

**PENGARUH LAMA FERMENTASI PADA PRODUKSI
EKSOPOLISAKARIDA MENGGUNAKAN MEDIA SEMI SINTETIS
OLEH *Weissella confusa***

SKRIPSI

**Oleh:
MUHAMMAD ILHAM KUSUMA WINAHYU
NIM. 17630106**

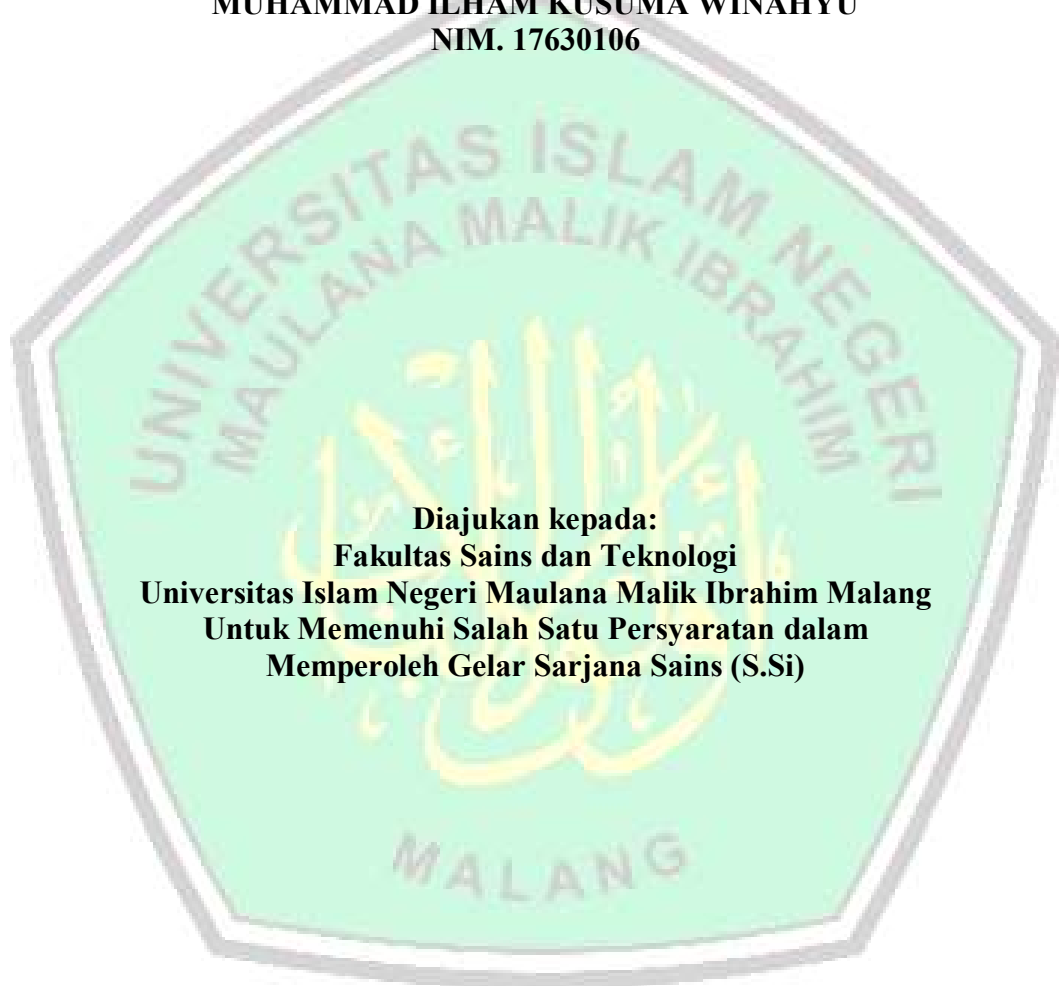


**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2022**

**PENGARUH LAMA FERMENTASI PADA PRODUKSI
EKSOPOLISAKARIDA MENGGUNAKAN MEDIA SEMI SINTETIS
OLEH *Weissella confusa***

SKRIPSI

**Oleh:
MUHAMMAD ILHAM KUSUMA WINAHYU
NIM. 17630106**



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

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2022**

**PENGARUH LAMA FERMENTASI PADA PRODUKSI
EKSOPOLISAKARIDA MENGGUNAKAN MEDIA SEMI SINTETIS
OLEH *Weissella confusa***

SKRIPSI

Oleh:
MUHAMMAD ILHAM KUSUMA WINAHYU
NIM. 17630106

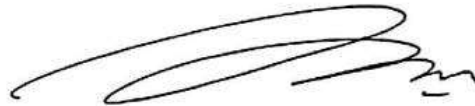
Telah Disetujui dan Disahkan untuk Diuji
Tanggal: 14 Juni 2022

Pembimbing I



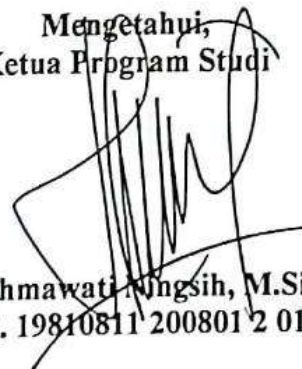
Dr. Anik Maunatin, S.T., M.P
NIDT. 19760105 20180201 2 248

Pembimbing II



Dr. Akyunul Jannah, S.Si., M.P
NIP. 19750410 200501 2 009

**Mengetahui,
Ketua Program Studi**



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

**PENGARUH LAMA FERMENTASI PADA PRODUKSI
EKSOPOLISAKARIDA MENGGUNAKAN MEDIA SEMI SINTETIS
OLEH *Weissella confusa***

SKRIPSI

**Oleh:
MUHAMMAD ILHAM KUSUMA WINAHYU
NIM. 17630106**

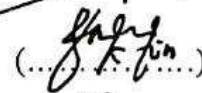
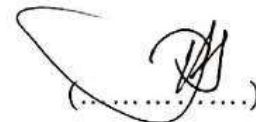
**Telah Dipertahankan Di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 14 Juni 2022**

**Ketua Penguji : Himmatul Barroroh, M.Si
NIP.19710311 200312 2 001**


**Anggota Penguji I : Fadilah Nor Laili Lutfia, M.Biotech
LB. 63033**

**Anggota Penguji II : Dr. Anik Maunatin, S.T., M.P
NIDT.19760105 20180201 2 248**

**Anggota Penguji III : Dr. Akyunul Jannah, S.Si., M.P
NIP. 19750410 200501 2 009**



**Mengesahkan,
Ketua Program Studi**



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

HALAMAN PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan kepada:

Allah SWT sebagai bukti telah kumanfaatkan rahmat dan nikmat akal fikiran yang Engkau berikan dengan sebaik-baiknya.

Kedua orangtua (Bapak Riyono Siran dan Ibu Umi Muslikhah) yang telah memberikan cerita betapa harus dimanfaatkannya masa kuliah untuk mengenal dunia luar dengan harus belajar apapun, dimanapun, dan dari siapapun; jalan-jalan kesana kemari; dan tetap bertanggungjawab terhadap perkuliahan. Juga cinta kasih serta do'a dan pelajaran hidup yang tiada henti selalu diberikan.

Tidak lupa untuk kakak (Rio Haryo Pandu Wiguna) yang telah kompetitif semasa hidup, dan adik-adik (Insan Hutami Puspa Nagari dan Dian Hapsari Nusa Bhakti) yang telah memotivasi agar cepat lulus dan gentian biaya sekolahnya.

Kakek dan Nenek (*Alm.* Mbah Sunaryo dan *Alm.* Mbah Sri Saparti) telah ada satu orang cucumu yang sarjana. (Mbah Siran) salah satu cucu kesayanganmu ini telah sarjana semoga sehat selalu dan (*Alm.* Mbah Sriaah) yang tiada di hari seminar proposal maafkan cucumu ini tidak bisa menemui dan menghantarkanmu kala itu.

Teman-teman penelitian di Laboratorium Riset Bioteknologi dan Biokimia. Teman-teman "*eendol dawet, dilarang ghibah, dilarang hasud*" (Alivia, Aninda, Dhema, Fikri, Fuad, Silvia, Suci, Taufiq, Ucha, dan Umami) apapun nanti nama perkumpulan ini yang telah saling memotivasi dan menguatkan untuk segera menyelesaikan penelitian.

Alivia Husin yang selalu ada, sabar menemani, dan mendengar keluh kesah kala itu, entah menjadi siapapun dirimu dimasa yang akan datang bagiku.

“Motto”

“Kemarin itu kenangan, Esok itu harapan, Sekarang itu anugrah, maka Manfaatkanlah anugrah itu sebaik-baiknya ~ KH. A. Tamim Romli, S.H., M.Si”

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Muhammad Ilham Kusuma Winahyu
NIM : 17630106
Program Studi : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Pengaruh Lama Fermentasi pada Produksi
Eksopolisakarida Menggunakan Media Semi Sintetis oleh
Weissella confusa

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan 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 cuplikan pada daftar pustaka. Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 22 Juni 2022

Yang membuat pernyataan,



Muhammad Ilham Kusuma Winahyu
NIM. 17630106

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah yang maha pengasih lagi maha penyayang, atas segala nikmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Lama Fermentasi pada Produksi Eksopolisakarida Menggunakan Media Semi Sintetis oleh *Weissella confusa*”** dengan sebaik mungkin. Shalawat serta salam selalu penulis haturkan pada Nabi Muhammad SAW yang menjadi suri tauladan. Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Ayah dan Ibu tercinta atas segala do'a, usaha, dan cinta kasih yang tiada henti diberikan kepada penulis.
2. Bapak Prof. Dr. M. Zainudin, MA selaku rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi.
4. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si selaku ketua program studi kimia.
5. Ibu Dr. Anik Maunatin, M.P, dan Ibu Dr. Akyunul Jannah, M.P selaku dosen pembimbing utama dan agama yang telah memberikan banyak arahan, masukan, serta motivasi dalam membimbing.
6. Seluruh dosen Jurusan Kimia yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat bagi penulis.
7. Teman-teman mahasiswa angkatan 2017 dan semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa moril maupun materil.
8. Penulis sendiri, kamu telah kuat dan masih sanggup sampai detik ini.

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

Malang, 22 Juni 2022

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERSEMBAHAN	iv
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
ABSTRAK	xii
ABSTRACT	xiii
مستخلص البحث.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Batasan Masalah.....	6
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Bakteri Asam Laktat	7
2.2 <i>Weissella confusa</i>	9
2.3 Eksopolisakarida (EPS).....	10
2.4 Biosintesis Eksopolisakarida.....	13
2.5 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Produksi Eksopolisakarida.....	15
2.6 Pengukuran Kadar Total Gula dengan Metode Asam Sulfat-Fenol.....	19
2.7 Spektroskopi <i>Fourier Transform Infrared</i> (FTIR).....	21
2.8 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	22
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	24
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	24
3.2 Alat dan Bahan.....	24
3.2.1 Alat	24
3.2.2 Bahan.....	24
3.3 Rancangan Penelitian	25
3.4 Tahapan Penelitian	25
3.5 Pelaksanaan Penelitian	26
3.5.1 Pembuatan Media	26
3.5.1.1 Media <i>de Man Rogosa and Sharpe Agar</i> (MRSA)	26
3.5.1.2 Media <i>de Man Rogosa and Sharpe Broth</i> (MRSB).....	27
3.5.1.2 Media Produksi Eksopolisakarida.....	27
3.5.2 Sterilisasi Alat dan Media	27

3.5.3 Regenerasi Bakteri <i>Weissella confusa</i>	28
3.5.4 Pembuatan Inokulum Bakteri.....	28
3.5.5 Produksi Eksopolisakarida oleh <i>Weissella confusa</i>	28
3.5.6 Ekstraksi Eksopolisakarida dari Media Fermentasi	29
3.5.7 Pengukuran <i>Total Plate Count</i> (TPC)	29
3.5.8 Penentuan Kadar Total Gula dengan Metode Sulfat Fenol	30
3.5.8.1 Pembuatan Kurva Standar dengan Metode Sulfat Fenol.....	30
3.5.8.2 Penetapan Kadar Total Gula dengan Metode Sulfat Fenol	30
3.5.9. Identifikasi Gugus Fungsi Eksopolisakarida dengan Fourier Transform Infrared (FTIR)	30
3.5.10. Identifikasi Monomer Eksopolisakarida dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)	31
3.5.11 Analisis data	32
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	33
4.1 Pembuatan Media.....	33
4.2 Regenerasi Bakteri <i>Weissella confusa</i>	35
4.3 Pembuatan Inokulum <i>Weissella confusa</i>	36
4.4 Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Produksi Eksopolisakarida oleh <i>Weissella confusa</i>	37
4.5 Analisis Kadar Total Gula Eksopolisakarida	42
4.6 Analisis Gugus Fungsi Eksopolisakarida dengan FTIR.....	44
4.7 Analisis Profil Monomer Eksopolisakarida dengan KLTA.....	46
4.8 Optimasi Produksi Eksopolisakarida oleh <i>Weissella confusa</i> dalam Perpektif Islam	49
BAB V PENUTUP.....	52
5.1 Kesimpulan	52
5.2 Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN.....	61

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Penelitian Terdahulu Produksi Eksopolisakarida dengan Lama Fermentasi yang Berbeda	17
Tabel 4.1 Produksi Eksopolisakarida oleh <i>Weissella confusa</i>	40
Tabel 4.2 Gugus Fungsi Spektra FTIR EPS oleh <i>Weissella confusa</i>	46



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Jalur Biosintesis EPS secara Ekstraseluler.....	13
Gambar 2.2 Jalur Biosintesis EPS secara Intraseluler	15
Gambar 2.3 Reaksi Dehidrasi Karbohidrat	20
Gambar 2.4 (a) Pentosa (b) Heksosa (c) 6-dioksiheksosa (d) Keto-heksosa	20
Gambar 2.5 Reaksi Pembentukan Kompleks Fenol Furfural	21
Gambar 2.6 FTIR Varian 1000 FT	21
Gambar 2.7 Spektra FTIR EPS oleh <i>Weissella confusa</i>	22
Gambar 4.1 Hasil Regenerasi Bakteri <i>Weissella confusa</i>	36
Gambar 4.2 Eksopolisakarida Kering oleh <i>Weissella confusa</i>	39
Gambar 4.3 Kurva Standar Glukosa	43
Gambar 4.4 Reaksi Polisakarida dalam Metode Sulfat-Fenol	43
Gambar 4.5 Spektra FTIR EPS oleh <i>Weissella confusa</i>	45
Gambar 4.6 Monitoring KLTA Monosakarida Penyusun Eksopolisakarida yang dihasilkan oleh <i>Weissella confusa</i>	48



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian	61
Lampiran 2 Skema Kerja	62
Lampiran 3 Perhitungan.....	67
Lampiran 4 Hasil Analisis SPSS.....	73
Lampiran 5 Dokumentasi.....	78



ABSTRAK

Winahyu, Muhammad Ilham Kusuma. 2022. **Pengaruh Lama Fermentasi pada Produksi Eksopolisakarida Menggunakan Media Semi Sintetis oleh *Weissella Confusa***. Skripsi. Program Studi Kimia. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Dr. Anik Maunatin, S.T., M.P. Pembimbing II: Dr. Akyunul Jannah, S.Si., M.P

Kata kunci: Eksopolisakarida, *Weissella confusa*, lama fermentasi, media semi sintetis.

Eksopolisakarida (EPS) merupakan suatu polisakarida yang tersusun atas monomer gula pereduksi yang disekresi mikroorganisme ke luar sel. EPS mempunyai banyak kegunaan dibidang pangan dan kesehatan serta aman untuk dikonsumsi atau *General Recognize as Safe* (GRAS). *Weissella confusa* merupakan salah satu mikroorganisme yang dapat memproduksi EPS dalam jumlah tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama fermentasi terhadap produksi EPS serta identifikasi gugus fungsi) dan profil monomer gula penyusun dari EPS terpilih.

Produksi EPS dilakukan menggunakan media alternatif semi sintetis dengan penambahan sumber gula berupa sukrosa. Percobaan pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal yaitu lama fermentasi dengan variasi 12, 24, 36, 48, dan 60 jam. Proses fermentasi dilakukan dengan menambahkan inokulum 5% kemudian diinkubasi pada suhu ruang dan shaker pada kecepatan 100 rpm. Analisis yang dilakukan meliputi rendemen EPS, jumlah bakteri setelah fermentasi, kadar total gula EPS, identifikasi gugus fungsi EPS menggunakan *fourier transform infrared* (FTIR), dan profil monomer gula penyusun EPS menggunakan kromatografi lapis tipis analisis (KLTA). Data yang didapatkan dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA* (α 0,05).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa lama fermentasi optimum *Weissella confusa* dalam memproduksi EPS adalah 36 jam dengan jumlah bakteri $6,5 \times 10^8$ CFU/mL menghasilkan EPS sebesar 10,412 g/L dan total gula 91,77 %. Uji ANOVA menunjukkan adanya beda nyata pengaruh lama fermentasi pada produksi EPS ($\text{sig} < 0,05$). Hasil identifikasi FTIR menunjukkan gugus fungsi OH pada panjang gelombang 3471,76 dan 3430,45 cm^{-1} , ikatan rangkap *doublet* COO- pada 1647,89 cm^{-1} , gugus simetri lokal CH₂/C-OH pada 1458,13 cm^{-1} , ikatan glikosidik pada 1113,48; 1071,48; 993,50; 930,25 dan 855,44 cm^{-1} , serta vibrasi kerangka pada 668,88; 619,20; dan 537,89 cm^{-1} . Hasil identifikasi KLTA menunjukkan monomer gula penyusun EPS berupa glukosa dengan nilai Rf 0,45.

