

POTENSI EKSOPOLISAKARIDA YANG DIHASILKAN OLEH *Weissella confusa* K2 SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus*

SKRIPSI

Oleh :
JIHAN ISABILLAH
NIM. 18630006



PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
202

POTENSI EKSOPOLISAKARIDA YANG DIHASILKAN OLEH *Weissella confusa* K2 SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus*

SKRIPSI

Oleh :
JIHAN ISABILLAH
NIM. 18630006

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

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

POTENSI EKSPOLISAKARIDA YANG DIHASILKAN OLEH *Weissella confusa* K2 SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus*

SKRIPSI

**Oleh:
JIHAN ISABILLAH
NIM. 18630006**

**Telah Disetujui dan Disahkan
Tanggal: 20 Juni 2023**

Pembimbing I



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

Pembimbing II



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

**Mengetahui,
Ketua Program Studi**



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

POTENSI EKSOPOLISAKARIDA YANG DIHASILKAN OLEH *Weissella confusa* K2 SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus*

SKRIPSI

**Oleh:
JIHAN ISABILLAH
NIM. 18630006**

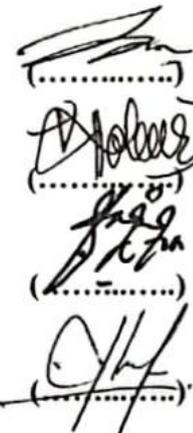
**Telah Dipertahankan Di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 20 Juni 2023**

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

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

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

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



**Mengesahkan,
Ketua Program Studi**



**Rachmasyati Wingsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 2 010**

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Jihan Isabillah

NIM : 18630006

Program Studi : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Potensi Eksopolisakarida yang Dihasilkan oleh
Weissella confusa K2 Sebagai Antibakteri terhadap
Staphylococcus aureus

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

Malang, 19 Juni 2023

Yang membuat pernyataan,



Jihan Isabillah
NIM. 18630006

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirobbil'aalamiin

Puji syukur kehadiran Allah Swt. atas rahmat, hidayah dan ridhonya sehingga tugas akhir ini dapat terselesaikan dengan baik.

Skripsi ini saya persembahkan kepada:

Untuk (Alm) Aba Abd. Adzim selaku orang tua saya yang sudah meninggal ketika saya masih menempuh pendidikan SMA kelas XII. Semoga Beliau bangga dengan perjuangan anaknya, dan semoga bahagia disana. Aamiin. Dan untuk Ibu saya, Ibu Hilyatun Nisak yang selama ini selalu memberikan dukungan secara lahir dan batin. Engkau mampu menjadi orang tua tunggal selama ini, terima kasih Ibu. Dan untuk kakak saya Qomariyah, terima kasih atas dukungannya selama ini, sehingga dapat menyelesaikan tugas akhir ini.

Untuk para dosen dan seluruh laboran Program Studi Kimia khususnya Ibu Dr. Anik Maunatin, S.T., M.P selaku dosen pembimbing utama, Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc selaku dosen pembimbing agama, Ibu Himmatul Barroroh, M.Si selaku dosen wali, yang telah membimbing dan memberikan banyak ilmu baik pada proses perkuliahan maupun penelitian sehingga dapat menyelesaikan tugas akhir dengan baik.

Untuk diri sendiri yang mau dan mampu bertahan, berjuang, berusaha sekuat yang saya bisa, tidak menyerah walau banyak masalah yang datang, terima kasih karena sudah bertahan untuk tetap kuat sampai detik ini.

Untuk teman-temanku semua khususnya “ponpes syahnur”, “semangat kuliah”, “kurcaci”, dan semua teman-teman yang selalu menemani saya dalam menyelesaikan tugas akhir ini, terima kasih atas motivasinya, kebersamaannya, bantuannya, dan dukungannya, semoga hal ini dapat membawa keberkahan dalam hidup kita di masa depan, Aamiin..

MOTTO

"لَا يُكَلِّفُ اللَّهُ نَفْسًا إِلَّا وُسْعَهَا"

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya”

Q.S Al-Baqarah: 286

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji syukur kehadirat Allah Swt. atas limpahan anugerah dan hidayah-Nya kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah skripsi yang berjudul “**Potensi Eksopolisakarida yang Dihasilkan oleh *Weissella confusa* K2 Sebagai Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*”** dengan sebaik mungkin. Sholawat serta salam selalu tercurah limpahkan kepada Nabi Muhammad SAW. yang telah menjadi suri tauladan bagi kita semua.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini tidak akan terselesaikan tanpa adanya bantuan serta dorongan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. H.M. Zainuddin, MA. selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi.
3. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si, selaku ketua Program Studi Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Dr. Anik Maunatin, S.T., M.P, dan Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc selaku dosen pembimbing utama dan agama yang telah memberikan pengarahan, bimbingan, dan masukan kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi dengan baik.
5. Seluruh Dosen Program Studi Kimia yang telah memberikan ilmu dan pengalaman yang bermanfaat bagi penulis.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Oleh sebab itu penulis mengharapkan kritik dan saran untuk menyempurnakannya. Semoga skripsi ini bisa memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya kepada penulis sendiri *Amin Ya Rabbal Alamin*.

Malang, 3 Juni 2023

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
MOTTO	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
مستخلص البحث	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Batasan Masalah	4
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Bakteri Asam Laktat	6
2.2 <i>Weissella confusa</i>	8
2.3 Eksopolisakarida	10
2.4 Biosintesis Eksopolisakarida	14
2.5 Faktor –Faktor yang Mempengaruhi Produksi Eksopolisakarida.....	17
2.6 Bakteri Patogen	19
2.7 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.8 Mekanisme Kerja Eksopolisakarida Sebagai Antibakteri.....	22
2.9 Kadar Gula Total Eksopolisakarida Metode Sulfat-Fenol.....	25
2.10 Kadar Protein Eksopolisakarida.....	26
2.11 Analisa Gugus Fungsi Eksopolisakarida Menggunakan FTIR	27
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	29
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	29
3.2 Alat dan Bahan.....	29
3.2.1 Alat	29
3.2.2 Bahan.....	29
3.3 Rancangan Penelitian	30
3.4 Tahapan Penelitian	30
3.5 Pelaksanaan Penelitian	31

3.5.1 Sterilisasi Alat	31
3.5.2 Produksi Eksopolisakarida	32
3.5.2.1 Pembuatan Media <i>de Man Rogosa and Sharpe Agar</i> (MRSA).....	32
3.5.2.2 Regenerasi <i>Weissella confusa</i>	32
3.5.2.3 Pembuatan Media <i>de Man Rogosa and Sharpe Broth</i> (MRSB).....	32
3.5.2.4 Pembuatan Inokulum	33
3.5.2.5 Produksi Eksopolisakarida	33
3.5.2.6 Ekstraksi Eksopolisakarida.....	33
3.5.3 Uji Antibakteri Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i>	34
3.5.3.1 Pembuatan Media <i>Nutrien Agar</i> (NA).....	34
3.5.3.2 Regenerasi <i>Staphylococcus aureus</i>	34
3.5.3.3 Pembuatan Media <i>Mueller Hinton Agar</i> (MHA)	34
3.5.3.4 Pembuatan Media <i>Mueller Hinton Broth</i> (MHB).....	34
3.5.3.5 Pembuatan Inokulum <i>Staphylococcus aureus</i>	35
3.5.3.6 Uji Aktivitas Antibakteri Eksopolisakarida terhadap <i>Staphylococcus aureus</i>	35
3.5.3.7 Rumus Perhitungan Zona Hambat.....	35
3.5.4 Uji Kadar Gula Total Eksopolisakarida dengan Metode Sulfat- Fenol	36
3.5.4.1 Pembuatan Kurva Standar Glukosa.....	36
3.5.4.2 Penetapan Kadar Gula Total dengan Metode Sulfat-Fenol	36
3.5.5 Uji Kadar Protein dengan Metode Lowry.....	37
3.5.5.1 Pembuatan Kurva Standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA).....	37
3.5.5.2 Penetapan Kadar Protein Eksopolisakarida dengan Metode Lowry.....	37
3.5.6 Analisa Gugus Fungsi Eksopolisakarida Menggunakan FTIR	38
3.5.7 Analisa Data	38

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN39

4.1 Pembuatan Media <i>de Man Rogose Sharpe Agar</i> (MRSA) dan <i>de Man Rogose Sharpe Broth</i> (MRSB).....	39
4.2 Regenerasi <i>Weissella confusa</i>	40
4.3 Pembuatan Inokulum <i>Weissella confusa</i>	41
4.4 Pembuatan Media Produksi MRSB Sukrosa 10%	43
4.5 Produksi dan Ekstraksi Eksopolisakarida	43
4.6 Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i>	48
4.6.1 Pembuatan Media <i>Nutrien Agar</i> (NA)	48
4.6.2 Regenerasi <i>Staphylococcus aureus</i>	48
4.6.3 Pembuatan Media MHA dan MHB.....	49
4.6.4 Pembuatan Inokulum <i>Staphylococcus aureus</i>	50
4.6.5 Uji Aktivitas Antibakteri Menggunakan Metode Difusi Agar	51
4.7 Analisa Kadar Gula Total Eksopolisakarida.....	54
4.8 Analisa Kadar Protein Eksopolisakarida	56
4.9 Analisa Gugus Fungsi Eksopolisakarida Menggunakan FTIR.....	58
4.10 Potensi Eksopolisakarida dari <i>Weissella confusa</i> Sebagai Antibakteri dalam Perspektif Islam.....	60

BAB V PENUTUP	62
5.1 Kesimpulan	62
5.2 Saran	62
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN	75

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Homopolisakarida yang Dihasilkan oleh Bakteri Asam Laktat.....	12
Tabel 2.2 Strain <i>Weissella confusa</i> dalam Produksi Eksopolisakarida.....	18
Tabel 4.1 Aktivitas Antibakteri Eksopolisakarida	52
Tabel 4.2 Gugus Fungsi Spektra FTIR Eksopolisakarida <i>Weissella confusa</i> K2 ..	59

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Bentuk <i>Weissella confusa</i>	9
Gambar 2.2 Dekstran	11
Gambar 2.3 Mutan	11
Gambar 2.4 Reutran	12
Gambar 2.5 Alternan.....	12
Gambar 2.6 Jalur Biosintesis Homopolisakarida.....	15
Gambar 2.7 Jalur Biosintesis Heteropolisakarida	16
Gambar 2.8 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> Berdasarkan Pewarnaan Gram.....	22
Gambar 2.9 Ilustrasi Interaksi antara EPS dengan Dinding Sel Bakteri Gram positif.....	22
Gambar 2.10 Reaksi Penentuan Kadar Gula Total Metode Sulfat-Fenol	26
Gambar 2.11 Spektra FTIR Eksopolisakarida <i>Weissella confusa</i> MD1	28
Gambar 3.1 Rumus perhitungan zona hambat	36
Gambar 4.1 Hasil Regenerasi <i>Weissella confusa</i>	41
Gambar 4.2 Inokulum kerja <i>Weissella confusa</i> OD 0,5.....	43
Gambar 4.3 Media produksi sebelum fermentasi, Media produksi setelah fermentasi	44
Gambar 4.4 Reaksi TCA dengan Protein.....	45
Gambar 4.5 Eksopolisakarida Kering	47
Gambar 4.6 Regenerasi <i>Staphylococcus aureus</i>	48
Gambar 4.7 Inokulum <i>Staphylococcus aures</i>	51
Gambar 4.8 Aktivitas Antibakteri Eksopolisakarida dari <i>Weissella confusa</i> K2 terhadap <i>Staphylococcus aureus</i>	54
Gambar 4.9 Kurva Standar Glukosa	55
Gambar 4.10 Kurva Standar BSA.....	57
Gambar 4.11 Spektra FTIR Eksopolisakarida <i>Weissella confusa</i> K2.....	59

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian	75
Lampiran 2. Skema Kerja	76
Lampiran 3. Perhitungan.....	83
Lampiran 4. Hasil Analisis SPSS.....	93
Lampiran 5. Dokumentasi	95

ABSTRAK

Isabillah, J. 2023. **Potensi Eksopolisakarida yang Dihasilkan oleh *Weissella confusa* K2 Sebagai Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus***. 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: Ahmad Hanapi, M.Sc.

