

**KARAKTERISASI EKSPOLISAKARIDA YANG DIHASILKAN OLEH
Weissella confusa K2 MENGGUNAKAN MEDIA AIR KELAPA DAN UJI
TOKSISITAS MENGGUNAKAN METODE *Brine Shrimp Lethality Test*
(BSLT)**

SKRIPSI

**Oleh:
FIKROTUS SANIYYAH
NIM.19630039**



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

**KARAKTERISASI EKSOPOLISAKARIDA YANG DIHASILKAN OLEH
Weissella confusa K2 PADA MEDIA AIR KELAPA DAN UJI TOKSISITAS
MENGUNAKAN METODE *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)**

SKRIPSI

**Oleh:
FIKROTUS SANIYYAH
NIM. 19630039**

**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**

**KARAKTERISASI EKSPOLISAKARIDA YANG DIHASILKAN OLEH
Weissella confusa K2 PADA MEDIA AIR KELAPA DAN UJI TOKSISITAS
MENGUNAKAN METODE *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)**

SKRIPSI

Oleh:
FIKROTUS SANIYYAH
NIM.19630039

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk DIUJI:
Tanggal:13 Desember 2023

Pembimbing I



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

Pembimbing II



Rifatul Mahmudah, M.Si
NIP. 19830125 202321 2 020

Mengetahui,
Ketua Program Studi Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang






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

**KARAKTERISASI EKSPOLISAKARIDA YANG DIHASILKAN OLEH
Weissella confusa K2 PADA MEDIA AIR KELAPA DAN UJI TOKSISITAS
MENGUNAKAN METODE *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)**

SKRIPSI

Oleh:
FIKROTUS SANIYYAH
NIM. 19630039

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 20 Desember 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	: Rifatul Mahmudah, M.Si NIP. 19830125 202321 2 020	 (.....)

**Mengetahui,
Ketua Program Studi
Fakultas Sains Dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang**


Rachmawati Wingsih, M.Si
NIP. 19810811200801 2 010

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Fikrotu Saniyyah

NIM : 19630039

Program Studi : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Karakterisasi Eksopolisakarida yang Dihasilkan oleh *Weissella confusa* K2 Pada Media Air Kelapa dan Uji Toksisitas Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini 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 di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 20 Desember 2023

Yang membuat pernyataan,



Fikrotu Saniyyah
NIM. 19630039

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirabbil'alamin

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat, hidayah, dan karunia-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini, skripsi ini saya persembahkan kepada pihak-pihak yang saya sayangi:

Dua pasang manusia yang penuh cinta kasih dan sayang, cinta pertama dan surgaku H.Shohibul Umam dan Hj. Muasiyah yang telah sepenuhnya memberikan kekuatan dan segalanya aspek untuk menyelesaikan studi ini, inilah setitik dan pencapaian sederhana untukmu, bukti bahwa mereka berhasil memberikan pendidikan tinggi untukku skripsi ini untuk kalian.

Untuk saudara saudaraku H.Rofiul Arzaqi dan Tuchfatin Khoiroh, untuk saudara kembarku, setengah hidupku Fikrotun Nabilah, dan malaikat kecil onty Muhammad Tsabit Isbata Zayyan yang telah menyemangati dan memberikan support terbaik, dan untuk anggota keluarga lainnya.

Untuk para dosen yang sudah berpengaruh besar dalam skripsi ini yang terkhusus Ibu Anik Maunatin, sudah memberikan banyak waktu dan materi untuk terselesaikannya penelitian ini, terimakasih juga kepada ibu Rif'atul Mahmudah, ibu Akyunul Jannah, dan ibu Nur Aini, sudah banyak memberikan dukungan, bimbingan, masukan dan juga saran pada penelitian ini, serta ilmu yang bermanfaat. Semoga ibu dosen dan keluarga selalu sehat dan bahagia.

Untuk teman teman sekaligus keluarga malang seperjuangan dalam menyelesaikan skripsi, "Teletubbies" (Hilda, Oktavira, dan Okky) berjuang bersama sedari maba sampai lulus bersama. "Bisimillah Umroh" (Cece, Adi, Sakhi, Geo, Rizal, Elvionita, Yusha, Akbar, dan Reza) teman KKN yang selalu membantu dan memberikan waktu dalam keadaan apapun, Teman SMA (Endah, Anggun, Deva, Nadya, dan Lulu) terimakasih sudah bersedia mendengarkan keluhan dan memberikan support yang sangat baik, Teman SMP (Ihza, Afifah, Syarif, Vira) terimakasih sudah memberikan waktu dukungannya, Warga Biokim (Novalia, Mey, dan Okta serta teman lab biokim lainnya) terimakasih sudah mau berjuang bersama dan akhirnya lab biokim sold out.

Terimakasih untuk Fikrotus Saniyyah! Diri saya sendiri Apresiasi sebesar besarnya karena sudah sangat bertanggungjawab menyelesaikan dan berjuang bisa sampai dititik ini, terimakasih sudah menikmati dan mensyukuri disetiap proses yang telah diberikan oleh-Nya, semua ini tidak mudah, dan terimakasih sudah bertahan.

Terimakasih banyak untuk semuanya sudah menjadi bagian kehidupan skripsi ini.

MOTTO

“Bersyukur atas apa yang telah diberikan Allah, bersyukur atas apa yang belum Allah berikan, dan bersyukur atas apa yang tidak Allah berikan, semua bisa masuk dipikiran asal kita sebagai manusia selalu bersyukur dalam segala hal”

“Untuk masa masa sulitmu, biarlah Allah SWT yang menguatkanmu, tugas dirimu adalah berusaha agar jarak antara kamu dengan Allah SWT tidak pernah jauh”

“Susah, tapi Bismillah”
(Fiersa Besari)

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji dan syukur kehadirat Allah SWT atas karunia, rahmat, ridho dan juga hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan penelitian **“Karakterisasi Eksopolisakarida yang Dihasilkan Oleh *Weissella confusa* K2 Pada Media Air Kelapa dan Uji Toksisitas Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*”**. Sholawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada Baginda Nabi Muhammad SAW. Pada kesempatan ini, dengan penuh rasa hormat, penulis mengucapkan terimakasih kepada berbagai pihak yang telah banyak membantu, diantaranya:

1. Prof. Dr. M. Zainuddin, M. A selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
2. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si. selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
3. Rahmawati Ningsih, M.Si. selaku Ketua Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
4. Dr. Anik Muanatin, M.P selaku Dosen Pembimbing yang telah membimbing, meberikan pengarahan, dan nasehat kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini
5. Ibu Rif'atul Mahmudah, M.Si. selaku dosen pembimbing agama yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini
6. Ibu Dr. Akyunul Jannah, M.P dan Ibu Nur Aini, M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik, saran, dan pengarahan kepada penulis sehingga bisa menyelesaikan skripsi ini.
7. Seluruh Dosen Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan pengalaman, dan juga wawasan untuk pedoman dalam kepenulisan skripsi ini

Penulis menyadari bahwa dalam kepenulisan penyusunan laporan ini masih banyak kekurangan dan juga jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, diharapkan

memberikan kritik dan juga saran yang bersifat membangun, semoga skripsi ini bermanfaat bagi kita semua. Amiin

Malang, 14 Desember 2023

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
MOTTO	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
ABSTRAK	xvi
ABSTRACT.....	xvii
ملخص البحث.....	xviii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Batasan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Air Kelapa	7
2.2 Bakteri Asam Laktat.....	8
2.3 <i>Weissella confusa</i>	10
2.4 Eksopolisakarida	11
2.5 Biosintesis Eksopolisakarida.....	12
2.6 Faktor Faktor yang Mempengaruhi Produksi Eksopolisakarida	16
2.7 Karakterisasi Eksopolisakarida	18
2.6.1 Karakterisasi Eksopolisakarida Secara Fisik	18
2.6.2 Karakterisasi Eksopolisakarida Secara Kimia	19
2.6.2.1 Kadar Gula Total Eksopolisakarida.....	19
2.6.2.2 Analisa Kadar Protein Eksopolisakarida	20
2.6.2.3 Analisa Gugus Fungsi Eksopolisakarida Menggunakan Fourier Transform Infra Red (FTIR)	20
2.8 Uji Toksisitas dengan Metode BSLT (<i>Brine Shrimp Lethality Test</i>)...	22
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	26
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	26
3.2 Alat dan Bahan	26
3.2.1 Alat.....	26
3.2.2 Bahan.....	26
3.3 Rancangan Penelitian	27
3.4 Tahapan Penelitian	28
3.5 Cara Kerja.....	28

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Media	28
3.5.2 Preparasi Air Kelapa	29
3.5.3 Pembuatan Media	29
3.5.3.1 Pembuatan <i>de Man Rogosa and Sharpe Agar</i> (MRSA) .	29
3.5.3.2 Pembuatan <i>de Man Rogosa and Sharpe Broth</i> (MRSB).	29
3.5.3.3 Regenerasi <i>Weissella confusa</i> K2	30
3.5.3.4 Pembuatan Inokulum <i>Weissella confusa</i> K2.....	30
3.5.4 Produksi Eksopolisakarida.....	30
3.5.4.1 Produksi Eksopolisakarida Terhadap Produksi EPS Air Kelapa	30
3.5.4.2 Ekstraksi Eksopolisakarida dari Media Fermentasi Air Kelapa	31
3.5.5 Karakterisasi Eksopolisakarida Secara Fisika dan Kimia.....	31
3.5.5.1 Indeks Kelarutan Air dan Daya Ikat Air Eksopolisakarida	31
3.5.5.2 Uji Kadar Gula Total Metode Asam Sulfat-Fenol	32
3.5.5.2.1 Pembuatan Kurva Standar Gula Total	32
3.5.5.2.2 Analisa Kadar Gula Total Eksopolisakarida.....	32
3.5.5.3 Uji Kadar Protein Eksopolisakarida.....	32
3.5.5.3.1 Pembuatan Kurva Strandar <i>Bovine Serum</i> <i>Albumin</i>	32
3.5.5.3.2 Analisis Kadar Protein Eksopolisakarida	33
3.5.5.4 Analisis Gugus Fungsi Eksopolisakarida Menggunakan Fourier <i>Trasnform Infra Red</i> (FTIR).....	33
3.5.6 Uji Toksisitas <i>Weissella confusa</i> K2 dengan Metode BSLT	34
3.5.6.1 Penetesan Telur	34
3.5.6.2 Uji Toksisitas	34
3.5.7 Analisis Data.....	35
BAB V PENUTUP	36
5.1 Kesimpulan.....	36
5.2 Saran.....	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN.....	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Kelapa Tua	7
Gambar 2.2 Jalur Biosintesis HoPs.....	13
Gambar 2.3 Struktur Mutan	13
Gambar 2.4 Struktur Dekstran	14
Gambar 2.5 Struktur Alternan.....	14
Gambar 2.6 Struktur Reutran	15
Gambar 2.7 Struktur Inulin	16
Gambar 2.8 Struktur Levan.....	16
Gambar 2.9 Reaksi Kompleks Fenol – Furfural	19
Gambar 2.10 Spektra FTIR EPS oleh <i>Weissella confusa</i> C19.....	21
Gambar 2.11 <i>Artemia Salina</i> Leach.....	23

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Komposisi Kimia Air Kelapa.....	8
Tabel 2.2 Nilai LC ₅₀	24
Tabel 3.1 Analisis Data Hasil Uji Toksisitas	28

DAFTAR LAMPIRAN

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

ABSTRAK

Saniyyah, Fikrotus. 2023. **Karakterisasi Eksopolisakarida yang Dihasilkan Oleh *Weissella confusa* K2 Menggunakan Media Air Kelapa dan Uji Toksisitas Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)**. 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: Rifatul Mahmudah, M.Si.

Kata Kunci: BSLT, Eksopolisakarida, Uji toksisitas, *Weissella confusa* K2

Eksopolisakarida (EPS) merupakan polimer hasil biosintesis dari organisme keluar sel dengan berat molekul tinggi. Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan bakteri yang dapat menghasilkan EPS salah satunya yaitu *Weissella confusa* K2. Media produksi EPS secara umum menggunakan MRSB dengan harga yang mahal, sehingga perlu digunakan media alternatif yaitu air kelapa. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui karakterisasi dan toksisitas EPS yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* K2 dengan media air kelapa.