ABSTRACT

Winahyu, Muhammad Ilham Kusuma. 2022. **The Effect of Fermentation Time on Exopolysaccharide Production Using Semi-Synthetic Media by *Weissella Confusa***. Thesis. Chemistry Study Program. Faculty of Science and Technology Islamic State University Maulana Malik Ibrahim Malang. Program Studi Supervisor I: Dr. Anik Maunatin, S.T., M.P. Supervisor II: Dr. Akyunul Jannah, S.Si., M.P

Keyword: Exopolysaccharide, *Weissella confusa*, fermentation time, semi-synthetic media.

Exopolysaccharide (EPS) is a polysaccharide composed of reducing sugar monomers secreted by microorganisms outside the cell. EPS has many uses in the food and health sector and is generally recognized as safe (GRAS). *Weissella confusa* is one of the microorganisms that can produce high amounts of EPS. This study aims to determine the effect of fermentation time on the production of EPS as well as the identification of functional groups) and the profile of the sugar monomers that make up the selected EPS.

EPS production is carried out using semi-synthetic alternative media with the addition of a sugar source in the form of sucrose. The experiment in this study used a single factor Completely Randomized Design (CRD), namely the length of fermentation with variations of 12, 24, 36, 48, and 60 hours. The fermentation process was carried out by adding 5% inoculum then incubated at room temperature and shaker at 100 rpm. The analysis carried out included the yield of EPS, the number of bacteria after fermentation, sugar content, functional activity using Fourier Transform Infrared (FTIR), and the profile of sugar monomers for making EPS using analytical layer chromatography (TLC). The data obtained were analyzed using the One Way ANOVA test (α 0.05).

The results of this study showed that the optimum fermentation time of *Weissella confusa* in producing EPS was 36 hours with the number of bacteria 6.5×10^8 CFU/mL producing EPS of 10.412 g/L and total sugar 91.77%. ANOVA tests showed that there was a significant difference in the effect of fermentation time on EPS production ($\text{sig} < 0.05$). The FTIR identification results show the OH functional group at the wavelength of 3471.76 and 3430.45 cm^{-1} , COO- double bond at 1647.89 cm^{-1} , local symmetry group CH₂/C-OH at 1458.13 cm^{-1} , glycosidic bond at 1113.48 ; 1071.48 ; 993.50 ; 930.25 and 855.44 cm^{-1} , and skeletal vibrations at 668.88 ; 619.20 ; and 537.89 cm^{-1} . The results of TLC identification show that the sugar monomer that makes up EPS is glucose with an R_f value of 0.45.

مستخلص البحث

وبناهيو ، محمد إلهام كوسوما. ٢٠٢٢. تأثير وقت التخمر على إنتاج عديدات السكاريد الخارجية بواسطة فايسيليا كونفوسا. بحث علمي. قسم الكيمياء بكلية العلوم و التكنولوجيا بجامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرفة الأولى: الدكتورة أنيك ماوناتين الماجستير؛ المشرفة الثانية: الدكتورة أعين الجنة الماجستير

الكلمات المفتاحية: عديدات السكاريد الخارجية ، فايسيليا كونفوسا، وقت التخمر، تحويل فوربييه بالأشعة ، وسائل الإعلام شبه الاصطناعية.

عديد السكاريد الخارجي (EPS) هو عديد السكاريد يتكون من اختزال مونومرات السكر التي تفرزها الكائنات الحية الدقيقة خارج الخلية. يستخدم EPS في العديد من القطاعات الغذائية والصحية ومعترف به عمومًا على أنه آمن (GRAS). يعتبر فايسيليا كونفوسا أحد الكائنات الحية الدقيقة التي يمكن أن تنتج كميات كبيرة من البوليسترين المبتوق. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد تأثير وقت التخمر على إنتاج EPS وكذلك تحديد المجموعات الوظيفية وملف تعريف مونومرات السكر التي تتكون منها EPS المختار.

تم إنتاج EPS باستخدام وسط بديل شبه اصطناعي مع إضافة ١٠٪ سكروز. استخدم التصميم في هذه الدراسة عاملاً واحدًا بتصميم عشوائي تمامًا (RAL) وهو وقت التخمر مع تغيرات تبلغ ١٢ و ٢٤ و ٣٦ و ٤٨ و ٦٠ ساعة. تم إجراء عملية التخمر بإضافة ٥٪ لقاح خلال فترة الحضانة في درجة حرارة الغرفة باستخدام رجّاش. يشمل التحليل محصول EPS، وعدد البكتيريا بعد التخمر، ومحتوى السكر الكلي، وتحديد المجموعات الوظيفية باستخدام تحويل فوربييه بالأشعة تحت الحمراء (FTIR)، وملف تعريف مونومرات السكر التي تشكل EPS باستخدام تحليل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (KLTA). تم تحليل البيانات التي تم الحصول عليها باستخدام اختبار أحادي الاتجاه ANOVA ($\alpha 0,05$).

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن زمن التخمر الأمثل فايسيليا كونفوسا في إنتاج EPS كان ٣٦ ساعة مع عدد البكتيريا $6,5 \times 10^8$ مليون/لتر CFU المنتجة EPS بحجم ١٠,٤١٢ جرامات/لتر والسكر الكلي ٩١,٧٧٪. أظهرت الاختبارات الإحصائية وجود فرق معنوي في تأثير زمن التخمر على إنتاج EPS ($\text{sig} < 0.05$). تُظهر نتائج تحديد المجموعة الوظيفية باستخدام FTIR المجموعة الوظيفية OH بطول موجة ٣٤٧١,٧٦ و ٣٤٣٠,٤٥ سنتيمتر^{-١}، رابطة مزدوجة COO عند ١٦٤٧,٨٩ سنتيمتر^{-١}، مجموعة التناظر المحلي C-OH / CH₂ عند ١٤٥٨,١٣ سنتيمتر^{-١}، رابطة الجليكوسيد عند ١١١٣,٤٨ ؛ ١٠٧١,٤٨ ؛ ٩٩٣,٥٠ ؛ ٩٣٠,٢٥ و ٨٥٥,٤٤ سنتيمتر^{-١}، والاهتزازات الهيكلية عند ٦٦٨,٨٨ ؛ ٦١٩,٢٠ ؛ و ٥٣٧,٨٩ سنتيمتر^{-١}. أظهرت نتائج تحديد ملف السكر لمكون EPS باستخدام KLTA أن مونومر السكر المكون كان عبارة عن جلوكوز بقيمة تبلغ Rf ٠,٤٥.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Eksopolisakarida (EPS) merupakan suatu polisakarida atau polimer gula yang tersusun atas monomer gula pereduksi yang disekresi mikroorganisme ke luar sel (Patel dkk., 2012). EPS mempunyai banyak kegunaan dibidang pangan dan kesehatan. EPS di dalam makanan dapat berfungsi sebagai pengental, stabilisator, pembentuk gel, dan memiliki kemampuan mengikat air yang baik (Stepanov dkk., 2017). EPS didalam kesehatan dapat berfungsi sebagai anti biofilm, anti maag, antioksidan, pencegah pelekatan bakteri patogen, (Dilna dkk., 2015), antitumor, antimutagenisitas, dan senyawa aktif imunomodulator (Nehal dkk., 2019). EPS juga telah banyak digunakan dalam bidang industri seperti *β-glukan*, *β-mannan*, *curdlan*, *dekstran*, *gellan* dan *xanthan* (Malik dkk., 2010).

EPS dapat dihasilkan oleh berbagai macam bakteri, seperti bakteri asam laktat (BAL) (Dilna dkk., 2015). BAL dapat memfermentasi bahan pangan dan menghasilkan produk yang aman untuk dikonsumsi (Kim dkk., 2018). EPS yang dihasilkan dari BAL telah memenuhi *Generally Recognize as Safe Status* (GRAS) sehingga memiliki potensi untuk dimanfaatkan dengan baik dan aman untuk dikonsumsi (Surayot dkk., 2014). EPS yang dihasilkan oleh BAL berfungsi untuk melindungi sel bakteri dari sel lain yang bersifat bakteriofag dan kondisi lingkungan yang ekstrim atau tidak menguntungkan sebagai bentuk pertahanan diri (Abid dkk., 2018). Beberapa genus BAL yang umumnya dikenal dalam produksi EPS adalah *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oecococcus*, *Teragenococcus*,

Vagococcus, dan *Weissella* (Patel dkk., 2012).

BAL sebagai makhluk mikroskopik telah dijelaskan di dalam Al-Qur'an dengan perumpamaan makhluk yang lebih kecil dari nyamuk. Allah berfirman di dalam surat Al-Baqarah ayat 26 berikut;

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا

Artinya: “Sesungguhnya Allah tidak segan membuat perumpamaan seekor nyamuk atau yang lebih kecil dari itu...” (QS. Al-Baqarah: 26).

Berdasarkan kandungan surat Al-Baqarah ayat 26 menurut tafsir Ibnu Katsir pada kalimat “atau yang lebih kecil dari itu” dijelaskan adalah sesuatu yang memiliki fisik atau makna lebih kecil dari nyamuk. Sehingga dapat diketahui bahwa Allah juga menciptakan makhluk hidup yang sangat kecil yang dikenal sebagai mikroorganisme. BAL sebagai salah satu mikroorganisme ciptaan Allah memiliki keberagaman spesies dan manfaat masing-masing dan tersebar baik di perairan maupun daratan.

Weissella confusa merupakan salah satu jenis BAL yang biasa digunakan dalam produksi EPS. Biosintesis EPS oleh *Weissella confusa* dipilih karena memiliki produktivitas EPS yang tinggi. *Weissella confusa* termasuk dalam jenis BAL yang biasanya menghasilkan EPS dengan penambahan sukrosa (Tayuan, 2011). Sukrosa merupakan sumber karbon yang baik untuk produksi EPS oleh *Weissella confusa* jika dibandingkan dengan glukosa, fruktosa, dan laktosa (Wongsuphachat dkk., 2010).

Produksi EPS oleh BAL dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti jenis bakteri, lama fermentasi, suhu, konsentrasi substrat, penambahan sukrosa,

konsentrasi inokulum, dan pH (El-Waseif dkk., 2013). Beberapa penelitian tentang produksi EPS telah dilakukan dan dapat diketahui bahwa lama fermentasi merupakan faktor yang sangat berpengaruh terhadap produksi EPS. Fermentasi yang terlalu lama dapat menyebabkan hidrolisis sebagian EPS oleh aktivitas laktat/ hidrolisis enzim endo-amilase. Selain itu lama fermentasi juga diketahui menunjukkan kemampuan spesifik setiap strain BAL di dalam produksi EPS pada media tertentu (Lin dan Chien, 2007).

Produksi EPS oleh *Weissella confusa* selama ini dilakukan menggunakan media *de man rogosa and sharpe broth* (MRSB). Penelitian Wongsuphachat dkk., (2010) menunjukkan produksi EPS oleh *Weissella confusa* NH02 pada lama fermentasi 24 jam dalam media MRSB dengan konsentrasi sukrosa 4% sebesar 18,08 g/L. Penelitian Tayuan, (2011) menunjukkan produksi EPS oleh *Weissella confusa* PSMS4-4 pada lama fermentasi 30 jam dalam media MRSB dengan konsentrasi sukrosa 5% sebesar 8,65 g/L. Penelitian Adesulu-Dahunsi dkk., (2018) menunjukkan produksi EPS oleh *Weissella confusa* OF126 pada lama fermentasi 48 jam dalam media MRSB termodifikasi dengan konsentrasi sukrosa 2,4% sebesar 3 g/L. Penelitian Jin dkk., (2019) menunjukkan produksi EPS oleh *Weissella confusa* VP30 pada lama fermentasi 48 jam dalam media MRSB dengan konsentrasi sukrosa 10% sebesar 59,99 g/L. Sedangkan penelitian Zhao dkk., (2020) menunjukkan produksi EPS oleh *Weissella confusa* XG-3 pada lama fermentasi 72 jam dalam media MRSB termodifikasi dengan konsentrasi sukrosa 10% sebesar 97,5 g/L.

EPS merupakan senyawa polisakarida yang dapat diidentifikasi gugus fungsinya. Gugus fungsi EPS dapat diidentifikasi menggunakan *fourier transform*

infrared (FTIR). Spektra IR polisakarida umumnya terdapat vibrasi regangan OH pada 3600-3000 Cm^{-1} ; regangan ikatan rangkap *doublet* COO- pada 1800-1500 Cm^{-1} dan pita air pada 1635 Cm^{-1} ; vibrasi gugus dengan simetri lokal (CH_2 dan C-OH) pada 1500-1200 Cm^{-1} ; ikatan glikosidik pada 1200-800 Cm^{-1} ; dan vibrasi daerah kerangka karbohidrat pada panjang gelombang dibawah 800 Cm^{-1} (Hong dkk., 2021). Polisakarida EPS tersusun dari monomer dengan struktur gula seperti glukosa, fruktosa, galaktosa, dan mannososa.

Jenis monomer penyusun EPS bergantung pada strain BAL penghasil EPS dan jenis EPS yang dihasilkan. Identifikasi profil gula penyusun EPS perlu dilakukan untuk mengetahui struktur gula penyusun EPS. Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode yang digunakan dalam identifikasi komposisi monomer gula penyusun EPS (Zhou dkk., 2016). Identifikasi menggunakan KLT dilakukan dengan pengamatan terhadap noda yang terbentuk serta nilai R_f yang dibandingkan dengan standar (Gandjar dan Abdul 2007). Penelitian Hector dkk., (2015) menunjukkan monomer gula penyusun EPS dari *Weissella confusa* menggunakan KLT adalah glukosa. Sedangkan Malik dkk., (2015) menunjukkan monomer gula penyusun EPS dari *Weissella confusa* menggunakan KLT adalah fruktosa.

Berdasarkan uraian yang telah dijelaskan, perlu dilakukan produksi EPS oleh *Weissella confusa* menggunakan media selain MRSB untuk menghemat biaya produksi yang tinggi. Selain itu dapat diketahui bahwa lama fermentasi merupakan salah satu faktor penting dalam produksi EPS karena kemampuan spesifik setiap strain BAL berbeda. Oleh karena itu, penelitian ini akan mempelajari pengaruh lama fermentasi terhadap produksi EPS oleh *Weissella confusa* dalam media

alternatif semi sintesis serta identifikasi profil monomer gula penyusun EPS terpilih menggunakan KLTA.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh lama fermentasi pada produksi eksopolisakarida menggunakan media semi sintesis oleh *Weissella confusa*?
2. Bagaimana gugus fungsi eksopolisakarida yang dihasilkan oleh *Weissella confusa*?
3. Bagaimana profil monomer gula penyusun eksopolisakarida yang dihasilkan oleh *Weissella confusa*?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui pengaruh lama fermentasi pada produksi eksopolisakarida menggunakan media semi sintesis oleh *Weissella confusa*.
2. Untuk mengetahui gugus fungsi eksopolisakarida yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* menggunakan *fourier transform infrared* (FTIR).
3. Untuk mengetahui profil monomer gula penyusun eksopolisakarida yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* menggunakan kromatografi lapis tipis analitik (KLTA).

1.4 Batasan Masalah

1. *Weissella confusa* yang digunakan merupakan hasil isolasi dari kacang tanah fermentasi yang diperoleh dari laboratorium Bioteknologi program studi Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

2. Variasi lama fermentasi yang digunakan adalah 12, 24, 36, 48, dan 60 jam.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai lama fermentasi optimum produksi eksopolisakarida oleh *Weissella confusa*.
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai karakteristik eksopolisakarida yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* hasil isolasi dari kacang tanah fermentasi.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Asam Laktat (BAL)

Bakteri asam laktat (BAL) adalah kelompok bakteri yang mampu menghasilkan asam laktat dalam jumlah besar sebagai produk utama dalam metabolisme karbohidrat. Secara umum BAL termasuk bakteri Gram positif yang memiliki ciri tidak membentuk spora, berbentuk bulat atau batang, dan bereaksi negatif terhadap katalase. Beberapa genus BAL yang umumnya dikenal dalam produksi EPS adalah *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oecococcus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus*, dan *Weissella* (Patel dkk., 2012). BAL tumbuh pada pH lingkungan yang rendah dan dapat diisolasi dari berbagai jenis habitat seperti tanaman, sayuran, air susu, daging, dan hewan (Kuswanto dan Soedarmadji, 1989).

BAL mampu menghasilkan asam laktat, hidrogen peroksida, dan berbagai hasil metabolisme lain yang dapat memberikan manfaat pada tubuh. BAL sejak lama dimanfaatkan pada proses fermentasi makanan oleh masyarakat. BAL sekarang dimanfaatkan dalam proses pengawetan dan menambah cita rasa bahan pangan (Chabela dkk., 2010). Dalam bidang kesehatan BAL dapat mengendalikan bakteri patogen dalam saluran pencernaan, memproduksi vitamin B, bakteriosin, menurunkan serum kolesterol, dan inaktivasi berbagai senyawa beracun dalam tubuh (Tallon dkk., 2003). Menurut Prescott dkk., (1990) terdapat 2 kelompok BAL yaitu:

1. Bakteri homofermentatif yaitu bakteri yang menghasilkan asam laktat sebagai

satu-satunya produk fermentasi glukosa. Contohnya; *Streptococcus*, *Pediococcus*, dan *Lactobacillus*.