Kata kunci: Eksopolisakarida (EPS), *Weissella confusa*, antibakteri, *Staphylococcus aureus*.

Weissella confusa merupakan salah satu bakteri asam laktat (BAL) yang dapat memproduksi eksopolisakarida yang telah diketahui memiliki manfaat dalam bidang kesehatan dan industri makanan serta aman untuk dikonsumsi atau *General Recognize as Safe* (GRAS). Eksopolisakarida (EPS) adalah polimer yang disintesis oleh mikroorganisme yang dilepaskan pada ekstraseluler disekitar selnya, dan setiap strain bakteri menghasilkan eksopolisakarida dengan sifat yang berbeda-beda. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi eksopolisakarida dari *Weissella confusa* sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.

Produksi EPS menggunakan media MRSB dengan penambahan sumber karbon berupa sukrosa 10% karena dalam produksi EPS memerlukan sumber karbon yang tinggi. Hasil produksi dilakukan uji aktivitas antibakteri EPS terhadap *Staphylococcus aureus* menggunakan metode difusi agar. Rancangan pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan faktorial tunggal yaitu variasi konsentrasi (0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; dan 5) mg/mL. Kemudian dianalisis dengan ragam varian One Way ANOVA.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan sukrosa 10% dalam produksi EPS menghasilkan rendemen sebesar 22,48 gr/L, dan aktivitas antibakteri EPS terhadap *Staphylococcus aureus* menghasilkan zona hambat tertinggi sebesar 3,1 mm pada konsentrasi 5 mg/mL, sedangkan pada uji ANOVA menunjukkan adanya beda nyata penambahan konsentrasi EPS terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ($\text{sig} < 0,05$).

ABSTRACT

Isabillah, J. 2023. **The Potency of Exopolysaccharide Produced from *Weissella confusa* K2 as Antibacterial Against *Staphylococcus aureus***. Thesis. Chemistry Study Program, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University Malang. Supervisor I: Dr. Anik Maunatin, S.T., M.P; Supervisor II: Ahmad Hanapi, M.Sc.

Keywords: Exopolysaccharides (EPS), *Weissella confusa*, antibacterial, *Staphylococcus aureus*.

Weissella confusa is one of the Lactic Acid Bacteria (LAB) that can produce exopolysaccharides known to benefit the health and food industry and is generally recognized as safe (GRAS). Exopolysaccharides (EPS) are polymers synthesized by microorganisms that are released in the cellular extracts around their cells, and each bacterial strain produces exopolysaccharides with different properties. This study aims to determine the effect of the concentration of exopolysaccharide from *Weissella confusa* as an antibacterial against *Staphylococcus aureus*.

Production of exopolysaccharides using MRSB media with the addition of a carbon source in the form of sucrose 10% because the production of exopolysaccharides requires a high carbon source. The results of the production were tested using the antibacterial activity test of exopolysaccharides against *Staphylococcus aureus* using the agar diffusion method. The design in this study used a completely randomized design (CRD) with a single factor, namely variations in concentration EPS (0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; dan 5) mg/mL. Then it was analyzed by using One Way ANOVA test.

The results of this study indicated that the addition of 10% sucrose in EPS production resulted in a yield of 22,48 gr/L, and the antibacterial activity of EPS against *Staphylococcus aureus* resulted in the highest inhibition zone of 3.1 mm at a concentration of 5 mg/mL, while the ANOVA test showed there was a significant difference in the addition of EPS concentration to the growth of *Staphylococcus aureus* (sig < 0.05).

مستخلص البحث

إيسايلا، ج. ٢٠٢٣. امكانية عديد السكاريد الخارجي الذي تنتجه ويسيلا كونفوسا ك (*Weissella confusa K2*) كمضادة البكتيريا على المكورات العنقودية الذهبية. 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: عديد السكاريد الخارجي (EPS)، مضادة البكتيريا، المكورات العنقودية الذهبية.

ويسيلا كونفوسا هي واحدة من بكتيريا حمض اللاكتيك (BAL) التي يمكن أن تنتج السكريات الخارجية التي من المعروف أن لها فوائد في صناعة الصحة والأغذية وهي آمنة للاستهلاك أو مادة آمنة بشكل عام (GRAS). عديد السكاريد الخارجي (EPS) هو بوليمرات يتم تصنيعها بواسطة الكائنات الحية الدقيقة التي يتم إطلاقها في المستخلصات حول خلاياها، وكل سلالة من البكتيريا تنتج عديد السكاريد الخارجي ذات الخصائص المختلفة. يهدف هذا البحث إلى معرفة تأثير تركيزات عديد السكاريد الخارجي من ويسيلا كونفوسا كمضادة البكتيريا على المكورات العنقودية الذهبية.

استخدم إنتاج EPS وسائط MRSB مع إضافة مصدر كربون على شكل سكروز بنسبة ١٠٪، لأنه يتطلب مصدرا عالي الكربون. تم اختبار نتائج الإنتاج لنشاط EPS كمضادة البكتيريا على المكورات العنقودية الذهبية باستخدام طريقة انتشار الآجار. استخدم التصميم في هذا البحث تصميم عشوائيا كاملا (RAL) بمضروب واحد؛ وهو اختلافات التركيز (٠,٣١٢٥ ؛ ٠,٦٢٥ ؛ ١,٢٥ ؛ ٢,٥ ؛ ٥) ملغم / مل. ثم تحليلها مع مجموعة متنوعة من المتغيرات من اتجاه واحد ANOVA.

أظهرت نتائج هذا البحث أن إضافة ١٠٪ سكروز في إنتاج EPS أدى إلى عائد قدره ٢٤,٤٨ جم / لتر، وأدى نشاط مضادة البكتيريا ل EPS على المكورات العنقودية الذهبية إلى أعلى منطقة مثبتة تبلغ ٣,١ مم بتركيز ٥ مجم / مل، بينما أظهر اختبار ANOVA فرقا حقيقيا في إضافة تركيز EPS إلى نمو المكورات العنقودية الذهبية (سيغ > ٠,٠٥).

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Eksopolisakarida (EPS) merupakan polimer yang disintesis melalui jalur metabolisme mikroorganisme meliputi bakteri, jamur, dan cyanobacteria (Li dkk., 2020). EPS adalah salah satu polisakarida yang dihasilkan dari sekresi oleh bakteri asam laktat yang dilepaskan pada ekstraseluler disekitar sel. Kemampuan bakteri asam laktat dalam menghasilkan polisakarida ekstraseluler yang berantai panjang EPS sudah banyak dilaporkan (Imran dkk., 2016). Penelitian sebelumnya sudah banyak melaporkan manfaat EPS yang diproduksi dari bakteri asam laktat (BAL) dalam bidang pangan sebagai pengatur tekstur dan reologi, dan dalam bidang kesehatan sebagai potensi imunostimulasi, aktivitas antioksidan, antitumor, menurunkan kolesterol darah (Anindita, 2020), dan sebagai antibakteri (Li dkk., 2014).

Salah satu jenis bakteri yang dapat menghasilkan EPS adalah bakteri asam laktat (BAL). Bakteri asam laktat (BAL) adalah bakteri gram positif, tidak membentuk spora, tahan terhadap asam dan bersifat fakultatif anaerob. BAL umumnya bersifat bakteri non patogen dan kelompok bakteri yang memiliki status *generally recognized as safe* (GRAS) (Widodo dkk., 2019). BAL umumnya digunakan dalam proses fermentasi makanan untuk mengubah karbohidrat menjadi asam laktat (Nuraida, 2015). BAL memiliki kelebihan dalam saluran pencernaan dengan cara memicu pertumbuhan bakteri baik yang baru dan mampu menyeimbangkan bakteri baik dan patogen di dalam usus manusia dan BAL dapat

meningkatkan keseimbangan mikroflora usus (Utami, 2018). Oleh karena itu, EPS banyak diaplikasikan dalam produk pangan fermentasi, bioemulsifier, dan produk kimia (Li dkk., 2020).

Golongan BAL yang memiliki kemampuan dalam memproduksi senyawa metabolit sekunder eksopolisakarida yang memiliki banyak manfaat diantaranya yaitu *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* dan *Weissella* (Sanlibaba dan Gürcü., 2016). Salah satu BAL yang dapat digunakan dalam produksi EPS adalah *Weissella confusa*, karena berpotensi menghasilkan EPS dengan rendemen yang cukup tinggi dengan penambahan sukrosa dalam media produksinya (Tayuan, 2011). Produksi EPS yang berasal dari BAL dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti jenis bakteri, suhu, pH, lama fermentasi, konsentrasi substrat, penambahan sukrosa, konsentrasi inokulum (El-Waseif dkk., 2013).

Salah satu potensi EPS yang sudah diketahui adalah sebagai antibakteri, karena memiliki kemampuan dalam merusak sel bakteri patogen sehingga dapat dijadikan sebagai kandidat antibakteri alami. Hikmah yang terdapat dalam eksopolisakarida adalah salah satu bukti ciptaan Allah SWT baik di bumi atau di langit pasti terdapat manfaat di dalamnya. Seperti firman Allah SWT di dalam Al-Qur'an surat Shaad ayat 27.

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَاطِلًا يُذَلِّكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا فَوَيْلٌ لِلَّذِينَ كَفَرُوا مِنَ النَّارِ ﴿٢٧﴾

Artinya: "Dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada di antara keduanya dengan sia-sia. Itu anggapan orang-orang kafir, maka celakalah orang-orang yang kafir itu karena mereka akan masuk neraka" (QS. Shaad: 27).

