

**PENGARUH JENIS SUMBER KARBON DAN pH MEDIA TERHADAP
PRODUKSI EKSPOLISAKARIDA OLEH *Weissella confusa* K2 HASIL
ISOLASI BUAH KELENGKENG**

SKRIPSI

**Oleh:
AFIFATUL FITRI KHOIRUMIYAH
NIM. 18630048**



**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2023**

**PENGARUH JENIS SUMBER KARBON DAN pH MEDIA TERHADAP
PRODUKSI EKSPOLISAKARIDA OLEH *Weissella confusa* K2 HASIL
ISOLASI BUAH KELENGKENG**

SKRIPSI

**Oleh:
AFIFATUL FITRI KHOIRUMIYAH
NIM. 18630048**

**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
2023**

**PENGARUH JENIS SUMBER KARBON DAN pH MEDIA TERHADAP
PRODUKSI EKSPOLISAKARIDA OLEH *Weissella confusa* K2 HASIL
ISOLASI BUAH KELENGKENG**

SKRIPSI

**Oleh:
AFIFATUL FITRI KHOIRUMIYAH
NIM. 18630048**

**Telah Disetujui dan Disahkan
Tanggal: 12 Juni 2023**

Pembimbing I



**Dr. Anik Ma'unatin, S.T, M.P
NIDT. 19760105 20180201 2 248**

Pembimbing II



**Ahmad Hanapi, M. Sc
NIDT. 19851225 20160801 1 069**

**Mengetahui,
Ketua Program Studi**



**Rachmatyati Ningsih, M.Si
NIP.19810811 2008012 010**

**PENGARUH JENIS SUMBER KARBON DAN pH MEDIA TERHADAP
PRODUKSI EKSPOLISAKARIDA OLEH *Weissella confusa* K2 HASIL
ISOLASI BUAH KELENGKENG**

SKRIPSI

**Oleh:
AFIFATUL FITRI KHOIRUMIYAH
NIM. 18630048**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan untuk
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 12 Juni 2023**

**Penguji Utama : Dr. Akyunul Jannah, M.P
NIP. 19750410 200501 2 009**

(.....)

**Ketua Penguji : Nur Aini, M.Si
NIP. 19840608 201903 2 009**

(.....)

**Sekretaris Penguji : Dr. Anik Maunatin, M.P
NIDT. 19760105 20180201 2 248**

(.....)

**Anggota Penguji : Ahmad Hanapi, M.Sc
NIDT. 19851225 20160801 1 069**

(.....)

**Mengesahkan,
Ketua Program Studi**


**Rachmawati Ningsih, M.Si
NIP. 19810811 2008012 010**

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Afifatul Fitri Khoirumiyah
NIM : 18630048
Program Studi : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Pengaruh Jenis Sumber Karbon dan pH Media terhadap
Produksi Ekspolisakarida oleh *Weissella confusa* K2
Hasil Isolasi Buah Kelengkeng

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

Malang, 12 Juni 2023
Yang membuat pernyataan,



Afifatul Fitri Khoirumiyah
NIM. 18630048

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahahirabbil 'aalamiin

Segala puji bagi Allah Swt. yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada penulis. Sholawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada Nabi Muhammad Saw.

Karya ilmiah ini penulis persembahkan,

Untuk kedua orang tuaku Ayah Muhammad Khusnul Khuluq dan Ibu Anik Sukaesih yang selalu mendo'akanku, memberikan motivasi, serta kasih sayang. Terima kasih Ayah dan Ibu atas semua yang telah engkau berikan, semoga diberikan kesehatan dan umur yang panjang untuk mengiringi langkah kecilku bersama adik Elok Devi Rahmawati menuju kesuksesan. Terima kasih kepada keluarga besar Alm. Oendoeng Loso Soemarno dan Keluarga Bani Djabbar yang selalu memberikan do'a, semangat serta motivasi kepada penulis.

Untuk semua dosen serta laboran di Program Studi Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, yang telah membimbing dan memberikan ilmu, wawasan, dan pengalaman kepada penulis. Penulis mengucapkan terima kasih terutama untuk Ibu Dr. Anik Ma'unatin, S.T, M.P dan Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc yang sudah membimbing penulis dalam menyelesaikan naskah skripsi ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P dan Ibu Nur Aini, M.Si selaku penguji yang sabar memberikan saran dan arahan. Dan terima kasih kepada Bapak A. Ghanaim Fasya, S.Si, M.Si selaku dosen pembimbing akademik yang selalu memotivasi saya dalam hal akademik. Semoga Bapak dan Ibu senantiasa sukses dan sehat selalu.

Untuk diri sendiri, terima kasih telah bertahan dan berjuang melawan segala rasa *overthinking*, *insecure*, atau bahkan mood yang tidak tentu selama proses penyusunan skripsi ini. Sekali lagi, kamu hebat.

Untuk semua teman-temanku Krypton 18, *Beranjak Dewasa* (Rizky Dwiandini dan Devi Nur Ananda), teman-teman *Kos Yellow* (Siti Silvikhati Ulfa, Dinda Ayu Lestari, Nita Islamiyah, Nur Rofiatul Majidah, Almh. Aulya Maghfiroh, dan Aulina Maghfiroh), *Ponpes Syah-Nur* (Syahnur Haqiqoh, Faridatul Jannah, Nurul Fitriathus Sholikha, Azmi Khafidzotul Ilmi, Hana Nur Habibah, Jihan Isabillah, Ovilia Putri Ramadhani, Olivia Hanny Yuvienda, dan Kos Yellow), *Bu Anik Squad* (Kak Intan, Kak Sisi, Kak Zainul, Kak Raihan, Kak Dhema, Jihan, dan Avivani), rekan di Laboratorium Biokim (Kak Vilan, Kak Zahra, Rista, Yani, Saifa, Wanda, dan Mahmudi) serta Ainur, Ana, Venera, Diajeng, Kak Alivia, Kak Yusril atau bahkan semua teman-teman yang belum disebutkan, penulis ucapkan terima kasih atas motivasi, kebersamaannya, semangat serta dukungannya sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah skripsi ini. Semoga hal ini dapat membawa suatu keberkahan dalam hidup kita di masa depan, Aamiin.

Untuk Treasure (Choi Hyun-suk, Park Jihoon, Kanemoto Yoshinori, Kim Junkyu, Takata Mashiho, Yoon Jaehyuk, Hamada Asahi, Bang Yedam, Kim Doyoung, Watanabe Haruto, Park Jeongwoo, So Junghwan) dan Enhypen (Lee Heeseung, Park Jong Seong, Sim Jae Yun, Park Sunghoon, Kim Sunoo, Yang Jungwon, Nishimura Riki) dan Terazono Keita terima kasih telah menemani perjalanan penulis selama menyelesaikan skripsi ini. Disaat sedang galau ataupun tidak mood dalam penyusunan skripsi kalian lah pelariannya. Dan kalian lah yang membangkitkan semangat penulis dalam menyusun skripsi kembali, terima kasih atas lagu-lagu yang membangkitkan semangat penulis. Untuk Keita, terima kasih telah mengajarkan untuk terus semangat mengejar kesuksesan. Setiap orang memiliki garis finish-nya masing-masing. Bukan tugas kita menyamakan standar kesuksesan satu sama lain.

MOTTO

يقول جلال الدين الرومي عند ما تدرك مقاصد القدر، لن تتوقف عن الابتسام

“Andai saja engkau mengetahui rencana-rencana indah Allah dibalik takdir-takdirNya, maka engkau tak akan pernah bisa berhenti untuk tersenyum”

-Jalaluddin Rumi-

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Alhamdulillah, puji syukur kehadiran Allah Swt. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah skripsi yang berjudul **“Pengaruh Jenis Sumber Karbon dan pH Media terhadap Produksi Eksopolisakarida oleh *Weissella confusa* K2 Hasil Isolasi Buah Kelengkeng”**. Shalawat serta salam semoga selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad Saw. yang telah menerangi dunia dengan cahaya iman dan Islam. Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang membantu proses penulisan naskah skripsi ini. Ucapan terima kasih ini, penulis sampaikan kepada:

1. Bapak Prof. Dr. H. M. Zainuddin, MA selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si selaku Ketua Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Dr. Anik Ma'unatin, S.T., M.P selaku pembimbing kimia yang sabar memberikan bimbingan, pengarahan dan nasehat kepada penulis dalam menyelesaikan naskah skripsi.
5. Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc selaku pembimbing agama yang memberikan bimbingan, pengarahan dan nasehat kepada penulis dalam menyelesaikan naskah skripsi ini.
6. Ibu Dr. Akyunul Jannah, M.P dan Ibu Nur Aini, M.Si selaku penguji skripsi yang sabar memberikan arahan ataupun saran kepada penulis untuk menyempurnakan naskah skripsi ini.
7. Seluruh Dosen dan Laboran Program Studi Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan naskah skripsi ini masih jauh dari sempurna. Penulis sangat terbuka dengan saran dan kritik yang bersifat membangun dari berbagai pihak demi kesempurnaan naskah skripsi ini. Semoga naskah skripsi ini dapat menjadi sarana pembuka tabir ilmu pengetahuan baru dan bermanfaat bagi kita semua, Amin.

Malang, 12 Juni 2023

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
MOTTO	viii
KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xv
ABSTRAK	xvi
ABSTRACT	xvii
مستخلص البحث	xviii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Batasan Masalah.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Bakteri Asam Laktat.....	6
2.2 <i>Weissella confusa</i>	7
2.3 Eksopolisakarida.....	8
2.3.1 Homopolisakarida (HoPS)	9
2.3.2 Heteropolisakarida (HePS).....	11
2.3.3 Jenis-Jenis Eksopolisakarida.....	12
2.4 Biosintesis Eksopolisakarida	15
2.4.1 Biosintesis Homopolisakarida (HoPS).....	16
2.4.2 Biosintesis Heteropolisakarida (HePS).....	18
2.5 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Produksi Eksopolisakarida.....	21
2.6 Karakterisasi secara Kimia	24
2.6.1 Uji Kadar Gula Total EPS Metode Asam Sulfat-fenol	24
2.6.2 Analisis Kadar Protein Eksopolisakarida.....	25
2.6.3 Analisis Gugus Fungsi Eksopolisakarida Menggunakan FTIR	26

BAB III METODE PENELITIAN	28
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	28
3.2 Alat dan Bahan	28
3.2.1 Alat.....	28
3.2.2 Bahan.....	28
3.3 Rancangan Penelitian	29
3.4 Tahapan Penelitian	29
3.5 Pelaksanaan Penelitian	30
3.5.1 Sterilisasi Alat	30
3.5.2 Pembuatan Media.....	30
3.5.3 Regenerasi Bakteri <i>Weissella confusa</i> K2.....	31
3.5.4 Pembuatan Inokulum	31
3.5.5 Pengaruh Jenis Sumber Karbon terhadap Produksi EPS	31
3.5.6 Pengaruh pH Media terhadap Produksi EPS.....	32
3.5.7 Ekstraksi Eksopolisakarida dari Media Fermentasi	32
3.5.8 Uji Kadar Gula Total dengan Metode Asam Sulfat-fenol	33
3.5.9 Analisis Kadar Protein Eksopolisakarida.....	34
3.5.10 Analisis Data	35
BAB V PENUTUP.....	55
5.1 Kesimpulan.....	55
5.2 Saran	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN.....	66

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian	47
--	----

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Bakteri <i>Weissella confusa</i>	8
Gambar 2. 2 Klasifikasi homopolisakarida (HoPS)	10
Gambar 2. 3 Struktur dekstran	13
Gambar 2. 4 Struktur mutan	13
Gambar 2. 5 Struktur alternan	14
Gambar 2. 6 Struktur reuteran	14
Gambar 2. 7 Struktur levan	15
Gambar 2. 8 Struktur inulin	15
Gambar 2. 9 Jalur biosintesis homopolisakarida (HoPS)	18
Gambar 2. 10 Jalur biosintesis heteropolisakarida (HePS)	20
Gambar 2. 11 Reaksi kompleks fenol-furfural	25
Gambar 2. 12 Spektrum FTIR EPS dari <i>Weissella confusa</i> C19	26

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Penelitian terdahulu mengenai pengaruh pH	22
--	----

ABSTRAK

Khoirumiyah, Afifatul Fitri. 2023. **Pengaruh Jenis Sumber Karbon dan pH Media terhadap Produksi Eksopolisakarida oleh *Weissella confusa* K2 Hasil Isolasi Buah Kelengkeng**. Skripsi. Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Dr. Anik Ma'unatin, S.T., M.P; Pembimbing II: Ahmad Hanapi, M. Sc.

Kata kunci: Eksopolisakarida, *Weissella confusa*, Pengaruh pH, Karakteristik Kimia

Eksopolisakarida (EPS) merupakan polimer bermassa molekul tinggi dengan rantai panjang yang diproduksi melalui jalur metabolisme mikroorganisme. Salah satu mikroorganisme penghasil EPS adalah Bakteri Asam Laktat (BAL). BAL merupakan mikroorganisme yang aman jika ditambahkan ke dalam makanan karena bersifat non toksik dan tidak menghasilkan toksin, sehingga bakteri asam laktat diakui sebagai mikroorganisme *Generally Recognized as Safe* (GRAS) yang aman bagi kesehatan. *Weissella confusa* merupakan salah satu jenis BAL yang mampu menghasilkan EPS dalam jumlah yang tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan jenis sumber karbon dan pengaruh pH media terhadap produksi EPS oleh *Weissella confusa* K2.

Penelitian ini terbagi menjadi dua tahapan. Penelitian tahap pertama untuk mengetahui pengaruh jenis sumber karbon fruktosa, glukosa, sukrosa, dan laktosa terhadap produksi EPS. Penelitian tahap satu dilanjutkan pada tahap dua dengan mengkaji pengaruh pH media 4, 5, 6, 7, 8 terhadap produksi EPS. Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pengulangan sebanyak tiga kali. EPS terpilih dari *Weissella confusa* K2 dilanjutkan analisa meliputi kadar gula total, kadar protein dan identifikasi profil gugus fungsi penyusun EPS dengan spektrofotometer FTIR.