2. Bakteri heterofermentatif yaitu bakteri yang menghasilkan asam laktat dan memproduksi senyawa-senyawa lainnya seperti etanol, asam asetat, dan CO₂ sebagai produk fermentasi glukosa.

BAL dapat menghasilkan Eksopolisakarida (EPS) untuk melindungi sel bakteri dari kondisi lingkungan yang ekstrim dan sebagai pertahanan diri dari sel lain yang bersifat bakteriofag (Nudyanto dan Zubaidah, 2015). Berdasarkan penelitian Tallon dkk., (2003) sebagian besar spesies BAL telah diteliti untuk produksi EPS, diantaranya adalah *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, dan *Lactobacillus casei*. Al-Qur'an menjelaskan bahwa bakteri merupakan bukti adanya materi fungsional yang sangat kecil dan disebut dengan zarah. Sebagaimana ayat Al-Qur'an dalam surat Yunus ayat 61 berikut;

وَمَا تَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتْلُو مِنْهُ مِنْ قُرْآنٍ وَلَا تَعْمَلُونَ مِنْ عَمَلٍ إِلَّا كُنَّا عَلَيْكُمْ شُهُودًا إِذْ تُفِيضُونَ فِيهِ ۗ وَمَا يَعْزُبُ عَنْ رَبِّكَ مِنْ مِثْقَالِ ذَرَّةٍ فِي الْأَرْضِ وَلَا فِي السَّمَاءِ وَلَا أَصْغَرَ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرَ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ

Artinya: "Kamu tidak berada dalam suatu keadaan dan tidak membaca suatu ayat dari Al Quran dan kamu tidak mengerjakan suatu pekerjaan, melainkan Kami menjadi saksi atasmu di waktu kamu melakukannya. Tidak luput dari pengetahuan Tuhanmu biarpun sebesar zarah (atom) di bumi ataupun di langit. Tidak ada yang lebih kecil dan tidak (pula) yang lebih besar dari itu, melainkan (semua tercatat) dalam kitab yang nyata (Lauh mahfuzh)" (QS. Yunus: 61).

Berdasarkan kandungan surat Yunus ayat 61, menurut Shihab, (2002) kata “*dzarrah*” pada ayat tersebut memiliki arti sebagai wujud substansi yang memiliki ukuran paling kecil. Sebagian ulama mengartikannya semut yang sangat kecil, atau debu yang berterbangan atau atom. Kata “*dzarrah*” juga memberikan petunjuk bagi manusia yang beriman untuk mempelajari makhluk mikroskopik.

2.2 *Weissella confusa*

Weissella merupakan kelompok bakteri asam laktat yang pada awalnya digolongkan kedalam *Leuconostoc* atau *Lactobacillus*. Namun, pada tahun 1993 Collins dkk., mengidentifikasi ciri biokimia yang khas pada *Leuconostoc* atau *Lactobacillus* dan diklasifikasikan sebagai *Weissella*. Sebagai mikroba alami *Weissella* terlibat dalam banyak proses fermentasi asam laktat dan minuman beralkohol *coolsip*. Berbagai strain *Weissella* menarik perhatian peneliti karena memiliki kemampuan tinggi dalam produksi EPS (Jin dkk., 2019). Represi katabolit *Weissella spp* dapat mengatur jalur transportasi gula, metabolisme sintesis enzim dan prekursor nukleotida gula. Hasil ini menunjukkan bahwa sukrosa merupakan karbon utama sumber produksi EPS. *Weissella spp.* memiliki kapasitas produksi EPS yang lebih tinggi dari strain BAL yang lain (Kumar dkk., 2011). Berdasarkan *Taxonomic Outline of the Prokaryotes*, *Weissella confusa* diklasifikasikan sebagai berikut:

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

2.3 Eksopolisakarida (EPS)

Eksopolisakarida (EPS) merupakan suatu polisakarida atau polimer gula yang disekresi ke luar sel mikroorganisme. Polisakarida pada EPS terdiri dari unit gula atau turunan gula yang bercabang dan berulang dalam rasio yang berbeda dengan massa molekul 10^4 - 10^7 Da. EPS memiliki karakteristik yang bervariasi pada struktur, massa molekul, ukuran molekul, substituen non-karbohidrat, dan biomolekul. Umumnya substituen non-karbohidrat pada EPS yaitu asetat, fosfat, piruvat, suksinat, dan juga biomolekul seperti asam nukleat, lipid, protein, dan zat humat (Sanalibaba dan Cakmak 2016).

EPS dari BAL banyak digunakan karena memiliki sifat fisiko-kimia yang serupa dengan polisakarida pada tumbuhan (Zubaidah dkk., 2008), Perbedaan EPS dengan polisakarida lain pertama EPS didapatkan dari sekresi metabolit sekunder oleh mikroorganisme keluar sel. Kedua terdapat perbedaan ikatan antara EPS dan polisakarida (bisa rantai utama ataupun percabangannya). Sebagai contoh glikogen dengan dekstran (EPS). Glikogen memiliki ikatan utama pada α -1,4 glikosidik dan percabangan pada α -1,6 glikosidik (Crichton, 2019). Sedangkan dekstran (EPS) memiliki ikatan utama pada α -1,6 glikosidik dan percabangan pada α -1,3 glikosidik (Sutherland, 1997).

EPS yang merupakan hasil metabolit sekunder dari BAL ternyata memiliki kegunaan yang sangat melimpah. Sebagaimana ayat Al-Qur'an dalam surat Ali-Imran ayat 191 berikut;

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ

Artinya: “(Yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): Ya Tuhan, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia. Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka” (QS. Ali-Imran: 191).

Berdasarkan kandungan surat Ali-Imran ayat 191 menurut Shihab, (2002) pada ayat tersebut terdapat objek zikir (Allah) dan objek fikir (makhluk Allah berupa fenomena alam). Hal ini berarti pengenalan terhadap Allah didasarkan kepada kalbu, sedangkan pengenalan alam raya didasarkan pada akal (berfikir). Berdasarkan tafsir tersebut juga dapat dipahami selain perintah untuk berzikir manusia juga diperintahkan untuk berfikir. Bahwa sesungguhnya tidak ada ciptaan Allah yang sia-sia, termasuk makhluk mikroskopik yang tak kasat mata seperti BAL. Salah satu manfaat BAL adalah dapat menghasilkan EPS yang bermanfaat dalam pengembangan teknologi pangan dan kesehatan.

EPS di dalam makanan dapat berfungsi sebagai pengental, stabilisator, pembentuk gel, dan memiliki kemampuan mengikat air yang baik (Zubaidah dkk., 2008). EPS didalam kesehatan dapat berfungsi sebagai pengantar senyawa aktif insulin oral, antitumor, aktivasi makrofage, dan limfosit untuk meningkatkan ketahanan tubuh, serta sebagai probotik (Anindita, 2002). EPS juga telah banyak digunakan dalam bidang industri seperti β -glukan, β -mannan, curdlan, dekstran, gellan, dan xanthan (Malik dkk., 2008).

EPS dari BAL dikelompokkan menjadi dua, yaitu homopolisakarida dan heteropolisakarida. Pengelompokan EPS dari BAL dilakukan Berdasarkan komposisi monosakarida dan jalur biosintesisnya. Homopolisakarida (HoPS) terdiri dari monosakarida identik D-glukosa atau D-fruktosa dan dapat dibagi menjadi dua kelompok besar yakni glukana dan fruktana. EPS yang termasuk

kedalam kategori glukosa HoPS adalah dextran (α -1,6 *osidic bond*), mutan (α -1,3 *osidic bond*), altermann (α -1,6 dan α -1,3 *osidic bond*), dan reuteran (α -1,6 dan α -1,4 *osidic bond*). EPS yang termasuk kedalam kategori fruktosa HoPS adalah levan (β -2,6 *osidic bond*) dan tipe inulin (β -2,1 *osidic bond*). Heteropolisakarida (HePS) dari BAL merupakan unit berulang dengan sedikit kesamaan struktural satu sama lainnya. HePS dari BAL terjadi pada fase pertumbuhan yang berbeda, jumlah, dan jenisnya diatur berdasarkan kondisi pertumbuhan yang terjadi. Secara struktural HePS dapat berupa *ropy* atau *mucoid*. Jenis EPS yang termasuk kedalam HePS adalah kefirin dan oligosakarida (Patel dkk., 2012).

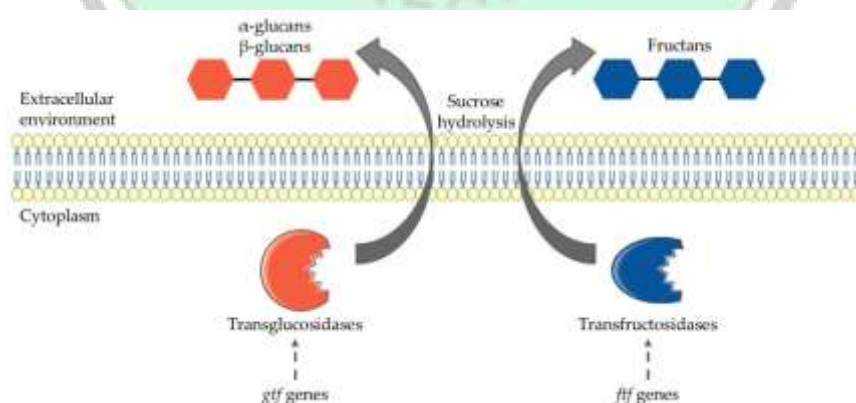
Produksi EPS dapat dilakukan melalui proses fermentasi oleh BAL. Fermentasi merupakan suatu proses respirasi anaerobik dengan atau tanpa adanya elektron eksternal (Dirmanto, 2006). Produk fermentasi oleh mikroorganisme yang dapat dimanfaatkan antara lain asam asetat, etil alkohol, gliserol, dan lain lain (Volk dan Wheeler, 1993). Salah satu contoh HoPS yang pertama kali diproduksi dalam skala industri adalah dextran yang dapat bermanfaat sebagai bahan pangan maupun non-pangan. Aplikasi dextran antara lain sebagai pengganti plasma. Dextran bekerja sebagai pengganti plasma darah dengan cara mengembangkan volume plasma darah sehingga kapasitas oksigen yang dapat dibawa oleh darah meningkat. Dextran ketika digunakan sebagai pengganti plasma fraksi polisakarida harus berada dalam kisaran massa molekul relatif 40.000-100.000 Da. Dextran banyak mengandung ikatan α -1,6 glikosidik sehingga terhidrolisis secara perlahan oleh enzim α -amilase dalam tubuh manusia dibandingkan dengan pati dan glikogen (α -1,4 glikosidik). Hal tersebut menyebabkan dextran memiliki antigenesitas rendah, kelarutan air tinggi, dan stabilitas biologis tinggi dalam darah

yang dibutuhkan dalam pengganti plasma. Dextrans diserap dengan baik ke dalam jaringan tubuh, dan dapat digunakan untuk perawatan yang melibatkan suplai zat besi selama anemia (Naessens dkk., 2005).

2.4 Biosintesis Ekspolisakarida

Jenis mikroorganisme mempengaruhi fase dan kondisi pertumbuhan proses sintesis dalam produksi EPS. Proses sintesis dapat dibagi menjadi dua prinsip, yaitu tempat sintesis dan prekursor alami. EPS yang disintesis oleh bakteri Gram positif (seperti levan, alantan, dan dextran) berbeda dengan EPS yang disintesis oleh bakteri Gram negatif (seperti xanthan, gellan, dan suksinoglikan). Bakteri Gram positif seperti *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* dan *Weissella* mensintesis secara ekstraseluler/homopolisakarida, sedangkan bakteri Gram negatif seperti *Lactococcus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium species* mensintesis EPS secara intraseluler/heteropolisakarida (Guérin dkk., 2020).

Jalur biosintesis EPS secara ekstraseluler/homopolisakarida ditunjukkan pada Gambar 2.1 (Guérin dkk., 2020);



Gambar 2.1 Jalur Biosintesis EPS secara Ekstraseluler (Guérin dkk., 2020)

Proses pembentukan Homopolisakarida (HoPs) dari substrat sukrosa berlangsung di luar sel. Sukrosa dipecah menjadi monomer glukosa dan fruktosa dengan bantuan enzim sukrase *glukansukrase/glukosiltransferase* (gtf) dan *fruktansukrase/ fruktosiltransferase* (ftf). Kemudian energi yang dilepaskan digunakan untuk menggabungkan kembali unit gula sehingga membentuk rantai polisakarida, sedangkan glukosa dan fruktosa yang tidak digunakan pada proses biosintesis EPS digunakan oleh bakteri untuk menghasilkan ATP. Aktivitas enzim gtf akan menghasilkan EPS jenis glukana, sedangkan enzim ftf menghasilkan EPS jenis fruktan.

Biosintesis intraseluler/heteropolisakarida diatur oleh enzim yang terletak pada berbagai bagian sel. Glukosa-1-fosfat dikonversi ke molekul utama pada sintesis eksopolisakarida, uridin difosfat glukosa (UDP-glukosa) di dalam sitoplasma. Setelah itu glikosiltransferase pada membran periplasmik sel mentransfer gula nukleosida difosfat (NDP) untuk membentuk pengulangan unit melekat pada lipid pembawa glikosil. Kemudian makromolekul dipolimerisasi dan disekresikan dalam bentuk eksopolisakarida. Jalur biosintesis EPS secara intraseluler ditunjukkan pada Gambar 2.2 (Vuyst dan Vin, 2007). Proses pembentukan heteropolisakarida (HePs) dari substrat sukrosa berlangsung dalam beberapa tahap. Pada jalur *Phosphoenolpyruvate-phosphotransferase* system (PEP-PTS) sukrosa diubah menjadi sukrosa 6-P dengan bantuan enzim SacB/ScrAL, kemudian dihidrolisis menjadi fruktosa dan glukosa 6-P oleh enzim SacA/ScrB (sukrosa 6-fosfat hidrolase). Fruktosa dan glukosa 6-P yang dihasilkan dapat diubah menjadi fruktosa 6-P oleh katalis enzim SacK/ScrK (6- fruktokinase) dan menjadi glukosamin 6-P oleh katalis enzim Glms (glutamin-fruktosa 6-fosfat

Lule, dkk., (2015) substrat paneer whey (0,047 g/L) dapat menghasilkan EPS sebesar 12,7 g/L dalam produksi EPS oleh *Leuconostoc mesenteroides*. Hasil penelitian Xu, dkk., (2010) menunjukkan dengan menggunakan substrat glukosa sebesar 30 g/L untuk menghasilkan EPS menggunakan isolat *Lactobacillus delbrueckii* B-3. Oksidasi kimia biasanya memberikan energi kepada bakteri. Secara umum bakteri memperoleh nutrisi yang diperlukan selnya untuk mensintesis protoplasma dari berbagai sumber nutrisi seperti sumber karbon (karbohidrat), nitrogen (protein atau amoniak), ion-ion anorganik tertentu, metabolit penting (vitamin, mungkin juga asam amino), dan air (Volk dan Wheeler, 1988).

2. Konsentrasi Substrat

Konsentrasi substrat dapat mempengaruhi kecepatan reaksi enzimatik pada bakteri. Besarnya konsentrasi substrat berbanding lurus dengan kecepatan reaksi enzimatik. Apabila konsentrasi substrat meningkat maka kecepatan reaksi akan meningkat. Peningkatan kecepatan reaksi ini akan semakin kecil hingga tercapai suatu titik batas yang pada akhirnya penambahan konsentrasi substrat hanya akan sedikit meningkatkan kecepatan reaksi (Lehniger, 1997). Hal ini disebabkan oleh semua molekul enzim yang telah membentuk ikatan kompleks dengan substrat sehingga selanjutnya kenaikan konsentrasi substrat tidak berpengaruh terhadap kecepatan reaksinya (Trenggono dan Sutardi, 1990).

Selama proses fermentasi sukrosa merupakan salah satu jenis gula yang menjadi substrat dan dapat dimetabolisme oleh BAL. Sukrosa merupakan sumber karbon yang baik untuk produksi EPS oleh *Weissella confusa* jika dibandingkan dengan glukosa, fruktosa, dan laktosa (Wongsuphachat, 2010). Kadar sukrosa

berbanding lurus dengan kadar EPS hasil produksi. Hal tersebut terjadi karena semakin banyak sukrosa yang tersedia maka semakin banyak pula substrat yang dapat dirombak oleh BAL menjadi asam piruvat yang selanjutnya dapat diubah menjadi asam-asam organik lainnya Sebagai sumber karbon. Penelitian Jin dkk., (2019) menunjukkan produksi EPS oleh *Weissella confusa* VP30 dengan konsentrasi sukrosa 10% sebesar 59,99 g/L. Sedangkan penelitian Zhao dkk., (2020) menunjukkan produksi EPS oleh *Weissella confusa* XG-3 dengan konsentrasi sukrosa 10% sebesar 97,5 g/L.

