

**PENGARUH pH MEDIA DAN KONSENTRASI SUKROSA TERHADAP
PRODUKSI EKSPOLISAKARIDA MENGGUNAKAN AIR KELAPA
OLEH *Weissella confusa* K2**

SKRIPSI

**Oleh :
NOVALIA WAHYU TRY SETYA PUTRI
NIM. 19630094**



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

**PENGARUH pH MEDIA DAN KONSENTRASI SUKROSA TERHADAP
PRODUKSI EKSOPOLISAKARIDA MENGGUNAKAN AIR KELAPA
OLEH *Weissella confusa* K2**

SKRIPSI

**Oleh :
NOVALIA WAHYU TRY SETYA PUTRI
NIM. 19630094**

**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**

**PENGARUH pH MEDIA DAN KONSENTRASI SUKROSA TERHADAP
PRODUKSI EKSPOLISAKARIDA MENGGUNAKAN AIR KELAPA
OLEH *Weissella confusa* K2**

SKRIPSI

**Oleh:
NOVALIA WAHYU TRY SETYA PUTRI
NIM: 19630094**

**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 14 Desember 2023**

Pembimbing I



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

Pembimbing II



**Nur Aini, M.Si
NIP. 19840608201903 2 009**

Mengetahui
Ketua Program Studi Kimia

**Rachmawati Wagsih, M.Si
NIP. 19811109 200801 2 010**

**PENGARUH pH MEDIA DAN KONSENTRASI SUKROSA TERHADAP
PRODUKSI EKSPOLISAKARIDA MENGGUNAKAN AIR KELAPA
OLEH *Weissella confusa* K2**

SKRIPSI

Oleh:
NOVALIA WAHYU TRY SETYA PUTRI
NIM: 19630094

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan Dinyatakan
Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan Untuk Memperoleh Gelar Sarjana
Sains (S.Si)

Tanggal: 22 Desember 2023

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

Ketua Penguji : Lilik Miftahul Khoiroh, M.Si
NIP. 19831226 2019203 2 008

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

Anggota Penguji : Nur Aini, M.Si
NIP. 19840608201903 2 009

(.....)

(.....)

(.....)

(.....)

Mengetahui,

Ketua Program Studi Kimia



Rachmawati Ningsih, M.Si
NIP. 19811019 200801 2 010

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Novalia Wahyu Try Setya Putri
NIM : 19630094
Program Studi : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Pengaruh pH Media dan Konsentrasi Sukrosa Terhadap
Produksi Eksopolisakarida Menggunakan Air Kelapa Oleh
Weissella confusa K2

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini adalah benar-benar 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-sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan maka saya bersedia menerima konsekuensi atas perbuatan tersebut.

Malang, 14 Desember 2023
Yang membuat pernyataan,



Novalia Wahyu Try Setya P.
NIM. 19630094

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahahirabbil 'aalamiin

Segala puji bagi Allah Swt. Yang telah memlimpahkan rahmat dan hidayah-Nya serta dukungan dari orang-orang sekitar, akhirnya pada kesempatan kali ini penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik. Sholawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada Nabi Muhammad Saw

Karya ilmiah ini penulis persembahkan, Untuk kedua orang tuaku Ayah Herminto dan Ibu Cholifah Agustina yang selalu mendoakan, memberikan dukungan baik secara materil maupun non materil, motivasi dan semangat serta kasih sayang. Terimakasih atas pengorbanan dan kerja kerasnya sehingga mengantarkan penulis menjadi sarjana. Semoga ayah dan ibu selalu diberikan kesehatan dan umur panjang untuk mengiringi langkahku menuju kesuksesan.

Untuk semua dosen dan laboran yang telah membimbing, memberikan ilmu, wawasan dan pengalaman kepada penulis. Penulis mengucapkan terimakasih terutama kepada Ibu Dr. Anik Maunatin S.T.,M.P dan Ibu Nur Aini, M.Si selaku dosen pembimbing penelitian, yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat kepada penulis dalam menyelesaikan tugas akhir ini. Penulis mengucapkan terimakasih kepada Ibu Dr. Akyunul Jannah, M.P dan Ibu Lilik Miftahul Khoiroh, M.Si selaku penguji, terimakasih atas nasihat, kritik, dan sarannya. Semoga Allah Swt. membalas segala kebaikan Bapak/Ibu.

Untuk Saudara dan Saudariku tercinta, Andryan Gusti Cahya Putra, Frischurianti Vani Putri Agustin, Ayu Aprilia dan Muhammad Sholehudin yang telah memberikan doa dan dukungan kepada penulis.

Untuk diri sendiri, terimakasih telah bertahandan berjuang melawan segala rasa ketakutan, *insecure* serta melalui banyak hal sehingga mendapatkan pelajaran dan pengalaman yang berharga dalam hidup. Terimakasih sudah bertahan hingga sampai di titik ini.

Untuk semua teman-temanku, Kos SMW (Rindi Arifiani, Aidina Quratul Aini, Titian Ajeng Wahyuningtyas, Dita Aidatunnisa, Oktavira Azizah A., Okky Vara Velya), Ceunuyy (Windi A., Sulfani A., Elfitra R), Tim EPS 2019 (Ria Dwi Oktavianti, Fikrotus Saniyyah, Mey Dwi Thousand Permatasari), Saffanah, dan Jazilatur Rif'ah atau teman-teman yang belum penulis sebutkan penulis mengucapkan terimakasih telah memberikan motivasi, semangat serta dukungannya sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah skripsi ini.

Untuk Christian Yu, EXO (Chanyeol, Baekhyun, Sehun, Xiumin, Suho, Kai, Chen dan Lay), Billkin, Krit, Off, dan Gun terimakasih telah menemani perjalanan penulis, membangkitkan semangat penulis dalam menyusun skripsi ini.

MOTTO

“Tidak ada kesuksesan tanpa kerja keras. Tidak ada keberhasilan tanpa kebersamaan. Tidak ada kemudahan tanpa doa.”

-Ridwan Kamil-

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, dengan mengucapkan syukur kepada Allah yang maha pengasih lagi maha penyayang yang telah memberikan berokah, nikmat, serta rahmatnya sehingga penulis dapat menyusun tugas akhir yang berjudul **“Pengaruh pH Media dan Konsentrasi Sukrosa Terhadap Produksi Eksopolisakarida Menggunakan Air Kelapa Oleh *Weissella confusa* K2”** dengan semaksimal mungkin. Tidak lupa sholawat serta salam selalu senantiasa dihaturkan kepada junjungan terbaik baginda Rosul Muhammad Shallallahu ‘Alaihu Wasasallam yang telah membawa kita dari zaman yang gelap menuju zaman yang terang. Semoga Allah melimpahkan rahmat kepada Rosulullah SAW, serta kepada keluarga, sahabat, tabi’in dan orang-orang yang selalu mengikuti sunnahnya. Penulis menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah mendukung, dan membantu, penyusunan tugas akhir ini sehingga berjalan dengan lancar. Penulisan laporan ini tidak luput dari bantuan semua pihak, baik secaralangsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terimakasih yang sedalam-dalamnya 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 Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si, selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

4. Ibu Anik Maunatin S.T.,M.P selaku dosen pembimbing penelitian, yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat kepada penulis dalam menyelesaikan tugas akhir ini.
5. Seluruh Bapak Ibu dosen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah mengalirkan ilmu, pengetahuan, pengalaman, wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.

Penulis menyadari bahwa penulisan tugas akhir ini masih sangat jauh dari sempurna sehingga membutuhkan masukan dan kritikan yang bersifat membangun. Akhir kata penulis berharap semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis sendiri maupun pembaca.

Terima kasih.

Malang, 22 Desember 2023

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERSETUJUAN	iv
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
MOTTO	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvi
ملخص البحث	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan.....	5
1.4 Batasan Masalah.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Air Kelapa	7
2.2 Bakteri Asam Laktat.....	9
2.3 <i>Weissella confusa</i>	11
2.4 Eksopolisakarida	12
2.4.1 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Produksi Eksopolisakarida	14
2.5 Biosintesis Eksopolisakarida	16
2.6 Fermentasi dari Bakteri Asam Laktat	20
2.7 Pengukuran Kadar Gula Total dengan Metode Sulfat Fenol	21
2.8 Spektroskopi Fourier <i>Transform Infrared</i> (FTIR).....	23
BAB III METODE PENELITIAN	25
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	25
3.2 Alat dan Bahan	25
3.2.1 Alat	25
3.2.2 Bahan	25
3.3 Rancangan Penelitian	26
3.4 Tahapan Penelitian	26
3.5 Pelaksanaan Penelitian	27
3.5.1 Sterilisasi Alat.....	27
3.5.2 Preparasi Air Kelapa.....	27
3.5.3 Pembuatan Media	27

3.5.4 Regenerasi <i>Weissella Confusa</i> K2	28
3.5.5 Pembuatan Inokulum	28
3.5.6 Produksi Eksopolisakarida.....	29
3.5.7 Ekstraksi Eksopolisakarida dari Media Fermentasi Air Kelapa	29
3.5.8 Uji Kadar Total Gula dengan Metode Fenol H ₂ SO ₄	30
3.5.9 Analisis Kadar Protein Eksopolisakarida	31
3.5.10 Analisis Data.....	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN.....	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 : Rancangan Penelitian	42
Lampiran 2 : Skema Kerja	43
Lampiran 3 : Perhitungan.....	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1	Kelapa Tua	9
Gambar 2. 2	Jalur Biosintesis EPS secara Ekstraseluler.....	17
Gambar 2. 3	Struktur mutan.....	18
Gambar 2. 4	Struktur Dextran.....	18
Gambar 2. 5	Struktur alternan.....	19
Gambar 2. 6	Struktur reuteran.....	19
Gambar 2. 7	Struktur inulin	20
Gambar 2. 8	Struktur Levan.....	20
Gambar 2. 9	Reaksi penentuan kadar gula total metode sulfat-fenol	22
Gambar 2. 10	Spektrum FTIR EPS dari Weissella confusa	24

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan gizi pada air kelapa	8
Tabel 3.1 Kombinasi perlakuan antara pH media dan konsentrasi sukrosa.....	26

ABSTRAK

Putri, Novalia Wahyu T S. 2023. **Pengaruh pH media dan konsentrasi sukrosa terhadap produksi eksopolisakarida menggunakan air kelapa oleh *Weissella confusa* K2**. Skripsi. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I : Dr. Anik Maunatin S.T.,M.P. Pembimbing II : Nur Aini, M.Si

Kata Kunci : Eksopolisakarida (EPS), *Weissella confusa*, Air kelapa, Konsentrasi Sukrosa, pH .

Eksopolisakarida (EPS) adalah polisakarida yang disekresi atau diproduksi dari sel terluar enzim ekstraseluler. EPS dapat diproduksi oleh bakteri asam laktat (BAL). EPS yang berasal dari BAL memiliki banyak manfaat pada bidang pangan, farmasi maupun kesehatan. Air kelapa merupakan salah satu media yang memiliki banyak nutrisi dengan penambahan sukrosa untuk fermentasi BAL yang dapat memproduksi EPS. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan konsentrasi sukrosa dan pH pada air kelapa dan terhadap produksi eksopolisakarida oleh *Weissella confusa* K2.

Produksi EPS dilakukan dengan menggunakan media alternatif yaitu media air kelapa dengan penambahan sukrosa untuk memenuhi kebutuhan sumber karbon pada produksi EPS. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok Faktorial (RAKF) dengan dua faktor, yaitu pH media (6, 7 dan 8) dan konsentrasi sukrosa (5 dan 10 % b/v). Masing-masing perlakuan dilakukan tiga kali ulangan. Produk EPS terpilih yang dihasilkan dilanjutkan analisa kadar gula total, kadar protein dan identifikasi gugus fungsi penyusun menggunakan instrumen FTIR. Data rendemen EPS dilakukan analisa *Two Way* ANOVA menggunakan IBM SPSS 25.0.

Hasil produksi EPS oleh *Weissella confusa* K2 diperoleh rendemen tertinggi pada pH media 8 dan penambahan konsentrasi sukrosa 10% yang menghasilkan EPS sebesar 31,70 g/L. Hasil analisa EPS terpilih oleh *Weissella confusa* K2 pada pH media 8 dengan konsentrasi sukrosa 10% diperoleh kadar gula total 99,90%, kadar protein 0,765% dan hasil analisis gugus fungsi menggunakan FTIR menunjukkan gugus fungsi O-H, C-H, C=O, C=C, C-H/CH₂, C-O-C, dan α -1,6 glikosidik pada panjang gelombang masing-masing 3267,0 cm⁻¹, 2927,8 cm⁻¹, 1653,1 cm⁻¹, 1428,1 cm⁻¹, 1340,0 cm⁻¹, 1151,7 cm⁻¹, dan 1008,2 cm⁻¹. Hasil rendemen EPS terpilih yaitu pada pH 8 dengan konsentrasi sukrosa 10%. Berdasarkan Uji *Two Way* ANOVA pada $\alpha = 0,05$ menunjukkan bahwa pada interaksi pengaturan pH media dan konsentrasi sukrosa tidak mempengaruhi produksi EPS, namun pada pengaturan pH saja mempengaruhi produksi EPS dan pada penambahan konsentrasi sukrosa saja mempengaruhi produksi EPS.

ABSTRACT

Putri, Novalia Wahyu T S. 2023. **Effect of pH media and sucrose concentration on exopolysaccharide production using coconut water by *Weissella confusa* K2.** Thesis. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Advisor I : Dr. Anik Maunatin S.T.,M.P. Advisor II : Nur Aini, M.Sc

Keywords : *Exopolysaccharide (EPS), Weissella confusa, coconut water, sucrose concentration, pH.*

Exopolysaccharides (EPS) are polysaccharides secreted or produced from the outer cells of extracellular enzymes. EPS can be produced by lactic acid bacteria (LAB). EPS derived from LAB has many benefits in the food, pharmaceutical and health sectors. Coconut water is a medium that has lots of nutrients with the addition of sucrose for LAB fermentation which can produce EPS. The aim of this research was to determine the effect of adding sucrose concentration and pH to coconut water and on exopolysaccharide production by *Weissella confusa* K2.

EPS production is carried out using alternative media, namely coconut water with the addition of sucrose to meet the need for carbon sources in EPS production. This research used a Randomized Block Factorial Design (RAKF) with two factors, namely media pH (6, 7 and 8) and sucrose concentration (5 and 10% w/v). Each treatment was carried out three times. The resulting selected EPS product is followed by analysis of total sugar content, protein content and identification of constituent functional groups using FTIR instruments. EPS yield data was analyzed using Two Way ANOVA.

