuatan media MRSB (*de Man Rogosa and Sharpe Broth*) dan MRSB + sukrosa 5%

Media MRSB 26,12 gr ditambahkan akuades 500 ml dan dipanaskan sampai mendidih. Media dipindahkan pada beberapa erlenmeyer kemudian ditutup dengan kapas dan dimasukkan dalam plastik tahan panas, kemudian disterilkan.

Ditambahkan 12,5 gr sukrosa steril pada sedikit MRSB kemudian dihomogenkan, dimasukkan MRSB-sukrosa dalam labu takar 250 mL dan ditanda bataskan.

3.5.2.4 Pembuatan Inokulum *Weissella confusa* (Ma'unatin, A., 2009)

Diambil 3 ose *Weissella confusa* dan dimasukkan dalam 20 mL MRSB, kemudian *dishaker* selama 18 jam dengan kecepatan 120 rpm. Diukur OD nya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 600 nm, kemudian disetarakan nilai OD nya 0,5.

3.5.2.5 Produksi Eksopolisakarida (Xu, et. al., 2010)

Inokulum *Weissella confusa* OD 0,5 sebanyak 25 mL ditambahkan pada MRSB termodifikasi 5% sukrosa sampai tanda batas, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 37 °C.

3.5.2.6 Ekstraksi Eksopolisakarida (Joo Seo, et. al., 2015)

Hasil fermentasi disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm dengan suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan diambil sebanyak 100 mL dan ditambahkan asam trikloroasetat dengan konsentrasi akhir 10% dan *dishaker* selama 30 menit dengan kecepatan 100 rpm. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang mengandung eksopolisakarida diambil dan ditambah etanol dingin 95% (2 kali volume supernatan) dan dibiarkan pada suhu 4°C selama 24 jam. Endapan yang didapat dipisahkan dari filtrat, kemudian dikeringkan pada temperatur 100 °C selama 4 jam, dimana setiap jam ditimbang berat kering sampai konstan. Kadar eksopolisakarida kering ditentukan dengan menggunakan Persamaan 3.1.

$$\text{Kadar EPS (gr/L)} = \frac{\text{berat eksopolisakarida kering (gr)}}{\text{volume (L)}} \dots\dots\dots 3.1$$

3.5.3 Karakterisasi Eksopolisakarida secara Fisik dan Kimia

3.5.3.1 Kelarutan Eksopolisakarida pada Berbagai Pelarut (Patil, et. al., 2015)

Uji eksopolisakarida dilakukan dengan menimbang masing-masing 0,01 gr dalam tabung reaksi, kemudian masing-masing ditambahkan 2 mL akuabides, metanol, klorofom, dan n-hektan. Masing-masing tabung kemudian divorteks selama 1 menit dan diamati kelarutannya.

3.5.3.2 Indeks Kelarutan Air dan Daya Ikat Air Eksopolisakarida (Zhou, et. al., 2017)

Indeks kelarutan air dilakukan dengan Ditimbang eksopolisakarida 0,02 gr dalam gelas beker, kemudian dilarutkan dalam 5 mL akuabides dan distirer dengan kecepatan 4 *hotplate* (125 rpm) selama 24 jam, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit, diambil 2 mL filtrat dan ditambahkan etanol 6 mL (tiga kali volume), kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit, diambil endapannya dan dikeringkan pada temperatur 105 °C selama 3 jam sampai berat konstan.

Daya ikat air dilakukan dengan Ditimbang eksopolisakarida 0,04 g kemudian dilarutkan dengan 2 mL akuabides dan divorteks selama 1 menit, kemudian disentrifugasi selama 25 menit dan di buang filtratnya, kemudian endapannya dibekukan dan ditaruh pada keatas saring, dibiarkan kering air yang terserap pada kertas saring dan ditimbang massanya.

3.5.3.4 Pembuatan Kurva Standar Glukosa (Dubois, et. al., 1956)

Dibuat larutan induk glukosa 1000 ppm dengan menimbang glukosa 0,1 gr dan ditera sampai 100 mL, kemudian dibuat konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm, diambil masing-masing 2 mL larutan glukosa kemudian ditambahkan 1 mL fenol 5% dan divorteks sebentar, ditambahkan 5 mL asam sulfat dengan cepat dan

dibiarkan selama 10 menit, kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 15 menit dan diukur nilai absorbansinya pada λ 490 nm.

3.5.3.5 Analisa Kadar Glukosa Total Eksopolisakarida (Dubois, et. al., 1956)

Ditimbang eksopolisakarida 0,01 gr dan ditera sampai 250 mL, diambil 2 mL kemudian ditambahkan 1 mL fenol 5% dan divortek, kemudian ditambahkan asam sulfat dan dibiarkan selama 10 menit, setelah itu dipanaskan pada air mendidih selama 15 menit dan diukur nilai absorbansinya pada λ 490 nm.

3.5.3.6 Pembuatan Kurva Standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) (Adesulu-Dahunsi, et. al., 2018)

Ditimbang 30 mg BSA dan dilarutkan pada 10 mL akuabides, dibuat konsentrasi 0,024; 0,048; 0,072; 0,096; dan 0,12. Diambil 1 mL masing-masing konsentrasi, ditambahkan 5 mL reagen lowry, divortek dan dibiarkan selama 10 menit, kemudian ditambahkan 0,5 mL folin 1N, diinkubasi dalam ruang gelap selama 20 menit, diukur absorbansinya pada λ 660 nm.

3.5.3.7 Analisa Kadar Protein Eksopolisakarida (Adesulu-Dahunsi, et. al., 2018)

Analisa kadar protein eksopolisakarida dilakukan menggunakan metode Lowry. Ditimbang 20 mg eksopolisakarida, dilarutkan pada 5 mL akuabides, diambil 1 mL eksopolisakarida dan ditambahkan 5 mL reagen lowry, divorteks dan dibiarkan selama 10 menit, ditambahkan 0,5 mL folin 1 N, kemudian diinkubasi dalam ruang gelap selama 20 menit,, kemudian diukur absorbansinya pada λ 660 nm.

3.5.3.8 Analisa Gugus Fungsi Eksopolisakarida Menggunakan *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) (Anton dan Zubaidah, 2015)

Ditimbang eksopolisakarida 0,01 gr ditumbuk sampai halus kemudian

dihomogenkan dengan KBr 0,25 gr kemudian campuran dicetak menjadi pelet dan diukur menggunakan FTIR.

3.5.4 Uji Aktivitas Antibakteri

3.5.4.1 Pembuatan Media *Nutrien Agar* (NA)

Ditimbang *nutrien agar* 5,6 gr kemudian dilarutkan pada 200 mL akuades sambil dipanaskan sampai mendidih, dipindahkan pada dua erlenmeyer dan disterilkan menggunakan autoklaf.

3.5.4.2 Regenerasi *Salmonella typhi* (Saliban, et. al., 2009)

Diambil 2 ose *Salmonella typhi* dan digoreskan pada NA miring secara aseptis, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 37°C.

3.5.4.3 Pembuatan Inokulum *Salmonella typhi* (Saliban, et. al., 2009)

Diambil 3 ose hasil peremajaan *Salmonella typhi* untuk membuat suspensi pekat dan dimasukkan dalam NaCl 10 mL, kemudian dihomogenkan, ditetesi NaCl sampai setara dengan *Mc. Farland* No.1.

3.5.5.3 Uji Aktivitas Antibakteri Eksopolisakarida terhadap *Salmonella typhi* (Patel, et. al., 2018)

Dilautkan eksopolisakarida 0,01 gr dalam 2 mL DMSO 10 %, kemudian dibuat konsentrasi 1,25; 2,5; dan 5 mg/mL, dipipet 100 µL inokulum *Salmonella typhi* dalam cawan petri, kemudian dituang media NA secukupnya, setelah mengeras ditaruhkan 4 cakram steril dan 1 cakram Siprofloksasin, ditambahkan 25 µL eksopolisakarida berbagai konsentrasi pada cakram 1-3 dan cakram 4 diisi dengan pelarut, ditunggu sampai larutan terserap kertas cakram kemudian diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 37 °C, diamati aktifitas antibakterinya.

3.5.5 Analis Data

Data yang diperoleh dari tahap I meliputi karakteristik fisik dan kimia eksopolisakarida dan data tahap II yaitu zona hambat yang dihasilkan dari aktivitas antibakteri eksopolisakarida dianalisa secara deskriptif dengan diinterpretasikan sesuai hasil pengamatan yang ada.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui karakteristik secara fisik dan kimia dari eksopolisakarida yang dihasilkan oleh *Weissella confusa*, karena dimungkinkan eksopolisakarida yang dihasilkan setiap golongan dari BAL memiliki perbedaan karakteristik, penelitian ini juga dimaksudkan untuk mengetahui kemampuan eksopolisakarida sebagai antibakteri terhadap *Salmonella typhi*.

4.1 Sterilisasi Alat dan Media

Alat gelas dan media disterilkan terlebih dahulu untuk mematikan mikroorganisme yang berada di alat dan media karena dapat mempengaruhi hasil akhir penelitian. Prinsip utama dari sterilisasi menggunakan autoklaf adalah menguapkan air yang bertekanan untuk sterilisasi, jika suhu yang digunakan 121 °C maka tekanannya 15-17,5 psi, pada keadaan tersebut dapat membunuh mikroorganisme yang berada di alat dan bahan, menurut Nester, et. al., dalam Adji, dkk (2007) kondisi yang baik untuk sterilisasi adalah pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi (2 atm). Hasil sterilisasi adalah alat dan bahan steril dari mikroorganisme yang tidak diinginkan.

Media MRS agar dan MRS *broth* dengan penambahan sukrosa 5% (b/v) disterilisasi dengan cara dilarutkan terlebih dahulu pada akuades sampai larut sempurna, kemudian media ditutup rapat dan disterilisasi. MRS agar merupakan medium selektif yang digunakan untuk mengisolasi, menumbuhkan, dan memberikan nutrisi bakteri asam laktat dalam fase padat (Khairunnisa dan Pato, 2016). MRS *broth* dengan penambahan sukrosa 5% (b/v) digunakan untuk pembuatan inokulum dan produksi eksopolisakarida, sukrosa 5% disterilisasi secara

terpisah dari MRS *broth* untuk menghindari terbentuknya karamelisasi karena temperature tinggi. Penambahan sukrosa pada MRS *broth* bertujuan untuk menambah sumber karbon yang dibutuhkan *W. confusa* sehingga dapat meningkatkan produksi eksopolisakarida, menurut Wongsuphachat, et. al., (2010) isolat *W. confusa* NH 02 dapat memproduksi eksopolisakarida lebih banyak pada media MRS *broth* dengan penambahan sukrosa 4 % dengan randemen 18,08 g/L daripada penambahan substrat glukosa, fruktosa, dan laktosa.

4.2 Produksi Eksopolisakarida

4.2.1 Regenerasi *Weissella confusa*

Regenerasi *W. confusa* dilakukan untuk mendapatkan biakan bakteri yang muda dengan kemampuan tumbuh yang baik, regenerasi juga digunakan untuk mengganti nutrisi pada media yang habis dan merupakan salah satu metode penyimpanan jangka pendek yang paling mudah, murah, dan hemat biaya (Saliban, et. al 2009).



Gambar 4.1 Regenerasi *W. confusa*

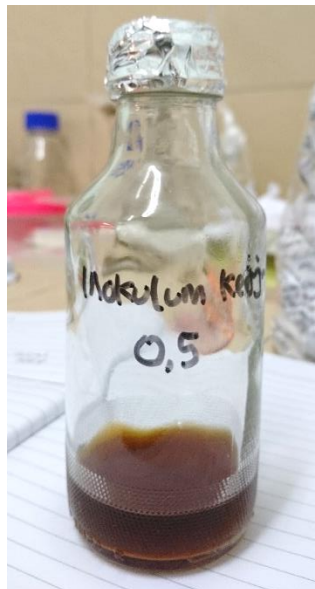
W. confusa diremajakan pada media MRS agar secara aseptis untuk meminimalkan kontaminasi dengan bakteri yang tidak diinginkan, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada temperatur 37 °C dimaksudkan untuk mendapatkan bakteri dengan pertumbuhan yang baik. Hasil regenerasi *W. confusa* pada media MRS agar diamati secara visual menunjukkan koloni bakteri berwarna bening sedikit putih kekuning-kuningan.

4.2.2 Pembuatan Inokulum *W. confusa*

Inokulum *W. confusa* dibuat agar bakteri beradaptasi sebelum digunakan dalam fermentasi, inokulum digunakan setelah berumur 18 jam karena pada umur tersebut *W. confusa* masuk pada fase eksponensial, yang mana pada fase ini *W. confusa* memiliki laju pertumbuhan yang optimum. Inokulum diamati kekeruhannya secara visual untuk memastikan bakteri tersebut tumbuh dengan ditandai semakin keruhnya media, kemudian diukur OD nya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 600 nm, panjang gelombang tersebut juga disesuaikan dengan warna komplementer pada media yakni dari kuning sampai kecoklatan (Febriyansari, 2008). Pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis didasarkan pada parameter kekeruhan media, sinar yang dipancarkan akan dihamburkan sebagian oleh kekeruhan suspensi bakteri dan sebagian lain ditransmisikan menuju detektor, sehingga semakin banyak sinar yang dihamburkan suspensi bakteri, maka sinar yang ditransmisikan semakin sedikit sehingga tingkat kekeruhan media semakin tinggi.

