

**ISOLASI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL
EKSOPOLISAKARIDA DARI MADU MANGGA (*Mangifera indica* L.)**

SKRIPSI

**Oleh :
ELZA NURHIDAYATI
NIM. 17630056**



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

**ISOLASI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL
EKSOPOLISAKARIDA DARI MADU MANGGA
(*Mangifera indica* L.)**

SKRIPSI

**Oleh:
ELZA NURHIDAYATI
NIM. 17630056**

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

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

**ISOLASI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL
EKSOPOLISAKARIDA DARI MADU MANGGA (*Mangifera indica* L.)**

SKRIPSI

**Oleh :
ELZA NURHIDAYATI
NIM. 17630056**

**Telah Diperiksa dan Disetujui
Tanggal: 15 Juni 2022**

Pembimbing I



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

Pembimbing II



**Rifatul Mahmudah, M. Si
NIDT. 19830125 20160801 2 068**

**Mengetahui,
Ketua Program Studi**



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

**ISOLASI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL
EKSOPOLISAKARIDA DARI MADU MANGGA (*Mangifera
indica L.*)**

SKRIPSI

**Oleh:
ELZA NURHIDAYATI
NIM. 17630056**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan
Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 23 Juni 2022**

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

**Anggota Penguji I : Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc
NIDT. 19900906 20180201 2 239**

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

**Anggota Penguji III : Rif'atul Mahmudah, M.Si
NIDT. 19830125 20160801 2 068**

(.....)
(.....)
(.....)
(.....)

**Mengetahui,
Ketua Program Studi**

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



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Elza Nurhidayati

NIM : 17630056

Program Studi : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Isolasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida
dari Madu Mangga (*Mangifera indica* L.)

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi ini hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya, kecuali dengan mencantumkan sumber kutipan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia mempertanggungjawabkannya sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 23 Juni 2022

Yang membuat pernyataan



Elza Nurhidayati

NIM. 17630056

HALAMAN PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk kedua orang tua saya, Bapak Sunarko dan Ibu Anita yang senantiasa memberi semangat serta nasihat hidup yang sangat berharga bagi penulis. Kepada Elza Nurhidayati yang selalu berjuang sekalipun jalan yang dilalui tak selalu mulus serta teman – teman penulis yang menemani penulis di saat sedih maupun senang.

MOTTO

“Jangan pernah menyerah atas apa yang ada di hadapanmu. Mudah dan sulitnya perjalanan tergantung keyakinan dirimu, usahamu, dan restu Allah serta orang tua”

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'alamin, puji syukur kehadiran Allah Swt. yang telah melimpahkan rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyusun proposal penelitian ini yang berjudul **“Isolasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida dari Madu Mangga (*Mangifera indica* L.)”**. Selawat serta salam senantiasa terpanjatkan dengan indah dan tulus terucap kepada Nabi Muhammad saw., keluarganya, sahabatnya dan para umat serta pengikutnya. Penyusunan proposal penelitian ini tidak luput dari dukungan, motivasi serta bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, izinkanlah penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. M. Zainuddin, M.A., selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malaik Ibrahim Malang.
2. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malaik Ibrahim Malang.
3. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si., selaku Ketua Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malaik Ibrahim Malang
4. Ibu Anik Maunatin, S. T., M. P selaku dosen pembimbing yang dengan sabar meluangkan waktunya membimbing penulis dalam menyusun proposal penelitian ini.
5. Ibu Rif'atul Mahmudah, M. Si., selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing, memberikan pengarahan, serta masukan dalam penulisan proposal penelitian ini.

6. Seluruh dosen Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah mengalirkan ilmu, pengetahuan, pengalaman, wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
7. Orang tua penulis, Bapak Sunarko dan Ibu Anita serta seluruh keluarga yang dengan sepenuh jiwa memberikan dukungan serta kasih sayangnya, sehingga penyusunan proposal penelitian ini dapat terselesaikan dengan baik.
8. Yusril, Nabila, Lifa, Sella, Aisyah, Yuyun, Ilham, Alip, Rasyid, Aninda, Ucha, Nisa, Putri. dan semua teman angkatan Neon yang senantiasa hadir memberi dukungan dalam penyusunan skripsi ini.
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas segala bantuan dan motivasinya kepada penulis.

Semoga amal baik semua pihak yang telah membantu penulis mendapatkan imbalan pahala yang berlipat ganda dari Allah Swt. Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam proposal penelitian ini. Untuk itu penulis mengharapkan masukan yang bersifat membangun demi menyempurnakan proposal penelitian ini. Semoga tulisan ini bisa bermanfaat bagi penulis pada khususnya dan bagi pembaca pada umumnya.

Malang, 12 Juni 2022

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERSETUJUAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	v
MOTTO	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvi
مستخلص البحث.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan	4
1.4. Batasan Masalah	4
1.5. Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Madu	6
2.1.1. Manfaat Madu.....	7
2.2. Madu Mangga	9
2.3. Bakteri Asam Laktat	9
2.4. Identifikasi Bakteri Asam Laktat	14
2.4.1. Pengamatan Makroskopis	14
2.4.2. Uji Pewarnaan Gram.....	15
2.5. Eksopolisakarida (EPS)	15
2.6. Biosintesis Eksopolisakarida	17
2.7. Faktor–Faktor yang Mempengaruhi Produksi Eksopolisakarida.....	20
2.8. Pengukuran Kadar Gula Total dengan Metode Asam Sulfat.....	21
BAB III METODE 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
3.2.3. Rancangan Penelitian.....	25
3.3. Tahapan Penelitian.....	26

3.4.	Pelaksanaan Penelitian.....	26
3.4.1.	Sterilisasi Alat.....	26
3.4.2.	Pembuatan Media	27
3.4.3.	Isolasi BAL	28
3.4.4.	Regenerasi BAL.....	28
3.4.5.	Skrining BAL Penghasil Eksopolisakarida.....	29
3.4.5.1.	Skrining BAL Penghasil EPS Secara Kualitatif).....	29
3.4.5.2.	Skrining BAL Penghasil EPS Secara Kuantitatif	29
3.4.6.	Identifikasi Bakteri Asam Laktat	29
3.4.7.	Pembuatan Inokulum	30
3.4.8.	Produksi Eksopolisakarida Oleh BAL Penghasil EPS Terpilih dalam Media Semi Sintesis.....	31
3.4.9.	Ekstraksi Eksopolisakarida	31
3.4.10.	Penentuan Kadar Gula Total Menggunakan Metode Sulfat Fenol ..	31
3.4.11.	Analisis Data.....	32
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	33
4.1.	Pembuatan Media.....	33
4.2.	Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL)	34
4.3.	Regenerasi Bakteri Asam Laktat.....	35
4.4.	Skrining Bakteri Asam Laktat (BAL) Penghasil Eksopolisakarida (EPS)	35
4.4.1.	Skrining Bakteri Asam Laktat (BAL) Penghasil Eksopolisakarida	35
	(EPS) Secara Kualitatif.....	35
4.4.2.	Skrining Bakteri Asam Laktat (BAL) Penghasil Eksopolisakarida	36
	(EPS) Secara Kuantitatif.....	36
4.5.	Identifikasi Bakteri Asam laktat (BAL) Penghasil Eksopolisakarida (EPS) .	38
4.5.1.	Identifikasi Makroskopik.....	38
4.5.2.	Pewarnaan Gram	38
4.5.3.	Uji Katalase	39
4.6.	Pembuatan Inokulum	40
4.7.	Produksi Eksopolisakarida oleh BAL Penghasil EPS Terpilih Menggunakan Media Semi Sintetik.....	41
4.8.	Perspektif Islam Terkait Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Asal Madu	43
BAB V	PENUTUP.....	46
DAFTAR PUSTAKA	47

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Kandungan mineral pada madu	7
Tabel 3.1	Skrining Kualitatif pada Isolat BAL asal Madu	25

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Biosintesis EPS.....	16
Gambar 2.2	Reaksi yang Terjadi pada Metode Sulfat Fenol.....	16
Gambar 2.3	Biosintesis Eksopolisakarida	18
Gambar 2.4	Reaksi Sulfat Fenol.....	22

DAFTAR LAMPIRAN

ABSTRAK

Nurhidayati, Elza 2022. **Isolasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida dari Madu Mangga (*Mangifera indica* L.)**. 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 : Rif'atul Mahmudah, M. Si

Kata Kunci : eksopolisakarida, bakteri asam laktat, GRAS, madu mangga, metode sulfat fenol

Eksopolisakarida (EPS) merupakan rantai polimer panjang dengan massa molekul tinggi yang diproduksi oleh mikroorganisme dan bermanfaat di bidang pangan dan kesehatan. Salah satu organisme yang memproduksi EPS adalah Bakteri Asam Laktat (BAL). BAL merupakan bakteri yang tergolong *Generally Recognized as Safe* (GRAS) dan banyak ditemukan pada makanan, tanaman, olahan fermentasi, dan madu. Madu memiliki kandungan gula yang tinggi yang bermanfaat sebagai nutrisi untuk BAL. Salah satu jenis madu yang banyak tersedia di Jawa Timur adalah madu dari bunga mangga (*Mangifera indica* L.). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik BAL penghasil EPS yang diisolasi dari madu mangga serta kemampuan isolat BAL terpilih dalam memproduksi EPS pada media semi sintesis.

Tahapan isolasi BAL penghasil EPS asal madu mangga meliputi isolasi BAL, skrining BAL penghasil EPS, karakterisasi secara makroskopis (warna, bentuk, tepi, permukaan dan elevasi) dan mikroskopis (pewarnaan Gram dan uji katalase). Sedangkan tahap produksi EPS oleh BAL pada sumber gula terpilih meliputi produksi dan ekstraksi EPS, serta uji kadar gula total dengan metode sulfat fenol.

Hasil isolasi BAL penghasil EPS telah ditemukan 4 isolat yaitu A, D, G, dan H. Produksi EPS oleh keempat isolat BAL tersebut pada berbagai sumber gula menunjukkan isolat A menghasilkan EPS tertinggi pada sumber gula sukrosa, isolat D pada sumber gula fruktosa, isolat G pada sumber gula glukosa, dan isolat H pada sumber gula sukrosa. Kemampuan produksi EPS terbaik diproduksi oleh isolat A pada media semi sintesis dan sumber gula sukrosa dengan rendemen sebesar 12,26 g/L dan kadar total gula EPS yaitu 72,55%.

ABSTRACT

Nurhidayati, Elza 2022. **Isolation of Exopolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacteria from Mango Honey (*Mangifera indica* L.)**. Thesis. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology. Maulana Malik Ibrahim State Islamic University Malang. Supervisor I: Dr. Anik Maunatin, S. T., M. P, Supervisor II: Rifatul Mahmudah, M. Si

Keywords: exopolysaccharide, lactic acid bacteria, GRAS, mango honey, phenol sulfate method

Exopolysaccharides (EPS) are long polymer chains with high molecular mass-produced by microorganisms and are helpful in the food and health fields. One organism that produces EPS is Lactic Acid Bacteria (LAB). LAB is a bacterium classified as Generally Recognized as Safe (GRAS) and is commonly found in foods, plants, fermented products, and honey. Honey has a high sugar content which is useful as a nutrient for LAB. One honey widely available in East Java is honey from mango flowers (*Mangifera indica* L.). This study aims to determine the characteristics of LAB producing EPS isolated from mango honey and the ability of selected LAB isolates to produce EPS on semi-synthetic media.

The stages of isolation of LAB-producing EPS from mango honey included LAB isolation, screening of LAB-producing EPS, macroscopic (color, shape, edge, surface and elevation) characterization and microscopic (Gram stain and catalase test). Meanwhile, the stages of EPS production by LAB on selected sugar sources include the production and extraction of EPS and the total sugar content test using the phenol sulfate method.

The isolation of LAB producing EPS results have found 4 isolates, namely A, D, G, and H. The production of EPS by the four LAB isolates on various sugar sources showed that isolate A produced the highest EPS on the source of sucrose sugar, isolate D on the source of fructose sugar, isolate G on the source of the sugar glucose, and isolate H on the source of the sugar sucrose. The best EPS production ability was produced by isolate A on semi-synthetic media and as a source of sucrose sugar with a yield of 12.26 g/L and a total EPS sugar content of 72.55%.

مستخلص البحث

نور هدايتي، إلزا. ٢٠٢٢. عزل جراثيم حمض اللاكتيك المنتجة للسكريات الخارجية من عسل المانجو (*Mangifera indica L.*). البحث الجامعي. قسم الكيمياء. كلية العلوم والتكنولوجيا. جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرفة الأول: الدكتور أنيق معونة. المشرفة الثانية: رفعة المحمودة الماجستير.

الكلمات الإشارية: السكريات الخارجية، جراثيم حمض اللاكتيك، GRAS، عسل المانجو، طريقة كبريتات الفينول

السكريات الخارجية (EPS) عبارة عن سلاسل بوليمر طويلة ذات كتلة جزيئية عالية تنتجها الكائنات الدقيقة وتفيدتها في مجالات الغذاء والصحة. وإحدى بكتيريا حمض اللاكتيك (BAL) وهو يدخل في قسم *Generally Recognized as Safe (GRAS)* وتوجد بشكل شائع في الأطعمة والنباتات والمنتجات المخمرة والعسل. يحتوي العسل كثير من السكر وهو مفيد كمغذ للبكتيريا حمض اللاكتيك. ومن نوع العسل المتوفر في جاوى الشرقية هو عسل من زهور المانجو. يهدف هذا البحث هو معرفة خصائص إنتاج بكتيريا حمض اللاكتيك المعزول من عسل المانجو وقدرة عزلته المختارة على إنتاج السكريات الخارجية على وسط شبه اصطناعي.