Hasil produksi EPS oleh *Weissella confusa* K2 pada pengaruh jenis sumber karbon, hasil terbaik adalah sukrosa. Hasil produksi EPS tertinggi dari *Weissella confusa* K2 diperoleh pada pH 8 sebesar 47,70 g/L. Berdasarkan analisis EPS terpilih dari *Weissella confusa* K2 pada pH 8 secara kimia diperoleh kadar gula total 81,48%, kadar protein 1,006%, dan hasil analisis gugus fungsi menggunakan FTIR menunjukkannya adanya gugus khas EPS O-H, C-H, C=O, C=C, C-H/CH₂, O-S-O, C-O-C, dan α -1,6 glikosidik pada panjang gelombang masing-masing yaitu 3427,49 cm⁻¹, 2933,72 cm⁻¹, 1666,49 cm⁻¹, 1456,25 cm⁻¹, 1338,59 cm⁻¹, 1267,22 cm⁻¹, 1153,42 cm⁻¹, dan 1000 cm⁻¹.

ABSTRACT

Khoirumiyah, Afifatul Fitri. 2023. **Effect of Carbon Source Type and Media pH on Exopolysaccharide Production by *Weissella confusa* K2 Isolated from Longan Fruit**. Thesis. Chemistry Study Program, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University Malang. Supervisor I: : Dr. Anik Ma'unatin, S.T., M.P; Supervisor II: Ahmad Hanapi, M. Sc.

Keywords: Exopolysaccharide, *Weissella confusa*, Effect of pH, Chemical Characteristics

Exopolysaccharide (EPS) was a high molecular mass polymer with long chains produced through the metabolic pathways of microorganisms. One of the EPS-producing microorganisms was Lactic Acid Bacteria (LAB). LAB was a microorganism that was safe when added to food because it was non-toxic and did not produce toxins so lactic acid bacteria were recognized as microorganisms Generally Recognized as Safe (GRAS) which were safe for health. *Weissella confusa* was a type of LAB that was capable of producing high amounts of EPS. This study aimed to determine the type of carbon source and the effect of media pH on EPS production by *Weissella confusa* K2.

This research was divided into two stages. The first phase of the study was to determine the effect of the type of carbon source of fructose, glucose, sucrose, and lactose on EPS production. Phase one research was continued in stage two by examining the effect of media pH 4, 5, 6, 7, and 8 on EPS production. The research design used a completely randomized design (CRD) with three repetitions. The selected EPS from *Weissella confusa* K2 was continued with analysis including total sugar content, protein content, and identification of functional group profiles making up EPS with an FTIR spectrophotometer.

EPS production results by *Weissella confusa* K2 on the influence of the type of carbon source, the best result was sucrose. The highest EPS production yielded from *Weissella confusa* K2 was obtained at pH 8 of 47.70 g/L. Based on the analysis of selected EPS from *Weissella confusa* K2 at pH 8 chemically obtained a total sugar content of 81.48%, protein content of 1.006%, and the results of functional group analysis using FTIR showed the presence of typical EPS groups O-H, C-H, C=O, C=C, C-H/CH₂, O-S-O, C-O-C, and α -1,6 glycosidic at the respective wavelengths of 3427.49 cm⁻¹, 2933.72 cm⁻¹, 1666.49 cm⁻¹, 1456.25 cm⁻¹, 1338.59 cm⁻¹, 1267.22 cm⁻¹, 1153.42 cm⁻¹, and 1000 cm⁻¹.

مستخلص البحث

خيرومية، عفيفة الفطر. ٢٠٢٣. تأثير نوع مصدر الكربون ودرجة الحموضة في الوسائط على إنتاج عديدات السكاريد الخارجية بواسطة بكتيريا *Weissella confusa* K2 نتائج العزل لفاكهة اللونجان. البحث الجامعي. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا بجامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول: د. عنيق معونة، الماجستير؛ المشرف الثاني: أحمد حنفي، الماجستير.

الكلمات الرئيسية: عديدات السكاريد الخارجية، *Weissella confusa*، تأثير درجة الحموضة، الخصائص الكيميائية

السكريات الخارجية (EPS) هي بوليمرات عالية الكتلة الجزيئية ذات سلاسل طويلة تنتج من خلال المسارات الأيضية للكائنات الحية الدقيقة. من الكائنات الحية الدقيقة المنتجة EPS هي بكتيريا حمض اللاكتيك (BAL). وهي كائنات دقيقة آمنة إذا تمت إضافتها إلى الطعام لأنها غير سامة ولا تنتج السموم، لذلك يتم التعرف على بكتيريا حمض اللاكتيك على أنها كائنات دقيقة معترف بها عموماً على أنها آمنة (GRAS) آمنة للصحة. *Weissella confusa* هو نوع واحد من BAL قادر على إنتاج كميات كبيرة من EPS. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد نوع مصدر الكربون وتأثير درجة الحموضة في الوسائط على إنتاج EPS بواسطة *Weissella confusa* K2.

ينقسم هذا البحث إلى مرحلتين. المرحلة الأولى من البحث لتحديد تأثير أنواع مصادر الكربون من الفركتوز والجلوكوز والسكروز واللاكتوز على إنتاج EPS. استمر بحث المرحلة الأولى في المرحلة الثانية من خلال فحص تأثير وسائط الأس الهيدروجيني 4 و 5 و 6 و 7 و 8 على إنتاج EPS. استخدم تصميم الدراسة التصميم العشوائي الكامل (RAL) مع ثلاث تكرارات. تبع EPS المختار من *Weissella confusa* K2 تحليل بما في ذلك إجمالي محتوى السكر ومحتوى البروتين وتحديد ملف تعريف المجموعة الوظيفية المكونة ل EPS باستخدام مقياس الطيف الضوئي FTIR.

نتيجة إنتاج EPS بواسطة *Weissella confusa* K2 على تأثير نوع مصدر الكربون، وأفضل نتيجة هي السكروز. تم الحصول على أعلى إنتاج EPS من *Weissella confusa* K2 عند الرقم الهيدروجيني ٨ وهي ٤٧,٧٠ جم / لتر. استناداً إلى تحليل EPS المختار من *Weissella confusa* K2 عند الرقم الهيدروجيني ٨، تم الحصول كيميائياً على إجمالي محتوى السكر بنسبة ٨١,٤٨%، ومحتوى البروتين بنسبة ١,٠٠٦%، وأظهرت نتائج تحليل المجموعة الوظيفية باستخدام FTIR وجود مجموعات EPS النموذجية هي O-H، C-H، C=O، C=C، C-H/CH₂، O-S-O، C-O-C، α-1,6 جليكوسيديك عند الأطوال الموجية هي ٣٤٢٧,٤٩ سم⁻¹، ٢٩٣٣,٧٢ سم⁻¹، ١٦٦٦,٤٩ سم⁻¹، ١٤٥٦,٢٥ سم⁻¹، ١٣٣٨,٥٩ سم⁻¹، ١٢٦٧,٢٢ سم⁻¹، ١١٥٣,٤٢ سم⁻¹، و ١٠٠٠ سم⁻¹ على التوالي.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Eksopolisakarida (EPS) merupakan polimer bermassa molekul tinggi dengan rantai panjang yang diproduksi melalui jalur metabolisme mikroorganisme (Wang dkk., 2015). Umumnya EPS disekresikan dari sel terluar yang dihasilkan oleh enzim ekstraseluler (Berecka dkk., 2013). EPS telah banyak dimanfaatkan pada berbagai macam industri seperti, industri pangan, kosmetik, serta industri kesehatan meliputi farmasi dan obat-obatan (Sanalibaba & Çakmak, 2016). Pemanfaatan EPS dalam industri pangan sebagai pengental, pembentuk gel, pengemulsi, *dressing salad*, serta lapisan gula pada *frozen food* (Bajpai dkk., 2016). Selain itu, EPS juga dimanfaatkan sebagai antioksidan, antibiofilm, antitumor, serta prebiotik pada bidang kesehatan (Silva dkk., 2019). Salah satu mikroorganisme penghasil EPS adalah Bakteri Asam Laktat (BAL) (Imran dkk., 2016).

BAL merupakan mikroorganisme yang aman jika ditambahkan ke dalam makanan karena bersifat non toksik dan tidak menghasilkan toksin, sehingga bakteri asam laktat diakui sebagai mikroorganisme *food grade* atau *generally recognized as safe* (GRAS) yang aman bagi kesehatan (Pratiwi dkk., 2017). BAL yang mampu menghasilkan EPS menunjukkan morfologi berbentuk *ropy* (adanya benang ketika ditarik dengan jarum ose) atau *muroid* (mendatar) (Nurhasanah dkk., 2020). Beberapa genus BAL yang mampu menghasilkan EPS antara lain *Weissella*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*,

Carnobacterium, Tetragenococcus, Leuconostoc, serta *Lactobacillus* (Patel dkk., 2012).

Al-Qur'an adalah kitab suci, sumber utama dan acuan bagi ilmu alam semesta termasuk ilmu umum dan pengetahuan agama. Allah menciptakan segala macam makhluk hidup di bumi ini, dari terkecil hingga terbesar, terlihat dan tidak terlihat atau kasat mata. Salah satu bukti kekuasaan Allah adalah adanya makhluk yang sangat kecil yakni mikroorganisme. Dalam Al-Qur'an, Allah telah memberikan isyarat tentang keberadaan mikroorganisme. Sebagaimana disebutkan dalam firman Allah Swt. surah Al-Baqarah ayat 26:

﴿إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا.....﴾

Artinya: "Sesungguhnya Allah tidak segan membuat perumpamaan seekor nyamuk atau yang lebih kecil dari itu...." (QS. Al-Baqarah (2): 26)

Pada QS. Al-Baqarah ayat 26 terdapat kata "بَعُوضَةً", yang berarti "nyamuk". Makna ini telah didukung oleh beberapa mufassir, seperti ath-Tabari, al-Maraghi, Imam an-Nawawi dan Hamka. Hal ini menjelaskan kepada kita bahwa Allah tidak ragu ataupun keberatan untuk menyebutkan nyamuk didalam kitab suci meskipun makhluk ini (nyamuk), umumnya dianggap manusia sebagai makhluk kecil, tidak berarti, dan tidak berguna yang membawa virus penyakit. Dalam kata "فَمَا فَوْقَهَا", Ahmad Mustafa al-Maraghi menjelaskan bahwa yang dimaksud dengan sesuatu yang lebih kecil dari nyamuk, yaitu sesuatu yang tampak lebih kecil dari nyamuk. Hal ini berarti hanya dapat diamati dengan kaca pembesar atau mikroskop. Seperti bakteri, bakteri ini tidak terlihat dengan mata telanjang dan hanya bisa dilihat dengan bantuan mikroskop (Saputra, 2021). Salah satu

mikroorganisme ciptaan Allah yang memiliki manfaat bagi manusia adalah BAL, BAL merupakan salah satu mikroorganisme penghasil EPS yang dapat dimanfaatkan oleh manusia dalam berbagai bidang.

Weissella confusa merupakan salah satu jenis BAL yang mampu menghasilkan EPS dalam jumlah yang tinggi (Malik dkk., 2008). *Weissella confusa* merupakan bakteri asam laktat Gram-positif dan katalase negatif (Spiegelhauer dkk, 2020). Pada penelitian Falasconi dkk., (2020) menunjukkan bahwa *Weissella confusa* memiliki fenotip *mucoïd* yang kuat sehingga dapat memproduksi EPS dengan jumlah yang tinggi. Jenis EPS yang umumnya di produksi oleh *Weissella confusa* adalah jenis dekstran (Netsopa dkk., 2018). Menurut penelitian Lakra dkk., (2020) EPS yang diproduksi oleh *Weissella confusa* berpotensi sebagai antioksidan dan antibiofilm.

Produksi EPS oleh BAL dipengaruhi oleh beberapa faktor yakni strain bakteri, pH, lama fermentasi, konsentrasi substrat, konsentrasi inokulum, dan penambahan sukrosa (Velasco dkk., 2006). Faktor kondisi nutrisi dan lingkungan sangat mempengaruhi sintesis EPS. Sumber karbon merupakan salah satu faktor yang penting dalam sintesis EPS, karena sifat dan konsentrasi sumber karbon mampu mengatur proses metabolisme sekunder (Tayuan dkk., 2011 dan Khani dkk., 2016). Sumber karbon yang berbeda akan mempengaruhi represisi katabolit pada metabolisme sekunder (Xu dkk., 2017).

BAL merupakan salah satu mikroorganisme fermentatif yang mampu hidup pada kisaran pH yang luas serta lebih toleran pada pH yang rendah (Wiyana, 2011). pH merupakan salah satu faktor yang kritis dalam produksi EPS, karena setiap strain bakteri memiliki pH optimum untuk menghasilkan EPS. Berdasarkan

penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *Weissella confusa* mampu memproduksi EPS pada berbagai pH. Menurut Penelitian Lakra dkk., (2020) hasil eksopolisakarida dari *Weissella confusa* MD1 tertinggi pada kondisi pH 6,5 sebesar 10,07 g/L. Hasil penelitian Adesulu dkk., (2018) menunjukkan produksi EPS dari *Weissella confusa* OF126 dengan kondisi optimum pH 7 menghasilkan EPS sebesar 3,10 g/L. Hasil serupa juga diperoleh pada penelitian Wongsuphachat dkk., (2010) produksi EPS dari *Weissella confusa* NH 02 dengan kondisi optimum pH 7-7,5 mampu menghasilkan rendemen EPS sebesar 18,08 g/L.