Nilai OD inokulum *W. confusa* terukur adalah 2,1378, kemudian diambil 5,95 mL inokulum dan ditambahkan media MRSB 19,05 mL sehingga didapatkan inokulum kerja dengan OD 0,5 atau setara dengan jumlah bakteri $1,4 \times 10^9$

CFU/mL. Inokulum dengan nilai OD 0,5 digunakan sebagai dasar perhitungan jumlah bakteri yang digunakan untuk produksi eksopolisakarida (Rosmania, dan Yanti., 2020).

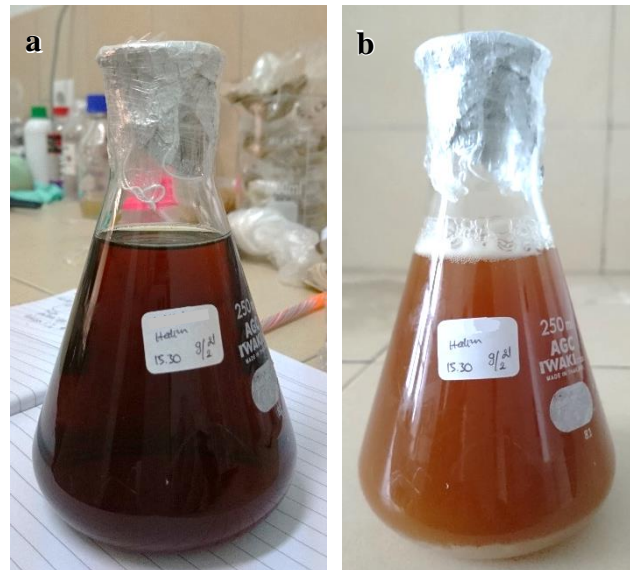


Gambar 4.2 Inokulum *W. confusa*

4.2.3 Produksi dan Ekstraksi Eksopolisakarida

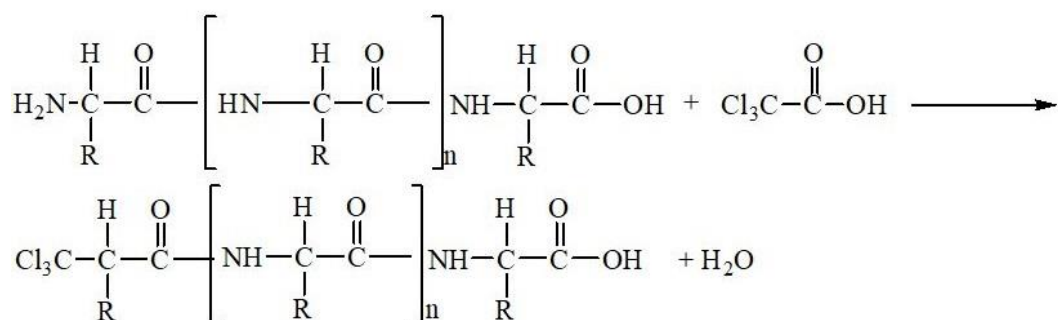
Produksi eksopolisakarida dilakukan ketika inokulum sudah inkubasi karena proses tersebut inokulum *W. confusa* akan masuk pada fase stasioner sehingga menghemat waktu fermentasi, proses fermentasi menguraikan sukrosa menjadi senyawa monosakarida berupa glukosa dan fruktosa, proses tersebut dilakukan *W. confusa* dengan memanfaatkan substrat sukrosa untuk menghasilkan enzim invertase yang digunakan untuk memproduksi eksopolisakarida. Pemecahan sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa melalui reaksi hidrolisis dengan bantuan enzim β -fruktofuranosidase atau enzim invertase, monosakarida yang terbentuk kemudian digunakan untuk metabolisme pada bakteri dan kemudian dikonversi menjadi eksopolisakarida, hasil fermentasi berupa eksopolisakarida yang

bercampur dengan media, hal tersebut secara visual ditunjukkan terdapat perubahan pada warna media yang semakin kuning keputih-putihan.



Gambar 4.3 Media Produksi Eksopolisakarida a) sebelum fermentasi b) setelah fermentasi

Hasil fermentasi kemudian diekstrak untuk memisahkan eksopolisakarida dari sel bakteri, media, dan senyawa lainnya. Ekstraksi dilakukan dengan sentrifugasi untuk mengendapkan sel bakteri, kemudian filtrat ditambahkan asam trikloroasetat 10 % untuk mengendapkan protein dari senyawa eksopolisakarida,

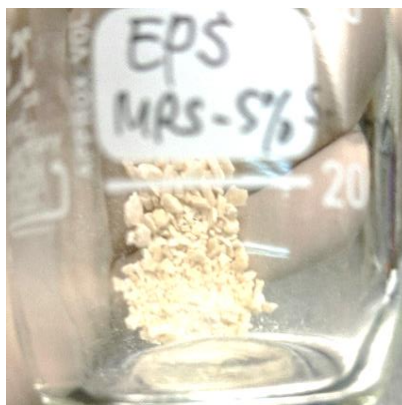


Gambar 4.4 Reaksi Protein dengan TCA

menurut Sivaraman, et. al., (1997) asam trikloroasetat merupakan agen pengendap protein yang baik dan konsentrasi 10 % asam trikloroasetat dapat mengendapkan

protein dengan maksimal (Rajalingnam, et. al., 2009). Reaksi pengendapan protein oleh TCA ditunjukkan pada Gambar 4.3.

Filtrat yang bebas sel bakteri dan protein kemudian ditambah etanol dingin dua kali volume filtrat untuk mengendapkan eksopolisakarida, karena etanol memiliki konstanta dielektrik yang lebih kecil daripada air sehingga tingkat kepolarannya lebih kecil dari air, sedangkan polisakarida memiliki banyak gugus hidroksil yang memberikan sifat kepolaran, sehingga konsentrasi etanol meningkat dalam larutan dan menurunkan kelarutan eksopolisakarida, penggunaan etanol dua kali volume ditujukan untuk mempermudah laju difusi sehingga distribusi partikel akan semakin besar dengan semakin besarnya luas permukaan, etanol juga dapat menyebabkan tegangan air pada eksopolisakarida menurun sehingga cenderung berinteraksi dengan molekul eksopolisakarida yang lain (Klinchongkon, dan Adachi., 2019). Endapan eksopolisakarida kemudian dikeluarkan dari media fermentasi dan etanol dengan cara disentrifugasi agar endapan terekstrak dengan maksimal, kemudian eksopolisakarida dioven dengan temperatur 60 °C selama 4 kali 1 jam untuk menghilangkan pelarut sehingga didapatkan eksopolisakarida kering, hasil ekstraksi eksopolisakarida berupa butiran kecil berwarna putih kekuning-kuningan dengan rendemen 11,321 gr/L.



Gambar 4.5 Eksopolisakarida Kering

Produksi eksopolisakarida telah dilakukan oleh beberapa peneliti dengan media MRSB dengan penambahan sukrosa, Jin, et. al., (2019) mengekstrak eksopolisakarida jenis dekstran dari *W. confusa* VP30 menghasilkan rendemen 60 gr/L, Kavitate, et. al., (2016) memproduksi eksopolisakarida dari *W. confusa* KR780676 menghasilkan rendemen 17,2 g/L, dan penelitian Adesulu-Dahunsi, et. al., (2018) memproduksi eksopolisakarida dari *W. confusa* OF126 dengan metode yang sama menghasilkan rendemen 3,0 g/L. Perbedaan rendemen eksopolisakarida dipengaruhi oleh kondisi kultur, komposisi media, dan kemampuan adaptasi yang berbeda pada spesies bakteri sehingga mempengaruhi karakteristik eksopolisakarida (Madiedo dan Reyes-Gavilan, 2005., van Geel-Schutten, et. al., 1998).

4.3 Karakterisasi Eksopolisakarida secara Fisik

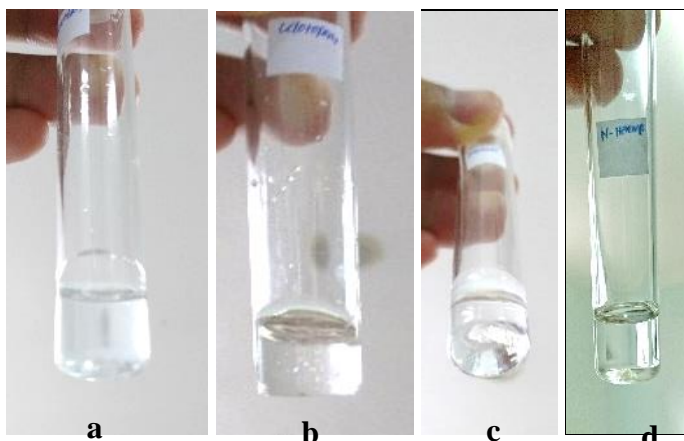
Tabel 4.1 Karakteristik Fisik Eksopolisakarida

Karakteristik Eksopolisakarida	Keterangan
Warna	Putih kekuningan
Kelarutan pada berbagai pelarut	Air : Larut (membentuk gel)
	Metanol : Tidak larut, eksopolisakarida mengendap
	Kloroform : Tidak larut, eksopolisakarida mengambang
	n-heksan : Tidak larut, eksopolisakarida mengendap
Indeks kelarutan air eksopolisakarida (%)	30,11 ± 3,47
Daya ikat air (%)	581,97 ± 93,7

Karakteristik fisik dari eksopolisakarida yang diamati meliputi warna, kelarutan terhadap berbagai pelarut, dan indeks kelarutan, ringkasan karakter fisik eksopolisakarida ditampilkan pada Tabel 4.1.

4.3.1 Kelarutan Eksopolisakarida pada Berbagai Pelarut Organik

Kelarutan eksopolisakarida yang diekstrak dari *W. confusa* diujikan pada akuabides, metanol, klorofom, dan n-heksan. Hasil menunjukkan eksopolisakarida dapat larut pada akuabides yang ditandai dengan berubahnya eksopolisakarida menjadi gel bening, pada metanol dan n-heksan eksopolisakarida tidak larut dan mengendap, sedangkan pada klorofom eksopolisakarida tidak larut dan menggambang.



Gambar 4.6 Kelarutan eksopolisakarida pada berbagai pelarut a) akuabides, b) kloroform, c) metanol, d) n-heksan.

Perbedaan kelarutan eksopolisakarida terjadi karena bedanya nilai konstanta dielektrik pada setiap pelarut. Konstanta dielektrik menggambarkan simetri molekul pelarut dengan memisahkan muatan atom untuk menentukan momen dipol pelarut, Semakin tinggi konstanta dielektrik suatu pelarut maka semakin besar peluang melarutkan eksopolisakarida (Antoniou, et. al., 2010). Akuabides memiliki konstanta dielektrik lebih tinggi dari yang lain dengan nilai 78,5, sehingga mampu

melarutkan eksopolisakarida dan kemudian secara urut diikuti oleh metanol dengan nilai konstanta dielektrik 32,6, kloroform dengan nilai konstanta dielektrik 4,7, dan n-heksan nilai konstanta dielektrik 1,9 (Kato et. al., 2013).

4.3.2 Indeks Kelarutan Air dan Daya Ikat Air Eksopolisakarida

Indeks kelarutan air eksopolisakarida dilakukan untuk mengetahui presentase kelarutan eksopolisakarida terhadap air dan daya ikat air dilakukan untuk mengetahui daya ikat eksopolisakarida untuk menahan air, kelarutan eksopolisakarida dipengaruhi oleh panjang rantai utama dan cabang, yang mana semakin panjang rantai utama dan cabang maka kelarutan eksopolisakarida semakin kecil, hal tersebut dikarenakan rantai polisakarida dengan struktur linier dan konformasi yang teratur dapat membentuk kristal atau struktur kristal parsial sehingga tidak mudah larut dalam air, kemudian bentuk struktur juga mempengaruhi kelarutan eksopolisakarida baik struktur sekunder maupun tersier, yang mana struktur percabangan semakin banyak maka kelarutan eksopolisakarida semakin tinggi, hal tersebut dikarenakan struktur percabangan dapat melemahkan interaksi intramolekul karena efek sterik sehingga meningkatkan kelarutan, dan derajat polimerisasi dari eksopolisakarida, derajat polimerisasi eksopolisakarida berhubungan dengan berat molekulnya semakin besar berat molekul suatu polisakarida maka memiliki derajat polimerisasi yang tinggi sehingga kelarutannya semakin kecil.

Daya ikat air eksopolisakarida diuji untuk mengukur kapasitas eksopolisakarida dalam menahan air, sifatnya yang mampu mengikat air dikarenakan adanya struktur matriks berpori dari adanya ikatan hidrogen yang terbentuk dari struktur eksopolisakarida sendiri, sehingga dengan adanya matriks

tersebut maka mampu menahan sejumlah air, eksopolisakarida dengan daya ikat air yang baik adalah yang dapat menahan air dengan kapasitas minimal 400% (Zhou, et. al.,2017). Menurut Rajoka, et. al (2018) daya ikat air eksopolisakarida yang baik adalah diatas 400 %, dari penelitian yang dilakukan menunjukkan daya ikat air eksopolisakarida yang diekstrak dari *W. confusa* adalah 581,97 %. Tingirikari, et. al., (2014) dalam penenlitiannya menguji daya ikat air eksopolisakarida dari *W. carabia* dengan hasil 352 %, Saravanan, V. et. al., (2016) menguji daya ikat air eksopolisakarida dari *Leuconostoc lactic* KC117496 dengan hasil 117%. karena sifat polisakarida tersebut sehingga dalam industry dimanfaatkan sebagai agen pengikat, dan penstabil air, selain itu digunakan juga untuk meningkatkan sifat tektrur dan reologi makanan (Saravanan, C dan Prathap. K, 2015; Ye, G, et. al., 2018; Guo, M. Q, et. al., 2017).