Berdasarkan tafsiran al Qurthubi (2009) menjelaskan bahwa Allah menciptakan alam semesta memiliki arah tujuan yang benar dan tidak ada kesia-

sian tanpa ada manfaat atau hikmah. Manfaat ini tidak langsung dirasakan, tetapi melalui pengolahan akal fikir manusia yang dikembangkan dengan wawasan keilmuan yang diperoleh baik secara eksperimental atau teoritis. EPS yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat memiliki manfaat salah satunya sebagai antibakteri. Hal tersebut menunjukkan atas kekuasaan Allah SWT dalam segala yang dikehendaki-Nya bagi orang yang berakal, serta mampu memahami firman-Nya.

Kemampuan adhesi eksopolisakarida digunakan sebagai alternatif pengobatan infeksi pada dinding saluran pencernaan, aktivitasnya sebagai antibakteri, kemampuan membentuk gel dan degradasi polutan (Anindita, 2020). Mekanisme aktivitas antibakteri pada EPS diawali dengan menembus ke dalam membran sel bakteri dan secara bergantian akan mengganggu proses replikasi bakteri dengan menekan pertumbuhan bakteri (Nwodo dkk., 2012). Bakteri patogen yang mengkontaminasi bahan pangan akan menyebabkan terjadinya degradasi protein sehingga akan mengalami kerusakan atau pembusukan pada sel-sel yang terdapat pada makanan. Bakteri patogen tersebut *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp*, dan *Clostridium batulinum* (Razak, 2009). *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu bakteri patogen pada manusia yang terdapat pada permukaan kulit maupun hidung manusia. Jika lapisan permukaan tubuh tersebut mengalami luka akibat gesekan, goresan atau penyakit kulit lainnya, bakteri akan mudah menginfeksi bahkan dapat masuk ke pembuluh darah dan menyebabkan bacteremia dan menginfeksi berbagai organ tubuh manusia. Pada kulit, infeksi *Staphylococcus aureus* dapat berupa bisul,

selulitis, impetigo (Humaryanto dkk., 2022), dan dermatitis, infeksi saluran pernafasan (Afifurahman dkk., 2014).

Li dkk., (2014) melaporkan bahwa EPS yang dihasilkan dari *Lactobacillus plantarum* dengan konsentrasi 0,3 mg/mL dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* sebesar 15 mm. Sedangkan menurut Saleem dkk., (2021) melaporkan bahwa EPS dari *Lactobacillus plantarum* S123 dengan konsentrasi 3 mg/mL dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* sebesar 7,2 mm. Sedangkan menurut penelitian Saif dan Sakr., (2020) melaporkan bahwa EPS dari *Lactobacillus plantarum* 47FE dengan konsentrasi 5 mg/mL dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* sebesar 18,5 mm.

Berdasarkan uraian yang telah dipaparkan bahwasannya EPS yang dihasilkan oleh BAL akan memiliki potensi sebagai antibakteri, sehingga dilakukan penelitian ini untuk mengetahui potensi EPS yang dihasilkan dari *Weissella confusa* K2 terhadap *Staphylococcus aureus*.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana aktivitas antibakteri eksopolisakarida yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* K2 terhadap *Staphylococcus aureus*?

1.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui aktivitas antibakteri eksopolisakarida yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* K2 terhadap *Staphylococcus aureus*.

1.4 Batasan Masalah

1. Bakteri asam laktat yang digunakan adalah *Weissella confusa* K2 yang diisolasi dari buah kelengkeng.

2. Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi agar dengan variasi konsentrasi eksopolisakarida yaitu 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; dan 5 mg/mL dengan kontrol positif kloramfenikol.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi eksopolisakarida dari *Weissella confusa* K2 sebagai antibakteri.
2. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai produksi eksopolisakarida dari *Weissella confusa* K2 dengan penambahan sukrosa 10% pada media MRSB.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat adalah bakteri yang memiliki kemampuan menghasilkan asam laktat, hidrogen peroksida, antimikroba dan hasil metabolisme lain yang dapat memberikan pengaruh positif terhadap kesehatan. Dapat tumbuh pada pH lingkungan yang rendah. Secara ekologis, kelompok bakteri sangat bervariasi dan anggota spesiesnya mendominasi pada makanan, minuman dan habitat lain seperti tanaman, jerami, rongga mulut hewan (Sudarmadji, 1989). Secara umum bakteri asam laktat memiliki ciri-ciri seperti selnya bereaksi positif terhadap pewarnaan Gram, bereaksi negatif terhadap katalase dan tidak membentuk spora. Beberapa bakteri asam laktat adalah *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, dan *Lactococcus*. (Romadhon dkk., 2012).

Bakteri asam laktat seperti *Weissella* merupakan golongan organisme food-grade yang memiliki status *Generally Recognized as Safe* (GRAS) dan mampu memproduksi sejumlah jenis molekul ekstraseluler polisakarida (EPS) yang berkontribusi untuk tekstur pada makanan fermentasi. EPS terbagi menjadi 2 golongan yaitu homopolisakarida dan heteropolisakarida. EPS ini memungkinkan pengembangan generasi baru dari food-grade polisakarida. Dan juga berkontribusi positif pada rasa, bau, preservasi dari produk akhir (Van Hijum, dkk., 2002; De Vuys, dkk., 2001). Jenis *Weissella* dapat dikelompokkan menjadi 2 jenis (Fardiaz., 1992) yaitu:

1. Bakteri homofermentatif adalah bakteri asam laktat sebagai produknya yang dihasilkan dari fermentasi glukosa.
2. Bakteri heterofermentatif adalah menghasilkan produk bakteri asam laktat dan senyawa lainnya seperti etanol, asam asetat, dan CO₂ dari glukosa yang difermentasikan.

Allah SWT telah menciptakan berbagai jenis makhluk hidup, sedangkan pemanfaatan dan pencariannya tergantung dari manusia. Petunjuk adanya makhluk hidup yang memiliki ukuran lebih kecil telah difirmankan oleh Allah SWT dalam surat Al-Baqarah ayat 26 yang berbunyi:

﴿ إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي ۚ أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا ۗ فَأَمَّا الَّذِينَ آمَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ ۗ وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ اللَّهُ بِهَذَا مَثَلًا ۗ يُضِلُّ بِهِ كَثِيرًا وَيَهْدِي بِهِ كَثِيرًا ۗ وَمَا يُضِلُّ بِهِ إِلَّا الْفَاسِقِينَ ۗ ۝۲۶ ﴾

Artinya: “Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan berupa seekor nyamuk atau yang lebih kecil dari itu. Adapun orang-orang beriman, mereka yakin bahwa perumpamaan itu kebenaran dari Tuhan. Tetapi mereka yang kafir berkata, “Apa maksud Allah menjadikan Ini sebagai perumpamaan?” dengan perumpamaan itu banyak orang yang disesatkan Allah, dan dengan perumpamaan itu juga banyak orang yang diberi-Nya petunjuk. Akan tetapi tidak ada yang disesatkan Allah kecuali orang-orang yang fasik” (QS. Al-Baqarah:26).

Berdasarkan ayat di atas terdapat lafadz “fama fauqohaa” yang berartikan sebagai hewan yang memiliki ukuran yang lebih kecil daripada nyamuk, sehingga dapat dikatakan bahwa hewan dengan ukuran yang lebih kecil dari nyamuk tersebut salah satunya adalah mikroba. Walaupun keberadaan mikroba tidak dapat dilihat secara langsung, akan tetapi mikroba tertentu memiliki manfaat bagi kehidupan manusia, salah satunya adalah bakteri asam laktat yang dapat menghasilkan

eksopolisakarida yang nantinya dapat memiliki banyak manfaat dalam bidang kesehatan dan industri makanan. Pada QS. Al-Jaatsiyah: 13 Allah SWT berfirman:

وَسَحَّرَ لَكُمْ مَّا فِي السَّمٰوٰتِ وَمَا فِي الْاَرْضِ جَمِيعًا مِّنْهُ لِيَّا فِيْ ذٰلِكَ لَاٰيٰتٍ لِّقَوْمٍ يَّتَفَكَّرُوْنَ ۝۱۳

Artinya: “Dan Dia telah menundukkan untukmu apa yang ada di langit dan apa yang ada di bumi semuanya, (sebagai rahmat) dari-Nya. Sesungguhnya dalam hal demikian itu benar-benar terdapat tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang berfikir” (QS. Al-Jaatsiyah: 13).

Berdasarkan ayat di atas menunjukkan bahwa manusia dapat memanfaatkan segala sesuatu yang telah Allah ciptakan, termasuk bakteri untuk kemaslahatan manusia. Para ahli bahasa menjelaskan bahwa lafadz “*Sakhkhara*” (menundukkan atau memudahkan) pada ayat di atas berarti memudahkan segala isi alam semesta untuk kepentingan manusia. Karena di alam semesta ini tidak ada sesuatu yang sulit untuk dipergunakan oleh manusia, asalkan manusia mempergunakan akal pikiran serta ilmu pengetahuannya dan mengerti bagaimana mengembangkan kebaikan-kebaikan yang berasal dari benda tersebut (Assiba’i, 1993).

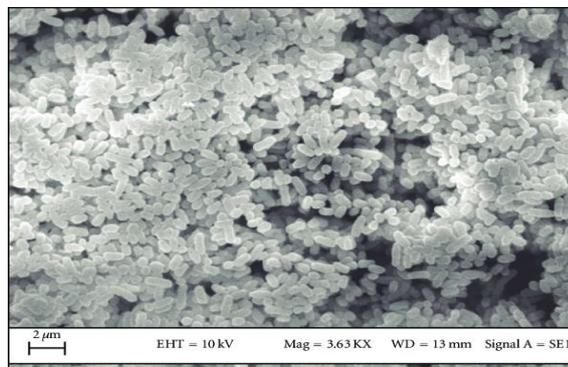
2.2 *Weissella confusa*

Weissella confusa adalah bakteri Gram positif, katalase negatif, memiliki bentuk non-spora, anaerob fakultatif, dan memiliki alfa hemolitik yang muncul sebagai batang pendek atau coccobacilli yang akan berpasangan dan rantai. *Weissella confusa* akan menghasilkan asam laktat dan CO₂ melalui proses fermentasi glukosa dengan jalur fermentasi heterolaktik. *Weissella confusa* memiliki ketahanan hidup dalam kondisi lingkungan pH rendah dan konsentrasi garam empedu yang tinggi, memiliki aktivitas antibakteri dan bakteriosin, aktivitas antioksidan yang baik bagi kesehatan, dan menunjukkan tidak adanya aktivitas

hemolitik dan memiliki sensitivitas terhadap antibiotik sehingga aman digunakan sebagai kultur starter dalam makanan (Lakra dkk., 2020).