EPS yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* memiliki sifat yang berbeda-beda sesuai strain bakteri penghasilnya. Sehingga menjadi salah satu faktor yang perlu dikaji lebih lanjut tentang karakterisasi secara kimia yang meliputi analisis kadar gula total, analisis kadar protein, dan analisis gugus fungsi. Berdasarkan uraian yang telah dijelaskan dapat diketahui bahwa *Weissella confusa* K2 dapat menghasilkan EPS pada sumber karbon dan pH media yang optimum serta perlu dilakukan pengkajian lebih lanjut tentang sifat kimia dari EPS sehingga akan mempengaruhi pemanfaatannya.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh jenis sumber karbon terhadap produksi eksopolisakarida oleh *Weissella confusa* K2?
2. Bagaimana pengaruh pH media terhadap produksi eksopolisakarida oleh *Weissella confusa* K2?
3. Bagaimana karakteristik kimia eksopolisakarida terpilih dari *Weissella confusa* K2?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui jenis sumber karbon terbaik terhadap produksi eksopolisakarida oleh *Weissella confusa* K2.
2. Untuk mengetahui pengaruh pH media terhadap produksi eksopolisakarida oleh *Weissella confusa* K2.
3. Untuk mengetahui karakteristik eksopolisakarida dari *Weissella confusa* K2 secara kimia.

1.4 Batasan Masalah

1. Bakteri *Weissella confusa* K2 hasil isolasi dari buah kelengkeng
2. Jenis sumber karbon yang digunakan fruktosa, glukosa, sukrosa, dan laktosa.
3. Variasi pH media yang digunakan adalah 4, 5, 6, 7 dan 8.
4. Karakterisasi secara kimia meliputi analisa gula total, kadar protein dan gugus fungsi eksopolisakarida.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah dapat memberikan informasi mengenai pengaruh jenis sumber karbon dan pH optimum terhadap produksi eksopolisakarida oleh *Weissella confusa* K2 yang dapat digunakan sebagai acuan produksi eksopolisakarida skala besar.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri yang dapat menghasilkan asam laktat, sebagai produk utama dalam metabolisme karbohidrat. Bakteri asam laktat memiliki ciri berbentuk *coccus* dan basil, tidak memiliki spora, tergolong Gram-positif dan pada umumnya katalase negatif (Nudyanto dan Zubaidah, 2015). Mayoritas BAL dikenal sebagai probiotik yang kaya akan manfaat bagi kesehatan, (Belicová, dkk., 2013). Beberapa spesies yang tergolong BAL adalah *Lactobacillus*, *Weissella*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, dan *Lactococcus* (Romadhon dkk., 2012). Sebagian besar BAL merupakan bakteri non patogen dan termasuk dalam kelompok bakteri yang memiliki status *generally recognized as safe* (GRAS) (Rahmiati dan Simanjuntak, 2019).

BAL merupakan salah satu mikroorganisme fermentasi dan dapat tumbuh pada pH 3,5 - 10 serta suhu berkisar 5°C - 45°C (Abdel dkk., 2013). Sebagian besar strain BAL toleran terhadap pH asam berkisar 4,4 dan dapat mengalami pertumbuhan yang optimum pada pH 5,5 (Salminen dan Wright, 2004). Mekanisme kerja BAL adalah dengan cara memetabolisme berbagai macam karbohidrat secara fermentatif yang akan diubah menjadi asam-asam organik (Nasution, 2012). BAL memiliki sifat proteolitik dengan kebutuhan asam amino yang cukup spesifik (Widodo, 2017).

Kelompok BAL terbagi menjadi 2 yakni 1) Bakteri homofermentatif yakni glukosa yang difermentasi untuk memproduksi asam laktat sebagai satu-satunya produk. Contoh: *Streptococcus*, *Pediococcus*, dan *Lactobacillus*, 2) Bakteri heterofermentatif yakni glukosa yang difermentasikan untuk memproduksi asam laktat serta senyawa-senyawa lainnya seperti etanol, asam asetat, dan CO₂. (Prescott dan Dunn, 1990). Beberapa penelitian menyebutkan bahwa BAL mampu menghasilkan senyawa metabolisme sekunder eksopolisakarida (EPS) (Giyatno dan Retnaningrim, 2020). EPS dihasilkan oleh BAL dengan cara dikultivasi pada rentan suhu 30-37°C pada media MRS, susu ataupun dengan senyawa derivatnya (Badel dkk., 2011).

EPS yang diproduksi BAL dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen (Madiedo & Gavilan, 2005). Penelitian Zubaidah (2008) mengenai eksopolisakarida (EPS) dari BAL telah banyak dilaporkan, eksopolisakarida yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat, memiliki ciri khas kontribusi bakteri sebagai probiotik yang dapat memberikan efek positif bagi kesehatan. Hasil penelitian Berecka dkk., (2013) EPS yang dihasilkan oleh BAL memiliki potensi sebagai imunostimulan, meningkatkan pertumbuhan bakteri probiotik didalam saluran pencernaan dan berpotensi sebagai antioksidan.

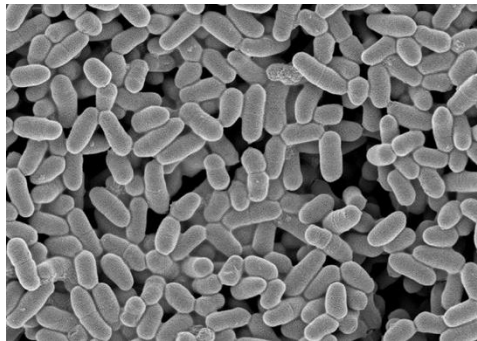
2.2 *Weissella confusa*

Weissella termasuk dalam famili *Leuconostocaceae* (Chelo dkk., 2010). *Weissella confusa* merupakan bakteri asam laktat (BAL) yang tergolong Gram-positif, katalase-negatif, serta sel pembentuk non endospora dengan morfologi berbentuk *coccoid* atau batang (Fusco dkk., 2015). Strain *Weissella* mampu

menghasilkan eksopolisakarida (EPS) jenis dekstran (Jin, 2019). Dalam memproduksi EPS *Weissella confusa* memanfaatkan sukrosa sebagai sumber karbon utama (Tayuan dkk., 2011). Gambar bakteri *Weissella confusa* ditunjukkan pada Gambar 2.1.

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

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



Gambar 2. 1 Bakteri *Weissella confusa* (Jin dkk., 2019)

2.3 Eksopolisakarida

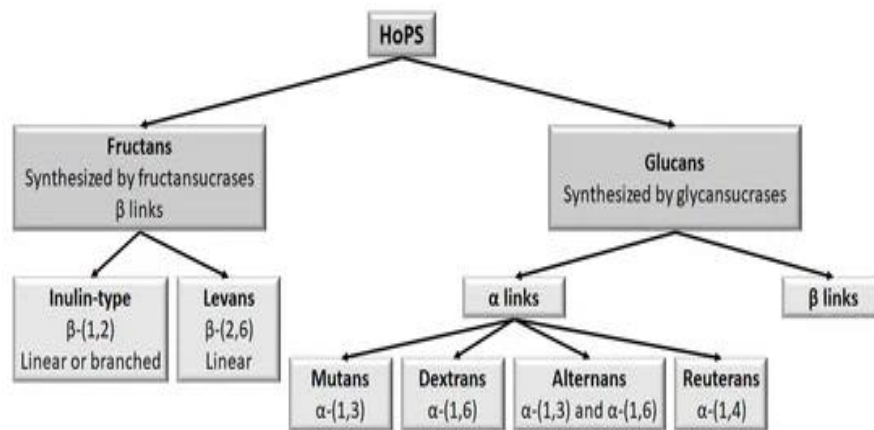
Eksopolisakarida (EPS) merupakan polimer bermassa molekul tinggi dengan rantai panjang yang diproduksi oleh melalui metabolisme mikroorganismenya, termasuk bakteri, jamur dan ganggang biru-hijau (Wang dkk., 2015). Polimer EPS dapat disekresikan oleh mikroorganismenya ke lingkungan eksternalnya (Berecka dkk., 2013). Secara umum EPS terdiri dari monosakarida serta substituent non-karbohidrat berupa asetat, fosfat, piruvat dan suksinat (Van

Hijum dkk., 2002). Selain itu, EPS juga terdiri dari beberapa biomolekul diantaranya adalah protein, lipid, asam nukleat serta zat humat (Vu, 2009).

EPS merupakan suatu polisakarida yang dihasilkan dari sekresi bakteri asam laktat pada ekstraseluler disekeliling sel (Ates, 2015). EPS atau polisakarida ekstraseluler rantai panjang yang dihasilkan dari sintesis bakteri asam laktat telah banyak diteliti dan dilaporkan (Imran dkk., 2016). Polimer EPS telah dimanfaatkan diberbagai macam industri, diantaranya kesehatan, serta dalam bidang pangan (Sanalibaba & Çakmak, 2016). Pada industri pangan eksopolisakarida dimanfaatkan sebagai agen pengental, pengontrol viskositas, pelembut makanan, dan peningkat tekstur (Bajpai dkk., 2016). Eksopolisakarida yang umum digunakan dalam bidang kesehatan antara lain dekstran, β -glukan, xanthan, β -mannan, curdlan, dan gellan (Malik, dkk., 2008). Salah satu penggunaan eksopolisakarida dibidang kesehatan adalah aktivitas antibakteri (Rajoka dkk., 2018).

2.3.1 Homopolisakarida (HoPS)

Homopolisakarida (HoPS) terdiri dari monosakarida tunggal yang diproduksi dalam media ekstra seluler, dan yang tergolong dalam homopolisakarida antara lain α -D-glukan, β -D-glukan, fruktan, alternan, reuteran, pullulan, levan, inulin, curdlan, mutan dan poligalaktan (Mende dkk., 2016). Klasifikasi Homopolisakarida (HoPS) menurut ikatan glikosidik ditunjukkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2. 2 Klasifikasi homopolisakarida (HoPS) (Singh & Saini, 2017)

Bakteri asam laktat yang menghasilkan homopolisakarida (HoPS) termasuk dalam genus *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* dan *Weissella* (Farinazzo dkk., 2020). Dua kelompok homopolisakarida penting yang di produksi oleh bakteri asam laktat adalah α -glukan, yakni dekstran dan mutan. Bakteri asam laktat *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* dan *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum* menghasilkan dekstran, sedangkan bakteri asam laktat *Streptococcus mutans* dan *Streptococcus sobrinus* menghasilkan mutans (Mende dkk., 2016). Spesies *Pediococcus* dapat memproduksi β -glukan (Wade dkk., 2019).

Dekstran terdiri dari rantai utama berupa unit glukosil berulang dengan ikatan α -(1 \rightarrow 6) dan unit sederhana atau rantai samping α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3) atau α -(1 \rightarrow 4) yang saling berkaitan (Juvonen dkk., 2015). Dekstran yang dihasilkan oleh *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus parabuchneri* dan *Lactobacillus curvatus* terdiri dari ikatan α -(1 \rightarrow 6) glikosidik dan memiliki cabang pada atom karbon pada posisi 3. Mutan umumnya dihubungkan oleh ikatan α -(1 \rightarrow 3) glikosidik (Guerin dkk., 2020). Pada alteran umumnya dihubungkan oleh ikatan α -(1 \rightarrow 6) atau α -(1 \rightarrow 3), kemudian

pada reuteran dihubungkan oleh ikatan α -(1 \rightarrow 4) atau α -(1 \rightarrow 6) dengan ikatan α -(1 \rightarrow 4) atau α -(1 \rightarrow 6) pada suatu titik percabangan (Sanalibaba & Çakmak, 2016).

Jenis homopolisakarida fruktan rantai utamanya mengandung fragmen fruktosil dengan ikatan β -(2 \rightarrow 6) atau β -(2 \rightarrow 1) (Juvonen dkk., 2015). Fruktan diklasifikasikan menjadi dua tipe yakni levan dan inulin (Sanalibaba & Çakmak, 2016). Fruktan diproduksi oleh beberapa spesies diantaranya *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* dan *Weissella* (Singh & Saini, 2017). Levan yang diproduksi oleh strain *Lactobacillus reuteri* dan *Lactobacillus sanfranciscensis* umumnya memiliki ikatan β -(2 \rightarrow 6) yang dominan (Juvonen dkk., 2015). Sedangkan, pada inulin umumnya terdiri dari ikatan β -(2 \rightarrow 1) serta percabangan pada posisi β -(2 \rightarrow 6) (Oleksy & Klewicka, 2018). Selain itu, poligalaktan juga termasuk dalam homopolisakarida karena mengandung unit berulang pentametrik dari galaktosa. Polimer poligalaktan umumnya dihasilkan oleh strain *Lactococcus lactis subsp. lactis* H414 dan 2 strain dari *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (CRL 406 and 142) (Sanalibaba & Çakmak, 2016).

2.3.2 Heteropolisakarida (HePS)

Heteropolisakarida (HePS) terdiri dari tiga hingga delapan unit berulang yang terdiri dari dua atau lebih monosakarida yang berbeda (Ryan dkk., 2015). Heteropolisakarida (HePS) dihasilkan oleh bakteri asam laktat mesofilik dan termofilik. *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactobacillus rhamnosus* dan *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus casei* merupakan spesies bakteri asam laktat mesofilik. Sedangkan, *Lactobacillus*

delbrueckii subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* dan *Streptococcus thermophilus* merupakan spesies bakteri asam laktat termofilik (Sanalibaba & Çakmak, 2016).

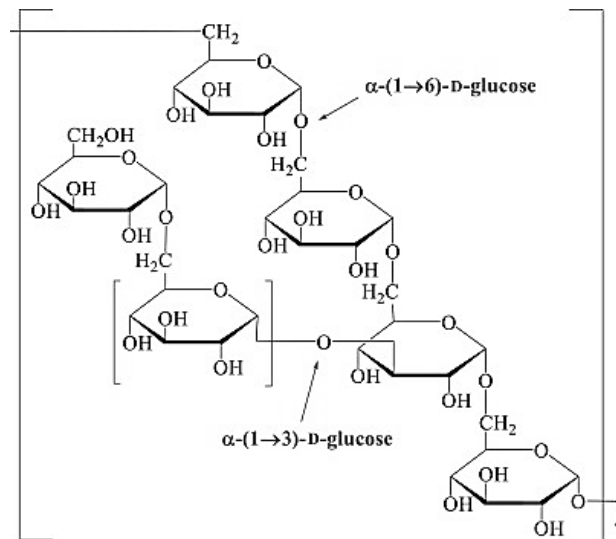
Struktur heteropolisakarida (HePS) tergantung pada jumlah serta jenis monosakarida dan jenis ikatan yang terlibat, heteropolisakarida (HePS) terdiri dari unit berulang linier atau bercabang. Unit ini sering mengandung kombinasi berbagai jenis monosakarida seperti D-glukosa, D-galaktosa dan L-rhamnosa. N-acetylglicosamine, N-acetylgalactosamine atau glucuronic merupakan jenis asam yang terlibat pada heteropolisakarida (HePS). Substituen non-karbohidrat seperti fosfat, asetil dan gliserol juga berperan dalam heteropolisakarida (HePS). Gellan, xanthan dan kefiran merupakan jenis heteropolisakarida (HePS) (Sanalibaba & Çakmak, 2016).