The results of EPS production by *Weissella confusa* K2 obtained the highest yield at media pH 8 and the addition of 10% sucrose concentration which produced EPS of 99,90 g/L. The results of selected EPS analysis by *Weissella confusa* K2 at media pH 8 with a sucrose concentration of 10% obtained a total sugar content of 71,51 %, protein content of 0.765% and the results of functional group analysis using FTIR showed the functional groups O-H, C-H, C=O, C=C, C-H/CH₂, C-O-C, and a-1,6 glycosidic at wavelengths 3267.0 cm⁻¹, 2927.8 cm⁻¹, 1653.1 cm⁻¹, 1428.1 cm⁻¹ respectively , 1340.0 cm⁻¹, 1151.7 cm⁻¹, and 1008.2 cm⁻¹. The results of the selected EPS yield were at pH 8 with a sucrose concentration of 10%. Based on the Two Way ANOVA test at $\alpha = 0.05$, it shows that the interaction between media pH settings and sucrose concentration does not affect EPS production, but pH settings alone affect EPS production and adding sucrose concentration alone affects EPS production.

ملخص البحث

فوتري، نوفاليا وحيو ت. س. ٢٠٢٣. تأثير درجة الحموضة الإعلامية وتركيز السكر على إنتاج عديدات السكاريد الخارجية باستخدام ماء جوز الهند بواسطة ويسيلا الخلط بين K2. بحث جامعي. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرفة الأولى: الدكتور أنيك ماؤنة، الماجستير، المشرفة الثانية: نور عيني، الماجستير

الكلمات الرئيسية: عديدات السكاريد الخارجية (EPS)، ويسيلا الخلط بين، ماء جوز الهند، تركيز السكر، درجة الحموضة

عديدات السكاريد الخارجية (EPS) هي متعددات السكريات التي تفرز أو تنتج من الخلايا الخارجية للإنزيمات خارج الخلية. يمكن إنتاج EPS بواسطة بكتيريا حمض اللاكتيك (BAL). المشتق من BAL له فوائد عديدة في مجالات الأغذية والأدوية والصحة. ماء جوز الهند هو أحد الوسائط التي تحتوي على العديد من العناصر الغذائية مع إضافة السكر لتخمير BAL والتي يمكن أن تنتج EPS. كان الغرض من هذا البحث هو تحديد تأثير زيادة تركيز السكر ودرجة الحموضة في ماء جوز الهند وعلى إنتاج عديدات السكاريد الخارجية بواسطة ويسيلا الخلط بين K2.

يتم إنتاج EPS باستخدام وسائط بديلة، وهي وسائط ماء جوز الهند مع إضافة السكر لتلبية احتياجات مصادر الكربون في إنتاج EPS. استخدمت هذا البحث التصميم العشوائي للمجموعة العاملة (RAKF) مع عاملين، وهما درجة الحموضة في الوسائط (٦ و ٧ و ٨) وتركيز السكر (٥ و ١٠٪). يتم تنفيذ كل علاج ثلاث مرات. يتبع منتجات EPS المختارة المنتجة تحليل إجمالي محتوى السكر ومحتوى البروتين وتحديد المجموعات الوظيفية المكونة باستخدام أداة FTIR. تم تحليل بيانات عائد EPS باستخدام ANOVA.

حصلت نتائج إنتاج EPS بواسطة ويسيلا الخلط بين K2 على أعلى عائد عند درجة حموضة الوسائط ٨ وإضافة تركيز السكر بنسبة ١٠٪ مما أدى إلى EPS بنسبة ٣١,٧ g/L. نتائج تحليل EPS التي اختارها ويسيلا الخلط بين K2 عند درجة حموضة الوسائط ٨ مع تركيز السكر بنسبة ١٠٪ حصلت على محتوى سكر كلي بنسبة ٩٩,٩٪ ومحتوى بروتين بنسبة ٠,٧٦٥٪. وأظهرت نتائج تحليل المجموعة الوظيفية باستخدام FTIR مجموعات وظيفية O-H \، C-H و C=O و C=C و C-H / CH2 و C-O-C و -A ١,٦ جليكوسيديك بأطوال موجية $cm^{-1} 3267,0$ و $cm^{-1} 2927,8$ و $cm^{-1} 1653,1$ و $cm^{-1} 1428,1$ و $cm^{-1} 1340,0$ و $cm^{-1} 1151,7$ و $cm^{-1} 1008,2$ على التوالي. يكون عائد EPS المحدد عند درجة الحموضة ٨ مع تركيز السكر بنسبة ١٠٪. أظهرت الاختبارات الإحصائية عدم وجود فرق حقيقي في التفاعل بين تأثير تنظيم الأس الهيدروجيني للوسائط وإضافة السكر ($sig > 0,05$)، لكن تنظيم درجة الحموضة في الوسائط أظهر فرقا حقيقيا في إنتاج EPS ($sig < 0,05$) وأظهر تركيز السكر فرقا حقيقيا في إنتاج EPS ($sig < 0,05$).

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Eksopolisakarida adalah suatu polisakarida hasil sekresi atau sintesis dari bakteri asam laktat (BAL) yang dilepaskan pada ekstraseluler di sekitar sel (Ates, 2015). Eksopolisakarida (EPS) yang berasal dari BAL yang memiliki banyak manfaat yang dapat digunakan untuk makanan, menaikkan reologi produk susu fermentasi serta mempunyai efek kesehatan yang menguntungkan. Salah satu bakteri yang menguntungkan adalah bakteri asam laktat yaitu bakteri yang mampu memproduksi EPS (Kusmiati, 2006). EPS telah banyak diteliti karena memiliki berbagai macam potensi, antara lain dalam bidang farmasi, pangan dan kesehatan. Pada penelitian yang dilakukan oleh Tayo, dkk, (2018), menunjukkan bahwa EPS yang diproduksi oleh *Weissella confusa* K2 memiliki potensi imunomodulator dengan merangsang produksi IgG dan IgM pada tikus. Sedangkan pada penelitian Rajoka, dkk. (2019) dimana hasil aktivitas antikanker in-vitro menunjukkan bahwa EPS yang dihasilkan oleh *Lactobacillus kefir* MSR101 (400µg/ml) memiliki aksi antikanker yang memuaskan pada sel kanker HT-29 (44,1%).

Menurut Widyastuti dan Sofarianawati (1999), BAL adalah bakteri yang mampu memfermentasi gula atau karbohidrat untuk memproduksi asam laktat dalam jumlah besar. Ciri-ciri dari BAL secara umum adalah bereaksi negatif terhadap katalase dan tidak membentuk spora. Dari beberapa sifatnya tersebut membuat BAL ini mampu tumbuh pada kadar garam, gula dan alkohol tinggi,

tumbuh pada kisaran pH 3,0-8,0 (Wibowo dan Ristanto, 1988). Salah satu bakteri asam laktat yang dapat menghasilkan EPS adalah *Weissella confusa* K2.

Weissella confusa K2 merupakan bakteri asam laktat heterofermentatif yang biasanya menghasilkan EPS dengan penambahan sukrosa sebagai sumber karbonnya (Tayuan, dkk., 2011). *Weissella confusa* K2 merupakan salah satu strain *Weissella spp.* yang telah banyak diisolasi dari berbagai sumber seperti sayuran segar, amilase terfermentasi, daging atau produk daging. Dalam penelitian ini digunakan bakteri asam laktat yaitu *Weissella confusa* K2 yang berasal dari buah kelengkeng. Buah kelengkeng mengandung gula alami seperti glukosa dan fruktosa dimanfaatkan sebagai sumber energi bagi bakteri asam laktat menghasilkan zat metabolik yang berupa asam (Puspitasari, 2014).

EPS yang diproduksi oleh BAL dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya suhu, pH, konsentrasi substrat, konsentrasi inokulum dan media (Farida, dkk., 2022) Air kelapa merupakan salah satu media alternatif untuk media produksi EPS dimana mengandung sumber nutrisi yang kompleks seperti gula, natrium, kalium, kalsium, magnesium, besi, dan tembaga sehingga dapat dimanfaatkan dengan baik sebagai media fermentasi (Putri, 2019). Air kelapa memiliki kandungan yang kompleks dan sangat bermanfaat, akan tetapi masih belum dimanfaatkan dengan baik oleh masyarakat. Keberadaan buah-buahan seperti kelapa serta manfaatnya yang terkandung di dalamnya merupakan salah satu bukti kekuasaan Allah yang telah menciptakan seluruh alam semesta beserta isinya sesuai dengan firman Allah dalam surah al-Baqarah (2): 22:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ فِرَاشًا وَالسَّمَاءَ بِنَاءً يُوَنِّزُ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجَ بِهِ مِنَ الثَّمَرَاتِ رِزْقًا

لَكُمْ ؕ فَلَا تَجْعَلُوا لِلَّهِ أَنْدَادًا وَأَنْتُمْ تَعْلَمُونَ

Artinya: “Dialah yang menjadikan bumi sebagai hamparan bagimu dan langit sebagai atap, dan Dia menurunkan air (hujan) dari langit, lalu Dia menghasilkan dengan hujan itu segala buah-buahan sebagai rezki untukmu; karena itu janganlah kamu mengadakan sekutu-sekutu bagi Allah, padahal kamu mengetahui.”

Menurut tafsir Al-Muyassar, dijelaskan bahwa Allah telah menciptakan bumi yang terhampar luas sehingga umat-Nya dapat merasa nyaman dan mudah dalam melakukan berbagai macam pekerjaan. Dia juga menurunkan air dari langit yang menyirami bumi yang asalnya mati (kering), maka tumbuhlah berbagai macam tanaman yang menghasilkan aneka biji-bijian, buah-buahan, sayur-mayur dan menjadi pemandangan yang indah. Semua hasil bumi itu dapat dinikmati oleh manusia dan binatang-binatang (Mashudi, 2020).

Dari ayat tersebut dapat diketahui bahwa Allah telah menciptakan seluruh alam semesta beserta isinya dengan tujuan agar dapat dimanfaatkan dengan sebaik-baiknya oleh makhluk hidup. Oleh karena itu, sebagai manusia hendaknya dapat termotivasi untuk mengembangkan potensi yang dimiliki dengan mengelola kembali limbah seperti air kelapa sebagai media yang kaya akan sumber karbon bagi mikroorganisme.

Menurut Badan Pusat Statistik (BPS) mencatat, produksi kelapa nasional telah mencapai 2,85 juta ton pada 2021 dan jumlah rata-rata air kelapa sebesar 600 juta liter merupakan potensi yang belum dimanfaatkan secara maksimal. Air kelapa banyak dibuang langsung ke lingkungan sebagai limbah rumah tangga, limbah pasar dan limbah industri (Widayati, dkk., 2002). Air kelapa harus dimanfaatkan dengan baik, karena apabila tidak dimanfaatkan dengan baik dapat merusak lingkungan. Jumlah buah kelapa di Indonesia sendiri sangat melimpah. Air kelapa mengandung gula sebanyak 5,6% dan karbohidrat sebanyak 4% dalam

bentuk yang sederhana seperti glukosa dan fruktosa yang berperan sebagai sumber karbon untuk mikroorganisme (Anwar dan Usman, 2018). BAL menyukai gula sederhana yang mengandung sedikit unsur nitrogen, sehingga bakteri asam laktat dapat tumbuh dan berkembang pada media yang mengandung gula sederhana dan juga protein (Anwar dan Usman, 2018).

Beberapa penelitian tentang produksi eksopolisakarida menunjukkan bahwa EPS yang diproduksi oleh BAL dipengaruhi oleh kondisi fermentasi antara lain pH media, jenis sumber karbon, konsentrasi sukrosa dan lama fermentasi. Pada penelitian yang dilaporkan oleh Seesuriyachan, *et al.*, (2014) variasi pada pH media menghasilkan EPS maksimum sebesar 65,28 g/L pada pH optimum 5,5 oleh bakteri *Lactobacillus confusus* TISTR 1498, hasil EPS dari *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 menghasilkan 38,2 g/L pada penambahan 100 g/L sukrosa (Kuntiya, *et al.*, 2010), dan dengan pH media sebesar 6,8 serta konsentrasi glukosa 120 g/L menghasilkan EPS dari *Lipomyces starkeyi* sebesar 7.76 g/L (Guo, *et.*, 2022), pada penelitian Wongsuphachat, *et al.*, (2010) produksi EPS dari *Weissella confusa* NH02 mampu menghasilkan rendemen EPS sebesar 18,08 g/L pada pH media 7-7,5.

Berdasarkan uraian yang telah dipaparkan, maka diperlukan penelitian untuk mengetahui pengaruh produksi EPS oleh *Weissella confusa* K2 pada berbagai kondisi lingkungan seperti pH media, konsentrasi sukrosa maupun jenis media yang digunakan sebagai sumber nutrisi. Penelitian ini menggunakan media air kelapa sebagai alternatif dengan harga yang relatif murah dan dapat digunakan sebagai sumber nutrisi yang cukup untuk fermentasi dalam produksi EPS oleh *Weissella confusa* K2.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh variasi pH dan konsentrasi sukrosa yang ditambahkan pada air kelapa terhadap produksi EPS oleh *Weissella confusa* K2?
2. Bagaimana karakteristik kimia EPS terpilih dari *Weissella confusa* K2?

1.3 Tujuan

1. Untuk mengetahui pengaruh pH media dan konsentrasi sukrosa yang ditambahkan pada air kelapa terhadap produksi EPS oleh *Weissella confusa* K2.
2. Untuk mengetahui karakteristik kimia EPS terpilih dari *Weissella confusa* K2

1.4 Batasan Masalah

1. Air kelapa yang digunakan adalah air kelapa tua yang didapat dari pasar Dinoyo, Kota Malang.
2. Bakteri yang digunakan untuk produksi EPS adalah *Weissella confusa* K2 yang merupakan hasil isolasi dari buah kelengkeng pada penelitian sebelumnya.
3. Variasi pH media yang digunakan adalah 6,7, dan 8.
4. Variasi penambahan konsentrasi sukrosa yang digunakan adalah 5 dan 10% b/v.
5. Karakterisasi kimia meliputi kadar gula total, kadar protein dan gugus fungsi EPS terpilih dari *Weissella confusa* K2

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan pengetahuan bagi masyarakat luas maupun civitas akademika mengenai produksi EPS menggunakan media air kelapa yang penting untuk kesehatan dan konsumsi pangan dalam kehidupan sehari-hari.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Air Kelapa

Kelapa merupakan salah satu keluarga *palmae* yang memiliki batang lurus dan tidak bercabang. Air kelapa merupakan bagian dari kelapa dimana memiliki banyak sekali potensi yang dapat dimanfaatkan. Air kelapa dapat menyembuhkan berbagai macam penyakit, dimana hal ini disebabkan karena air kelapa mempunyai komposisi mineral dan gula yang sempurna sehingga mempunyai kesetimbangan elektrolit yang sempurna, sama dengan cairan tubuh manusia (Prasetyo, 2002).