Weissella confusa diketahui dapat menghasilkan hidrogen peroksida yang mampu menghambat keputihan isolat *vagina Candida albicans*, dan pertumbuhan *E. coli*, *S. aureus*, dan *Streptococcus agalctiae*. Spesies *Weissella* telah banyak digunakan dalam produksi pangan yang difermentasi dan akhir-akhir ini juga banyak digunakan sebagai probiotik. *Weissella confusa* memiliki potensi antikanker, anti radang, anti bakteri, anti jamur, dan daya tahan tubuh (Kamboj dkk., 2015). *Weissella confusa* baru-baru ini menarik perhatian dalam bidang akademis karena memiliki kemampuan yang tinggi dalam memproduksi EPS (Jin dkk., 2019). Berdasarkan *Taxonomic Outline of the Prokaryotes*, *Weissella confusa* diklasifikasikan sebagai berikut:

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



Gambar 2.1 Bentuk *Weissella confusa* (Shukla dan Goyal 2011)

2.3 Eksopolisakarida (EPS)

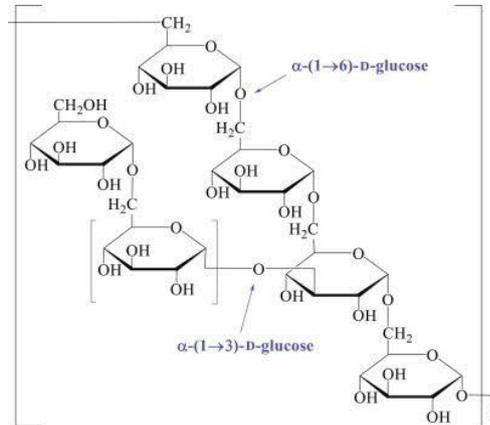
Eksopolisakarida adalah sebuah polimer dari gula pereduksi yang memiliki berat molekul tinggi dan dapat disekresikan oleh mikroorganisme ke lingkungan eksternalnya. Eksopolisakarida adalah suatu polisakarida hasil sekresi dari bakteri asam laktat (BAL) yang dilepaskan pada ekstraseluler di sekitar sel (Imran dkk., 2016). Polimer ini adalah salah satu polimer yang dapat disintesis oleh bakteri asam laktat. Umumnya EPS terdiri dari monosakarida dengan beberapa substituen non-karbohidrat (asetat, piruvat, suksinat, dan fosfat) (Van Hijum dkk., 2002) juga biomolekul seperti protein, asam nukleat, lipid, dan zat humat (Vu dkk., 2009).

Senyawa EPS yang dapat digolongkan menjadi homopolisakarida dan heteropolisakarida. Penggolongan EPS dari BAL berdasarkan komposisi monosakarida dan jalur biosintesisnya. Homopolisakarida (HoPs) dapat diklasifikasikan berdasarkan ikatan glikosidik, panjang rantai, struktur polimer, dan berat molekul. Senyawa HoPs tersusun atas monosakarida yang seragam meliputi glukosa dan fruktosa. Glukosa disintesis dari sukrosa oleh glikansukrase dan dicirikan oleh jumlah atom karbon pada ikatan α dan β . Bakteri penghasil α -D-glukosa yaitu *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, dan *Weissella*, sedangkan *Pediococcus* dapat memproduksi β -glukosa (Badel dkk., 2011). Ikatan α (α -D-glukosa) yang terdiri:

a. Dekstran

Dekstran merupakan polimer kompleks dari glukosa yang mengalami percabangan dengan membentuk ikatan α -(1,6) glikosidik, dengan rantai cabang pada α -(1,2), α -(1,3), dan α -(1,4) (Juraskova dkk., 2022). Dekstran yang dibiosintesis oleh bakteri asam laktat memiliki berat molekul yang besar yaitu 40-

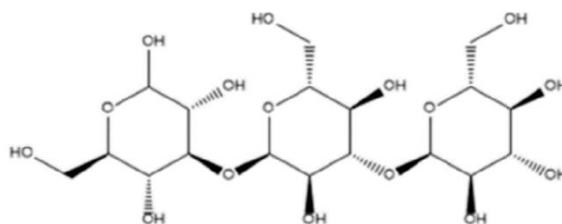
2000 kDa (Nestopa dkk., 2018). Konstanta dielektrik 78,5 dalam akuabides, dan mampu larut dalam DMSO. Memiliki warna putih kekuningan (krem) dan berbentuk powder (Chalim, 2020).



Gambar 2.2 Dekstran (Mehnath dkk.,2021)

b. Mutan

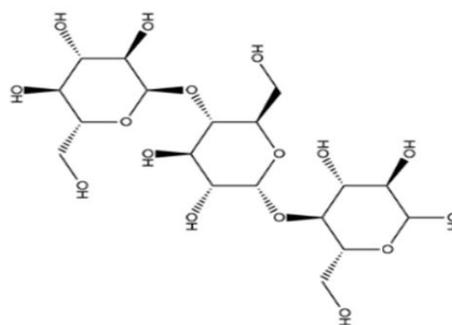
Mutan merupakan polimer gula reduksi yang membentuk ikatan glikosidik pada α -(1,3) dan α -(1,6), kelarutan dalam air sedikit, dan memiliki kemampuan kuat dalam menempel di mukosa usus (Guerin dkk., 2020).



Gambar 2.3 Mutan (Sorensen dkk., 2022)

c. Reutran

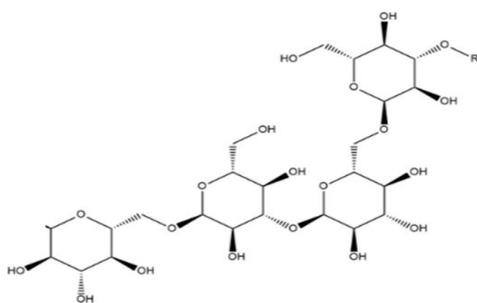
Reutran mampu larut dalam air, dan memiliki ikatan glikosidk pada α -(1,6) dan α -(1,4) (Guerin dkk., 2020).



Gambar 2.4 Reutran (Sorensen dkk., 2022)

d. Alternan

Alternan dihubungkan secara bergantian oleh α -(1,6) dan α -(1,3) dan memiliki viskositas yang lebih rendah dengan kelarutan yang lebih tinggi dalam air (Juraskova dkk., 2022).



Gambar 2.5 Alternan (Sorensen dkk., 2022)

Tabel 2.1 Homopolisakarida yang Dihasilkan oleh Bakteri Asam Laktat

HoPS		BAL	Literatur
α -D-glucans	Dextran	<i>Weissella confusa</i>	Maina dkk., 2008
	α -(1,6) glikosidik	<i>Weissella confusa</i> C19	Heperkan dkk., 2020
		<i>Weissella confusa</i>	Rosca dkk., 2017
		<i>Lactobacillus satsumensis</i>	Jurášková dkk., 2022
Fructans	Levans	<i>Weissella cibaria</i>	Kang dkk., 2009
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Jurášková dkk., 2022
		<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	Jurášková dkk., 2022
β -Glucans		<i>Lactobacillus suebicus</i>	Garai dkk., 2010

Fruktan terdiri dari fruktosa yang disintesis oleh β -fruktansukrase seperti inulin (β -2,1 glicosidic bond) dan levan (β -2,6 glicosidic bond), bakteri penghasil fruktan diantaranya adalah *Lactobacillus*, *Leuconoctoc*, *Streptococcus*.

Heteropolisakarida (HePs) dari BAL merupakan unit berulang dengan sedikit kesamaan struktural satu sama lainnya, dan terdiri dari beberapa monosakarida yang disintesis secara intraseluler. Unit penyusun HePs terdiri dari glukosa, rhamnosa, mannosa, galaktosa, dan fruktosa. Bakteri penghasil HePs yaitu *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, dan *Lactobacillus* (Guerin dkk., 2020).

Eksopolisakarida di dunia industri makanan fermentasi berfungsi sebagai pengental, stabilizer, pembuatan gel sampai pengemulsian, seperti produksi yoghurt, keju, kefir, roti, dan sereal. Dalam dunia kesehatan EPS memiliki banyak manfaatnya, yaitu sebagai penurun kadar kolesterol, imunomodulator, antitumor, antibiotik, dan antikanker. Aplikasinya dalam bidang farmasi sebagai sistem penghantaran obat (*carrier*) senyawa aktif insulin oral (Nurhasana dkk., 2020). EPS juga digunakan sebagai obat antiinflamasi dalam bentuk gel, dan masker gel jerawat (Rahmadini, 2018).

Efek eksopolisakarida dalam kesehatan yaitu pada sistem imunitas, dimana beberapa EPS seperti polisakarida lain memiliki sifat merangsang kekebalan yang bergantung pada stereokimianya, ukuran molekul, jumlah dan jenis residu gula yang dapat membentuk EPS. EPS juga terdapat struktur yang penting dalam efek imunostimulan, dan berperan dalam kolestrol dengan menurunkan kadar kolestrol serum, dengan melapisi lapisan dari mukosa usus yang dapat mengurangi penyerapan kolestrol, juga pencernaan, dan memiliki efek pada diabetes dengan cara memperlambat respon glikemik dimana viskositas pada makanan ini mempercepat makanan keluar dari perut (Mozzi, 1995). EPS juga berperan dalam proses perlindungan sel bakteri dari kekeringan, mempertahankan fungsi seluler

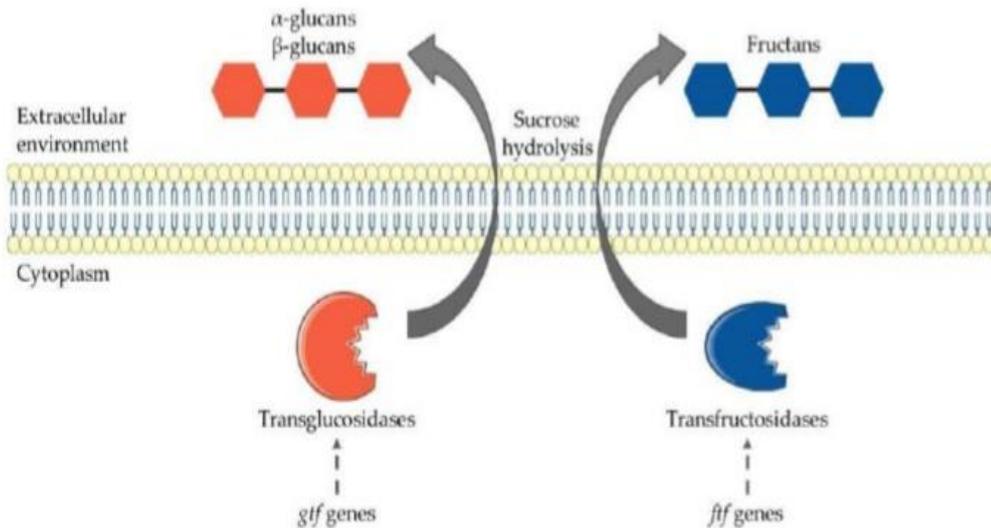
primer, aktivitas antibakteri terhadap predator, dapat melakukan pembentuk gel, dan degradasi polutan. Terdapat dua jenis utama EPS menurut komponen penyusunnya yaitu homo-EPS dan hetero-EPS. Saat ini, EPS telah banyak dimanfaatkan secara luas dalam berbagai aplikasi dalam pangan, farmasi, dan industri lainnya. EPS telah terbukti memiliki aktivitas fisiologis seperti antitumor, antivirus dan antiinflamasi, serta menjadi penginduksi interferon, penghambatan agregasi trombosit, sintesis faktor penstimulasi koloni, koagulan, dan pelumas (Anindita, 2020).