تضمنت مراحل عزل بكتيريا حمض اللاكتيك الذي ينتج السكريات الخارجية من عسل المانجو هي عزل بكتيريا حمض اللاكتيك وفحصها لإنتاج السكريات الخارجية، والمكروسكوبيس (اللون والشكل والحافة والسطحية والارتفاع) والميكروسكوبيس (تلون غرام واختبار الكاتالاز). وفي مرحلة إنتاج السكريات الخارجية بواسطة بكتيريا حمض اللاكتيك على المصدر المختارة من السكر تشعب الإنتاج واستخراج السكريات الخارجية مع اختبار محتوى السكر الكلي باستخدام طريقة كبريتات الفينول.

أما نتائج عزل جراثيم حمض اللاكتيك المنتج من السكريات الخارجية توجد ٤ عزلات وهي A و D و G و H. دل إنتاج السكريات الخارجية بواسطة عزلات جراثيم حمض اللاكتيك الأربعة على أن حصلت العزلة A لإنتاج السكريات الخارجية أكثر في مصدر السكر السكروز، وعزل D في مصدر سكر الفركتوز، وعزل G في مصدر سكر الجلوكوز، وعزل H على مصدر سكر السكروز. وكان أفضل قدرة إنتاج السكريات الخارجية بواسطة العزلة A على وسط شبه اصطناعي ومصدر لسكر السكروز بإنتاجية ١٢,٢٦ غرام / لتر ومحتوى السكر الإجمالي من السكريات الخارجية هي ٧٢,٥٥٪.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Eksopolisakarida (EPS) merupakan rantai polimer panjang dengan massa molekul tinggi yang diproduksi oleh mikroorganisme di antaranya bakteri, jamur dan alga (Guo, dkk., 2013). EPS bermanfaat sebagai agen pengental, stabilisator pada keju rendah lemak dan yoghurt yang berguna untuk meningkatkan tekstur dan karakter reologinya (Min, dkk., 2019). Selain itu, EPS memiliki manfaat di bidang kesehatan seperti agen imunomodulator, antitumor, antibiofilm, antioksidan, dan menurunkan kolesterol (Wang, dkk., 2014).

Salah satu bakteri yang menghasilkan EPS adalah Bakteri Asam Laktat (BAL), merupakan bakteri yang aman dikonsumsi karena masuk dalam kategori *Generally Recognized as Safe* (GRAS) (Rahmiati dan Helen, 2019). BAL memiliki ciri antara lain Gram-positif, katalase negatif, mikroaerofilik, tahan asam, tidak membentuk spora dan berbentuk batang serta *coccus* (Zhang dan Cai, 2014). BAL dapat ditemukan di berbagai habitat di antaranya, tanaman, saluran pencernaan hewan dan manusia, pada produk makanan kalengan, produk susu, produk fermentasi, buah-buahan, sayur-sayuran tropis (Chotiah dan Damayanti, 2018) dan juga madu (Tajabadi, 2012).

Madu terdiri atas 60-85% karbohidrat dan 12-23% air (De-Melo, dkk., 2017) serta sebagian kecil senyawa lain, seperti asam organik, mineral, vitamin, protein, asam amino dan lipid (Finola, dkk., 2007). Gula yang umumnya terkandung pada 100 gram madu yaitu, fruktosa sebesar 38,94 gram, glukosa 31,65

gram dan sukrosa 1,84 gram (Buba, dkk., 2013). Salah satu madu yang mengandung gula tinggi adalah madu mangga dengan kandungan fruktosa sebesar 4,94% (Adalina dan Kuntadi, 2019). Kandungan gula pada madu dapat menjadi substrat untuk fermentasi oleh BAL (Mohan, dkk., 2021). Selain itu, ketersediaan tanaman mangga sebagai sumber nektar untuk madu mangga di Jawa Timur mencapai lebih dari 1 juta ton (BPS, 2020). Madu juga memiliki sifat antioksidan yang berasal dari zat-zat enzimatik (misalnya katalase, glukosa oksidase dan peroksidase) dan non enzimatik (misalnya asam askorbat, α -tokoferol, karotenoid, asam amino, protein, produk reaksi Maillard, flavonoid dan asam fenolat) (Wulandari, 2017).

Madu memiliki berbagai manfaat seperti firman Allah pada QS. Muhammad: 15 berikut ini:

مَثَلُ الْجَنَّةِ الَّتِي وَعِدَ الْمُتَّقُونَ ۚ فِيهَا أَنْهَارٌ مِنْ مَاءٍ غَيْرِ آسِنٍ ۚ وَأَنْهَارٌ مِنْ لَبَنٍ لَمْ يَتَغَيَّرَ طَعْمُهُ ۚ وَأَنْهَارٌ
مِنْ خَمْرٍ لَذَّةٍ لِلشَّارِبِينَ ۚ وَأَنْهَارٌ مِنْ عَسَلٍ مُصَفًّى ۚ وَهُمْ فِيهَا مِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ وَمَغْفِرَةٌ مِنْ رَبِّهِمْ ۚ كَمَنْ
هُوَ خَالِدٌ فِي النَّارِ وَسُقُوا مَاءً حَمِيمًا فَقَطَّعَ أَمْعَاءَهُمْ

Artinya :

“Perumpamaan taman surga yang dijanjikan kepada orang-orang yang bertakwa; di sana ada sungai-sungai yang airnya tidak payau, dan sungai-sungai air susu yang tidak berubah rasanya, dan sungai-sungai khamar (anggur yang tidak memabukkan) yang lezat rasanya bagi peminumnya dan sungai-sungai madu yang murni. Di dalamnya mereka memperoleh segala macam buah-buahan dan ampunan dari Tuhan mereka. Samakah mereka dengan orang yang kekal dalam neraka, dan diberi minuman dengan air yang mendidih sehingga ususnya terpotong-potong?”

Ayat tersebut menunjukkan adanya perumpamaan tentang nikmat yang diperoleh orang beriman di surga berupa sungai yang bisa diminum salah satunya sungai madu yang bersih, seperti madu yang telah disaring, enak, dan menyehatkan (Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur’an, 2011). Madu tidak hanya untuk produk konsumsi tetapi juga bisa sebagai produk kosmetik yang keduanya memiliki

manfaat sebagai antibakteri (Cahyadi, dkk., 2019). Karakteristik antibakteri pada madu dapat dikarenakan adanya EPS yang dihasilkan oleh BAL.

Kemampuan BAL yang dapat beradaptasi di lingkungan dengan kadar gula yang tinggi, mengakibatkan BAL dapat ditemukan di dalam madu. Berdasarkan Hasali, dkk., (2015) mengidentifikasi *Lactobacillus brevis* dan *Lactobacillus sp* dari madu Meliponine. Sedangkan Bulgasem, dkk., (2016) diperoleh 4 isolat dari berbagai madu di Libya, Malaysia dan Yaman yaitu *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus carvatus*, *Pediococcus acidilactici*, dan *Pediococcus pentosaceus*. Penelitian lain menunjukkan 8 jenis BAL dari madu *Apis mellifera* yaitu, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus sp.*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, dan *Lactobacillus pentosus* (Feizabadi, dkk., 2020).

BAL penghasil EPS telah diisolasi dari berbagai bahan yang mengandung sumber gula tinggi. Pinaria, dkk., (2016) melaporkan *Lactobacillus casei* AL15 asal nira aren mampu menghasilkan EPS sebesar 0,0141 g/L. Panthavee, dkk., (2017) menemukan *Pediococcus pentosaceus* dari buah leci dan menghasilkan EPS sebesar 0,023 g/L serta *Lactobacillus amylovarus* dari buah nanas sebesar 0,0068 g/L. Sedangkan Maunatin, dkk., (2020) menemukan 5 strain asal nira siwalan (*Borassus flabellifer L.*) dengan rendemen EPS berturut-turut yaitu, *Leuconostoc mesenteroides* N5 sebesar 9,849 g/L, *Leuconostoc mesenteroides* N7 10,997 g/L, *Leuconostoc mesenteroides* N9 9,713 g/L, *Fructabacillus fructococcus* N4 6,140 g/L, *Fructabacillus fructococcus* N10 4,505 g/L. Giyatno dan Retnaningrum (2020) mengisolasi *Lactobacillus plantarum* dari buah kersen (*Muntingia calabura L.*) dan menghasilkan EPS sebesar 1,910 g/L.

Berdasarkan uraian yang telah dipaparkan, tingginya kadar gula pada madu merupakan lingkungan yang cocok untuk BAL penghasil EPS, oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi BAL penghasil EPS dari madu randu. Sehingga diharapkan penelitian ini mendapatkan BAL penghasil EPS dari madu randu serta kemampuannya dalam menghasilkan EPS.

1.2. Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah pada penelitian ini antara lain :

1. Bagaimana karakteristik BAL penghasil EPS yang diisolasi dari madu mangga (*Mangifera indica* L.)?
2. Bagaimana kemampuan BAL penghasil EPS terpilih asal madu mangga (*Mangifera indica* L.) dalam memproduksi EPS pada media semi sintesis?

1.3. Tujuan

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui karakteristik BAL penghasil EPS yang diisolasi dari madu mangga (*Mangifera indica* L.).
3. Untuk mengetahui kemampuan BAL penghasil EPS terpilih asal madu mangga (*Mangifera indica* L.) dalam memproduksi EPS pada media semi sintesis.

1.4. Batasan Masalah

1. Madu dalam penelitian ini adalah madu mangga (*Mangifera indica* L.) yang didapat dari Peternakan Lebah Pondok Madu Asyiq Pasuruan.

2. Penentuan karakteristik BAL penghasil EPS meliputi pengamatan makroskopis dan mikroskopis.

1.5. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini antara lain :

1. Menambah diversitas BAL penghasil EPS asal madu mangga.
2. Memberikan informasi kemampuan BAL penghasil EPS asal madu dalam memproduksi EPS.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Madu

Madu merupakan cairan alami yang umumnya manis, berasal dari nektar bunga yang kemudian dikumpulkan oleh lebah madu (Evahelda, dkk., 2017). Madu tersusun dari beberapa gula antara lain fruktosa (41%), glukosa (34%), dan sukrosa dengan kandungan antara 1-2% (Cummings dan Stephen, 2007). Selain itu, menurut Alvarez-Suarez (2017) terdapat beberapa mineral yang mayoritas ditemukan dalam madu dan tersaji dalam tabel 2.1 dan beberapa unsur dalam jumlah yang minim antara lain tembaga (Cu), kromium (Cr), litium (Li), nikel (Ni), timbal (Pb), tin (Sn), osmium (Os), berilium (Be), vanadium (V), zirkonium (Zr), perak (Ag), emas (Au), barium (Ba), gallium (Ga), bismut (Bi), Germanium (Ge). Mineral–mineral ini berasal dari tanah dan kemudian masuk ke dalam tumbuhan melewati akar dan kemudian masuk dalam madu melalui nektar atau embun madu (Anklam, 1998).

Madu juga mengandung protein dalam jumlah yang relatif kecil, rata-rata sekitar 0,2-0,7% dengan berat molekul 22-75 kDa. Kandungan protein pada madu bergantung pada beberapa faktor seperti spesies lebah madu, kemampuan serangga dalam memproduksi embun madu, dan sumber nabati dari nektar dan polen (Alvarez-Suarez, 2017). Inayah, dkk., (2012) menyatakan bahwa dalam madu terkandung vitamin antara lain, vitamin B1, B2, B3, B6, C, A, E, dan flavonoid. Vitamin C, B3, A, E, asam organik, enzim, asam fenolik, serta flavonoid

berperan sebagai antioksidan (Bogdanov, dkk, 2008). Selain itu, madu memiliki kemampuan bakterisidal dan bakteriostatik seperti antibiotik (Rio, dkk., 2012), serta imunomodulator (Wineri, dkk., 2014).

Tabel 2.1 Kandungan mineral utama yang terdapat dalam madu

Mineral	Kandungan rata-rata pada madu berwarna terang hingga gelap (ppm)
Kalium (K)	40-1350
Klorin (Cl)	52-427
Sulfur (S)	15-100
Natrium (Na)	3-237
Kalsium (Ca)	5-218
Fosfor (P)	29-119
Magnesium (Mg)	2-564
Silikon dioksida (SiO ₂)	9-41
Besi (Fe)	0,4-224
Seng (Zn)	0,2-74
Mangan (Mn)	0,3-4

2.1.1. Manfaat Madu

Kandungan madu yang beragam, menjadikan madu dimanfaatkan di bidang kesehatan sebagai agen antioksidan, anti inflamasi, antitumor, anti bakteri, dan mampu meningkatkan sistem imun (Jafar, dkk., 2017). Selain itu, madu juga menjadi tempat ditemukannya BAL (Olofsson dan Vasquez, 2014). Putri, dkk., (2020) menunjukkan bahwa BAL yang ditemukan dari madu mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Seperti firman Allah dalam QS. An-Nahl: 68 – 69 berikut ini :

وَأَوْحَىٰ رَبُّكَ إِلَى النَّحْلِ أَنِ اتَّخِذِي مِنَ الْجِبَالِ بُيُوتًا وَمِنَ الشَّجَرِ وَمِمَّا يَعْرِشُونَ ۗ - ٦٨ ثُمَّ كُلِي مِن كُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلُلًا ۗ يَخْرُجُ مِنْ بَطُونِهَا شَرَابٌ مُّخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ ۗ فِيهِ شِفَاءٌ لِّلنَّاسِ ۗ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ - ٦٩

Artinya:

“Dan tuhanmu mewahyukan kepada lebah, buatlah sarang-sarang di bukit-bukit, di pohon-pohon kayu, dan di tempat-tempat yang dibikin oleh manusia, kemudian

makanlah dari tiap-tiap (macam) buah-buahan dan tempuhlah jalan tuhanmu yang telah dimudahkan (bagimu). Dari perut lebah itu keluar minuman (madu) yang bermacam-macam warnanya, di dalamnya terdapat obat yang menyembuhkan bagi manusia. Sesungguhnya yang pada demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran tuhan) bagi orang-orang yang memikirkan.” (Q.S An- Nahl ayat 68-69)

Berdasarkan ayat yang dijelaskan, bahwa madu adalah sari makanan dari tumbuh-tumbuhan yang dikumpulkan oleh lebah. Madu merupakan sumber karbohidrat berupa oligosakarida yang mudah dicerna, senyawa fosfor organik, mineral (natrium, kalium, dan kalsium), unsur tanah jarang seperti krom dan seng yang berguna bagi manusia. Oleh karena itu, madu digunakan sebagai obat berbagai penyakit (Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an, 2013).