3. Lama Fermentasi

Lama fermentasi sangat mempengaruhi hasil produksi EPS, hal ini disebabkan karena fermentasi merupakan tahap dalam pembentukan EPS. lama fermentasi merupakan parameter yang sangat berpengaruh terhadap massa molekul, jenis gula penyusun, dan komposisi gula pada EPS (Lin dan Chien, 2005). Beberapa penelitian produksi EPS oleh *Weissella confusa* pada lama fermentasi berbeda ditunjukkan dalam Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Penelitian Terdahulu Produksi Eksopolisakarida dengan Lama Fermentasi yang Berbeda

Literatur	Lama Fermentasi (Jam)	Media	Rendemen (g/L)
Wongsupachat dkk., (2010)	48	MRSB + 4% sukrosa	18,08
Seesurichan dkk., 2014	24	MRSB + 10% sukrosa	63,8
Kavitake dkk., (2016)	48	MRSB + 2% sukrosa	17,2
Tayo dkk., (2018)	16	Media semi sintetis + 5% glukosa	5,5807
Jin dkk., (2019)	48	MRSB + 10% sukrosa	59,99
Lakra dkk., (2020)	36	MRSB + 4% galaktosa dan 1 % amonium nitrat	10,07
Zhao dkk., (2020)	72	MRSB + 10% sukrosa	97,5

Beberapa peneliti juga telah mengkaji pengaruh lama fermentasi terhadap produksi EPS oleh *Weissella confusa*. Tayuan dkk., (2011) melaporkan produksi EPS dari *Weissella confusa* PSMS4-4 dengan variasi lama fermentasi 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 dan 48 jam, diperoleh hasil EPS sebesar 8,65 g/L pada lama fermentasi 30 jam. Dahuni dkk., (2018) melaporkan produksi EPS oleh *Weissella confusa* OF126 dengan lama fermentasi 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, dan 96 jam diperoleh hasil sebesar 3 g/L pada lama fermentasi 48 jam.

4. Konsentrasi Inokulum

Inokulum merupakan biakan bakteri yang dimasukkan ke dalam media cair yang siap digunakan untuk fermentasi (Pelczar dkk., 2008). Kadar inokulum pada fermentasi menunjukkan pengaruh terhadap produk fermentasi, hasil biosintesis EPS dengan variasi inokulum 1,0; 2,5; 5,0; 10; 15; dan 20 mL/L di dapatkan jumlah EPS sebesar 650 mg/L pada konsentrasi inokulum 10 mL/L (Haroun dkk., 2013).

5. Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor penting dalam pertumbuhan mikroba. Suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan denaturasi enzim, sehingga akan mempengaruhi mikroba dan enzim yang dihasilkan. Umumnya enzim berkerja sangat lambat pada suhu di bawah titik beku dan kereaktifannya akan meningkat sampai suhu 45°C. Pada pertumbuhan *Weissella confusa* biasanya digunakan suhu 37°C. Hasil penelitian Jin dkk., (2019) menunjukkan bahwa produksi optimum EPS dari isolat *Weissella confusa* VP30 diperoleh sebesar 59,99 g/L pada suhu 37°C.

6. pH

pH merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi total BAL

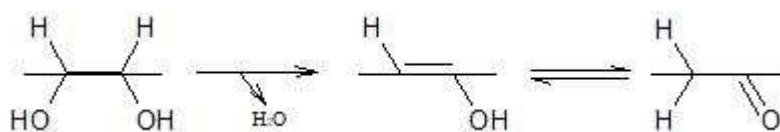
dalam medium fermentasi, total asam laktat dan total eksopolisakarida kasar yang dihasilkan (Zubaidah, dkk., 2008). pH optimum untuk pertumbuhan isolat *Weissella confusa* adalah pada kondisi netral yaitu sekitar 7. Hasil penelitian Adesulu-dahunsi dkk., (2018) menunjukkan bahwa produksi EPS oleh *Weissella confusa* OF126 pada pH 7,0 menghasilkan EPS sebesar 3 g/L. Sedangkan hasil penelitian Jin dkk., (2019) menunjukkan produksi EPS dari isolat *Weissella confusa* pada pH 7,0 sebesar 59,99 g/L.

2.6 Pengukuran Kadar Total Gula dengan Metode Sulfat-Fenol

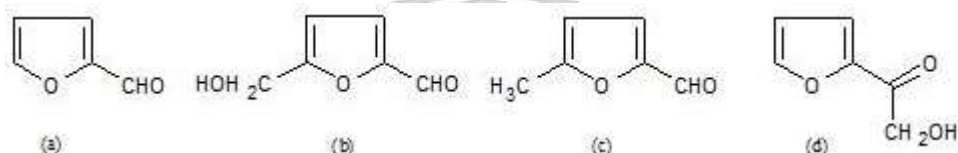
Metode sulfat fenol dapat mengukur konsentrasi sebenarnya dari masing-masing monosakarida, gula pereduksi heksosa maupun pentosa penyusun glikosida, oligosakarida, dan polisakarida. Metode ini dipilih karena memiliki sensitifitas tinggi dan mudah dilakukan. Asam sulfat pekat akan menghasilkan panas yang cukup untuk menghidrolisis semua ikatan glikosidik dari karbohidrat (glikosida, oligosakarida, polisakarida) kemudian bereaksi dengan fenol dan secara kuantitatif menghasilkan warna jingga kekuningan yang menimbulkan absorbansi pada 490 nm. Kurva kalibrasi yang sesuai kemudian dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi monosakarida, disakarida, oligosakarida, dan polisakarida (Saha dan Brewer 1994).

Gula merupakan molekul karbohidrat yang mana ketika ditambahkan asam kuat lalu dipanaskan akan mengalami serangkaian reaksi membentuk derivat furan seperti furanaldehid dan hidroksimetil furaldehid. Reaksi yang terjadi yaitu reaksi dehidrasi karbohidrat (Gambar 2.3) yang diikuti dengan pembentukan

turunan furan (Brummer, 2005). Senyawa turunan furan yang dibentuk dari karbohidrat dapat dilihat pada Gambar 2.4.

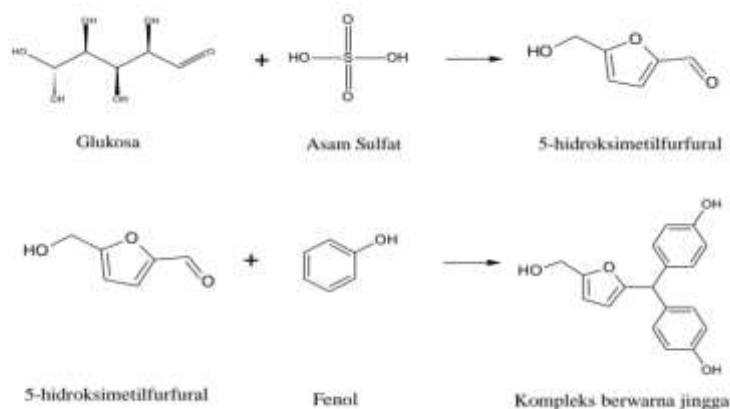


Gambar 2.3 Reaksi Dehidrasi Karbohidrat (Brummer, 2005)



Gambar 2.4 (a) Pentosa (b) Heksosa (c) 6-dioksiheksosa (d) Keto-heksosa (Brummer, 2005)

Prinsip dari metode ini adalah karbohidrat didehidrasi dengan asam sulfat pekat diikuti pembentukan turunan furfural, selanjutnya turunan furfural akan bereaksi dengan fenol menghasilkan warna jingga kekuningan stabil dan dapat dideteksi oleh spektrofotometer UV- Vis. Adanya warna ini diakibatkan oleh reaksi hidrolisis oligosakarida menjadi monosakarida (glukosa, fruktosa dan galaktosa) oleh asam sulfat dan terjadi hidrasi karena panas yang ditimbulkan saat reaksi berlangsung (Albalasmeh dkk., 2013). Reaksi glukosa dengan penambahan fenol dan asam sulfat berjalan secara eksotermik yang ditandai dengan adanya panas yang dihasilkan, reaksi yang terjadi ditunjukkan pada Gambar 2.5 (Lewkowski, 2001);



Gambar 2.5 Reaksi Pembentukan Kompleks Fenol-Furfural (Lewkowski, 2001)

2.7 Spektroskopi *Fourier Transform Infrared* (FTIR)

Spektroskopi *fourier transform infrared* (FTIR) merupakan spektroskopi yang mempelajari interaksi antara sinar inframerah (IR) dengan materi. Spektra IR berhubungan dengan interaksi antara vibrasi molekul oleh radiasi elektromagnetik, yaitu absorpsi radiasi IR tengah oleh materi yang menyebabkan adanya transisi tingkat energi vibrasi. Daerah spektra spektroskopi FTIR berada pada bilangan gelombang $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ (Setianingsih, 2020). Instrumen FTIR ditunjukkan pada Gambar 2.4.

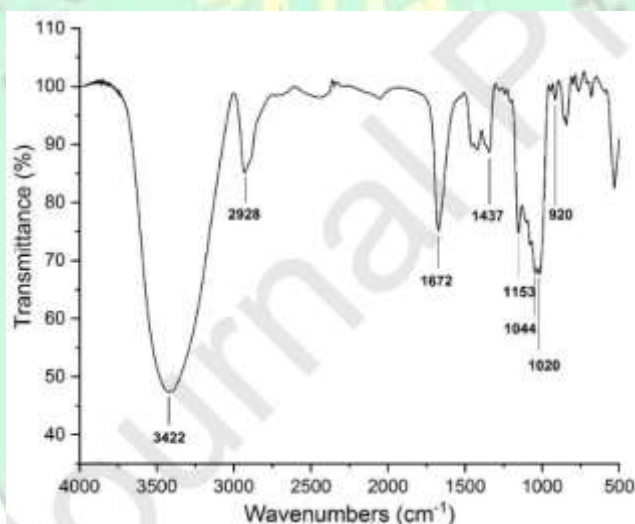


Gambar 2.6 FTIR Varian 1000 FT

Identifikasi menggunakan FTIR berfungsi untuk mengetahui gugus fungsi yang terkandung di dalam sampel. Adanya gugus fungsi ditandai dengan adanya

puncak serapan yang dapat diidentifikasi jenis senyawanya dengan menghitung dan membandingkan panjang gelombang pada tiap puncak. Menurut Sankari (2010) tiap senyawa memiliki pola absobansi yang berbeda-beda, sehingga senyawa tersebut dapat dibedakan dan dikuantifikasikan masing-masing.

Berdasarkan penelitian Lakra dkk., (2020) gugus fungsi EPS yang diperoleh dari *Weissella confusa* menggunakan FTIR (Gambar 2.5) menunjukkan gugus *stretching* O-H hidroksil pada 3422 cm^{-1} , gugus *stretching vibration* C-H pada 2928 cm^{-1} , gugus *stretch* C=O pada 1672 cm^{-1} , gugus *bending vibration* C-H pada 1437 cm^{-1} , gugus *pyranose* dari gula pada 1153 cm^{-1} , gugus C-O-C polisakarida pada 1044 cm^{-1} , dan ikatan α 1-6 glikosidik pada 1020 cm^{-1} .



Gambar 2.7 Spektra FTIR EPS oleh *Weissella confusa* (Lakra dkk., 2020).

2.8 Kromatografi Lapi Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu teknik pemisahan yang menggunakan fasa diam (*stasioner phase*) dan fasa gerak (*mobile phase*) yang berbeda tingkat kepolarannya. KLT merupakan kromatografi planar yang digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang sifatnya hidrofobik seperti

lipida dan hidrokarbon (Sastrohamidjojo, 2001). Fasa diam pada KLT dapat berupa serbuk halus yang berungsi sebagai permukaan penyerap, penyangga, atau lapisan zat cair. Sedangkan untuk fasa gerak dapat berupa hampir segala macam pelarut atau campuran pelarut (Gritter, dkk., 1991). KLT pada umumnya digunakan untuk dua tujuan, pertama sebagai digunakan untuk mencapai hasil kualitatif, kuantitatif dan preparatif. Kedua digunakan untuk menentukan kondisi yang sesuai untuk pemisahan pada kromatografi kolom ataupun kromatografi cair kinerja tinggi (Rollando, 2019).

KLT dapat digunakan untuk analisis kualitatif terhadap suatu senyawa. Identifikasi menggunakan KLT dapat diketahi dengan melihat nilai R_f (*Retardation Factor*). Nilai R_f merupakan nilai yang diperoleh dengan membandingkan jarak yang ditempuh oleh bercak senyawa yang diidentifikasi dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut (jarak pengembang). Dua senyawa dikatakan identik apabila memiliki R_f yang sama jika diukur pada kondisi KLT yang sama (Rollando, 2019).

Nilai maksimum untuk R_f adalah 1, sampel yang bermigrasi memiliki kecepatan sama dengan eluen. Nilai minimum R_f adalah 0, teramati jika sampel tertahan pada posisi titik awal dipermukaan fase diam. Nilai R_f untuk senyawa-senyawa yang murni dapat dibandingkan dengan nilai R_f standar. Nilai R_f yang diperoleh hanya berlaku untuk campuran tertentu dari pelarut dan penyerap yang digunakan (Gandjar dan Abdul 2007).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2021 – Mei 2022 di Laboratorium Bioteknologi Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas beker 500 mL, pipet ukur 5 mL dan 10 mL, pipet tetes, gelas ukur 100 mL, erlenmeyer 250 mL, labu ukur 10 mL, 25 mL, dan 100 mL, bola hisap, botol semprot, spatula, gelas arloji, batang pengaduk, korek api, bunsen spiritus, jarum ose, corong gelas, penangas air, mikro pipet, *blue tip*, *yellow tip*, *hot plate*, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung, tabung *sentrifuge*, *sentrifuge*, *magnetic stirrer*, *autoclave*, *shaker incubator*, lemari asam, lemari pendingin, *laminar air flow*, *vortex*, oven, spektrofotometer UV-Vis, spektrofotometer FTIR, lampu UV, dan chamber.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Weissella confusa* dari stok laboratorium bioteknologi jurusan kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, media *De Man Ragosa dan Sharpe Agar* (MSRA) (Merck), akuades, akuabides sukrosa (HiMedia), pepton, ekstrak ragi, K_2HPO_4 , mannos, n-butanol (Merck), H_2SO_4 96% (Mallinckrodt), glukosa (merck), fruktosa (HiMedia)

CaCl₂.2H₂O, MgSO₄.7H₂O, NaCl, NaOH 0,1 N, HCl 0,1 N, alkohol 70%, fenol 5%, H₂SO₄ 1 M, etanol (Mallinckrodt), plat KLT silika gel GF 254 (Merck), spiritus, aluminium foil, kertas saring, plastik tahan panas (*wrap*), kertas label, *blue tip*, tisu, dan kapas.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama fermentasi terhadap produksi eksopolisakarida (EPS) oleh *Weissella confusa*. Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal yaitu lama fermentasi dengan variasi (L1=12 jam, L2=24 jam, L3=36 jam, L4=48 jam, dan L5=60 jam) dengan pengulangan sebanyak tiga kali (*triplo*). Analisis dalam penelitian ini meliputi rendemen, jumlah bakteri setelah fermentasi, kadar total gula, identifikasi gugus fungsi polisakarida dengan *Fourier transform Infrared Spectroscopy* (FTIR), dan identifikasi profil monomer gula penyusun EPS dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA).

3.4 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian kali ini yaitu:

1. Pembuatan Media
 - 1.1 Media *de man rogosa and sharpe agar* (MRSA)
 - 1.2 Media *de man rogosa and sharpe broth* (MRSB)
 - 1.3 Media produksi eksopolisakarida
2. Sterilisasi alat dan media
3. Regenerasi bakteri *Weissella confusa*

4. Pembuatan inokulum
5. Produksi eksopolisakarida oleh *Weissella confusa*
6. Ekstraksi eksopolisakarida
7. Pengukuran *Total Plate Count* (TPC)
8. Penentuan kadar total gula dengan metode sulfat fenol
 - 7.1 Pembuatan kurva standar
 - 7.2 Penetapan kadar total gula eksopolisakarida
9. Identifikasi Gugus Fungsi Eksopolisakarida dengan *fourier transform infrared* (FTIR)
10. Identifikasi monomer eksopolisakarida dengan dengan lapis tipis analitik (KLTA)
11. Analisis data

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Pembuatan Media

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

MRS Agar ditimbang Sebanyak 6,82 gram, dilarutkan ke dalam 100 mL aquades, dihomogenkan dengan *hot plate* dan *magnetic stirrer* sampai homogen dan mendidih. Larutan tersebut kemudian dituangkan sebanyak masing-masing 5 mL ke dalam tabung reaksi dan ditutup memakai *cotton plug* (sumbat kapas) dan plastik wrap, dilanjutkan dengan sterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C tekanan 15 psi selama 20 menit. Kemudian disimpan pada cetakan papan miring sampai memadat. Media MRSA padat ini digunakan untuk regenerasi bakteri.

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

MRSB ditimbang Sebanyak 5,22 gram, dilarutkan ke dalam 100 mL aquades, dihomogenkan dengan *hot plate* dan *magnetic stirrer* sampai homogen dan mendidih. Larutan tersebut kemudian dituangkan sebanyak masing-masing 25 mL ke dalam botol kaca dan ditutup memakai *cotton plug* (sumbat kapas) dan plastik wrap, dilanjutkan dengan sterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C tekanan 15 psi selama 20 menit. Media MRSB ini digunakan untuk pembuatan inokulum.

3.5.1.3 Media Produksi Eksopolisakarida (Dharmik dan Narkhede 2020)

Media produksi eksopolisakarida dibuat dengan menimbang sukrosa 10 gram, pepton 0,5 gram, ekstrak ragi 0,5 gram, K_2HPO_4 1,5 gram, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,005 gram, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 gram, dan NaCl 0,001 gram kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquades. Media kemudian dipanaskan hingga mendidih sambil distirer hingga larut. Media tersebut kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL dan disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C tekanan 15 psi selama 20 menit.