Air kelapa mempunyai potensi yang baik untuk dibuat menjadi produk fermentasi karena kandungan zat gizinya. Air kelapa kaya akan nutrisi yaitu gula, protein, dan lemak sehingga sangat baik untuk pertumbuhan bakteri penghasil produk pangan. Komposisi air kelapa terutama kandungan gulanya dipengaruhi oleh umur buah kelapa. Semakin tua umur buah kelapa maka kandungan fruktosa dan glukosanya akan meningkat, sedangkan kandungan sukrosanya akan menurun (Kholifah, 2010).

Unsur makro yang terdapat pada air kelapa adalah karbon dan nitrogen. Unsur karbon dalam air kelapa berupa karbohidrat sederhana seperti glukosa, sukrosa, fruktosa, sorbitol, inositol, dan lain-lain, unsur nitrogen berupa protein, tersusun dari asam amino, seperti alin, arginin, alanin, sistin dan serin. Selain itu, air kelapa mengandung beberapa mineral seperti kalium (K), kalsium (Ca),

magnesium (Mg), ferum (Fe), cuprum (Cu), fosfor (P), dan Sulfur (S) (Permana, 2010). Adapun kandungan gizi pada air kelapa yang disajikan dalam Tabel 2.1

Tabel 2.1 Kandungan gizi pada air kelapa

Kandungan Gizi	Kelapa Tua	Kelapa Muda
Kalori (K)	17,0	-
Protein (g)	0,2	0,14
Lemak (g)	1,00	1,50
Karbohidrat (g)	4,60	3,80
Vit. C (mg)	1,00	-
Air (g)	95,50	91,50
Fosfor (g)	8,00	0,50

Sumber: Ernawati, 2010

Menurut Badan Pusat Statistik (BPS) mencatat, produksi kelapa nasional telah mencapai 2,85 juta ton pada 2021 dan jumlah rata-rata air kelapa sebesar 600 juta liter merupakan potensi yang belum dimanfaatkan secara maksimal. Air kelapa tua banyak dibuang langsung ke lingkungan sebagai limbah rumah tangga, limbah pasar dan limbah industri (Widayati, dkk., 2002). Air kelapa memiliki kandungan yang kompleks dan sangat bermanfaat, akan tetapi masih belum dimanfaatkan dengan baik oleh masyarakat.

Pada bidang bioteknologi, air kelapa memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai media fermentasi. Air kelapa mengandung nutrisi seperti gula, protein dan lemak dimana sangat baik untuk menunjang pertumbuhan bakteri penghasil produk pangan. Glukosa dan fruktosa yang dapat berperan sebagai *fermentable sugar* dan dapat menjadi sumber karbon bagi mikroorganisme (Rachmawati, 2011). Penggunaan air kelapa sebagai media fermentasi salah satunya berupa produk yang disebut sebagai minuman probiotik. Dalam penelitian (Prayananti, 2015) yang menunjukkan perlakuan terbaik berdasarkan sifat mikrobiologi, kimia, dan fisik yaitu perlakuan konsentrasi sukrosa 0% dan lama fermentasi 48 jam dengan nilai parameter total BAL 4.00×10^8 CFU/ml.



Gambar 2. 1 Kelapa Tua (Mardiatmoko dan Ariyanti,2018)

2.2 Bakteri Asam Laktat

Bakteri merupakan mikroorganisme yang tersebar luas di alam baik di udara, air, dan di dalam tanah. Bakteri Asam Laktat (BAL) adalah sejenis bakteri Gram positif, tidak menghasilkan spora, berbentuk bulat atau batang dan memproduksi asam laktat sebagai produk akhir metabolik utama selama proses fermentasi (Ramesh, 2015). Asam laktat dihasilkan dari pemecahan glukosa menjadi piruvat kemudian diubah menjadi asam laktat melalui proses glikolisis (Tamime dan Robinson, 2007). BAL merupakan salah satu mikroorganisme yang dapat digunakan dalam mengontrol pertumbuhan bakteri patogen dalam bahan pangan karena mampu menurunkan pH dan menghasilkan senyawa anti bakteri. Menurut Buckle, *et al.*, (1987), habitat BAL terdapat di produk makanan atau minuman, saluran pencernaan hewan, dan manusia. Terdapatnya BAL di dalam produk pangan bisa secara alami atau sengaja ditambahkan untuk proses fermentasi. Pada fermentasi pangan bakteri ini akan mengubah gula menjadi asam organik.

BAL adalah mikrobia dominan yang menekan pertumbuhan bakteri pembusuk. Aktifitas BAL dalam menghambat bakteri pembusuk dan bakteri patogen berkaitan dengan adanya asam organik (asam laktat, asam asetat, asam format), hidrogen peroksida, diasetil dan bakteriosin yang dihasilkan (Daeschel, 1989). Asam laktat yang dihasilkan BAL dalam saluran pencernaan dapat mencegah pertumbuhan bakteri yang merugikan dan sebagai kontrol pembuangan kotoran dengan cara merangsang dinding saluran pencernaan. Asam-asam organik seperti asam laktat dan asam asetat yang diproduksi BAL sebagai hasil fermentasi laktosa dalam susu dapat membantu aktivitas usus dengan merangsang peristaltik, meningkatkan kemampuan pencernaan dan penyerapan (Widyastuti, 1999).

Klasifikasi BAL dalam genus yang berbeda sebagian besar didasarkan pada perbedaan morfologi, cara fermentasi glukosa, pertumbuhan pada suhu yang berbeda, dan konfigurasi dari asam laktat yang dihasilkan, kemampuan untuk tumbuh pada konsentrasi garam tinggi, dan toleransi terhadap asam atau basa (Desai, 2008). Sifat-sifat khusus BAL adalah mampu tumbuh pada kadar gula, alkohol, dan garam yang tinggi, mampu memfermentasikan monosakarida dan disakarida (Syahrurahman, 1994). Ciri-ciri BAL secara umum bereaksi negatif terhadap katalase dan tidak membentuk spora. Bakteri *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, spesies *Leuconostoc*, dan *Weissella* adalah BAL yang bersifat probiotik yang telah diketahui dapat memproduksi eksopolisakarida yang bersifat antibakteri terhadap bakteri patogen (Tallon, *et al.*, 2003). BAL merupakan salah satu bakteri yang menguntungkan. Al-Quran menjelaskan bahwa bakteri merupakan salah satu bukti bahwa Allah SWT telah

menciptakan seluruh alam semesta beserta isinya termasuk makhluk didalamnya.

Allah SWT berfirman dalam Al-Quran surat Hud (11): 6:

وَمَا مِنْ دَابَّةٍ فِي الْأَرْضِ إِلَّا عَلَى اللَّهِ رِزْقُهَا وَيَعْلَمُ مُسْتَقَرَّهَا وَمُسْتَوْدَعَهَا ۗ كُلٌّ فِي كِتَابٍ مُبِينٍ

Artinya: “Dan tidak satupun makhluk bergerak (bernyawa) di bumi melainkan semuanya dijamin Allah rezekinya. Dia mengetahui tempat kediamannya dan tempat penyimpanannya. Semua (tertulis) dalam Kitab yang nyata (Lauh Mahfuzh).”

Menurut tafsir ilmi, *jasad renik dapat dipahami dari kata ‘dabbah’*. kata ‘dabbah’ adalah semua yang bergerak di muka bumi, termasuk makhluk renik yang baru bisa tampak bila dilihat dengan bantuan kaca pembesar. (Kementrian agama, 2015).

Pada ayat tersebut telah dijelaskan bahwa Allah telah menciptakan semua makhluk yang bergerak yang ada di bumi seperti hewan, tumbuhan, manusia bahkan mikroorganisme yang memiliki ukuran sangat kecil atau ‘dabbah’. Dimana dapat diartikan bahwa manusia dapat mempelajari dan mengenal makhluk mikroskopik yang memiliki banyak potensi yang dapat dimanfaatkan dengan baik oleh manusia.

2.3 *Weissella confusa*

Weissella merupakan bakteri jenis Gram-positif, katalase-negatif, dan nonendospora berbentuk batang. *Weissella confusa* merupakan kelompok bakteri asam laktat yang pada awalnya digolongkan kedalam *Leuconostac* atau *Lactobacillus*. Namun, pada tahun 1993 Collins *et al.*, mengidentifikasi ciri biokimia yang khas pada *Leuconostac* atau *Lactobacillus* dan diklasifikasikan sebagai *Weissella*. *Weissella* dapat diisolasi dari berbagai sumber seperti tanah, sayuran segar, daging, ikan, silase yang difermentasi dan makanan yang difermentasi (Björkroth *et al.*, 2002). *Weissella confusa* merupakan salah satu

spesies *Weissella* yang memiliki aktivitas proteolitik. Sistem protease dan peptidase yang kompleks pada BAL memungkinkan mereka menggunakan kasein sebagai sumber asam amino dan nitrogen (Tulini dkk., 2015). Selain itu, *Weissella* spp. Memiliki kapasitas produksi EPS yang lebih tinggi dari strain BAL yang lain (Kumae dkk., 2011). Berdasarkan *Taxonomic Outline of the Prokaryotes*, *Weissella confusa* dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

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

2.4 Eksopolisakarida

Eksopolisakarida (EPS) merupakan polisakarida yang disekresikan dari sel, atau diproduksi di sel terluar enzim ekstraseluler. Karakteristik EPS adalah berbentuk seperti kapur berongga yang melekat dan sulit dikeluarkan. Salah satu bakteri yang mampu menghasilkan EPS adalah BAL. BAL yang menghasilkan lendir telah banyak digunakan dalam industri susu (Zubaidah, dkk., 2008). EPS berasal dari BAL yang dapat memberi dampak fungsional pada makanan, menaikkan reologi produk susu fermentasi, serta mempunyai efek kesehatan yang menguntungkan. EPS yang diproduksi BAL pada produk pangan fermentasi berperan sebagai peningkat cita rasa dan tekstur, selain itu EPS terbukti dapat digunakan sebagai aditif pada pangan dan bermanfaat sebagai antikarsinogen, antitumor, penurun kolesterol, serta imunomodulator (Mundiri, dkk., 2020).

EPS umumnya tersusun atas monosakarida dan beberapa substituen non-karbohidrat diantaranya seperti asetat, piruvat, suksinat, fosfat dan biomolekul

seperti protein, asam nukleat, lipid dan zat humat (Surono, 2004). Perbedaan produksi jumlah EPS secara umum dipengaruhi oleh sifat genetis dan fenotif. Sifat genetis merupakan sifat turunan bawaan dari masing-masing spesies yang dipengaruhi oleh susunan gen, sedangkan sifat fenotif cenderung dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Produksi EPS dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya suhu, pH, konsentrasi substrat, konsentrasi inokulum dan media (Farida, dkk., 2022)

EPS telah banyak diteliti karena memiliki berbagai macam potensi dan manfaat yaitu dalam bidang pangan, kesehatan dan farmasi. Dalam bidang pangan, EPS bermanfaat sebagai stabilisator, pengental, emulgaor, pembentuk gel, dan memiliki kemampuan mengikat air yang baik sehingga dapat mempertahankan tekstur agar tetap lembut selama penyimpanan (Nudyanto, 2015). Di bidang farmasi atau pengobatan, EPS dilaporkan memiliki berbagai manfaat sebagai anti inflamasi, anti tumor, anti infeksi dan sebagai imunomodulator (Halim, dkk., 2013). Dalam bidang kesehatan EPS memiliki fungsi yang beragam seperti anti inflamasi, anti trombotik, anti koagulan, hingga memiliki peran yang penting sebagai intraarterial dan intravenous (Veronese dan Caliceti, 2006).

Penelitian tentang EPS produksi *Weissella confusa* yang diisolasi dari berbagai habitat memiliki manfaat diantaranya sebagai antioksidan, antitumor, antimikroba, antibiotik, antiadesi, antiinflamatori dan biofilm. Oleh karena itu, adanya berbagai dampak menguntungkan dari EPS yang diproduksi oleh BAL memunculkan kesadaran akan pentingnya menambahkan EPS pada makanan yang

dikonsumsi setiap hari sehingga diperlukan EPS dalam jumlah besar (Sunjaya, dkk., 2012).

2.4.1 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Produksi Eksopolisakarida

Bakteri mengalami pertumbuhan sama halnya dengan makhluk hidup yang lain. Adapun faktor tersebut diantaranya adalah sebagai berikut:

2.4.1.1 Suhu

Salah satu faktor penting dalam pertumbuhan mikroba adalah suhu. Suhu berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroba, sehingga diperlukan suhu optimal untuk masing-masing mikroba yang digunakan selama proses fermentasi. Suhu akan meningkat dan mengalami penurunan kembali akibat kerja mikroorganisme selama fermentasi berlangsung. Suhu sangat memengaruhi kecepatan pertumbuhan mikrobial, kecepatan sintesis enzim dan kecepatan inaktivasi enzim (Knob dan Carmona, 2008). Menurut Shukla dan Arun (2011) bakteri *Weissella confusa* mencapai aktifitas optimum pada suhu 25°C. *Weissella confusa* KR780676 mampu memproduksi EPS sebesar 17,2 g/L pada media MRSB dengan substitusi 2% sukrosa yang diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C (Kavitake, *et al.*, 2016).

2.4.1.2 pH

pH merupakan salah satu parameter penting yang mempengaruhi total bakteri asam laktat dalam medium fermentasi, total asam laktat dan total EPS kasar yang dihasilkan (Zubaidah, dkk., 2008). Derajat keasaman (pH) media yang digunakan juga akan berpengaruh terhadap produksi EPS, karena mikroba memiliki pH optimum untuk proses fermentasinya. Kerja enzim akan

menurun jika di bawah atau di atas suhu optimumnya. pH optimum untuk pertumbuhan isolat *Weissella confusa* adalah pada kondisi netral yaitu sekitar 7. Pada penelitian Jin, *et al.*, (2019) bahwa produksi EPS optimum dari isolat *Weissella confusa* adalah pada sekitar pH 7,0 dengan hasil EPS sebesar 59 g/L. Sedangkan pada penelitian (Tayuan, *et al.*, 2019) dihasilkan EPS optimum sebesar 8,65 g/L dengan pH 7,0 oleh isolat *Weissella confusa*.

2.4.1.3 Lama fermentasi

Fermentasi merupakan tahap dalam pembentukan EPS sehingga waktu fermentasi sangat mempengaruhi hasil dari produk EPS. Hasil penelitian (Haroun., *et al.*, 2013) dengan lama fermentasi 36 jam dapat menghasilkan EPS 650 mg/L. Sedangkan pada penelitian yang dilakukan (Tayuan, *et al.*, 2019) dihasilkan EPS optimum sebesar 8,65 g/L dengan lama fermentasi 30 jam oleh isolat *Weissella confusa*.