Produksi EPS dilakukan menggunakan media air kelapa pada pH 8 dengan penambahan sukrosa 10% (b/v), fermentasi dilakukan selama 24 jam dengan kecepatan 100 rpm pada suhu ruang. Karakterisasi dilakukan secara fisik dan kimia, karakterisasi fisika meliputi indeks kelarutan air dan daya ikat air, sedangkan untuk karakterisasi secara kimia meliputi analisa total gula, kadar protein dan gugus fungsi EPS menggunakan *Fourier Transform Infra Red Spectroscopy* (FTIR), dan tahap kedua yaitu uji toksisitas dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) yang dilakukan dengan variasi konsentrasi EPS 125, 250, 500, 1000 dan 2000 ppm, yang diujikan pada larva *Artemia salina* L.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa produksi EPS dari *Weissella confusa* K2 menghasilkan rendemen sebesar 23,69 g/L, dan uji karakterisasi fisik (Indeks kelarutan air sebesar 33,5%, dan daya ikat air sebesar 694%) karakterisasi secara kimia (kadar gula total sebesar 82,15%, dan kadar protein sebesar 0,65%, analisa gugus fungsi yang terbaca adalah O-H *stretching*, N-H *stretching*, C-H *stretching*, C=C *stretching*, C-H, C-H₂ *bending*, C-O-C *stretching*, C-O *stretching*, Ikatan glikosidik, C-H *bending* α -1-6 glikosidik,). Hasil uji toksisitas pada berbagai konsentrasi terhadap larva *Artemia Salina* Leach diperoleh nilai LC₅₀ 1.308 mg/L.

ABSTRACT

Saniyyah, Fikrotus. 2023. **Characterization of Exopolysaccharides Produced by *Weissella confusa* K2 Using Coconut Water Media and Toxicity Test Using the *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) Method.** 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: Rifatul Mahmudah, M.Sc.,

Keywords: BSLT *Exopolysaccharide*, *Toxicity test*, *Weissella confusa* K2

Exopolysaccharides (EPS) are polymers resulting from biosynthesis from organisms outside cells with high molecular weight. Lactic Acid Bacteria (LAB) are bacteria that can produce EPS, one of which is *Weissella confusa* K2. EPS production media generally use MRSB which is expensive, so it is necessary to use an alternative media, namely coconut water. The aim of this research is to determine the characterization and toxicity of EPS produced by *Weissella confusa* K2 using coconut water as a medium.

EPS production was carried out using coconut water at pH 8 with the addition of 10% sucrose (w/v), fermentation was carried out for 24 hours at a speed of 100 rpm at room temperature. Characterization is carried out physically and chemically, physical characterization includes water solubility index and water holding capacity, while chemical characterization includes analysis of total sugar, protein content and EPS functional groups using *Fourier Transform Infra Red Spectroscopy* (FTIR), and the second stage is a toxicity test. using the *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) method which was carried out with various EPS concentrations of 125, 250, 500, 1000 and 2000 ppm, which were tested on *Artemia salina* L larvae.

The results of this research showed that EPS production from *Weissella confusa* K2 resulted in a yield of 23.69 g/L, and physical characterization tests (water solubility index of 33.5%, and water holding capacity of 694%) chemical characterization (total sugar content amounted to 82.15%, and the protein content was 0.65%, the functional group analysis read was O-H stretching, N-H stretching, C-H stretching, C=C stretching, C-H, C-H₂ bending, C-O-C stretching, C-O stretching, glycosidic bonds, C-H bending α -1-6 glycosidic,). The results of toxicity tests at various concentrations on *Artemia Salina* Leach larvae obtained an LC₅₀ value of 1,308 mg/L.

ملخص البحث

سانيا، فكرتوس. ٢٠٢٣. يؤدي توصيف السكريات الخارجية التي تنتجها ويسيلا الخلط بين K2 (*Weissella confusa* K2) في وسائط ماء جوز الهند واختبار السمية باستخدام طريقة اختبار فتك الجمبري الملحي (BSLT). بحث جامعي. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرفة الأولى: الدكتورة أنيك ماؤنة، الماجستير، المشرفة الثانية: رفعة المحمودة، الماجستير

الكلمات الرئيسية: عديدات السكاريد الخارجية، ويسيلا الخلط بين K2، اختبار السمية، BSLT

عديدات السكاريد الخارجية هي بوليمرات يتم تصنيعها حيويًا من كائنات حية عالية الوزن الجزيئي. يتم الحصول على السكريات الخارجية واحدة منها من إنتاج بكتيريا حمض اللبنيك (BAL) تم إنتاج EPS في هذا البحث بواسطة ويسيلا الخلط بين K2 ينتج EPS الذي تنتجه كل سلالة من البكتيريا خصائص مختلفة. كان الغرض من هذا البحث هو تحديد توصيف وسمية EPS التي تنتجها ويسيلا الخلط بين K2 ووسائط ماء جوز الهند.

يتكون هذا البحث من مرحلتين، المرحلة الأولى هي إجراء التوصيف الفيزيائي والكيميائي، ويشمل التوصيف الفيزيائي مؤشر الذوبان في الماء وربط الماء، أما بالنسبة للتوصيف الكيميائي فيشمل تحليل السكر الكلي ومحتوى البروتين والمجموعات الوظيفية ل EPS باستخدام التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء لتحويل فورييه (FTIR)، والمرحلة الثانية هي اختبار السمية باستخدام طريقة اختبار فتك الجمبري الملحي (BSLT) الذي يتم إجراؤه مع اختلافات في تركيز EPS ١٢٥، ٢٥٠ و ٥٠٠ و ١٠٠٠ و ٢٠٠٠ ppm، والتي تم اختبارها على يرقات الأرتيميا سالينال.

أظهرت نتائج هذا البحث أن إنتاج EPS من ويسيلا الخلط بين K2 أدى إلى عائد قدره ٢٣,٦٩ g/L، واختبارات التوصيف الفيزيائي (مؤشر الذوبان في الماء بنسبة ٣٣,٥٪ وربط الماء بنسبة ٦٩٤٪) التوصيف الكيميائي إجمالي محتوى السكر بنسبة ٨٢,١٥٪، ومحتوى البروتين بنسبة ٠,٦٥٪، تحليل المجموعة الوظيفية يقرأ على أنه تمتد O-H، تمتد N-H، تمتد C-H، C = C، تمتد C-H، C-H2 الانحناء، C-O-C، تمتد C-O، الترابط جليكوسيديك، C-H الانحناء ٦-١- α جليكوسيدي (حصلت نتائج اختبارات السمية بتركيزات مختلفة على يرقات أرتيميا سالينا لينتس على قيم LC_{٥٠} تبلغ ١٣٠٨ mg/L، وقيم LC_{٥٠} من عينات تزيد عن ١٠٠٠ mg/L والتي أشارت إلى أن نتائج تخمير EPS لم يكن لها تأثيرات سامة للخلايا لذلك لم يكن لديها القدرة على اختبارها بشكل أكبر على الخلايا السرطانية.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Eksopolisakarida (EPS) adalah suatu polisakarida atau sebuah polimer gula yang terusun dari beberapa monomer gula pereduksi hasil sekresi mikroorganisme ke luar sel yaitu berada di luar dinding sel jamur atau bakteri. (Patel, *et al.*, 2012). EPS juga memiliki kegunaan dibidang pangan seperti sebagai pengental, stabilisator, pembentuk gel, dan juga memiliki kemampuan mengikat air dengan baik (Malik, dkk., 2008). EPS juga berperan dalam proses perlindungan sel bakteri dari kekeringan, mempertahankan fungsi seluler primer dan aktivitas antibakteri terhadap predator, kemampuan pembentuk gel dan degradasi polutan (Rawal, *et al.*, 2016). EPS memiliki kegunaan dibidang kesehatan seperti antibakteri, aktivitas antioksidan, imunostimulasi, dapat menurunkan kolesterol di dalam darah, dan juga sebagai antikanker (Li, *et al.*, 2016).

Penelitian Li, *et al* (2016) mengenai uji antitumor EPS yang diproduksi jamur endofit *Bionectria Ochroleuca* terdapat aktivitas poliferasi yang kuat pada sel HepG2, SGC-7901, dan HT29 pada konsentrasi 0,1–0,45. Penelitian Wang, K., *et al* (2013) menjelaskan bahwa EPS yang produksi dari *Lactobacillus Plantarum* 70810 memiliki kemampuan antitumor pada sel HepG2 pada konsentrasi 50 – 600 g/mL dan pada sel BCG-823 dan HT29 terdapat efek penghambatan yang signifikan.

EPS dapat dihasilkan dari banyak bakteri, salah satu bakteri penghasil EPS adalah Bakteri Asam Laktat (BAL), EPS dari BAL dapat diaplikasikan untuk memfermentasi bahan pangan, menghasilkan produk yang aman untuk dikonsumsi

(Kim, *et al.*, 2018). BAL umumnya dapat ditemukan pada sesuatu yang kaya nutrisi seperti sayuran, buah, daging, dan kacang-kacangan. BAL seperti *Lactobacillus*, *Leuconostoc* dan *Weissella* mempunyai kemampuan memproduksi senyawa metabolit sekunder berupa EPS (Sanlibaba and Gurcti, 2016). Hasil EPS yang baik, dapat menunjang hasil fermentasi juga dengan cara menggunakan atau menambahkan substrat yang memiliki kandungan yang baik juga seperti glukosa, sukrosa, dan fruktosa (Fifendy, dkk., 2013).

Air kelapa adalah salah satu bahan tambahan yang memiliki kandungan glukosa yang tinggi dan juga nutrisi yang kompleks sehingga cocok untuk dijadikan sebagai media alternatif pertumbuhan bakteri. Kandungan yang dimiliki air kelapa seperti gula, protein, asam amino, vitamin, dan mineral baik digunakan sebagai bahan pada proses fermentasi (Saraswati, 2014). Pencemaran bisa terjadi akibat air kelapa, karena tidak dimanfaatkan dengan baik dan akan berubah menjadi bau yang menyengat dan juga asam (Putri dan Tiara, 2019). Berdasarkan hal ini air kelapa digunakan sebagai media dalam produksi EPS oleh BAL untuk dan mengurangi pencemaran lingkungan yang terjadi dan juga sebagai media alternatif pengganti media MRSB yang mahal yang merupakan media standar spesifik untuk produksi EPS (Untari dan Puspitaningtyas, 2006).

Weissella confusa merupakan bakteri Gram positif dengan uji katalase negatif dengan bentuk sel *cocobacillus*. *Weissella confusa* merupakan bakteri probiotik maka dari itu memiliki potensi sebagai antikanker (Kamboj, *et al.*, 2015). Bakteri *Weissella confusa* diketahui memiliki kemampuan yang tinggi dalam memproduksi EPS jenis dekstran (Jin, *et al.*, 2019). Spesies ini banyak digunakan dalam berbagai

industri makanan. Hal ini menunjukkan bahwa segala sesuatu yang telah diciptakan Allah SWT memiliki manfaat, dalam Al-Quran Surat Ali-Imran (3) ayat 191:

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمٰوٰتِ
وَالْاَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هٰذَا بَطِلًا سُبْحٰنَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ

Artinya:

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

Menurut Dr. Abdullah Bin Muhammad bin Abdurrahman dalam buku tafsir Ibnu Katsir menginterpretasikan Al-Quran Surat Ali-Imran ayat yang ke 191 “Pada ketinggian dan kekuasaan langit dan juga pada kerendahan bumi serta kepadatannya, dan tanda tanda kekuasaan-Nya dapat dijangkau oleh indra manusia pada keduanya (langit dan bumi) baik berupa; bintang, komet, daratan, lautan, pegunungan, pepohonan, buah buahan, barang, tambang, dan segala hal yang beraneka ragam, silih berganti siang dan malam. Bahwa semuanya adalah ketentuan Allah SWT yang Maha Perkasa lagi Maha Mengetahui. Oleh karena itu terdapat tanda tanda bagi orang yang berakal sempurna lagi bersih dapat mengetahui dengan jelas dan nyata seharusnya memikirkan serta memanfaatkan apa yang Allah SWT telah berikan.” Manusia yang terus berfikir akan kekuasaan Allah SWT pasti mendapatkan manfaat dari semua yang sudah diciptakan dilangit dan bumi (Abdullah, M. 2007). Ayat ini dapat dijadikan landasan untuk penelitian ini, dan untuk mengetahui sebuah senyawa yang memiliki potensi sebagai antikanker, maka perlu dilakukan penelitian awal. Salah satu metode awal atau skrining untuk uji sitotoksik adalah dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test*

terhadap larva udang *Artemia salina* yang mengindikasikan sifat sitotoksik dari suatu senyawa.