2.3.3 Jenis-Jenis Eksopolisakarida

Struktur eksopolisakarida sangat beragam, berikut adalah beberapa jenis eksopolisakarida antara lain:

1. Dekstran

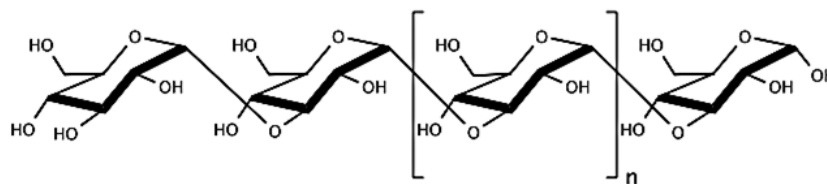
Dekstran terdiri dari rantai utama berupa unit glukosil berulang dengan ikatan α -(1 \rightarrow 6) dan unit sederhana atau rantai samping α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3) atau α -(1 \rightarrow 4) yang saling berkaitan (Juvonen dkk., 2015). Dekstran disintesis dari substrat sukrosa oleh BAL dengan berat molekul berkisar $9-200 \times 10^6$ (E. H. Song dkk, 2012). Dekstran tergolong dalam kelompok glukukan yang sintesis secara ekstraseluler oleh *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* spp. (Nasrollahzadeh dkk, 2021).



Gambar 2. 3 Struktur dekstran (Nasrollahzadeh dkk, 2021)

2. Mutan

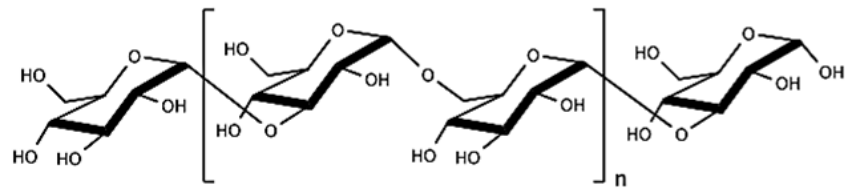
Mutan tergolong dalam kelompok α -glukan yang tidak larut dalam air dengan ikatan α -(1 \rightarrow 3) dengan percabangan pada α -(1 \rightarrow 6). Polimer mutan mampu mensintesis mutansukrase yang ditemukan pada spesies dari genus *Streptococcus*, *Lactobacillus* dan *Leuconostoc* (Kimura & Iwata, 2019).



Gambar 2. 4 Struktur mutan (Kimura & Iwata, 2019)

3. Alternan

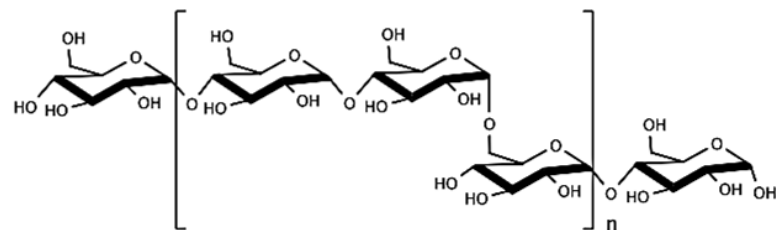
Alternan tergolong dalam kelompok α -glukan dengan ikatan α -(1 \rightarrow 6) dan α -(1 \rightarrow 3) bergantian, ditemukan dalam *L. mesenteroides* NRRL B-1355. Enzim yang mampu menghidrolisis alternan adalah isomaltodekstranase dan alternanase (Kimura & Iwata, 2019).



Gambar 2. 5 Struktur alternan (Kimura & Iwata, 2019)

4. Reuteran

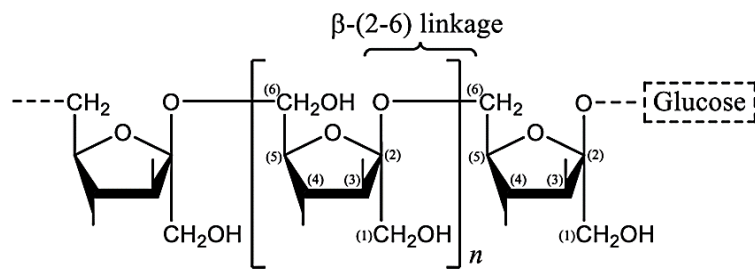
Reuteran adalah kelompok α -glukan yang mampu larut dalam air yang terdiri dari ikatan α -(1 \rightarrow 4) dihubungkan oleh satu ikatan α -(1 \rightarrow 6). Enzim yang mampu menghidrolisis reuteran adalah reuteransukrase yang ditemukan pada *Lactobacillus reuteri*. Umumnya reuteran berfungsi sebagai bahan makanan yang berpotensi meningkatkan kesehatan (Kimura & Iwata, 2019).



Gambar 2. 6 Struktur reuteran (Kimura & Iwata, 2019)

5. Levan

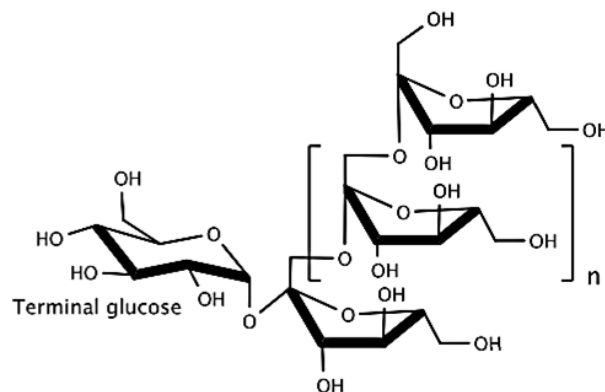
Levan adalah jenis fruktan yang terdiri dari unit fruktosa pada ikatan β -(2 \rightarrow 6) yang memiliki rantai samping fruktosa terkait β -(2 \rightarrow 1). BAL yang mampu menghasilkan EPS jenis levan adalah spesies dari genus seperti *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, dan *Weissella*. Levan disintesis oleh enzim levansukrase dengan memanfaatkan sukrosa sebagai substrat. Levansukrase juga menghasilkan oligosakarida yang disebut *fructooligosaccharides* (FOS) (Baruah & Goyal, 2022).



Gambar 2. 7 Struktur Levan (Korakli dan Vogel, 2006)

6. Inulin

Inulin merupakan golongan fruktan yang tersusun dari residu fruktosa yang terikat pada ikatan β -(2 \rightarrow 1) dengan adanya enzim inulosukrase. Inulin memanfaatkan substrat sukrosa, enzim inulosukrase ditemukan pada bakteri asam laktat. Struktur inulin disintesis oleh fruktansukrase dari sukrosa. Saat sukrosa digunakan sebagai substrat dalam reaksi priming awal, fruktan yang disintesis mengandung gula non reduksi unit glukosa di ujung rantai (glukosa terminal) (Kimura & Iwata, 2019).



Gambar 2. 8 Struktur inulin (Kimura & Iwata, 2019)

2. 4 Biosintesis Eksopolisakarida

Biosintesis eksopolisakarida berlangsung dalam fase pertumbuhan yang berbeda tergantung pada jenis mikroorganismenya. Proses sintesis dapat dibagi menjadi dua prinsip dasar yaitu tempat dan prekursor alami, seperti sintesis di luar dinding sel atau di membran sel. Sintesis heteropolisakarida berbeda dari sintesis

monosakarida, yaitu dengan biosintesis di membran sitoplasma memanfaatkan prekursor intraseluler. Gula nukleotida memainkan peran penting dalam sintesis heteropolisakarida, sehingga perannya dalam interkonversi monosakarida atau disakarida (gula) dan aktivitas gula diperlukan untuk polimerisasi monosakarida menjadi polisakarida (Cerning, 1990).

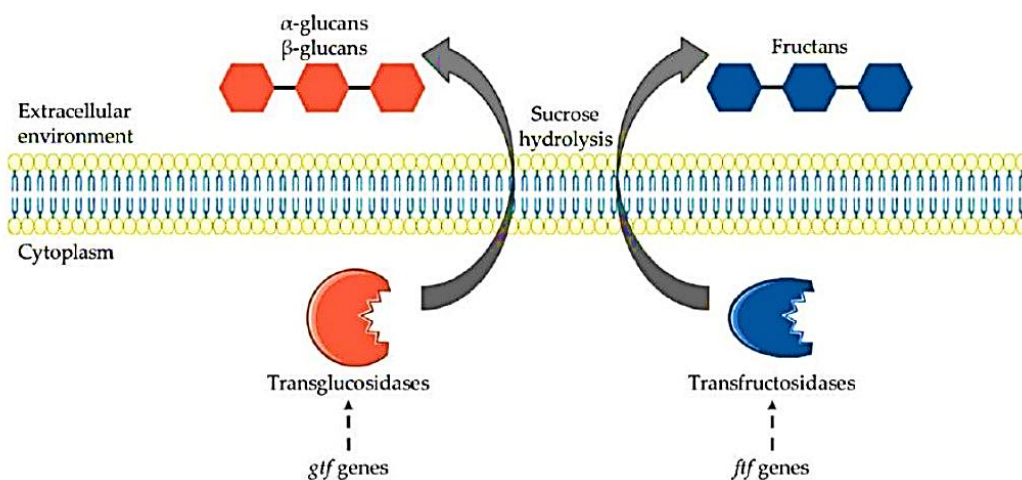
Biosintesis eksopolisakarida pada bakteri asam laktat merupakan proses kompleks yang melibatkan sejumlah enzim dan protein pengaturnya. Pada dasarnya, biosintesis eksopolisakarida dapat dikategorikan menjadi tiga langkah utama yakni karbon substrat diasimilasi, polisakarida disintesis pada intraseluler dan akhirnya keluar dari sel. Biosintesis eksopolisakarida umumnya memiliki empat langkah utama dimulai dengan gula transportasi ke sitoplasma, sintesis gula-1P, polimerisasi prekursor unit berulang dan terakhir transportasi eksopolisakarida di luar sel (Sanalibaba & Çakmak, 2016).

2. 4.1 Biosintesis Homopolisakarida (HoPS)

Karakteristik biosintesis pada homopolisakarida (HoPS) adalah tidak adanya tahapan transportasi aktif pada jalur sintesis dan tidak ada energi yang dikeluarkan serta kebutuhan biosintesis enzim ekstraseluler. Terdapat dua enzim ekstraseluler yang terlibat dalam biosintesis homopolisakarida (HoPS) yakni, Glikosiltransferase (GTF atau glukansukrase) enzim ini memanfaatkan adanya glukosa, dan Fruktosiltransferase (FTF atau fruktansukrase) memanfaatkan adanya fruktosa. Glukosa dan fruktosa digunakan sebagai donor glikosil selama biosintesis homopolisakarida (HoPS) berlangsung (Sanalibaba & Çakmak, 2016).

Biosintesis homopolisakarida (HoPS) terjadi pada genus *Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* dan *Pediococcus*, dibantu oleh adanya enzim ekstraseluler glukansukrase dan fruktansukrase. Enzim glukansukrase dan fruktansukrase berperan mentransfer monosakarida dari substrat spesifik pada pertumbuhan rantai polisakarida, residu monosakarida yang dihasilkan akan melekat pada rantai aseptor glikan. Enzim-enzim ini termasuk dalam kelompok glikosiltransferase (GTF, EC 2.4xy) dan mengkatalisis hidrolisis gula, serta dapat dikategorikan menjadi transglukosidase (EC 2.4.1.y; glukansintesis dekstransukrases, mutansukrases, dan reuteransukrases) dan transfruktosidase (EC 2.4.1.y atau 2.y; fruktansintesis transfruktosidase levansucrase dan inulosukrase), dan dikodekan oleh gen GTF dan FTF. Glukansukrase bertanggung jawab untuk sintesis glukansukrase dan fruktansukrase termasuk dalam superfamili α -amilase sebagai bagian dari glikosida hidrolase (GH), dalam klan GH-H (Guerin dkk., 2020).

Glukansukrase memiliki ciri oleh kemampuannya untuk memutuskan ikatan α -glikosidik antara bagian glukosa dan bagian monosakarida yang lain menggunakan domain katalitik (β/α)₈-barrel yang menentukan reaksi spesifik, mengenai struktur tiga dimensi glukansukrase, inti katalitik mengandung tiga domain yang dilampirkan dua domain tambahan yakni domain IV dan V. Beberapa domain terdiri dari dua segmen terputus-putus rantai polipeptida dan menghasilkan struktur berbentuk U (Guerin dkk., 2020). Jalur Biosintesis Homopolisakarida (HoPS) ditunjukkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2. 9 Jalur biosintesis homopolisakarida (HoPS) (Guerin dkk., 2020)

2.4.2 Biosintesis Heteropolisakarida (HePS)

Biosintesis heteropolisakarida (HePS) terdiri dari beberapa tahapan yakni transportasi gula ke dalam sitoplasma sel bakteri, sintesis gula nukleotida dan gula-1-fosfat (substrat donor nukleotida gula), sintesis unit berulang, polimerisasi unit gula berulang, dan terakhir, ekspor eksopolisakarida dari sel sehingga dapat disekresikan sebagai polimer berlendir atau dengan menempel pada dinding sel untuk membentuk kapsul (Guerin dkk., 2020).