2.4.1.4 Media

Media yang digunakan untuk mengoptimalkan produksi EPS sangat beragam, karena rantai utama dari polimer ini adalah glukosa. Hasil penelitian oleh Lule, *et al.*, (2014) dengan menggunakan substrat paneer whey (0,047 g/L) untuk memproduksi EPS oleh *Leuconostoc mesenteroides* dan menghasilkan EPS sebesar 12,7 g/L. Sedangkan pada penelitian (Kuntiya, *et al.*, 2010) dengan menggunakan modifikasi MRS-sucrose-coconut water untuk memproduksi EPS oleh *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 dan dihasilkan EPS sebesar 31,5 g/L.

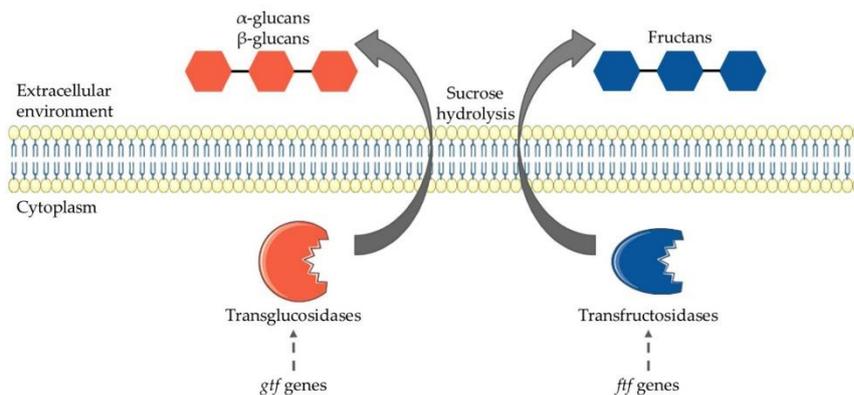
2.4.1.5 Penambahan sukrosa

Sukrosa adalah salah satu jenis gula yang dapat dimetabolisme oleh bakteri menjadi asam laktat selama proses fermentasi berlangsung (Anindita, 2002). Sukrosa berpotensi menjadi sumber nutrisi bagi bakteri asam laktat. Semakin banyak sukrosa yang tersedia maka semakin banyak pula substrat yang dapat dirombak oleh bakteri asam laktat menjadi asam piruvat yang selanjutnya dapat diubah menjadi asam-asam organik lainnya. Sebagai sumber karbon, semakin tinggi konsentrasi sukrosa maka konsentrasi eksopolisakarida yang dihasilkan juga semakin tinggi. Hasil penelitian (Kuntiya, *et al.*, 2010) dengan pemberian variasi konsentrasi sukrosa 60, 80, dan 100 g/L dihasilkan EPS maksimum maksimum sebesar 38,17 g/L. Sedangkan pada penelitian (Widodo, 2019) dihasilkan EPS 3,27 g/L dengan kadar gula total 85,77%. pada penambahan sukrosa 20%.

2.5 Biosintesis Eksopolisakarida

EPS yang dihasilkan oleh BAL dapat dibedakan menjadi dua kelompok berdasarkan pada komposisi dan mekanisme biosintesisnya, yaitu homopolisakarida, dimana hanya terdiri dari satu macam monosakarida dan heteropolisakarida. Bakteri yang mampu mensintesis homopolisakarida diantaranya adalah *Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* dan, *Pediococcus*. Sintesis homopolisakarida pada bakteri tersebut dibantu oleh enzim ekstraseluler yaitu glukansukrase atau fruktansukrase. Kedua enzim tersebut mentransfer monosakarida dari substrat spesifik sehingga terbentuk rantai polisakarida dengan cara menghidrolisis monosakarida yang selanjutnya akan melekat pada rantai akseptor glikan. Glukansukrase dikendalikan oleh gen glikosiltransferase (gtf)

sedangkan fruktansukrase dikendalikan oleh gen fruktosiltransferase (ft) seperti terlihat pada Gambar 2.1. Glukansukrase termasuk dalam enzim amilase yang berperan dalam sintesis glukukan dan fruktan sebagai penghidrolisis ikatan glikosida (Guerin dkk., 2020).

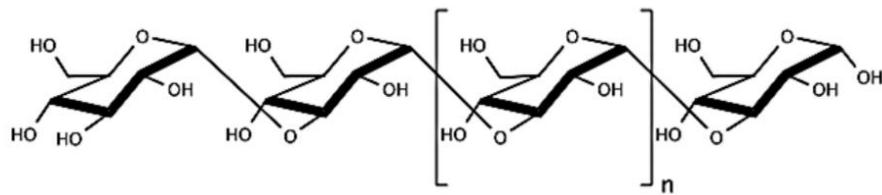


Gambar 2. 2 Jalur Biosintesis EPS secara Ekstraseluler (Guerin, *et al.*, 2020)

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

1. Mutan

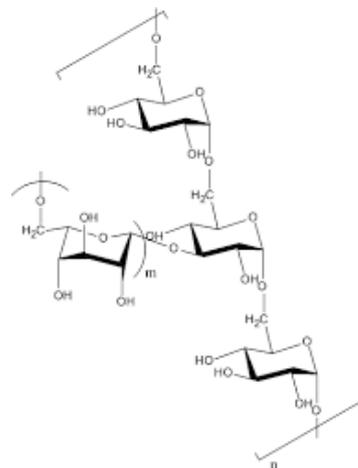
Mutan tergolong dalam kelompok α -glukan yang tidak larut dalam air dengan ikatan α -(1 \rightarrow 3) dengan percabangan pada α -(1 \rightarrow 6). Polimer mutan mampu mensintesis mutansukrase yang ditemukan pada spesies dari genus *Streptococcus*, *Lactobacillus* dan *Leuconostoc* (Kimura dan Iwata,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



Gambar 2. 3 Struktur mutan (Kimura dan Iwata, 2019)

2. Dekstran

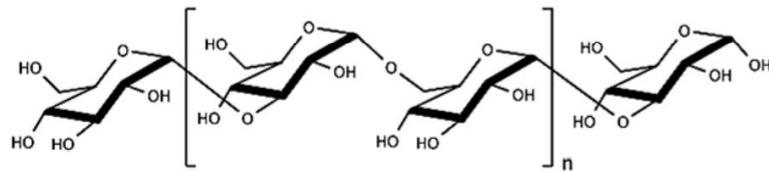
Dekstran merupakan polimer kompleks dari glukosa yang mengalami percabangan dengan membentuk ikatan α -1,6 dan α -1,3 glikosidik. Dekstran yang di biosintesis oleh bakteri asam laktat memiliki berat molekul yang besar antara kda. Dalam bidang kesehatan dekstran memiliki fungsi yang beragam seperti anti 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

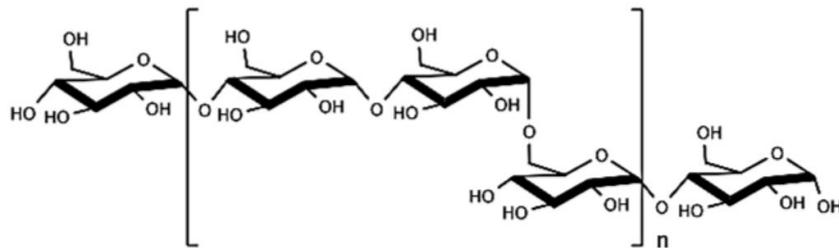
Alternan tergolong dalam kelompok α -glukan dengan ikatan α -(1 \rightarrow 6) dan α -(1 \rightarrow 3) bergantian, ditemukan dalam *L. mesenteroides* NRRL B-1355. Enzim yang mampu menghidrolisis alternan adalah isomaltodekstranase dan alternanase (Kimura dan Iwata, 2019).



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

4. Reuteran

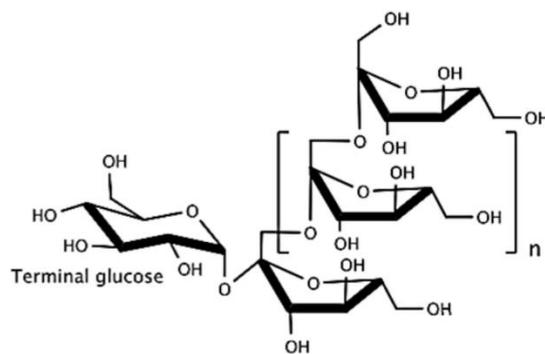
Reuteran adalah kelompok α -glukan yang mampu larut dalam air yang terdiri dari ikatan α -(1 \rightarrow 4) dihubungkan oleh satu ikatan α -(1 \rightarrow 6). Enzim yang mampu menghidrolisis reuteran adalah reuteransukrase yang ditemukan pada *Lactobacillus reuteri*. Umumnya reuteran berfungsi sebagai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



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

5. Inulin

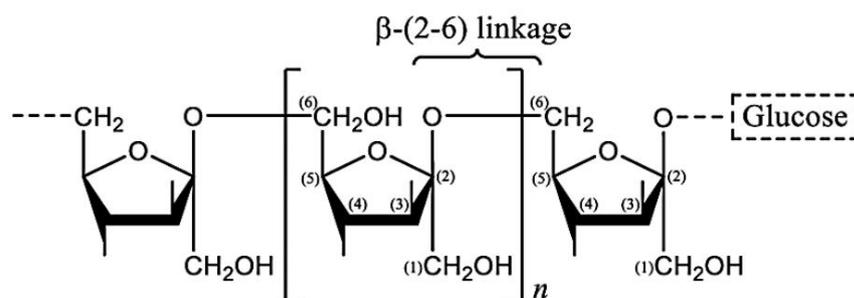
Inulin merupakan golongan fruktan yang tersusun dari residu fruktosa yang terikat pada ikatan β -(2 \rightarrow 1) dengan adanya enzim inulosukrase. Inulin memanfaatkan substrat sukrosa, enzim inulosukrase ditemukan pada bakteri asam laktat. Struktur inulin disintesis oleh fruktansukrase dari sukrosa. 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 Fermentasi dari Bakteri Asam Laktat

Fermentasi adalah proses yang dilakukan oleh mikroorganisme (misalnya bakteri) yang bertujuan mengawetkan dan mengubah tekstur. Proses fermentasi

menyebabkan perubahan pada sifat substrat, contohnya pada fermentasi sari buah akan timbul rasa dan bau alkohol, pada fermentasi ketela dan ketan akan menghasilkan bau alkohol dan rasa asam yang khas (tape), pada fermentasi susu akan menghasilkan bau dan rasa asam. Tujuan dilakukannya fermentasi ialah memperbanyak jumlah mikroorganisme dan meningkatkan aktivitas metabolisme terhadap media fermentasi (Hidayat, 2006).

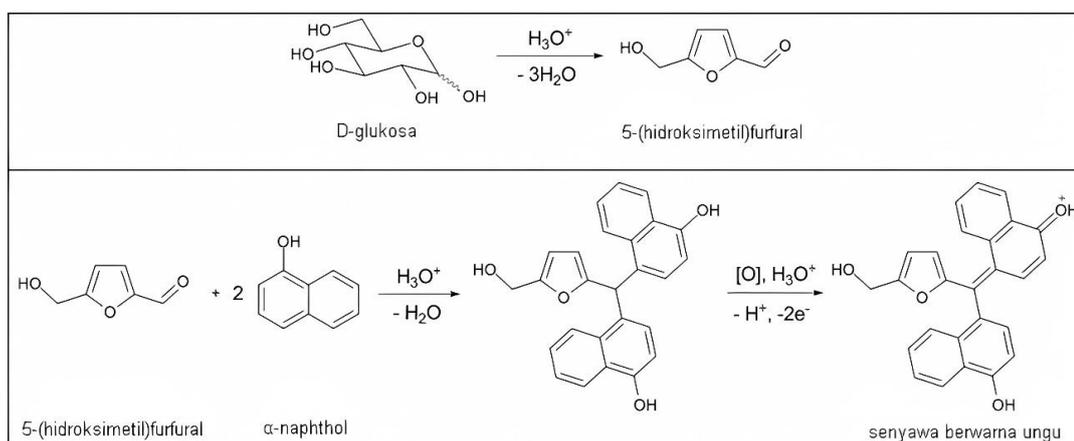
Secara fisiologis dan berdasarkan aktivitas metabolismenya fermentasi terbagi menjadi dua jenis yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. BAL homofermentatif akan mengubah gula menjadi asam laktat, sedangkan BAL heterofermentatif akan memproduksi tidak hanya asam laktat, namun juga asam asetil, etanol, dan karbondioksida. Kedua jenis bakteri tersebut dibedakan melalui uji fermentasi. Apabila BAL yang diuji menghasilkan gas yang tertampung dalam tabung durham, maka bakteri tersebut dinyatakan sebagai heterofermentatif sedangkan isolat yang tidak menghasilkan atau memproduksi gas disebut homofermentatif (Nasution, 2012).

2.7 Pengukuran Kadar Gula Total dengan Metode Sulfat Fenol

Metode fenol-asam sulfat adalah contoh metode kolorimetrik yang banyak digunakan untuk menentukan konsentrasi total karbohidrat yang ada dalam makanan. Penentuan karbohidrat dengan metode ini sering disebut uji Molisch yang bergantung pada dehidrasi sakarida terhidrolisis menjadi turunan furfural dalam reaksi dengan asam sulfat pekat. Reaksi lebih lanjut dari turunan furfural dengan bentuk fenol yang menghasilkan senyawa kompleks dapat menyerap cahaya visibel. Senyawa fenol yang lain yang biasa digunakan dalam tes molish

adalah α -naftol, timol dan resorsinol dan warna yang dihasilkan bergantung pada jenis fenol yang digunakan. (Boahen dan Isaac, 2015).

Gula merupakan karbohidrat yang mana apabila ditambahkan asam kuat dan dipanaskan akan mengalami serangkaian reaksi yang mengarah pada pembentukan derivat furan seperti furanaldehid dan hidroksimetil furaldehid. Reaksi awal yaitu reaksi dehidrasi yang diikuti dengan pembentukan turunan furan (Brummer, 2005). Prinsip dari metode ini adalah gula sederhana dan oligosakarida dapat bereaksi dengan fenol dalam asam sulfat pekat menghasilkan warna jingga kekuningan yang stabil. Dimana oligosakarida dihidrolisis menjadi monosakarida oleh asam sulfat pekat dan menghidrasinya sehingga membentuk senyawa furfural yang bereaksi dengan fenol menghasilkan warna jingga kekuningan. Penerapan metode fenol-sulfat banyak digunakan untuk menentukan karbohidrat dalam sampel secara langsung yang dinyatakan sebagai persen glukosa (Qalsum, 2015).