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk pencarian senyawa antikanker. Metode BSLT telah terbukti memiliki korelasi dengan aktivitas antikanker. Selain itu, metode ini juga mudah dikerjakan, murah, cepat, dan cukup akurat (Meyer, *et al.*, 1982) nilai mortalitas ditentukan dengan menggunakan analisa probit untuk menentukan nilai toksisitas menggunakan *Lethal Concentration* (LC₅₀) (Ningdyah, dkk., 2015). Agustini dan Kusmiati (2017) melaporkan hasil potensi EPS dari *Porphyridium cruentum* (S. F. Gray) Nageli sebagai toksisitas biologis (BSLT) pada konsentrasi 10, 100, dan 1000 mg/L, mikroalga merah ini diketahui dapat memproduksi EPS dan hasil toksisitas BSLT nilai LC₅₀ sebesar 513,175 g/L.

EPS yang dihasilkan oleh BAL mempunyai keragaman jenis berdasarkan bakteri penghasilnya, hal ini menyebabkan perbedaan struktur dari EPS sehingga mempengaruhi pemanfaatan aplikasi EPS. Penelitian ini akan melakukan produksi dan karakterisasi EPS yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* K2 dengan menggunakan media air kelapa. Berdasarkan penjelasan tersebut penelitian ini dilakukan dikarenakan setiap bakteri memiliki kemampuan yang berbeda apabila media yang digunakan juga berbeda, maka akan menghasilkan jumlah EPS yang berbeda juga, selanjutnya EPS diuji toksisitasnya dengan menggunakan metode BSLT.

1.1 Rumusan Masalah

1. Bagaimana karakterisasi eksopolisakarida yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* K2 pada media air kelapa?
2. Bagaimana hasil toksisitas eksopolisakarida yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* K2 pada media air kelapa dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)?

1.2 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui karakterisasi eksopolisakarida yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* K2 pada media air kelapa?
2. Untuk mengetahui hasil toksisitas eksopolisakarida yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* K2 pada media air kelapa dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)?

1.3 Batasan Masalah

1. *Weissella confusa* K2 yang digunakan merupakan hasil isolasi buah kelengkeng pada penelitian sebelumnya.
2. Karakterisasi EPS secara fisika meliputi indeks kelarutan air dan *Water Holding Capacity* (WHC).
3. Karakterisasi secara kimia meliputi analisa kadar gula total, kadar protein dan identifikasi profil gugus fungsi EPS menggunakan instrument *Fourier Transform Infrared* (FTIR).
4. Konsentrasi yang digunakan pada metode BSLT adalah 125, 250, 500, 1000, dan 2000 ppm dengan menggunakan air laut sintetik sebagai pengencer.

1.4 Manfaat

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan pengetahuan bagi masyarakat luas maupun sivitas akademika mengenai produksi EPS menggunakan air kelapa sebagai media alternatif pengganti MRSB.
2. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai hasil produksi dan karakterisasi EPS dengan menggunakan air kelapa sebagai media, serta uji toksisitas EPS yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* K2 isolasi dari buah kelengkeng menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Air Kelapa

Air kelapa memiliki banyak nutrisi didalamnya, tetapi ini tergantung dari umur kelapa, air kelapa memiliki komposisi kimia seperti protein, lemak, hidrat arang, vitamin C, vitamin B kompleks, kalsium dan mineral yang sangat baik untuk tubuh manusia (Santoso, 2003). Disamping zat gizi tersebut, air kelapa juga mengandung berbagai asam amino bebas. Air kelapa dapat digunakan sebagai media pertumbuhan mikroba, misalnya *Acetobacter xylinum* untuk produksi nata de coco. Untari dan Dwi (2006) menambahkan, air kelapa memang mengandung zat atau bahan-bahan seperti unsur hara, vitamin, asam amino, asam nukleat dan zat tumbuh seperti auksin dan asam giberelat yang berfungsi sebagai penstimulasi proliferasi jaringan, memperlancar metabolisme dan respirasi.



Gambar 2.1 Kelapa Tua (Mardiatmoko dan Ariyanti,2018)

Pada air kelapa terdapat gula yaitu sukrosa, glukosa dan fruktosa (Santoso, 1996). Air kelapa mengandung komposisi kimia dan nutrisi yang lengkap (hormon, unsur hara makro, dan unsur hara mikro), komposisi kimia dari air kelapa terdapat pada Tabel 2.1

Tabel 2.1 Komposisi Kimia Air Kelapa

Nutrisi air kelapa dalam 100 g	Air kelapa muda	Air kelapa tua
Kalori	17,0 kal	-
Protein	0,2 g	0,4 g
Lemak	1,0 g	1,50 g
Karbohidrat	3,8 g	4,60 g
Kalsium	15,0 g	-
Fosfor	8,0 g	0,5 g
Besi	0,2 g	-
Asam Askorbat	1,0 g	91,5 mg
Air	95,5 mg	-
Bagian yang dapat dimakan	100 g	

Sumber: Kiswanto, 2004

Salah satu hal yang dapat kita lakukan untuk memperbaiki lingkungan adalah dengan meminimalisir limbah air kelapa. Hasil penelitian Widodo (2021) mengenai pengaruh penambahan sukrosa pada air kelapa terhadap produksi EPS oleh *Weisella confusa*, proses fermentasi dilakukan pada kondisi pH media 6,5 dengan penambahan inokulum kerja sebanyak 5% dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil EPS dengan rendemen rata rata tertinggi dihasilkan pada penambahan sukrosa 20% yaitu sebesar 3,27 g/L dengan kadar gula total 85,77%. Sedangkan hasil EPS terendah didapat pada penambahan sukrosa 8% yaitu 2,23 g/L dengan kadar gula total 79,48%.

2.2 Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat atau yang biasa disebut BAL merupakan golongan bakteri yang dapat menguraikan karbohidrat menjadi senyawa asam dan dapat menurunkan nilai pH sehingga menimbulkan rasa asam (Muchtadi, 2010; Salminen, *et al.*, 2012). BAL telah diketahui dapat menghasilkan berbagai jenis antimikrobia seperti bakteriosin, antijamur, asam organik dan peroksida sehingga aman ketika dikonsumsi oleh manusia. Produk olahan dari asam laktat berpotensi sebagai

probiotik yang dapat menambah sistem kekebalan tubuh manusia (Mutia dan Ulfa, 2013).

BAL tergolong dalam bakteri Gram positif dengan hasil uji katalase negatif dan dapat tumbuh dalam kondisi tanpa oksigen atau anaerobic tetapi masih bisa mentoleransi adanya oksigen dan juga metabolisme karbohidrat melalui jalur fermentasi (Hardiningsih, dkk., 2006). BAL membentuk asam laktat dari metabolisme karbohidrat dan tumbuh di pH yang lingkungannya rendah. BAL merupakan bakteri yang tidak memiliki spora. Pertumbuhan optimum bakteri asam laktat ini pada lingkungan yang kaya akan nutrisi seperti susu dan juga daging (Yousef and Clastrom, 2003).

Secara umum yang termasuk kelompok BAL adalah *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* dan *Lactobacillus* (Salminen, et al., 2004). BAL umumnya bersifat mesofilik namun ada beberapa jenis yang dapat tumbuh pada suhu 4°C. BAL memiliki pH pertumbuhan 4,0-4,5 namun beberapa galur tahan pada pH 3,2 dan pH di atas 9,0 (Bamforth, 2005).

Menurut Suardana (2007) BAL dapat dibedakan menjadi 2 kelompok berdasarkan hasil fermentasinya, yaitu:

1. Bakteri homofermentatif, dimana glukosa difermentasi menghasilkan asam laktat sebagai satu-satunya produk. Contohnya yaitu *Streptococcus*, *Pediococcus*, dan beberapa *Lactobacillus*.
2. Bakteri heterofermentatif, glukosa difermentasikan selain menghasilkan asam laktat juga memproduksi senyawa-senyawa lainnya yaitu etanol, asam asetat dan CO₂. Contohnya yaitu *Leuconostoc* dan beberapa spesies *Lactobacillus*.

BAL telah berhasil diisolasi dari berbagai macam sumber alami seperti bunga, sayur dan buah-buahan. BAL yang berhasil diisolasi dari buah salah satunya berasal dari jus buah cherimoya (Isas, *et al.*, 2020). Penelitian Giyatno dan Endah (2020) mengisolasi BAL dari buah kersen, dan menghasilkan Sebanyak empat isolat BAL diperoleh dengan bentuk sel basil, Gram positif, katalase negatif, non-motil, non spore forming, mesofilik, *aciduric*, non halofilik serta dapat memfermentasi karbohidrat. Berdasarkan *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* keempat isolat teridentifikasi sebagai spesies *Lactobacillus plantarum* dan menghasilkan EPS dengan kisaran 870 - 1.910 mg/L.

2.3 *Weissella confusa*

Weissella confusa adalah kelompok BAL yang digunakan sebagai probiotik, *Weissella confusa* diperoleh dari yoghurt. *Weissella* merupakan bakteri jenis Gram-positif, katalase-negatif, dan non endospora dan bentuk sel *coccobacillus*, yang dapat diisolasi dari berbagai habitat yang luas seperti tanah, sayuran segar, pangan terfermentasi, daging dan produknya (Vela AI, *et al.*, 2003). *Weissella confusa* menjadi salah satu spesies *Weissella* yang penyebarannya paling luas dalam makanan (Fusco, *et al.*, 2011). Hal ini dikarenakan sifat nya yang dinilai aman untuk manusia dibandingkan dengan spesies lainnya. Potensi *Weissella confusa* selain dalam bidang fermentasi makanan yaitu sebagai antibakteri, bakteri ini juga berpotensi sebagai probiotik (Lee, *et al.*, 2012).

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

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

2.4 Eksopolisakarida

Eksopolisakarida merupakan polimer dari gula pereduksi atau polisakarida yang disekresikan oleh mikroba keluar sel. Polimer ini merupakan salah satu polimer yang mampu disintesis oleh BAL. EPS secara umum terdiri dari monosakarida dan beberapa substituent non-karbohidrat seperti aset, piruvat, suksinat, dan fosfat juga biomolekul seperti protein, asam nukleat, lipid dan zat humat (Surono, 2004).

EPS merupakan produk metabolit sekunder yang dikeluarkan pada saat lingkungan pertumbuhannya sedang kurang menguntungkan. EPS juga berperan dalam proses perlindungan sel bakteri dari kekeringan, mempertahankan fungsi seluler primer dan aktivitas antibakteri terhadap predator, kemampuan pembentuk gel dan degradasi polutan. Saat ini, EPS telah banyak dimanfaatkan secara luas dalam berbagai aplikasi dalam pangan sebagai pengental, stabilizer, pembuatan gel, sampai pengemulsian, seperti produksi yoghurt, keju, kefir, roti, dan sereal. Dalam dunia farmasi sebagai penurun kadar kolesterol, imunomodulator, antitumor, antibiotik, dan industri lainnya serta menjadi penginduksi interferon, penghambatan agregasi trombosit, sintesis faktor penstimulasi koloni, koagulan, dan pelumas (Anindita dan Nasa, 2020).

EPS dengan struktur dextran dapat dimanfaatkan sebagai agen emulsifier, agen pemisah, dan plasma. Dextran termasuk dalam keluarga glukana yang dibuat

dengan polimerisasi α -D-glucopyranosyl dari sukrosa yang dikatalisis oleh enzim dextransucrase, dimana pengulangan unitnya berasal dari ikatan (1,6)-linked- α -D-glucopyranosyl.