3.5.2 Sterilisasi Alat dan Media

Alat gelas yang digunakan dalam penelitian dicuci bersih dan dikeringkan. Alat yang sudah bersih dan media yang telah dibuat kemudian dibungkus plastik tahan panas lalu dilakukan sterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C tekanan 15 psi selama 20 menit.

3.5.3 Regenerasi Bakteri *Weissella confusa*

Kultur diambil tiga ose dan ditumbuhkan pada 5 mL media MRSA padat posisi miring, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Kultur tersebut dapat langsung digunakan dan diremajakan setiap dua minggu sekali. *Weissella confusa* yang telah diremajakan digunakan untuk pembuatan stok inokulum.

3.5.4 Pembuatan Inokulum Bakteri (Ma'unatin dkk., 2020)

Pembuatan inokulum dilakukan dengan memindahkan 3 ose biakan *Weissella confusa* ke dalam 25 mL media MRSB, kemudian dishaker pada kecepatan 100 rpm dengan suhu ruang selama 16 jam. Kekeruhan inokulum sel *Weissella confusa* yang digunakan disetarakan dengan *optical density* (OD) 0,5 pada panjang gelombang 600 nm.

3.5.5 Produksi Eksopolisakarida oleh *Weissella confusa* (Seesuriyachan dkk., 2014, termodifikasi)

Inokulum *Weissella confusa* diambil 5 mL (5% v/v) kemudian disentrifugasi pada suhu 4°C kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Sel bakteri diambil dan dimasukkan kedalam 100 mL media produksi yang sudah dibuat. Media yang sudah diinokulasi kemudian di inkubasi pada suhu ruang selama variasi lama waktu fermentasi (L1=12 jam, L2=24 jam, L3=36 jam, L4=48 jam, dan L5=60 jam) dan dishaker pada 100 rpm.

3.5.6 Ekstraksi Eksopolisakarida dari Media Fermentasi (Seo dkk., 2015, termodifikasi)

Media produksi hasil fermentasi diambil sebanyak 50 mL dan disentrifugasi 10 menit. Supernatan ditambah etanol dingin 95% (2 kali volume) serta didiamkan pada suhu 4°C selama 24 jam. Supernatan disentrifugasi pada suhu 4°C kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Endapan EPS yang didapat kemudian dipisahkan dan dikeringkan pada suhu 60°C selama 7 jam. Rendemen EPS kering ditentukan dengan menggunakan persamaan berikut;

$$\text{Rendemen EPS } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Berat eksopolisakarida kering (G)}}{\text{Volume (L)}} \dots\dots\dots (3.1)$$

EPS kering yang diperoleh dengan rendemen tertinggi kemudian diambil dan dilanjutkan untuk di uji kadar total gula, gugus fungsi, dan profil monomer penyusunnya.

3.5.7 Pengukuran *Total Plate Count* (TPC) (Ferdiaz 1989, termodifikasi)

Pengukuran TPC dilakukan menggunakan metode tuang. Kultur bakteri diambil sebanyak 1 mL lalu diinokulasikan ke dalam NaCl fisiologis 0,85% dengan pengenceran bertingkat 10^{-1} - 10^{-8} . Inokulum kemudian ditanam sebanyak 0,1 mL dalam media MRSA mulai dari pengenceran 10^{-5} - 10^{-8} dan di inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Pertumbuhan koloni pada setiap cawan dicatat kemudian dihitung menggunakan *American Standart Testing and Methode* (ASTM) dengan rentan bakteri hitung 30-300 koloni. Jumlah koloni tumbuh kemudian dihitung menggunakan persamaan berikut;

$$\text{Jumlah mikroba hidup (CFU/mL)} = \frac{\text{Jumlah koloni} \times \text{Faktor pengenceran (fp)}}{10} \dots\dots (3.2)$$

3.5.8 Penentuan Kadar Total Gula dengan Metode Sulfat-Fenol (Dubois dkk., 1956)

3.5.8.1 Pembuatan Kurva Standar

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

3.5.8.2 Penetapan Kadar Total Gula Eksopolisakarida

Sampel EPS sebanyak 0,01 g dilarutkan ke dalam 250 mL aquades dan dihomogenkan, larutan homogen diambil sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 mL larutan fenol 5% (b/v) dan dikocok. Selanjutnya ditambahkan 5 mL asam sulfat pekat dengan cepat di lemari asap. Dibiarkan selama 10 menit, dikocok lalu ditempatkan dalam penangas air dengan suhu 100°C selama 15 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm.

3.1.9 Identifikasi Gugus Fungsi Eksopolisakarida dengan *Fourier transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) (Dahuni dkk., 2018)

Sampel EPS diambil 1 mg dan dihaluskan dengan 250 mg KBr kemudian ditekan dalam cetakan hingga diperoleh pelet KBr. Selanjutnya sampel dianalisis dengan FTIR pada frekuensi 4000-400 cm⁻¹. Data yang diperoleh melalui uji FTIR berupa gugus fungsional atau jenis ikatan tertentu pada bilangan gelombang tertentu.

3.1.10 Identifikasi Monomer Eksopolisakarida dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) (Trabelsi dkk., 2015)

Sampel EPS ditimbang sebanyak 0,2 gram, selanjutnya dilarutkan dalam aquabides 1:10 (b/v) dan didialisis dengan menggunakan kantong membran semipermeabel 14 kDa dalam akuabides pada suhu 2°C selama 24 jam dengan 2 kali pergantian. Kemudian hasil dialisis dikeringkan pada suhu 60°C selama 3 jam. EPS murni sebanyak 2,5 mg dihidrolisis dengan 500 µL asam sulfat 1 M pada suhu 100°C selama 2 jam (Geel-Schutten dkk., 1998). Selanjutnya dilakukan pengenceran dengan aquabides (1:5) dan sampel digunakan untuk KLTA. Disiapkan plat KLT dari silika gel dengan ukuran 7 x 10 cm, kemudian diberi tanda garis bawah dan atas masing-masing 1 cm lalu diaktifasi plat pada suhu 105°C selama 30 menit. Disiapkan eluen dengan campuran n-butanol:etanol:air (2:1:1) dan dijenuhkan dalam bejana pengembang selama 4 jam.

Hasil elusi dikering anginkan kemudian disemprot dengan reagen larutan etanol yang mengandung 5% α -naftol dan 5% asam sulfat. Setelah dilakukan penyemprotan (perlakuan penyemprotan diulang-ulang), selanjutnya plat dioven pada suhu 120°C selama 10 menit sampai noda muncul dengan intensitas maksimum (Vettori dkk., 2012). Setelah noda terlihat, maka diukur Rf dan dibandingkan dengan standar glukosa, fruktosa, dan mannosa hasil hidrolisis untuk mengetahui senyawa penyusun EPS terpilih. Nilai Rf ditentukan menggunakan Persamaan 3.2.

$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{Jarak tempuh dari komponen}}{\text{jarak tempuh dari pelarut}} \dots\dots\dots (3.3)$$

3.5.11 Analisis data

Data rendemen dan *total plate count* (TPC) yang diperoleh kemudian dianalisis dengan ragam varian *One Way* ANOVA. Apabila terdapat adanya pengaruh, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan signifikansi 5%. Sedangkan data yang diperoleh dari FTIR dan KLT diinterpretasikan dengan bilangan gelombang dan nilai Rf standar yang didapat.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembuatan Media

Media merupakan sumber nutrisi yang dibutuhkan bakteri selama proses pertumbuhan/fermentasi. *De man rogosa and sharpe* (MRS) adalah media kompleks semi sintesis selektif yang baik sebagai pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL) dan dapat memberikan hasil yang baik dalam perhitungan koloni serta morfologi bakteri (Man, 1960). Media MRS memiliki kandungan berupa glukosa, tripton, yeast extract, beef extract, KH_2PO_4 , natrium asetat anhidrat, ammonium sitrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Tween 80 (Du dkk., 2017). Media ini dibedakan menjadi dua yaitu *de man rogosa and sharpe agar* (MRSA) dan *de man rogosa and sharpe broth* (MRSB). MRSA dan MRSB memiliki perbedaan kandungan agar dalam MRSA yang menyebabkan fasa padat ketika media dingin (Man, 1960).

MRSA digunakan untuk proses isolasi, regenerasi, dan memberi nutrisi BAL dalam fasa padat (Khairunnisa dan Pato 2016), sedangkan MRSB digunakan untuk regenerasi, memberi nutrisi, dan pembuatan inokulum dalam fasa cair (Murwani 2015). Selain MRSA dan MRSB digunakan juga media produksi yang digunakan untuk memproduksi EPS. Penelitian ini menggunakan media produksi alternatif selain media MRS berupa media campuran semi sintesis.

Media produksi yang digunakan merupakan media alternatif berupa semi sintesis. Media ini dipilih karena memiliki biaya produksi yang murah dibandingkan media MRSB dan kandungan didalamnya yang dapat di kontrol

dengan sangat baik dibandingkan media bahan alam. Nutrisi yang terkandung dalam media semi sintesis juga tidak lebih lengkap dibandingkan media MRSB, sehingga dapat memberi cekaman pada bakteri. Penelitian Abid dkk., (2018) melaporkan bahwa EPS dihasilkan oleh BAL berfungsi untuk melindungi sel bakteri dari kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan sebagai bentuk pertahanan diri, sehingga suasana lingkungan yang kurang akan nutrisi dapat menyebabkan produksi EPS oleh bakteri meningkat. Komposisi media produksi yang digunakan mengikuti penelitian Dharmik dan Narkhede (2020) media ini dipilih karena memiliki kesamaan sumber karbon yang digunakan untuk memproduksi EPS berupa sukrosa. Komposisi media yang digunakan yaitu pepton 5 g/L, ekstrak ragi 5 g/L, K_2HPO_4 15 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,05 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 g/L, NaCl 0,01 g/L dan sukrosa 100 g/L (10%). Semua media dibuat dengan cara dilarutkan dengan akuades sampai larut sempurna, kemudian ditutup rapat dan dibungkus plastik tahan panas untuk selanjutnya dilanjutkan dengan sterilisasi media beserta alat.

Media beserta alat gelas disterilkan menggunakan *autoclave* untuk membunuh mikroorganisme yang berada pada alat dan media karena dapat mempengaruhi hasil akhir penelitian. Sterilisasi menggunakan *autoclave* didasarkan pada prinsip menguapkan air bertekanan untuk sterilisasi. Suhu $121^\circ C$ yang digunakan akan menghasilkan tekanan sebesar 15-17,5 psi yang mana pada kondisi tersebut mikroorganisme dapat mati. Berdasarkan Jacquely dan Black (2008) kondisi tersebut merupakan kondisi yang baik untuk sterilisasi karena dapat membunuh sebagian besar bakteri, jamur, dan menonaktifkan beberapa virus.

4.2 Regenerasi Bakteri *Weissella confusa*

Regenerasi bakteri merupakan suatu proses menumbuhkan bakteri kedalam media baru. Regenerasi bakteri dilakukan untuk memperbarui nutrisi serta meremajakan sel bakteri, sehingga sel bakteri dapat melakukan fermentasi secara optimal dan dapat bertahan hidup selama masa penyimpanan. Regenerasi bakteri secara berkala penting dilakukan guna memelihara kestabilan genetik dari sel bakteri (Machmud, 2001). Menurut Charlena dkk., (2009) menyatakan bahwa regenerasi bakteri berguna untuk mengaktifkan kembali bakteri yang telah inaktif akibat penyimpanan pada lemari pendingin, sehingga bakteri dapat menghasilkan enzim secara optimal dalam proses metabolismenya dan dapat digunakan untuk pembuatan inokulum.

Regenerasi *Weissella confusa* dilakukan menggunakan media MRSA dengan metode gores. Media MRSA dipilih untuk penyimpanan bakteri karena dalam media tersebut bakteri dapat dimanfaatkan untuk penanaman pembuatan inokulum dan pertumbuhan bakteri mudah diamati (Wuryanti dkk., 2012). Regenerasi bakteri dilakukan secara aseptis di dalam *laminar air flow* (LAF) menggunakan kawat ose yang telah dipanaskan di atas bunsen untuk membunuh kontaminan bakteri. Stok *Weissella confusa* di inokulasikan sebanyak tiga ose pada media MRSA padat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Hasil regenerasi ditandai dengan tumbuhnya bakteri berwarna putih pada permukaan media sesuai dengan goresan yang dibuat (Gambar 4.1).

Gambar 4.1 Hasil regenerasi bakteri *Weissella confusa*

4.3 Pembuatan Inokulum *Weissella confusa*

Pembuatan inokulum bertujuan untuk memproduksi bakteri dalam fase eksponensial sebagai starter yang siap digunakan dalam proses fermentasi. Pembuatan inokulum dilakukan dengan cara mengambil 3 ose biakan bakteri ke dalam media MRSB secara aseptis lalu diinkubasi shaker pada suhu ruang kecepatan 100 rpm selama 16 jam. Proses inkubasi shaker dilakukan untuk memproduksi sel bakteri pada fase eksponensial yang siap digunakan dalam proses fermentasi.

Menurut Mangrove dkk., (2015) fase eksponensial BAL ditandai dengan terbentuknya kekeruhan pada inokulum akibat adanya suspensi bakteri pada lama inkubasi 16-18 jam. Pada fase ini, jumlah pertumbuhan sel lebih banyak dari jumlah kematiannya, aktivitas metabolisme sel terjadi pada keadaan optimum dan sel mudah terpengaruh oleh faktor lingkungan (Maier, 2009). Menurut Abid dkk., (2018) ketika memasuki fase logaritma/eksponensial terjadi peningkatan biomassa pada bakteri hingga jam ke 16-18, kemudian bakteri memasuki fase stasioner pada jam ke 18-34, dan memasuki fase kematian pada jam ke 34.

Inokulum *Weissella confusa* yang didapatkan diukur nilai *Optical density* (OD) untuk mengetahui jumlah bakteri yang terkandung dalam inokulum. Nilai OD yang semakin besar menunjukkan bahwa jumlah bakteri yang terdapat di dalam inokulum semakin banyak. Setelah diketahui nilai OD-nya kemudian dilakukan penyetaraan OD inokulum sebesar 0,5 dengan cara diencerkan menggunakan media MRSB. Penyetaraan OD 0,5 dilakukan untuk stabilitas jumlah bakteri yang digunakan pada proses fermentasi disetiap pengulangan.

Inokulum *Weissella confusa* dalam penelitian ini menggunakan OD 0,5 yang setara dengan jumlah bakteri $1,4 \times 10^9$ CFU/mL (Chalim 2021).

4.4 Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Produksi Eksopolisakarida oleh *Weissella confusa*

Produksi Eksopolisakarida (EPS) oleh *Weissella confusa* dalam penelitian ini dilakukan menggunakan media alternatif semi sintetis. Media tersebut dipilih karena memiliki beberapa kelebihan seperti harga yang terjangkau dibandingkan media MRS dan nutrisi di dalam media dapat diukur secara akurat dibandingkan media organik. Penelitian ini menggunakan penambahan sukrosa sebesar 10% sebagai sumber karbon selama proses fermentasi. Menurut Wongsuphachat dkk., (2010) sukrosa merupakan sumber karbon yang baik untuk produksi EPS oleh *Weissella confusa* jika dibandingkan dengan glukosa, fruktosa, dan laktosa. Kandungan sukrosa 10% dipilih karena menurut Jin dkk., (2019) dan Zhao dkk., (2020) merupakan konsentrasi terbaik dalam produksi EPS oleh *Weissella confusa*.

Produksi EPS oleh *Weissella confusa* pada media alternatif dilakukan dengan variasi lama fermentasi. Hal ini bertujuan untuk mengetahui lama fermentasi optimum *Weissella confusa* dalam memproduksi EPS, variasi lama fermentasi yang digunakan yaitu 12, 24, 36, 48, dan 60 jam. Menurut Lin dan Chien (2007) lama fermentasi dapat mempengaruhi produksi EPS karena berpengaruh terhadap massa molekul, jenis gula penyusun, dan komposisi gula EPS dalam tahap pembentukan EPS. Inokulum *Weissella confusa* sebesar 5% ditambahkan pada media produksi dan diinkubasi shaker pada suhu ruang selama variasi lama fermentasi untuk memproduksi EPS. Variasi ini diperlukan untuk mengetahui bagaimana pertumbuhan bakteri dalam menghasilkan EPS pada fase logaritma,

eksponensial, dan stasioner. Shaker dibutuhkan untuk memberi energi kinetik pada bakteri sehingga terjadi cekaman yang menyebabkan produksi EPS oleh bakteri meningkat.

EPS yang dihasilkan setelah proses fermentasi masih mengandung sel bakteri sehingga perlu dipisahkan. Pemisahan filtrat dari sel tersebut dilakukan dengan sentrifugasi, sehingga sel akan mengendap dan dapat dipisahkan. Filtrat yang diperoleh kemudian diekstrak EPSnya dengan menambahkan etanol dingin 95% sebanyak dua kali volume dan didiamkan pada suhu 4°C selama 24 jam. Etanol berfungsi untuk memisahkan EPS dari air karena memiliki konstanta dielektrik yang lebih rendah dari pada air, sedangkan polisakarida yang memiliki banyak gugus hidroksil yang memberikan karakteristik polar pada EPS. Sehingga kenaikan konsentrasi etanol dalam larutan dapat menyebabkan penurunan kelarutan polisakarida dan terjadi pengendapan EPS (Klinchongkon dkk., 2019). EPS yang terbentuk kemudian dikeringkan pada suhu 60°C untuk menghilangkan pelarut yang masih menempel. EPS yang dihasilkan merupakan padatan berwarna putih kekuningan dan ditunjukkan pada Gambar 4.2.