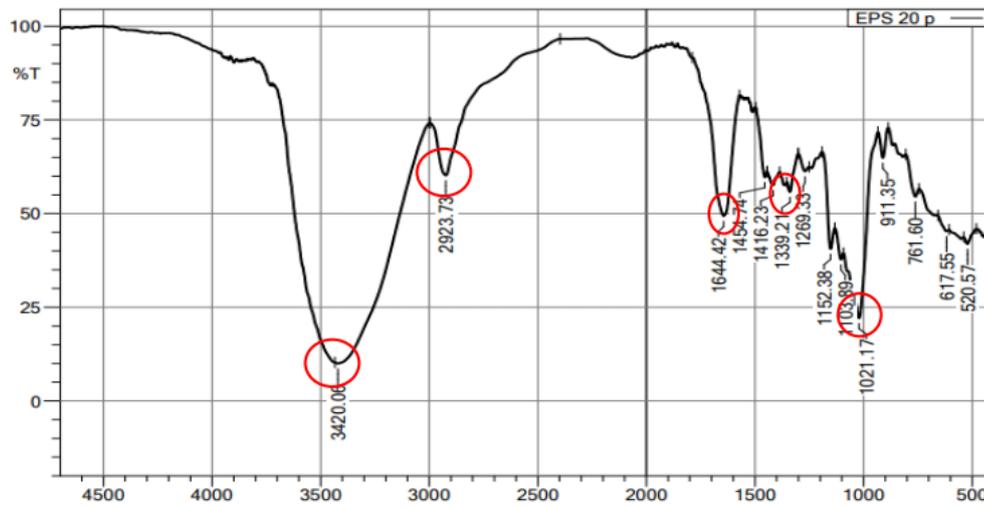


Gambar 2. 9 Reaksi penentuan kadar gula total metode sulfat-fenol (Boahen dan Isaac, 2015)

2.8 Spektroskopi Fourier Transform Infrared (FTIR)

Spektroskopi FTIR (*Fourier Transform Infrared*) adalah suatu metode analisis berdasarkan pada prinsip interaksi suatu senyawa kimia dengan radiasi elektromagnetik yang akan menghasilkan suatu getaran (vibrasi) dari suatu ikatan kimia poliatomik atau gugus fungsional senyawa kimia. Teknik ini disebut juga dengan spektroskopi vibrasional (Moros, *et al.*, 2010), Spektroskopi FTIR memiliki kemampuan yang cepat dalam menganalisis, bersifat tidak merusak dan hanya dibutuhkan preparasi sampel yang sederhana (Vlachos, *et al.*, 2006).

Spektroskopi inframerah memiliki manfaat untuk identifikasi senyawa organik karena spektrumnya yang sangat kompleks, spectrum yang kompleks dikarenakan terdiri dari banyak puncak yang menandakan adanya gugus fungsi yang ditandai dengan bilangan gelombang. Prinsip dari spektroskopi IR didasarkan pada interaksi antara tingkat energi getaran (vibrasi). Vibrasi atom yang berikatan dalam molekul dengan mengadsorpsi radiasi gelombang elektromagnetik IR (Bresnick, 2003). Adapun komponen-komponen dari FTIR adalah sumber energi, monokromator, wadah sampel, detektor dan rekorder. Pada penelitian yang telah dilakukan oleh Widodo (2019) menggunakan FTIR untuk mengidentifikasi gugus fungsi EPS yang diperoleh dari *Weissella confusa* menunjukkan adanya puncak karakteristik polisakarida seperti gugus O-H (hidroksil), C=O (karbonil), H-C-H, dan C-O-C (ester/eter) sebagaimana pada Gambar 2.10



Gambar 2. 10 Spektrum FTIR EPS dari *Weissella confusa* (Widodo, 2019)

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus-November 2023 di Laboratorium Bioteknologi, Laboratorium Biokimia, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya gelas ukur 100 mL, beaker glass 500 mL, erlenmeyer 250 mL, labu ukur 10 mL, 25 mL, dan 100 mL, pipet ukur 5 mL dan 10 mL, gelas arloji, pipet tetes, bola hisap, botol semprot, spatula, batang pengaduk, corong gelas, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung *sentrifuge*, jarum ose, pembakar spiritus, korek api, penangas air, mikropipet, blue tip, hot plate, *magnetic stirrer*, *autoclave*, *shaker*, *laminar air flow*, vortex, oven, lemari asap, lemari pendingin, pinset, spektrofotometer UV-Vis, Spektroskopi Fourier *Transform Infrared* (FTIR).

3.2.2 Bahan

Bahan- bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya air kelapa yang diperoleh dari limbah penjual kelapa di Pasar Lowokwaru Kota Malang, *de Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA), *de Man Rogosa Sharpe Broth* (MRSB), etanol PA 95%, alkohol 70% sebagai desinfektan, fenol 5%, asam sulfat (H₂SO₄) 98%, asam klorida (HCl), natrium hidroksida (NaOH), 0,5 N, KBr, akuades ,

H₂SO₄ 2N, asam-trikloroasetat (TCA), kapas, kertas label, kertas saring halus, *aluminium foil*, plastik *wrap*, plastik, karet, dan starter *Weissella confusa* K2.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) faktorial dengan dua variasi yaitu variasi pH ($P_1 = 6$, $P_2 = 7$ dan $P_3 = 8$). Variasi kedua adalah variasi konsentrasi sukrosa ($K_1 = 5\%$ dan $K_2 = 10\%$). Dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali pada setiap perlakuan. Kombinasi perlakuan pH media dan konsentrasi sukrosa secara RAK digambarkan pada Tabel 3.1

Tabel 3. 1 Kombinasi perlakuan antara pH media dan konsentrasi sukrosa (b/v)

pH media	Konsentrasi Sukrosa (b/v)	
	K ₁ = 5%	K ₂ = 10%
P ₁ = 6	P ₁ K ₁	P ₁ K ₂
P ₂ = 7	P ₂ K ₁	P ₂ K ₂
P ₃ = 8	P ₃ K ₁	P ₃ K ₂

Tahap selanjutnya adalah konfirmasi gugus fungsi pada EPS untuk mengetahui komposisi senyawa gula dan struktur dari EPS yang dihasilkan dengan melakukan analisis menggunakan instrumentasi FTIR.

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Sterilisasi alat
2. Preparasi air kelapa
3. Pembuatan media
4. Regenerasi *Weissella confuse* K2
5. Pembuatan inokulum

6. Produksi eksopolisakarida (EPS)
7. Ekstraksi eksopolisakarida dari media fermentasi air kelapa
8. Karakteristik EPS Secara Kimia
10. Analisis data

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat

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

3.5.2 Preparasi Air Kelapa

Air kelapa tua segar yang diperoleh dari pasar Dinoyo, Kota Malang dikeluarkan dari kemasan plastik dan dijadikan dalam satu wadah. Kemudian disaring menggunakan kain saring hingga terpisah dengan residu yang ada. Air kelapa tua segar yang telah disaring digunakan untuk media fermentasi produksi EPS oleh *Weissella confusa* K2.

3.5.3 Pembuatan Media

3.5.3.1 Pembuatan Media MRSA (*de Man Rogosa and Sharpe Agar*) (Fardiaz, 1992)

Media MRSA dibuat dengan ditimbang MRSA sebanyak 6,52 g, dilarutkan ke dalam aquades 100 mL, dan dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut. Kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer

250 mL kemudian disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi. Larutan tersebut didinginkan dalam tabung reaksi pada keadaan miring hingga memadat. Media MRSA ini digunakan untuk regenerasi bakteri *Weissella confusa* K2.

3.5.3.2 Pembuatan Media MRSB (*de Man Rogosa and Sharpe Broth*) (Fardiaz, 1992)

Media MRSB dibuat dengan menimbang MRSB 5,52 g kemudian dilarutkan dengan akuades 100 mL hingga homogen dan dipanaskan hingga mendidih dengan diaduk hingga larut. Kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL dan disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 30 menit. Media MRSB ini digunakan untuk pembuatan inokulum.

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

Weissella confusa K2 yang sudah menjadi biakan diambil sebanyak 2 (dua) ose dan diinokulasikan ke media MRSA miring. Diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. *Weissella confusa* K2 yang telah mengalami regenerasi digunakan untuk pembuatan inokulum stok.

3.5.5 Pembuatan Inokulum (Kultsum, 2009)

Pembuatan inokulum ini dilakukan dengan memindahkan 2 (dua) ose biakan *Weissella confusa* K2 ke dalam 25 mL media MRSB, kemudian di shaker pada kecepatan 100 rpm selama 18 jam pada suhu 30°C dengan nilai OD (*Optical Density*) 0,5.

3.5.6 Produksi Eksopolisakarida

3.5.6.1 Pengaruh pH Media dan Konsentrasi sukrosa terhadap Produksi EPS

(Trabelsi,*et al.*, termodifikasi, 2014 dan Seesuriyachan, *et al.*, 2011)

Air kelapa segar yang telah disaring ditambahkan *yeast extract* dan *peptone* sebanyak masing-masing 1,25 g (b/v). Kemudian diaduk ditandabatkan hingga 500 mL. Dibuat media dengan langkah yang sama sebanyak dua kali. Kemudian media produksi EPS masing-masing diukur pH media awal dengan menggunakan pH meter. Selanjutnya, diatur pH 6, 7 dan 8 dengan menggunakan HCl 2 N atau NaOH 2 N. Media air kelapa yang telah diatur pH 6, 7 dan 8 disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi. Media air kelapa yang telah disterilisasi diendapkan selama satu malam untuk memisahkan endapan yang terbentuk. Media yang telah diendapkan, diambil filtratnya dan ditambahkan sukrosa yang telah disterilkan pada botol terpisah dengan masing-masing variasi konsentrasi 5% dan 10% (b/v). Ditandabatkan media yang telah ditambahkan sukrosa hingga 100 mL. Kemudian, ditambahkan inokulum *Weissella confusa* K2 sebanyak 5% (v/v) dan *dishaker* dengan kecepatan 100 rpm dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam.

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

Media air kelapa hasil fermentasi diambil sebanyak 50 mL dan ditambahkan asam-trikloroasetat dengan konsentrasi akhir 10% (2 g) kemudian *dishaker* selama 30 menit pada 100 rpm. Kemudian disentrifugasi pada 4°C kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang mengandung EPS diambil sebanyak 30 mL lalu

ditambahkan 60 mL etanol dingin 95% dan dibiarkan pada suhu 4°C selama 24 jam. Selanjutnya endapan EPS yang didapat dipisahkan dengan filtrat dan dikeringkan pada suhu 60 °C selama 5 jam. Kadar eksopolisakarida kering ditentukan dengan menggunakan rumus :

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

3.5.8 Uji Kadar Total Gula dengan Metode Fenol H₂SO₄

3.5.8.1 Pembuatan Kurva Standar dengan Metode Fenol H₂SO₄ (Dubois,*et al.*, 1956, Maunatin, dkk., 2020)

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

$$y = ax + b \dots\dots\dots(3.2)$$

3.5.8.2 Penetapan Kadar Total Gula dengan Metode Fenol H₂SO₄ (Dubois, *et al.*, 1956, Maunatin, dkk., 2020)

Sampel EPS sebanyak 0,01 g dilarutkan ke dalam aquades sebanyak 250 mL dan dihomogenkan, larutan homogen diambil sebanyak 2 mL dimasukkan ke

dalam tabung reaksi, ditambahkan larutan fenol 5% (b/v) 1 mL dan dikocok. Selanjutnya ditambahkan asam sulfat pekat sebanyak 5 mL dengan cepat di lemari asap. Dibiarkan selama 10 menit, dikocok lalu ditempatkan dalam penangas air selama 15 menit dengan suhu 100°C. Sehingga, larutan akan berwarna jingga kekuningan dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm. Pada panjang gelombang 490 nm warna yang diserap adalah warna biru kehijauan dan warna komplementer yang terlihat adalah warna jingga.

$$\text{Kadar Gula (\%)} = \frac{\text{konsentrasi kurva}}{\text{konsentrasi analisa}} \times 100 \dots \dots \dots (3.3)$$

3.5.9 Analisis Kadar Protein Eksopolisakarida

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

Pembuatan larutan baku standar dilakukan dengan menimbang 30 mg BSA dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dalam 10 mL. Larutan standar dibuat dengan seri konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100 ppm, kemudian diambil 1 mL larutan pada masing-masing konsentrasi dan ditambahkan reagen Lowry sebanyak 50 mL. Selanjutnya divortex dan dibiarkan selama 10 menit. Selanjutnya, ditambahkan reagen folin 1N sebanyak 0,5 mL dan diinkubasi dalam ruang gelap selama 20 menit. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 660 nm.

3.5.9.2 Penentuan Kadar Protein Eksopolisakarida (Adesulu, *et al.*, 2018)

Sampel EPS ditimbang sebanyak 20 mg, kemudian dilarutkan dan ditandabatkan dengan labu ukur 5 mL dengan akuades. Kemudian diambil 1 mL larutan sampel dan ditambahkan 5 mL reagen Lowry, divortex dan dibiarkan

selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan reagen folin 1N sebanyak 0,5 mL dan diinkubasi dalam ruang gelap selama 20 menit. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 660 nm.

3.5.10 Identifikasi Gugus Fungsi Eksopolisakarida menggunakan Fourier Transform Infrared Spektrofotometer (FTIR) (Zhou, *et al.*, 2016)

KBr sebanyak 250 mg ditumbuk kemudian ditekan dalam cetakan hingga diperoleh pelet KBr. EPS kering sebanyak 0,01 g ditekan dengan penekan hidrolik dan dianalisis menggunakan FTIR dengan rentang frekuensi $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Data yang diperoleh melalui uji FTIR adalah data kualitatif. Data kualitatif yang berupa informasi keberadaan gugus fungsional atau jenis ikatan tertentu pada bilangan gelombang tertentu yang diidentifikasi berdasarkan inframerah yang dihasilkan.

3.5.10 Analisis Data

Data yang diperoleh adalah rendemen kasar eksopolisakarida, kadar total gula, kadar protein dan spektra FTIR. Kadar gula total dan kadar protein dibuat grafik kurva standar dan dianalisis menggunakan *excel*. Rendemen kasar EPS kemudian dianalisis dengan ragam varian (*Two Way ANOVA*). Apabila terdapat adanya pengaruh, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan signifikansi 5%.