Indeks kelarutan eksopolisakarida yang diekstrak dari *W. confusa* terhadap air adalah 30,11 % (Tabel 4.1), Ye, G, et. al., (2018) dalam penelitiannya menguji kadar kelarutan eksopolisakarida dari *W. carabia* YB-1 dengan hasil 95,23%, Saravanan, V. et. al., (2015) menguji kadar kelarutan eksopolisakarida dari *Leuconostoc lactic* KC117496 dengan hasil 14,2%.

4.4 Karakterisasi Eksopolisakarida secara Kimia

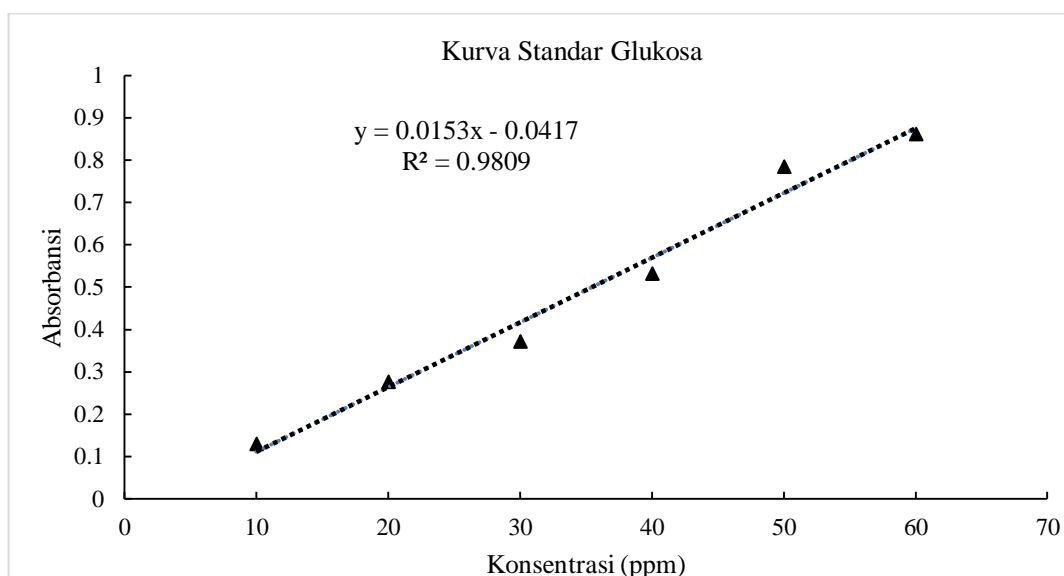
Karakteristik kimia dari eksopolisakarida yang diamati meliputi analisa kadar glukosa dan kadar protein eksopolisakarida.

Tabel 4.2 Karakteristik Kimia Eksopolisakarida

Karakteristik Eksopolisakarida	Keterangan
Kadar total gula (%)	79,74±3,68
Kadar protein (%)	0.847±0,016

4.4.1 Analisa Kadar Gula Total Eksopolisakarida

Kadar gula total eksopolisakarida ditentukan untuk mengetahui kemurnian eksopolisakarida menggunakan metode sulfat-fenol, metode ini digunakan karena struktur dasar eksopolisakarida adalah polimer yang tersusun dari gula dan metode ini mudah, cepat, sensitif, akurat, spesifik untuk karbohidrat sehingga dilakukan uji total gula. Prinsip dasar metode ini adalah karbohidrat yang ditambahkan asam sulfat pekat akan mengalami dehidrasi membentuk senyawa turunan furfural, kemudian penambahan fenol digunakan sebagai pereaksi untuk membentuk senyawa kompleks berwarna jingga dalam suasana asam dan berkondensasi dengan monomer gula (Nielsen,S,. 2017). Hasil reaksi dianalisa menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 490 nm yang mana pada panjang gelombang tersebut menyesuaikan dengan warna komplementer yang terbentuk.



Gambar 4.3 Kurva Standar Glukosa

Kadar gula total eksopolisakarida yang dihasilkan dari *W. confusa* adalah 79,74%. Menurut Wongsuphachat, et, al., (2010) kadar gula pada eksopolisakarida dapat dipengaruhi oleh spesies BAL penghasil eksopolisakarida, media,

temperatur, substrat, dan aktivitas enzim invertase yang mengubah substrat menjadi monomer-monomer penyusunnya serta pengotor pada eksopolisakarida. Adesulu-Dahunsi, et, al.,(2018) menggunakan metode yang sama pada eksopolisakarida dari *W. confusa* menghasilkan gula total 80,4 %.

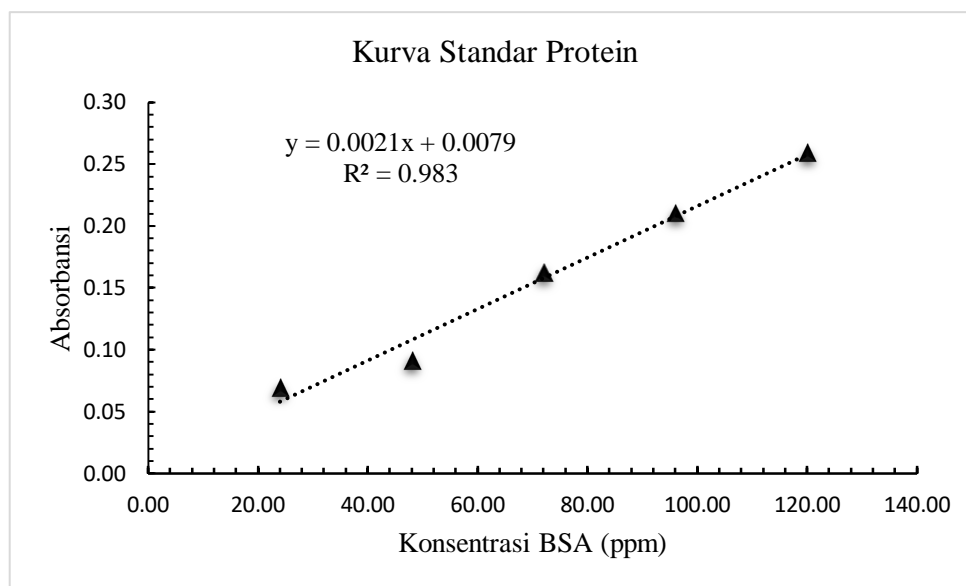
4.4.2 Analisa Kadar Protein Eksopolisakarida

Penentuan kadar protein digunakan untuk mengetahui adanya protein yang terikat pada eksopolisakarida, kemungkinan terikutnya protein tersebut karena dalam fermentasi produksi eksopolisakarida menggunakan media *MRS broth* yang mengandung protein tinggi sehingga walaupun sudah dilakukan pengendapan protein dengan TCA pada media hasil fermentasi masih memungkinkan adanya protein yang terikat eksopolisakarida.

Analisa protein menggunakan metode lowry dengan prinsip reaksi antara Cu^{2+} dengan ikatan peptida dan reduksi asam fosfomoblidat dan asam fosfotungstat oleh tirosin dan triptofan yang menghasilkan warna biru. Kompleks Cu (II)-protein dalam suasana alkalis mereduksi Cu (II) menjadi Cu (I), kemudian ion Cu^+ mereduksi reagen folin-ciocalteu dan kompleks fosfomoblidat fosfotungstat yang menghasilkan *heteropoly molybdenum blue* akibat reaksi oksidasi gugus aromatis rantai samping asam amino terkatalis Cu yang memberikan warna biru yang dapat dideteksi secara kolorimetri.

Eksopolisakarida dengan kemurnian tinggi ditandai dengan rendahnya kadar protein, berdasarkan hasil analisa kadar protein eksopolisakarida dari *W. confusa* mempunyai kemurnian tinggi dengan nilai 0.847 %. Menurut Adesulu-Dahunsi, et, al., (2018) dalam penelitiannya dengan metode yang sama pada eksopolisakarida dari *W. confusa* OF126 menghasilkan kadar protein 1,51 %, Adesulu-Dahunsi, et, al., (2018) dengan metode yang sama melakukan pengujian kadar protein pada

eksopolisakarida dari *Lactobacillus plantarum* YO175 and OF101 dengan hasil 1.21% dan 1.47%.



Gambar 4.7 Kurva Standar BSA

4.4.3 Analisa Gugus Fungsi Eksopolisakarida Menggunakan *Fourier Transform Infra Red (FTIR)*

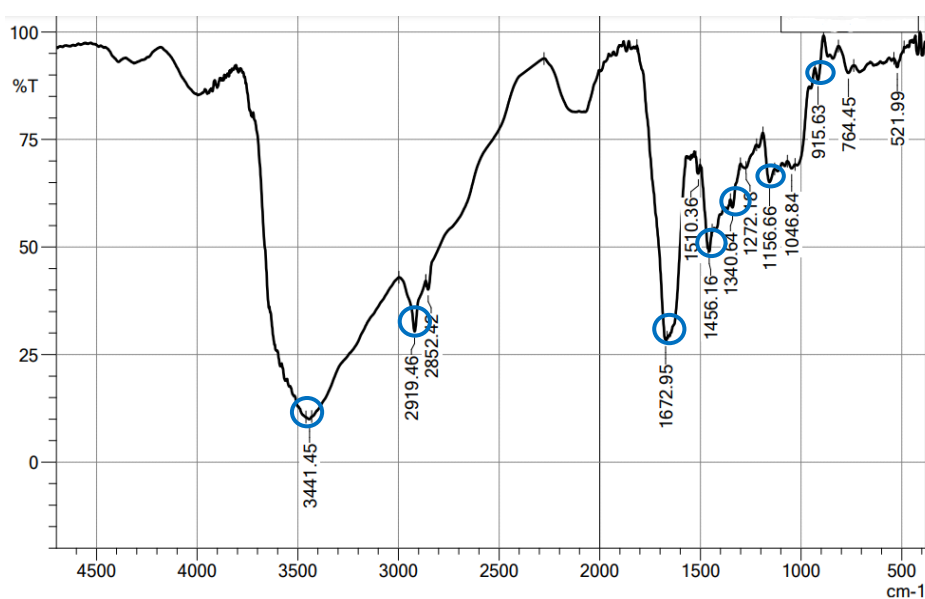
Identifikasi gugus fungsi menggunakan spektrofotometer FTIR pada eksopolisakarida diinterpretasikan berdasarkan puncak yang muncul terhadap serapan khas pada gugus fungsi dari eksopolisakarida, rangkuman serapan puncak ditampilkan pada Tabel 4.3.

Analisa FTIR akan menunjukkan gugus fungsi yang khas pada setiap senyawa, seperti pada polisakarida yang secara umum terdapat gugus fungsi utama $-OH$, $-CH$, $-C=C$, dan $C-O-C$ (Santi, dkk., 2011). Eksopolisakarida dari *W. confuse* secara spesifik memiliki pita serapan $3441,35\text{ cm}^{-1}$ yang menginterpretasikan gugus hidroksil $-OH$ yang cenderung tidak jenuh atau aromatik yang melebar dari polisakarida, pada pita serapan $2919,46\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan vibrasi *Stretching* gugus $-C-H$ yang mengindikasikan adanya senyawa organik seperti protein dan gula. Pita serapan pada bilangan gelombang $1672,95\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi

stretching C=O atau gugus karbonil, pada bilangan gelombang 1340,64 cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus C-H dan C-H₂ bending, pada bilangan gelombang 1156,66 cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus C-O-C (Adesulu-Dahunsi, et. al., 2018). Pita serapan diatas ditunjukkan pada Gambar 4.4.

Tabel 4.3 Gugus fungsi dari spektra FTIR eksopolisakarida *W. confusa* (Pavia., et.al., 2009)

Spektra Analisa (cm ⁻¹)	Spektra Literatur (cm ⁻¹)	Gugus Fungsi
3441,45	3400	O-H streching
2919,46	3000-2850	C-H streching
1672,95	1680-1630	C=O stretch
1456,15 dan 1340,64	1450 dan 1375	C-H, C-H ₂ bending
1156,66	1300-1000	C-O-C
915,63	914	α-glikosidik



Gambar 4.8 Spektra FTIR eksopolisakarida dari *W. confusa*

Berdasarkan hasil karakterisasi secara fisika dan kimia serta didukung dengan penelitian terdahulu bahwa eksopolisakarida yang dihasilkan *Weissella confusa* kemungkinan jenis dekstran. Adapun dekstran dapat dimanfaatkan sebagai pengatur tekstur, campuran pasta gigi, pengantar obat (*Drug delivery system*) yang penting dalam pembuatan insulin oral, dan sebagai immunostimologi (Dinoto, A. dkk, 2011).