2.4 Biosintesis Eksopolisakarida

Eksopolisakarida yang dihasilkan oleh bakteri terdapat berbagai macam yang disintesis melalui jalur biosintesis yang berbeda-beda. EPS disintesis dalam fase-fase pertumbuhan yang berbeda dengan kondisi yang bervariasi tergantung dari jenis mikroorganismenya. Bakteri Gram positif dan Gram negatif dapat mensintesis EPS dengan melalui dua mekanisme yang berbeda. Bakteri Gram positif akan mensintesis EPS melalui proses secara ekstraseluler seperti *levan*, *alternan*, dan *dextran* (Vanhooren dkk., 1998), sedangkan bakteri Gram negatif akan mensintesis EPS melalui proses secara intraseluler seperti *xanthan*, *gellan*, *cellulose*, dan *sucinoglycans* (Sutherland, 2001). Bakteri Gram positif seperti *Weissella*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, dan *Pediococcus* mensintesis secara ekstraseluler (homopolisakarida, sedangkan bakteri Gram negatif seperti *Lactococcus*, *Bifidobacterium* spesies mensintesis EPS secara intraseluler (heteropolisakarida) (Guerin dkk., 2020).

Proses sintesis dibagi menjadi dua prinsip dasar yaitu tempat sintesis dan prekursor alami misalnya sintesis di luar dinding sel atau pada membran sel. Jalur

biosintesis EPS secara intraseluler (heteropolisakarida) ditunjukkan pada Gambar 2.2 (Guerin dkk., 2020).

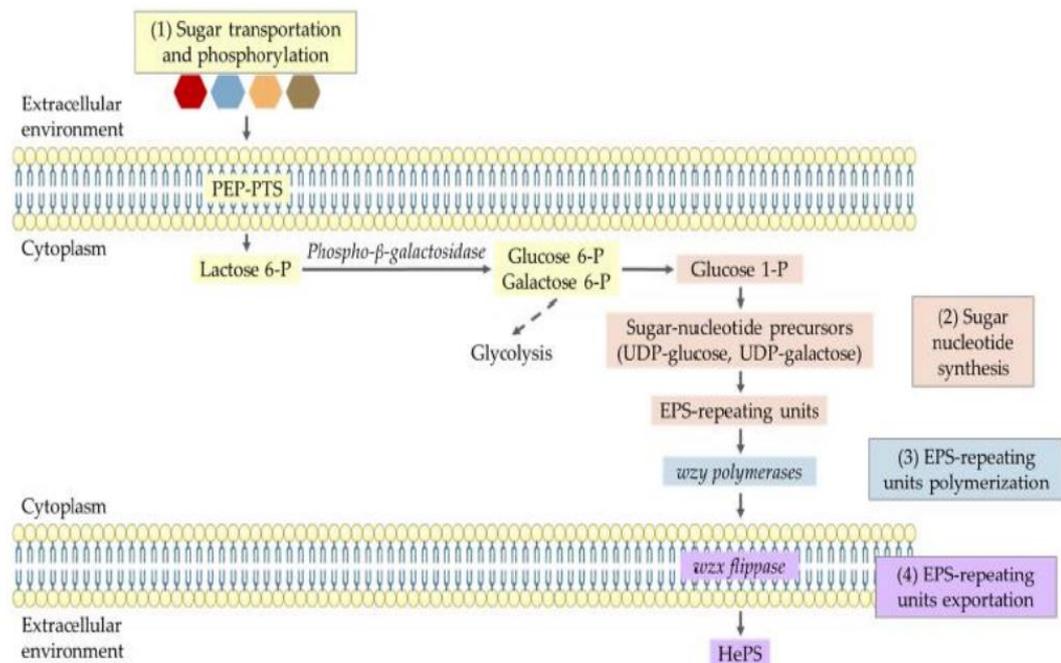


Gambar 2.6 Jalur Biosintesis Homopolisakarida (Guerin dkk., 2020)

Proses pembentukan Homopolisakarida (HoPs) dari substrat sukrosa berlangsung secara ekstraseluler (di luar sel). sukrosa dipecah menjadi monomer glukosa dan fruktosa dengan bantuan enzim sukrase *glukansukrase/glukosiltransferase* (gtf) dan *fruktansukrase/fruktosiltransferase* (ftf). Kemudian energi yang dilepaskan digunakan untuk menggabungkan kembali unit gula sehingga membentuk rantai polisakarida, sedangkan glukosa dan fruktosa yang tidak digunakan pada proses biosintesis EPS digunakan bakteri untuk menghasilkan ATP. Aktifitas enzim gtf akan menghasilkan EPS jenis alfa-glukan, dan beta-glukan, sedangkan enzim ftf menghasilkan EPS jenis fruktan (Guerin dkk., 2020).

Biosintesis heteropolisakarida (HePs) melalui 4 tahap seperti pada Gambar 2.3 yaitu: (1) transfortasi gula ke dalam sel sitoplasma bakteri, (2) sintesis

nukleotida, (3) polimerisasi EPS, dan (4) EPS yang dihasilkan akan berbentuk polimer berlendir atau menempel di dinding sel (Guerin dkk., 2020).



Gambar 2.7 Jalur Biosintesis Heteropolisakarida (Guerin dkk., 2020)

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

asetilglukosamin dengan katalis enzim GimU (UDP-Nasetilglukosamin pirofosforilase), UDP-N-asetilglukosamin melakukan pengulangan unit baik rantai maupun cabang dengan bantuan Glikosiltransferase. Setelah terjadi penggabungan, selanjutnya polisakarida yang terbentuk dikeluarkan dari sel dan terlarut di media fermentasi (Fatih, 2020).

2.5 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Produksi Eksopolisakarida

1. Media

Pengoptimalan proses fermentasi BAL dalam produksi EPS yang sangat beragam dibutuhkan media, karena polimer ini memiliki rantai utama yaitu glukosa. Menurut Badel dkk., (2011) menggunakan media MRSB dengan penambahan karbohidrat seperti glukosa, sukrosa, laktosa dan lainnya merupakan media yang umum digunakan dalam produksi EPS. Hasil penelitian Wongsuphachat dkk., (2010) melaporkan bahwa *Weissella confusa* mampu menghasilkan EPS tertinggi dengan menggunakan media MRSB dan penambahan sukrosa 10% menghasilkan rendeman EPS sebesar 40 gr/L.

2. Konsentrasi Substrat

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

3. Konsentrasi Inokulum

Inokulum merupakan biakan bakteri aktif yang dimasukkan ke dalam media cair yang siap digunakan dalam fermentasi (Pelczar dkk., 2007). Semakin tinggi konsentrasi inokulum akan mempercepat dan memperbanyak pembentukan EPS akan tetapi, jika konsentrasi inokulum yang berlebihan atau sangat besar akan menyebabkan fermentasi tidak efisien (Franca, 2009). Menurut penelitian Haroun dkk., (2013) hasil biosintesis EPS dengan variasi inokulum 1, 2,5, 5,0, 10, 15, dan 20 mL/L yakni jumlah EPS tertinggi yaitu sebesar 0,65 gr/L pada konsentrasi inokulum 10 mL/L.

4. Konsentrasi Sukrosa

Penggunaan sumber karbon dalam proses fermentasi yaitu monosakarida seperti glukosa dan disakarida seperti sukrosa dan laktosa (Kusmiati dkk., 2011). Sukrosa merupakan salah satu jenis gula yang dapat dimetabolisme oleh bakteri menjadi asam laktat selama proses fermentasi berlangsung. Sukrosa memiliki potensi menjadi sumber nutrisi bagi BAL. Semakin tinggi jumlah konsentrasi sukrosa yang ditambahkan dalam media fermentasi maka rendeman EPS yang dihasilkan akan meningkat (Anindita, 2020).

Tabel 2.2 Strain *Weissella confusa* dalam Produksi EPS

Strain	Media	Produksi (gr/L)	Sumber
<i>Weissella confusa</i> VP30	MRSB sukrosa 10%	59,99	Jin dkk., (2019)
<i>Weissella confusa</i> NH02	MRSB sukrosa 4%	18,08	Wongsuphachat dkk., (2010)
<i>Weissella confusa</i> 3MI3	MRSB sukrosa 10%	47,1	Buksa dkk., (2021)
	MRSB sukrosa 5%	25,6	

5. Lama Fermentasi

Fermentasi merupakan tahap dalam pembentukan EPS sehingga waktu fermentasi sangat mempengaruhi hasil dari produk EPS. Hasil penelitian Fitria, (2017) bahwa dengan variasi lama fermentasi 18 jam dan 24 jam, diperoleh hasil EPS tertinggi sebesar 0,74 gr/L yakni pada lama fermentasi 18 jam.

6. Suhu

Suhu fermentasi yang terlalu tinggi akan mempengaruhi pertumbuhan mikroba dan enzim yang dihasilkan oleh mikroba itu sendiri. Suhu yang terlalu tinggi akan mengakibatkan denaturasi enzim. Umumnya enzim bekerja sangat lambat pada suhu di bawah titik beku dan kereaktifannya akan meningkat sampai suhu 45°C. Menurut penelitian Jin dkk., (2019) menunjukkan bahwa produksi EPS optimum dari isolat *Weissella confusa* dihasilkan pada sekitar suhu 37° C dengan hasil EPS sebesar 59 gr/L.

7. pH

pH merupakan salah satu parameter yang penting dan kritis lingkungan yang mempengaruhi total BAL dalam medium fermentasi, total asam laktat dan total EPS kasar yang dihasilkan. pH optimum untuk pertumbuhan isolat *Weissella confusa* adalah pada kondisi netral yaitu sekitar 7. Hasil penelitian Jin dkk., (2019) bahwa produksi EPS optimum dari isolat *Weissella confusa* adalah pada sekitar pH 7,0 dengan hasil EPS sebesar 59,99 gr/L.