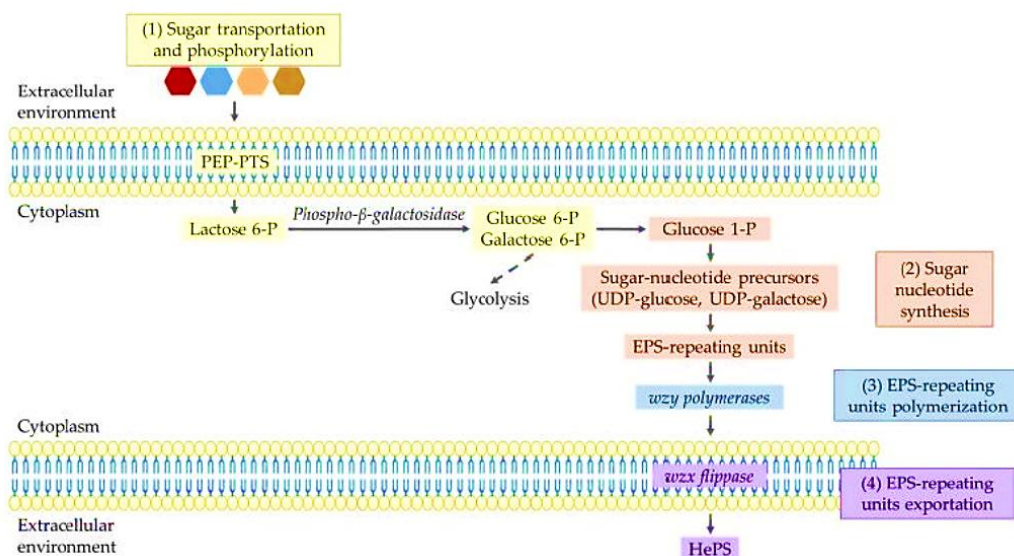
Biosintesis heteropolisakarida (HePS) menggunakan substrat sukrosa terdiri dari beberapa tahapan. Biosintesis ini diawali dengan substrat sukrosa akan diubah menjadi sukrosa 6-P melalui jalur fosfotransferase sistem spesifik (PEP-PTS dan permease), kemudian sukrosa 6-P akan diubah menjadi monomernya berupa fruktosa dan glukosa 6-P yang dikatalisis oleh enzim SacA/ScrB (sukrosa 6-fosfat hidrolase). Selanjutnya, fruktosa dan glukosa 6-P hasil hidrolisis diubah menjadi fruktosa 6-P dengan katalis berupa enzim SacK/ScrK (6-fruktokinase), kemudian fruktosa 6-P akan dirubah menjadi glukosamin 6-P dengan katalis berupa enzim Glms (glutamin-fruktosa 6 fosfat transaminase), dan diubah lagi

menjadi N-asetil-glukosamin 6-P dengan bantuan katalis berupa enzim NagA (N-asetilglukosamin 6-fosfat deasetilase). Hasil N-asetil-glukosamin 6-P pada proses sebelumnya akan diubah menjadi N-asetilglukosamin 1-P dengan enzim NagM (N-asetilglukosamin fosfomutase) sebagai katalis, kemudian N-asetilglukosamin 1-P diubah menjadi UDP-N-asetil-glukosamin dengan katalis enzim GimU (UDP-N-asetil-glukosamin pirofosforilase). UDP-N-asetil-glukosamin melakukan pengulangan unit baik rantai maupun cabang dengan bantuan nukleotida lain dengan bantuan katalis enzim glikosiltransferase.

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

Biosintesis eksopolisakarida dengan menggunakan substrat glukosa diawali dengan pembentukan glukosa-6-fosfat sebagai senyawa intermediet yang akan menghubungkan jalur anabolik pada pembentukan eksopolisakarida dan glikolisis. Kemudian adanya aliran karbon yang terbagi menjadi dua bagian yakni

fruktosa-6-fosfat menuju pembentukan produk berupa glikolisis, biomassa, dan ATP, serta masuk ke tahapan biosintesis gula nukleotida (prekursor eksopolisakarida). Selanjutnya, 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) sebagai katalis. Gula nukleotida tersebut merupakan gula prekursor yang berperan dalam pembentukan polisakarida di dalam sel dan membutuhkan bantuan enzim glukosiltransferase, gula nukleosida difosfat (NDP) akan membentuk pengulangan unit dan melekat pada sebuah lipid pembawa glikosil. Kemudian makromolekul akan dipolimerasi dan disekresikan dalam bentuk eksopolisakarida (Welman & Maddox, 2003). Jalur Biosintesis Heteropolisakarida (HePS) ditunjukkan pada Gambar 2.4.



Gambar 2. 10 Jalur biosintesis heteropolisakarida (HePS) (Guerin dkk., 2020)

2.5 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Produksi Ekspolisakarida

Faktor-faktor yang mempengaruhi kinerja bakteri dalam memproduksi ekspolisakarida antara lain:

1. Media

Media produksi ekspolisakarida yang diperlukan untuk mengoptimalkan proses fermentasi BAL dalam memproduksi EPS sangat beragam. Karbon dan nitrogen adalah nutrisi penting bagi mikroorganisme untuk pertumbuhan sel, metabolisme serta pembentukan sekresi dalam media fermentasi. Menurut Seesuriyachan dkk., (2011) *yeast extract* dan *peptone* ditambahkan pada media produksi sebagai tambahan sumber nitrogen untuk membantu proses fermentasi BAL dalam memproduksi EPS. Senyawa organik seperti kalium sulfat, ammonium nitrat, urea, dan ammonium sulfat dapat dimanfaatkan sebagai sumber nitrogen (Mahapatra dan Banerjee, 2013) Selain sumber nitrogen, media produksi EPS memerlukan sukrosa, glukosa, manosa, fruktosa sebagai sumber karbon (Tayuan dkk., 2011 dan Mahapatra dan Banerjee, 2013).

2. Suhu

Suhu dapat mempengaruhi mikroorganisme dalam dua cara yang berlawanan apabila suhu naik, kecepatan akan metabolisme naik dan pertumbuhan dipercepat. Sebaliknya apabila suhu turun, kecepatan metabolisme juga akan turun dan pertumbuhan juga diperlambat, apabila suhu naik atau turun tingkat pertumbuhan akan berhenti, komponen sel menjadi tidak aktif dan sel-sel bakteri asam laktat dapat mati (Ayuti, dkk., 2016).

3. Lama Fermentasi

Lama fermentasi, inkubasi perlu diperhatikan agar dapat mencegah terjadinya dominasi salah satu galur biakan atau spesies lain. Lama fermentasi yang berlebihan pada produk akan menghasilkan bakteri asam laktat yang berlebihan ataupun penurunan bakteri asam laktat akibat berkurangnya kebutuhan nutrisi sehingga menyebabkan kegagalan dalam fermentasi (Kartikasari, dkk., 2014).

4. pH

Derajat keasaman (pH) adalah faktor yang penting dalam fermentasi, setiap bakteri memiliki pH yang spesifik guna pertumbuhan yang optimum. Hal tersebut dikarenakan pH akan mempengaruhi efektivitas enzim yang dihasilkan dalam membentuk suatu kompleks enzim substrat serta adanya perubahan pH akan menyebabkan terjadinya proses denaturasi enzim (Poedjiadi dan Titin, 2006). Menurut Zubaidah dkk., (2008) pH merupakan salah satu parameter lingkungan utama yang mempengaruhi total BAL, total asam laktat dan total eksopolisakarida kasar yang dihasilkan dalam media fermentasi. Penelitian terdahulu mengenai pengaruh pH terhadap produksi eksopolisakarida ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Tabel 2. 1 Penelitian terdahulu mengenai pengaruh pH

Kondisi Media	pH	Hasil EPS (g/L)	Bakteri	Literatur
MRS 4% galaktosa dan 1% ammonium nitrat	6,5	10,07	<i>Weissella confusa</i> MD1	Lakra dkk., (2020)
MRS sukrosa 24 g/L	7	3,10	<i>Weissella confusa</i> OF126	Adesulu dkk., (2018)
MRS sukrosa 40 g/L	7	18,08	<i>Weissella confusa</i> NH 02	Wongsuphachat dkk., (2010)

5. Penambahan Sukrosa

Beberapa penelitian telah dilakukan terhadap produksi EPS dan salah satu faktor yang mempengaruhi produksi EPS adalah penambahan sukrosa. Dibandingkan dengan sumber gula lainnya, sukrosa merupakan salah satu sumber karbon terpenting untuk produksi EPS oleh BAL (Mahapatra dan Banerjee, 2013). Jin dkk., (2019) melaporkan bahwa produksi EPS tertinggi yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* VP30 dengan penambahan konsentrasi sukrosa sebanyak 10% menghasilkan EPS sebesar 59,99 g/L.

6. Kandungan Oksigen

Tersedianya oksigen mempengaruhi jenis mikroba yang dapat tumbuh. Mikroba dapat dibedakan menjadi 3 kelompok yaitu mikroba yang bersifat aerob (memerlukan oksigen), anaerob (tidak memerlukan oksigen), dan anaerob fakultatif (dapat hidup pada keadaan ada atau tidak adanya oksigen) (Ferdaus, dkk., 2008). Produksi EPS melalui respirasi aerob memerlukan oksigen dengan agitasi untuk mendistribusikan oksigen pada media (Anike dkk., 2015).

7. Konsentrasi Substrat

Mikroba membutuhkan substrat untuk kehidupannya, yaitu sebagai sumber karbon dan sumber energi. Pada proses fermentasi, fermentasi atau enzim dapat mengubah substrat menjadi bahan lain dengan mendapat keuntungan berupa energi (Ferdaus, dkk., 2008).

8. Konsentrasi Inokulum

Inokulum adalah biakan bakteri yang dimasukkan ke dalam media cair yang siap digunakan untuk fermentasi. Kenaikan konsentrasi inokulum akan

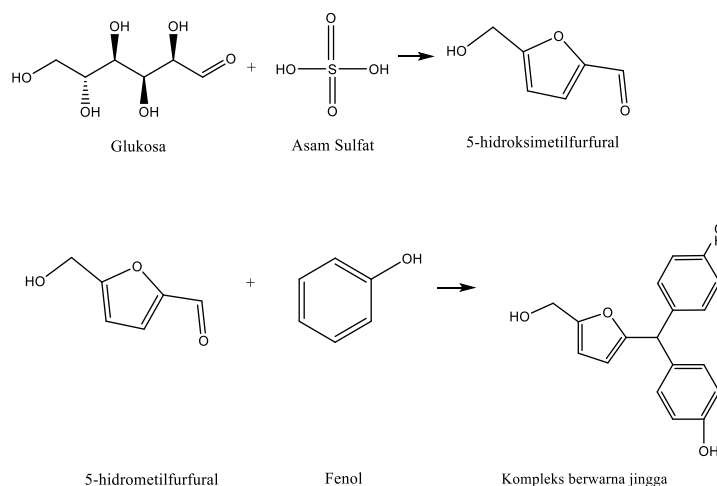
mempercepat dan menambah pembentukan EPS, tetapi jika konsentrasi inokulum terlalu besar akan menyebabkan fermentasi tidak efisien (Franca, 2009).

2.6 Karakterisasi secara Kimia

2.6.1 Uji Kadar Gula Total Ekspolisakarida Metode Asam Sulfat-fenol

Metode sulfat-fenol merupakan suatu metode analisis karbohidrat yang digunakan untuk mengukur kadar glukosa total (Amir dkk., 2013). Prinsip pengujian kadar glukosa total dengan metode sulfat-fenol adalah bahwa gula sederhana dan turunannya akan bereaksi dengan fenol menghasilkan warna jingga kekuningan dengan asam sulfat pekat (Lailah dkk., 2017). Penambahan asam sulfat pekat dan fenol pada reaksi glukosa berjalan secara eksotermis dengan ditandai adanya panas yang dihasilkan (Lewkowski, 2001).

Gula merupakan jenis karbohidrat, apabila ditambahkan asam sulfat pekat dan kemudian dipanaskan maka akan mengalami reaksi pembentukan derivat furan (ranaldehid dan hidrosimetil furaldehid) sehingga reaksi dehidrasi merupakan reaksi awal bersamaan dengan terbentuknya turunan furan (Brummer dan Cui, 2005). Pada dasarnya karbohidrat yang didehidrasi melalui reaksi dengan penambahan asam sulfat pekat akan menghasilkan turunan furfural. Turunan furfural dapat bereaksi dengan fenol yang akan menghasilkan kompleks berwarna jingga kekuningan yang dapat dideteksi dengan spektrofotometer UV-Vis (Albalasmeh, A. & Ghezzehei, 2013). Reaksi kompleks fenol-furfural ditunjukkan pada Gambar 2.5.



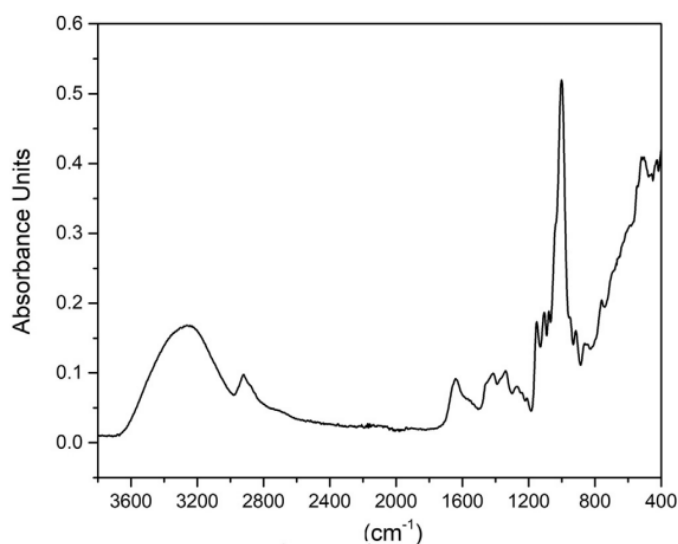
Gambar 2. 11 Reaksi kompleks fenol-furfural (Lewkowski, 2001)

2.6.2 Analisis Kadar Protein Eksopolisakarida

Analisis kadar protein eksopolisakarida menggunakan metode Lowry bertujuan untuk menghilangkan senyawa protein. Umumnya senyawa protein ini berasal dari pengotor yaitu media produksi (Fatih dkk., 2020). Kandungan protein pada eksopolisakarida ditentukan dengan menggunakan metode Lowry Folin Ciocalteu. Dalam metode Lowry terdapat 2 reaksi, pertama kompleks Cu(II) terbentuk dengan protein, kemudian Cu(II) akan direduksi menjadi Cu(I) dalam suasana basa. Ion Cu^+ kemudian mereduksi reagen Folin-Ciocalteu, kompleks asam fosfomolibdat-asam fosfotungstat, untuk menghasilkan heteropolimolibdenum biru, yang dihasilkan dari oksidasi gugus aromatik yang dikatalisis oleh Cu (rantai samping asam amino) dan menghasilkan warna biru intensif untuk dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Pangestu dkk., 2017)

2.6.3 Analisis Gugus Fungsi Eksopolisakarida Menggunakan *Fourier Transform Infra Red* (FTIR)

Prinsip kerja spektroskopi FTIR adalah dengan mengidentifikasi gugus fungsi senyawa dengan absorbansi inframerah terhadap senyawa tersebut. Pola absorbansi yang diserap oleh masing-masing senyawa berbeda, sehingga memungkinkan senyawa dapat dibedakan serta dikuantifikasi (Sankari, 2010). Identifikasi gugus fungsi EPS dari *Weissella confusa* yang dilakukan oleh Heperkan dkk., (2020) menunjukkan adanya beberapa puncak yang menggambarkan struktur dari senyawa eksopolisakarida. Spektrum hasil identifikasi FTIR EPS ditunjukkan pada Gambar 2.6.