4.5 Uji Antibakteri Eksopolisakarida terhadap *Salmonella typhi*

4.5.1 Pembuatan Media Nutrien Agar (NA)

Nutrien agar (NA) digunakan sebagai media untuk isolasi, pertumbuhan, dan uji antibakteri, media ini juga dapat digunakan sebagai media penyimpanan bakteri patogen (Juariyah dan Wulan., 2018). Penggunaan NA sebagai media penumbuh *Salmonella typhi* karena pada media NA bakteri tersebut mampu tumbuh dengan baik, *Salmonella typhi* juga tidak memerlukan nutrisi yang selektif seperti BAL dan media NA secara umum digunakan untuk mengisolasi, menumbuhkan, dan menyimpan bakteri patogen (Morse dan Meitzner, 2010).

4.5.2 Regenerasi *Salmonella typhi*

Regenerasi *Salmonella typhi* dilakukan untuk mendapatkan biakan bakteri yang muda dengan kemampuan tumbuh yang baik dan untuk mengganti nutrisi pada media yang telah habis. Regenerasi juga merupakan salah satu metode penyimpanan yang paling mudah, murah, dan hemat biaya, regenerasi *Salmonella typhi* dilakukan untuk selanjutnya membuat inokulum dalam persiapan uji antibakteri (Saliban, et, al 2009).

Regenerasi *Salmonella typhi* dilakukan secara aseptis pada NA miring untuk menghindari terjadinya kontaminasi bakteri lain dan mencegah agar bakteri tersebut tidak mengkontaminasi laboratorium karena *Salmonella typhi* merupakan bakteri

yang berbahaya bagi kesehatan. Tahap selanjutnya adalah inkubasi yang dilakukan pada temperatur 37 °C selama 24 jam, karena pada keadaan tersebut *Salmonella typhi* dapat tumbuh dengan baik, hasil regenerasi *Salmonella typhi* diamati secara visual menunjukkan koloni berwarna putih kekuning-kuningan.

4.5.3 Pembuatan Inokulum *Salmonella typhi*

Inokulum *Salmonella typhi* digunakan untuk menyiapkan biakan bakteri yang akan digunakan sebagai obyek uji, bakteri yang digunakan adalah yang telah berumur 24 jam karena pada umur tersebut *Salmonella typhi* tumbuh dengan optimum (O'Donnell, et. al., 2006). Inokulum dibuat dengan menambahkan *Salmonella typhi* pada NaCl 0,9 % karena pada larutan tersebut bakteri patogen tumbuh dengan baik dari pada menggunakan media nutrisi (Invante dan Ana., 2012).

4.5.4 Uji Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Agar

Eksopolisakarida yang akan diuji aktivitas antibakterinya dilarutkan terlebih dahulu menggunakan DMSO 10%, penggunaan DMSO untuk melarutkan eksopolisakarida karena pelarut air kurang dapat melarutkan dengan sempurna, pada penelitian terdahulu DMSO-air dianjurkan untuk melarutkan eksopolisakarida karena campuran tersebut memiliki sifat zwitterion, struktur DMSO yang menyerupai molekul detergen anionic kecil, dalam hal ini DMSO melarutkan eksopolisakarida dengan menghancurkan ikatan hidrogen antarmolekul yang biasanya menimbulkan agregat molekul dengan kelarutan rendah (Guo, M. Q, et, al.,2017). Kontrol positif antibiotik yang digunakan adalah Siprofloksasin yang merupakan obat antibakteri dengan jangkauan luas atau bisa untuk bakteri gram negatif maupun positif (POM RI, 2014).

Aktivitas antibakteri eksopolisakarda terhadap *Salmonella typhi* ditunjukkan pada Tabel 4.3. Berdasarkan zona hambat yang terbentuk, aktivitas antibakteri eksopolisakarida dari *W. confusa* pada berbagai konsentrasi menunjukkan semakin besar konsentrasi eksopolisakarida maka semakin kecil zona hambat yang terbentuk, nilai zona hambat terbesar yaitu 5,39 pada konsentrasi eksopolisakarida 1,25 mg/mL. Hal ini diduga karena semakin tinggi konsentrasi eksopolisakarida menyebabkan viskositas larutan uji mengalami peningkatan sehingga mengganggu penyerapan larutan uji atau eksopolisakarida tidak bisa terserap dengan baik pada kertas cakram.



Gambar 4.9 Aktivitas Antibakteri Eksopolisakarida *W. confusa* terhadap *Salmonella typhi*

Adebayo-Tayo, dan Racheal. F (2020), menggunakan metode yang sama pada uji aktivitas antibakteri eksopolisakarida dari *Lactobacillus delbureckii subsp. bulgaricus* dengan konsentrasi 1×10^6 CFU/mL terhadap *Salmonella typhi* menghasilkan zona hambat sebesar 11 mm, sedangkan penelitian Aullybux, et, al., (2019) dengan metode yang sama aktivitas antibakteri eksopolisakarida isolate marine dengan konsentrasi 8 mg/mL menghasilkan zona bening 9,9 mm terhadap

Salmonella typhi. Berdasarkan kedua literatur tersebut aktivitas antibakteri eksopolisakarida dari *Weissella confusa* lebih kecil dari keduanya, hal tersebut dimungkinkan karena kurang larut sempurna eksopolisakarida sehingga kurang efektif aktifitas antibakterinya.

Tabel 4.4 Aktifitas Antibakteri Eksopolisakarida

Konsentrasi Eksopolisakarida (mg/mL)	Zona bening rata-rata (mm)
1,25	5,39 ± 0,58
2,5	5,31 ± 0,74
5	4,8 ± 0,45
Siprofloksasin	24 ± 3,71

Allah SWT menciptakan bermacam-macam makhluk hidup untuk dipelajari, karena pada setiap makhluk hidup menyimpan hikmah tersendiri. Berdasarkan surah al-Baqarah ayat 26,

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا ۗ فَأَمَّا الَّذِينَ آمَنُوا 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 ۗ

Artinya: Sesungguhnya Allah tidak segan membuat perumpamaan seekor nyamuk atau yang lebih kecil dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, mereka tahu bahwa itu kebenaran dari Tuhan. Tetapi mereka yang kafir berkata, “Apa maksud Allah dengan perumpamaan ini?” Dengan (perumpamaan) itu banyak orang yang dibiarkan-Nya sesat, dan dengan itu banyak (pula) orang yang diberinya petunjuk. Tetapi tidak ada yang Dia sesatkan dengan (perumpamaan) itu selain orang-orang fasik, (Al-Baqarah/2:26)

Menurut Tafsir Jalalain bahwa Allah tidak akan segan untuk mengangkat nyamuk atau makhluk yang lebih kecil dari itu untuk dijadikan perumpamaan, karena

pada makhluk tersebut terdapat hikmah yang bermanfaat bagi orang yang mau berfikir (Al-Mahalli dan As-Suyuthi, 2008). Menurut Tafsir Ibnu Katsir, Allah tidak malu terhadap kebenaran meski menyebut apapun sebagai perumpamaan, baik dari makhluk yang dianggap hina ataupun yang diagungkan oleh kaum musyrikin, karena pada perumpamaan tersebut termasuk kalam ilahi yang bersifat rahman dan terdapat hikmah didalamnya (Ad-Dimasqi, 2004).

Berdasarkan tafsir surat Al-Baqarah ayat 26, Allah memberi petunjuk bahwa pada makhluk yang dianggap hina oleh kaum musyrikin pada masa kenabian, terdapat kekuasaan Allah SWT yang pada masa sekarang dapat ditunjukkan dalam hal kompleksnya struktur makhluk tersebut baik yang memiliki bentuk kecil maupun yang besar dan sesuatu yang dihasilkannya, seperti eksopolisakarida yang merupakan senyawa sekunder dari *W. confusa*. Eksopolisakarida mempunyai karakteristik tidak larut pada pelarut organik seperti metanol, kloroform, dan n-heksan, namun dapat larut pada akuabides dengan membentuk gel. Karakteristik lain dari eksopolisakarida ditunjukkan dengan adanya aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi*, yang mana bakteri tersebut penyebab penyakit tipus. Sifat eksopolisakarida yang memiliki kemampuan sebagai antibakteri terhadap *Salmonella typhi* dapat menjadi referensi dan salah satu kandidat sebagai obat antibakteri dengan kemampuan menghambatnya yang ditunjukkan dengan adanya zona bening sebesar 5,39 mm.

Eksopolisakarida dalam bidang kesehatan digunakan untuk menekan pertumbuhan patogen pada usus halus karena eksopolisakarida memiliki aktivitas anti tumoral, anti ulcer, anti inflamasi, anti infeksi, dan meningkatkan sistem imun tubuh (imunostimulator) (Halim,dan Elok., 2013) serta kemampuannya sebagai

antibakteri, jika dipikirkan lebih dalam tentang penciptaan makhluk baik yang dianggap hina maupun yang dijunjung tinggi oleh suatu kaum, termasuk senyawa eksopolisakarida yang dihasilkan dari bakteri *W. confusa*, didalamnya terdapat kekuasaan Allah SWT.

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Hasil penelitian ini didapatkan eksopolisakarida yang diekstrak dari *W. confusa* dengan rendemen 11,321 gr/L dengan kadar gula total 79,74 % dan kadar protein 0.847 %, eksopolisakarida dapat larut dengan baik pada akuabides dan tidak larut dalam pelarut organik, kadar kelarutannya dalam akuabides 27,33 %. Hasil analisis FTIR menunjukkan adanya gugus O-H, C-H, C=O, -C-H/ -C-H₂ dan C-O-C pada bilangan gelombang 3441,45 cm⁻¹, 2919,46 cm⁻¹, 1672,95 cm⁻¹, 1340,64 cm⁻¹, dan 1156,66 cm⁻¹. Aktifitas antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi* tertinggi dengan zona bening 5,39 mm pada konsentrasi 1,25 mg/mL dan tidak ada perbedaan signifikan seiring kenaikan konsentrasi eksopolisakarida.

5.2 Saran

Perlu melakukan analisis lebih detail menggunakan instrumen yang lebih baik seperti instrumen NMR untuk mengkonfirmasi lebih lanjut jenis eksopolisakarida dan sifat-sifatnya, serta perlu mencari komposisi pelarut yang baik untuk kelarutannya.

DAFTAR PUSATAKA

- Ad-Dimasyqi, Al-Imam Ibnu Katsir. 2004. Tafsir Ibnu Katsir: Al-Baqarah 142 – Al-Baqarah 252. Juz 2. Penterjemah: Bahrul Abu Bakar dan Anwar Abu Bakar. Bandung : Penerbit Sinar Baru Algensindo.
- Adesulu-Dahunsi dik., 2018. Production of exopolysaccharide by strains of *Lactobacillus plantarum* YO175 and OF101 isolated from traditional fermented cereal beverage. Department of Microbiology, University of Ibadan, Nigeria.
- Adesulu-Dahunsi, dkk. 2018. Extracellular polysaccharide from *Weissella confusa* OF126: Production, optimization, and characterization. Department of Microbiology, University of Ibadan, Ibadan, Oyo, State, Nigeria.
- Al Qurtubi, S. I. 2009. Tafsir Al-Qurtubi, Jakarta: Pustaka Azzam.
- Albalasmeh, 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-Mahalli dan As-Suyuthi, Imam Jalaluddin. 2008. Tafsir Jalalain berikut Asbabun Nuzul Ayat: Surat Al-Fatihah – Al-Isra'. Jilid 1. Penterjemah: Bahrul Abu Bakar. Bandung : Penerbit Sinar Baru Algensindo.
- Anindita, Nosa. S. 2020. Identifikasi Glukosiltransferase (gtf) Penyandi Eksopolisakarida Pada Strain *Weissella Confusa* Probiotik Asal Air Susu Ibu (Asi). Program Studi Bioteknologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta.
- Antoni, dkk., 2010. Solvent effects on polysaccharide conformation. Department of Chemical and Biological Engineering, University at Buffalo, The State University of New York. Carbohydrate Polymers 79: 380–390.
- Aullybux, A. A, dkk., 2019. Phylogenetics and antibacterial properties of exopolysaccharides from marine bacteria isolated from Mauritius seawater. Department of Agricultural and Food Science, Faculty of Agriculture, University of Mauritius, Réduit, Republic of Mauritius.
- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, dan Mietzner, T.A. 2010. Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, & Adelberg. Ed.25. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Brummer, Y. dan Cui., 2005. Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications. E-book. 432-439. France: taylor and francies group. LLC.
- Casida, 1968. Industrial Microbiology. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Cerning, J. 1990. Exocellular polysaccharides produce by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology review, 87:113-130.
- Cita, Y.P. 2011. Bakteri *Salmonella typhi* dan demam tifoid. Jurnal Kesehatan Masyarakat, STIKes Istara Nusantara.