Selanjutnya dijelaskan juga dalam HR. Ibnu Majah : 3450 yang berbunyi :

حَدَّثَنَا عَلِيُّ بْنُ سَلَمَةَ حَدَّثَنَا زَيْدُ بْنُ الْحُبَابِ حَدَّثَنَا سُفْيَانُ عَنْ أَبِي إِسْحَقَ عَنْ أَبِي الْأَحْوَصِ عَنْ عَبْدِ اللَّهِ قَالَ قَالَ رَسُولُ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ عَلَيْكُمْ بِالشِّقَاءِ مِنَ الْعَسَلِ وَالْقُرْآنِ

Artinya:

“Telah menceritakan kepada kami Ali bin Salamah telah menceritakan kepada kami Zaid bin Al Hubbab telah menceritakan kepada kami Sufyan dari Abu Ishaq dari Abu Al Ahwash dari Abdullah dia berkata, "Rasulullah shallallahu 'alaihi wasallam bersabda: "Gunakanlah dua jenis terapi penyembuhan; madu dan Al Qur'an."

Aiman (2005) menyatakan bahwa penyembuhan dimulai dari Al – qur'an dan As – Sunnah akan tetapi diantara keduanya terdapat As – syifa atau hal lain yang bersangkutan dengan manusia salah satunya adalah madu seperti pada hadits di atas. Madu memiliki kemampuan menyingkirkan zat – zat yang dapat merusak lambung sehingga dapat dijadikan obat (Al – Jauziyyah, 2004). Kemampuan madu menjadi obat juga tak lepas dari adanya BAL yang terkandung di dalamnya. Beberapa BAL mampu memproduksi EPS yang memiliki beberapa manfaat di

bidang pangan dan kesehatan. Oleh karena itu diperlukan isolasi BAL penghasil EPS asal madu.

2.2. Madu Mangga

Madu mangga merupakan jenis madu monofloral karena terdiri dari satu jenis tanaman (Jaya, 2017). Madu mangga dihasilkan oleh lebah madu yang ditenakkan di hutan dan mengonsumsi nektar dari bunga mangga (*Mangifera indica* L.). Bunga mangga memiliki ciri subsessile, bertangkai jarang, dan memiliki bau yang manis (Yadav, dkk., 2018). Madu mangga memiliki manfaat sebagai peningkat daya tahan tubuh, peningkat fungsi otak, penghilang rasa mual, penyembuh luka bakar, memperlancar urin, dan mengobati anemia (Suranto, 2004). Taksonomi tanaman mangga adalah sebagai berikut (Yadav, dkk., 2018):

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Sapindales
Family	: Anacardiaceae-Sumac Family
Genus	: <i>Mangifera</i>
Spesies	: <i>Mangifera indica</i> L.

2.3. Bakteri Asam Laktat

BAL merupakan bakteri Gram positif, katalase negatif, tahan dari kondisi asam, bersifat fakultatif anaerob, dan termasuk bakteri yang tidak berspora (Widodo, 2017). BAL merupakan mikroba yang dapat memproduksi asam laktat dari peristiwa glikolisis pada kondisi anaerob dengan bahan utamanya berupa sumber gula (Romadhon, dkk., 2012).

BAL dibagi menjadi 2 kelompok yakni, homofermentatif dan heterofermentatif. BAL yang bersifat homofermentatif menghasilkan asam laktat

sebagai produk akhir utama. Proses awal yakni perombakan glukosa dibantu enzim aldolase yang akan menghasilkan gliseraldehid-3-P dan dihidroksiakton-P. selanjutnya gliseraldehid-3-P diubah menjadi asam piruvat dan diubah lagi menjadi dua molekul asam laktat. Sedangkan untuk kelompok heterofermentatif menggunakan enzim fosfoketolase dengan hasil akhir gliseraldehid-3-P dan asetil fosfat. Senyawa asetil fosfat kemudian dikonversi menjadi asetaldehid dan diubah menjadi asam laktat, etanol, asam asetat, dan produk samping lainnya (Surono, 2004).

Saat ini terdapat 12 genus BAL yang terkait dengan makanan antara lain (Zhang dan Cai, 2014):

1. *Lactobacillus*

Lactobacillus merupakan genus berisi bakteri Gram positif, tidak membentuk spora dan terkadang berperan sebagai pemecah nitrat. Selain itu, bakteri pada genus ini memiliki ciri katalase negatif ketika tumbuh di lingkungan dengan nutrisi kompleks seperti karbohidrat, asam amino, peptida, asam lemak ester, garam, turunan asam nukleat dan vitamin. Umumnya, bakteri yang termasuk dalam genus *Lactobacillus* akan menggunakan glukosa lewat fermentasi pada jalur glikolisis. Genus *Lactobacillus* pertama kali diperkenalkan pada tahun 1896 dari spesies *Lactobacillus delbrueckii*. Genus ini merupakan yang terbesar dan paling beragam dalam keluarga BAL karena terdapat 158 spesies tervalidasi (Zhang dan Cai, 2014).

2. *Lactococcus*

Lactococcus memiliki bentuk kokus, katalase negatif, termasuk dalam Gram positif, nonmotil, kelompok bakteri anaerob, dan menghasilkan L-(+)-asam laktat sebagai produk utama dari proses fermentasi glukosa. Bakteri yang termasuk

dalam genus *Lactococcus* umumnya memiliki morfologi sel berbentuk bulat atau lonjong dengan diameter 0,5–1 μm yang berpasangan maupun membentuk rantai. Sel dari bakteri–bakteri genus ini sering memanjang mengikuti arah rantai sehingga sulit dibedakan dengan bakteri dari genus *Lactobacillus*. *Lactococcus* merupakan jenis bakteri homofermentatif mikroaerofilik, di mana pertumbuhannya tidak dipengaruhi oleh aerasi atau adanya oksigen. Bakteri yang termasuk dalam genus ini dapat tumbuh optimal di pH menuju netral dan berhenti tumbuh pada pH sekitar 4,5 (Zhang dan Cai, 2014).

3. *Leuconostoc*

Kelompok bakteri dari genus ini memiliki ciri Gram positif, nonmotil, asporogen, anaerob fakultatif, selnya berbentuk elips hingga bulat, umumnya mengalami pemanjangan dan membentuk pasangan atau rantai. Bakteri dari genus *Leuconostoc* dapat ditemukan pada material tumbuhan, susu, produk sehari–hari, daging dan produk makanan lainnya. Saat ini terdapat 13 spesies yang termasuk dalam genus *Leuconostoc* (Zhang dan Cai, 2014).

4. *Oenococcus*

Menurut Endo dan Okada (2006) bakteri yang termasuk dalam genus ini merupakan bakteri Gram positif, bersifat asporogen, nonmotil, berukuran kecil, dan berbebtuk elips hingga kokus bulat. Genus ini umumnya ditemui secara berpasangan atau dalam bentuk rantai dan morfologi (Holzapfel dan Wood, 2014)

5. *Pediococcus*

Genus *Pediococcus* memiliki ciri antara lain Gram positif, katalase negatif dan oksidase. Bakteri yang termasuk dalam kelompok ini memiliki sel kokoid yang terbagi menjadi dua bidang membentuk tetrad serta tidak pernah membentuk rantai.

Sel dari bakteri genus ini umumnya tunggal atau berpasangan, terutama pada saat fase pertumbuhan logaritma tengah. Sel kokoid yang dimiliki oleh genus ini berbentuk bulat dan jarang ditemui dalam bentuk bujur telur dengan ukuran 0,6-1,0 μm . Selain itu, genus *Pediococcus* memiliki sifat nonmotil dan tidak membentuk spora, serta tidak berkapsul dan dicirikan sebagai Lys-D-Asp peptidoglikan. Sifat lain yang dimiliki adalah homofermentatif, yakni mampu memfermentasi karbohidrat melalui jalur Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) membentuk L(+) laktat (untuk spesies *Pediococcus argentinus* dan *Pediococcus claussenii*) dan DL(+) laktat pada spesies lain. Genus ini toleran terhadap konsentrasi garam yang tinggi yakni sekitar lebih dari 18% NaCl (w/v) dan dapat tumbuh di pH 9,0 namun tidak pada pH 5,0 (Zhang dan Cai, 2014).

6. *Streptococcus*

Genus *Streptococcus* berisi bakteri jenis Gram positif, nonmotil, berbentuk bulat atau bujur telur dan berpasangan maupun membentuk rantai ketika tumbuh pada media cair. Semua spesies di dalamnya bersifat fakultatif anaerob (tetapi beberapa membutuhkan tambahan CO₂ untuk pertumbuhan), tidak memiliki spora, katalase negatif dan homofermentatif. Beberapa spesies bakteri *Streptococcus* dinyatakan bersifat patogen pada hewan dan manusia dan beberapa sangat virulen (Zhang dan Cai, 2014).

7. *Tetragenococcus*

Holfzapfel dan Wood (2014) menyatakan bahwa genus *Tetragenococcus* memiliki bentuk sel bulat atau kokus berbentuk bulat telur dengan susunan tunggal, berpasangan maupun tetrad, serta nonmotil. Genus ini termasuk ke dalam Gram positif, katalase negatif, tidak membentuk spora, dan metabolisme fermentatif.

8. *Vagococcus*

Genus ini memiliki bentuk sel kokus dengan susunan tunggal, berpasangan maupun rantai pendek, motilitasnya tergantung spesies (*Vagococcus lutrae*, *Vagococcus camphilus*, dan *Vagococcus fluvisilis* bersifat motil) dan termasuk Gram positif, katalase negatif, tidak membentuk spora dengan metabolisme fermentatif (Holzapfel dan Wood, 2014).

9. *Weisella*

Ciri-ciri dari genus ini antara lain, Gram positif, tidak membentuk spora, heterofermentatif dan umumnya non motil. Strain pada genus ini terbagi menjadi dua yakni asporogen batang pendek dengan runcing di bagian ujung atau seperti bujur telur, baik tunggal, berpasangan maupun dalam rantai pendek. Genus ini merupakan bakteri yang bersifat heterofermentatif dengan memfermentasi karbohidrat melalui jalur heksomonofosfat dan fosfoketolase menjadi CO₂, etanol dan asetat. Bakteri jenis ini tumbuh dengan baik pada suhu 15 °C dan memiliki pertumbuhan optimum pada suhu 42–45 °C. Selain itu beberapa spesies mampu menghasilkan dextran antara lain, *Weisella kandler*, *Weisella confusa*, *Weisella koreensis*, *Weisella ghanensis*, *Weisella beninensis*, *Weisella fabaria*, *Weisella oryzae* dan *Weisella fabalis* (Zhang dan Cai, 2014).

10. *Enterococcus*

Kata “*enterocoque*” atau “*enterococi*” pertama kali digunakan oleh Thiercelin dan Jouhaud pada tahun 1899 untuk mendeskripsikan bakteri gram positif baru yang memiliki bentuk diplococcal asal usul yang kemudian termasuk dalam genus *Enterococcus* sebagai jenis isolat dari spesies *Enterococcus proteiformis*. Bakteri dari genus *Enterococcus* memiliki ciri-ciri berbentuk kokus, termasuk ke dalam

bakteri Gram positif, bereaksi negatif terhadap katalase, dapat hidup di 6,5% (w/v) media NaCl, dan tumbuh baik dalam media berisi 0,04% natrium azida (media selektif isolasi pada genus *Enterococcus*) (Zhang dan Cai, 2014).

11. *Carnobacterium*

Bakteri yang termasuk dalam genus ini memiliki ciri yakni Gram positif, berbentuk batang, katalase negatif dan tidak membentuk spora (Zhang dan Cai, 2014). Genus ini pertama kali diperkenalkan oleh Collins, dkk., (1987) untuk mengelompokkan grup dari strain *atypical lactobacilli* yang diisolasi dari daging kemasan vakum yang dapat tumbuh di agar asetat.

12. *Aerococcus*

Menurut Zhang dan Cai (2014), genus ini memiliki kelompok bakteri Gram positif, bersifat mikroaerofilik dan katalase negatif. Bakteri yang termasuk dalam genus *Aerococcus* memiliki sel kokoid yang berbeda dengan genus *Streptococcus* terutama pada susunan sel tetradnya. Genus *Aerococcus* dapat ditemukan di berbagai lingkungan seperti udara, debu, tumbuh-tumbuhan, air garam pengawet daging, tanah, saluran pernafasan manusia dan sumber kelautan.

2.4. Identifikasi Bakteri Asam Laktat

2.4.1. Pengamatan Makroskopis

Identifikasi bakteri dapat dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi bakteri dilakukan dengan pengamatan warna, bentuk, permukaan, dan tepi koloni. Pengamatan bentuk koloni dilakukan dengan melihat dari atas, permukaan koloni dilihat dari samping, tepi koloni dilihat dari atas (Djiwoseputro, 2005).