2.6 Bakteri Patogen

Bakteri ada yang bersifat patogen ketika dapat menyebabkan penyakit pada makhluk hidup lainnya, termasuk manusia. Makanan bisa terkena kontaminasi oleh mikroba patogen yang masuk ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan. Infeksi oleh mikroba tersebut dapat dimulai dari membran mukosa pada dinding

saluran pencernaan, terutama usus halus. Beberapa bakteri patogen yang menyebabkan penyakit infeksi pada manusia antara lain *Staphylococcus* keracunan makanan dan bronkitis, *Streptococcus* radang paru dan karies gigi, *Vibrio* penyebab penyakit kolera, dan *Salmonella* menyebabkan penyakit diare, demam (Suseno dkk., 2000; Puspita, 2011; Jorgensen dkk., 2015).

Suatu mikroorganisme termasuk bakteri dapat bersifat patogen ketika memiliki kemampuan sebagai berikut (Palczar dan Chan, 1996):

Mampu memasuki jaringan tubuh inang, mampu melakukan metabolisme dan berkembang biak di dalam tubuh inang, mampu mempertahankan diri dari pertahanan tubuh inang, dan mampu mengkapabilitas dalam menyebabkan kerusakan pada inang.

Bakteri patogen dibedakan menjadi dua kelompok utama berdasarkan pada pewarnaan Gram yaitu bakteri Gram positif dan Gram negatif. Gram positif ketika dilakukan pewarnaan gram akan menghasilkan warna ungu, dikarenakan bakteri golongan gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang sangat tebal pada dinding selnya, sehingga mampu mempertahankan warna ungu dari kristal violet. Sedangkan bakteri Gram negatif akan menghasilkan warna merah pada hasil pewarnaan gram. Hal ini dikarenakan bakteri ini memiliki lapisan peptidoglikan yang tidak terlalu tebal sehingga tidak dapat mempertahankan warna ungu dari pewarna kristal violet (Helmiyati dan Nurrahman, 2010).

Kelompok bakteri Gram positif diantaranya adalah bakteri dari genus *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Cyanococcus*, *Nocardila*, *Clostridium*, *Actinobacteria*, dan *Listeria*. Sedangkan kelompok bakteri Gram negatif adalah

Enterobacteriaceae, *Pseudomonas*, *Heliptobacter*, *Moravella*, *Streptomonas*, Bakteri Asam Laktat (BAL), Legionella, alfa proteobacter (Pratita dan Putra, 2012).

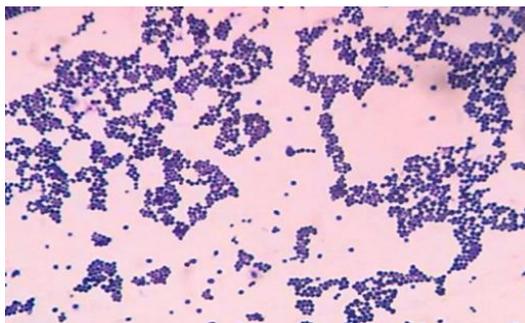
2.7 Bakteri *Staphylococcus aureus*

Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif, tidak berspora, dan non motil. Memiliki bentuk bulat dengan diameter antara 0,8- 1 mikron. Keberadaan bakteri ini dapat ditemukan pada bagian tubuh manusia seperti kulit dan membran mukus yang meliputi bukal, nasal, dan aural. Bakteri ini bersifat patogenik yang dapat menyebabkan berbagai macam penyakit serius seperti pneumonia, septicaemia, osteomyelitis, endokarditis, dan gatroenteritis (Bernardo dkk., 2005).

Menurut Garrity dkk., (2007) taksonomi bakteri *Staphylococcus aureus* sebagai berikut:

Kerajaan	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Coccoi
Ordo	: Bacillales
Famili	: Staphylococaceae
Genus	: Staphylococcus
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>

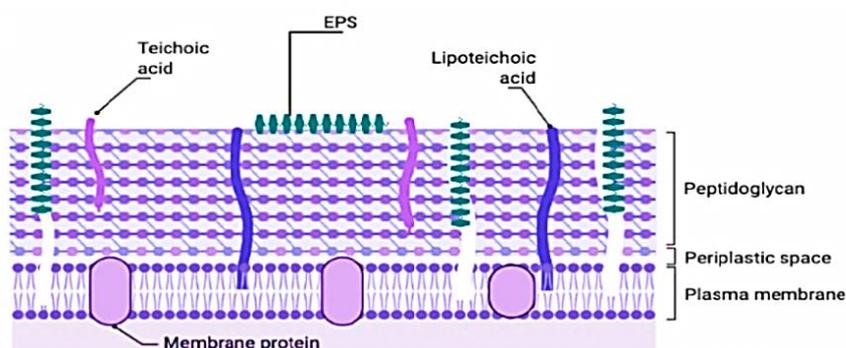
Bakteri *Staphylococcus aureus* dapat tumbuh pada kisaran suhu 6,5 sampai 45° C dengan suhu optimum adalah 37° C dengan pH antara 4,2 sampai 9,3 (Tyasningsih dkk., 2010).



Gambar 2.8 Bakteri *Staphylococcus aureus* Berdasarkan Pewarnaan Gram (Malelak dkk., 2015)

2.8 Mekanisme Kerja Eksopolisakarida Sebagai Antibakteri

Mekanisme penghambatan eksopolisakarida (EPS) terhadap bakteri patogen terjadi interaksi antara EPS dengan dinding sel bakteri patogen. Kemampuan EPS sebagai antibakteri karena adanya substituen organik seperti asetil dan piruvil bersama dengan gula deoksi seperti rhamnosa yang dapat berkontribusi pada karakter hidrofobik. EPS juga memiliki gugus OH yang sangat kuat yang berkontribusi pada karakter hidrofilik. Oleh karena itu EPS memiliki struktur amfifilik yang dapat memberikan afinitas struktur antara dinding sel bakteri dengan EPS, sehingga akan menyebabkan penghancuran dinding sel bakteri (Li dkk., 2016).



Gambar 2.9 Ilustrasi Interaksi antara EPS dengan Dinding Sel Bakteri Gram positif (Abdalla dkk., 2021)

1. Penghambatan terhadap sintesis dinding sel

Eksopolisakarida (EPS) telah terbukti sebagai antibakteri dengan merusak dinding sel bakteri. EPS menyerang bakteri Gram negatif dan Gram positif yang mana kedua bakteri ini memiliki perbedaan struktur dinding selnya. Bakteri Gram negatif memiliki membrane luar yaitu lipopolisakarida, lipoprotein, dan fosfolipid yang akan melindungi bagian dalam yaitu peptidoglikan terhadap molekul asing dengan berat molekul yang tinggi. Molekul polar EPS yang mampu melewati bagian luar dinding sel bakteri melalui porin protein yang berlimpah dan berfungsi sebagai saluran transmembran hidrofilik, sehingga bakteri Gram negatif tahan terhadap hidrofobik antibakteri, akibatnya membrane luar bakteri Gram negatif berperan melindungi dari penetrasi terhadap makromolekul dan senyawa hidrofobik. Sedangkan bakteri Gram positif memiliki anionik sitoplasma tunggal dan lapisan peptidoglikan tebal yang mengandung polisakarida yaitu asam teikoat anionik. Lapisan polisakarida merupakan polimer yang bersifat polar dan tempat transport ion positif dan sebagai jalur keluar masuk, sehingga EPS akan mudah masuk kedalam dinding sel bakteri Gram positif (Lingga dan Evy, 2015). Hal ini EPS akan mengganggu permeabilitas pada permukaan dinding sel dan mengalami denaturasi protein, sehingga pertumbuhan bakteri akan terhambat.

Secara umum bakteri Gram negatif memiliki ketahanan yang kuat terhadap senyawa antibakteri karena memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks yaitu lapisan luar (lipopolisakarida) dan lapisan dalam (peptidoglikan) (Halim dan Zubaidah, 2013). Lipopolisakarida pada bakteri Gram negatif berperan sebagai pelindung bagian dalam yaitu peptidoglikan yang merupakan komponen penting dan spesifik dari dinding sel bakteri yang ditemukan di bagian luar membran

sitoplasma dan memiliki peran bertanggung jawab menjaga integritas sel dan sebagai tumpuan untuk menahan komponen selubung sel lain seperti protein (Dramsidi dkk., 2008).

2. Penghambatan terhadap fungsi membran sel.

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

3. Penghambatan terhadap sintesis protein

Proses sintesis protein tersusun dari transkripsi dan pemindehan protein. Senyawa antibakteri mampu menghambat proses sintesis protein dengan mendenaturasi kandungan protein. Hidupnya suatu sel tergantung pada terpeliharanya molekul-molekul dalam keadaan alamiah. Suatu kondisi atau substansi mengubah keadaan ini yaitu mendenaturasi protein dengan merusak sel tanpa dapat diperbaiki kembali (Pelczar dan Chan, 1988).

4. Penghambatan terhadap sintesis asam nukleat

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

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

2.9 Kadar Gula Total Eksopolisakarida Metode Sulfat-Fenol

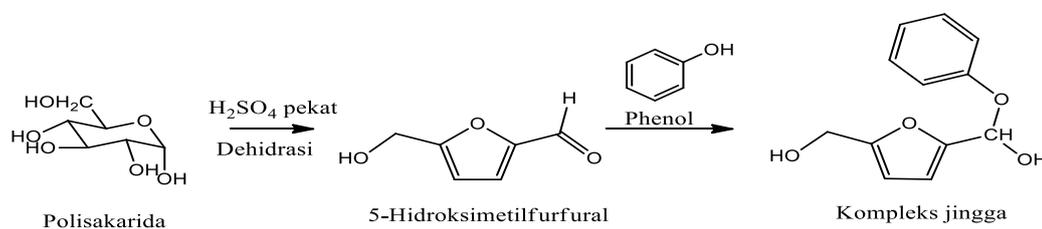
Metode kimia yang digunakan dalam penentuan gula total yaitu metode sulfat fenol dan metode anthron, dimana kedua metode ini merupakan metode klasik dengan sejarah yang panjang dalam penggunaannya, meskipun pada metode sulfat-fenol yang lebih populer dibandingkan metode anthron. Metode sulfat-fenol dimanfaatkan dalam menentukan kadar glukosa dalam sampel (Brummer, 2005).

Metode asam sulfat fenol adalah metode dalam menentukan total karbohidrat dalam sampel. Metode ini mendeteksi secara virtual semua kelas karbohidrat (mono-, di-, oligo-, dan polisakarida) (Nielsen, 2010). Metode ini dapat mengukur dua molekul gula pereduksi. Gula sederhana, oligosakarida, dan turunannya dapat dideteksi dengan fenol dalam asam sulfat yang pekat yang akan menghasilkan warna jingga kekuningan yang stabil dan mampu mendeteksi dua gula pereduksi karena sukrosa yang ada dihidrolisis dahulu menjadi dua molekul glukosa sehingga dapat mengetahui gula pereduksi total. Penentuan glukosa menggunakan metode

fenol-asam sulfat yang disebut juga metode TS (total sugar) yang digunakan untuk mengukur kadar gula total (Nurjannah, 2019).