- Cui, Y. dkk. 2016. New Insights into Various Production Characteristics of *Streptococcus thermophilus* Strains. Department of Food Science and Engineering, School of Chemistry and Chemical Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China.
- Daulay, D dan A. Rahman. 1992. Teknologi Fermentasi Sayuran dan Buah-buahan. Pusat antar universitas pangan dan gizi, IPB, Bogor.
- Djide dan Sartini. 2008. Dasar-Dasar Mikrobiologi Farmasi. Lepas, Makasar.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal Chem; 28: 350-356.
- Febriyansari, A.N. 2008. Penerapan model gompertz pada pertumbuhan bakteri *L. acidophilus* dan *B. longum* di media adonan es krim (ice cream mix atau ICM) jenis standar. Skripsi. Malang: Universitas Brawijaya.
- Ganiswara, S.G. 1995. Farmakologi dan Terapi Edisi 4. Jakarta : FKUI.
- Guérin, M, dkk., 2020. Lactic Acid Bacterial Production of Exopolysaccharides from Fruit and Vegetables and Associated Benefits. Qualisud, Université La Réunion, CIRAD, Université Montpellier, Montpellier SupAgro, Université Avignon, 2 rue Wetzell, F-97490 Sainte Clotilde, France.
- Guo, M. Q, dkk., 2017. Polysaccharides: Structure and Solubility. School of Food Engineering and Biological Technology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin, China. Chapter 2.
- Halim, C. dkk, 2013. Studi Kemampuan Probiotik Isolat Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Tinggi Asal Sawi Asin (*Brassica juncea*). Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP Universitas Brawijaya Malang.
- Haroun, dkk. 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.
- Invante dan Ana., 2012. Saline solution as culture media from a viewpoint of nosocomial bacteremia. Revista de Investigación Clínica / Vol. 64, No. 2.
- Jin, H., dkk. 2019. Isolation and characterization of high exopolysaccharide-producing *Weissella confusa* VP30 from young children's feces. Department of Food and Nutrition, Research Institute of Human Ecology, Seoul National University, Seoul 08826, South Korea.
- Joo Seo B, Bajpai VK, Rather IA, Park YH. 2015. Partially purified exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* YML009 with total Phenolic content, antioxidant, and free radical scavenging efficacy. Indian J Pharm Educ Res; 49: 282-292.
- Juariyah dan Wulan., 2018. Pemanfaatan Limbah Cair Industri Tahu Sebagai Media Alternatif Pertumbuhan *Bacillus* sp. Jurnal Analisis Kesehatan Klinikal Sains 6(1). Akademi Analisis Kesehatan Yayasan Fajar Pekanbaru.

- Kamboj, K. dkk. 2015. Identification and significance of *Weissella* species infections. Clinical Microbiology Laboratory, Department of Pathology, The Ohio State University Wexner Medical Center, Columbus, OH, USA.
- Kato, C, dkk., 2013. Quick and selective synthesis $\text{Li}_6[\alpha\text{-P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}]\cdot 28\text{H}_2\text{O}$ soluble in various organic solvents. aGraduate School of Science, Hiroshima University, 1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-8526, Japan.
- Kaviatake, dkk., 2016. Characterization of a novel galactan produced by *Weissella confusa* KR780676 from an acidic fermented food. *Department of Food Science and Technology, Pondicherry University, India.*
- Kimmel, S. A. dan Ziegler, G. R. 1998. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* *supsp. Bulgaricus* RR growth in a Semidefined Medium. *Applied and environmental Microbiology*, 64(4), 659-664.
- Kirk, R. E. dan Othmer. 1963. Encyclopedia of chemical technology. Interscience Publ. Co., New York.
- Klinchongkon, dan Adachi., 2019. Ethanol precipitation of Mannooligosaccharides from Subcritical Water-Treated Coconut meal hydrolase. Food and bioprocess technology.
- Kultsum, U. 2009. Pengaruh variasi nira tebu dari beberapa varietas penambahan sumber N dari tepung kedelai hitam sebagai substrat terhadap efisiensi fermentasi etanol. Skripsi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Kumar, M. A., 2011. Production and Characterization of Exopolysaccharides (EPS) from Biofilm Forming Marine Bacterium. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Vol.54, no. 2.
- Kusdianawati dkk, 2020. Genetic diversity of lactic acid bacteria isolated from Sumbawa horse milk, Indonesia. Department of Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Universitas Teknologi Sumbawa.
- Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an, Badan Litbang dan Diklat Kementerian Agama RI dengan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). 2015. Tafsir Ilmi: Jasad Renik dalam Prespektif Al-Quran dan Sains.
- Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an, Badan Litbang dan Diklat Kementerian Agama RI dengan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). 2015. Tafsir Ilmi: Jasad Renik dalam Prespektif Al-Quran dan Sains.
- Lehninger, A. L. 1997. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid I*. Jakarta : Erlangga.
- Li, S. dkk., (2014). Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum* R315. State Key Laboratory of Food Science and technology, Nanchang University, Nanchang 330047, P. R. China.

- Lule V, Singh R, Behare P, Tomar SK. Comparison of exopolysaccharide production by indigenous *Leuconostoc mesenteroides* strains in whey medium. *Asian J Dairy Food Res* 2015;34: 8-12.
- Madiedo dan Reyes-Gavilan, 2005. Invited Review: Methods for the Screening Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. Instituto de Productos Lácteos de Asturias, CSIC, Asturias, Spain. *Journal of Dairy Science* Vol. 88, No. 3.
- Malik, A., Donna, M., Ariesranti, A.N dan Arry, Y. 2008. Skrining Gen Glukonsiltransferase (GTF) dari Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida. 2008. *Markara Sains*, Vol. 12, No. 1.
- Malik, Amarila, dkk. 2015. Sucrase Activity and Exopolysaccharide Partial Characterization From Three *Weissella confusa* Strains. *HAYATI Journal of Biosciences*. 22 (2015) 130-135.
- Mao, H dan Zhengsong, Q., 2016. Development and Application of Ultra-High Temperature Drilling Fluids in Offshore Oilfield Around Bohai Sea Bay Basin, China. China University of Petroleum.
- Maunatin, Anik dan Khanifa. 2012. Uji Potensi Probiotik *Lactobacillus plantarium* Secara In-Vitro. Vol. 2. No. 1. *ALCHEMY*. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Nielsen, S., 2017. Food Analysis Laboratory Manual, Food Science Text Series: Total Carbohydrate by Phenol-Sulfuric Acid Method. Department of Food Science, Purdue University, West Lafayette, IN, USA. Chapter 4.
- Nouha, K. dkk. 2012. Critical Review Of EPS Production, Synthesis And Composition For Sludge Flocculation. Université du Québec, Institut national de la Recherche Scientifique, Centre Eau, Terre & Environnement, 490 de la Couronne, Québec G1K 9A9, Canada.
- O'Donnell, dkk., 2006. Enhancement of In Vitro Growth of Pathogenic Bacteria by Norepinephrine: Importance of Inoculum Density and Role of Transferrin. *Applied And Environmental Microbiology*, July 2006, p. 5097–5099.
- Panturau, 1982. By Production Of The Cane Sugar Industry. Amsterdam. Elsevier Scientific Publishing Company.
- Patel S, Majumder A, Goyal A. 2012. Potential of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian J Microbiol.*;52: 3-12.
- Pelczar, M.J. dan E.C.S.Chan, (1996), *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, Terjemahan R.S.
- Pine, S. H. dan Hammond. 1980. *Organic chemistry*. New York: McGraw-Hill Inc.
- Rahayu, E.S, 2003. Lactic Acid Bacteria In Fermented Food Indonesian Origin. *Agritech* 23 (2): 75-84.
- Rajalingnam, dkk., 2009. Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured

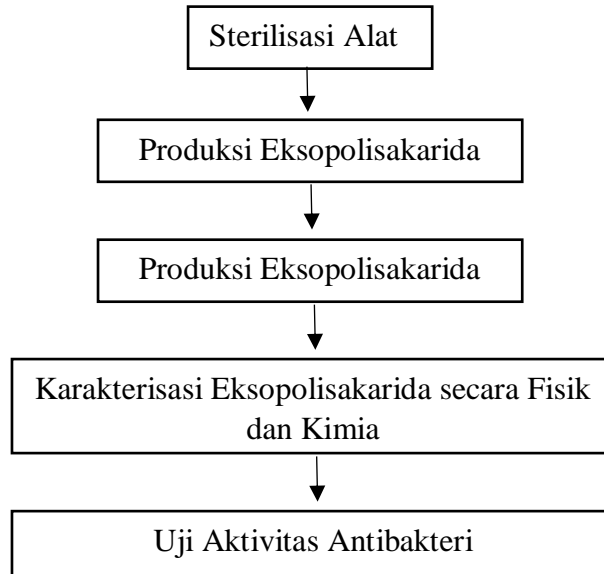
- intermediate. Department of Chemistry and Biochemistry, University of Arkansas, Fayetteville.
- Rajoka, M. S. R. dkk., 2018. Characterization, the Antioxidant and Antimicrobial Activity of Exopolysaccharide Isolated from Poultry Origin Lactobacilli. Institute of Microbiology, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan. 11:1132–1142.
- Ray, B. 2001. Fundamental Food Microbiology. 2nd edition. CRC Press. USA.
- Reddy, G. dkk, 2008. Amyolytic bacterial lactic acid fermentation-A review. Department of Microbiology. Osaman University, Hyderabad-500 007. India.
- Rosmania, dan Yanti., 2020. Perhitungan jumlah bakteri di Laboratorium Mikrobiologi menggunakan pengembangan metode Spektrofotometri. Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sriwijaya, Sumatera Selatan, Indonesia.
- Sanlibaba. P dan Gürcü. A, 2016. Exopolysaccharides Production By Lactic Acid Bacteria. Department of Food Engineering. Ankara university Engineering Faculty. Ankara. Turkey.
- Saravanan, C, dan Prathap. K., 2015. Isolation and characterization of exopolysaccharide from *Leuconostoc lactis* KC117496 isolated from idli batter. Department of Food Science and Technology, Pondicherry University, Pondicherry 605014, India.
- Shingle, K.I. 2002. Determination of Structural peculiarities of dextran, pullulan, and c-irradiated pullulan by Fourier-transform IR spectrophotometry. Carbohydrates Res. 337: 1445-1451.
- Silaban, Lowysa Wanti. 2009. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri dari Kulit Buah sentul (*Sandoricum Koetjæ* (Burm. f.) Merr) terhadap Beberapa Bakteri secara in Vitro. Skripsi. Medan: USU.
- Sivaraman, dkk., 1997. The Mechanism of 2,2,2-Trichloroacetic Acid-Induced Protein Precipitation. Journal of Protein Chemistry, Vol. 16, No. 4.
- Sudarmadji, Slamet. dkk., 1981. Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan Dan Pertanian. Liberty. Yogyakarta.
- Sutherlad, I. W. 1977. Microbial Exopolysaccharide Synthesis. Extracellular Microbial Polysaccharides, 40-57.
- Sutherlad, I. W. 2001. Microbial Polysaccharides From Gram-Negative Bacteria. International Dairy Journal, 11(9), 663-674.
- Tallon, R. dkk. 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. Laboratoire de Microbiologie et Biochimie Appliquée, ENITA de Bordeaux, 1, cours du Général de Gaulle, BP 201, 33175 Gradignan, France.

- Tingirikari, dkk., 2014. Structural and biocompatibility properties of dextran from *Weissella cibaria* JAG8 as food additive. Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology Guwahati, Guwahati, Assam, India.
- Trenggono dan Sutardi, 1990. Biokimia dan Teknologi Pasca Panen. UGM Press. Yogyakarta.
- van Geel-Schutten, dkk., 1998. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol.* 50: 697–703.
- Vanhooren, P. and Vandamme, E. J., 1998. Biosynthesis, physiological role, use and fermentation process characteristics of bacterial exopolysaccharides. *Recent research developments in fermentation & bioengineering*, 253-300.
- Velasco et al, 2006. Environmental Factors Influencing Growth Of And Exopolysaccharide Formation by *Pediococcus palvulus* 2.6. *Int J Food Microbiol* 111, 252-258.
- Wahyudi, M. 2006. Proses Pembuatan dan Analisis Mutu yoghurt. *Bulletin teknik pertanian*. Vol. 11 No. 1.
- Wanto dan Soebagyo, 1980. *Dasar-dasar Mikrobiologi Industry*. Jakarta: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan RI.
- Wongsuphachat, Wararat, dkk. 2010. Optimization of exopolysaccharides production by *Weissella confusa* NH 02 isolated from Thai fermented sausages. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 32 (1), 27-35.
- Xu, R. H., dkk. 2010. Chemical Characterization and Antioxidant Activity of an Exopolysaccharide Fraction Isolated from Bifidobacterium animals RH. *European Food Research and Technology*, 232, 231-241.
- Yang, dkk., 2018. Isolation, purification and characterization of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* YF32 from soybean paste. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, PR China.
- Ye, G, dkk., 2018. Purification and characterization of exopolysaccharide produced by *Weissella cibaria* YB-1 from pickle Chinese cabbage. *International Journal of Biological Macromolecules* 120 (2018) 1315–1321.
- Zhou, dkk., 2017. Characterization of a dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 from homemade wine. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, PR China.
- Zhou, Q, dkk. 2017. Characterization of a dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 from homemade wine. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, PR China.

Zisu, B dan N.P. Shah, 2003. Effect of pH, temperatur, supplementation Alt whey protein concentrate, Ana adjunct cultures on The production of exopolysacarides by *streptococcus thermophilus* 1275. Vol. 86. Issues 11. Victoria university. Australia.