2.4.2. Uji Pewarnaan Gram

Identifikasi mikroskopik dapat dilakukan dengan pewarnaan Gram dan uji katalase. Uji pewarnaan Gram dilakukan berdasarkan kemampuan dari dinding sel dalam mengikat warna dasar (kristal violet) setelah dibilas dengan alkohol 95% (Nasution, dkk., 2017). BAL termasuk dalam golongan Gram positif, yaitu memiliki susunan dinding sel peptidoglikan yang lebih tebal dibanding bakteri Gram negatif. Peptidoglikan yang tersusun atas ikatan tiga dimensi dari gula amino *N-acetylglucosamine* dan *N-acetyl murmaric acid* dan akan mempertahankan kristal violet karena memiliki kekuatan mekanik dinding sel sel yang lebih kuat (Hamidah, dkk., 2019).

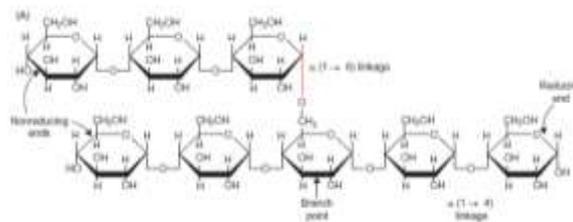
2.4.3. Uji Katalase

Uji katalase bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memecah H_2O_2 . BAL merupakan golongan bakteri katalase negatif. Suhaeni dan Akhmad (2016) menyatakan bahwa BAL merupakan katalase negatif karena tidak memiliki enzim katalase untuk memecah hidrogen peroksida.

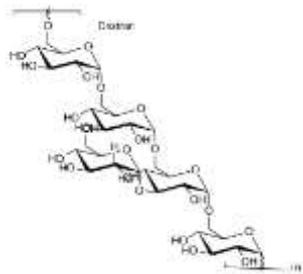
2.5. Eksopolisakarida (EPS)

Eksopolisakarida (EPS) merupakan polimer gula atau polisakarida yang disekresikan oleh mikroba ke luar sel dinding bakteri (Zubaidah, 2008), jamur dan alga (De Vuyst, dkk., 2001). Penyusun utama dari unit gula pada EPS antara lain glukosa, galaktosa, dan rhamnosa dengan rasio berbeda (Welman dan Maddox, 2003). EPS umumnya terdiri dari monosakarida dan beberapa substituen non karbohidrat seperti, asetat, piruvat, suksinat, fosfat (Van Hijum, dkk., 2002) serta biomolekul seperti protein, asam nukleat, lipid dan zat humat (Vu, dkk, 2009).

EPS berbeda dengan polisakarida yang dapat ditinjau dari ikatannya. Salah satu contoh polisakarida adalah glikogen yang banyak terdapat pada jaringan otot dan hati dan memiliki ikatan α -1, 4 glikosidik dan cabang α -1, 6 glikosidik yang ditunjukkan pada gambar 2.1 (Crichton, 2019). Sedangkan dekstran sebagai kelompok EPS memiliki ikatan α -1, 6 glikosidik antar molekul glukosa dan memiliki cabang di α -1, 3 glikosidik (Oliveira, 2008) yang ditunjukkan pada gambar 2.2.



Gambar 2.1 Struktur Glikogen (Crichton, 2019)



Gambar 2.2 Struktur Dekstran (Schmid, dkk., 2015)

Salah satu mikroba yang mensekresikan EPS adalah BAL (Imran, dkk., 2016). Polimer ini disekresikan oleh bakteri ke luar lingkungan saat mengalami kondisi yang tidak menguntungkan. Kondisi ini diakibatkan oleh cekaman lingkungan dan membuat bakteri membentuk perlindungan diri dengan mensekresikan EPS. EPS juga berperan untuk memberikan perlindungan pada sel

bakteri terhadap bakteriofag, fagositis, stress osmotik, senyawa beracun dan pembentukan biofilm (Giyatno & Retnaningrum, 2020). EPS juga memiliki manfaat sebagai pemberi rasa, tekstur, dan persepsi rasa pada produk fermentasi sehingga dimanfaatkan sebagai pengental, pembuat gel, dan pengemulsi (Silalahi, 2006).

2.6. Biosintesis Eksopolisakarida

EPS disintesis pada fase-fase pertumbuhan yang berbeda dengan kondisi yang bervariasi dan bergantung pada jenis mikroorganismenya. Proses sintesis dapat dibagi menjadi dua yakni tempat sintesis dan prekursor alami misalnya sintesis di luar dinding sel atau pada membran sel. Sintesis heteropolisakarida (HePS) berbeda dengan sintesis monosakarida yang disintesis pada membran sitoplasma dengan memanfaatkan prekursor yang terbentuk intraseluler. Sedangkan sintesis HePS terdapat peran penting dari gula nukleotida pada tahap interkonversi monosakarida atau disakarida (gula) sebaik aktivasi gula untuk kebutuhan polimerisasi monosakarida menjadi polisakarida (Cerning, 1990).

EPS disintesis oleh bakteri Gram-positif dan Gram-negatif dengan mekanisme yang berbeda. EPS yang dihasilkan oleh bakteri Gram-positif, seperti levan, alternan dan dextran disintesis secara ekstraseluler (Vanhooren, dkk, 1999), sedangkan bakteri gram-negatif mensintesis EPS secara intraseluler dengan produk seperti xanthan, gellan, selulosa, dan suksinoglikan (Sutherland, 2001).

Produksi eksopolisakarida diawali dengan gula (monosakarida maupun disakarida) ke dalam fosfotransferase sistem spesifik (PEP-PTS dan permease) yang tersaji dalam gambar 2.3. Sukrosa kemudian dirubah menjadi sukrosa 6-P

dengan bantuan katalis enzim MannA (mannosa 6-fosfat isomerase). Kemudian mannososa 6-P menjadi mannososa 1-P dikatalisis oleh enzim MannB (fosfomannomutase). Selanjutnya mannososa 1-P diubah menjadi GDP-mannosa dengan bantuan enzim Gtp (mannosa 1-fosfat guaniltransferase), GDP-mannosa kemudian menjadi GDP-4-dehidro-6-deoksimannosa dikatalisis oleh enzim Gmd (GDP-mannosa-4,6-dehidratase). GDP-4-dehidro-6-deoksimannosa berubah menjadi GDP fukosa dibantu dengan enzim GDP-fukosasintase, kemudian nukleotida gula berupa GTF (glikosiltransferase) berperan untuk menggabungkan monosakarida-monosakarida yang melakukan pengulangan unit hingga membentuk HePs.

Biosintesis EPS dengan substrat glukosa diawali dengan pembentukan glukosa-6-fosfat, yakni senyawa intermediet yang menghubungkan jalur anabolik pembentukan EPS dan glikolisi. Selanjutnya terjadi aliran karbon yang dibagi menjadi dua yakni fruktosa-6-fosfat menuju pembentukan produk glikolisis, biomassa, dan ATP, serta masuk ke tahapan biosintesis gula nukleotida (prekursor EPS). G-6-P diubah menjadi G-1-P (senyawa yang menjadi titik cabang pembentukan gula nukleotida UDP-glukosa dan dTDP-glukosa) dengan bantuan enzim phosphoglutcomutase (PGM). Gula nukleotida tersebut merupakan gula prekursor dalam pembentukan polisakarida di dalam sel dan membutuhkan enzim glikosiltransferase. EPS yang disintesis dalam sel BAL disusun ulang dari monosakarida dengan bantuan enzim spesifik. Gula – gula tersebut kemudian membentuk ikatan dan terjadi pengulangan. Hal ini terjadi dengan bantuan enzim glikosiltransferase dan kemudian menghasilkan EPS (Welman dan Maddox, 2003).

2.7. Faktor–Faktor yang Mempengaruhi Produksi Eksopolisakarida

Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi kinerja bakteri dalam memproduksi eksopolisakarida (EPS) antara lain:

1. Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor yang penting dalam pertumbuhan mikroba. Suhu fermentasi yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan suatu mikroba dan enzim mengalami kerusakan atau denaturasi. Sedangkan pada suhu yang rendah dapat mempengaruhi kinerja mikroba dan enzim menjadi sangat lambat dan akan kembali normal pada suhu 45°C (Haroun, dkk., 2013). Bakteri asam laktat menghasilkan EPS optimal pada suhu 30-37°C (Badel, dkk., 2011).

2. Jenis Substrat

Jenis substrat merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi produksi EPS. Panthavee, dkk., (2017) menyatakan bahwa bakteri *Lactobacillus amylovarus* memproduksi EPS secara optimum dengan substrat berupa fruktosa dengan rendemen sebesar 113% sedangkan *Pediococcus pentosaceus* pada substrat galaktosa dengan rendemen sebesar 113%.

3. pH Media

pH merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi kondisi fermentasi BAL dalam memproduksi EPS. Setiap bakteri memiliki pH optimum yang spesifik. Zisu dan Shah (2003) menyatakan bahwa bakteri *Streptococcus thermophilus* 1275 bekerja optimum dalam memproduksi EPS pada pH 5,5 dengan rendemen 0,832 g/L.

4. Konsentrasi Substrat

Kecepatan reaksi enzimatik dipengaruhi oleh konsentrasi substrat yang digunakan. Kecepatan reaksi akan meningkat sejalan dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Hal ini terjadi hingga mencapai titik batas akhir reaksi (Lehninger, 1997). Tranggono (1990) menyatakan bahwa kenaikan konsentrasi substrat tidak berpengaruh terhadap kecepatan reaksi karena semua molekul enzim telah membentuk ikatan kompleks dengan substrat.

5. Konsentrasi inokulum

Inokulum merupakan biakan bakteri yang dimasukkan ke dalam media cair yang siap digunakan untuk fermentasi (Pelczar, dkk., 2007). Kadar inokulum mampu mempengaruhi hasil fermentasi. Kenaikan konsentrasi inokulum akan mempercepat dan menambah pembentukan EPS, tetapi jika konsentrasi inokulum terlalu besar akan menyebabkan fermentasi tidak efisien (Franca, 2009).

6. Lama fermentasi

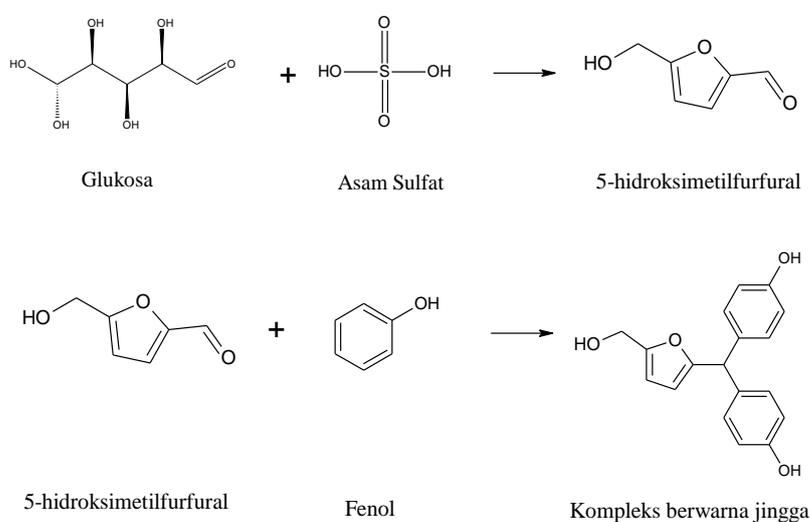
Fermentasi merupakan tahap dalam produksi EPS sehingga waktu fermentasi sangat mempengaruhi hasil dari produk EPS. Haroun, dkk., (2013) menyatakan lama fermentasi optimum pada produksi EPS oleh bakteri *Lactobacillus plantarum* NRLL B-4496 adalah selama 24 jam dengan rendemen sebesar 0,65 g/L.

2.8. Pengukuran Kadar Gula Total dengan Metode Asam Sulfat

Metode sulfat fenol merupakan metode simpel yang menggunakan analisis secara kolorimetrik untuk mengetahui kadar gula total pada suatu sampel. Metode ini juga dapat mendeteksi monosakarida, disakarida, oligosakarida, dan polisakarida (Nielsen, 2017). Metode sulfat fenol banyak digunakan dalam analisis

kadar gula total karena kesensitifannya dan tidak rumit (Masuko, dkk., 2005). Metode ini memiliki prinsip yaitu karbohidrat akan terdehidrasi saat bereaksi dengan asam sulfat pekat akan menghasilkan turunan fulfural yang kemudian akan menghasilkan warna tertentu saat bereaksi dengan fenol (Quero-Jimenez, dkk., 2019).

Meskipun mampu mendeteksi banyak jenis karbohidrat, tetapi metode ini akan menunjukkan absorptivitas yang berbeda di setiap jenis karbohidrat. Asam sulfat akan memecah polisakarida, oligosakarida dan disakarida menjadi monosakarida. Sedangkan pentosa menjadi senyawa fulfural dan heksosa menjadi senyawa hidroksi metil fulfural yang kemudian akan bereaksi dengan fenol membentuk warna jingga kekuningan (Nielsen, 2017). Intensitas warna yang terbentuk berbanding lurus dengan banyaknya fenol yang ditambahkan saat reaksi, sehingga saat konsentrasi fenol naik maka absorbansi akan meningkat pula (Dubois, dkk., 1956). Reaksi glukosa dengan penambahan asam sulfat dan fenol berlangsung secara eksotermis ditandai dengan panas yang dihasilkan serta memiliki reaksi yang ditunjukkan pada gambar 2.4 (Lewkowski, 2001):



Gambar 2.4 Reaksi pembentukan kompleks fenol-fulfural

Lewkowski (2001) menyatakan bahwa pemberian fenol pada metode ini dipengaruhi oleh konsentrasi, waktu, dan volume yang ditambahkan serta pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 490 nm.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2021 sampai Januari 2022 di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

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

3.2.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya madu mangga yang didapatkan dari Peternakan Lebah Pondok Asyiq Pasuruan, *de Man Rogose Sharpe Agar* (MRSA) (Merck), *de Man Rogose Sharpe Broth* (MRSB)(Merck), *buffered peptone water* (Merck), glukosa (Merck), fruktosa (Himedia), sukrosa (Pronadisa), pepton, ekstrak ragi, K_2HPO_4 , $CaCl_2 \cdot 2H_2O$,

MgSO₄.7H₂O, NaCl, NaOH, HCl, CaCO₃, etanol absolut 95%, alkohol 70% sebagai desinfektan, asam sulfat pekat 98%, fenol, aquades, safranin, lugol, kapas, kertas label, kertas saring halus, aluminium foil, plastik wrap, plastik, dan karet.