DAFTAR PUSTAKA

- 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.
- Anindita. 2002. Pembuatan Yakult Kacang Hijau. Kajian Tingkat Pengenceran dan Konsentrasi Sukrosa. *Skripsi*. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya.
- Anton, N dan Zubaidah E. 2015. Isolasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida dari Kimchi. *Jurnal Universitas Brawijaya Malang*. Volume 3, Nomor 2 : 743-748
- Anwar, M. Z. 2018. Pembuatan Minuman Probiotik Air Kelapa Muda (*Cocos Nucifera* L) Dengan Starter *Lactobacillus Casei Subsp. Casei* R-68, *JOM Faperta*, Volume 5, Nomor 1
- Ates O. 2015. Systems Biology of Microbial Exopolysaccharides Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Volume 3, Nomor 12 :1-16
- Atlas, R. M. 2004. *Handbook of Microbiological Media Third Edition* Volume I, United States Of America : CRC Press
- Björkroth KJ., Schillinger U., Geisen R., Weiss N., Hoste B., Holzapfel WH., Korkeala HJ., Vandamme P. 2002. Taxonomic Study of *Weissella confusa* and Description of *Weissella Cibaria* Sp. Nov., Detected in Food and Clinical Samples. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* Volume 52 :141-148.
- Boahen, Y. O., & Isaac, A. 2015. Colorimetric Determination Of Carbohydrates In Some Brands Of Beer In Ghana As An Indication Of Their Glycemic Index In The Management Of Diabetes Type II. *African Journal of Food Science and Technology*, Volume 6, Nomor 7
- Bresnick. 2003. *Intisari Biologi*. Hipokrates: Jakarta.
- Brummer, Y. and Cui, W.S. 2005. *Food carbohydrates for chemistry, physical properties, and application*, E-book : 432-439. France : Taylor and francies group, LLC
- Buckle, K.A dan Edwards, G.H. 1987. *Exopolysaccharide production from micro substrate and identified the molecule*. Volume 1, Nomor 5 : 7-9.

- Budi, M. A. S. 2018. Pengaruh Penggunaan Jenis dan Konsentrasi ZPT Sintetik pada Pertumbuhan Awal Bibit Kelengkeng (*Dimocarpus longan* Lour.) Kultivar Leci Tumpang. *Jurnal Primordia*. Volume 14, Nomor 1
- Cahyani, B. D. dan H. Rizqiati. 2019. Perubahan Sifat Fisikokimia dan Mutu Hedonik Kefir Air Kelapa Hijau (*Cocos nucifera* L.) dengan Penambahan High Fructose Syrup (HFS), *Jurnal Teknologi Pangan*, Volume 3, Nomor 1
- Daeschel, M. A. 1989. Antimicrobial substance from lactic acid bacteria for use as food preservation. *Journal Food Technol.* Volume 4, Nomor 3 : 148-155
- Desai dan Ankur. 2008. *Strain Identification, Viability and Probiotics Properties of Lactobacillus casei*. School of Biomedical and Health Science Victoria University. Werribee Campus Victoria Australia.
- Desniar., D. Poernomo, dan W. Wijatur. 2009. Pengaruh Konsentrasi Garam pada Peda ikan Kembung (*Rastrelliger* sp.) dengan Fermentasi Spontan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. Volume 7 Nomor 1.
- 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
- Ernawati, Y. 2010. Uji Kandungan Karbohidrat pada Pembuatan Kecap dengan Penambahan Air Kelapa pada Berbagai Konsentrasi. *Skripsi*. Jakarta : Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Ertesvag, H dan Valla, S. 1998. Biosynthesis and applications of alginates. *Polym. Degrad. Stab.* Volume 5, Nomor 9 : 85-91
- Fardiaz, S. (1992). *Mikrobiologi Pangan I*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan*. E-Book Jakarta: PT. Gedia Pustaka Utama
- Farida, E. Yanesti N.A.L, Mursid T. S., Latifah R. 2022. *Potensi Eksopolisakarida Bakteri Asam Laktat Untuk Mencegah dan Mengendalikan Diabetes Mellitus Tipe 2*. Bookchapter Kesehatan Masyarakat Universitas Negeri Semarang,
- Fatih, M. T. 2020. Produksi eksopolisakarida oleh bakteri asam laktat asal susu kacang tanah terfermentasi (Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim).
- Fatih, M. T. 2020. Produksi Eksopolisakarida Oleh Bakteri Asam Laktat Asal Susu Kacang Tanah Terfermentasi. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

- Gimwood, B.E. 1975. *Coconut Palm Products*. FAO. Rome.
- 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
- Gummadi, S.N dan Kumar, K. 2005. Production of extracellular water insoluble B-1,3-glucan (curdlan) from *Bacillus sp.* SN07. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* Volume 10 : 546-551
- Guo, Y., Wentian L., Haiming C., Weijun C., Ming Z., Qiupin Z., and Wenxue C. 2022. Optimazion and Rheological Study Of an Exopolysaccharide Obtained from Fermented Mature Coconut Water with *Lipomyces starkeyi*. *J. Foods*. Volume 11 : 999.
- Halim, C. N., dan Zubaidah, E., 2013, Studi Kemampuan Probiotik Isolat Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Tinggi Asal Sawi Asin (*Brassica juncea*), *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, Volume 1, No 1 : 129-137
- 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.
- Hepkan, Z. D., Bolluk, M., & Bülbül, S. 2020. Structural Analysis and Properties of Dextran Produced by *Weissella Confusa* and The Effect Of Different Cereals on its Rheological Characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 143 : 305-313.
- Hidayat, N. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Penerbit : Andi. Yogyakarta.
- Huang, G., Wang, B., Lin, W., Huang, S., Lee, C., Yen, M., Huang, M. (2012). *Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Longan (Dimocarpus longan Lour.) Pericarp*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
- 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*.
- Jin, Y., H. Zhang, Y., Yin, K dan Nishinari. 2006. Conformation of curdlan as observed by tapping mode atomic force microscopy. *Colloid Polym. Sci.* Volume 284 : 1371-1377.
- Kavitake., Devi, P.B., Singh, S.P., & Shetty, P.H., 2016. Characterization of a Novel Galactan Produced by *Weissella Confusa* KR780676 from an Acidic

Fermented Food. *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 86 : 681-9.

Kementrian Agama RI., Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur-an, dan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. 2015. *Jasad Renik : Dalam Prespektif Al-Qur'an dan Sains*. Jakarta.

Kementrian Agama RI., Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur-an, dan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. 2013. *Makanan dan Minuman : Dalam Prespektif Al-Quran dan Sains*. Jakarta

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.

Kholifah, Siti. 2010. Pengaruh Penambahan ZA dan Gula Terhadap Karakteristim Fisik, Organoleptik dan Kandungan Logam nata de coco, *Skripsi*, Bogor: IPB

Kimmel, S. A., Roberts, R. F dan Ziegler, G. R. 1998. Optimation of Exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* RR gown in a semidefined medium. *Applied and Environmental Microbiology*. Volume 64 : 659-664.

Knob, A & Carmona, E.C. 2008. Xylanase production by *Penicillium sclerotiorum* and its characterization. *World Applied Sciences Journal* Volume 4, Nomor 2 : 277-283.

Kultsum, U. 2009. Pengaruh variasi nira tebu dar beberapa varietas penambahan sumber N dari tepung kedelai hitam sebagai substrat terhadap efisiensi fermentasi etanol. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Saintek UIN Malang, 43-47.

Kumar, M., Anandapandian, K.T.K., dan Parthiban. 2011. Production and Characterization of Exopolysaccharides (EPS) from Biofilm Forming Marine Bacterium. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Volume 54, Nomor 2 : 259-265.

Kuntiya, A., Prasert, H., Charin, T., Ken, S. dan Phisit, S. 2010. Influence of pH, sucrose concentration and agitation speed on exopolysaccharide production by *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 using coconut water as a raw material substitute. *Maejo international Journal of Science and Technology*. Volume 4 Nomor 2 : 318-330.

Kusmiati, F.R, S Siregar, S Nuswantara, A Malik. 2006. Produksi Beta-1,3 Glukan Dari Agobacterium dan Aktivitas Penyembuhan Luka Terbuka Pada Tikus Putih. *Makara Sains*. Volume 10, Nomor 1

- Lapasin, R. S. Pricel. 1999. *Rheology of industrial polysaccharides: Theory and applications*. Aspen Publisher: New Yorll. USA.1-118.
- Lin, T.Y. M. F dan Chien, C. 2007. Exopolysaccharide Production as Affected by Lactic Acid Bacteria and Fermentation Time. *Food Chemistry*.
- Lule, V., Singh, R., Behare, P., Tomar, S.K. 2015. Comparison of Exopolysaccharide Production by Indigenous *Leuconostoc mesenteroides* Strains in Whey Medium. *Asian Journal Dairy Food Research*, Volume 34 : 8-12.
- Mashudi, Kojin. 2020. *Telaah Tafsir Al-Muyassar Jilid I*. Penerbit: PT. Cita Intrans Selaras. Malang.
- Maunatin, Anik., Harijono., Zubaidah, E., 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 : 357-444
- Micheli, L., D. Uccelletti., Palleschi dan Crescenzi. 1999. Isolation amd characterization of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. *J.Appl. Environ. Microniol*, Volume 53 : 69-74
- Moros, J., Garrigues, S., and Guardia, M. 2010. Vibrational Spectroscopy. Provides a Geen Tool for Multicomponent Analysis. *Trends in. Analytical Chemistry* Volume 29, Nomor 7
- Mundiri, N. A., Megantara, I., & Anggaeni, T. T. K. 2020. Kajian Pustaka: Pemanfaatan Eksopolisakarida Bakteri Asam Laktat Probiotik Asal Produk Pangan Fermentasi sebagai Imunomodulator. *Indonesia Medicus Veterinus*, Volume 9, Nomor 5 : 849–859.
- Nasution, F.,S. 2012. Identifikasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Pada. Kotoran Ayam boiler Sebagai Agensi Probiotik. *Skripsi*. Universitas Negeri Medan.
- Nudyanto, A dan Zubaidah, E. 2015. Isolasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida dari Kimchi. *Jurnal Pangan dan Agoindustri*. Jurusan teknologi hasil pertanian, FTP Universitas Brawijaya Malang. Volume 3 Nomor 2 : 743-748.
- Olano, A., Chua, J., Schroeder, S., Minari, A., La Salvia, M., Hall, G., 2001. *Weissella confusa* (Basonym: *Lactobacillus confusus*) Bacteremia: A Case Report. *J. Clin. Microbiol*. Volume 39, Nomor 4 :1604–1607.
- Onifade, A.K. Jeff-Agboola, Y.A. 2003. Effect of fungal infectionon proximate nutrient composition of coconut (*Cocos nucifera* Linn) fruit. *Food, Agiculture and Environment*.

- Patel,S.,Majumder,A., dan Goyal, A. 2012. Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Indian J Microbiol.* Volume 52, Nomor 1: 3–12.
- Permana S B. 2010. Efektifitas Konsentrasi dan Frekuensi Pemberian Teh Kompos Limbah Kulit Kopi dan Air Kelapa dalam Meningkatkan Keberhasilan Bunga Kakao Menjadi Buah. *Skripsi.* Jember : Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- Petrovici, A. R., Roşca, I., Dodi, G., Nicolescu, A., Avădanei, M., Varganici, C. D., & Ciolacu, D. 2017. Effects of Culture Medium Composition on Biosynthesis of Exopolysaccharides. *Cellulose Chem. Technol.*, Volume 51 , Nomor 9- 10: 821-830.
- Pranayanti, I.A.P dan Aji S. 2015. Pembuatan Minuman Probiotik Air Kelapa Muda (*Cocos nucifera L.*) dengan Starter *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* Volume 3, Nomor 2
- Prasetyo. 2002. *Air Kelapa Muda sebagai Minuman Isotonik Alami.*
- Prastika, H. H., Ratnayanti, K., Puspawati, N. M., & Mayun, A. A. I. A. 2019. Penggunaan Enzim Pepsin Untuk Produksi Hidrolisat Protein Kacang Gude (*Cajanus cajan (L.) Millsp.*) yang Aktif Antioksidan. *Indonesian E-Journal of Applied Chemistry.* Volume 7, Nomor 2 : 180-188.
- Puspitasari, I. Yoyok B. P., Masykuri, A.N.A., 2014. Pengaruh Tingkat Penambahan Ekstrak Buah Kelengkeng terhadap pH, Viskositas, Citarasa, dan Kesukaan Yoghurt Kelengkeng. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan.* Volume 3, Nomor 4
- Putri, T. 2019. *Keampuhan Air dan Minyak Kelapa Bagi Kesehatan.* Yogyakarta: Laksana
- Qalsum, U. Anang W.M.D, Supriadi. 2015. Analisis Kadar Karbohidrat, Lemak dan Protein dari Tepung Biji Mangga (*Mangifera Indica L*) Jenis Gadung. *Jurnal Akademika Kimia.* Volume 4, Nomor 4 : 168-174
- Rachmawati, R.N. 2011. Kajian Rasio C/N terhadap Produksi Bioinsektisida dari *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawai menggunakan Substrat Limbah Cair Tahu dan Air Kelapa. *Skripsi.* IPB. Bogor
- Rajoka,M.S.R., Hafiza. M., Huiyan F., Arshad,A.P.,Xierong Z. Mohsin K., Zhen dan He dan Liqing Z. 2019. Characterization and anti-tumor activity of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefir* isolated from Chinese kefir gains. *Journal of Functional Foods.* Volume 63.
- Ramesh C, Ray DM. 2015. *Food Biology Series.* 108–109. CRC Press, Boca Raton, Florida