Gambar 4.2 Eksopolisakarida kering oleh *Weissella confusa*

Produksi EPS oleh BAL dipengaruhi oleh kondisi lingkungan yang merugikan seperti stres osmotik. Penelitian Nguyen dkk., (2020) melaporkan stres osmotik menyebabkan hilangnya tekanan turgor sel dan perubahan konsentrasi zat terlarut intraseluler dalam bakteri, sehingga bakteri mensintesis EPS untuk melindungi diri dan mencegah dehidrasi sel. Konsentrasi sukrosa yang tinggi dalam penelitian ini digunakan untuk meningkatkan tekanan osmotik sehingga

produksi EPS lebih banyak. Selain itu sukrosa dapat digunakan oleh bakteri sebagai sumber karbon pembentukan EPS oleh bakteri.

Biosintesis EPS oleh *Weissella confusa* terjadi karena adanya aktivitas enzim sukrase *glukansukrase/glukosiltransferase* (gtf) menghasilkan EPS jenis glukukan. Enzim tersebut akan memecah substrat sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa lalu energi yang dilepaskan digunakan untuk menggabungkan kembali unit gula glukosa sehingga membentuk rantai polisakarida, sedangkan fruktosa yang tidak digunakan pada proses biosintesis EPS digunakan oleh bakteri untuk menghasilkan ATP (Angelin dan Kavitha 2020). Hasil produksi EPS ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Produksi eksopolisakarida oleh *Weissella confusa*

Berdasarkan Tabel 4.1 menunjukkan bahwa rendemen EPS meningkat seiring bertambahnya lama fermentasi hingga produksi tertinggi terjadi pada lama fermentasi 36 jam sebesar 10,412 g/L kemudian mengalami penurunan. Lama fermentasi 12 jam menunjukkan jumlah bakteri sebesar $1,4 \times 10^9$ CFU/mL karena lama fermentasi tersebut merupakan awal fase logaritma, pada fase ini bakteri banyak memproduksi asam laktat dan melakukan regenerasi sel yang tinggi sehingga EPS yang dihasilkan rendah. Lama fermentasi 24 jam menunjukkan jumlah bakteri sebesar $4,5 \times 10^{10}$ CFU/mL karena lama fermentasi tersebut menuju awal fase stasioner, pada fase ini jumlah bakteri meningkat dan mulai menghasilkan EPS. Lama fermentasi 36 jam menunjukkan jumlah bakteri sebesar $6,5 \times 10^8$ CFU/mL dengan hasil tertinggi dalam produksi EPS. Lama fermentasi tersebut merupakan fase stasioner yang optimal dalam menghasilkan EPS pada

penelitian ini. Setelah 36 jam produksi EPS mengalami penurunan bersamaan dengan jumlah bakteri, hal ini terjadi karena pada 48 dan 60 jam bakteri memasuki fase kematian, sehingga EPS dapat didegradasi oleh enzim yang dihasilkan bakteri dan dimanfaatkan kembali sebagai sumber karbon dalam proses metabolisme.

Penelitian Pham dkk., (2000) melaporkan produksi optimum EPS oleh BAL terjadi pada fase stasioner menuju fase kematian, sedangkan pada fase eksponensial BAL banyak memproduksi asam laktat. Giyatno dan Ratnaningrum (2020) menjelaskan pada fase stasioner bakteri mulai kekurangan nutrisi sehingga menghasilkan metabolit sekunder berupa EPS untuk melindungi sel dari kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan. Menurut Abid dkk., (2018) selama 4 jam pertama waktu inokulasi bakteri memasuki fase lag yaitu fase penyesuaian bakteri dalam media baru, setelah itu memasuki fase logaritma/eksponensial bakteri terjadi peningkatan biomassa hingga jam ke 16-18, kemudian jam ke 18-34 bakteri memasuki fase stasioner, dan memasuki fase kematian pada jam ke 34.

Hasil penelitian ini serupa dengan Tayuan, (2011) yang melaporkan bahwa lama fermentasi 30 jam menghasilkan EPS sebesar 8,65 g/L dan penelitian Lakra dkk., (2020) bahwa lama fermentasi 36 jam dalam media MRSB menghasilkan EPS sebesar 10,07 g/L. Penelitian ini juga memiliki hasil yang lebih tinggi dari penelitian Tayo dkk., (2018) menggunakan media MRSB dengan produksi sebesar 5,5807 g/L dan penelitian Dahunsi dkk., (2018) menggunakan media MRSB termodifikasi menghasilkan EPS 3 g/L.

Berdasarkan uji *One Way* ANOVA menunjukkan terdapat perbedaan signifikan lama fermentasi terhadap rendemen EPS oleh *Weissella confusa* dengan nilai F hitung sebesar 29,631 lebih besar dari F tabel yaitu 4,60 dengan probabilitas

(Sig.) sebesar 0,000 (Sig<0,05). Lama fermentasi 36 jam menunjukkan nilai yang berbeda nyata dengan lama fermentasi lainnya. Lama fermentasi 12 dan 60 jam tidak berbeda nyata namun berbeda nyata dengan lama fermentasi lainnya. Lama fermentasi 12 dan 48 jam tidak berbeda nyata namun berbeda nyata dengan lama fermentasi lainnya. Lama fermentasi 24 dan 48 jam tidak berbeda nyata namun berbeda nyata dengan lama fermentasi lainnya. Uji *One Way* ANOVA juga menunjukkan terdapat perbedaan signifikan lama fermentasi terhadap pertumbuhan bakteri *Weissella confusa* dengan nilai F hitung sebesar 8,339 lebih besar dari F tabel yaitu 4,60 dengan probabilitas (Sig.) sebesar 0,003 (Sig<0,05). Lama fermentasi 24 jam menunjukkan nilai yang berbeda nyata dengan lama fermentasi lainnya, sedangkan lama fermentasi 12, 36, 48, dan 60 jam tidak berbeda nyata.

4.5 Analisis Kadar Total Gula Eksopolisakarida

Analisis kadar total gula Eksopolisakarida (EPS) dilakukan untuk mengukur kandungan gula dari EPS yang dihasilkan. Sehingga analisis ini dapat digunakan untuk mengetahui kemurnian EPS. Menurut Patel dkk., (2012) EPS merupakan suatu polisakarida yang tersusun atas polimer gula pereduksi. Sehingga semakin tinggi kadar gula EPS menunjukkan tingkat kemurniannya semakin tinggi.

Pengukuran kadar total gula EPS dilakukan menggunakan metode sulfat-fenol. Metode ini dipilih karena dapat mengukur konsentrasi sebenarnya dari monosakarida, disakarida, oligosakarida, dan polisakarida dengan menghitung tiap monosakarida penyusunnya yang terkandung dalam EPS. Pengukuran total gula

EPS diawali dengan pembuatan kurva standar glukosa sebagai acuan menentukan kadar total gula EPS. Kurva standar glukosa ditunjukkan pada Gambar 4.3.

Gambar 4.3 Kurva standar glukosa

Analisis kadar total gula EPS dilakukan dengan dengan melarutkan EPS dalam akuades kemudian ditambahkan fenol dan asam sulfat pekat lalu diuji absorbansinya menggunakan UV-Vis pada panjang gelombang 490 nm. Penambahan fenol berfungsi untuk membentuk kompleks senyawa berwarna jingga. Perubahan warna jingga disebabkan oleh fenol yang berkondensasi dengan senyawa furfural dari monomer gula hasil degradasi polisakarida oleh asam sulfat yang telah mengalami pemanasan (Poedjiadi dan Supriyanti, 2012). Intensitas warna yang dihasilkan berbanding lurus dengan kadar karbohidrat dalam sampel, reaksi dehidrasi polisakarida ditunjukkan pada Gambar 2.3. Reaksi polisakarida EPS dalam metode ini ditunjukkan pada Gambar 4.4.

Gambar 4.4 Reaksi Polisakarida dalam Metode Sulfat-Fenol (Viel dkk., 2018)

Analisis kadar total gula EPS dilakukan pada variasi lama fermentasi terpilih (36 jam). Hasil analisis kadar total gula EPS terpilih yaitu 91,77%. EPS diproduksi dari proses polimerisasi gula sehingga gula merupakan sumber karbon penyusun utama EPS, oleh karena itu kadar total gula yang tinggi menunjukkan bahwa EPS memiliki kemurnian yang tinggi juga. Berdasarkan hasil pengukuran tersebut EPS yang dihasilkan dalam penelitian ini menunjukkan kadar kemurnian yang tinggi namun belum mencapai 100% karena masih terdapat pengotor yang menempel pada EPS. Penelitian Maunatin dkk., (2022) melaporkan terdapat

protein yang menempel pada EPS sebagai pengotor. Serupa dengan penelitian Wongsuphachat dkk., (2010) yang melaporkan bahwa kadar gula EPS dipengaruhi oleh pengotor seperti protein yang menempel pada EPS, spesies BAL, media, suhu, substrat, dan aktivitas enzim intervasse.

4.6 Analisis Gugus Fungsi Ekso polisakarida dengan Spektrosotometer FTIR

Identifikasi gugus fungsi EPS menggunakan FTIR dilakukan pada EPS terpilih yang dihasilkan pada lama fermentasi dengan produksi tertinggi yaitu 36 jam (L36). Berdasarkan gugus fungsinya spektra IR polisakarida umumnya terdapat dalam lima wilayah spektra yaitu vibrasi regangan OH pada 3600-3000 Cm^{-1} ; regangan ikatan rangkap *doublet* COO- pada 1800-1500 Cm^{-1} dan pita air pada 1635 Cm^{-1} ; vibrasi gugus dengan simetri lokal (CH_2 dan C-OH) pada 1500-1200 Cm^{-1} ; ikatan glikosidik pada 1200-800 Cm^{-1} ; dan vibrasi daerah kerangka karbohidrat pada panjang gelombang dibawah 800 Cm^{-1} (Hong dkk., 2021). Hasil analisis FTIR dari EPS L36 tersebut ditunjukkan pada Gambar 4.5.

Gambar 4.5 Spektra FTIR EPS oleh *Weissella confusa*

Berdasarkan Tabel 4.2 EPS yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* secara spesifik memiliki pita serapan 3471,76; 3430,45 cm^{-1} yang menunjukkan adanya vibrasi regangan OH hidroksil yang melimpah, pita serapan 1647,89 Cm^{-1} ikatan rangkap *doublet* COO- menunjukkan karakteristik polisakarida pektik, pita serapan 1458,13 Cm^{-1} menunjukkan ikatan C=C (aromatik) dan vibrasi gugus simetri lokal $\text{CH}_2/\text{C-OH}$, pita serapan 1113,48; 1071,48; dan 855,44 C-H Cm^{-1} (alkana); 993,50 dan 930,25 Cm^{-1} CH=CH₂ (alkena) menunjukkan adanya ikatan glikosidik pada

polisakarida, pita serapan $668,88 \text{ Cm}^{-1}$ C-H (alkana); $619,20 \text{ Cm}^{-1}$ (alkuna); dan $537,89 \text{ Cm}^{-1}$ (alkilhalida) menunjukkan daerah kerangka yang berhubungan dengan vibrasi karbohidrat. Penelitian Iqbal dkk., (2017) melaporkan bahwa pada panjang gelombang $1008,2-993,3 \text{ Cm}^{-1}$ menunjukkan adanya ikatan α 1-6 glikosidik. Hal serupa juga dilaporkan oleh Dilna dkk., (2015) dan Lakra dkk., (2020) bahwa pada panjang gelombang 1024 dan 1020 Cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan α 1-6 glikosidik yang merupakan ikatan khas dari EPS jenis dekstran.

Tabel 4.2 Gugus fungsi Spektra FTIR *Weissella confusa*.

4.7 Analisis Profil Monomer Eksopolisakarida dengan Kromatografi Lapis Tipis Analisis (KLTA)

Jenis mikroorganisme yang menghasilkan eksopolisakarida (EPS) mempengaruhi jenis monomer gula penyusun EPS tersebut. Identifikasi monomer penyusun EPS oleh penting dilakukan untuk mengetahui profil gula penyusunnya. Sehingga EPS yang dihasilkan dapat dimanfaatkan sesuai kegunaannya masing-masing (Sanalibaba dan Cakmak 2016). Spesies bakteri dan kondisi media pertumbuhan dapat mempengaruhi komposisi monomer gula dan substituen non karbohidrat yang menyusun EPS, sehingga EPS yang diproduksi oleh bakteri asam laktat memiliki struktur yang berbeda-beda.

EPS terpilih yang digunakan pada analisis profil gula yaitu variasi lama fermentasi 36 jam (L36). Sebelum dilakukan analisis EPS terpilih dimurnikan dari substituen non karbohidrat penyusunnya dengan cara dialisis menggunakan membran selofan 14 kDa dan dihidrolisis menggunakan asam sulfat 1 M. Proses dialisis dilakukan pada suhu dingin untuk mencegah terjadinya kerusakan pada

EPS. Dialisis didasarkan pada prinsip difusi, yaitu peristiwa terjadinya perpindahan zat terlarut dari larutan dengan konsentrasi tinggi menuju larutan dengan konsentrasi rendah, selain itu dialisis juga dapat memisahkan molekul berdasarkan ukuran melalui membran pori selofan (Sinatari dkk., 2013). EPS murni dihidrolisis dengan asam bertujuan untuk memutus rantai panjang polimer EPS agar menjadi monomer dan akan teranalisis menggunakan kromatografi lapis tipis analisis (KLTA).

Monomer penyusun EPS diidentifikasi menggunakan standar glukosa, fruktosa, dan mannososa, standar tersebut digunakan sebagai acuan untuk mengetahui komponen gula yang berada dalam sampel eksopolisakarida yang dihasilkan dalam penelitian ini. Identifikasi profil monomer EPS menggunakan KLTA ditampilkan pada Gambar 4.6. Hasil analisis profil monomer gula penyusun EPS menggunakan KLTA menunjukkan nilai faktor retensi (R_f) EPS L36, glukosa, fruktosa, dan mannososa berturut-turut sebesar 0,45; 0,45; 0,46; dan 0,48.

Gambar 4.6 Monitoring KLTA monosakarida penyusun eksopolisakarida yang dihasilkan oleh *Weissella confusa*.

Analisis EPS L36 menunjukkan adanya kesamaan spot dengan standar glukosa dengan nilai R_f 0,45, nilai R_f tersebut serupa dengan penelitian Kumar dkk., (2012) yang melaporkan nilai R_f standar glukosa sebesar 0,44. Profil monomer penyusun EPS yang didapatkan serupa dengan penelitian Hector dkk., (2015) yang menunjukkan bahwa EPS yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* memiliki monomer berupa glukosa dan penelitian Dahunsi dkk., (2018) melaporkan analisis komposisi monosakarida penyusun EPS oleh *Weissella confusa* menggunakan KLT menunjukkan adanya spot monomer glukosa dengan

nilai Rf 0,56. Perbedaan nilai Rf antara literatur dan hasil yang didapat disebabkan karena eluen yang digunakan dalam KLT berbeda. Hasil KLTA menunjukkan EPS yang disintesis oleh *Weissella confusa* tersusun atas monomer glukosa yang termasuk kedalam EPS jenis glukon.

4.8 Optimasi Produksi Ekspolisakarida oleh *Weissella confusa* dalam Perspektif Islam

Al Qur'an sebagai kitab suci umat Islam merupakan pedoman/landasan untuk manusia dalam menjalani kehidupan di bumi. Berbagai macam ilmu pengetahuan dapat dipelajari dari Al Qur'an, seperti penciptaan langit dan bumi termasuk apa yang telah diketahui maupun apa yang tidak diketahui/belum diketahui manusia. Sebagaimana yang dituliskan dalam surat Yasin ayat 36 berikut;

سُبْحٰنَ الَّذِيْ خَلَقَ الْاَزْوَاجَ كُلَّهَا مِمَّا تُنْبِتُ الْاَرْضُ وَمِنْ اَنْفُسِهِمْ وَمِمَّا لَا يَعْلَمُوْنَ

Artinya: “Maha suci (Allah) yang telah menciptakan semuanya berpasang-pasangan, baik dari apa yang ditumbuhkan oleh bumi dan dari diri mereka sendiri, maupun dari apa yang tidak mereka ketahui” (QS. Yasin:36).