Gambar 2. 12 Spektrum FTIR EPS dari *Weissella confusa* C19 (Heperkan dkk., 2020)

EPS yang dihasilkan *Weissella confusa* memiliki gugus fungsi pada spektra 3262 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus O-H *stretching*, pada pita serapan 2920 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus C-H *stretching*, pada spektra 1640 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus amida, pada pita serapan 1413 cm^{-1} dan 1338 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus karboksil, hal ini yang menunjukkan EPS bersifat

asam. Pada pita serapan 1200-950 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus khas polisakarida pada EPS. Pita serapan 1151 cm^{-1} , 1105 cm^{-1} dan 1000 cm^{-1} merupakan vibrasi C-O dan C-C serta getaran deformasi dari ikatan CCH, COH dan HCO. Pada serapan 1151 cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi ikatan C-O-C dan jembatan glikosidik. Puncak serapan pada 1105 cm^{-1} disebabkan adanya vibrasi ikatan C-O pada posisi C₄ dari residu glukosa. Intensitas peak 1000 cm^{-1} merupakan fleksibilitas rantai lebar yang ada di dekstran sekitar menunjukkan adanya ikatan α -glikosidik (1 \rightarrow 6).

Identifikasi gugus fungsi EPS dengan FTIR yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* OF126 dilaporkan oleh Adesulu dkk., (2018) memiliki gugus fungsi sebagian besar berupa gugus hidroksil (O-H) pada serapan 3287 cm^{-1} , pada serapan ini ditunjukkan bahwa gugus khas EPS adalah karbohidrat. Pada serapan 2980 cm^{-1} disebabkan adanya C-H *stretching* dan pada serapan 1651 cm^{-1} adanya gugus C=O dan gugus karboksil. Serapan 1009 cm^{-1} dikaitkan dengan adanya gugus C-O-C.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Juni 2022-Maret 2023.

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, pipet ukur 5 mL dan 10 mL, pipet tetes, labu ukur 5 mL, 10 mL, 25 mL, dan 100 mL, bola hisap, botol semprot, spatula, batang pengaduk, korek api, kawat ose, pembakar spiritus, cawan petri, *waterbath*, mikropipet, *blue tip*, *hot plate*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung *sentrifuge*, *magnetic stirrer*, *autoclave*, *shaker*, *laminar air flow*, *vortex*, oven, lemari asap, spektrofotometer UV-Vis, spektrofotometer FTIR, lemari pendingin.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya *De Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA), *De Man Rogosa Sharpe Broth* (MRSB), etanol absolut, alkohol 70% sebagai desinfektan, fenol 5%, asam sulfat (H₂SO₄) 98%, asam klorida (HCl) 2N, natrium hidroksida (NaOH) 2N, aquades, asam

trikloroasetat (TCA) 10%, glukosa, fruktosa, laktosa, sukrosa, kapas, kertas label, aluminium foil, plastik wrap, dan starter *Weissella confusa* K2.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini terbagi menjadi dua tahapan. Penelitian tahap pertama untuk mengetahui pengaruh jenis sumber karbon fruktosa, glukosa, sukrosa, dan laktosa terhadap produksi eksopolisakarida. Penelitian tahap satu dilanjutkan pada tahap dua dengan mengkaji pengaruh pH media 4, 5, 6, 7, 8 terhadap produksi eksopolisakarida. Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pengulangan sebanyak tiga kali. EPS terpilih dari *Weissella confusa* K2 dilanjutkan analisa meliputi kadar gula total, kadar protein dan identifikasi profil gugus fungsi penyusun EPS dengan spektrofotometer FTIR.

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui tahapan-tahapan berikut:

1. Sterilisasi alat dan pembuatan media
2. Regenerasi *Weissella confusa* K2
3. Pembuatan inokulum
4. Pengaruh jenis sumber karbon terhadap produksi EPS
5. Pengaruh pH media terhadap produksi EPS
6. Ekstraksi Eksopolisakarida
7. Karakteristik EPS Secara Kimia
8. Analisa Data

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas yang akan digunakan dalam penelitian dicuci bersih dan dikeringkan. Kemudian dibungkus dengan aluminium foil ataupun ditutup kapas dan plastik wrap. Setelah itu, semua alat gelas dilakukan sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 30 menit.

3.5.2 Pembuatan Media

3.5.2.1 Pembuatan Media *De Man Rogosa and Sharpe Agar* (MRSA)

MRS Agar dibuat dengan ditimbang sebanyak 6,82 gram, dilarutkan ke dalam 100 mL aquades, dipanaskan hingga mendidih diatas *hot plate* dan *magnetic stirrer* agar homogen. Kemudian larutan diambil 5 mL dimasukkan kedalam masing-masing tabung reaksi, ditutup dengan *cotton plug* (sumbat kapas) serta plastik wrap, dan dilanjutkan sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan sebesar 15 psi. Kemudian didinginkan pada keadaan miring hingga memadat dan disimpan kedalam lemari pendingin.

3.5.2.2 Pembuatan Media *De Man Rogosa and Sharpe Broth* (MRSB)

MRS ditimbang sebanyak 5,515 gram kemudian dilarutkan dengan 100 mL aquades, dipanaskan diatas *hot plate* dan *magnetic stirrer* hingga homogen. Kemudian larutan tersebut dituangkan ke dalam botol, ditutup dengan *cotton plug* (sumbat kapas) dan plastik wrap. Selanjutnya, dilakukan sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 psi.

3.5.3 Regenerasi Bakteri *Weissella confusa* K2 (Kultsum, 2009)

Kultur *Weissella confusa* K2 diambil sebanyak beberapa ose dan diinokulasikan pada media MRSA padat posisi miring sebanyak 5 mL. Diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Hasil regenerasi *Weissella confusa* K2 digunakan untuk pembuatan inokulum stok.

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

Pembuatan inokulum dengan cara diambil sebanyak beberapa ose biakan *Weissella confusa* K2 yang telah diregenerasi, kemudian dimasukkan kedalam 25 mL media MRSB, selanjutnya diinkubasi pada kecepatan 100 rpm selama 18 jam pada suhu ruang sampai fase eksponensial. Kekeruhan inokulum *Weissella confusa* K2 diukur *optical density* (OD) menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm dan disetarakan OD menjadi 0,5.

3.5.5 Pengaruh Jenis Sumber Karbon terhadap Produksi EPS

Inokulum OD 0,5 bakteri *Weissella confusa* K2 sebanyak 1 mL dimasukkan dalam 9 mL media MRSB tersuplementasi berbagai sumber karbon fruktosa, glukosa, sukrosa, dan laktosa sebanyak 10% (b/v). Media diinkubasi pada suhu ruang dengan kecepatan 100 rpm selama 24 jam. Kemudian dilanjutkan ekstraksi EPS seperti prosedur 3.5.7.

3.5.6 Pengaruh pH Media terhadap Produksi EPS oleh *Weissella confusa* K2 (Seesuriyachan dkk., 2011, termodifikasi Khanh dkk., 2016, termodifikasi)

MRSB ditimbang sebanyak 26,1 gram kemudian dilarutkan dalam 500 mL aquades, dipanaskan diatas *hot plate* dan *magnetic stirrer* hingga homogen. Ditambahkan sukrosa 10% (b/v) pada sedikit MRSB kemudian dihomogenkan, dimasukkan MRSB sukrosa dalam labu takar 100 mL dan ditandabatkan. Media produksi diatur pada berbagai pH (4,5,6,7, dan 8) menggunakan HCl 2N dan NaOH 2N. Media dimasukkan ke dalam botol kaca dan dilakukan sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 psi. Inokulum *Weissella confusa* K2 OD 0,5 sebanyak 5% (v/v) dimasukkan kedalam media produksi pada masing-masing variasi pH yang telah dibuat. Media produksi selanjutnya diinkubasi dengan dengan kecepatan 100 rpm selama 24 jam.

3.5.7 Ekstraksi Eksopolisakarida dari Media Fermentasi (Adebayo dkk., 2018 dan Fashogbon dkk., 2021)

Media hasil fermentasi 24 jam dipanaskan pada suhu mendidih selama 20 menit dan diambil sebanyak 30 mL dimasukkan kedalam botol kaca steril. Media hasil fermentasi selanjutnya ditambahkan asam trikloroasetat (TCA) 10% dengan perbandingan (1:1). Selanjutnya, diinkubasi selama 30 menit dengan kecepatan 100 rpm, kemudian disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang mengandung eksopolisakarida diambil dan ditambahkan etanol absolut dingin (2 kali volume media fermentasi) serta dilanjutkan pengendapan pada suhu 4°C selama 24 jam. Supernatan disentrifugasi kembali pada suhu 4°C selama 20 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Kemudian,

endapan eksopolisakarida yang diperoleh dipisahkan dengan filtrat dan dikeringkan pada suhu 60°C sampai berat konstan. Setiap jam ditimbang berat kering eksopolisakarida sampai konstan. Rendemen eksopolisakarida kering ditentukan dengan menggunakan rumus :

$$\text{Rendemen g/L} = \frac{\text{berat eksopolisakarida kering (g)}}{\text{volume media (L)}}$$

3.5.8 Uji Kadar Gula Total dengan Metode Asam Sulfat-fenol (Dubois dkk., 1956)

3.5.8.1 Pembuatan Kurva Standar dengan Metode Fenol H₂SO₄

Larutan glukosa standar yang mengandung 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm glukosa sebanyak 2 mL masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan larutan fenol 5% (b/v) sebanyak 1 mL dan divortex. Kemudian ditambahkan 5 mL H₂SO₄ pekat dengan cepat di lemari asam. Dibiarkan terlebih dahulu selama 10 menit, divortex lalu ditempatkan diatas penangas air selama 15 menit dengan suhu 100°C. Kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 490 nm dan selanjutnya ditentukan nilai regresinya.

3.5.8.2 Penentuan Kadar Gula Total dengan Metode Fenol H₂SO₄

Sampel eksopolisakarida diambil sebanyak 0,01 g dan dilarutkan kedalam 250 mL aquades. Sebanyak 2 mL larutan diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan larutan fenol 5% (b/v) sebanyak 1 mL dan divortex. Kemudian ditambahkan 5 mL H₂SO₄ pekat dengan cepat di lemari asam. Dibiarkan terlebih dahulu selama 10 menit, lalu ditempatkan diatas penangas air selama 15 menit dengan suhu 100°C. Kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 490 nm.

3.5.9 Analisis Kadar Protein Eksopolisakarida

3.5.9.1 Pembuatan Kurva Standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) (Adesulu dkk., 2018)

Pembuatan larutan baku standar diawali dengan menimbang 30 mg BSA dimasukkan kedalam tabung reaksi dan dilarutkan dalam 10 mL. Larutan standar dibuat dengan seri konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm, kemudian diambil 1 mL larutan pada masing-masing konsentrasi dan ditambahkan reagen Lowry sebanyak 5 mL. Selanjutnya, divortex dan dibiarkan selama 10 menit, kemudian ditambahkan reagen folin 1N sebanyak 0,5 mL dan diinkubasi dalam ruang gelap selama 20 menit. Kemudian diukur absorbansinya pada λ 660 nm.

3.5.9.2 Penentuan Kadar Protein Eksopolisakarida (Adesulu dkk., 2018)

Sampel eksopolisakarida ditimbang sebanyak 20 mg, dilarutkan dan ditandabatkan dengan labu ukur 5 mL menggunakan aquades. Kemudian diambil 1 mL larutan sampel dan ditambahkan reagen Lowry sebanyak 5 mL, divortex dan dibiarkan selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan reagen folin 1N sebanyak 0,5 mL dan diinkubasi dalam ruang gelap selama 20 menit, kemudian diukur absorbansinya pada λ 660 nm.

3.5.9.3 Identifikasi Gugus Fungsi Eksopolisakarida menggunakan Fourier Transform Infrared Spektrofotometer (FTIR) (Zhou, dkk., 2016)

Eksopolisakarida sebanyak 0,01 gr digerus dengan bubuk KBr 0,25 gr dan di tekan vakumkan dalam cetakan sehingga diperoleh pellet KBr. Kemudian dianalisis menggunakan instrumen FTIR dengan rentang frekuensi 4000 cm^{-1} – 400 cm^{-1} . Data hasil analisis dengan instrumen FTIR merupakan data kualitatif. Data kualitatif berupa keberadaan gugus fungsi atau jenis ikatan tertentu pada panjang

gelombang tertentu yang dapat diidentifikasi berdasarkan inframerah yang dihasilkan.