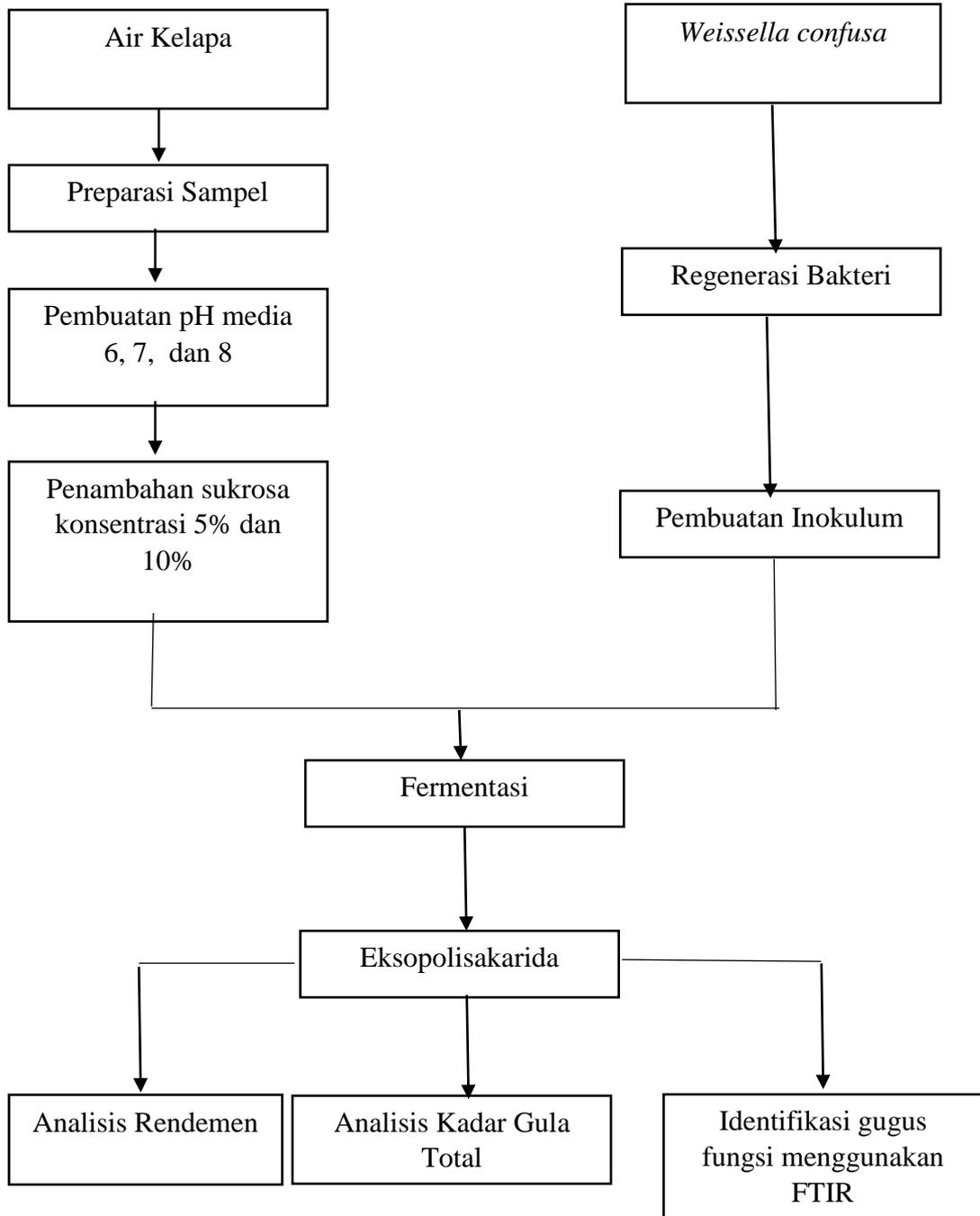
- Raymond, R. 2009. *Adipic Acid. Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 11-12
- Rehm, B. 2009. Microbial exopolysaccharides: Variety and potential application. In *Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives*. Caister Academic: Norfolk, UK. 254.
- Respati NY, Yulianti E, Rakhmawati A. 2017. Optimasi suhu dan pH media pertumbuhan bakteri pelarut fosfat dari isolat bakteri termofilik. *Jurnal Prodi Biologi*. Volume 6 Nomor 7: 423-430
- 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
- Setya, R. A., dan S. R. Putra. 2011. Identifikasi Biohidrogen secara Fermentatis dengan Kultur Campuran menggunakan Glukosa sebagai Substrat. *Prosiding Skripsi*. Surabaya : Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Shukla, S., Arun G. 2011. 16S rRNA-Based Identification of a GlicanHyperproducing *Weissella confusa*. *Research Article*.
- 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.
- Sunjaya, I. N., Aryantini, N. P. D., Nursini, N. W., Cakrawati, C. I. D., Juliasari, N. L. M. E., Dwipayantil, N. M. U., Ramona, Yan. 2012. Eksopolisakarida dari *Lactobacillus sp.* Isolat Susu Kuda Sumbawa dan Potensinya sebagai Prebiotik. *Jurnal Veteriner*. Volume 13, Nomor 2 : 136-144
- Surono, I. 2004. *Probiotik, Susu Fermentasi dan Kesehatan*. PT. Tri Cipta Karya, Jakarta.
- Sutherland. I. W. 2001. Microbial polysaccharides from G-negative bacteria. *International Dairy Journal*. Volume 11 : 663-674
- Syahrurahman, A., 1994, *Mikrobiologi Kedokteran*, Edisi Revisi, Penerbit Bina Rupa Aksara, Jakarta.

- Tallon, R., P. Bressollier dan M.C. Urdaci. 2003. Isolation and Characterization of Two Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*. Volume 154 : 705-712.
- Tamime, A.Y. dan R.K. Robinson. 2000. *Yogurt Science and Technology*. 3 rd ed. Woodhead Publishing, Cambridge
- Tayo BA, Ishola R, Oyewunmi T. 2018. Characterization, antioxidant and immunomodulatory potential on exopolysaccharide produced by wild type and mutant *Weissella confusa* strains. *Biotechnology Reports* Volume 19: 1–8.
- Tayuan, C. 2011. Growth and exopolysaccharide production by *Weissella* sp. from low-cost substitutes for sucrose. *African Journal of Microbiology Research*, Volume 5, Nomer 22 : 3693–3701.
- Trabelsi, I., Ben S., 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 7, Nomer 4 : 541-546.
- Tseng, H., Wu, W., Huang, H., Wu, M. 2014. Antimicrobial Activities of Various Fractions of Longan (*Dimocarpus longan* Lour. Fen Ke) Seed Extract. *International Journal of Food Science and Nutrition*, Volume 65, Nomor 5 : 589-593.
- Tulini, F. L., Nolwenn H., Thomas H., Gwenaelle L.B., Elaine C.P.D.M. 2015. Screening for Antimicrobial and Proteolytic Activities of Lactic Acid Bacteria Isolated From Cow, Buffalo and Goat Milk and Cheeses Marketed in the Southeast Region Of Brazil. *Journal of Dairy Research*. Volume 83 : 155-124
- Untari, I. 2010. Air Kelapa Muda Sebagai Obat Tradisional. *Journal Stikes pku*.
- Vasanthakumari, R., 2007, *Textbook of Microbiology*, BI Publication Pvt. Ltd., New Delhi.
- Veronese, F.M., P. Caliceti. In: Meibohm (Editor). 2006. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Biotech Drugs: Principle and Case Studies in Drug Development*. Wiley CH. Weinham. 272-273
- Vlachos, N., Skopetilis, Y., Psaroudaki M., Konstantinidou V., Chatzilazarou A., Tegou E. 2006. Applications of Fourier Transform Infrared Spectroscopy. To Edible Orls.. *Analytica Chemica* Vol573:459-465
- Vu, M.H. 2009. *The chemistry of rancidity in foods in J.C. Allen and R. J. Hamilton, editor. Rancidity in Foods*. London: Applied Science Publisher

- Warisno. 2004. *Mudah dan praktis membuat nata de coco*. Jakarta: Media Pustaka.
- Wibowo dan D. Ristanto. 1988. *Petunjuk Khusus Deteksi Mikroba*. Yogyakarta: Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada. hal. 163-179.
- Widayati, E., Sutarno dan Setyaningsih, R. 2002. Seleksi Isolat Bakteri untuk fermentasi Asam Laktat dari Air Kelapa Varietas Rubescent (*Cocos nucifera L.ver rubescent*). *Jurnal Biologi*. Volume 4, Nomor 4
- Widiastika, W. 2011. Perbanyak Tanaman Kelengkeng (*Dimocarpus longan*) dengan Teknik Ovulasi. *Skripsi*. Universitas Sebelas Maret. Semarang
- Widodo, H. A. 2019. Pengaruh Penambahan Sukrosa pada Air Kelapa terhadap Produksi Eksopolisakarida oleh *Weissella confusa*. *Skripsi*. Jurusan Kimia. Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Widyastuti, Y., Sofarianawati E. 1999. Karakter Bakteri Asam laktat *Enterococcus* sp. yang diisolasi dari Saluran Pencernaan Ternak. *Jurnal mikrobiologi Indonesia*. Volume 4, Nomor 2: 50-53
- Wongsuphachat, W., Aran H. K dan Suppasil M. 2010. Optimization of exopolysaccharides production by *Weissella confusa* NH 02 isolated from Thai fermented sausages. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 32, Nomor 1 : 27- 35.
- Zubaidah, E., Yusnita, L., dan Ella, S. 2008. Produksi Eksopolisakarida oleh *Lactobacillus plantarum* B2 pada Produk Probiotik Berbasis Buah Murbei. *Jurnal Teknologi Pertanian*. Volume 9, Nomor 1: 59-68.

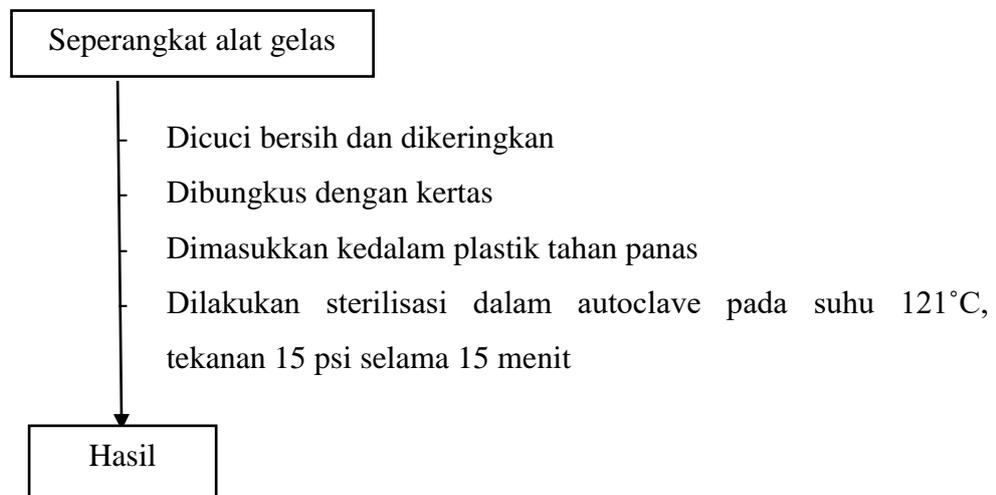
LAMPIRAN

Lampiran 1 : Rancangan Penelitian

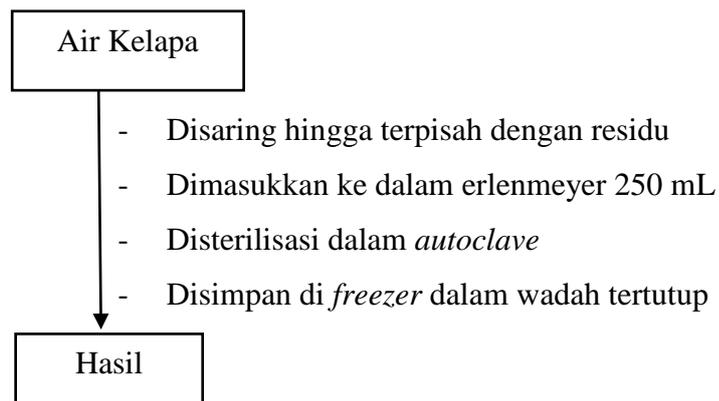


Lampiran 2: Skema Kerja

L.2.1 Sterilisasi Alat

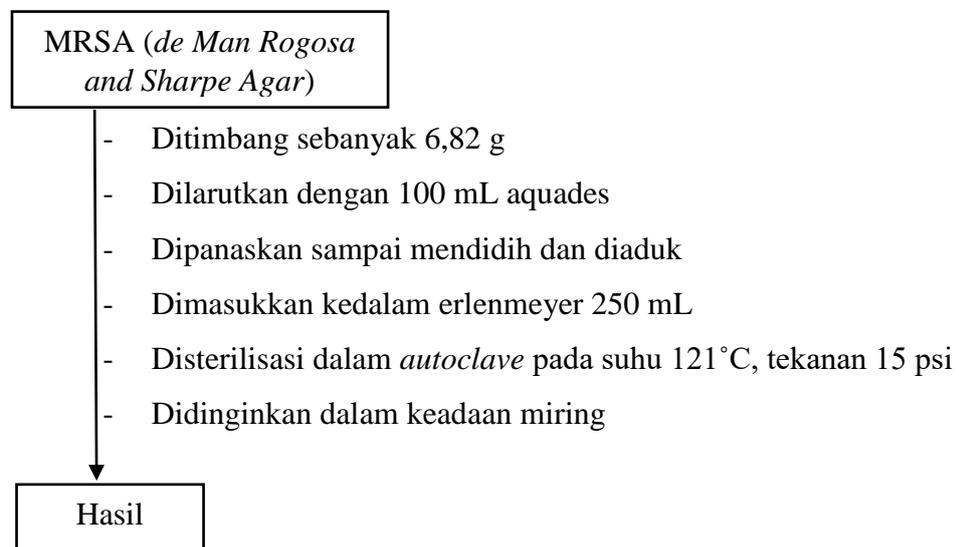


L.2.2 Preparasi Air Kelapa

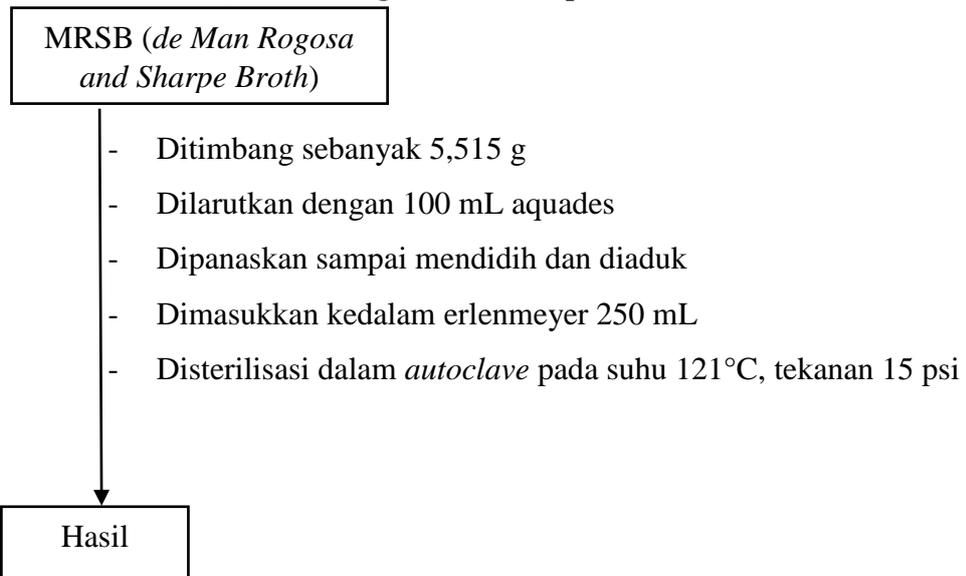


L.2.3 Pembuatan Media

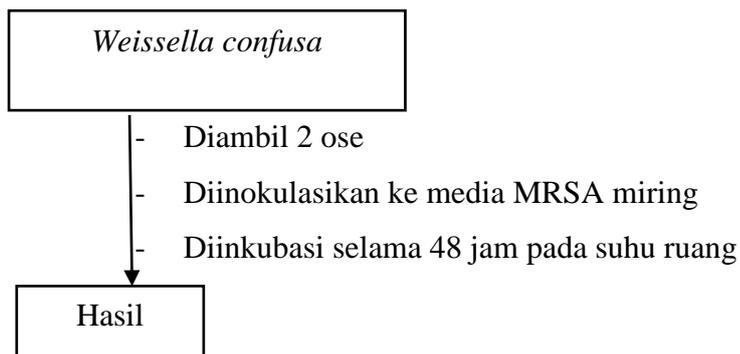
L.2.3.1 Media MRSA (*de Man Rogosa and Sharpe Agar*)