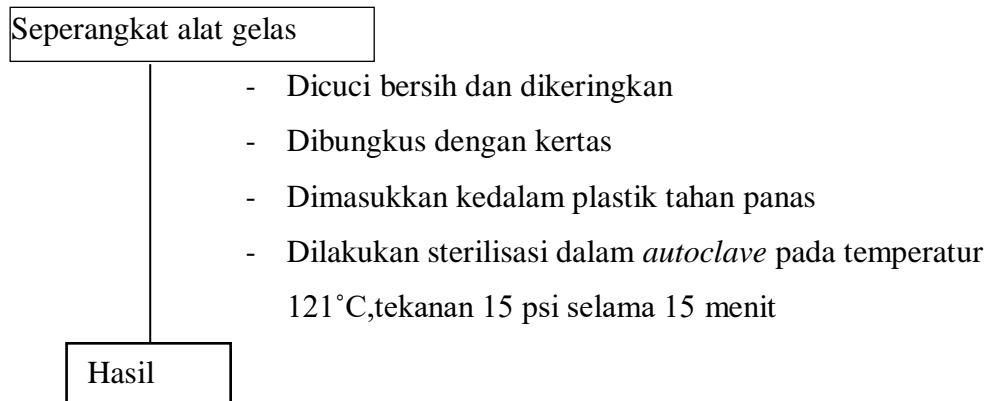
LAMPIRAN

Lampiran 1: Tahapan Penelitian



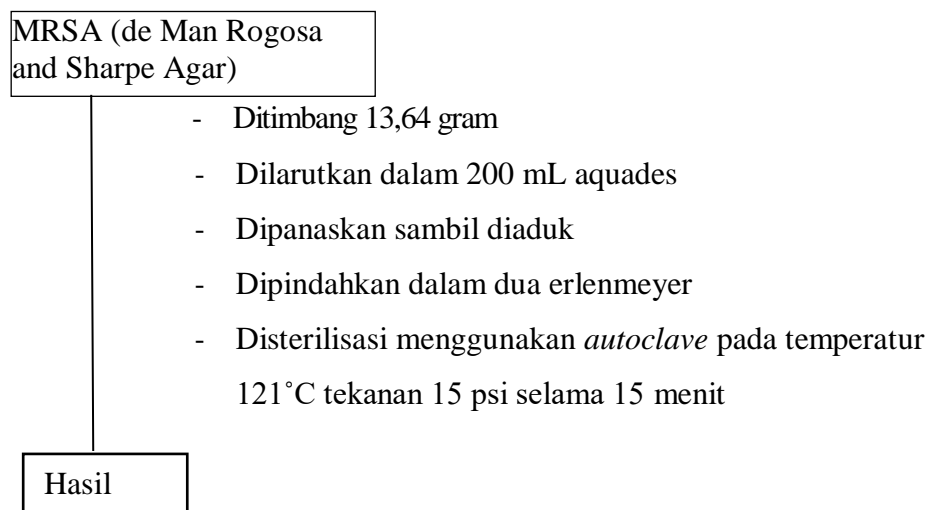
Lampiran 2: Skema Kerja

1. Sterilisasi Alat

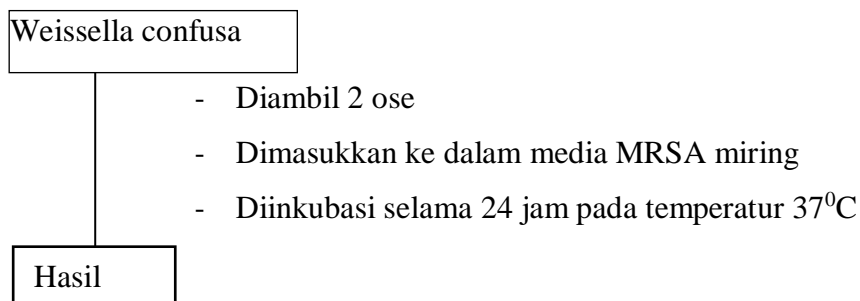


2. Produksi Ekspolisakarida

a. Media MRSA (de Man Rogosa and Sharpe Agar)



b. Regenerasi *Weissella confusa*



c. Media MRSB (*de Man Rogosa and Sharpe Broth*) termodifikasi 5% sukrosa

MRSB(*de Man Rogosa and Sharpe Broth*)

- Ditimbang sebanyak 26,12 gram
- Dilarutkan dalam 500 mL aquades
- Dipanaskan dan diaduk sampai mendidih
- Dipindahkan dalam dua erlenmeyer
- Ditambahkan 12,5 gram sukrosa pada salah satu erlenmeyer berisi MRSB 250 mL
- Disterilisasi menggunakan *autoclave* pada 121°C, tekanan 15 psi selama 15 menit

Hasil

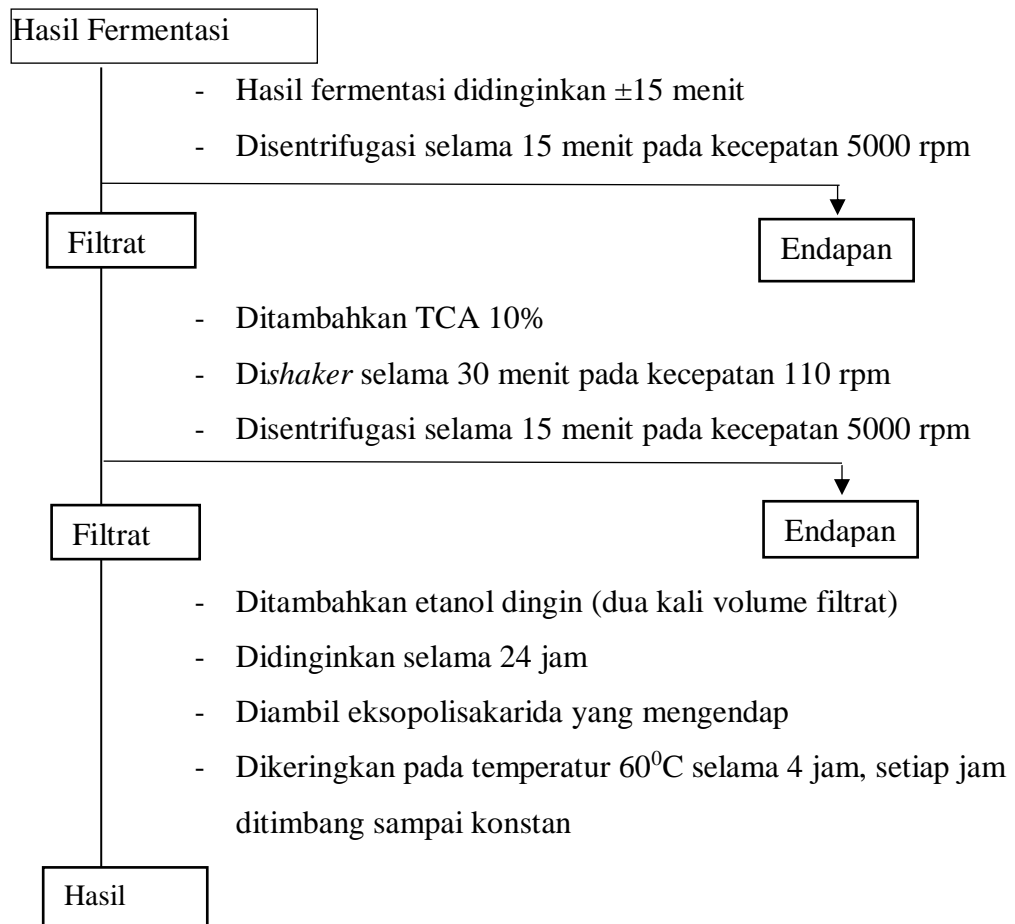
d. Pembuatan Inokulum dan Fermentasi *Weissella confusa*

Weissella confusa

- Diambil 3 ose
- Dimasukkan dalam 20 mL MRSB
- *Dishaker* selama 18 jam dengan kecepatan 120 rpm
- Diukur nilai OD pada λ 600 nm
- Disetarakan OD nya 0,5
- Inokulum kerja dimasukkan dalam 250 mL MRSB termodifikasi 5% sukrosa
- Diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 37°C

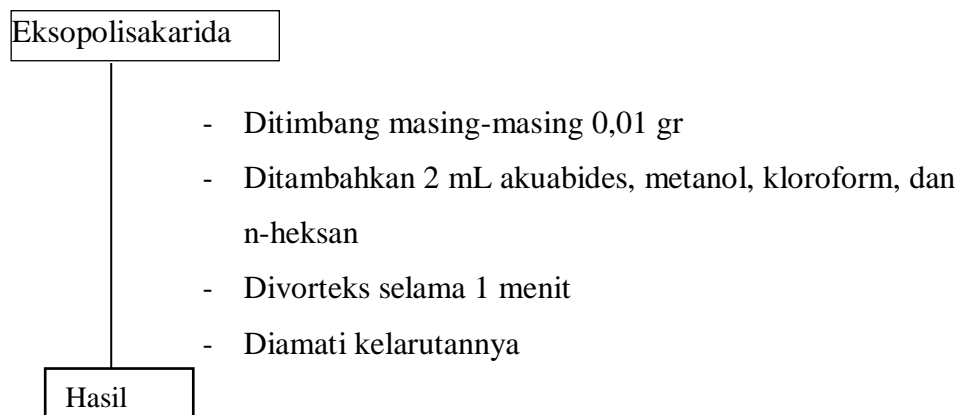
Hasil

e. Ekstraksi Eksopolisakarida



3. Karakterisasi Eksopolisakarida secara Fisik dan Kimia

a. Kelarutan Eksopolisakarida



b. Kadar Eksopolisakarida Terlarut

Eksopolisakarida

- Ditimbang 0,02 gr
- Dilarutkan dengan 5 mL akuabides
- Distirer dengan kecepatan 4 (125 rpm) selama 24 jam
- Disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit
- Diambil filtrat 2 mL
- Ditambahkan etanol dingin 3 kali volume filtrat
- Disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit
- Diambil endapan
- Dikeringkan menggunakan oven pada temperatur 105 °C selama 3 jam sampai berat konstan

Hasil

c. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Glukosa

- Ditimbang 0,1 gr
- Ditandabatkan dengan akuades 100 mL
- Dibuat konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50, 60 ppm
- Diambil 2 mL masing-masing konsentrasi
- Ditambahkan 1 mL fenol 5% dan divortek sebentar
- Ditambahkan 5 mL asam sulfat dengan cepat
- Dibiarkan 10 menit
- Dipanaskan pada air mendidih selama 15 menit
- Didinginkan
- Diukur absorbansinya pada λ 490 nm

Hasil

d. Analisa Kadar Glukosa pada Eksopolisakarida

Eksopolisakarida

- Ditimbang 0,01 gr
- Ditandabatkan dengan akuades 250 mL
- Diambil 2 mL
- Ditambahkan 1 mL fenol 5% dan divortek sebentar
- Ditambahkan 5 mL asam sulfat dengan cepat
- Dibiarkan 10 menit
- Dipanaskan pada air mendidih selama 15 menit
- Didinginkan
- Diukur absorbansinya pada λ 490 nm

Hasil

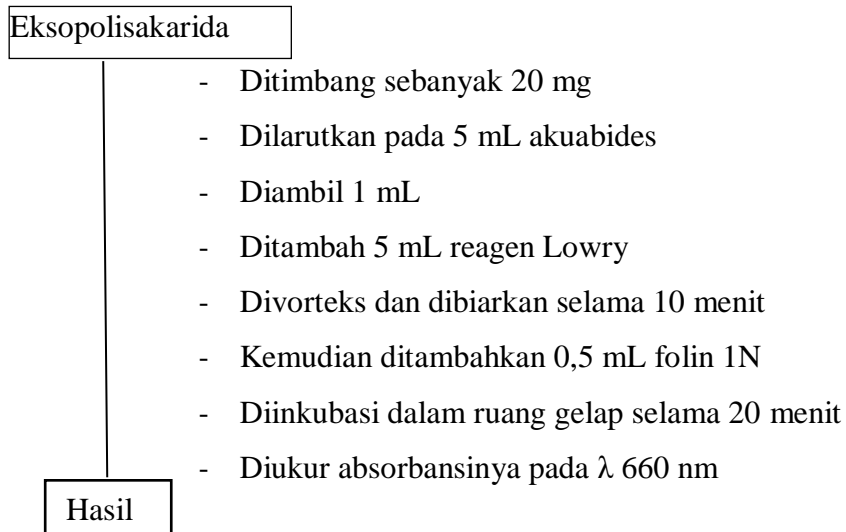
e. Pembuatan Kurva Standar *Bovine Serum Albumin* (BSA)

BSA

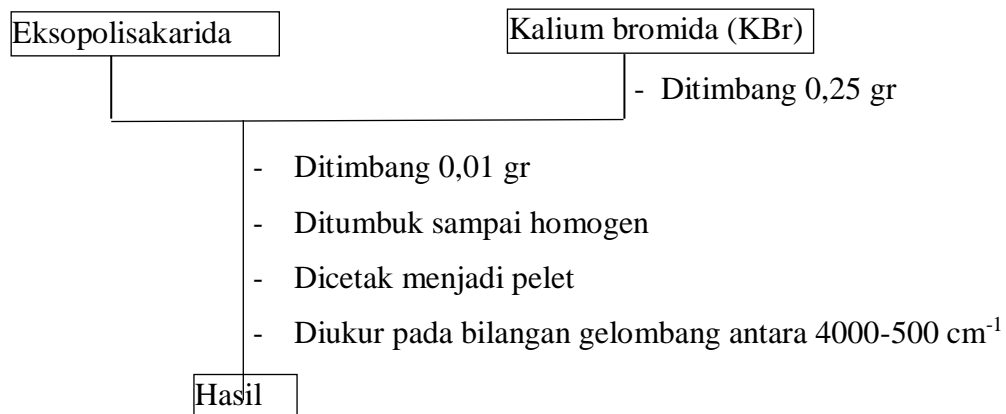
- Ditimbang 30 mg
- Dilarutkan pada 10 mL akuades
- Di buat konsentrasi 0,024; 0,048; 0,072; 0,096; dan 0,12
- Diambil 1 mL masing-masing konsentrasi
- Ditambah 5 mL reagen Lowry
- Divorteks dan dibiarkan selama 10 menit
- Kemudian ditambahkan 0,5 mL folin 1N
- Diinkubasi dalam ruang gelap selama 20 menit
- Diukur absorbansinya pada λ 660 nm