3.5.10 Analisis Data

Data yang diperoleh yaitu rendemen eksopolisakarida dianalisis dengan ragam varian *One Way ANOVA*. Apabila terdapat adanya pengaruh pada perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan signifikansi 5%.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Jenis sumber karbon terbaik terhadap produksi EPS oleh *Weissella confusa* K2 adalah sukrosa.
2. Hasil terbaik produksi eksopolisakarida dari *Weissella confusa* K2 diperoleh pada pH 8 sebesar 47,70 g/L.
3. Berdasarkan analisis eksopolisakarida terbaik dari *Weissella confusa* K2 pada pH 8 dilakukan karakteristik secara kimia diperoleh kadar gula total 81,48%, kadar protein 1,006%, dan hasil analisis gugus fungsi menggunakan FTIR menunjukkannya adanya gugus O-H, C-H, C=O, C=C, C-H/CH₂, O-S-O, C-O-C, dan α -1,6 glikosidik pada panjang gelombang 3427,49 cm⁻¹, 2933,72 cm⁻¹, 1666,49 cm⁻¹, 1456,25 cm⁻¹, 1338,59 cm⁻¹, 1267,22 cm⁻¹, 1153,42 cm⁻¹, dan 1000 cm⁻¹.

5.2 Saran

Perlu dilakukan regenerasi bakteri *Weissella confusa* K2 secara berkala dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk optimasi produksi eksopolisakarida oleh *Weissella confusa* K2 karena penggunaan konsentrasi sukrosa 10%, EPS yang ada pada media sulit untuk diekstraksi maka perlu dilakukan variasi konsentrasi sukrosa yang lebih kecil, karakterisasi lebih lanjut menggunakan KLT, H-NMR, HPLC, dan perlu dilakukan uji pemanfaatan eksopolisakarida sebagai antibakteri, antioksidan, dan imunomodulator.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. 2013. Recent Advances in Lactic Acid Production by Microbial Fermentation Processes. *Biotechnology advances*, 31(6), 877-902.
- Adebayo, B., Ishola, R., & Oyewunmi, T. 2018. Characterization, Antioxidant and Immunomodulatory Potential on Exopolysaccharide Produced by Wild Type and Mutant *Weissella confusa* strains. *Biotechnology Reports*, 19, e00271.
- Adesulu, 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.
- Adesulu, A. T., Sanni, A. I., Jeyaram, K., Ojediran, J. O., Ogunsakin, A. O., & Banwo, K. 2018. Extracellular Polysaccharide from *Weissella confusa* OF126: Production, Optimization, and Characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 514-525.
- Adji, D., & Larashanty, H. 2007. Perbandingan Efektivitas Sterilisasi Alkohol 70%, Inframerah, Otoklaf dan Ozon terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus subtilis*. *Jurnal Sain Veteriner*, 25(1).
- Albalasmeh, A. dan Ghezzehei., 2013. A New Method for Rapid Determination of Carbohydrate and Total Carbon Concentration Using UV Spectrophotometry. *United State: Carbohydrate polymer* 97: 253-261.
- Al-Maraghi, Ahmad Musthafa., 1969 Tafsir al-Maraghi Jilid IV, Mesir: Mushthafa al-Bab al-Halabi.
- Amir, M., Agustini, W. S., & Caesar, Q. F. 2013. Analisis Protein, Karbohidrat, Lemak, dan Pigmen Fikobiliprotein Mikroalga *Spirulina Platensis* yang Dikultivasi pada Media Limbah Cair Pembuatan Tempe. *Sainstech Farma*, 6(2), 21-29.
- Amraini, S. Z., & Muria, S. R. 2011. Pengaruh Volume Inokulum Pada Produksi Bioetanol dari Limbah Kulit Nanas Menggunakan *Zymomonas Mobilis* dengan Metode *Solid State Fermentation* (SSF). *Jurnal Online Mahasiswa (JOM) Bidang Teknik dan Sains*, 1(1), 1-5.
- Anike, F. N., Isikhuemhen, O. S., Blum, D., & Neda, H. 2015. Nutrient Requirements and Fermentation Conditions for Mycelia and Crude Exopolysaccharides Production by *Lentinus squarrosulus*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6(08), 526.
- Ates O. 2015. Systems Biology of Microbial Exopolysaccharides Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3(12):1-16.
- Ath-Thabari, Abu Ja'far Muhammad bin Jarir. 2009. Tafsir Ath Thabari Juz 'Amma. jilid 26. Jakarta: Pustaka Azzam.

- Ayuti, S. R., Nurliana, N., Yurliasni, Y., Sugito, S., & Darmawi, D. 2016. Dinamika Pertumbuhan *Lactobacillus casei* dan Karakteristik Susu Fermentasi Berdasarkan Suhu dan Lama Penyimpanan. *Jurnal Agripet*, 16(1), 23-30.
- Badel, S., Bernardi, T., & Michaud, P. 2011. New Perspectives for *Lactobacilli* Exopolysaccharides. *Biotechnology advances*, 29(1), 54-66.
- Bajpai, V. K., Rather, I. A., Majumder, R., Shukla, S., Aeron, A., Kim, K., & Park, Y. H. 2016. Exopolysaccharide and Lactic Acid Bacteria: Perception, Functionality and Prospects. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11(1), 1-23.
- Baruah, R., & Goyal, A. 2022. Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria in Fermented Foods and Beverages. In *Lactic Acid Bacteria in Food Biotechnology*. Elsevier, 305-317.
- Belicová, A., Mikulášová, M., & Dušinský, R. 2013. Probiotic potential and safety properties of *Lactobacillus plantarum* from Slovak Bryndza cheese. *BioMed research international*. 2013: 1-8.
- Berecka, M. P., Waško, A., Szwajgier, D., & Choma, A. 2013. Bifidogenic And Antioxidant Activity Of Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus rhamnosus* E/N Cultivated on Different Carbon Sources. *Pol. J. Microbiol*, 62, 181-189.
- Bibiana, W.L. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta: Raja Grafindo Persada.
- Brummer, Y. dan Cui., 2005. *Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications*. E-book. 432-439. France: taylor and francies group. LLC.
- Cerning, J. 1990. Exocellular Polysaccharides Produce By Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology review*, 87:113-130.
- Chalim, M. A. 2021. Karakterisasi Eksopolisakarida yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* dan Potensinya sebagai Antibakteri terhadap *Salmonella Typhi* (Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim).
- Charlena., Haris, Abdul., dan Karwati. 2009. Degradasi Hidrokarbon pada Tanah Tercemar Minyak Bumi dengan Isolat A10 dan D8. *Prosiding Seminar Nasional Sains II*, 124-136.
- Chelo, I. M., Zé-Zé, L., & Tenreiro, R. 2010. Genome Diversity in The Genera *Fructobacillus*, *Leuconostoc* and *Weissella* Determined by Physical and Genetic Mapping. *Microbiology*, 156(2), 420-430.
- Dubey, A. K., & Jeevaratnam, K. 2015. Structural Characterization and Functional Evaluation of an Exopolysaccharide Produced by *Weissella confusa* AJ53, an Isolate from Fermented Uttapam Batter Supplemented With *Piper betle* L. Leaves. *Food Science and Biotechnology*, 24, 2117-2124.

- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances. *Anal Chem*; 28: 350-356.
- E.-H. Song, J. Shang, D.M. Ratner. 2012. 9.08 – Polysaccharides. *Polymer Science: A Comprehensive Reference. Elsevier*, 137-155.
- Elova*, N., Kutliyeva, G., Zakiryaeva, S., & Bekmukhamedova, N. 2021. Optimization of Cultivation Conditions for Increasing The Production of Exopolysaccharides of The *Lactobacillus plantarum* Eb-2 Strain. *Nveo-Natural Volatiles & Essential Oils Journal*, 8(5), 8689-8697.
- Falasconi, I., Fontana, A., Patrone, V., Rebecchi, A., Duserm Garrido, G., Principato, L., ... & Morelli, L. 2020. Genome-assisted Characterization of *Lactobacillus fermentum*, *Weissella cibaria*, and *Weissella confusa* Strains Isolated from Sorghum as Starters for Sourdough Fermentation. *Microorganisms*, 8(9), 1388.
- Farinazzo, F. S., Valente, L. J., Almeida, M. B., Simionato, A. S., Fernandes, M. T. C., Mauro, C. S. I., ... & Garcia, S. 2020. Characterization and Antioxidant Activity of an Exopolysaccharide Produced by *Leuconostoc Pseudomesenteroides* JF17 from Juçara Fruits (*Euterpe edulis Martius*). *Process Biochemistry*, 91, 141-148.
- Farzand, I., Rahman, S. U., Sajid, S., & Nayab, S. 2020. 15. Evaluation of modified MRS media for The Selective Enumeration of *Lactobacillus casei*. *Pure and Applied Biology (PAB)*, 10(1), 194-198.
- Fashogbon, R. O., Bukola, A. T., & Jadesola, S. 2021. Optimization of Extracellular Polysaccharide Substances from Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Dairy Products. *Microbiol. J*, 11, 1-11.
- Febriyansari, A.N. 2008. Penerapan Model Gompertz pada Pertumbuhan Bakteri *L. Acidophilus* Dan *B. Longum* di Media Adonan Es Krim (Ice Cream Mix atau ICM) Jenis Standar. *Skripsi*. Malang: Universitas Brawijaya
- Ferdaus, F., Wijayanti, M. O., Retnonigtyas, E. S., & Irawati, W. 2008. Pengaruh pH, Konsentrasi Substrat, Penambahan Kalsium Karbonat dan Waktu Fermentasi Terhadap Perolehan Asam Laktat dari Kulit Pisang. *Widya Teknik*, 7(1), 1-14.
- Firmanto, F., Ahmad, A., & Muria, S. R. 2014. Pengaruh Waktu Inokulasi Inokulum dalam Pembuatan Bioetanol dari Limbah Srabut Buah Sawit Menggunakan *Saccharomyces Cerevisiae*, *Jom FTEKNIK*, 1(2),5.
- Franca, A. J. 2009. *Fundamental principles of bacteriology*. E-Book. Kogakusha Company, Ltd. Tokyo. PP812-817.
- Fusco, V., Quero, G. M., Cho, G. S., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H., ... & Franz, C. M. 2015. The Genus *Weissella*: Taxonomy, Ecology and Biotechnological Potential. *Frontiers in microbiology*, 6, 155.
- 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.

- Guérin, M., Silva, C. R. D., Garcia, C., & Remize, F. 2020. Lactic Acid Bacterial Production of Exopolysaccharides from Fruit and Vegetables and Associated Benefits. *Fermentation*, 6(4), 115.
- Guezennec, J. G., Pignet, P., Raguene, G., Deslandes, E., Lijour, Y., & Gentric, E. 1994. Preliminary Chemical Characterization of Unusual Eubacterial Exopolysaccharides of Deep-Sea Origin. *Carbohydrate polymers*, 24(4), 287-294.
- Heperkan, Z. D., Bolluk, M., & Bülbül, S. 2020. Structural Analysis and Properties of Dextran Produced by *Weissella Confusa* and The Effect Of Different Cereals on its Rheological Characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 143, 305-313.
- Imran MYM., Reehana N., Jayaraj KA., Ahamed AAP., Dhanasekaran D., Thajuddin N., Alharbi NS., Muralitharan G. 2016. Statistical Optimization of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus plantarum* NTMI05 and NTMI20. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93: 731-745.
- Iqbal, S., Marchetti, R., Aman, A., Silipo, A., Qader, S. A. U., & Molinaro, A. 2017. Enzymatic and Acidic Degradation of High Molecular Weight Dextran Into Low Molecular Weight and its Characterizations Using Novel Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy. *International journal of biological macromolecules*, 103, 744-750.
- Jin, H., Jeong, Y., Yoo, S. H., Johnston, T. V., Ku, S., & Ji, G. E. 2019. Isolation and Characterization of High Exopolysaccharide-producing *Weissella confusa* VP30 from Young Children's Feces. *Microbial cell factories*, 18(1), 1-13.
- Juvonen, R., Honkapää, K., Maina, N. H., Shi, Q., Viljanen, K., Maaheimo, H., ... & Lantto, R. 2015. The Impact of Fermentation with Exopolysaccharide Producing Lactic Acid Bacteria on Rheological, Chemical and Sensory Properties of Pureed Carrots (*Daucus carota* L.). *International journal of food microbiology*, 207, 109-118.
- Kartikasari, D. I., & Nisa, F. C. 2014. Pengaruh Penambahan Sari Buah Sirsak dan Lama Fermentasi Terhadap Karakteristik Fisik dan Kimia Yoghurt. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 2(4), 239-248.
- Khanh, T. B., Thuy, D. T. B., Thao, D. T. T. 2016. Optimal Conditions for Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus plantarum* T10. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 54(4A), 40-47.
- Khani, M., Bahrami, A., Chegeni, A., Ghafari, M. D., & Zadeh, A. M. 2016. Optimization of Carbon and Nitrogen Sources for Extracellular Polymeric Substances Production by *Chryseobacterium indologenes* MUT. 2. *Iranian Journal of Biotechnology*, 14(2), 13.
- Kimura, S., & Iwata, T. 2019. Synthesis of Polysaccharides III: Sucrase as Catalyst. *Enzymatic Polymerization towards Green Polymer Chemistry*, 89-104.