Berdasarkan kandungan surat Yasin ayat 35 menurut Shihab, (2002) pada ayat tersebut Allah menciptakan segala macam makhluk-Nya berpasang-pasangan, baik berupa tumbuh-tumbuhan, hewan, manusia, dan makhluk hidup lainnya yang tak kasat mata dan belum diketahui manusia. Hal tersebut mengindikasikan akan eksistensi atau adanya bentuk kehidupan yang belum diketahui oleh manusia pada saat ayat tersebut turun. Sehingga dijadikan landasan bagi orang-orang beriman dalam rangka mengembangkan ilmu pengetahuan dan

teknologi untuk mengetahui dan memanfaatkan semua ciptaan Allah dengan sebaik-baiknya. Salah satu bentuk perkembangan teknologi adalah ditemukannya mikroskop sehingga manusia dapat melihat makhluk yang tidak bisa dilihat secara langsung seperti yang ditunjukkan oleh Al-Qur'an. Makhluk tidak kasat mata tersebut sebagaimana dituliskan didalam surat Saba' ayat 3 sebagai berikut;

لَا يَعْزُبُ عَنْهُ مِثْقَالُ ذَرَّةٍ فِي السَّمَوَاتِ وَلَا فِي الْأَرْضِ وَلَا أَصْغَرُ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرُ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ
 Artinya: "...Tidak ada yang tersembunyi bagi-Nya sekalipun seberat zarah baik yang di langit maupun yang di bumi, yang lebih kecil dari itu atau yang lebih besar, semuanya (tertulis) dalam Kitab yang jelas (*Lauh Mahfuz*)," (QS. Saba': 3).

Ayat tersebut dalam kitab "*Tafsir Jalalayn*" karya Imam Jalaludin Al-Mahalli dan Imam Jalaludin As-Suyuti dijelaskan bahwa Allah melalui ayat tersebut menegaskan pada manusia bahwa hanya Dia-lah yang dapat mengatur kehidupan di langit dan bumi. Allah juga menerangkan bahwa segala sesuatu ciptaan-Nya sudah tertulis dengan jelas dalam kitab (*Lauh Mahfuz*) termasuk yang sebesar "*Zarah*" yang berarti benda yang sangat kecil. Makhluk yang sangat kecil tersebut kemudian dapat diidentifikasi sebagai mikroba/bakteri oleh manusia setelah ditemukan mikroskop. Bakteri menjadi salah satu makhluk ciptaan-Nya yang menakjubkan karena memiliki banyak manfaat dalam kehidupan dengan ukuran yang sangat kecil. Seperti bakteri asam laktat (BAL) yang dapat digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder berupa eksopolisakarida (EPS) yang sangat berguna dalam kehidupan manusia.

Weissella confusa yang digunakan dalam penelitian ini merupakan salah satu jenis BAL yang dapat memproduksi EPS dalam jumlah besar. Namun, untuk

memaksimalkan hasil produksi EPS terdapat beberapa faktor yang memengaruhi, salah satunya lama fermentasi. *Weissella confusa* tentunya memiliki batas lama fermentasi optimum dalam memproduksi EPS. Hasil penelitian ini menunjukkan lama fermentasi 36 jam merupakan batas optimum yang digunakan *Weissella confusa* untuk memproduksi EPS yaitu sebesar 10,412 g/L. Pada lama fermentasi tersebut juga memiliki kadar kemurnian penyusun EPS tersendiri yaitu sebesar 91,77 %. Lama fermentasi optimum dan kadar kemurnian EPS tersebut sesuai Allah berfirman didalam surat Al-Qamar ayat 49 berikut;

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ

Artinya: “Sungguh, kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran” (QS. Al-Qamar:49).

Berdasarkan kandungan surat Al-Qamar ayat 49 menurut Shihab, (2002) pada ayat tersebut kata “*qadar*” merupakan ketentuan yang telah ditetapkan oleh Allah dan dapat bermakna kadar tertentu yang tidak bisa ditambah maupun dikurangi. Dapat dipahami juga bahwa segala sesuatu yang diciptakan Allah telah ditetapkan/ditakdirkan takarannya dan telah ditulis di dalam kitab (*Lauh Mahfuz*).

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Hasil terbaik produksi eksopolisakarida oleh *Weissella confusa* dalam media semi sintetis diperoleh pada lama fermentasi 36 jam dengan jumlah bakteri $6,5 \times 10^8$ CFU/mL menghasilkan eksopolisakarida sebesar 10,412 g/L dan total gula 91,77 %.
2. Hasil FTIR pada eksopolisakarida dari *Weissella confusa* menunjukkan gugus fungsi OH pada panjang gelombang 3471,76 dan 3430,45 cm^{-1} , ikatan rangkap *doublet* COO- pada 1647,89 cm^{-1} , gugus simetri lokal $\text{CH}_2/\text{C-OH}$ pada 1458,13 cm^{-1} , ikatan glikosidik pada 1113,48; 1071,48; 993,50; 930,25 dan 855,44 cm^{-1} , serta vibrasi kerangka pada 668,88; 619,20; dan 537,89 cm^{-1} .
3. Hasil KLT pada eksopolisakarida dari *Weissella confusa* menunjukkan profil monomer gula penyusun berupa glukosa.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk optimasi produksi eksopolisakarida pada faktor yang lain seperti suhu, pH, dan konsentrasi inokulum agar didapatkan hasil yang maksimal. Serta uji pemanfaatan eksopolisakarida yang dihasilkan sebagai antioksidan, antibakteri, dan imunomodulator.

DAFTAR PUSTAKA

- Abid, Yousra., Casilo, Angela., Gharsallah, Houda., Joulak, Ichrak., Lanzatta, Rosa., Corsaro, Maria Michela., Attia, Hamida., dan Azabou, Samia. 2017. Production and Structural Characterization of Exopolysaccharides from Newly Isolated Probiotic Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108: 719-728.
- Albalasmeh, Ammar A., behre, Asmeret Asefaw., dan Ghezzehei, Teamrat A. 2013. A New Method for Rapid Determination of Carbohydrate and Total Carbon Concentrations Using UV Spectrophotometry. *Carbohydrate polymers*, 97: 253-261.
- Angelin, J., & Kavitha, M. (2020). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 853–865.
- Anindita. 2002. Pembuatan Yakult Kacang Hijau. Kajian Tingkat Pengenceran dan Konsentrasi Sukrosa. *Skripsi*. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya.
- Bintang, M. 2010. Biokimia Teknik Penelitian. Jakarta: Erlangga.
- Brummer, Y., dan Cui, W. 2013. Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Application. France: Taylor and Francies Group, LLC.
- Carocho, M., Ferreira, I. C. Food and Chemical Toxicology. 51, 15-25.
- Cerning, Jutta. 1990. Exocellular Polysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 87: 113-130.
- Chabela, G., Fience, B. R., dan Case, C. L. 2010. *Introduction Microbiology Part 7. E-Book*. 76-83. San Fransisco: Addison Weasly angman.
- Chalim, Mohamad Abdul. 2021. Karakterisasi Eksopolisakarida yang Dihasilkan oleh *Weissella confusa* dan Potensinya sebagai Antibakteri Terhadap *Salmonella typhi*. *Skripsi*. Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Unisersitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Charlena., Haris, Abdul., dan Karwati. 2009. Degradasi Hidrokarbon pada Tanah Tercemar Minyak Bumi dengan Isolat A10 Dan D8. *Prosiding Seminar Nasional Sains II*, 124-136.
- Dahunsi, A. T., Sanni, A. I., Jeyaram, K., Ojediran, J. O., Ogunsakin, A. O., dan Banwo, K. 2018. Extracellular Polysaccharide from *Weissella confusa* OF126: Production, Optimization, and Characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111: 514-525.

- Dharmik, P., & Narkhede, S. (2020). *Effect of Nitrogen Sources and Sucrose Concentration on Dextran Production by Leuconostoc mesenteroides NRRL-B-512F*. 8(9), 160–162.
- Dilna, Sasidharan Vasanthakumari., Surya, Harikumar., Aswathy, Ravindran Girija., Varsha, Kontham Kulangara., Sakthikumar, Dasappan Nair., Pandey, Ashok., dan Nampoothiri, Kasevan Madhavan. 2015. Characterization of an Exopolysaccharide with Potential Health-benefit.
- Properties from a Probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *LWT-Food Science and Technology*, 64: 1179-1186.
- Dirmanto, 2006. *Concise Handbook of Indigenous Fermented Foods in the ASCA Countries*. Jakarta: Indonesian Institute of Sciences
- Du, R., Xing, H., Zhou, Z., & Han, Y. (2017). Original article Isolation , characterisation and fermentation optimisation of glucansucrase-producing *Leuconostoc mesenteroides* DRP105 from sauerkraut with improved preservation stability. 1–9. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13537>
- Dubois, M.K., Gilles, A., Hamilton, P.A., Rebers., dan Fred, S. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substance. *Journal of University of Minnesota*, 28(3): 350-356.
- El-Waseif, A., Haroun, B., El-Menoufy, H., & Amin, H. (2013). Biosynthesis and morphology of an exopolysaccharide fro a probiotic *Lactobacillus plantarum* under different growth conditions. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(2), 1256–1265.
- Feliatra. 2018. Probiotik. Jakarta: Kencana.
- Ferdiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan. E-Book*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Gandjar, G.I dan Abdul, R. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Belajar.
- Geel-Schutten, G. H. Van., Brink, B. Ten., Smith, M. R., Dijkhuizen, L. 1998. Screening and Characterization of *Lactobacillus* Strains Producing Large Amounts of Exopolysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*, 50: 697-703.
- Guérin, Marie., Silva, Christine Robert-Da., Garcia., Cyrielle., dan Remize, Fabienne. 2020. Lactic Acid Bacterial Production of Exopolysaccharides from Fruit and Vegetables and Associated Benefit. *Journal Fermentation*, 6(4): 115.
- Haroun, Bakry M., El-Menoufy, Hassaan A., Amin, Hala A., dan El-Waseif, Amr A. 2013. Biosynthesis and Morphology of an Exopolysaccharide from a

Probiotic *Lactobacillus plantarum* Under Different Growth Condition. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(2): 1256-1265.

- Hector, Staton., Willard, Kyle., Bauer, Rolane., Mulako, Inonge., Slabbert, Etienne., Kossmann, Jens., dan George, Gavin M., 2015. Diverse Ezopolysaccharide Producing Bacteria Isolated from Milled Sugarcane: Implications for Cane Spoilage and Sucrose Yield. *PLOS ONE*, 10(12): e0145487.
- Hong, T., Yin, J., Nie, S., & Xie, M. (2021). Food Chemistry : X Applications of infrared spectroscopy in polysaccharide structural analysis : Progress , challenge and perspective. *Food Chemistry: X*, 12(October), 100168. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100168>
- Iqbal, Samina., Marchetti, Roberta., Aman, Afsheen., Silipo, Alba., Qader, Shah Ali Ul., dan Molinaro, Antonio. 2017. Enzymatic and Acidic Degradation of High Molecular Weight Dextran into Low Molecular Weight and its Characterizations Using Novel Diffusion-ordered NMR Spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103: 744-750.
- Jacquely, & Black, L. (2008). *Microbiology principles and explorations* (7th ed.).
- Jin, Hui., Jeong, Yunju., Yoo, Sang-Ho., Johnston, Tony V., Ku, Seockmo., dan Ji, Geun Eog. 2019. Isolation and Characterization of High Exopolysaccharide-Producing *Weissella confusa* VP30 from Young Children's Feces. *Microbial Cell Factories*, 18: 110.
- Kavitake., Devi, Palanisamy Bruntha., dan Shetty, Prathapkumar Halady. 2016. Characterization of a novel galactan produced by *Weissella confusa* KR780676 from an acidic fermented food. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.099.
- Khairunnisa, F., & Pato, U. (2016). Perbandingan Aktivitas Antibakteri Antara *Lactobacillus Casei* Subsp. *Casei* R-68 dan *Lactobacillus Casei* Komersil Terhadap *Staphylococcus aureus* FNCC-15 dan *Escherichia coli* FNCC-19 THE. *Jom FAPERTA*, 3(2), 1–9.
- Kim, Ji-Won., Choi, Bo-Hyun., Jung, Jin-Ho., Yuan, Xiaofang., Kim, Ju-Min., dan Lee, Pyung Cheon. 2018. Genome Resequencing and Analysis of D-Lactic Acid Fermentation Ability of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293. *Process Biochemistry*, 75: 83-88.
- Klinchongkon, K., Bunyakiat, T., Khuwijitjaru, P., & Adachi, S. (2019). Ethanol Precipitation of Mannooligosaccharides from Subcritical Water-Treated Coconut Meal Hydrolysate. *Food and Bioprocess Technology*, 12(7), 1197–1204. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02288-w>

- Kultsum, U. 2009. Pengaruh variasi nira tebu dar beberapa varietas penambahan sumber N dari tepung kedelai hitam sebagai substrat terhadap efisiensi fermentasi etanol. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Saintek UIN Malang, 43-47.
- Kumar, Muthusamy., Anandapandian, Kanaphathi Thangavel Kasirajan., dan Parthiban. 2011. Production and Characterization of Exopolysaccharides (EPS) from Biofilm Forming Marine Bacterium. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(2): 259-265.
- Kuswanto, R. K dan Sudarmadji, Slamet. 1989. *Proses Mikrobiologi Pangan*. Yogyakarta: UGM.
- Lakra, Avinash Kant., Domli, Latha., Tilwani, Younus Mohd., dan Arul, Venketesan. 2020. Physicochemical and functional characterization of mannan exopolysaccharide from *Weissella confusa* MD1 with bioactivities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 143: 797-805.
- Lehninger, A. L. 1997. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid I*. Jakarta: Erlangga.
- Lewkowski, J. 2001. Synthesis, Chemistry and Application of 5-hydroxymethylfurfural and Its Derivatives. *ARKIVOC*. Hlm. 17-54
- Lin, T. Y., dan Chien, M. F. C. (2007). Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chemistry*, 100(4), 1419–1423. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.033>
- Lule, Vaibhao., Singh, Rameshwar., Behare, Pradip., dan Tomar, Sudhir Kumar. 2015. Comparison of Ecopolysaccharide Production by Indigenous *Leuconostoc mesenteroides* strain in whey medium. *Asian J. Dairy & Food Res.*, 34(1): 8-12.
- Ma'unatin, Anik., Harijono, Harijono., Zubaidah, Elok., dan Rifa'I, Muhaimin. 2020. The Isolation of Exopolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacteria from Lontar (*Borassus flabellifer* L.) sap. *Iranlan Journal of Microbiology*, 12(5): 347-444.
- Machmud, M. (2001). Teknik Penyimpanan dan Pemeliharaan Mikroba. *Buletin AgroBio*, 4(1), 24–32.
- Maier, R. M. 2009. *Edvironmental Microbioplogy Second Edition*. New Yoyk: Academic Press.
- Malik, Amarila., Ariesranti, Donna M., Nurfachtiyani, Anandayu., dan Yanuar, Arry. 2008. Skrining Gen Glukonsiltransferase (GTF) dari Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida. *Markara Sains*, 12(1): 1-6.

- Malik, Amerila., Sheilla, Sheilla., Firdausi, Wangi., Handayani, Tri., dan Saepudin, Endang. 2015. Sucrase Activity and Exopolysaccharide Partial Characterization from Three *Weissella confusa* Strains. *HAYATI Journal of Biosciences*. 22: 130-135.
- Man, B. Y. J. C. D. E. (1960). *A Medium For The Cultivation Of Lactobacilli*. 23, 130–135.
- Mangrove, E., Setyati, W. A., Martani, E., & Zainuddin, M. (2015). *Kinetika Pertumbuhan dan Aktivitas Protease Isolat 36k dari Sedimen*. 20(September), 163–169.
- Murwani, S. 2015. *Dasar-dasar Mikrobiologi Veteriner*. Malang: UB Press.
- Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (2005). Leuconostoc dextranucrase and dextran: Production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(8), 845–860. <https://doi.org/10.1002/jctb.1322>
- Nehal, Fatima., Sahnoun, Mouna., Smaoui, Slim., Jaouadi, Bassem., Bejar, Samir., Mohammed, Sbaihia. 2019. Characterization, High Production and Antimicrobial Activity of Exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* F-mou. *Microbial Pathogenesis*, 132: 10-19.
- Nudyanto, Anton dan Zubaidah, Elok. 2015. Isolasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida dari Kimchi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 3(2): 743-748.
- Nurjannah, L., dkk. 2017. Produksi Asam Laktat oleh *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* dengan Sumber Karbon Tetes Tebu. *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia*, 9(1).
- Patel, Seema., Majumder, Avishek., dan Goyal, Arun. 2012. Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Indian J Microbiol*, 52(1): 3–12.
- Pelczar, M. J. dan E. C. S. Chan. 2008. *Dasar-dasar Mikrobiologi I*. Universitas Indonesia Press. Jakarta
- Pham, PL., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., dan Cerning, J. 2000. Production of Exopolysaccharides by *Lactobacillus rhamnosus* and Analysis of its Enzymatic Degradation During Prolonged Fermentation. *Appl Environ Microbiol*. 66(6): 2302-2310.
- Poedjiadi, A. dan Supriyanti, T. 2006. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Presscott, S.C. dan Dunn, G. C. 1990. *Industrial Microbiology Third Edition*. New York: Mc. Graw Hill Book Company.