Gula merupakan golongan karbohidrat, baik gula reduksi atau gula non-reduksi. Ketika ditambahkan asam kuat dan dipanaskan pada senyawa D-galaktosa dan D-manosa maka akan terjadi serangkaian reaksi yang mengarah pada pembentukan turunan furan seperti furanaldehid dan hidroksimetil furfural pada karbohidratnya. Reaksi awal yaitu terjadi reaksi dehidrasi dengan diikuti pembentukan turunan furan (Brummer, 2005).

Prinsip dasar metode sulfat-fenol adalah karbohidrat ketika didehidrasi melalui reaksi dengan asam sulfat pekat, akan menghasilkan turunan furfural. Kemudian turunan furfural akan bereaksi dengan fenol menghasilkan senyawa kompleks berwarna jingga kekuningan yang stabil sehingga dapat dideteksi menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Albalasmeh dkk., 2013).



Gambar 2.10 Reaksi Penentuan Kadar Gula Total Metode Sulfat-Fenol (Muhaimin, 2018)

2.10 Kadar Protein Eksopolisakarida

Kadar protein pada eksopolisakarida merupakan senyawa yang tidak diinginkan sehingga perlu dipisahkan. Pemisahan protein pada eksopolisakarida menggunakan metode Lowry. Prinsip metode lowry adalah reagen pendeteksi Folin-ciocalteu berfungsi sebagai pendeteksi gugus-gugus fenolik. Dalam keadaan basa, ikatan peptida akan mereduksi ion tembaga divalent (Cu^{2+}) menjadi tembaga

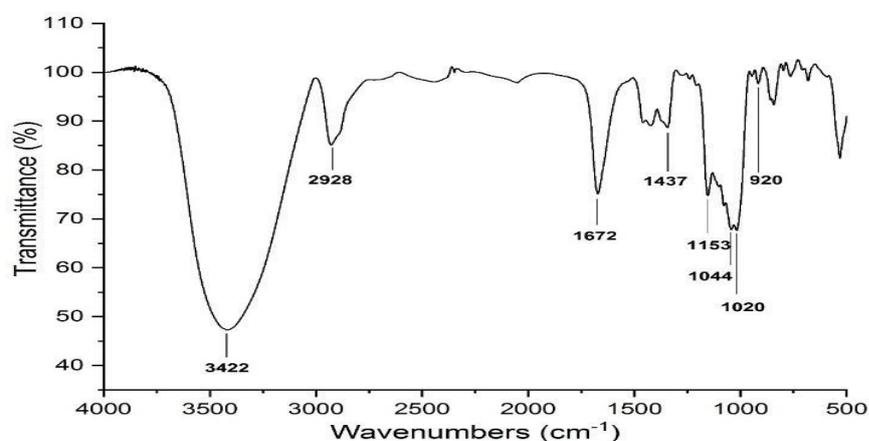
monovalent (Cu^+), kemudian ion Cu^+ mereduksi reagen folin-ciocalteu dan kompleks fosfomolidat fosfotungstat yang menghasilkan *heteropoly molybdenum blue* akibat reaksi oksidasi pada gugus aromatis rantai samping asam amino yang terkatalsis Cu dan memberikan warna biru yang dapat dideteksi secara kolorimetri (Bintang, 2010). Reagen Folin-Ciocalteu berfungsi mendeteksi residu oksidasi dimana gugus fenolik tirosin akan mereduksi fosfotungstat dan fosfomolidat yang terdapat pada reagen tersebut menjadi tungstate dan molibden dengan menghasilkan warna biru, hasil reduksi tersebut dapat dianalisa menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Sudarmadji, Slamet, dkk., 1981).

Penentuan kadar protein dengan menggunakan kurva standar dengan larutan protein murni yang sudah diketahui kadar proteinnya seperti *Bovine Serum Albumin* (BSA) yang memiliki rentang konsentrasi tertentu, kemudian konsentrasi sampel yang mengandung protein berada pada rentang tersebut dengan konsentrasi yang semakin naik (Sudarmadji, Slamet, dkk., 1981).

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

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

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



Gambar 2.11 Spektra FTIR Eksopolisakarida *Weissella confusa* MD1 (Lakra dkk., 2020)

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, Laboratorium Biokimia, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas yaitu meliputi tabung reaksi, cawan petri, Erlenmeyer, pipet tetes, pipet ukur, batang pengaduk, gelas ukur, dan beaker glass. *Laminor air flow*, spektrofotometer UV-Vis, neraca analitik, *hot plate*, *autoclave*, *shaker*, sentrifus, inkubator, *blue tip*, *yellow tip*, tabung sentrifugasi, rak tabung reaksi, jarum ose, spatula, *stirrer*, aluminium foil, kapas, plastik tahan panas, bunsen, korek api, dan jangka sorong.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian kali ini meliputi BAL berupa *Weissella confusa* K2. Bakteri patogen berupa *Staphylococcus aureus*. MRSA (*De Man Rogosa Sharpe Agar*) (Merck), MRSB (*De Man Rogosa Sharpe Broth*) (Pronadisa), MHA (*Mueller Hinton Agar*) (Merck), MHB (*Mueller Hinton Broth*) (Merck), *Nutrien Agar* (NA), NaOH (Merck), aquadenim (waterone), spiritus, NaCl, etanol PA 96% (Merck), alkohol 70% (Onemed), *blank disc* (Oxoid) diameter 6 mm, *antibiotic disc* kloramfenikol (oxoid), dan sukrosa.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri EPS oleh *Weissella confusa* K2 terhadap *Staphylococcus aureus*. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAL) dengan pola faktorial tunggal yaitu variasi konsentrasi EPS (0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; dan 5 mg/mL) terhadap bakteri patogen yaitu *Staphylococcus aureus*, dengan mengukur diameter zona bening yang terbentuk pada lima variasi konsentrasi EPS. Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak empat kali. Analisis dalam penelitian ini adalah rendemen, aktivitas antibakteri, kadar total gula, dan kadar protein.

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Sterilisasi alat dan media
2. Produksi eksopolisakarida
 - 2.1 Pembuatan media MRSA
 - 2.2 Regenerasi *Weissella confusa* K2
 - 2.3 Pembuatan media MRSB
 - 2.4 Pembuatan inokulum *Weissella confusa* K2
 - 2.5 Produksi eksopolisakarida dengan penambahan sukrosa 10% pada media MRSB
 - 2.6 Ekstraksi eksopolisakarida
3. Uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*
 - 3.1 Pembuatan media *Nutrien Agar* (NA)
 - 3.2 Regenerasi *Staphylococcus aureus*
 - 3.3 Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

- 3.4 Pembuatan media *Mueller Hinton Broth* (MHB)
- 3.5 Pembuatan inokulum *Staphylococcus aureus*
- 3.6 Uji aktivitas antibakteri
- 3.7 Rumus perhitungan zona hambat
- 4. Analisa kadar gula total eksopolisakarida dengan metode sulfat – fenol
 - 4.1 Pembuatan kurva standar glukosa
 - 4.2 Penetapan kadar gula total dengan metode sulfat-fenol
- 5. Analisa kadar protein eksopolisakarida dengan metode lowry
 - 5.1 Pembuatan kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA)
 - 5.2 Penetapan kadar protein dengan metode Lowry
- 6. Analisa gugus fungsi eksopolisakarida menggunakan FTIR
- 7. Analisa data

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat

Seperangkat alat gelas yang digunakan selama penelitian harus dicuci terlebih dan disterilisasi dengan dipanaskan pada autoklaf selama 15 menit dengan temperatur 121°C dan tekanan 2 atm. Jarum ose disterilkan dengan sterilisasi panas kering dalam nyala api bunsen sampai berwarna merah membara. Juga pada medium dan alat non-gelas terlebih dahulu disterilkan dengan sterilisasi panas basah menggunakan autoklaf, sterilisasi selama 30 menit dengan temperatur 121°C dan tekanan 2 atm.

3.5.2 Produksi Eksopolisakarida

3.5.2.1 Pembuatan Media MRSA (de Man Rogosa and Sharpe Agar) (Fitria, 2017)

MRS Agar dibuat dengan ditimbang sebanyak 6,82 gr, dilarutkan ke dalam 100 mL aquades, dipanaskan hingga mendidih diatas *hot plate* dan *magnetic stirrer* agar homogen. Kemudian larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 mL dan ditutup dengan *cotton plug* (sumbat kapas) serta plastik wrap, dan dilanjutkan sterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C, dengan tekanan sebesar 15 psi selama 15 menit. Larutan tersebut didinginkan dalam tabung reaksi pada keadaan miring hingga memadat. Media MRS Agar ini berfungsi untuk regenerasi bakteri *Weissella confusa*.

3.5.2.2 Regenerasi *Weissella confusa* K2 (Nudyanto dan Zubaidah, 2015)

Kultur *Weissella confusa* K2 yang telah dibiakkan diambil sebanyak dua ose dan diinokulasikan pada media MRSA padat posisi miring. Diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Setiap dua minggu sekali kultur *Weissella confusa* K2 ini harus diremajakan. *Weissella confusa* K2 yang telah mengalami regenerasi dapat digunakan untuk pembuatan inokulum stok.

3.5.2.3 Pembuatan Media MRSB (de Man Rogosa and Sharpe Broth)

Media MRSB 10,44 gr ditambahkan akuades sebanyak 200 mL dan dipanaskan sampai mendidih. Media dipindahkan pada beberapa erlenmeyer 250 mL kemudian ditutup dengan kapas dan dimasukkan dalam plastik tahan panas, kemudian disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C tekanan 15 psi selama 20 menit.

3.5.2.4 Pembuatan Inokulum (Maunatin dkk., 2020)

Pembuatan inokulum ini dilakukan dengan memindahkan 3 (tiga) ose biakan *Weissella confusa* K2 ke dalam 25 mL media MRSB, kemudian diinkubasi selama 18 jam pada suhu ruang. Kekeruhan inokulum sel *Weissella confusa* K2 yang digunakan disetarakan dengan optical density (OD) 0,5 pada panjang gelombang 600 nm.

3.5.2.5 Produksi Eksopolisakarida (Bomfim dkk., termodifikasi, 2020)

Produksi EPS menggunakan media MRSB 100 mL dan ditambahkan sukrosa 10% (b/v). Kemudian ditambahkan inokulum *Weissella confusa* K2 5% (v/v), selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

3.5.2.6 Ekstraksi Eksopolisakarida (Seo dkk., termodifikasi, 2015)

Hasil fermentasi sebanyak 100 mL disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Diambil supernatan sebanyak 80 mL dan ditambahkan 3,2 gr asam trikloroasetat dengan konsentrasi akhir 4% dan dishaker selama 30 menit dengan kecepatan 100 rpm. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang mengandung eksopolisakarida diambil 75 mL dan ditambah etanol dingin absolut (2 kali volume supernatan) dan dibiarkan pada suhu 4°C selama 24 jam. Endapan yang didapat dipisahkan dari filtrat, kemudian dikeringkan pada temperatur 60°C selama 4 jam, dimana setiap jam ditimbang berat kering sampai konstan. Kadar eksopolisakarida kering ditentukan dengan menggunakan persamaan 3.1.