Hasil

f. Analisa Kadar Protein Eksopolisakarida

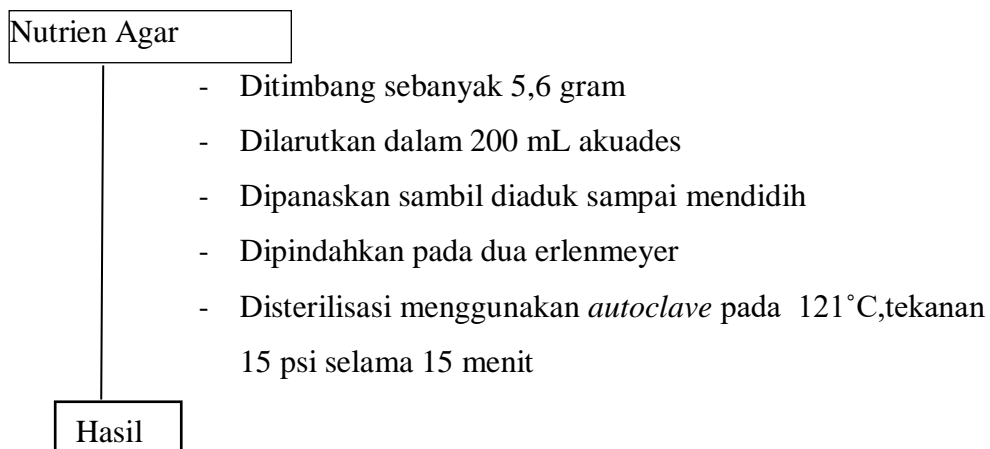


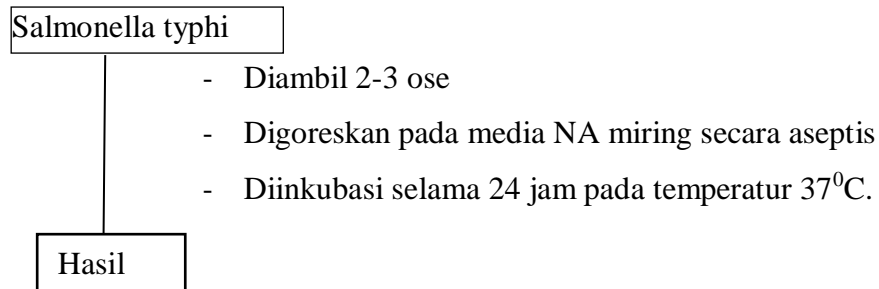
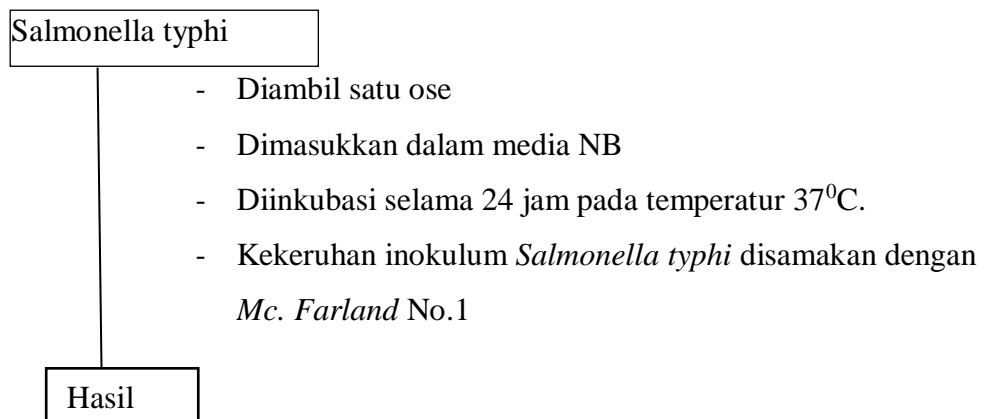
g. Analisa Gugus Fungsi Eksopolisakarida Menggunakan *Fourier Transform Infra Red (FTIR)*



4. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Pembuatan Media *Nutrien Agar*



b. Regenerasi *Salmonella typhi***c. Pembuatan Inokulum *Salmonella typhi***

d. Uji Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Agar

Eksopolisakarida

- Ditimbang 0,01 gr
- Dilarutkan pada 2 mL DMSO 10%
- Dibuat konsentrasi (1,25; 2,5; 5) mg/mL
- Dipipet 100 μ L inokulum *Salmonella typhi*
- Dimasukkan dalam cawan petri
- Dituang media NA secukupnya pada cawan
- Ditunggu sampai media mengeras
- Ditaruh 4 cakram kosong dan 1 cakram antibiotik Siprofloksasin
- Dipipet 25 μ L larutan eksopolisakarida berbagai konsentrasi pada cakram 1-3
- Cakram ke 4 diisi dengan pelarut
- Ditunggu sampai larutan terserap
- Diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 37⁰C
- Diamati aktivitas antibakterinya

Hasil

Lampiran 3. Perhitungan

1. Pembuatan larutan NaCl 0,85 %

$$\text{NaCl } 0,85\% \text{ (b/v)} = \frac{0,85 \text{ gram NaCl}}{100 \text{ mL akuades}}$$

Larutan NaCl dibuat dengan ditimbang 0,85 gram NaCl dengan neraca analitik, kemudian dilarutkan dengan aquades. Dimasukkan ke dalam labu ukur 100 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: 5 gram fenol ditimbang menggunakan neraca analitik, kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker 100 mL, dilarutkan dengan aquades kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, lalu ditandabatkan dan dihomogenkan.

3. Pembuatan Inokulum OD 0,5

Isolat *Weissella confusa* yang ditumbuhkan dalam media MRSB telah diukur OD nya menggunakan Spektrofotomeer UV-Vis dengan nilai 2.1378. Pembuatan inokulum kerja dengan nilai OD 0,5 dengan volume 20 mL dicari menggunakan persamaan berikut,

$$OD_1 \cdot V_1 = OD_2 \cdot V_2$$

$$2,1 \times V_1 = 0,5 \times 20 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{0,5 \times 20 \text{ mL}}{2,1} = 9,5 \text{ mL}$$

Inokulum kerja OD 0,5 20 mL di buat dengan menambahkan 9,5 mL inokulum induk dengan 10,5 mL MRSB

4. Rendemen Eksopolisakarida

Produksi eksopolisakarida dari fermentasi menggunakan bakteri *Weissella confusa* pada 100 mL media *de Man rogosa and Shaarpe broth* dengan penambahan sukrosa 5% adalah 1.1321 gr

$$\begin{aligned} \text{Rendemen eksopolisakarida (mg/L)} &= \frac{\text{berat kering eksopolisakarida (mg)}}{\text{volume media (L)}} \\ &= \frac{1132,1 \text{ mg}}{0,1 \text{ L}} = 11.321 \text{ mg/L} \end{aligned}$$

5. Indeks Kelarutan Air Eksopolisakarida

Eksopolisakarida terlarut ditunjukkan pada Tabel 5.1

Tabel 5.1 Eksopolisakarida terlarut

	Berat cawan (gr)	Berat cawan +EPS (gr)	Berat EPS kering (gr)
Ulangan 1	48,0192	48,0276	0,0084
Ulangan 2	46,2288	46,2395	0,0107
Ulangan 3	46,8297	46,8379	0,0082

Menghitung eksopolisakarida terlarut menggunakan persamaan berikut,

$$\text{Kelarutan (\%)} = \frac{(\text{berat EPS dan cawan} - \text{berat cawan}) \text{ mg}}{\text{berat awal eksopolisakarida}} \times 100$$

Berat EPS awal 0,03 gr → 30 mg

Ulangan 1

$$\text{Kelarutan U1(\%)} = \frac{(48.0276 - 48.0192) \text{ mg}}{30 \text{ mg}} \times 100 = 28 \%$$

Ulangan 2

$$\text{Kelarutan U2(\%)} = \frac{(46.2395 - 46.2288) \text{ mg}}{30 \text{ mg}} \times 100 = 35,66 \%$$

Ulangan 3

$$\text{Kelarutan U3 (\%)} = \frac{(46,8379 - 46,8297) \text{ mg}}{30 \text{ mg}} \times 100 = 27,33 \%$$

Tabel 5.2 Kadar eksopolisakarida terlarut

Eksopolisakarida terlarut (%)			Rata-rata (%)
Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
28	35	27,33	30,11

6. Daya Ikat Air Eksopolisakarida

Kemampuan eksopolisakarida dalam mengikat air ditunjukkan pada Tabel 6.1.

Tabel 6.1 Daya ikat air

Berat kering (mg)			Rata-rata (mg)
Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
197,9	273	231,5	234,13

Daya ikat air eksopolisakarida dihitung menggunakan persamaan,

$$\text{Daya ikat air (\%)} = \frac{\text{berat eksopolisakarida setelah menyerap air}}{\text{berat awal eksopolisakarida}} \times 100$$

Ulangan 1

$$\text{Daya ikat air U1 (\%)} = \frac{197,9 \text{ mg}}{40 \text{ mg}} \times 100 = 491,06 \%$$

Ulangan 2

$$\text{Daya ikat air U2 (\%)} = \frac{273 \text{ mg}}{40 \text{ mg}} \times 100 = 677,41 \%$$

Ulangan 3

$$\text{Daya ikat air U3 (\%)} = \frac{231,5 \text{ mg}}{40 \text{ mg}} \times 100 = 574,44 \%$$

Tabel 6.2 Daya ikat air eksopolisakarida

Daya ikat air (%)			Rata-rata (%)
Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
491,06	677,41	577,44	581,97

7. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

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

Cara pembuatan: ditimbang glukosa sebanyak 100 mg menggunakan neraca analitik, kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker kemudian dilarutkan dengan akuades. Dimasukkan larutan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian

ditandabatkan dan dihomogenkan. Larutan ini digunakan sebagai larutan induk glukosa standar. Pembuatan larutan glukosa 10, 20, 30, 40, 50 dan 60 ppm dilakukan dengan pengenceran dari larutan glukosa induk dengan 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

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

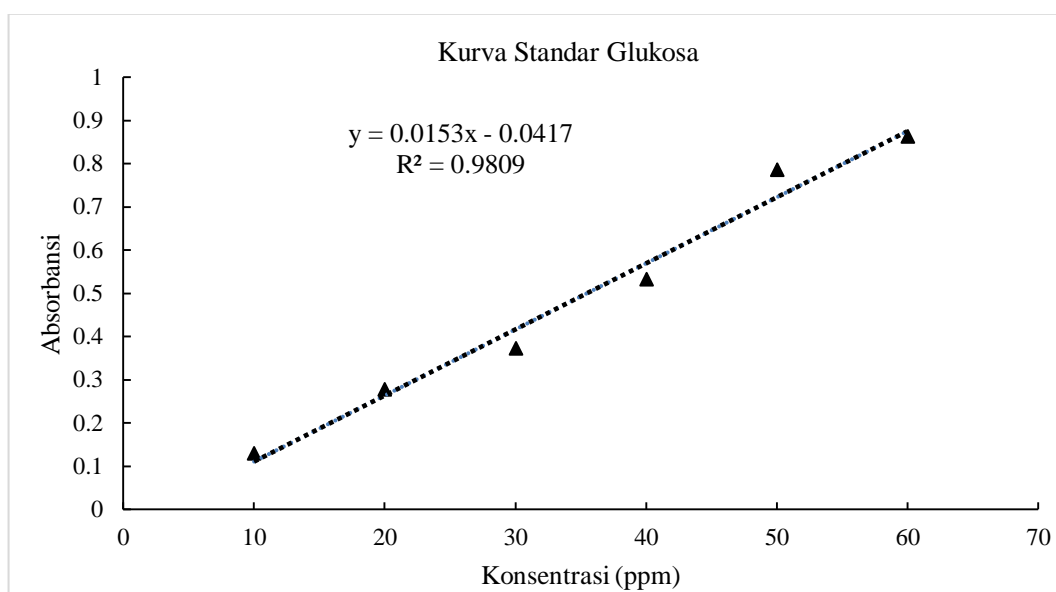
$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 60 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

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

Glukosa dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50, 60 ppm diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis, nilai absorbansinya ditunjukkan pada Tabel 7.1.