- 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.
- Koontz, L. 2014. TCA Precipitation. In *Methods in enzymology* (Vol. 541, pp. 3-10). Academic Press.
- Korakli, M. and Vogel, R. F. 2006. Structure/Function Relationship of Homopolysaccharide Producing Glycosyltransferases and Therapeutic Potential of Their Synthesized Glycans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (71), 790-803.
- Kultsum, U. 2009. Pengaruh Variasi Nira Tebu Dar Beberapa Varietas Penambahan Sumber N dari Tepung Kedelai Hitam sebagai Substrat Terhadap Efisiensi Fermentasi Etanol. Skripsi. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Saintek UIN Malang, 43-47.
- Lailah, R., Syauqi, A., & Santoso, H. 2017. Aktivitas Jamur *Trichoderma viride* pada Substrat Pasta Tepung Kulit Buah Rambutan (*Nephelium lappaceum*) Menggunakan Tolok Ukur Glukosa. *Biosaintropis (Bioscience-Tropic)*, 3, 1-7.
- Lakra, A. K., Domdi, L., Tilwani, Y. M., & Arul, V. 2020. Physicochemical and Functional Characterization of Mannan Exopolysaccharide from *Weissella confusa* MD1 with Bioactivities. *International journal of biological macromolecules*, 143, 797-805.
- Lelchat, F., Cozien, J., Le Costaouec, T., Brandilly, C., Schmitt, S., Baudoux, A. C., ... & Boisset, C. 2015. Exopolysaccharide biosynthesis and biodegradation by a marine hydrothermal *Alteromonas* sp. strain. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 2637-2647.
- Lewkowski, J. 2001. Synthesis, Chemistry and Applications Of 5-Hydroxymethylfurfural and its Derivatives. *Arkivoc*, 1, 17-54.
- Ma'unatin, Anik., Harijono, Harijono., Zubaidah, Elok., dan Rifa'I, Muhaimin. 2020. The Isolation of Exopolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacteria from Lontar (*Borassus flabellifer* L.) sap. *Iranlan Journal of Microbiology*, 12(5): 347-444.
- Madiedo, R. P. Dan Gavilan, L. R. 2005. Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *Journal Dairy Sci* 88: 843-856.
- Mahapatra S., & Banerjee D., 2013. Optimization of a Bioactive Exopolysaccharide Production from Endophytic *Fusarium solani* SD5. *Carbohydrat Polymers*, 97: 627-634.
- Malik, A., Ariestanti, D. M., Nurfachtiyani, A., & Yanuar, A. 2008. Skrining Gen Glukosiltransferase (Gtf) dari Bakteri Asam Laktat Penghasil Ekspolisakarida. *Makara Journal of Science*, 12(1),1-6.

- Malik, A., Sheilla, S., Firdausi, W., Handayani, T., & Saepudin, E. 2015. Sucrase Activity and Exopolysaccharide Partial Characterization from Three *Weissella confusa* Strains. *HAYATI Journal of Biosciences*, 22(3), 130-135.
- Mende, S., Rohm, H., & Jaros, D. 2016. Influence of Exopolysaccharides on The Structure, Texture, Stability and Sensory Properties of Yoghurt and Related Products. *International Dairy Journal*, 52, 57-71.
- Nachtigall, C., Rohm, H., & Jaros, D. 2021. Degradation of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria by Thermal, Chemical, Enzymatic and Ultrasound Stresses. *Foods*, 10(2), 396.
- Nasrollahzadeh, M., Sajjadi, M., Nezafat, Z., & Shafiei, N. 2021. Polysaccharide Biopolymer Chemistry. Biopolymer Based Metal Nanoparticle Chemistry for Sustainable Applications. *Elsevier*, Amsterdam, 45-105.
- Nasution, F. S. 2012. Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat pada Kotoran Ayam Broiler sebagai Agensi Probiotik (Doctoral dissertation, UNIMED).
- Netsopa, S., Niamsanit, S., Sakloetsakun, D., & Milintawisamai, N. 2018. Characterization and Rheological Behavior of Dextran from *Weissella confusa* R003. *International Journal of Polymer Science*, 2018: 1-10.
- Ningsih, N. P., Sari, R., & Apridamayanti, P. 2018. Optimasi Aktivitas Bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus brevis* dari Es Pisang Ijo. *Jurnal Pendidikan Informatika dan Sains*, 7(2), 233-242.
- Nudyanto, A., & Zubaidah, E. 2015. Isolation of Lactic Acid Bacteria Producing Exopolysaccharide from Kimchi. *J. Pangan dan Agroindustri*, 3, 743-8.
- Nurhasanah, N., Fu'adah, I. T., Satria, H., & Yuwono, S. D. 2020. Analisis Ekspolisakarida dari Bakteri Asam Laktat Hasil Fermentasi Kefir Kolostrum. *Analit: Analytical and Environmental Chemistry*, 5(1), 65-73.
- Oleksy, M., & Klewicka, E. 2018. Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus* Sp.: Biosynthesis and Applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(3), 450-462.
- Pangestu, S. I., Kurnaty, N., & Miftah, A. M. 2017. Analisis Kadar Protein dan Lemak pada Susu Cair Perah di Berbagai Daerah di Bandung dengan Metode Lowry dan Ekstraksi Cair-cair. *Prosiding Farmasi*, 1-5.
- Patel, S., Majumder, A., & Goyal, A. 2012. Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Indian journal of microbiology*, 52(1), 3-12.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., and Vyvyan, J.R., 2009, Introduction to Spectroscopy, 4th Edition, Brooks/Cole Cengage Learning, United State of America.
- Petrovici, A. R., Roşca, I., Dodi, G., Nicolescu, A., Avădanei, M., Varganici, C. D., & Ciolacu, D. 2017. Effects of Culture Medium Composition on Biosynthesis of Exopolysaccharides. *Cellulose Chem. Technol.*, 51 (9-10), 821-830.

- Poedjiadi, A. dan Titin, S. 2006. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Prastika, H. H., Laksmiwati, A. A. I. A. M., Ratnayani, K., & Puspawati, N. M. (2019). Penggunaan Enzim Pepsin untuk Produksi Hidrolisat Protein Kacang Gude (*Cajanus cajan (L.) Millsp.*) yang Aktif Antioksidan. *Indonesian E-Journal of Applied Chemistry*, 7(2), 180–188.
- Pratiwi, N. P. I. I., Suardana, I. W., & Suarsana, I. N. 2017. Karakterisasi Fisikokimia dan Uji Aktivitas Bakteriosin dari Bakteri Asam Laktat Isolat 13 B Hasil Isolasi Kolon Sapi Bali. *Indonesia Medicus Veterinus*, 6(4): 278-287.
- Rahmiati, R., & Simanjuntak, H. A. 2019. Kemampuan Bakteri Asam Laktat dalam Menghambat *Salmonella thypii*. *Jurnal Jeumpa*, 6(2), 257-264.
- Rajoka, M. S. R., Jin, M., Haobin, Z., Li, Q., Shao, D., Jiang, C., ... & Hussain, N. 2018. Functional Characterization and Biotechnological Potential of Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus rhamnosus* Strains Isolated from Human Breast Milk. *Lwt*, 89, 638-647.
- 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.
- Rusmana, I., Desniar., Suwanto, A., & Mubarik, N. R. 2020. Organic Acid Produced by Lactic Acid Bacteria from Bekasam as Food Biopreservatives. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, Vol. 414, No. 1, p. 012003. IOP Publishing.
- Ryan, P. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Caplice, N. M., & Stanton, C. 2015. Sugar-Coated: Exopolysaccharide Producing Lactic Acid Bacteria for Food and Human Health Applications. *Food & function*, 6(3), 679-693.
- Salminen, S., & Von Wright, A. (Eds.). 2004. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Vol. 139). CRC Press.
- Sanalibaba, P., & Çakmak, G. A. 2016. Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria. *Appl. Microbiol.* open access, 2(1000115), 10-4172.
- Sankari, G., Krishnamoorthy, E., Jayakumar, S., Gunasekaran, S., Priya, V. V., Subramaniam, S., & Mohan, S. K. 2010. Analysis of Serum Immunoglobulins Using Fourier Transform Infrared Spectral Measurements. *Biology and Medicine*, 2(3), 42-48.
- Saputra, N. 2021. Mikroorganisme dalam Al-Qur'an (Analisis Penafsiran Mustafa al-Maraghi terhadap Kata Famâ Fauqahâ Pada Surat Al-Baqarah Ayat 26). Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau.
- Schlegel, HG 1994. *Mikrobiologi Umum* (diterjemahkan oleh RM Tedjo Baskoro). Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

- Seesuriyachan, P., Kuntiya, A., Hanmoungjai, P., dan Techapun, C. 2011. Exopolysaccharide Production By *Lactobacillus Confusus* TISTR 1498 Using Coconut Water As an Alternative Carbon Source: The Effect of Peptone, Yeast Extract and Beef Extract. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*. 33 (4), 379-387.
- Seniati, S., Marbiah, M., & Irham, A. 2019. Pengukuran Kepadatan Bakteri *Vibrio Harveyi* secara Cepat dengan Menggunakan Spektrofotometer. *Agrokompleks*, 19(2), 12-19.
- Silva, L. A., Neto, J. H. P. L., & Cardarelli, H. R. 2019. Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus plantarum*: Technological Properties, Biological Activity, and Potential Application In The Food Industry. *Annals of Microbiology*, 69(4), 321-328.
- Singh, P., & Saini, P. 2017. Food and Health Potentials of Exopolysaccharides Derived from *Lactobacilli*. *Microbiology Research Journal International*, 1-14.
- Spiegelhauer, M. R., Yusibova, M., Rasmussen, I. K. B., Fuglsang, K. A., Thomsen, K., & Andersen, L. P. 2020. A Case Report of Polymicrobial Bacteremia with *Weissella Confusa* and Comparison of Previous Treatment for Successful Recovery with a Review of The Literature. *Access Microbiology*, 2(5).
- Subagiyo, S., Margino, S., & Triyanto, T. 2016. Pengaruh Penambahan Berbagai Jenis Sumber Karbon, Nitrogen dan Fosfor pada Medium *deMan, Rogosa and Sharpe* (MRS) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Terpilih yang Diisolasi dari Intestinum Udang Penaeid. *Jurnal Kelautan Tropis*, 18(3), 127-132.
- Sutrisna, R., Ekowati, C. N., & Agustin, V. S. 2017. Uji Viabilitas Bakteri Asam Laktat dari Usus Itik pada Media Pakan Dedak Padi dan Kombinasi Dedak Padi Dengan Molases. *Jurnal Ilmiah Biologi Eksperimen dan Keanekaragaman Hayati (J-BEKH)*, 4(2), 7-14.
- Tayuan, C., Tannock, G. W., & Rodtong, S. 2011. Growth and Exopolysaccharide Production by *Weissella Sp.* from Low-Cost Substitutes for Sucrose. *African Journal of Microbiology Research*, 5(22), 3693-3710.
- van Geel-Schutten, G. H., Fleisch, F., Ten Brink, B., Smith, M. R., & Dijkhuizen, L. J. A. M. 1998. Screening and Characterization of *Lactobacillus* Strains Producing Large Amounts of Exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(6), 697-703.
- Van Hijum, A.M., Arun G. 2002. Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Indian Journal Microbiology*. Vol 52. No 1. 3-12.
- Velasco, S., Årsköld, E., Paese, M., Grage, H., Irastorza, A., Rådström, P., & Van Niel, E. W. J. 2006. Environmental Factors Influencing Growth of and Exopolysaccharide Formation by *Pediococcus parvulus* 2.6. *International journal of food microbiology*, 111(3), 252-258.

- Viel, M., Collet, F., & Lanos, C. 2018. Chemical and Multi-Physical Characterization of Agro-Resources' by-Product as a Possible Raw Building Material. *Industrial Crops and Products*, 120, 214-237.
- Vu, M.H. 2009. The Chemistry Of Rancidity In Foods In J.C. Allen and R.J. hamilton, editor. Rancidity In Foods. London: *Applied Science Publisher*.
- Wade, M. E., Strickland, M. T., Osborne, J. P., & Edwards, C. G. 2019. Role of *Pediococcus* in Winemaking. *Australian journal of grape and wine research*, 25(1), 7-24.
- Waluyo, Lud. 2011. *Mikrobiologi Umum*. Malang: UMM Press.
- Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A., & Yang, Z. 2015. Characterization And Bioactivities Of An Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *International journal of biological macromolecules*, 74, 119-126.
- Wardhani, A. K., Uktolseja, J. L., & Djohan, D. 2020. Identifikasi Morfologi dan Pertumbuhan Bakteri pada Cairan Terfermentasi Silase Pakan Ikan. Prosiding SNPBS (Seminar Nasional Pendidikan Biologi dan Saintek) Ke-5.
- 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*. Gadjah Mada University Press: Yogyakarta.
- Wijayati, N., Astutiningsih, C., & Mulyati, S. 2014. Transformasi α -Pinena dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 6(1), 24-28.
- Winahyu, D. A., & Primadhamanti, A. 2020. Bioaktivitas Antioksidan Lotion Senyawa Eksopolisakarida dari Mikroalga *Spirulina* sp. *Analit: Analytical and Environmental Chemistry*, 5(2), 169-177.
- Wiyana, A. 2011. Karakteristik Ketahanan Bakteri Asam Laktat Indigenous Kefir sebagai Kandidat Bakteri Probiotik pada Kondisi Saluran Pencernaan in vitro.
- Wongsuphachat, W., & Maneerat, S. 2010. Optimization of exopolysaccharides production by *Weissella confusa* NH 02 isolated from Thai fermented sausages. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 32(1).
- Wuryanti, W., Mulyani, N. S., Asy'ari, M., & Sarjono, P.R. 2021. Uji Ekstrak Bawang Bombay sebagai Antibakteri Gram Positif *Staphylococcus aureus* dengan Metode Difusi Cakram. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*, 12(2), 68.

- Xu, C., Yu, J., Zhao, S., Wu, S., He, P., Jia, X., ... & Mao, D. 2017. Effect of Carbon Source on Production, Characterization and Bioactivity of Exopolysaccharide Produced by *Phellinus vaninii* Ljup. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89, 2033-2041.
- Yue, F., Zhang, J., Xu, J., Niu, P., Lu, X., & Liu, M. 2022. Effects of Monosaccharide Composition on Quantitative Analysis of Total Sugar Content by Phenol-Sulfuric Acid Method. *Frontiers in Nutrition*, 1723.
- Yunus, Y., & Zubaidah, E. 2015. Pengaruh Konsentrasi Sukrosa dan Lama Fermentasi Terhadap Viabilitas *L. Casei* Selama Penyimpanan Beku Velva Pisang Ambon [In Press April 2015]. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 3(2), 303-312.
- Zhou, K., Zeng, Y., Yang, M., Chen, S., He, L., Ao, X., ... & Liu, S. 2016. Production, Purification and Structural Study of an Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* BC-25. *Carbohydrate Polymers*, 144, 205-214.
- Zubaidah, E., Liasari, Y., & Saparianti, E. 2008. Produksi Eksopolisakarida oleh *Lactobacillus plantarum* B2 pada Produk Probiotik Berbasis Buah Murbei. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 9(1), 59-68.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian