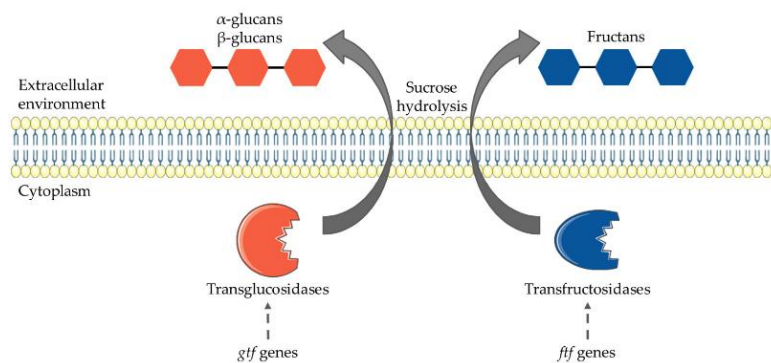
2.5 Biosintesis Eksopolisakarida

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

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

Pada *Weissella* biosintesis homopolisakarida (HoPS) dibantu oleh enzim ekstraseluler glukansukrase atau fruktansukrase, enzim tersebut mentransfer monosakarida dari substrat spesifik pada pertumbuhan rantai polisakarida, residu monosakarida yang dihasilkan akan melekat pada rantai aseptor glikan. Glukan sukrase memiliki ciri kemampuannya untuk memutus ikatan α -glikosidik antara glukosa dan bagian monosakarida lain menggunakan domain katalitik, inti katalitik

mengandung tiga domain yang dilampirkan dua domain yaitu domain IV dan V. Beberapa dari domain tersebut terdiri dari dua segmen rantai polipeptida putus-putus dan menghasilkan struktur U (Guerin, dkk., 2020).

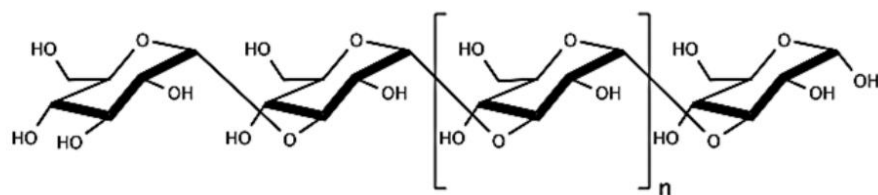


Gambar 2.2 Jalur Biosintesis HoPs (Guerin, dkk., 2020).

EPS yang dihasilkan oleh BAL dapat dibedakan menjadi dua kelompok berdasarkan pada komposisi dan mekanisme biosintesisnya, yaitu heteropolisakarida, yang terdiri dari satu atau lebih monosakarida yang berbeda, dan homopolisakarida hanya terdiri dari satu macam monosakarida dan Beberapa jenis EPS antara lain:

1. Mutan

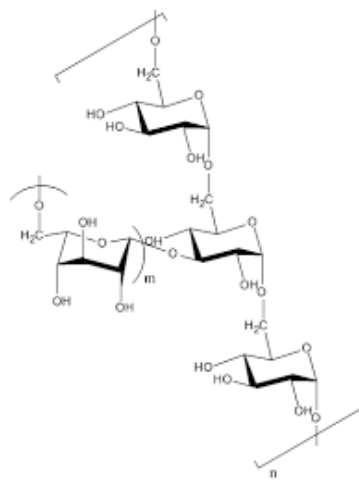
Mutan tergolong dalam kelompok α -glukan yang tidak larut dalam air dengan ikatan α -(1 \rightarrow 3) dengan percabangan pada α -(1 \rightarrow 6). Polimer mutan mampu mensintesis mutansukrase yang ditemukan pada spesies dari genus *Streptococcus*, *Lactobacillus* dan *Leuconostoc* (Kimura dan Iwata,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



Gambar 2.3 Struktur mutan (Kimura dan Iwata, 2019)

2. Dekstran

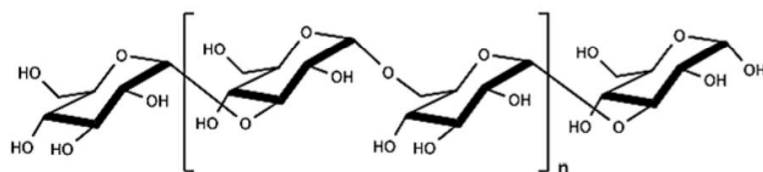
Dekstran merupakan polimer kompleks dari glukosa yang mengalami percabangan dengan membentuk ikatan α -1,6 dan α -1,3 glikosidik. Dekstran yang di biosintesis oleh bakteri asam laktat memiliki berat molekul yang besar antara kda. Dalam bidang kesehatan dekstran memiliki fungsi yang beragam seperti anti inflamasi, anti trombotik, anti koagulan, hingga memiliki peran yang penting sebagai intraarterial dan intravenous (Veronese dan Caliceti, 2006).



Gambar 2. 4 Struktur Dextran (Lapasin, 1999)

3. Alternan

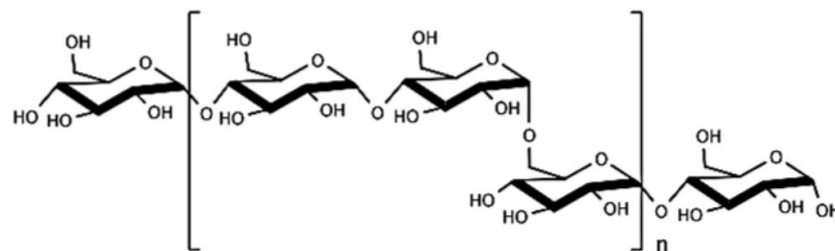
Alternan tergolong dalam kelompok α -glukan dengan ikatan α -(1 \rightarrow 6) dan α -(1 \rightarrow 3) bergantian, ditemukan dalam *L. mesenteroides* NRRL B-1355. Enzim yang mampu menghidrolisis alternan adalah isomaltodekstranase dan alternanase (Kimura dan Iwata, 2019).



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

4. Reuteran

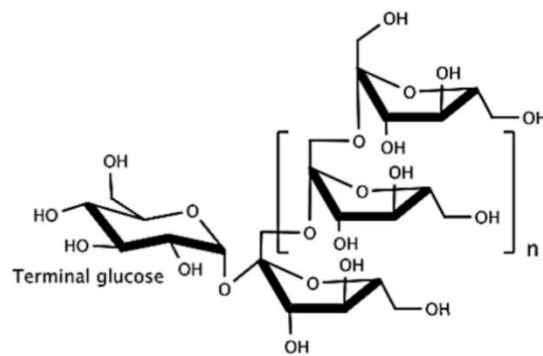
Reuteran adalah kelompok α -glukan yang mampu larut dalam air yang terdiri dari ikatan α -(1 \rightarrow 4) dihubungkan oleh satu ikatan α -(1 \rightarrow 6). Enzim yang mampu menghidrolisis reuteran adalah reuteransukrase yang ditemukan pada *Lactobacillus reuteri*. Umumnya reuteran berfungsi sebagai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



Gambar 2.6 Struktur reuteran (Kimura dan Iwata, 2019)

5. Inulin

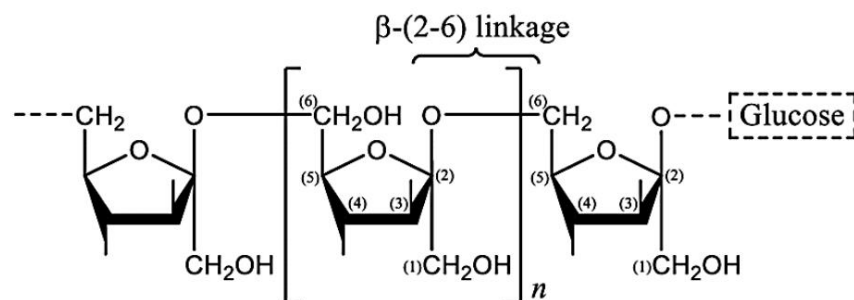
Inulin merupakan golongan fruktan yang tersusun dari residu fruktosa yang terikat pada ikatan β -(2 \rightarrow 1) dengan adanya enzim inulosukrase. Inulin memanfaatkan substrat sukrosa, enzim inulosukrase ditemukan pada bakteri asam laktat. Struktur inulin disintesis oleh fruktansukrase dari sukrosa.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



Gambar 2.7 Struktur inulin (Kimura dan Iwata, 2019)

6. 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 dan Goyal, 2022).



Gambar 2.8 Struktur Levan (Korakli dan Vogel, 2006).

2.6 Faktor Faktor yang Mempengaruhi Produksi Eksopolisakarida

Faktor faktor yang dapat mempengaruhi produksi EPS dalam efisiensi fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu:

1. Suhu

Suhu dapat mempengaruhi siklus mikroba dan faktor abiotik yang menentukan keberhasilan proses fermentasi. Pada saat fermentasi akan mengalami perubahan suhu, mulai dari suhu rendah sampai suhu tinggi ketika proses eksoteris lalu mengalami penurunan kembali setelah rekasi selesai, kondisi ini dikarenakan kerja dari ragi dalam metabolisme media. Pada pertumbuhan *Weissella confusa* biasanya digunakan suhu 37°C. Hasil penelitian Jin *et al*, (2019) menunjukkan bahwa produksi optimum EPS dari isolat *Weissella confusa* VP30 diperoleh sebesar 59,99 g/L pada suhu 37°C.

2. pH

Banyak enzim memiliki pH yang optimal untuk melakukan aktivitasnya secara maksimal, jika pH diatas atau dibawah pH optimum kinerja enzim akan mengalami penurunan. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Zisu and Shah (2003) Produksi EPS dari bakteri *Streptococcus thermophilus* pada pH 5,5 dengan 20 suplemen *whey protein concentrate* mencapai 1029 mg/L. Hasil penelitian Kimmell, S. A. and Ziegler, G. R. (1998) bahwa produksi EPS optimum dari *Leuconostoc menteroides* adalah pH 5,0 dengan hasil 30mg/L setelah diprediksi sebelumnya 296 mg/L. Penelitian Whongsuphachat, *et al* (2010) produksi EPS dari *Weissella confusa* dengan tambahan sukrosa 2% pada pH 7 menghasilkan 18,08 g/L.

3. Konsentrasi Substrat

Kecepatan reaksi enzimatik umumnya tergantung pada konsentrasi substrat. Kecepatan reaksi akan meningkat sebanding dengan naiknya konsentrasi substrat,

meningkatnya kecepatan reaksi akan terus terjadi sampai pada titik konstan namun tetap terjadi reaksi dengan kecepatan rendah (Lehniger, 1997). Hal ini terjadi karena molekul enzim telah membentuk kompleks dengan substrat dan selanjutnya kecepatan reaksi tidak terpengaruh oleh kenaikan konsentrasi (Trenggono dan Sutardi, 1990).

4. Konsentrasi Inokulum

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

5. Media

Media yang digunakan untuk mengoptimalkan produksi EPS sangat beragam, karena rantai utama dari polimer ini adalah glukosa. Penelitian Widodo (2021) produksi EPS yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* dengan menggunakan media air kelapa hasil rendemen 3,27 g/L. Penelitian Chalim (2021) produksi EPS yang dihasilkan oleh bakteri yang sama yaitu *Weissella confusa* dengan media MRSB menghasilkan rendemen sebesar 11,321%.

2.7 Karakterisasi Eksopolisakarida

2.7.1 Karakterisasi Secara Fisik

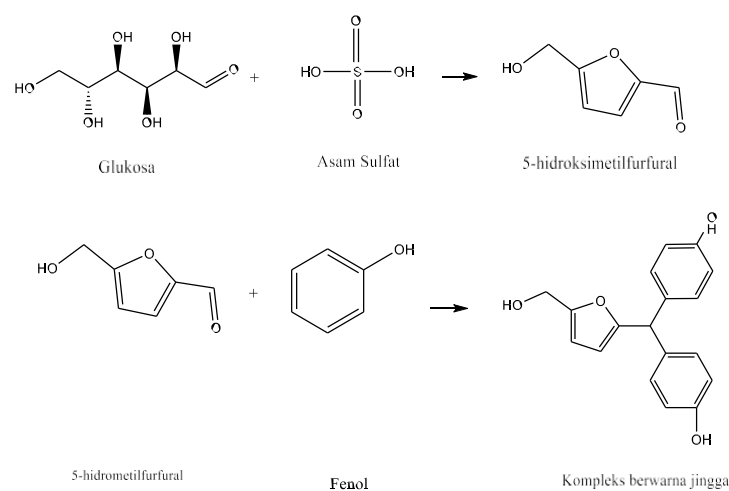
Pada indeks kelarutan air EPS dilakukan untuk mengetahui presentase kelarutan EPS untuk menahan air, Penelitian Chalim (2021) hasil indeks kelarutan air sebesar 30,11%. *Water Holding Capacity* EPS diuji untuk mengukur kapasitas

EPS dalam menahan air dikarenakan adanya struktur matriks berpori dari adanya ikatan hidrogen yang terbentuk dari struktur EPS sendiri. EPS dengan daya ikat air yang baik adalah yang dapat menahan air dengan kapasitas minimal 400% (Zhou, *et al.*, 2017). Penelitian oleh Rajoka, *et al* (2018) daya ikat air EPS yang di ekstrak dari *Weissella confusa* diperoleh sebesar 581,97%.

2.7.2 Karakterisasi Secara Kimia

2.7.2.1 Kadar Gula Total Eksopolisakarida

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



Gambar 2.9 Reaksi kompleks fenol-furfural (Lewkowski, 2001)

2.7.2.2 Kadar Protein Eksopolisakarida

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

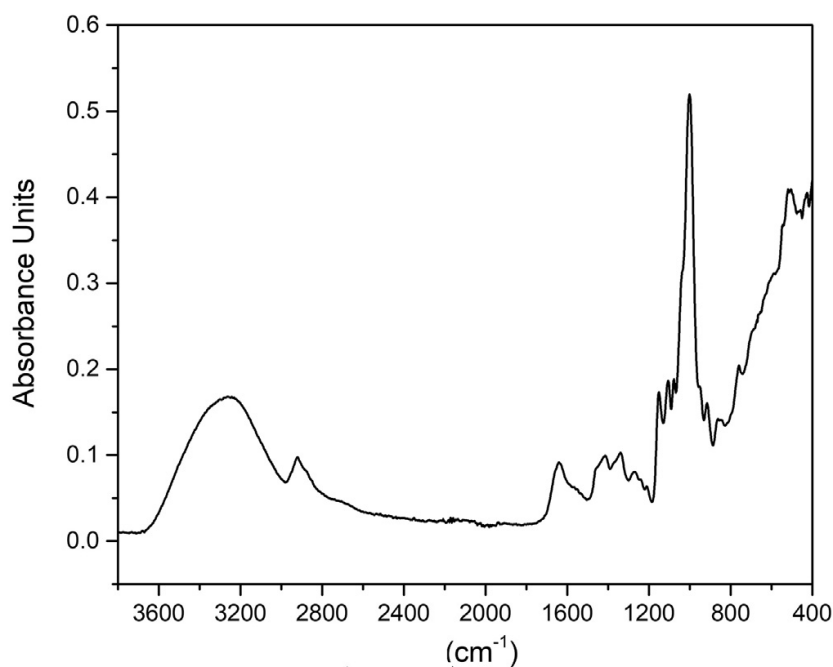
Kadar protein dapat ditentukan dengan membaca kurva standar yang dibuat dengan larutan protein murni yang telah diketahui kadar proteinnya seperti *Bovine Serum Albumin* (BSA) yang memiliki rentang konsentrasi tertentu, kemudian konsentrasi sampel berprotein berada pada rentang tersebut dengan konsentrasi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

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

Penentuan struktur EPS 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 EPS (Pine, 1980).

Penggunaan FTIR digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi yang terdapat dalam suatu sampel. Adanya gugus fungsi ditandai dengan terbentuknya puncak serapan sehingga dapat diidentifikasi jenis senyawa sampel dengan menghitung dan membandingkan panjang gelombang pada tiap puncak. Menurut Adesulu-Dahnusi *et al.*, (2018) EPS yang diproduksi oleh *Weissella confusa* OF126 memiliki gugus fungsi yang khas seperti O-H pada spektra 3287 cm^{-1} , C-H *stretching* pada pita serapan 2980 cm^{-1} , C=O pada pita serapan 1651 cm^{-1} , C-O-C *stretching* pada pita serapan 1009 cm^{-1} .



Gambar 2.10 Spektra FTIR EPS oleh *Weissella confusa* C19 (Heperkan *et al.*, 2020)

Spektra hasil FTIR ditunjukkan pada Gambar 2.3 Penelitian Heperkan *et al.*, (2020) EPS yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* C19 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} , pada pita serapan 1413 cm^{-1} dan 1338 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus karboksil, pita serapan 1151 cm^{-1} , 1105 cm^{-1} merupakan vibrasi C-O dan C-C. 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).

2.8 Uji Toksisitas Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Toksisitas adalah kemampuan zat yang dapat menimbulkan kerusakan pada organisme hidup, semua bahan atau zat yang akan digunakan atau dikonsumsi oleh manusia diperlukan uji keamanan untuk melihat adanya kemungkinan bahaya bagi kesehatan, maka langkah awal yang dilakukan yaitu menguji potensi toksik bahan atau zat tersebut (Astri, dkk., 2012). Uji toksisitas juga merupakan uji pendahuluan yang biasanya dilakukan untuk mengetahui potensi toksik serta ambang batas penggunaan tumbuhan sebagai sumber obat (Tampungan, 2011).

Menurut Wikanta (2017) metode uji toksisitas yang biasa digunakan adalah metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*), metode ini digunakan sebagai uji pendahuluan untuk skrining aktivitas farmakologis pada bahan alam, memprediksikan toksisitas suatu bahan serta untuk mendeteksi toksin jamur, logam berat, sianobakteria dan aktivitas pestisida. Uji toksisitas dengan metode BSLT ini menggunakan hewan uji, hewan uji yang digunakan adalah *brine shrimp* atau udang laut spesies *Artemia salina* Leach. (Vitalia, dkk., 2016). Keunggulan dari metode

BSLT dalam menguji toksisitas yaitu biaya murah, mudah, perkembangbiakan cepat, sampel yang digunakan sedikit, cukup akurat, serta tidak memerlukan laboratorium khusus (Agustini, 2012). Prinsip metode BSLT berdasarkan pada tingkat mortalitas (kematian) larva udang *Artemia salina* Leach terhadap ekstrak uji.



Gambar 2.11 *Artemia Salina* Leach

Pengujian toksisitas dengan metode BSLT dilakukan dengan mengamati kematian larva udang *Artemia salina* Leach, dimana respon kematiannya merupakan pengaruh dari senyawa yang diuji. Ciri umum untuk mengetahui kematian larva udang adalah jika larva udang tidak menunjukkan tanda-tanda pergerakan selama 10 detik observasi. Mekanisme kematian larva udang berdasarkan senyawa target yang merupakan senyawa toksik bertindak sebagai racun perut, ketika senyawa toksik ini masuk ke dalam perut larva udang, organ pencernaannya akan terganggu dan akan menghambat reseptor perasa pada bagian mulut larva. Hal tersebut mengakibatkan larva udang gagal menerima stimulus rasa dan tidak dapat mengenali makanannya sehingga larva udang akan mati kelaparan (Anwar, dkk., 2014). Berikut klasifikasi larva udang *Artemia salina* Leach. (Desianti, 2014):

Kingdom: Animal
 Filum: Arthropoda
 Kelas: Crustacea
 Sub Kelas: Branchiopoda
 Ordo : Anostraca
 Famili : Artemilidae
 Marga: Artemia
 Jenis : *Artemia salina* Leach

Hasil yang diperoleh kemudian dihitung nilai LC₅₀ (*median lethal concentration*) dari ekstrak uji yaitu jumlah konsentrasi ekstrak uji yang dapat menyebabkan 50% larva udang mati setelah masa inkubasi selama 24 jam (Fadli, dkk., 2019). Tingkat ketoksikan suatu ekstrak ditentukan dengan menghitung nilai LC₅₀ yang merupakan konsentrasi sampel yang dibutuhkan dalam mematikan larva uji sebanyak 50% (Wahyuni, 2018). Nilai LC₅₀ menurut Djide, dkk., (2019) ditunjukkan pada Tabel 2.2:

Tabel 2.2 Nilai LC₅₀

Golongan	Nilai LC₅₀ (ppm)
Tidak Toksik	>1000
Toksik	30-1000
Sangat Toksik	<30

Sumber: Djide, dkk., 2019

Menurut Tampungan, dkk., (2011) untuk mendapatkan presentase mortalitas atau kematian kumulatif dengan rumus sebagai berikut.

$$\% \text{Mortalitas} = \frac{\text{Jumlah Larva artemia yang mati}}{\text{Jumlah Larva artemia yang diuji}} \times 100\% \dots \dots \dots (2.1)$$

Angka kematian larva *Artemia salina* Leach diperoleh dengan membuat grafik persamaan regresi linier LC₅₀ dengan sumbu y adalah % mortalitas dan sumbu x adalah deret konsentrasi, semakin kecil nilai LC₅₀ nya semakin tinggi tingkat toksisitasnya (Yudiati, dkk., 2011). Penelitian Agustini dan Kusmiati (2017) meneliti mengenai potensi EPS dari *Porphyridium cruentum* (S. F. Gray) Nageli,

mikroalga merah ini diketahui dapat memproduksi EPS dan hasil toksisitas BSLT nilai LC_{50} sebesar 513,175 mg/L yaitu bersifat toksik tetapi dengan nilai rendah.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini berjudul “Karakterisasi Eksopolisakarida yang Dihasilkan Oleh *Weissella confusa* K2 Pada Media Air Kelapa dan Uji Toksisitas Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)”. Dilakukan mulai dari bulan Agustus 2023 di Laboratorium Biokimia, Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2. Alat dan Bahan penelitian

3.2.1. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi *laminar air flow*, neraca analitik, *hot plate*, *autoclave*, shaker, sentrifugasi, pipet mikro, pipet ukur 1 mL, 5 mL dan 10 mL, labu ukur 10 mL, 25 mL, dan 100 mL, botol semprot, jarum ose, *vortex shaker*, Erlenmeyer 250 mL, Erlenmeyer 50 mL, tabung reaksi, cawan petri, inkubator, batang pengaduk, *blue tip*, *yellow tip*, *rotary evaporator*, tabung sentrifugasi, termometer, rak tabung reaksi, gelas ukur 100 mL, pipet tetes, spatula, *stirrer*, gelas ukur, aluminium foil, kapas, plastik tahan panas, bunsen, korek api, bola hisap, lemari pendingin, pinset, botol vial 10 mL, akuarium kaca, aerator, lampu, timer, dokumentasi, spektrofotometer UV-VIS, *Fourier Transform Infra Red* (FTIR).

3.2.2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *Weissella confusa*

K2, air kelapa tua yang diperoleh dari limbah penjual kelapa di pasar Dinoyo Malang, MRSA (*De Man Rogosa Sharpe Agar*), MRSB (*De Man Rogosa Sharpe Broth*), NaOH 2N, akuabides steril, spiritus, NaCl, etanol absolute, alkohol 70%, aquades, larva udang *Artemia Salina Leach*, kapas, larutan HCl 2N, air laut sintetik, aluminium foil, plastik wrap, alkohol 70%, ragi, metanol, n-heksan, kloroform, TCA 4%, gula pasir (sukrosa), fenol, H₂SO₄, *yeast extract*, *peptone*, *Bovine Serum Albumin* (BSA), KBr, Folin, Reagen Lowry.

3.3. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian terdapat dua tahap, tahap pertama yaitu melakukan karakterisasi fisik dan kimia, karakterisasi fisika meliputi indeks kelarutan air dan *Water Holding Capacity* (WHC), sedangkan untuk karakterisasi secara kimia meliputi analisa total gula, kadar protein dan gugus fungsi EPS menggunakan *Fourier Transform Infra Red Spectroscopy* (FTIR), dan tahap kedua yaitu uji toksisitas dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dengan hewan uji *Artemia Salina* L dimana dilakukan penetasan terlebih dahulu selama 48 jam, lalu dilakukan uji toksisitas untuk mendapatkan hasil uji dengan menentukan nilai LC₅₀ dengan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal yaitu variasi konsentrasi EPS pada uji toksisitas yaitu 125, 250, 500, 1000, dan 2000 ppm.

Tabel 3.1 Analisis Data Hasil Uji Toksisitas

Konsentrasi EPS (ppm)	Mortalitas (Kematian)					
	Kontrol	Pengulangan				
		1	2	3	4	5
125						
250						
500						
1000						
2000						

3.4. Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan – tahapan sebagai berikut:

1. Sterilisasi Alat dan Media
2. Preparasi Bahan
3. Pembuatan Media
4. Produksi EPS
5. Karakterisasi Secara Fisika dan Kimia
6. Uji Toksisitas EPS dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)
7. Analisis Data

3.5. Cara Kerja

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Media

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian disterilisasi terlebih dahulu, alat-alat yang terbuat dari gelas dibungkus dengan kertas, untuk tabung reaksi disumbat dengan kapas berlemak kemudian dibungkus dengan plastik tahan panas dan diikat dengan rapat agar air dan bakteri tidak masuk. Media atau bahan yang digunakan untuk membunuh bakteri setelah direbus hingga mendidih dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang disumbat dengan kapas kemudian ditutup dengan plastik tahan panas, lalu dimasukkan ke dalam *autoclave* untuk disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm.

3.5.2 Preparasi Air Kelapa (Widodo, 2021)

Air kelapa yang telah diambil dari pasar Dinoyo Malang dalam kemasan plastik, disaring hingga terpisah dengan residu yang ada, lalu ditambahkan *yeast extraxt* dan *peptone* masing masing sebanyak 0,25% (b/v) serta ditandabatkan hingga 500 mL, lalu diukur pH hingga 8 dengan ditambahkan beberapa tetes NaOH 2N. Kemudian air kelapa disterilisasi menggunakan *autoclave* dan dilakukan pengendapan untuk memisahkan filtratnya, untuk digunakan pada proses fermentasi.

3.5.3 Pembuatan Media

3.5.3.1 Pembuatan *de Man Rogosa and Sharpe Agar (MRSA)*

Media MRSA ditimbang sebanyak 6,52 g dan dihomogenkan dengan aquades sebanyak 100 mL, campuran dipanaskan sampai mendidih, kemudian media dimasukkan kedalam Erlenmeyer dan ditutup dengan kapas, Erlenmeyer dibungkus menggunakan plastik tahan panas dan disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dan tekanan 1 atm.

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

Media MRSB dibuat dengan menimbang 5,515 g MRSB kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquades dan dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk hingga larut. Kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL dan disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 20 menit. Media MRSB ini digunakan untuk pembuatan inokulum.

3.5.3.3 Regenerasi *Weissella confusa* K2 (Kultsum, 2009)

Regenerasi bakteri dilakukan dengan cara diambil 2 ose biakan *Weissella confusa* K2 dimasukkan ke dalam media MRS agar miring, selanjutnya 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.

3.5.3.4 Pembuatan Inokulum *Weissella confusa* K2 (Maunatin, et al., 2020)

Diambil beberapa ose *Weissella confusa* K2 dan dimasukkan dalam 25 mL MRSB, kemudian dishaker selama 18 jam dengan kecepatan 100 rpm. Diukur OD nya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 600 nm, kemudian disetarakan nilai OD nya 0,5.

3.5.4 Produksi Eksopolisakarida

3.5.4.1 Produksi Eksopolisakarida Terhadap Produksi Eksopolisakarida dari Air Kelapa (Trabelsi, et al., termodifikasi, 2014 dan Seesuriyachan, et al., 2011)

Media produksi air kelapa yang sudah steril dan jernih dilakukan penambahan sukrosa yang telah disterilkan pada wadah terpisah sebanyak 10% (b/v) dengan media air kelapa menggunakan labu ukur 250 mL, Setelah itu ditambahkan inokulum *Weissella confusa* K2 sebanyak 5% (v/v) dengan cara diambil 5 mL inokulum kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit kemudian diambil filtrat MRSB, lalu endapan sel dicuci dengan 5 mL NaCl steril lalu disentrifugasi kembali dan diambil endapan untuk ditambahkan pada media produksi air kelapa. Selanjutnya media produksi

diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

3.5.4.2 Ekstraksi Eksopolisakarida dari Media Fermentasi Air Kelapa (Seo, *et al.*, termodifikasi, 2015)

Media air kelapa hasil fermentasi diambil sebanyak 100 mL dan ditambahkan asam trikloroasetat (TCA) 4% (4 g) kemudian dishaker selama 30 menit pada 100 rpm. Kemudian disentrifugasi pada 4°C dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang mengandung EPS diambil sebanyak 95 mL lalu ditambahkan etanol absolute dua kali volume media air kelapa dan dibiarkan pada suhu 4°C selama 24 jam. Selanjutnya endapan EPS yang didapat dipisahkan dengan filtrat dan dikeringkan pada suhu 60°C di dalam oven selama 5 jam. Dimana setiap jam ditimbang berat kering sampai konstan. Kadar EPS kering ditentukan dengan menggunakan persamaan 3.1:

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

3.5.5 Karakterisasi Secara Fisik dan Kimia

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

Ditimbang EPS sebanyak 0,05 g dan dimasukkan kedalam gelas beaker, dilarutkan ke dalam 5 mL aquabides dan distirer selama 24 jam, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit, lalu diambil 0,5 mL filtrat dan ditambahkan etanol sebanyak tiga kali volume, dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit dan diambil endapannya kemudian dikeringkan pada suhu 105°C selama 3 jam hingga berat konstan.

$$\text{Indeks Kelarutan (\%)} = \frac{(\text{Berat EPS dan cawan} - \text{berat cawan})}{\text{berat awal EPS}} \times 100 \dots \dots (3.2)$$

Pengujian daya ikat air dilakukan dengan menimbang 0,05 g EPS yang dilarutkan kedalam 2 mL aquabides dan divortex selama 1 menit, kemudian dilakukan sentrifugasi selama 25 menit dan dibuang filtratnya, Lalu diambil endapannya dan dibekukan. Diletakkan pada kertas saring dan dibiarkan kering. Air yang terserap dalam kertas saring ditimbang massanya.

$$\text{Daya Ikat Air (\%)} = \frac{\text{Berat EPS setelah menyerap air}}{\text{berat awal EPS}} \times 100 \dots \dots \dots (3.3)$$

3.5.5.2 Uji Kadar Gula Total dengan Metode Asam Sulfat-Fenol

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

Dibuat larutan induk glukosa 1000 ppm dengan menimbang glukosa 0,1 g dan ditera sampai 100 mL, kemudian dibuat konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm, diambil masing-masing 2 mL larutan glukosa kemudian ditambahkan 1 mL fenol 5% dan divortex sebentar, ditambahkan 5 mL asam sulfat dengan cepat dan dibiarkan selama 10 menit, kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 15 menit dan diukur nilai absorbansinya pada λ 490 nm.

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

Ditimbang EPS sebanyak 0,0075 g dan ditera sampai 250 mL, diambil 2 mL kemudian ditambahkan 1 mL fenol 5% lalu divortex, kemudian ditambahkan dengan asam sulfat dan dibiarkan selama 10 menit, setelah itu dipanaskan di air mendidih selama 15 menit dan diukur nilai absorbansinya pada λ 490 nm.

3.5.5.3 Analisa Kadar Protein Eksopolisakarida

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

Ditimbang sebanyak 0,03 g BSA dan dilarutkan pada 10 mL aquabides, dibuat konsentrasi 24 ppm, 48ppm, 72ppm, 96ppm, dan 120 ppm dengan mengambil volume masing masing 0,04; 0,08; 0,12; 0,16; 0,2 mL dan ditandabatkan sampai 5 mL, lalu diambil 1 mL masing-masing konsentrasi, ditambahkan 5 mL reagen lowry, divortex dan dibiarkan selama 10 menit, kemudian ditambahkan 0,5 mL folin 1N, diinkubasi dalam ruang gelap selama 20 menit, diukur absorbansinya pada λ 660 nm.

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

Analisa kadar protein EPS dilakukan menggunakan metode Lowry, ditimbang 0,02 g EPS, dilarutkan pada 5 mL aquabides, diambil 1 mL EPS dan ditambahkan 5 mL reagen lowry, divortex dan dibiarkan selama 10 menit, ditambahkan 0,5 mL folin 1 N, kemudian diinkubasi dalam ruang gelap selama 20 menit, kemudian diukur absorbansinya pada λ 660 nm.

3.5.5.4 Analisa Gugus Fungsi Eksopolisakarida Menggunakan Fourier Transform Infra Red (FTIR) (Adesulu, *et al.*, 2018)

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

3.5.6 Uji Toksisitas *Weissella confusa* K2 dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) (Djide, dkk., 2019)

3.5.6.1 Penetasan Telur (Djide, 2019)

Disiapkan larva udang *Artemia salina* dengan disiapkan wadah kotak, ditetaskan sejumlah tertentu telur udang, kemudian disimpan kotak di bawah penerangan lampu dengan dilengkapi aerator selama 48 jam. Penetasan telur dilakukan dalam wadah bening dengan menggunakan media air laut. Pada wadah diberi penerangan dengan cahaya lampu neon 5 watt agar suhu penetasan 25-30°C tetap terjaga. Telur udang dibiarkan terendam dan akan menetas dalam waktu 48 jam. Kemudian dilakukan uji toksisitas menggunakan larva udang. Ekstrak yang akan diuji dibuat dalam konsentrasi 125, 250, 500 dan 1000 ppm, dan 2000 ppm.

3.5.6.2 Uji Toksisitas (Agustini, 2017)

Larutan uji dengan konsentrasi 125, 250, 500, 1000, dan 2000 ppm dibuat dari larutan induk 5000 ppm, dengan ditimbang EPS sebanyak 0,25 g dilarutkan dalam 50 mL air laut, lalu dilakukan pengenceran untuk membuat larutan uji menggunakan air laut 10 mL sebagai pengencernya pada setiap konsentrasi. Masing masing dilakukan 5 kali pengulangan, uji toksisitas dilakukan dengan memasukkan 10 ekor larva udang yang telah berumur 48 jam kedalam botol vial yang berisi sampel yang telah diencerkan kemudian didiamkan dan diamati setelah 24 jam, kemudian dihitung jumlah larva yang mati dengan kriteria standar larva yang tidak menunjukkan pergerakan selama 10 detik saat observasi.

3.5.7 Analisis Data

Data dari penelitian ini meliputi karakteristik EPS secara fisik dan kimia, dan data uji toksisitas diperoleh dari hasil pengujian menggunakan metode analisis probit dengan menghitung jumlah larva udang yang mati, pengolahan data dilakukan dengan memasukkan angka kematian (nilai mortalitas), konsentrasi larutan uji, dan total larva udang yang digunakan. Angka kematian dikonversi menjadi nilai probit analisis yang diolah pada software secara otomatis sehingga didapatkan sumbu y adalah nilai probit analisis dan sumbu x adalah log konsentrasi. Keduanya diplotkan dan diolah pada aplikasi Minitab sehingga akan didapatkan nilai LC_{50} dalam satuan ppm.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Hasil penelitian ini didapatkan EPS yang diekstrak dari *Weissella confusa* K2 dengan rendemen sebesar 23,69 g/L, kadar kelarutannya air sebesar 33,5%, hasil *WHC* sebesar 694%. Untuk karakterisasi secara kimia yaitu kadar gula total 109,40% dan kadar protein 0.204%. Hasil analisis FTIR menunjukkan adanya gugus khas pada dextran yaitu α 1-6 glikosidik.
2. Hasil uji BSLT didapatkan Nilai LC_{50} filtrat hasil EPS yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* K2 sebesar 1.308 mg/L, nilai LC_{50} dari sampel lebih dari 1000 mg/L yang mengindikasikan bahwa hasil fermentasi tidak memiliki efek sitotoksik sehingga tidak berpotensi untuk diujikan lebih lanjut pada sel kanker.

5.2 Saran

Perlu dilakukan regenerasi bakteri *Weissella confusa* K2 secara berkala dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk optimasi produksi EPS oleh *Weissella confusa* K2, penggunaan media yang berbeda, karakterisasi lebih lanjut menggunakan KLT, H-NMR, HPLC, dan perlu dilakukan uji pemanfaatan EPS sebagai antibakteri, antioksidan, dan imunomodulator.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M. 2007. *Tafsir Ibnu Ktasir Jilid 2*. Bogor: Pustaka Imam Asy-syafi'i.
- Abid, Yousra., dkk.,. 2017. Production and Structural Characterization of Exopolysaccharides from Newly Isolated Probiotic Lactic Acid Bakteria. *International Journal of Biological Macromolecules*. Volume 108: 719-728.
- Adesulu-Dahunsi, 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.
- Agustini dan Kusmiawati. 2017. Potency of Endo-Exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum* (S. F. Gray) Nägeli as Antioxidant (DPPH) and Biological Toxicity (BSLT). *ICBS Conference Proceedings International Conference on Biological Science 2015*.
- Albalasmeh, A. dan Ghezzehei. 2013. A New Method For Rapid Determination of Carbohydrate and Total Carbon Concentration Using UV Spectrophotometry. United State: *Carbohydrate polymer*. Volume 97: 253-261.
- 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*, Volume 1, Nomor 1: 1-5.
- Angelin, J., & Kavitha, M. (2020). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 853–865.
- Anindita, dan Nosa. 2020. Identifikasi Glukosiltransferase (*gtf*) Penyandi Eksopolisakarida Pada Strain *Weissella confusa* Probiotik Asal Air Susu Ibu (ASI). *Skripsi*. Program Studi Bioteknologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta.
- Anton, N dan Zubaidah E. 2015. Isolasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida dari Kimchi. *Jurnal Universitas Brawijaya Malang*. Volume 3, Nomor 2: 743-748.
- Antoniou, *et al.*, 2010. Solvent Effects on Polysaccharide Conformation. Department of Chemical and Biological Engineering, University at Buffalo The State University of New York. *Carbohydrate Polymers*. Volume 79: 380–390.
- Anwar, S., Yulianti, E., Hakim, A., Fasya, A. G., Fauziah, B., & Muti'ah, R. 2014. Uji Toksisitas Ekstrak Aquades (Suhu Kamar) dan Aquades Panas (70°C) Daun Kelor (*Moringa Oleifera* Lamk.) Terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Leach. *Alchemy*. 84-92.

- Astri, Y., Sitorus, T., Sigit, J. I., & Sujatno, M. 2012. Toksisitas Akut per Oral Ekstrak Etanol Daun Dewa (*Gynura pseudochina (Lour.) DC*) Terhadap Kondisi Lambung Tikus Jantan dan Betina Galur Wistar. *Majalah Kedokteran Bandung*. Volume 44, Nomor 1: 38-43.
- Azizah, F. R. 2019. Pengaruh Penambahan Sukrosa pada Air Kelapa dan Lama Fermentasi pada Produksi Eksopolisakarida oleh *Leuconostoc mesenteroides*. *Skripsi*. Malang: Uin Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Bamforth, C.W. 2005. *Food, fermentation and micro-organisms*. Oxford: Blackwell publishing.
- Bintang, M. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Jakarta: Erlangga.
- Brummer, Y., dan Cui, W. 2013. Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Application. France: Tylor and Francies Group, LLC.
- Carocho, M., Ferreira, I. C. *Food and Chemical Toxicology*. 51, 15-25.
- Cerning, J. 1990. Exocellular Polysaccharides Produce by Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology review*. Volume 87:113-130.
- Chalim, A. 2021. Karakterisasi Eksopolisakarida yang Dihasilkan Oleh *Weissella confusa* dan Potensinya Sebagai Anti Bakteri Terhadap *Salmonella typhi* *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Malang.
- Charlena., Haris, Abdul., dan Karwati. 2009. Degradasi Hidrokarbon pada Tanah Tercemar Minyak Bumi dengan Isolat A10 Dan D8. *Prosiding Seminar Nasional Sains II*, 124-136.
- Desianti, N. 2014. Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter dan n-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. *Skripsi*. Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Dirmanto, 2006. *Concise Handbook of Indigenous Fermented Foods in the ASCA Countries*. Jakarta; Indonesian Institute of Sciences.
- Djide Nana., Asri Rangga. 2019. Skrining Potensi Probiotik dan Sitotoksik Antibakteri *Weissella confuse* Isolat Dangke Sapi. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar. Volume 23, Nomor 2: 58-60.
- Dubois, M.K., Gilles, A., Hamilton, P.A., Rebers dan Fred, S.1956. Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substance. *Journal of University of Minnesota*. Volume 28, Nomor 3: 350-356.
- Fadli, F., Suhaimi, S., & Idris, M. 2019. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum (Wight) Walp.*) dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Medical Sains: *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. Volume 4, Nomor 1: 35-42.
- 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.

- Fifendy, M., Eldini dan Irdawati. 2013. Pengaruh Pemanfaatan Molase Terhadap Jumlah Mikroba dan Ketebalan Nata pada Teh Kombucha. *Semirata. Prosiding Seminar Bidang Biologi*. Lampung, 10-12 Mei 2013. Lampung
- 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.
- Fusco, V., Quero, G.M., Stea, G., Morea, M., Visconti, A., 2011. Novel PCR-Based Identification of *Weissella confusa* using an AFLP-Derived Marker. *Int. J Food Microbiol.* 145, 437–443.
- Gityatno, dan Endah. 2020. Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Dari Buah Kersen (*Muntingia calabura* L.). *Jurnal Sains Dasar*. Fakultas Biologi, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. Volume 9, Nomor 2: 42-49.
- Guerin, M., Da-Silva, C.R., Garcia, C., & Remize, F. 2020. Lactic Acid Bacterial Production of Exopolysaccharides from Fruit and Vegetables and Associated Benefits. *Fermentation*. Volume 6, Nomor 4:115.
- Halim, Christine N dan Elok Zubaidah. 2013. Studi Kemampuan Probiotik Isolat Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Tinggi Asal Sawi Asin (*Brassica juncea*). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Volume 1, Nomor 1: 129-137.
- Hardiningsih, R., R.N.R. Napitupulu dan T. Yulinery. 2006. Isolasi dan Uji Resistensi Beberapa Isolat *Lactobacillus* pada pH Rendah. *Biodiversitas*. Volume 7, Nomor 1: 15-17.
- Haroun, B. M., El-Menoufy, H. A., Amin, H. A. and El-Waseif, A. A. 2013. Biosynthesis and Morphology of an Exopolysaccharide from a Probiotic *Lactobacillus plantarum* Under Different Growth Condition. *Journal of Applied Sciences Research*, Volume 9, Nomor 2: 1256-1265.
- Heperkan, ZS. D. Bolluk, M. Bulbul, S. 2020. Structural Analysis and Properties of Dextran Produced by *Weissella confusa* and The Effect of Different Cereals on Its Rheological Characteristics. *Internatoional Journal of Biological Macromolecules*. 143: 305-313.
- Hutkins, R. W. 2006. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Iowa: IFT Press. Blackwell Publishing Ltd.3-49.
- Isabilah, J. 2023. Potensi Eksopolisakarida Yang Dihasilkan Oleh *Weissella Confusa* K2 Sebagai Antibakteri Terhadap *Staphylococcus Aureus*. *Skripsi*. Program Studi Kimia. Uin Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Isas, A., S *et al.* 2020. Functional Fermented Cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) Juice Using *Autochthonous* Lactic Acid Bacteria. *Food Research International*. 138: 109729.
- 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. *J. Microbiol Cell Factories*.

- Joo Seo B, Bajpai VK, Rather IA, Park YH. 2015. Partially Purified Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* YML009 With Total Phenolic Content, Antioxidant, and Free Radical Scavenging Efficacy. *Indian J Pharm Educ Res*; 49: 282-292.
- Kamboj, K., Vasquez, Amber., Jon Miquel Blada Llasat., 2015. *Identification and significance of Weissella species infections. Clinical Microbiology Laboratory*, Department of Pathology. The Ohio State University Wexner Medical Center, Columbus, OH, USA.
- Khairunnisa, F. dan Pato, U. 2016. Perbandingan Aktivitas Antibakteri Antara *Lactobacillus casei* subs R-68 dan *Lactobacillus casei* Komersil Terhadap *Staphylococcus aureus* FNCC-15 dan *Escherichia coli* FNCC-19. *Jurnal Teknologi Pertanian*. Universitas Riau.
- Khoirumiyah, A, F. 2023. Pengaruh Jenis Sumber Karbon Dan Ph Media Terhadap Produksi Eksopolisakarida Oleh *Weissella Confusa* K2 Hasil Isolasi Buah Kelengkeng. *Skripsi*. Jurusan Kimia. Uin Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Kim, J., Choi, Bo., Jung, Jin., Yuan, X., Kim, Ju., Lee, P.C. 2018. Genome Resequencing and Analysis of D-Lactic Acid Fermentation Ability of *Leuconostoc mesenteroides* Subsp. *Mesenteroides* ATCC 8293. *Process Biochemistry*. Department of Molecular Science and Technology and Department of Applied Chemistry and Biological Engineering, Ajou University, Woncheon-dong, Yeongtong-gu, Suwon, South Korea.
- Kimmel, S. A. dan Ziegler, G. R. 1998. Optimization of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus Delbrueckii* Supsp. *Bulgaricus* RR Growth In A Semidefined Medium. *Applied and environmental Microbiology*. Volume 64, Nomor 4: 659-664.
- Kimura, S., & Iwata, T. 2019. *Synthesis of Polysaccharides III: Sucrase as Catalyst. Enzymatic Polymerization towards Green Polymer Chemistry*, 89-104.
- Kiswanto, Y. 2004. *Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan Air Kelapa Terhadap Produksi Nata De Coco*. Yogyakarta.
- Klinchongkon, dan Adachi. 2019. Ethanol Precipitation of Mannooligosaccharides from Subcritical Water-Treated Coconut Meal Hydrolase. *Food and bioprocess technology*.
- Korakli, M. and Vogel, R. F. 2006. Structure/Function Relationship of Homopolysaccharide Producing Glycansucrases and Therapeutic Potential of Their Synthesised Glycans. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, Volume 71: 790-803.
- Kultsum, U. 2009. Pengaruh Variasi Nira Tebu dari Beberapa Varietas Penambahan Sumber N dari Tepung Kedelai Hitam Sebagai Substrat Terhadap Efisiensi Fermentasi Etanol. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Kusdianawati dan Fatimah. 2020. Genetic Diversity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Sumbawa Horse Milk, Indonesia. *Biodiversitas*. Department

of Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Universitas Teknologi Sumbawa.

- Lee, Kang Wook., Park, Ji Yeong., Jeong, Hee Rok., Heo, Ho Jin., Han, Nam Soo., Kim, Jeong Hwan. 2012. Probiotic Properties of *Wissella Strainds* Isolated from Human Faeces. *Anaerobe*. Volume 18, Nomor 1: 96-102.
- Lehninger, A. L. 1997. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid I*. Jakarta: Erlangga.
- Lewkowski, J. 2001. Synthesis, Chemistry and Applications of 5-Hydroxymethylfurfural and its Derivatives. *Arkivoc*, Volume 1, 17-54.
- Li, Y., Li., Guo, S and Zhu, H. 2016. Statistical Optimization of Culture Medium for Production of Exopolysaccharide from Endophytic Fungus *Bionectria Ochroleuca* And Its kim Antitumor Effect In Vitro. *Exli J*. 15: 211–220.
- 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*, Volume 12, Nomor 5: 347-444.
- Madiedo dan Reyes-Gavilan, 2005. Invited Review: Methods for the Screening Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. Instituto de Productos *La ´cteos de Asturias*, CSIC, Asturias, Spain. *Journal of Dairy Science* Volume 88, Nomor 3.
- Malik, A., Donna., Nurfachtiyani, A., Yanuar, A. 2008. Skrining Gen Glukosiltransferase (GTF) Dari Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida. *Makara, Sains*. Volume 12, Nomor 1: 1-6.
- Mao, H dan Zhengsong, Q., 2016. Development and Application of Ultra-High Temperature Drilling Fluids in Offshore Oilfield Around Bohai Sea Bay Basin, China. *China University of Petroleum*.
- Maridiatmoko, G., dan Ariyanti, M., 2018. Produksi Tanaman Kelapa (*Cocos nucifera* L.). Badan Penerbit Fakultas Pertanian Universitas Pattimura. Ambon.
- Mashudi, Kojin. 2020. *Telaah Tafsir Al-Muyassar Jilid V*. Penerbit: PT.Cita Intrans Selaras. Malang.
- Maunatin, A., Harijono., Zubaidah, E., Rifa'i, M., 2020. The Isolation of Exopolysaccharide-producing lactic Acid Bacteria from Lontar (*Boassus fabellifer* L.) sap. *Iranlan Journal of Microbiology*. Malang.
- Medis Salminen, S. Wright. Av, and Ouwehand, A. 2004. *Lactic Acid Bacteria*. Marckel Decker Inc. New York.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E. dan McLaughlin, J.L. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journal of Medicinal Plant Research*. Volume 45: 31-34.
- Muchtadi, T dan F, Ayustaningwarno. 2010. *Teknologi Proses Pengolahan Pangan*. Alfabeta. Bandung. 245.