3.2.3. Rancangan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis bakteri asam laktat penghasil eksopolisakarida dari madu mangga (*Mangifera indica*) dan bagaimana kemampuannya dalam memproduksi eksopolisakarida (EPS) pada berbagai media. Penelitian ini terdiri dari dua tahap, tahap pertama yaitu melakukan isolasi BAL penghasil EPS dari madu mangga. Sedangkan tahap kedua yaitu produksi EPS oleh BAL penghasil EPS pada sumber gula terpilih. Perlakuan pada penelitian ini terdapat pada skrining BAL penghasil EPS di berbagai sumber gula yaitu glukosa, fruktosa dan sukrosa yang tersaji pada Tabel 3.1 berikut ini:

Tabel 3.1 Perlakuan Skrining BAL penghasil EPS di berbagai sumber gula

Isolat Bakteri	Sumber Gula		
	Glukosa	Fruktosa	Sukrosa

Selanjutnya, BAL penghasil EPS dengan rendemen EPS tertinggi pada sumber gula terpilih dilanjutkan produksi EPS media produksi semi sintesis.

Analisa dalam karakterisasi BAL penghasil EPS meliputi skrining BAL penghasil EPS, karakter makroskopis (bentuk, tepi, dan elevasi) dan mikroskopis (pewarnaan Gram dan uji katalase). Sedangkan analisa tahap dua meliputi rendemen EPS dan kadar total gula.

3.3. Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui tahapan-tahapan berikut:

1. Sterilisasi Alat
2. Pembuatan Media
3. Isolasi BAL
4. Regenerasi BAL
5. Skrining BAL Penghasil EPS Secara Kualitatif
6. Skrining BAL penghasil EPS Secara Kuantitatif
7. Identifikasi BAL
8. Pembuatan Inokulum
9. Produksi Eksopolisakarida oleh BAL Penghasil EPS Terpilih
10. Ekstraksi Eksopolisakarida
11. Penentuan Kadar Gula Total Menggunakan Metode Sulfat Fenol
12. Analisis data

3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Sterilisasi Alat

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

3.4.2. Pembuatan Media

3.4.2.1. Pembuatan Media MRS Agar (*de Man Rogosa and Sharpe Agar*) (Fardiaz, 1992 Termodifikasi)

Media MRS agar dibuat dengan ditimbang sebanyak 6,82 gram MRS agar ditambahkan CaCO_3 0,5% (0,5 gram), dilarutkan ke dalam 100 mL aquades, dan dipanaskan hingga mendidih dan diaduk sampai larut. Selanjutnya media tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL, kemudian disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan sebesar 15 psi. Kemudian, Larutan didinginkan dalam tabung reaksi pada keadaan miring hingga memadat.

3.4.2.2. Pembuatan Media MRSB (*de Man Rogosa and Sharpe Broth*)

Media MRSB dibuat dengan ditimbang sebanyak 5,52 gram MRSB kemudian ditambahkan 100 mL aquades dan dipanaskan hingga mendidih serta diaduk hingga larut. Kemudian media dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL serta disterilisasi ke dalam *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 20 menit.

3.4.2.3. Media *Buffered Pepton Water*

Sebanyak 12,75 gram *peptone water* dilarutkan ke dalam 500 mL aquades kemudian diaduk hingga larut. Setelah itu dimasukkan 50 mL ke dalam erlenmeyer dan ditutup kapas. Kemudian media disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.4.2.4. Media Produksi Eksopolisakarida Semi Sintesis (Dharmik dan Narkhede, 2020)

Pembuatan media semi sintesis untuk produksi EPS dengan ditimbang sukrosa 5 gram, pepton 0,5 gram, ekstrak ragi 0,5 gram, K_2HPO_4 1,5 gram,

CaCl₂·2H₂O 0,005 gram, MgSO₄·7H₂O 0,001 gram, dan NaCl 0,001 gram. Campuran media kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquades. pH media diatur hingga mencapai 6,5. Bila media terlalu asam ditambahkan NaOH 0,1 N dan apabila terlalu basa ditambahkan HCl 0,1 N beberapa tetes. Media dipanaskan hingga mendidih dan larut sempurna. Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan disterilisasi pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 20 menit.

3.4.3. Isolasi BAL (Maunatin, dkk., 2020 Termodifikasi)

Sebanyak 10 gram madu dicampurkan dengan 90 mL *Buffered Peptone Water* (BPW) ke dalam gelas beaker. Kemudian madu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu dilakukan isolasi BAL dengan mengambil 1 mL sampel ke dalam 9 mL BPW ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan. Pengenceran dilakukan berulang hingga 10⁻¹⁰ kemudian dipipet 1 ml dari pengenceran 10⁻¹ hingga 10⁻¹⁰ ke dalam MRS agar tersuplementasi 0,5% CaCO₃ secara *pour plate* yang secara duplo. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Isolat yang menghasilkan zona bening kemudian dipurifikasi dengan teknik *quadrant streak plate* pada media MRS agar.

3.4.4. Regenerasi BAL (Kultsum, 2009)

Kultur BAL asal madu diambil 2 ose dan digoreskan pada MRS agar posisi miring. Kemudian media berisi kultur BAL diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Kultur yang telah diregenerasi dapat digunakan dan diremajakan setiap 2 minggu sekali. Kultur BAL yang telah diremajakan dapat digunakan untuk pembuatan stok inokulum.

3.4.5. Skrining BAL Penghasil Eksopolisakarida

3.4.5.1. Skrining BAL Penghasil EPS Secara Kualitatif (Benhoua, dkk., 2019 Termodifikasi)

Kultur BAL yang sudah diisolasi kemudian dimasukkan ke dalam MRS agar yang tersuplementasi 10% (b/v) sumber gula (fruktosa, glukosa, dan sukrosa). Media kemudian diinkubasi di suhu 30°C selama 48 jam. Setelah itu diamati penebalan koloni pada media MRS agar. Penebalan koloni pada media MRS agar tersuplementasi berbagai sumber gula menunjukkan BAL memiliki kemampuan memproduksi EPS dalam media gula tersebut. BAL terpilih sebagai penghasil EPS akan dilanjutkan pada proses skrining secara kuantitatif dan diidentifikasi secara makroskopis serta mikroskopis.

3.4.5.2. Skrining BAL Penghasil EPS Secara Kuantitatif (Maunatin, dkk., 2020 dan Seo, dkk., 2015 Termodifikasi)

Sebanyak 1 mL nokulum dari isolat BAL yang sudah diskriminasi secara kualitatif dimasukkan dalam 9 mL media MRSB tersuplementasi 10% (b/v) sumber gula (fruktosa, glukosa, dan sukrosa). Media beiris inokulum kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Filtrat dipisahkan dengan cara disentrifugasi menggunakan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Kemudian dilanjutkan dengan ekstraksi EPS seperti prosedur 3.4.9.

3.4.6. Identifikasi Bakteri Asam Laktat

3.4.6.1. Identifikasi Makroskopik (Vanmeter dan Hubert, 2015)

Identifikasi makroskopik dilakukan dengan mengamati koloni yang tumbuh pada MRSA meliputi warna, bentuk, tepi, dan elevasi.

3.4.6.2. Pewarnaan Gram (Hadioetomo, 1993)

Kaca preparat terlebih dahulu dibersihkan menggunakan alkohol dan dipanaskan di dekat nyala api. Isolat bakteri diteteskan pada kaca preparat menggunakan mikropipet dan selanjutnya dipanaskan di dekat api hingga isolat kering. Kemudian isolat ditetesi kristal ungu, didiamkan selama 1 menit dan dicuci dengan aquades. Hasil pewarnaan kemudian ditetesi dengan lugol, didiamkan selama 2 menit dan dicuci menggunakan aquades. Kemudian ditetesi etanol dan dicuci dengan aquades. Selanjutnya ditetesi safranin dan didiamkan selama 1 menit kemudian dicuci menggunakan aquades dan diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x untuk mengetahui jenis Gram dan bentuk sel BAL penghasil EPS. Hasil Gram positif akan menunjukkan warna ungu/biru sedangkan Gram negatif berwarna merah/oranye.

3.4.6.3. Uji Katalase (Hadioetomo, 1993)

Isolat bakteri diletakkan pada kaca preparat, kemudian diteteskan 3% hidrogen peroksida (H_2O_2) diteteskan pada gelas objek. Langkah terakhir, dihomogenkan secara perlahan dan diamati ada atau tidaknya gelembung udara yang terbentuk. Jika terbentuk gelembung udara termasuk bakteri katalase positif namun jika tidak terbentuk gelembung maka termasuk katalase negatif.

3.4.7. Pembuatan Inokulum (Maunatin, dkk., 2020)

Isolat bakteri asam laktat penghasil EPS asal madu diinokulasi ke dalam 20 ml MRSB kemudian diinkubasi di suhu $37^\circ C$ selama 16 jam. Kekeruhan inokulum BAL asal madu disetarakan dengan *optical density* (OD) 0,5 pada panjang gelombang 600 nm.

3.4.8. Produksi Eksopolisakarida Oleh BAL Penghasil EPS Terpilih dalam Media Semi Sintesis (Maunatin, dkk., 2020 Termodifikasi)

Produksi EPS menggunakan media semi sintesis sebanyak 100 mL yang tersusun dari 5% (b/v) sumber gula terpilih, 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 ditambahkan inokulum BAL penghasil EPS terpilih asal madu sebanyak 10% (10 mL) dan diinkubasi di suhu 37°C selama 24 jam.

3.4.9. Ekstraksi Eksopolisakarida (Seo, dkk., 2015 Termodifikasi)

Media hasil fermentasi diambil sebanyak 40 disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Diambil supernatan yang mengandung EPS dan ditambahkan dengan etanol absolut 95% (2x volume supernatan) serta didiamkan pada suhu 4°C selama 24 jam. Kemudian endapan EPS diambil dengan cara disentrifugasi 4°C di kecepatan 5000 rpm selama 20 menit dan dikeringkan pada suhu 60°C selama 6 jam.

Kadar eksopolisakarida kering ditentukan dengan menggunakan rumus :

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

3.4.10. Penentuan Kadar Gula Total Menggunakan Metode Sulfat Fenol (Dubois, dkk., 1956)

3.4.10.1. Pembuatan Kurva Standar dengan Metode Sulfat Fenol

Larutan glukosa standar yang mengandung 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm glukosa dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan 1 mL larutan fenol 5% (b/v) dan dikocok. Selanjutnya 5 mL

asam sulfat pekat ditambahkan dengan cepat di lemari asap. Larutan di dalam tabung reaksi dibiarkan selama 10 menit, dikocok lalu ditempatkan dalam penangas air selama 15 menit. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm.

3.4.10.2. Penetapan Kadar Gula Total dengan Metode Sulfat Fenol

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

3.4.11. Analisis Data

Data yang didapat dari penelitian tahap satu yaitu karakter makroskopis (bentuk, tepi, dan elevasi) dan mikroskopis (pewarnaan Gram dan uji katalase) Sedangkan data dari tahap dua yaitu rendemen EPS dan kadar gula total dianalisis secara deskriptif dengan diinterpretasikan sesuai data yang ada.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

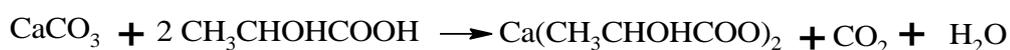
4.1. Pembuatan Media

Media *de Man Rogosa Sharpe* (MRS) merupakan media standar untuk pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL) karena kandungan sumber C, N dan P dapat menghasilkan peningkatan pertumbuhan dan kepadatan sel (Subagio, dkk., 2015). Menurut kandungannya, media MRS dibagi menjadi dua antara lain MRS agar dan MRS Broth (MRSB). Media MRS agar dan MRSB memiliki perbedaan pada kandungan agar di dalamnya yang membuat media MRS agar memadat ketika dingin (Man, 1960).

MRS agar digunakan untuk isolasi, regenerasi, serta memberi nutrisi BAL pada fase padat (Khairunnisa dan Pato, 2016). Penelitian ini juga menggunakan MRS agar tersuplementasi 0,5% CaCO₃ untuk skrining BAL pada proses isolasi. Media MRS agar juga digunakan pada tahap skrining BAL penghasil eksopolisakarida (EPS) yang ditambahkan berbagai sumber gula untuk deteksi awal terbentuknya EPS (Benhoua, dkk., 2019). Sedangkan media MRSB digunakan untuk memberi nutrisi, pembuatan inokulum pada media cair dan skrining BAL penghasil EPS secara kuantitatif dengan menambahkan berbagai sumber gula. Media produksi juga menggunakan media semi sintesis. Kandungan media produksi semi sintesis mengikuti penelitian Dharnik dan Narkhede (2020) karena mempunyai kesamaan sumber karbon untuk memproduksi EPS.