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

3.5.3 Uji Antibakteri Terhadap *Staphylococcus aureus*

3.5.3.1 Pembuatan Media *Nutrien Agar* (NA)

Nutrien agar ditimbang sebanyak 2 gr, kemudian dilarutkan pada 100 mL akuades sambil dipanaskan sampai mendidih. Kemudian larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 mL dan ditutup dengan *cotton plug* (sumbat kapas) serta plastik wrap, dan dilanjutkan sterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan sebesar 15 psi selama 15 menit. Larutan tersebut didinginkan dalam tabung reaksi pada keadaan miring hingga memadat

3.5.3.2 Regenerasi *Staphylococcus aureus*

Kultur *Staphylococcus aureus* diambil 2 ose dan digoreskan pada NA miring secara aseptis, tabung didekatkan pada api ketika menggoreskan bakteri. Kemudian ditutup tabung dengan *cotton plug*, dan diinkubasi selama 24 jam pada temperature 37°C.

3.5.3.3 Pembuatan Media MHA (*Mueller Hinton Agar*)

Mueller Hinton Agar ditimbang sebanyak 3,8 gr, kemudian dilarutkan pada 100 mL akuades sambil dipanaskan sampai mendidih, kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan sebesar 15 psi selama 15 menit.

3.5.3.4 Pembuatan Media MHB (*Mueller Hinton Broth*)

Mueller Hinton Broth ditimbang sebanyak 2,1 gr, kemudian dilarutkan pada 100 mL akuades sambil dipanaskan sampai mendidih, kemudian disterilkan

menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan sebesar 15 psi selama 15 menit.

3.5.3.5 Pembuatan Inokulum *Staphylococcus aureus* (Sari., termodifikasi, 2013)

Pembuatan inokulum ini dilakukan dengan memindahkan 3 ose biakan *Staphylococcus aureus* ke dalam 25 mL media MHB, kemudian diinkubasi selama 18 jam pada suhu ruang sampai. Kekeruhan inokulum sel *Staphylococcus aureus* yang digunakan disetarakan dengan optical density (OD) 0,3 pada panjang gelombang 600 nm.

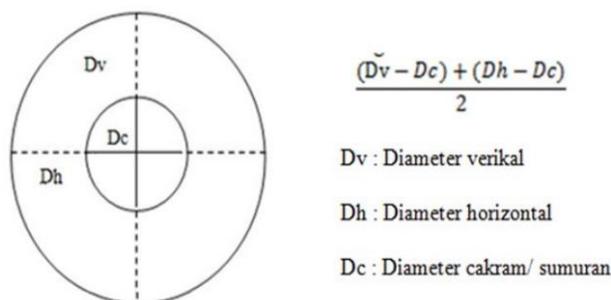
3.5.3.6 Uji Aktivitas Antibakteri Eksopolisakarida Terhadap *Staphylococcus aureus* (Saleem dkk., 2021)

Eksopolisakarida 0,025 gr dilarutkan dalam 5 mL DMSO 10 %, kemudian dibuat konsentrasi 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5 dan 5 mg/mL, dipipet 100 µL inokulum *Staphylococcus aureus* dalam cawan petri, kemudian dituang media MHA secukupnya, ditunggu sampai media mengeras, kemudian cakram yang sudah direndam pada tiap-tiap konsentrasi EPS selama 30 menit diletakkan diatas media yang sudah mengeras, dan 1 cakram kloramfenikol sebagai kontrol positif, dan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada temperature 37°C, diamati aktivitas antibakterinya.

3.5.3.7 Rumus Perhitungan Zona Hambat

Setelah proses inkubasi selama 24 jam dari proses penanaman bakteri dan peletakan kertas cakram yang berisi antibakteri, pengamatan dan perhitungan luas zona hambat yang terbentuk disekitar kertas cakram dilakukan 2x pengukuran yaitu

diukur diameter zona hambat secara horizontal dan vertikal dengan dikurangi setiap diameter kertas cakram, kemudian hasil yang didapat dibagi 2 untuk memperoleh rata-rata luas zona hambat (Dwi, 2019), seperti pada rumus dibawah ini.



Gambar 3.1 Rumus Perhitungan Zona Hambat (Harti, 2015)

3.5.4 Analisa Kadar Gula Total Eksopolisakarida dengan Metode Asam Sulfat-Fenol

3.5.4.1 Pembuatan Kurva Standar Glukosa (Dubois dkk., 1956)

Glukosa ditimbang sebanyak 0,01 gr dan ditanda bataskan sampai 100 mL untuk membuat larutan induk glukosa 1000 ppm, kemudian dibuat konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50 dan 60 ppm glukosa dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 2 mL, ditambahkan 1 mL larutan fenol 5% (b/v) dan divortex. Lalu ditambahkan 5 mL asam sulfat pekat di lemari asam. Dibiarkan selama 10 menit, dikocok lalu ditempatkan dalam penangas air selama 15 menit, diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 490 nm.

3.5.4.2 Penetapan Kadar Gula Total Eksopolisakarida dengan Metode Sulfat-Fenol (Dubois, dkk., 1956)

Eksopolisakarida ditimbang sebanyak 0,01 gr dilarutkan ke dalam 250 mL aquades lalu dihomogenkan. Kemudian diambil 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 1 mL larutan fenol 5% (b/v) dan divortex.

Kemudian ditambahkan 5 mL asam sulfat pekat di lemari asap. Dibiarkan selama 10 menit. dikocok dan ditempatkan dalam penangas air selama 15 menit dengan suhu 100°C dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm. Dihitung kadar total gula pada eksopolisakarida dengan mensubstitusikan absorbansi eksopolisakarida pada persamaan regresi linear dari kurva standar larutan glukosa standar dan nilai gula total eksopolisakarida (Lestari, 2013).

3.5.5 Analisa Kadar Protein Eksopolisakarida dengan Metode Lowry

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

BSA ditimbang sebanyak 0,03 gr dilarutkan ke dalam 10 mL aquades lalu dihomogenkan. Kemudian dibuat konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm. Setiap konsentrasi diambil 1 mL, dimasukkan ke setiap tabung reaksi dan ditambahkan 5 mL reagen lowry, divortex dan dibiarkan selama 10 menit, ditambahkan 0,5 mL folin 1N. Kemudian diinkubasi dalam ruang gelap selama 20 menit, lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 660 nm.

3.5.5.2 Penetapan Kadar Protein Eksopolisakarida dengan Metode Lowry (Adesulu dkk., 2018)

Eksopolisakarida ditimbang sebanyak 0,02 gr dilarutkan ke dalam 5 mL aquades lalu dihomogenkan. Kemudian diambil 1 mL, dimasukkan ke tabung reaksi dan ditambahkan 5 mL reagen lowry, divortex dan dibiarkan selama 10 menit, ditambahkan 0,5 mL folin 1N. Kemudian diinkubasi dalam ruang gelap selama 20 menit, lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 660 nm.

3.5.6 Analisa Gugus Fungsi Eksopolisakarida Menggunakan Fourier Transform Infra Red (FTIR) (Adesulu dkk., 2018)

Ditimbang eksopolisakarida 0,01 gr ditumbuk sampai halus kemudian dihomogenkan dengan KBr 0,25 gr kemudian campuran dicetak menjadi pelet dan diukur menggunakan FTIR pada frekuensi 4000-400 cm^{-1} .

3.5.7 Analisa Data

Data yang diperoleh yaitu zona hambat yang diperoleh dari uji aktivitas antibakteri EPS dianalisis dengan ragam varian One Way ANOVA. Jika ada pengaruh terhadap perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan signifikan 5%.

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Hasil aktivitas antibakteri EPS yang dihasilkan dari *Weissella confusa* K2 terhadap *Staphylococcus aureus* tertinggi terdapat pada konsentrasi 5 mg/mL dengan zona hambat yang muncul sebesar 3,1 mm, dan menghasilkan zona hambat terkecil sebesar 2,0 mm pada konsentrasi 0,3125 mg/mL.

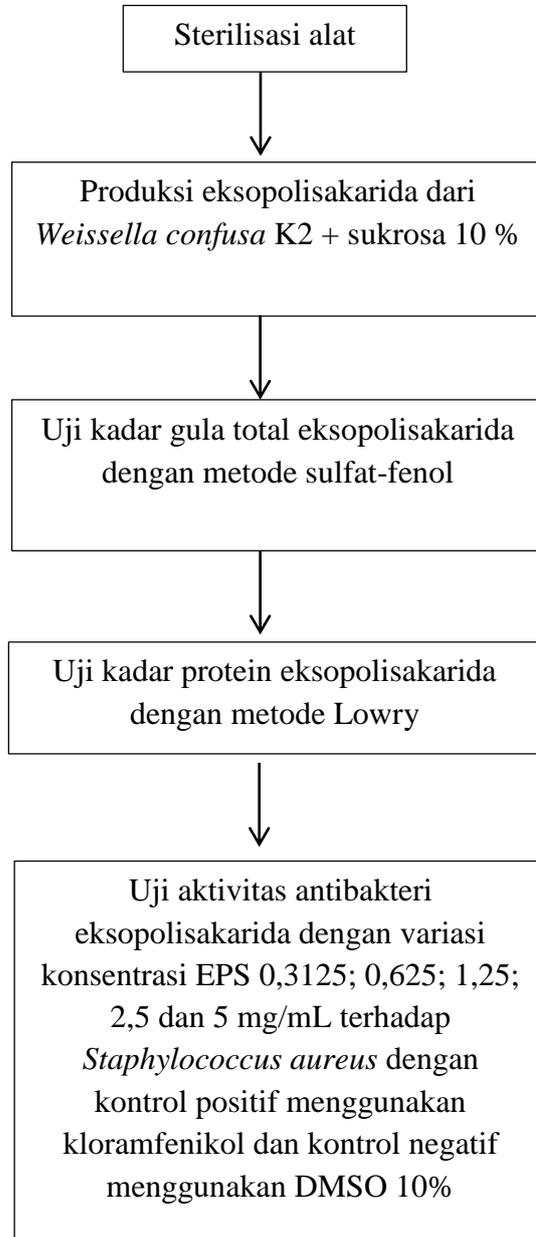
5.2 Saran

Perlu dilakukan uji lebih lanjut untuk optimasi produksi EPS dari *Weissella confusa* K2 terhadap potensi EPS sebagai antibakteri dengan melakukan penambahan variasi pH pada produksi EPS dan penambahan variasi konsentrasi EPS pada uji aktivitas antibakteri.

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian



Lampiran 2. Skema Kerja

Lampiran 3. Perhitungan

Lampiran 4. Hasil Analisa SPSS

Lampiran 5. Dokumentasi