Tabel 7.1 Data Absorbansi Glukosa

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
10	0,1296
20	0,2772
30	0,3721
40	0,5327
50	0,7850
60	0,8626

**Gambar 7.1** Kurva Standar Glukosa

8. Analisa Kadar Gula Total pada Eksopolisakarida

Kadar gula total eksopolisakarida dilakukan dengan menimbang 0,01 mg EPS dilarutkan pada akuades 250 mL. Kemudian diambil sebanyak 1 mL, ditambahkan fenol 5% sebanyak 2 mL dan asam sulfat pekat sebanyak 5 mL. Kemudian dipanaskan dengan penangas air mendidih selama 15 menit. Kemudian dihitung absorbansi gula total menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 490 nm. Data hasil absorbansi gula total eksopolisakarida ditunjukkan pada Tabel 8.1.

Tabel 8.1 Nilai Absorbansi Eksopolisakarida

Sampel	Absorbansi		
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
Eksopolisakarida	0,4635	0,4597	0,4139

Data absorbansi eksopolisakarida dimasukkan ke dalam persamaan regresi dari kurva standar glukosa $y = 0,01528 \cdot x - 0,04170$ dengan y adalah absorbansi eksopolisakarida dan x adalah konsentrasi gula yang terkandung dalam eksopolisakarida. Nilai konsentrasi dihitung sebagai berikut,

Ulangan 1

$$y = 0,01528 \cdot x - 0,04170$$

$$0,4635 = 0,01528 \cdot x - 0,04170$$

$$x = \frac{0,4635 + 0,04170}{0,01528}$$

$$x = 33,06 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi analisa} &= \frac{10 \text{ mg}}{0,25 \text{ L}} \\ &= 40 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar Gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva}}{\text{Konsentrasi analisa}} \times 100 \\ &= \frac{33,06}{40} \times 100 \\ &= 82,65 \% \end{aligned}$$

Ulangan 2

$$y = 0,01528 \cdot x - 0,04170$$

$$0,4597 = 0,01528 \cdot x - 0,04170$$

$$x = \frac{0,4597 + 0,04170}{0,01528}$$

$$x = 32,81 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi analisa} &= \frac{10 \text{ mg}}{0,25 \text{ L}} \\ &= 40 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar Gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva}}{\text{Konsentrasi analisa}} \times 100 \\
 &= \frac{32,81}{40} \times 100 \\
 &= 82,03 \%
 \end{aligned}$$

Ulangan 3

$$y = 0,01528 \cdot x - 0,04170$$

$$0,4139 = 0,01528 \cdot x - 0,04170$$

$$x = \frac{0,4139 + 0,04170}{0,01528}$$

$$x = 29,81 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi analisa} &= \frac{10 \text{ mg}}{0,25 \text{ L}} \\
 &= 40 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar Gula (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva}}{\text{Konsentrasi analisa}} \times 100 \\
 &= \frac{29,81}{40} \times 100 \\
 &= 74,54 \%
 \end{aligned}$$

Kadar gula total eksopolisakarida dapat dilihat pada tabel 7.2.

Tabel 8.2 Kadar gula total eksopolisakarida

Sampel	Kadar Gula Total (%)			Rata-rata (%)
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
Eksopolisakarida	82,65	82,03	74,54	79,74

9. Pembuatan Kurva Standar *Bovine Serum Albumin* (BSA)

$$\text{BSA induk, } \frac{30 \text{ mg Bovine Serum Albumin}}{10 \text{ mL akuades}} = 3000 \text{ ppm}$$

Kurva standar BSA dibuat dengan melarutkan BSA dengan konsentrasi 5 mg/mL, kemudian diambil volume 0,04; 0,08; 0,12; 0,16; 0,2 mL mengikuti perhitungan berikut,

a. Volume 0,04 mL:

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

$$M_1 \times 5 \text{ mL} = 3000 \text{ ppm} \times 0,04 \text{ mL}$$

$$M_1 = 24 \text{ ppm}$$

b. Volume 0,08 mL

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

$$M_1 \times 5 \text{ mL} = 3000 \text{ ppm} \times 0,08 \text{ mL}$$

$$M_1 = 48 \text{ ppm}$$

c. Volume 0,12 mL

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

$$M_1 \times 0,12 \text{ mL} = 3000 \text{ ppm} \times 0,12 \text{ mL}$$

$$M_1 = 72 \text{ ppm}$$

d. Volume 0,16 mL

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

$$M_1 \times 5 \text{ mL} = 3000 \text{ ppm} \times 0,16 \text{ mL}$$

$$M_1 = 96 \text{ ppm}$$

e. Volume 0,2 mL

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

$$M_1 \times 5 \text{ mL} = 3000 \text{ ppm} \times 0,2 \text{ mL}$$

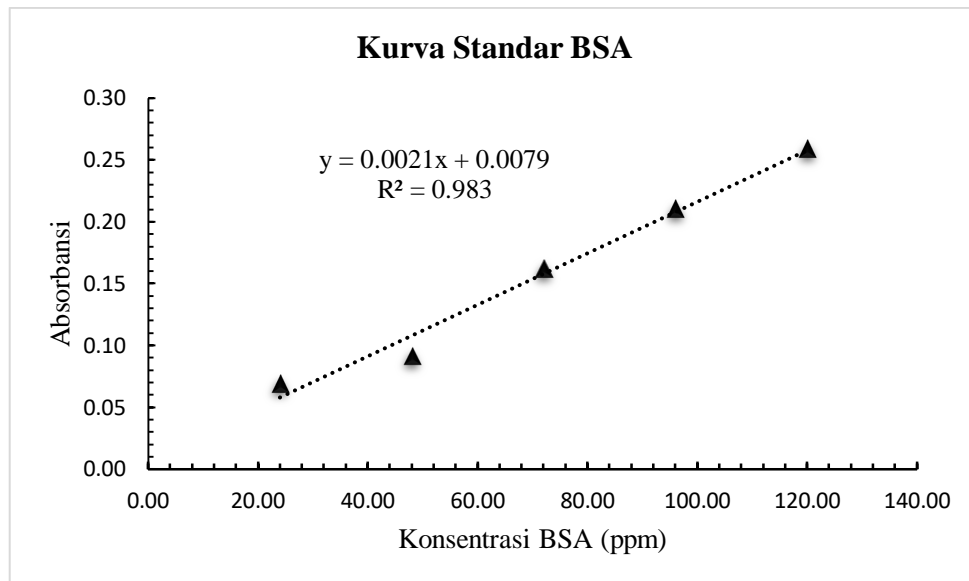
$$M_1 = 120 \text{ ppm}$$

Larutan BSA dengan konsentrasi 24, 48, 72, 96, 120 ppm diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis, nilai absorbansinya ditunjukkan pada Tabel

9.1.

Tabel 9.1 Data Absorbansi BSA

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
24	0,0684
48	0.0905
72	0.1616
96	0.21
120	0.2584



Gambar 9.1 Kurva Standar BSA

10. Analisa Kadar Protein Eksopolisakarida

Kadar protein dilakukan dengan menimbang 20 mg eksopolisakarida dilarutkan pada akuades 5 mL. Kemudian diambil 1 mL eksopolisakarida dan ditambahkan 5 mL reagen lowry, divorteks dan dibiarkan selama 10 menit, kemudian ditambahkan 0,5 mL folin 1 N, kemudian diinkubasi dalam ruang gelap selama 20 menit,, kemudian diukur absorbansinya pada λ 660 nm.. Data hasil absorbansi gula total eksopolisakarida ditunjukkan pada Tabel 10.1.

Tabel 10.1 Nilai Absorbansi Eksopolisakarida

Sampel	Absorbansi		
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
Eksopolisakarida	0,0967	0,0716	0,0689

Data absorbansi eksopolisakarida dimasukkan ke dalam persamaan regresi dari kurva standar BSA $y = 0.0021x + 0.0079$ dengan y adalah absorbansi eksopolisakarida dan x adalah konsentrasi BSA yang terkandung dalam eksopolisakarida. Nilai konsentrasi dihitung sebagai berikut,

Ulangan 1

$$y = 0.0021x + 0.0079$$

$$0,0652 = 0.0021x + 0.0079$$

$$x = \frac{0,0652 - 0,0079}{0.0021}$$

$$x = 42,285 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi analisa} &= \frac{20 \text{ mg}}{0,005 \text{ L}} \\ &= 4000 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar Protein (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva}}{\text{Konsentrasi analisa}} \times 100 \\ &= \frac{42,285}{4000} \times 100 \\ &= 1,057 \% \end{aligned}$$

Ulangan 2

$$y = 0.0021 * x + 0.0079$$

$$0,0716 = 0.0021x + 0.0079$$

$$x = \frac{0,0716 - 0,0079}{0.0021}$$

$$x = 30,33 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi analisa} &= \frac{20 \text{ mg}}{0,005 \text{ L}} \\ &= 4000 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar Protein (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva}}{\text{Konsentrasi analisa}} \times 100 \\ &= \frac{30,33}{4000} \times 100 \\ &= 0,7583\% \end{aligned}$$

Ulangan 3

$$y = 0.0021 * x + 0,0079$$

$$0,0689 = 0,0021 * x + 0,0079$$

$$x = \frac{0,0689 - 0,0079}{0.0021}$$

$$x = 29,047 \text{ ppm}$$

$$\text{Konsentrasi analisa} = \frac{20 \text{ mg}}{0,005 \text{ L}}$$

$$\begin{aligned}
 &= 4000 \text{ ppm} \\
 \text{Kadar Protein (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi kurva}}{\text{Konsentrasi analisa}} \times 100 \\
 &= \frac{29,047}{4000} \times 100 \\
 &= 0,726 \%
 \end{aligned}$$

Kadar protein eksopolisakarida dapat dilihat pada Tabel 10.2.

Tabel 10.2 Kadar protein eksopolisakarida

Sampel	Kadar Protein (%)			Rata-rata (%)
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
Eksopolisakarida	1,057	0,7583	0,726	0.847±0,016

11. Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Agar

Metode difusi agar dilakukan dengan melarutkan 0,01 gr eksopolisakarida dalam 2 mL DMSO 10% , kemudian dibuat konsentrasi 1,25 mg/mL dan 2,5 mg/mL. Inokulum *Salmonella typhi* dibuat kekeruhannya setara *Mc. Farland* No. 1, kemudian diambil 100 µL dan ditaruh pada cawan petri steril, dimasukkan media NA cair secukupnya dan dibiarkan mengeras, kemudian *blank disc* dan antibiotik siprofloksasin ditempatkan pada agar, *blank disc* ditetesi 25 µL masing-masing konsentrasi eksopolisakarida, kemudian di inkubasi selama 24 jam dan diukur zona bening yang terbentuk menggunakan jangka sorong. Hasil zona bening ditunjukkan pada Tabel 11.1.

Tabel 11.1 Aktifitas antibakteri eksopolisakarida metode difusi agar

Konsentrasi Eksopolisakarida (mg/mL)	Zona bening (mm)			
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4
1,25	5,6	6,1	5,05	4,8
2,5	5,05	6,4	5,08	4,7
5	5,45	4,5	5	4,5
Siprofloksasin	20,35	27,9	26,4	21,35

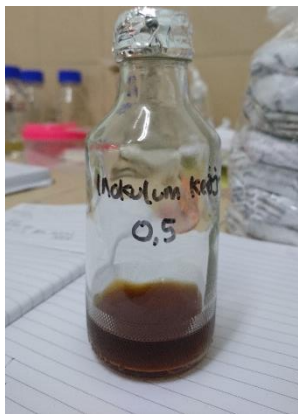
Lampiran 4. Dokumentasi



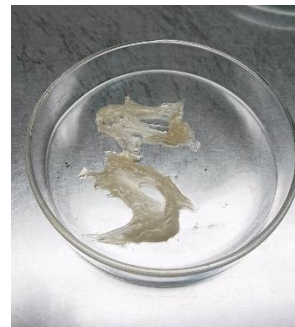
Regenerasi *W. confusa*



Media setelah fermentasi



Inokulum kerja (OD 0,5)



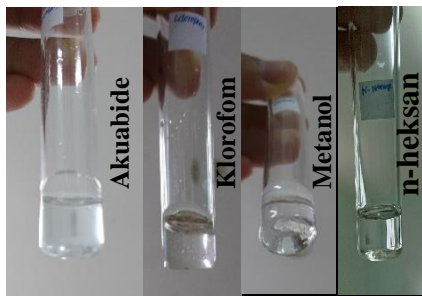
Endapan eksopolisakarida



Media sebelum fermentasi



Eksopolisakarida kering



Uji kelarutan eksopolisakarida berbagai pelarut



Uji aktifitas antibakteri metode difusi agar



Pembuatan kurva standar glukosa

Lampiran 5. Keterangan Tambahan**1. Komposisi media MRSA, MRSB, dan NA****a. MRSA**

Senyawa	Kadar (gr/L)
Glucose	20
Enzymatic digest of casein	10
Triammonium sitrate	2
Beef extract	8
Sodium acetate	5
Yeast extract	4
Dippotassium phosphate	2
Tween 80	1,08
Magnesium sulfat heptahidrat	0,2
Manganese sulfat tetrahidrat	0,04
Agar	12-18

b. MRSB (Pronadisa, Spain)

Senyawa	Kadar (gr/L)
Glucose	20
Bacteriological pepton	10
Beef extract	8
Sodium acetate	5
Yeast extract	4
Dipotassium phosphate	2
Ammonium sitrate	2
Tween 80	1
Magnesium sulfat	0,2
Manganese sulfat	0,05