4.2. Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL)

Isolasi BAL dari madu mangga dilakukan dengan mengambil 10 gram madu dan dicampurkan dengan 90 ml media *Buffered Peptone Water* (BPW) (pengenceran 10^{-1}). Selanjutnya campuran media BPW dan madu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan dilanjutkan dengan pengenceran 10^{-2} sampai dengan 10^{-10} . Pengenceran bertingkat dilakukan untuk mengurangi kepadatan bakteri (Rukmana dan Zulaika, 2017). Pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-10} ditanam sebanyak 1 ml ke dalam media MRS agar tersuplementasi 0,5% CaCO_3 dengan metode tuang (*pour plate*) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Media MRS agar tersuplementasi CaCO_3 merupakan media selektif untuk BAL yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening pada koloni bakteri yang tercantum pada Gambar 4.1. Reaksi antara asam laktat yang disekresikan oleh BAL dengan CaCO_3 dan membentuk kalsium laktat yang larut dalam media sehingga membentuk zona bening pada media (Putri, dkk., 2020). Reaksi dehidrasi antara CaCO_3 dengan asam laktat sebagai berikut (Meghana, dkk., 2021):



Sebanyak 8 isolat yang membentuk zona bening dimurnikan menggunakan metode *quadrant streak* untuk mendapatkan koloni tunggal dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Koloni tunggal diregenerasi pada media MRS agar miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam kemudian disimpan dalam suhu 2°C .

4.3. Regenerasi Bakteri Asam Laktat

Regenerasi bakteri bertujuan untuk menumbuhkan kembali bakteri pada media baru. Regenerasi bakteri berfungsi untuk mengaktifkan kembali bakteri serta untuk memulai kembali metabolisme setelah proses penyiapan (Wijayati, 2014). Mahmudah, dkk., (2016) menyatakan bahwa regenerasi bakteri memiliki fungsi untuk meregenerasi sel, menjaga nutrisi, dan menghindari perubahan karakteristik dari bakteri.

Regenerasi bakteri pada penelitian menggunakan media MRS agar miring dengan metode gores. Metode gores adalah sebuah teknik yang sederhana dan paling praktis untuk mengamati bakteri pada media (Machmud, 2001). Delapan isolat BAL hasil isolasi dari madu mangga yaitu A, B, C D, E, F, G, dan H diregenerasi pada media MRS agar miring. Delapan isolat tersebut kemudian ditanam sebanyak 2 ose dan digoreskan pada MRS agar miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Pertumbuhan dari masing-masing bakteri ditandai dengan terbentuknya koloni berwarna putih pada media sesuai dengan goresan saat regenerasi. Hasil regenerasi ditampilkan pada Gambar 4.2.

4.4. Skrining Bakteri Asam Laktat (BAL) Penghasil Eksopolisakarida (EPS)

4.4.1. Skrining Bakteri Asam Laktat (BAL) Penghasil Eksopolisakarida

(EPS) Secara Kualitatif

Skrining BAL penghasil EPS secara kualitatif dilakukan untuk mengetahui kemampuan BAL dalam memproduksi EPS pada media padat yang ditandai dengan munculnya lendir pada pinggiran koloni bakteri (Vijayan, dkk., 2012). Isolat BAL asal madu kemudian diuji secara kualitatif pada media MRS agar dengan tambahan

sumber gula antara lain fruktosa, glukosa dan sukrosa. Penambahan sumber gula berfungsi sebagai sumber bahan baku pembentukan EPS.

Isolat BAL pada penelitian ini menunjukkan kemampuan tumbuh yang berbeda pada media MRS agar dengan tambahan 10% berbagai sumber gula yaitu pada penebalan koloni BAL. Ketebalan koloni pada masing-masing isolat BAL menunjukkan isolat mampu memproduksi EPS. Hasil menunjukkan bahwa isolat BAL asal madu memiliki karakter dalam memproduksi EPS yang berbeda seperti yang tersaji dalam Tabel 4.1. Gambar hasil skrining BAL penghasil EPS pada media MRS agar dan berbagai sumber gula terlampir pada Gambar L.4.2. Hal ini terjadi karena perbedaan genotip dari masing-masing isolat (Maunatin, dkk., 2020).

Isolat BAL yang koloninya menebal dengan kode (++) kemudian dilanjutkan pada tahap skrining secara kuantitatif. Isolat A, D, G, dan H dilanjutkan pada tahap skrining secara kuantitatif karena mampu tumbuh dan koloninya menebal pada media agar tersuplementasi berbagai sumber gula.

4.4.2. Skrining Bakteri Asam Laktat (BAL) Penghasil Eksopolisakarida

(EPS) Secara Kuantitatif

Isolat A, D, G, dan H dari skrining kualitatif selanjutnya diuji secara kuantitatif dengan melakukan produksi EPS pada media cair MRSB yang tersuplementasi oleh berbagai sumber gula. Produksi EPS dilakukan dengan menambahkan 10% inokulum dari masing-masing isolat ke dalam media MRSB yang ditambahkan 10% berbagai sumber gula. Penggunaan media MRSB dipilih karena merupakan media selektif dan standar untuk BAL (Subagio, dkk., 2015). Setelah itu media produksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Inkubasi 24

jam dipilih karena untuk mencapai fase stasioner bakteri untuk memproduksi metabolit sekunder.

Pemisahan EPS dari membran sel dilakukan dengan cara sentrifugasi. Filtrat yang bebas dari membran sel ditambahkan etanol absolut 95% dingin dua kali volume filtrat untuk pengendapan EPS. Penggunaan etanol absolut 95% karena etanol memiliki konstanta dielektrik yang lebih rendah dari air sedangkan gugus hidroksil pada polisakarida menyebabkan sifat polar dan tidak larut dalam etanol, sehingga dengan meningkatnya volume etanol mengakibatkan kelarutan dari polisakarida menurun dan mengendap (Klinchongkon, dkk., 2019). EPS yang terbentuk dikeringkan pada suhu 60°C untuk menghilangkan pelarut yang masih menempel.

Penentuan rendemen EPS dilakukan dengan cara gravimetri yang memanfaatkan berat konstan dari EPS. Perhitungan rendemen EPS pada skrining secara kuantitatif terlampir pada Tabel L.3.5. Berdasarkan Tabel 4.2 ditemukan bahwa isolat A, D, G dan H mampu menghasilkan EPS di berbagai sumber gula sehingga diprediksikan termasuk dalam golongan bakteri heterofermentatif. Bakteri heterofermentatif mampu menghasilkan asam laktat yang sedikit dan produk samping yang dihasilkan berupa etanol, asam asetat, dan asam format (Moat, dkk., 2002). Hasil skrining secara kuantitatif menunjukkan bahwa rendemen tertinggi di media tersuplementasi sukrosa adalah isolat A dengan rendemen sebesar 1,58 g/L, kemudian media fruktosa oleh isolat G dengan rendemen sebesar 0,51 g/L dan isolat G pada media glukosa dengan rendemen sebesar 0,56 g/L. Pemilihan isolat terbaik dalam memproduksi EPS didasarkan pada rendemen EPS tertinggi tanpa memperdulikan sumber gula. Nudyanto dan Zubaidah, (2015)

menyatakan pemilihan isolat terbaik pada produksi EPS yaitu isolat yang berpotensi menghasilkan EPS terbanyak. Hasil skrining secara kuantitatif menunjukkan isolat A memiliki rendemen tertinggi dibanding isolat lain yang kemudian dilanjutkan pada proses produksi EPS dalam skala besar.

4.5. Identifikasi Bakteri Asam laktat (BAL) Penghasil Eksopolisakarida (EPS)

4.5.1. Identifikasi Makroskopik

Identifikasi makroskopik pada penelitian ini dilakukan melalui pengamatan morfologi meliputi bentuk koloni, permukaan koloni, tepi koloni dan warna koloni bakteri. Pengamatan bentuk koloni dengan melihat dari atas, permukaan koloni dilihat dari samping, tepi koloni dilihat dari atas (Djiwoseputro, 2005). Hasil isolasi BAL asal madu menunjukkan karakter morfologi yang ditampilkan pada Tabel 4.3.

4.5.2. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram pada isolat bakteri bertujuan untuk membedakan jenis bakteri berdasarkan dinding sel penyusunnya. Prinsip dari pewarnaan Gram adalah kemampuan dari dinding sel dalam mengikat zat warna dasar (kristal violet) setelah dibilas dengan alkohol 95% (Nasution, dkk., 2017). Sel-sel yang tidak mampu melepaskan warna dasar akan tetap berwarna biru-ungu seperti kristal violet disebut Gram positif (Fardiaz, 1992). Bakteri Gram positif memiliki peptidoglikan yang lebih banyak pada dinding selnya jika dibandingkan bakteri Gram negatif (Reith dan Mayer, 2011). Presskott, dkk., (1999) menambahkan bahwa ketebalan dinding sel bakteri Gram positif sekitar 20-80 nm yang sebagian besar tersusun atas peptidoglikan.

Sel bakteri yang sudah ditetesi kristal violet kemudian ditetesi iodin akan menghasilkan kompleks violet-iodin. Ikatan antara kristal violet dan iodin akan menambah ukuran molekul dan menunjukkan warna ungu ketika diamati menggunakan mikroskop. Proses dekolorisasi dilakukan dengan menggunakan alkohol 95%, yang kemudian mengakibatkan penyusutan peptidoglikan pada dinding sel bakteri (Ismail, 2017). Bakteri Gram negatif ketika ditetesi alkohol akan kehilangan warna dari kristal violet. Sedangkan bakteri Gram positif yang memiliki lapisan peptidoglikan lebih tebal akan mempertahankan warna dari kristal violet. Sehingga pada penambahan safranin bakteri Gram positif akan tetap berwarna ungu karena warna kristal violet masih tertahan pada dinding sel bakteri.

Hasil pewarnaan isolat A, D, G, dan H menunjukkan bakteri Gram positif yang ditunjukkan dengan warna ungu yang terbentuk pada masing-masing isolat seperti pada Tabel 4.4 dan Gambar 4.3. Menurut Mathialagan, dkk., (2018) BAL termasuk dalam golongan bakteri Gram positif. Pernyataan tersebut didukung dengan penelitian Feizabadi, dkk., (2020) yang mengisolasi BAL dari madu *Apis mellifera* dan memiliki ciri Gram positif. Selain itu Bulgasem, dkk., (2016) menyatakan hasil pewarnaan Gram dari isolat BAL asal madu menunjukkan karakteristik Gram positif.

4.5.3. Uji Katalase

Pengujian katalase bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya enzim katalase pada bakteri. Apabila uji katalase negatif maka tidak terbentuk gelembung pada plat dan bakteri bersifat anaerob. Berdasarkan Gambar 4.4 dan Tabel 4.5 di atas Isolat A, D, G, dan H tidak menghasilkan gelembung udara ketika ditetesi dengan H₂O₂ dan termasuk dalam jenis bakteri katalase negatif. Menurut Suhaeni

dan Akhmad (2016), BAL termasuk dalam golongan bakteri katalase negatif karena tidak memiliki enzim katalase untuk memecah hidrogen peroksida. BAL termasuk dalam golongan bakteri anaerob fakultatif yang memiliki enzim peroksidase dan akan memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan senyawa organik, sehingga tidak terbentuk gelembung pada pengamatan (Hamidah, dkk., 2019). Hal ini sesuai dengan penelitian Ibrahim, dkk., (2015) yakni isolat BAL dari buah mangga menunjukkan karakter katalase negatif ketika ditambahkan H_2O_2 .

Berdasarkan pengamatan secara makroskopis (bentuk koloni, elevasi, tepi koloni dan warna) dan mikroskopis (pewarnaan Gram dan uji katalase) menunjukkan isolat A, D, G dan H merupakan BAL yang ditandai dengan bentuk koloni bulat lonjong hingga oval, elevasi cembung, tepian rata, berwarna putih, bentuk sel batang, Gram positif, dan katalase negatif. Hal ini sesuai dengan Maunatin, dkk., (2020) yang menyatakan 5 isolat penghasil EPS asal nira siwalan memiliki ciri Gram positif dan katalase negatif serta selnya berbentuk batang pada isolat N4 dan N10. Kemudian Bulgasem, dkk., (2016) menyatakan bahwa 4 isolat BAL asal madu memiliki ciri Gram positif dan katalase negatif serta pada isolat dengan kode HS dan HM memiliki bentuk sel batang pendek.

4.6. Pembuatan Inokulum

Inokulum adalah bakteri yang siap untuk tahap fermentasi. Pembuatan inokulum dilakukan dengan memindahkan bakteri dari stok bakteri ke dalam media MRSB secara aseptis dan dishaker selama 16 jam. Waktu pembuatan inokulum dibatasi sampai 16 jam karena bakteri dalam fase eksponensial yang siap digunakan

untuk fermentasi. Sejalan dengan Desniar, dkk., (2019) fase eksponensial dari BAL berkisar dari 16-20 jam pertumbuhan.

Inokulum isolat BAL kemudian diukur tingkat kekeruannya atau nilai OD untuk mengetahui jumlah bakteri di dalamnya secara kuantitatif. Pembacaan nilai OD dilakukan pada panjang gelombang 600 nm karena sel-sel bakteri menyerap pada panjang gelombang tersebut (Astutiningsih, dkk., 2014). Selain itu, panjang gelombang 600 nm merupakan serapan dari warna yang terbentuk pada inokulum yaitu warna kuning. Nilai OD berbanding lurus dengan jumlah bakteri yang terkandung di dalamnya. Jumlah bakteri meningkat seiring dengan meningkatnya nilai OD inokulum. Nilai OD disetarakan menjadi 0,5 karena kekeruhan yang sama diidentikkan dengan jumlah bakteri yang sama pada setiap perlakuan.

4.7. Produksi Eksopolisakarida oleh BAL Penghasil EPS Terpilih Menggunakan Media Semi Sintetik

Produksi EPS menggunakan BAL penghasil EPS tertinggi pada sumber gula terpilih. Penelitian ini menunjukkan bahwa menggunakan sumber gula sukrosa menghasilkan EPS tertinggi oleh isolat A, oleh karena itu isolat A dilanjutkan untuk pengujian produksi EPS menggunakan media semi sintesis dengan penambahan sukrosa sebagai sumber gulanya. Inokulum dari masing-masing isolat ditambahkan dalam media semi sintesis dengan sumber gula terpilih dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pemilihan waktu inkubasi terkait dengan fase stasioner dari BAL yang dicapai pada jam ke-24 karena pada fase ini bakteri akan menghasilkan metabolit sekunder yakni EPS (Zahro, 2014).