- Rollando. 2019. *Senyawa Antibakteri dan Fungsi Endofit*. Malang: CV. Seribu Bintang.
- Saha, Sanat K. dan Brewer, Curtis F. 1994. Determination of the Concentrations of Oligosaccharides, Complex Type Carbohydrates, and Glycoproteins using the Phenol-Sulfuric Acid Method. *Carbohydrate Research*. 254: 157-167.
- Sanalibaba, P., & Cakmak, G. A. (2016). Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria. *Applied Microbiology: Open Access*, 2(2). <https://doi.org/10.4172/2471-9315.1000115>
- Sastrohamidjojo. 2001. *Spektroskopi*. Jakarta: Liberty.
- Seesuriyachan, Phisit., Kuniyita, Ampit., Chaiyaso, Thanongsak., Hanmoungjai, Prasert., Leksawasdi, Noppol., dan Techapun, Charin. 2014. Enhancement and Optimization of Exopolysaccharide Production by *Weissella confusa* TISTR 1498 in pH Controlled Submerged Fermentation Under High Salinity Stress. *Chiang Mai J. Sci.* 41(3): 503-512.
- Seo, Byoung-Joo., Bajpai, Vivek Kumar., Rather, Irfan Ahmad., dan Park, Young-Ha. 2015. Partially Purified Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* YM009 with Total Phenolic Content, Antioxidant and Free Radical Scavenging Efficacy. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 49(4).
- Shihab, M. Quraish. 2002. *Tafsir Al-Misbah*. Jakarta: Lentera Hati.
- Sinatari, H. ., A.L.N, A., & Sarjono, P. . (2013). Pemurnian Selulase dari Isolat Kb Kompos Termofilik Desa Bayat Klaten Menggunakan Fraksinasi Amonium Sulfat. *Chem Info Vol*, 1(1), 130–140.
- Stepanov, N. A., Senko, O. V., dan Efremenko, E. N. 2017. Biocatalytic Production of Extracellular Exopolysaccharide Dextran Synthesized by Cells of *Leuconostoc mesenteroides*. *Catalysis in Industry*, 9(4): 339-343.
- Surayot, Utoomporn., Wang, Jianguo., Seesuriyachan, Phisit., Kuntiya, Ampin., Tabarsa, Mehdi., Lee, YongJin., Kim, Jin-Kyun., Park, Woojung., dan You, SangGuan. 2014. Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria: Structural Analysis, Molecular Weight Effect on Immunomodulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 68: 233–240.
- Surono, Ingrid S. 2004. *Probiotik, Susu Fermentasi Kesehatan*. Jakarta: PT. Tri Cipta Karya.
- Sutherland, I. W. (1997). Microbial exopolysaccharides-structural subtleties and their consequences. *Pure & Appl. Chem*, 69(9), 1911–1917.

- Tallon, Richard., Bressollier, Philippe., dan Urdaci, Maria C. 2003. Isolation and Characterization of Two Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, 154: 705-712.
- Tayo, Bukola Adebayo., Ishola, Racheal., dan Oyewunmi, Titiloye. 2018. Characterization, antioxidant and immunomodulatory potential on exopolysaccharide produced by wild type and mutant *Weissella confusa* strains. *Biotechnology Reports*, 19: e00271.
- Tayuan, Chintana., Tannock, Gerald W., dan Rodtong, Sureelak. 2011. Growth and Exopolysaccharide Production by *Weissella sp.* from Low-Cost Substitutes for Sucrose. *African Journal of Microbiology Research*, 5(22): 3693-3710.
- Trabelsi, Imen., Slima, Sirine Ben., Chaabane, Hela., dan Riadh, Ben Salah. 2015. Purification and Characterization of a novel Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus sp. Ca6*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74: 541-546.
- Trenggono dan Sutardi. 1990. *Biokimia dan Teknologi Pasca Panen*. Yogyakarta: UGM Press.
- Vettori, Mary Helen Palmuti Braga., Franchetti, Sandra Mara Martins., dan Contiero, Jonas. 2012. Structural Characterization of a New Dextran with a Low Degree of Branching Produced by *Leuconostoc mesenteroides* FT045B Dextranase. *Carbohydrate Polymer*, 88: 1440-1444.
- Volk, W.A dan Wheeler, M.F. 1998. *Mikrobiologi Dasar Edisi Kelima*. Jakarta: Erlangga.
- Vuyst, L. De dan Vin, F. De. 2007. *Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria*. Brussels: Elsevier.
- Wongsuphachat, Wararat., H-Kittikun, Aran., dan Maneerat, Suppasil. 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.
- Wuryanti, W., Mulyani, N. S., Asy'ari, M., & Sarjono, P. R. (2012). Uji Ekstrak Bawang Bombay sebagai Anti Bakteri Gram Positif *Staphylococcus aureus* dengan Metode Difusi Cakram. *Bioma : Berkala Ilmiah Biologi*, 12(2), 68.
- Xu, Rinhua., Shen, Qian., Ding, Xuelong., Gao, Wengeng., dan Li, Pinglan. 2010. Chemical Characterization and Antioxidant Activity of an Exopolysaccharide Fraction Isolated from *Bifidobacterium animalis* RH. *European Food Research and Technology*, 232: 231-241.

- Zhao, Dan., Liu, Lina., Jiang, Jing., Guo, Shangxu., Ping, Wenxiang dan Ge, Jingping. 2020. The Response Surface Optimization of Exopolysaccharide Produced by *Weissella confusa* XG-3 and its Rheological Property. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50(10): 1014-1022.
- Zhou, Kang., Zeng, Yiting., Yang, Menglu., Chen, Shujuan., He, Li., Ao, Xiaolin., Zou, Likou., dan Liu, Shuliang. 2016. Production, Purification and Structural Study of An Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* BC-25. *Carbohydrate Polymers*, 144: 205-214.
- Zubaidah, Elok., Liasari, Yunita., dan Saparianti, Ella. 2008. Produksi Eksopolisakarida oleh *Lactobacillus plantarum* B2 pada Produk Probiotik Berbasis Buah Murbei. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 9(1): 59-68.



LAMPIRAN

Lampiran 1: Rancangan Penelitian



Lampiran 2: Skema Kerja

➤ Sterilisasi Alat

Seperangkat alat gelas

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

Hasil

➤ Pembuatan Media

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

MRSA (*de Man Rogosa and Sharpe Agar*)

- Ditimbang 6,82 gram
- Dilarutkan dalam 100 mL aquades
- Dipanaskan sambil diaduk
- Dipindahkan dalam erlenmeyer 250 mL
- Dilakukan sterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C tekanan 15 psi selama 15 menit

Hasil

- Media Produksi Eksopolisakarida

Media produksi

- Ditimbang sebanyak 10 gram sukrosa; 0,5 gram pepton; 0,25 gram ekstrak ragi; 2 gram K_2HPO_4 ; 0,0025 gram $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,001 gram $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; dan 0,001 gram NaCl
- Dilarutkan dalam 100 mL aquades dan di atur pH sebesar 6,5
- Dipanaskan sambil diaduk sampai mendidih
- Dipindahkan dalam erlenmeyer 250 mL
- Dilakukan sterilisasi dalam *autoclave* pada 121 °C, tekanan 15 psi selama 15 menit

Hasil

➤ Regenerasi *Weissella confusa*

Weissella confusa

- Diambil 2 ose
- Diinokulasikan ke media MRSA padat posisi miring
- Diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang

Hasil

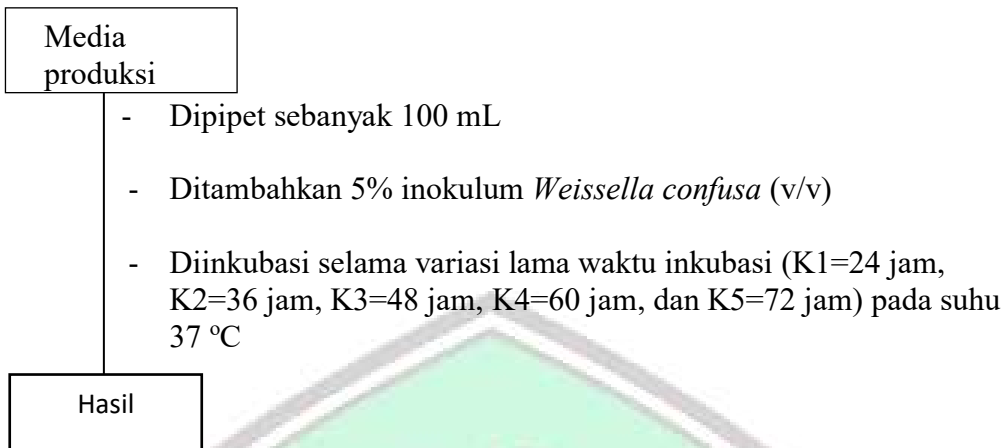
➤ Pembuatan inokulum

Weissella confusa

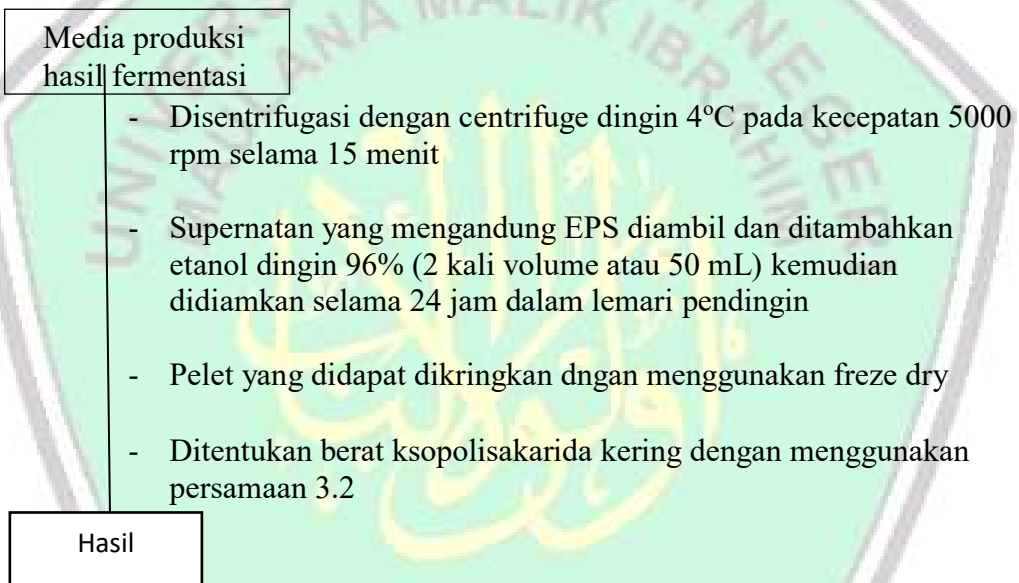
- Diambil 2 ose
- Dipindahkan ke dalam 10- mL media produksi
- Di shaker selama 18 jam 100 rpm pada suhu 30°C dengan nilai OD 0,5 setara dengan $2,98 \times 10^9$ cfu/mL

Hasil

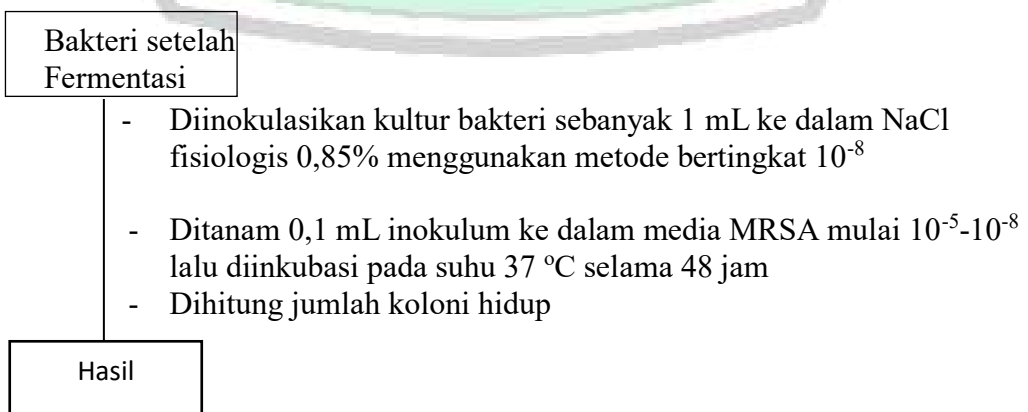
- Prodksi Eksoppolisakarida
 - Pengaruh lama fermentasi terhadap produksi EPS *Weissella confusa*



- Ekstraksi Eksopolisakarida dari Media Fermentasi



- Pengukuran TPC Bakteri setelah Fermentasi



- Uji Kadar Total gula dengan Metode Asam Sulfat-Fenol
 - Pembuatan Kuva Standar dengan metode Asam Sulfat-Fenol

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

- Diambil masing-masing 2 mL
- Dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- Ditambahkan 1 mL larutan fenol 5% (b/v)
- Ditambahkan 5 mL H₂SO₄ pekat
- Dibiarkan selama 10 menit
- Dikocok, ditempatkan dalam penangas air selama 15 menit
- Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm

Hasil

- Penetapan Kadar Total Gula dengan Metode Fenol H₂SO₄

Sampel EPS

- Ditimbang sebanyak 0,01 gram dan dilarutkan dengan 250 mL aquades
- Dipipet sebanyak 2 mL ke dalam tabung reaksi
- Ditambahkan 1 mL larutan fenol 5% (b/v) dan dikocok
- Ditambahkan 5 mL asam sulfat pekat dengan cepat di lemari asap
- Dibiarkan selama 10 menit
- Dikocok, lalu ditempatkan dalam penangas air selama 15 menit
- Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm

Hasil

- Persiapan plat KLT dan bejana pengembang

Plat KLT

- Disiapkan plat KLT dari silika gel dengan ukuran 7 cm x 10 cm
- Diberi tanda garis batas bawah dan batas atas masing-masing 1 cm dan diaktifasi selama 30 menit pada suhu 105 °C
- Disiapkan eluen dengan campuran n-butanol:etanol:air (2:1:1) dan dijenuhkan dalam bejana pengembang selama 4 jam

Hasil

- Identifikasi Monomer Eksopolisakarida Terpilih Menggunakan Kromtografi Lapis Tipis

Eksopolisakarida

- Ditimbang sebanyak 5 mg
- Dihidrolisis dengan 650 µL asam sulfat 1 N 100 °C selama 2 jam
- Dilakukan pengenceran dengan aquabides (1:5)
- Ditempatkan pada plat KLT untuk pemisahan kandungan
- Ditempatkan pada bejana pengembang yang telah disiapkan
- Dibiarkan terelusi hingga batasa atas
- Hasil elusi dikering anginkan lalu disemprot dengan reagen larutan etanol yang mengandung 5% α-naftol dan 5% asam sulfat
- Dioven plat pada suhu 120 °C selama 10 menit sampai noda muncul
- Diukur Rf dan dibandingkan dengan standar glukosa, fruktosa, dan sukrosa

Hasil

Lampiran 3: Perhitungan

L.3.1 Pembuatan Larutan Fenol 5% (b/v)

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

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

L.3.2 Pembuatan Larutan H₂SO₄ 1 M

Hitung molaritas H₂SO₄ pekat (96%)

$$\begin{aligned} \text{Molaritas} &= \frac{(10 \times \% \text{H}_2\text{SO}_4 \times \text{berat jenis})}{\text{BM}} \\ &= \frac{(10 \times 96\% \times 1,84)}{98,08} \\ &= 18 \text{ M} \end{aligned}$$

Hitung pembuatan larutan H₂SO₄ 1 M sebanyak 50 mL dengan cara pengenceran

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

$$18 \text{ M} \times V_1 = 1 \text{ M} \times 50 \text{ mL}$$

$$V_1 = 2,8 \text{ mL}$$

Keterangan: M = Molaritas

Mr = Massa molekul relatif

V = Volume

BM = Berat molekul H₂SO₄

Cara pembuatan: H₂SO₄ dengan konsentrasi 1 M dibuat dengan cara masukkan akuades kira-kira sebanyak 20 mL ke dalam labu ukur 50 mL. Kemudian tambahkan 2,8 mL H₂SO₄ pekat secara perlahan (melalui dinding labu ukur). Larutan kemudian digoyangkan perlahan agar tercampur merata. Setelah itu ditandabatkan dengan aquades dan dihomogenkan.

L.3.3 Kurva Standar Glukosa

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

$$\text{Stok glukosa baku} = \frac{10 \text{ mg glukosa}}{0,1 \text{ L akuades}} = 100 \text{ ppm}$$

Cara pembuatan larutan stok 100 ppm: ditimbang glukosa sebanyak 10 mg, kemudian dimasukkan ke dalam gelas beker, selanjutnya ditambahkan dengan aquades secukupnya sampai glukosa terlarut. Selanjutnya larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, kemudian ditandabatkan dan dihomogenkan. Larutan ini akan digunakan sebagai larutan stok untuk pembuatan larutan glukosa standar. Pembuatan larutan glukosa 10, 20, 30, 40, 50 dan 60 ppm dapat dilakukan dengan pengenceran larutan stok glukosa baku melalui perhitungan sebagai berikut:

A. Konsentrasi 10 ppm:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 10 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V1 = 1 \text{ mL}$$

B. Konsentrasi 20 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 20 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V1 = 2 \text{ mL}$$

C. Konsentrasi 30 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 30 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V1 = 3 \text{ mL}$$

D. Konsentrasi 40 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 40 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V1 = 4 \text{ mL}$$

E. Konsentrasi 50 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 50 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V1 = 5 \text{ mL}$$

F. Konsentrasi 60 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 60 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V1 = 6 \text{ mL}$$

L.3.4 Penentuan OD inokulum

L.3.5 Perhitungan Rendemen Eksopolisakarida (EPS)

L.3.6 Perhitungan Jumlah Pertumbuhan Bakteri

L.3.7 Kurva Standar Glukosa

L.3.8 Analisis Kadar Gula Eksopolisakarida

L.3.9 Faktor Retensi Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Lampiran 4. Hasil Analisis SPSS

L.4.1 Hasil Analisis Kadar EPS

L.4.2 Hasil Analisis Pertumbuhan Bakteri

Lampiran 5. Dokumentasi