- Mutia dan Ulfa. 2013. Uji Kadar Asam Laktat Pada Keju Kacang Tanah (*Arachis Hypogaea* L.) Berdasarkan Variasi Waktu dan Konsentrasi Bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus lactis*. *Jurnal Kimia Mulawarman*. Volume 10, Nomor 2: 58-62.
- Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., Ragadhita, R. 2019. How to Read and Interpret FTIR Spectroscopy of Organic Material. *Indonesian Journal of Science & Technology*. Volume 4, Nomor 1: 97-118.
- Nielsen, S., 2017. Food Analysis Laboratory Manual, Food Science Text Series: Total Carbohydrate by Phenol-Sulfuric Acid Method. Department of Food Science, Purdue University, West Lafayette, IN, USA. Chapter 4
- Ningdyah, A. W, Alimuddin A. H, Jayuska, A. 2015. Uji Toksisitas Dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) Terhadap Hasil Fraksinasi Ekstrak Kulit Buah Tampoi (*Baccaurea macrocarpa*). *JKK*. Universitas Tanjungpura. Volume 4, Nomor 1: 75-83.
- Okomoda, V., Solomon, S. G., Ataguba, G. A., Ayuba, V. O., & Asuwaju, F. P. 2013. Acute Toxicity Test in Aquaculture: A Review. *Banat's Journal of Biotechnology*. Volume 4, Nomor 8:59.
- Patel S, Majumder A, dan Goyal A. 2012. Potential of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Indian J Microbiol*. Volume 52: 3-12.
- Patil, P., Wadehra, A., Munjal, K., dan Behare, P., 2015. Isolation of Exopolysaccharides Producing Lactic Acid Bacteria from Dairy Products. Agricultural Research Communication Centre. *Asian J. Dairy & Food Res*, Volume 34, Nomor 4: 280-284.
- Pine, S. H. dan Hammond. 1980. *Organic chemistry*. New York: McGraw-Hill Inc.
- Poedjiadi, A. dan Supriyanti, T. 2012. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Putri, dan Tiara. 2019. *Keampuhan Air dan Minyak Kelapa Bagi Kesehatan*. Yogyakarta: Laksana.
- Rajalingnam, *et al.*, 2009. Trichloroacetic Acid-Induced Protein Precipitation Involves The Reversible Association of a Stable Partially Structured Intermediate. Department of Chemistry and Biochemistry, University of Arkansas, Fayetteville.
- Rajoka, M. S. R., 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*, Volume 89, 638-647.
- Rawal, P.M., Chauhan, P.B., Prajapati, H and Gahlout, M. 2016. Evaluation of Cultivation Condition for Enhanced Production of Exopolysaccharide by Bacterial Isolate P11 Under Submerged Culture Condition. *International Journal Advanced Research Biology Science*. Volume 3, Nomor 5: 183-190.
- Rizqillah, N. 2013. Uji Toksisitas Akut Ekstrak n-heksan Daun *Garcinia benthami* Pierre Terhadap Larva *Artemia salina* Leach dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Skripsi*. Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas

Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.

- Rosca, I., Petrovici, A.R., Peptanariu, D., Nicolescu, A., Dодii, G., Avadanei, m., Ivaov, A., Bostanaru, A.C., Mares, M., Ciolaci, D. 2018. Biosynthesis of Dextran by *Weissella confuse* and Its In Vitro Function Characteristic. *International Journal*
- Rosca, Irina. Petrovici, A. R. Peptanariu, D. Nicolescu A. 2017. Biosynthesis of dextran by *Weissella confusa* and its In vitro functional characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules*. BIOMAC-8343: Nomor 8.
- 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*, Volume 414, Nomor 1, IOP Publishing.
- Safitri, Nurlaela, Sunarti, titi C ., dan Meryandini, Anja.2016. Formula Media Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat *pediococcus pentosaceus* Menggunakan Substrat Whey Tahu. *Jurnal Sumber Daya Hati*. Volume 2, Nomor 2.
- Safitri, Nurlaela., Sunarti, Titi C., dan Meryandini, Anja. 2016. Formula Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat *Pediococcus pentosaceus* Menggunakan Substrat Whey Tahu. *Jurnal Sumber Daya Hayati*. Volume 2, Nomor 2.
- Sangi, M., Momuat, L. dan Kumaunang, M. 2012. Uji toksisitas dan skrining fitokimia tepung gabah pelepah aren (*Arenga pinnata*). *Jurnal Ilmiah Sains*, Volume 12: 128-134.
- Sanlibaba. P dan Gürcü. A, 2016. Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria. Department of Food Engineering. Ankara University Engineering Faculty. *Ankara*. Turkey.
- Santoso, 1996. *Limbah dan Pengolahannya*. Jakarta: Grasindo.
- Santoso, H. B. 2003. Pengaruh Konsentrasi Gula Kristal Dan Asam Sitrat Terhadap Karakteristik Fisik, Kimia Dan Organoleptik Sirup Air Kelapa. *Jurnal Sains dan Teknologi Pangan (JSTP)*. Universitas Halu Oleo. 210.
- Santoso. 2003. *Analisis Kandungan Mineral Dalam Air Kelapa Hijau*. Universitas Sumatra Utara: Medan.
- Saraswati, D. 2014. Pengaruh Konsentrasi Air Kelapa Muda Terhadap Pertumbuhan *Saccharomyces cereviceae*. Jurusan Kesehatan Masyarakat. Universitas Negeri Gorontalo. Gorontalo.
- Saravanan, C dan Prathap. K, 2015. Isolation and Characterization of Exopolysaccharide from *Leuconostoc lactis* KC117496 Isolated from Idli Batter. *Department of Food Science and Technology*, Pondicherry University, Pondicherry 605014, India
- 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. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. Volume 33, Nomor 4: 379-387.
- Seo, B.-J., Bajpai, V. K., Rather, I. A., & Park, Y.-H. 2015. Partially Purified Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* YML009 with Total Phenolic Content, Antioxidant and Free Radical Scavenging Efficacy. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. Volume 49, Nomor 4: 282– 292.
- Sivaraman, dkk., 1997. The Mechanism of 2,2,2-Trichloroacetic Acid-Induced Protein Precipitation. *Journal of Protein Chemistry*, Volume 16, Nomor 4.
- Suardana, W. 2007. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Cairan Rumen Sapi Bali sebagai Kandidat Biopreservatif. *Journal of Veterinery*. Volume 8, Nomor 4:155-159.
- Sudarmadji, Slamet. dkk., 1981. *Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan Dan Pertanian*. Liberty. Yogyakarta.
- Surono, Ingrid S. 2004. *Probiotik, Susu Fermentasi Kesehatan*. Jakarta: PT. Tri Cipta Karya.
- Sutrinio, J. M. 2018. Literature-based Safety Assessment of An Agriculture-And Animal-Associated Microorganism: *Weissella confusa*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Volume 95:142–152.
- 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)*, Volume 4, Nomor 2, 7-14.
- Tampungan, W. A. 2011. Uji Toksisitas Ekstrak Batang Pinang Yaki (*Areca vestiaria*) pada *Artemia salina* Leach. *Jurnal Bios Logos*. Volume 1, Nomor 1.
- Tingirikari, dkk., 2014. Structural and Biocompatibility Properties of Dextran From *Weissella cibaria* JAG8 as Food Additive. Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology Guwahati, Guwahati, Assam, India.
- Trabelsi, I., Ben Slima, S., Chaabane, H., Salah Riadh, B. 2015. Purification and Characterization of a Novel Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus* sp, *Ca6*. *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 74: 541-546.
- Trenggono dan Sutardi, 1990. *Biokimia dan Teknologi Pasca Panen*. Yogyakarta: UGM Press.
- Triwinata, M. R. 2006. *Pengenalan dan Pengembangan Lengkeng Dataran Rendah di Indonesia. Makalah Workshop Lengkeng*.
- Untari, R. dan Dwi M. P. 2006. Pengaruh Bahan Organik dan NAA terhadap Pertumbuhan Anggrek Hitam (*Coelogyne pandurata* Lindl.) dalam Kultur

- in Vitro. *Biodiversitas*. Bogor: Fakultas Kehutanan, Institut Pertanian Bogor.
- Van Geel-Schutten, dkk., 1998. Screening and Characterization of *Lactobacillus* Strains Producing Large Amounts Of Exopolysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*. Volume 50: 697–703.
- Vanhooren, P. and Vandamme, E. J., 1998. Biosynthesis, Physiological Role, Use and Fermentation Process Characteristics of Bacterial Exopolysaccharides. *Recent research developments in fermentation & bioengineering* :253- 300.
- Vela AI, C Porrero, J Goyache, A Nieto, B Sánchez, V Briones, MA Moreno, L Domínguez & JF Fernández-Garayzábal. 2003. *Weissella confusa* Infection in Primate (*Cercopithecus mona*). *J Emerging Infectious Diseases*. Volume 9, Nomor 10.
- Viel, M., Collet, F., & Lanos, C. 2018. Chemical and Multi-Physical Characterization of Agro-Resources' by-Product as a Possible.
- Vitalia, N., Najib, A., & Ahmad, A. R. 2016. Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pletakan (*Ruellia tuberosa* L.) Dengan Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. Volume 3, Nomor 1: 124-129.
- Volk, W.A dan Wheeler, M.F. 1998. *Mikrobiologi Dasar Edisi Kelima*. Jakarta: Erlangga.
- Wahyudi, A dan S. Samsundari. 2008. *Bugar dengan Susu Fermentasi*. Malang: UMM Press.
- Wahyuni, N., Masithah, E. D., Soemarjati, W., Suciyono, S., & Ulkhaq, M. F. 2018. Pola Pertumbuhan mikroalga *Spirulina* sp. skala laboratorium yang dikultur menggunakan wadah yang Berbeda. *Majalah Ilmiah Bahari Jogja*. Volume 16, Nomor 2: 89-97.
- Waluyo, Lud. 2011. *Mikrobiologi Umum*. Malang: UMM Press.
- Wang, K., Li, W., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., Dong, M., 2013. Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. *International Journal of Biological Macromolecules*. 63 133-139.
- Widodo, H. 2021. Pengaruh Konsentrasi Sukrosa Pada Air Kelapa Terhadap Produksi Eksopolisakarida Oleh *Weissella confusa*. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Malang.
- Wikanta, T., Januar, H. I., & Nursid, M. 2017. Uji aktivitas antioksidan, toksisitas, dan sitotoksitas ekstrak Alga Merah *Rhodomenia palmata*. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. Volume 11, Nomor 4: 41- 49.
- Wongsuphachat, W., & Maneerat, S. 2010. Optimization of exopolysaccharides production by *Weissella confusa* NH 02 isolated from Thai fermented sausages. *Songklanakarinn Journal of Science & Technology*, Volume 32, Nomor 1.
- Xu, R. H., dkk. 2010. Chemical Characterization and Antioxidant Activity of an Exopolysaccharide Fraction Isolated from *Bifidobacterium* Animals RH. *European Food Research and Technology*: Volume 232, 231-241.

- Ye, G, *et al.*, 2018. Purification and Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Weissella cibaria* YB-1 From Pickle Chinese Cabbage. *International Journal of Biological Macromolecules* 120: 1315–1321.
- Yousef, A.E dan C. Clastrom. 2003. *Food Microbiology (A Laboratory Manual)*. Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, Inc. Ohio State University. USA. 223-224.
- Yudiati, E., Sejati, S., Sunarsih, S., & Agustian, R. 2011. Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Metanol dan Pigmen Kasar *Spirulina* sp. *Indonesian Journal of Marine Sciences*. Volume 16, Nomor 4: 187-192.
- 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.
- Zhao, Dan., Liu, Lina., Jiang, Jing., Guo, Shangxu., Ping, Wenxiang dan Ge, Jingping. 2020. The Response Surface Optimization of Exopolysaccharide Produced by *Weissella confusa* XG-3 and its Rheological Property. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, Volume 50, Nomor 10: 1014-1022.
- Zhou, Q., Fenf, F., Yang, F., Zhao F., Du, R., Han, Y. 2017. Characterization of a dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 from homemade wine. *School of Chemical Engineering and Technology*, Tianjin University, PR China.
- Zisu, B dan N.P. Shah, 2003. Effect of pH, Temperatur, Supplementation Alt Whey Protein Concentrate, Ana Adjunct Cultures on The Production of Exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. Victoria University, Australia. Volume 86, Nomor 11.

LAMPIRAN

Lampiran 1: Rancangan Penelitian