Sel bakteri dipisahkan dari media dan EPS yang terbentuk dengan cara disentrifugasi. Filtrat yang berisi EPS terlarut ditambahkan etanol absolut 95% dingin sebanyak 2x volume filtrat untuk proses pengendapan. Pengendapan terjadi karena penurunan kelarutan polisakarida akibat konstanta dielektrik etanol lebih rendah daripada air yang cenderung non polar, kemudian polisakarida yang lebih polar akan mengendap (Klinchongkon, dkk., 2019). Endapan yang terbentuk kemudian dihitung rendemen menggunakan metode gravimetri berdasarkan berat konstan dari EPS setelah dikeringkan pada suhu 60°C. Gambar 4.5 menunjukkan morfologi rendemen EPS yang terbentuk oleh isolat A pada berbagai media. Isolat A memiliki rendemen sebesar 12,26 g/L pada media semi sintesis yang perhitungannya terlampir pada Tabel L.3.5.

4.7.1 Analisis Total Gula

Polisakarida masuk ke dalam golongan gula. pengukuran kadar total gula menggunakan sulfat-fenol diidentifikasi menggunakan UV-Vis. Metode ini memiliki prinsip yaitu karbohidrat akan terdehidrasi saat bereaksi dengan asam sulfat pekat akan menghasilkan turunan fulfural yang kemudian akan menghasilkan warna tertentu saat bereaksi dengan fenol (Quero-Jimenez, dkk., 2019). Senyawa kompleks yang terbentuk ditandai dengan perubahan larutan dari tidak berwarna menjadi jingga. Asam sulfat pekat yang ditambahkan akan menghidrolisis polisakarida. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 490 nm sesuai dengan warna komplementer yang terbentuk.

Hasil kadar total gula EPS oleh isolat A pada media mencapai 72,55%. Kadar total gula berkaitan dengan kemurnian EPS, karena EPS tersusun atas gula sebagai sumber karbon utamanya. Hasil uji total gula menunjukkan rendemen EPS yang

diperoleh kurang murni yang dapat dipengaruhi oleh pengotor. Pengotor yang paling umum diketahui adalah protein (Fatih, 2020). EPS dengan kemurnian yang tinggi akan disertai dengan kandungan protein yang rendah. Sejalan dengan Adesulu-Dahunsi, dkk., (2018) yang memiliki kadar total gula EPS dari bakteri *Lactobacillus plantarum* YO175 dan OF101 sebesar 87,1% dan 2,19% memiliki kadar protein yang rendah yakni sebesar 1,36 g/L dan 2,18 g/L.

Karakteristik EPS yang dihasilkan oleh isolat A pada berbagai media memiliki karakteristik yang tersaji dalam Tabel 4.6.

Isolat A menghasilkan rendemen EPS pada media semi sintesis yaitu sebesar 12,26 g/L dengan kemurnian mencapai 72,55% serta memiliki karakteristik berupa warna putih kekuningan dan berbentuk padatan. Rendemen dan warna EPS yang dihasilkan pada media semi sintesis berbeda dibandingkan pada uji kuantitatif karena perbedaan komposisi dari media semi sintetis dan MRSB. Isolat A menghasilkan rendemen terbaiknya pada media semi sintetis dibanding pada media MRSB.

4.8. Perspektif Islam Terkait Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Asal Madu

Madu tidak hanya mengandung nutrisi yang tinggi, tetapi juga menjadi tempat ditemukannya bakteri asam laktat (BAL) (Olofsson dan Vasquez, 2014). BAL memiliki banyak manfaat seperti mampu menghasilkan eksopolisakarida (EPS). EPS memiliki banyak manfaat diantaranya sebagai stabilisator, pengental, emulgaor, pembentuk gel, dan mampu mengikat air dan menjaga tekstur agar tetap lembut (Malik, dkk., 2008). Allah Swt. menciptakan makhluk dengan manfaat

untuk makhluk sesamanya tanpa terkecuali seperti yang disampaikan dalam QS Al-Baqarah: 26:

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

Artinya:

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

Kalimat “yang lebih kecil dibanding nyamuk” adalah sesuatu yang terlihat lebih kecil morfologinya dibandingkan nyamuk, seperti mikroorganisme (Al-Maraghi, 1993). Ayat tersebut dapat menjadi dasar manusia mengkaji makhluk berukuran mikro seperti bakteri dan dapat memberi manfaat dalam kehidupan manusia. Penelitian ini membuktikan bahwa madu mangga mengandung BAL yang mampu menghasilkan EPS. Hal ini dibuktikan dengan ditemukannya 4 isolat diantaranya isolat dengan kode A, D, G, dan H yang mampu menghasilkan EPS yang ditandai dengan terbentuknya lendir pada saat skrining kualitatif dan endapan pada skrining secara kuantitatif. Empat isolat tersebut memiliki ciri dari golongan BAL karena membentuk zona bening pada media selektif, memiliki karakter katalase negatif, Gram positif dan endospora negatif. Selain itu, isolat A mampu menghasilkan rendemen EPS terbanyak pada media sukrosa dibandingkan isolat yang lain. Isolat A memproduksi EPS pada media semi sintesis dan menghasilkan rendemen sebesar 12,26 g/L. Isolat BAL dari madu mangga dapat menghasilkan

EPS yang bisa dimanfaatkan dalam berbagai bidang seperti stabilisator pada bidang makanan dan antibakteri pada bidang kesehatan.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Ditemukan 4 isolat bakteri asam laktat (BAL) penghasil eksopolisakarida (EPS) asal madu mangga (*Mangifera indica* L.) yaitu A, D, G dan H. Keempat isolat tersebut memiliki kemampuan yang berbeda dalam memproduksi EPS pada berbagai sumber gula.
2. BAL penghasil EPS terpilih yaitu isolat A memproduksi EPS pada media semi sintesis menghasilkan rendemen terbesar pada media semi sintesis sebesar 12,26 g/L dengan total gula mencapai 72,55%

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan identifikasi sampai tingkat spesies untuk menambah eksplorasi BAL dari madu.
2. Perlu dilakukan penambahan TCA sebelum pengendapan EPS untuk mengendapkan pengotor berupa protein.
3. Selain isolat A perlu dilakukan pengujian produksi EPS menggunakan sumber gula yang sesuai.

DAFTAR PUSTAKA

- Adalina, Y., & Kuntadi, K. (2019). The Sucrose Contents of Four Honey Types from *Apis mellifera* Beekeepers in Java. *El-Hayah: Jurnal Biologi*, 7(2), 55-61.
- Adesulu-Dahunsi, A. T., Jeyaram, K., Sanni, A. I., & Banwo, K. (2018). Production of exopolysaccharide by strains of *Lactobacillus plantarum* YO175 and OF101 isolated from traditional fermented cereal beverage. *PeerJ*, 6, e5326.
- Adji Suranto, S. (2004). *Khasiat & manfaat madu herbal*. Jakarta: AgroMedia.
- Aiman, Abdul Fattah bin. 2005. KEAJAIBAN THIBBUN NABAWI, Bukti ilmiah dan Rahasia Kesembuhan dalam Metode Pengobatan Nabawi. Solo: Al Qowam
- Al-Jauziyyah, Ibnu Qayyim, At-Tibb An-Nabawi. 2004. Metode Pengobatan Nabi SAW, Jakarta: Griya Ilmu.
- Al-maraghi, Ahmad Musthafa. 1993. Tafsir Al-Maraghi, terj. Anshori Umar Sitanggal, dkk.,. Semarang: Karya Toha Putra, cet. Ke-2 juz 11.
- Alvarez-Suarez, J. M. (Ed.). (2017). *Bee products-chemical and biological properties*. Springer.
- Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food chemistry*, 63(4), 549-562.
- Astutiningsih, C., Setyani, W., & Hindratna, H. (2014). Uji Daya Antibakteri dan Identifikasi Isolat Senyawa Katekin dari Daun Teh (*Camelia sinensis L. var Assamica*). *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas (Journal of Pharceutical Sciences and Community)*, 11 (2).
- Badel, S., Bernardi, T., & Michaud, P. (2011). New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnology advances*, 29(1), 54-66.
- Batubara, P. A. P., Desniar, D., & Setyaningsih, I. (2019). PENGARUH STARTER BAKTERI ASAM LAKTAT PROBIOTIK TERHADAP PERUBAHAN KIMIAWI DAN MIKROBIOLOGIS RUSIP. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 30(1), 28-35.
- Benhoua, I. S., Heumann, A., Rieu, A., Guzzo, J., Kihal, M., Bettache, G., ... & Weidmann, S. (2019). Exopolysaccharide produced by *Weissella*

- confusa*: Chemical characterisation, rheology and bioactivity. *International Dairy Journal*, 90, 88-94.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: a review. *Journal of the American college of Nutrition*, 27(6), 677-689.
- Buba, F., Gidado, A., & Shugaba, A. (2013). Analysis of biochemical composition of honey samples from North-East Nigeria. *Biochem Anal Biochem*, 2(3), 139.
- Bulgasem, B. Y., Lani, M. N., Hassan, Z., Yusoff, W. M. W., & Fnaish, S. G. (2016). Antifungal activity of lactic acid bacteria strains isolated from natural honey against pathogenic *Candida* species. *Mycobiology*, 44(4), 302-309.
- Cahyadi, M. A., Sidharta, B. R., & To'bungan, N. (2019). Karakteristik dan Efektivitas Salep Madu Klanceng dari Lebah Trigona sp. Sebagai Antibakteri dan Penyembuh Luka Sayat. *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 4(3), 104-109.
- Cerning, J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 7(1-2), 113-130.
- Chotiah, S., & Damayanti, R. (2018). Karakterisasi bakteri asam laktat kandidat probiotik untuk mengatasi salmonellosis pada ayam pedaging. *Buletin Plasma Nutfah*, 24(1), 89-96.
- Collins, M. D., Farrow, J. A. E., Phillips, B. A., Fergus, S., & Jones, D. (1987). Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), 310-316.
- Cummings, J. H., & Stephen, A. M. (2007). Carbohydrate terminology and classification. *European journal of clinical nutrition*, 61(1), S5-S18.
- De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F., & Degeest, B. (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 687-707.
- De Man, J. C., Rogosa, D., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of applied Bacteriology*, 23(1), 130-135.
- Dharmik, P., & Narkhede, S. (2020). Effect of Nitrogen Sources and Sucrose Concentration on Dextran Production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B-512F. *Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)*, 8(9), 160.

- Direktorat Statistik Tanaman Pangan, Hortikultura, dan Perkebunan. 2020. Statistik Hortikultura. Badan Pusat Statistik
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Dwidjoseputro, D. (2019). Dasar-dasar mikrobiologi.
- Endo, A., & Okada, S. (2006). *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting oenococcus isolated from a composting distilled shochu residue. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(10), 2345-2348.
- Evahelda, E., Pratama, F., & Santoso, B. (2017). Sifat fisik dan kimia madu dari nektar pohon karet di Kabupaten Bangka Tengah, Indonesia. *Agritech*, 37(4), 363-368.
- Fadhilla, R. R., Diyantoro, D. W. I., & Sundari, A. S. (2020). Antibacterial Potency of Indonesian Randu Honey Against *Staphylococcus sp.* *Mal J Med Health Sci* 16(SUPP16): 67-71
- Fardiaz, D. S. (1992). *Mikrobiologi pangan 1*. Jakarta : PT Gramedia Pustaka Utama.
- Fatih, M. T. (2020). *Produksi eksopolisakarida oleh bakteri asam laktat asal susu kacang tanah terfermentasi* (Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim).
- Feizabadi, F., Sharifan, A., & Tajabadi, N. (2021). Isolation and identification of lactic acid bacteria from stored *Apis mellifera* honey. *Journal of Apicultural Research*, 60(3), 421-426.
- Finola, M. S., Lasagno, M. C., & Marioli, J. M. (2007). Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chemistry*, 100(4), 1649-1653.
- Franca, A. J. (2009). Fundamental principles of bacteriology. *E-Book. Kogakusha Company, Ltd. Tokyo. PP812-817*.
- Giyatno, D. C., & Retnaningrum, E. (2020). Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida dari Buah Kersen (*Muntingia calabura L.*). *Jurnal Sains Dasar*, 9(2), 42-49.
- Guo, Y., Pan, D., Li, H., Sun, Y., Zeng, X., & Yan, B. (2013). Antioxidant and immunomodulatory activity of selenium exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis subsp. lactis*. *Food chemistry*, 138(1), 84-89.

- Hadioetomo, R. S. (1993). *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek : Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta : PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Hamidah, M. N., Rianingsih, L., & Romadhon, R. (2019). Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat Dari Peda Dengan Jenis Ikan Berbeda Terhadap *E. coli* Dan *S. aureus*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Perikanan*, 1(2), 11-21.
- Haroun, B. M., El-Menoufy, H. A., Amin, H. A., & El-Waseif, A. A. (2013). Biosynthesis and Morphology of an Exopolysaccharide from a Probiotic *Lactobacillus plantarum* Under Different Growth Condition. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(2), 1256-1265.
- Hasali, N. H. M., Zamri, A. I., Lani, M. N., Mubarak, A., & Suhaili, Z. (2015). Identification of lactic acid bacteria from Meliponine honey and their antimicrobial activity against pathogenic bacteria. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 9(6), 1-7.
- Heyne, K., (1987). *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Jilid III, cetakan I, Diterjemahkan oleh Badan Litbang Kehutanan, Jakarta, 1312, 1543-1544
- Holzapfel, W. H., & Wood, B. J. (Eds.). (2014). *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*. John Wiley & Sons.
- Imran, M. Y. M., Reehana, N., Jayaraj, K. A., Ahamed, A. A. P., Dhanasekaran, D., Thajuddin, N., ... & Muralitharan, G. (2016). Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* NTMI05 and NTMI20. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 731-745.
- Inayah, A. M. (2012). Lisdiana. Efek Madu Randu dan Kelengkeng dalam Menurunkan Kolesterol pada Tikus Putih Hiperkolesterolemik. *Unnes J Life Scie*, 1(1).
- Ismail, Y. S., Yulvizar, C., & Putriani, P. (2017). Isolasi, karakterisasi dan uji aktivitas antimikroba bakteri asam laktat dari fermentasi biji kakao (*Theobroma cacao* L.). *Jurnal Bioleuser*, 1(2).
- Jafar, N., Hamid, S. K., Citrakesumasari, C., Najamuddin, U., & Syam, A. (2017). Khasiat madu menurunkan tekanan darah dan hematologi parameter. *Media Kesehatan Masyarakat Indonesia*, 13(1), 27-33.
- Jaya, F. (2017). *Produk-produk lebah madu dan hasil olahannya*. Universitas Brawijaya Press.
- Khairunnisa, F., & Pato, U. (2016). *Perbandingan Aktivitas Antibakteri antara Lactobacillus Casei Subsp. Casei R-68 dan Lactobacillus Casei*

Komersil terhadap Staphylococcus Aureus Fnc-15 dan Escherichia Coli Fnc-19 (Doctoral dissertation, Riau University).

- 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.
- Kultsum, U. (2009). Pengaruh variasi nira tebu (*Saccharum officinarum*) dari beberapa varietas tebu dengan penambahan sumber nitrogen (N) dari tepung kedelai hitam (*Glycine soja*) sebagai substrat terhadap efisiensi fermentasi etanol. *Fakultas Sains dan Teknologi. UIN Maulana Malik Ibrahim. Skripsi*.
- Lehninger, A.L. (1997). *Dasar-dasar Biokimia I*. Jakarta : Erlangga.
- Lewkowski, J. (2001). Synthesis, chemistry and applications of 5-hydroxymethylfurfural and its derivatives. *Arkivoc*, 1, 17-54.
- Ma'unatin, A., Harijono, H., Zubaidah, E., & Rifa'i, M. (2020). The isolation of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria from lontar (*Borassus flabellifer L.*) sap. *Iranian Journal of Microbiology*, 12(5), 437.
- Machado De-Melo, A. A., Almeida-Muradian, L. B. D., Sancho, M. T., & Pascual-Maté, A. (2018). Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of apicultural research*, 57(1), 5-37.
- Machmud, M. 2001. Teknik Penyimpanan dan Pemeliharaan Mikroba. *Buletin Agrobio*. 4(1); 24-32
- Madiedo dan Reyes-Gavilan. 2005. Invited Review: Methods for The Screening Isolation and Characterization of Exopolysaccharide Produced by Lactic Acid Bacteria. Instituto de Productos Lácteos de Asturias. CSIC. Asturias, Spain. *Journal of Dairy Science* Vol. 88 No.3.
- Mahmudah, R., Baharuddin, M., & Sappewali, S. (2016). Identifikasi Isolat Bakteri Termofilik dari Sumber Air Panas Lejja, Kabupaten Soppeng. *Al-Kimia*, 4(1), 31-42.
- Malik, A., Ariestanti, D. M., Nurfachtiyani, A., & Yanuar, A. (2010). Skrining gen glukosiltransferase (gtf) dari bakteri asam laktat penghasil eksopolisakarida. *Makara Journal of Science*.
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S. I., & Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical biochemistry*, 339(1), 69-72.

- Mathialagan, M., Edward, Y. S. J. T., David, P., Senthilkumar, M., Srinivasan, M., & Mohankumar, S. (2018). Isolation, characterization and identification of probiotic lactic acid bacteria (LAB) from honey bees. *International J Current Microbiol Applied Sci*, 7, 849-906.
- Meghana, M., Shastri, Y., Konde, K., & Patil, S. (2021). Valorization of sugarcane bagasse to lactic acid: Life cycle assessment and Techno-economic evaluation in Indian scenario. In *Computer Aided Chemical Engineering* (Vol. 50, pp. 1963-1968). Elsevier.
- Min, W. H., Fang, X. B., Wu, T., Fang, L., Liu, C. L., & Wang, J. (2019). Characterization and antioxidant activity of an acidic exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* JLAU103. *Journal of bioscience and bioengineering*, 127(6), 758-766.
- Murwani, S. (2015). *Dasar-dasar Mikrobiologi veteriner*. Universitas Brawijaya Press.
- Moat, A. G., Foster, J. W., & Spector, M. P. (Eds.). (2002). *Microbial physiology*. John Wiley & Sons.
- Nielsen, S. S. (Ed.). (2017). *Food analysis laboratory manual* (p. 557). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Nurhasanah, N., Fu'adah, I. T., Satria, H., & Yuwono, S. D. (2020). Analisis Eksopolisakarida dari Bakteri Asam Laktat Hasil Fermentasi Kefir Kolostrum. *Analit: Analytical and Environmental Chemistry*, 5(1), 65-73.
- Olofsson, T. C., Butler, È., Markowicz, P., Lindholm, C., Larsson, L., & Vásquez, A. (2016). Lactic acid bacterial symbionts in honeybees—an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. *International Wound Journal*, 13(5), 668-679.
- Osche, J. J. (1961). Kapok (*Ceiba pentandra* (L) Gaertn). *Tropical and sub tropical. Agriculture*. pp : 41-53
- Osche, J. J. (1961). *Kapok (Ceiba pentandra (L) Gaertn). Tropical and sub tropical. Agriculture*. pp : 41-53
- Panthavee, W., Noda, M., Danshiitsoodol, N., Kumagai, T., & Sugiyama, M. (2017). Characterization of exopolysaccharides produced by thermophilic lactic acid bacteria isolated from tropical fruits of Thailand. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40(5), 621-629.
- Pelczar, P. L., Igarashi, T., Setlow, B., & Setlow, P. (2007). Role of GerD in germination of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of bacteriology*, 189(3), 1090-1098.

- Pinaria, Y. W., Antara, N. S., Putra, G. G., & Sujaya, I. N. (2016). Characterization of exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus casei* AL15 Isolated from sap of *Arenga pinnata*. *Journal of Natural Sciences Research*, 6(22).
- Putri, I., Jannah, S. N., & Purwantisari, S. (2020). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from *Apis mellifera* and their potential as antibacterial using in vitro test against growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *NICHE Journal of Tropical Biology*, 3(1), 26-34.
- Prescott, A. M., & Fricker, C. R. (1999). In situ reverse transcription for the specific detection of bacteria and protozoa. *Letters in applied microbiology*, 29(6), 396-400.
- Quero-Jiménez, P. C., Montenegro, O. N., Sosa, R., Pérez, D. L., Rodríguez, A. S., Méndez, R. R., ... & Hernández, N. B. (2019). Total carbohydrates concentration evaluation in products of microbial origin. *Afinidad*, 76(587).
- Rahmiati, R., & Simanjuntak, H. A. (2019). The KEMAMPUAN BAKTERI ASAM LAKTAT DALAM MENGHAMBAT *Salmonella thypii*. *Jurnal Jeumpa*, 6(2), 257-264.
- Ratnayani, K., Adhi, D. S. N. M. A., & Gitadewi, I. G. A. M. A. S. (2008). Penentuan kadar glukosa dan fruktosa pada madu randu dan madu kelengkeng dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi. *Jurnal Kimia*, 2(2), 77-86.
- Reith, J., & Mayer, C. (2011). Peptidoglycan turnover and recycling in Gram-positive bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 92(1), 1-11.
- Rio, Y. B. P., Djamal, A., & Asterina, A. (2012). Perbandingan efek antibakteri madu asli Sikabu dengan madu Lubuk Minturun terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara in vitro. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 1(2).
- Romadhon, R., Subagiyo, S., & Margino, S. (2012). Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat dari usus udang penghasil bakteriosin sebagai agen antibakteria pada produk-produk hasil perikanan. *Saintek Perikanan: Indonesian Journal of Fisheries Science and Technology*, 8(1), 59-64.
- Rukmana, G., & Zulaika, E. (2017). Isolasi Bakteri Karbonoklastik dari Pegunungan Kapur. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 6(2), E39-E42.
- Sarwono, B. (2003). *Lebah Madu (ed. Revisi)*. Jakarta : AgroMedia Pustaka.

- Seo, B. J., Bajpai, V. K., Rather, I. A., & Park, Y. H. (2015). Partially purified exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* YML009 with total phenolic content, antioxidant and free radical scavenging efficacy. *Indian Journal of pharmaceutical education and research*, 49(4), 282-292.
- Shihab, M. Q. (2007). Tafsir Al Misbah Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an, Cet. IX. Jakarta: Lentera Hati.
- Silalahi, J. (2006). *Makanan Fungsional*. Yogyakarta : Penerbit Kanisius.
- Suhaeni, S., & Syakur, A. (2016). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Dangke Asal Kabupaten Enrekang Sulawesi Selatan. *Biogenesis: Jurnal Ilmiah Biologi*, 4(2), 79-83.
- Surono IS. (2004). *Probiotik. Susu Fermentasi dan Kesehatan*. Jakarta: YAPMMI.
- Sutherland, I. W. (1982). Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. *Advances in microbial physiology*, 23, 79-150.
- Sutherland, I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(1), 3-9.
- Tajabadi, N., Mardan, M., Mustafa, S., Feizabadi, F., Nateghi, L., Rasti, B., & Manap, M. Y. A. (2012). Weissella sp. Taj-Apis, a novel lactic acid bacterium isolated from honey. *J. Food Agricul. Environ*, 10, 263-267.
- Tranggono, S. (1990). *Biokimia dan teknologi pasca panen*. Yogyakarta : PAU Pangan dan Gizi, UGM,.
- Ustadi, U., Radiati, L. E., & Thohari, I. (2017). Komponen Bioaktif pada Madu Karet (*Hevea brasiliensis*) Madu Kaliandra (*Calliandra calothyrsus*) dan Madu Randu (*Ceiba pentandra*). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Hasil Ternak (JITEK)*, 12(2), 97-102.
- Van Geel-Schutten, dkk.,. 1998. Screening and Characterization of *Lactobacillus* strains Producing Large Amount of Exopolysaccharide. *Appl Microbiol Biotechnol*. 50: 697-703
- Van Hijum, S. A. F. T., van Geel-Schutten, G. H., Rahaoui, H., Van Der Maarel, M. J. E. C., & Dijkhuizen, L. (2002). Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4390-4398.
- Vanhooren, P. T., & Vandamme, E. J. (1999). L-Fucose: occurrence, physiological role, chemical, enzymatic and microbial synthesis. *Journal of Chemical*

Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology, 74(6), 479-497.

- VanMeter, K. C., & Hubert, R. J. (2013). *Pathophysiology for the Health Professions-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Vijayan, N., Sagadevan, E., Arumugam, P., Hussain, A. J., & Jayaprakashvel, M. (2012). Screening of Marine bacteria for multiple Biotechnological applications. *J. Acad. Indus. Res*, 1(6), 348-354.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14(7), 2535-2554.
- Wang, K., Li, W., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M. (2014). Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. *International journal of biological macromolecules*, 63, 133-139.
- Welman, A. D., & Maddox, I. S. (2003). Fermentation performance of an exopolysaccharide-producing strain of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. *Journal of Industrial microbiology and Biotechnology*, 30(11), 661-668.
- Widodo, D. (2017). *Bakteri Asam Laktat Strain Lokal*. Yogyakarta : UGM Press
- Wijayati, N., Astutiningsih, C., Mulyati, S., dan Artikel, I. (2014). Transformasi α Pinena dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923. *Biosaintifika: Journal of Biology dan Biology Education*, 6(1), 24–28.
- Wineri, E., Rasyid, R., & Alioes, Y. (2014). Perbandingan daya hambat madu alami dengan madu kemasan secara in vitro terhadap *Streptococcus beta hemolyticus* Group A sebagai penyebab faringitis. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 3(3).
- Wulandari, D. D. (2017). Analisa kualitas madu (keasaman, kadar air, dan kadar gula pereduksi) berdasarkan perbedaan suhu penyimpanan. *Jurnal Kimia Riset*, 2(1), 16-22.
- Yadav, D., Yadav, K. S., & Singh, S. (2018). Mango: Taxonomy and botany. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(2), 3253-3258.
- Zahro, F. (2014). *Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat asal fermentasi markisa ungu (*Passiflora edulis* var. *sims*) sebagai penghasil eksopolisakarida* (Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim).

- Zhang, H., & Cai, Y. (2014). *Lactic acid bacteria*. Springer Berlin Heidelberg.
- Zisu, B., & Shah, N. P. (2003). Effects of pH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *Journal of dairy science*, 86(11), 3405-3415.
- Zubaidah, E, Dkk. 2008. Produksi Eksopolisakarida Oleh Bakteri *Lactobacillus Plantarum* B2 Pada Produk Probiotik Berbasis Buah Murbei. *Jurnal Teknologi Pertanian*. Vol.9 No. 1, 59-68.
- Zubaidah, E., Liasari, Y., & Saparianti, E. (2012). Production of Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* B2 in Mulberry Based Probiotic Product. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 9(1).
- Zubaidah, E., Suryawira, Y. M., & Saparianti, E. Comparative Study Production of Exopolysaccharide (EPS) by Lactic Acid Bacteria (*L. casei* and *L. plantarum*) in Different Media (Dates and Mulberry juice). *Agroindustrial Journal*, 3(1), 107.