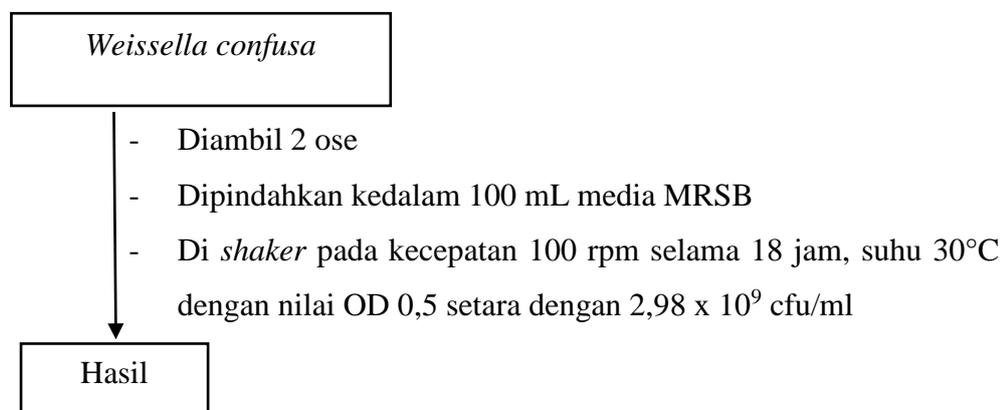
L.2.3.1 Media MRSB (*de Man Rogosa and Sharpe Broth*)



L.2.4 Regenerasi *Weissella confusa*

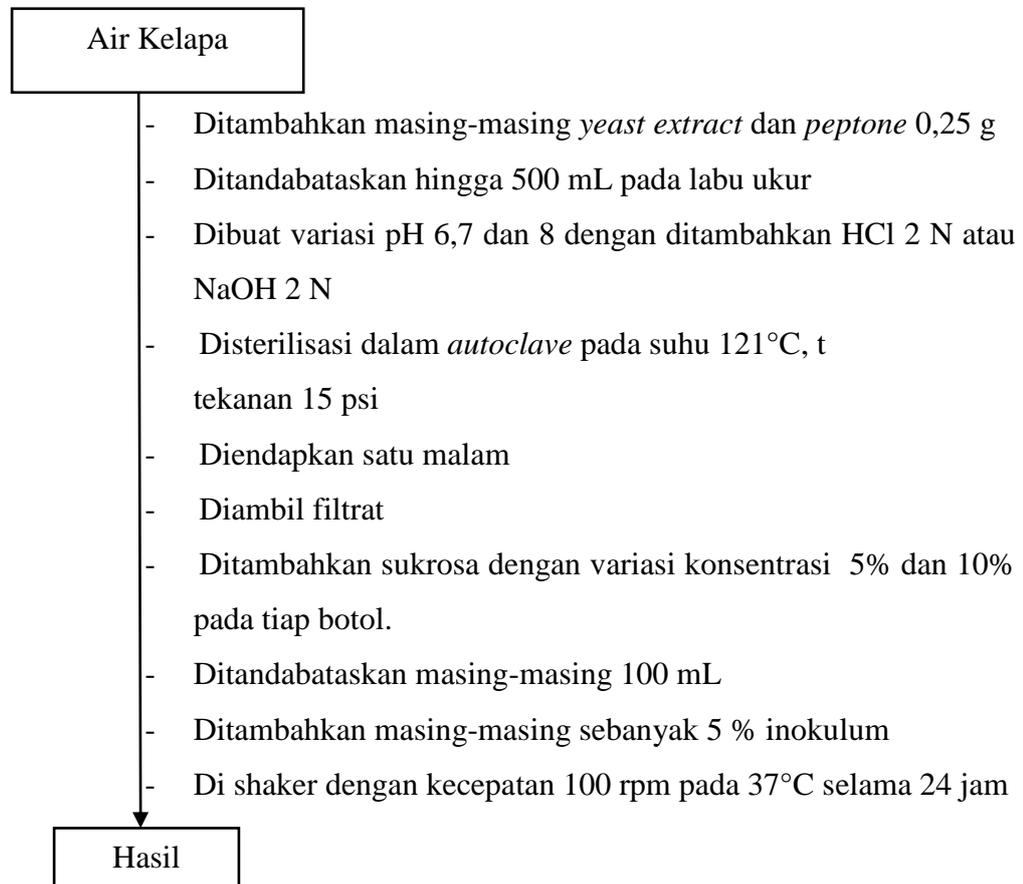


L.2.5 Pembuatan Inokulum

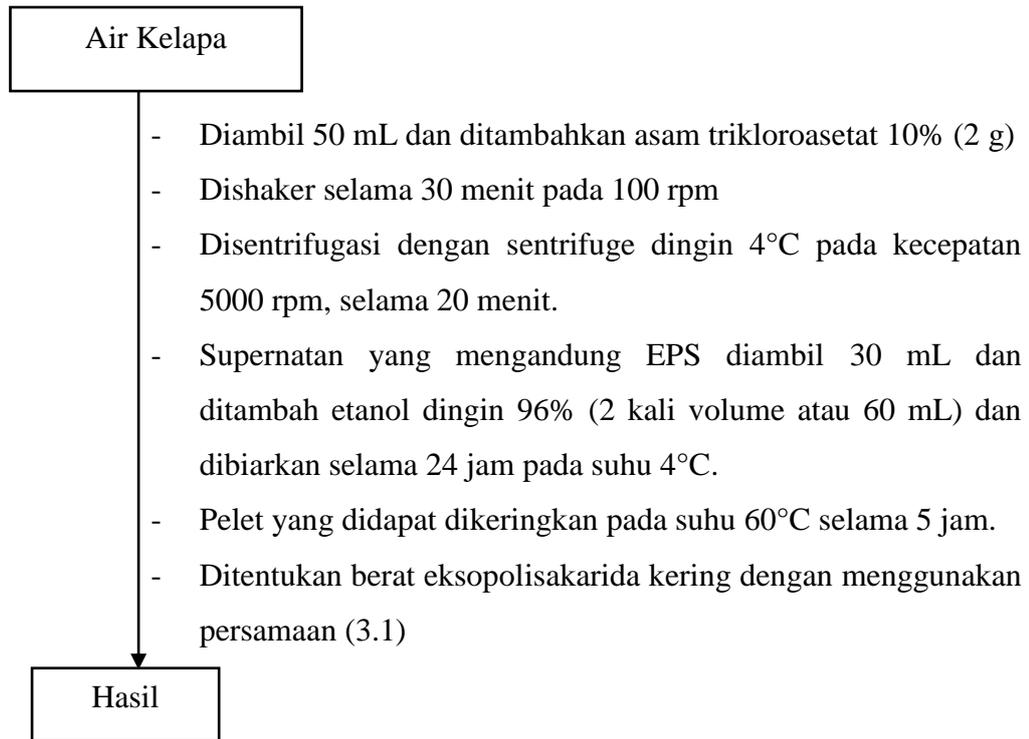


L.2.6 Produksi Eksopolisakarida

L.2.6.1 Pengaruh pH media dan Konsentrasi Sukrosa terhadap Produksi Eksopolisakarida dari Air Kelapa

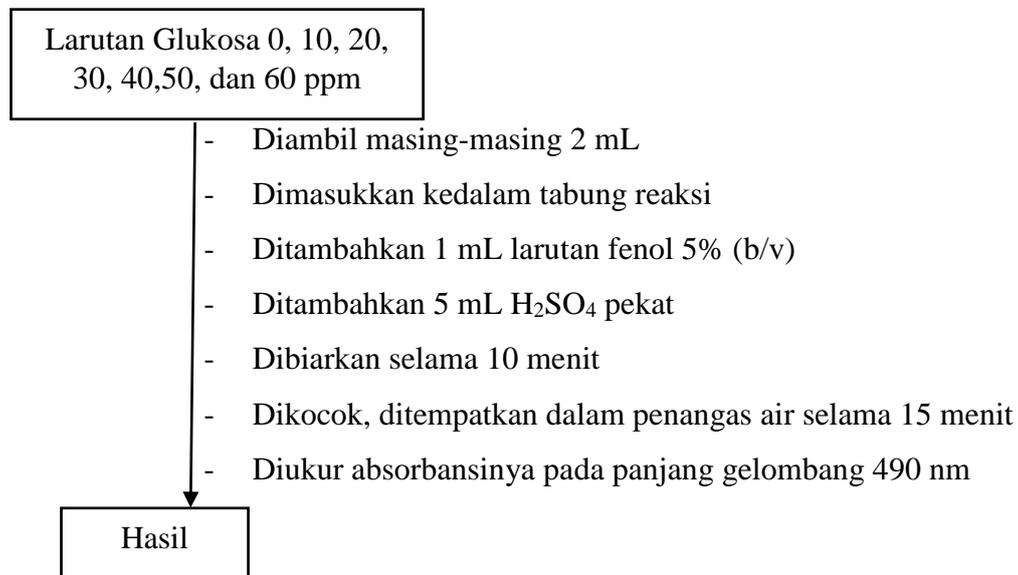


L.2.6.2 Ekstraksi Eksopolisakarida dari Media Fermentasi Air Kelapa

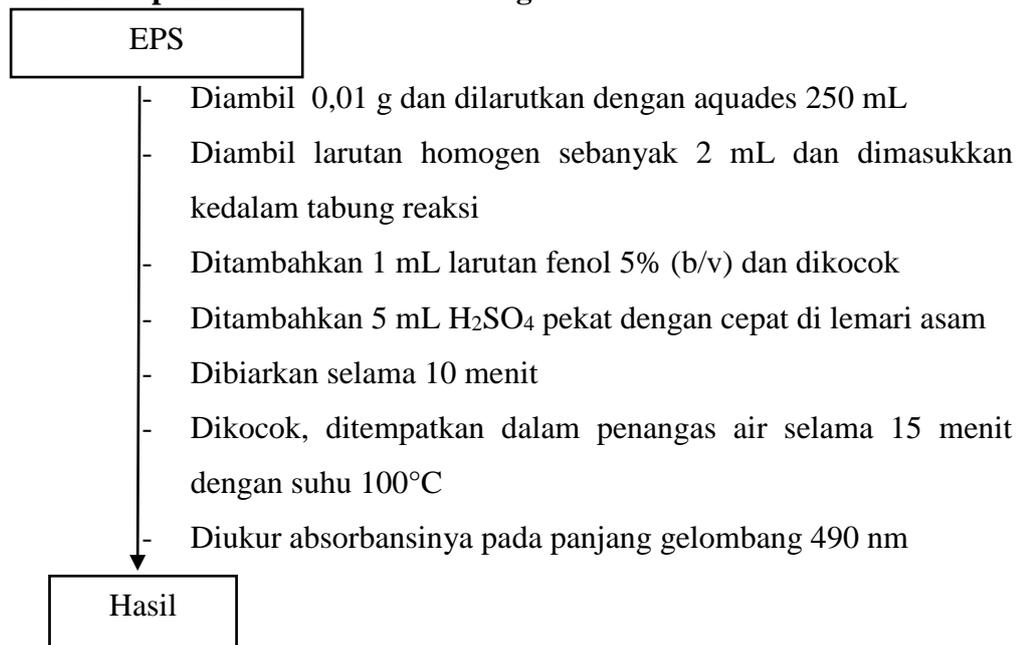


L.2.7. Uji Kadar Total Gula dengan Metode Fenol H₂SO₄

L.2.7.1 Pembuatan Kurva Standar dengan Metode Fenol H₂SO₄

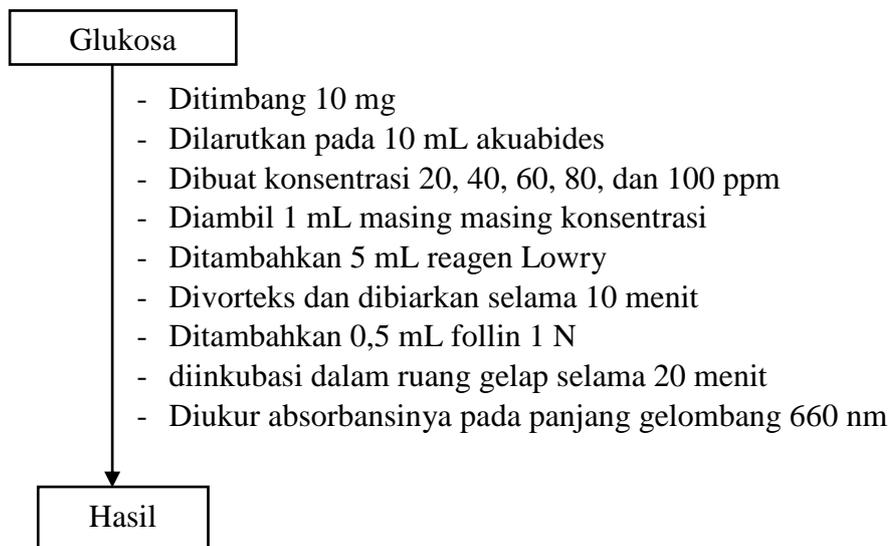


L.2.7.2 Penetapan Kadar Total Gula dengan Metode Fenol H₂SO₄

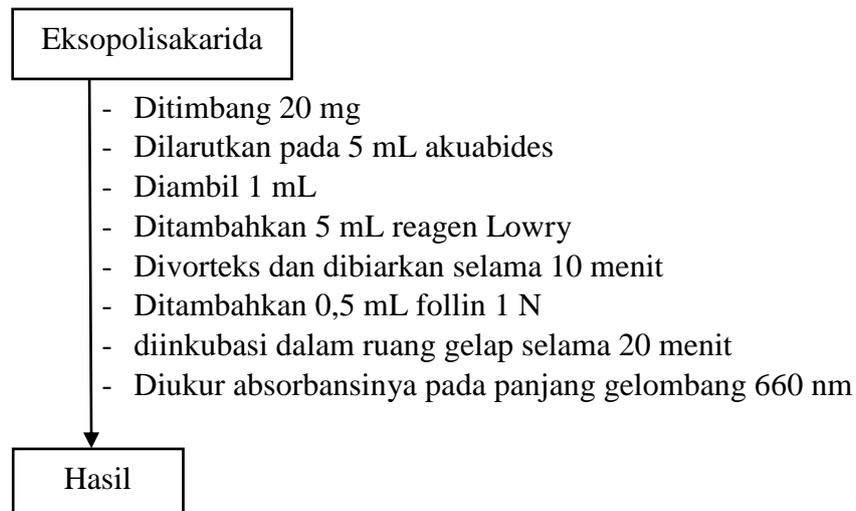


L.2.8 Analisis Kadar Protein EPS

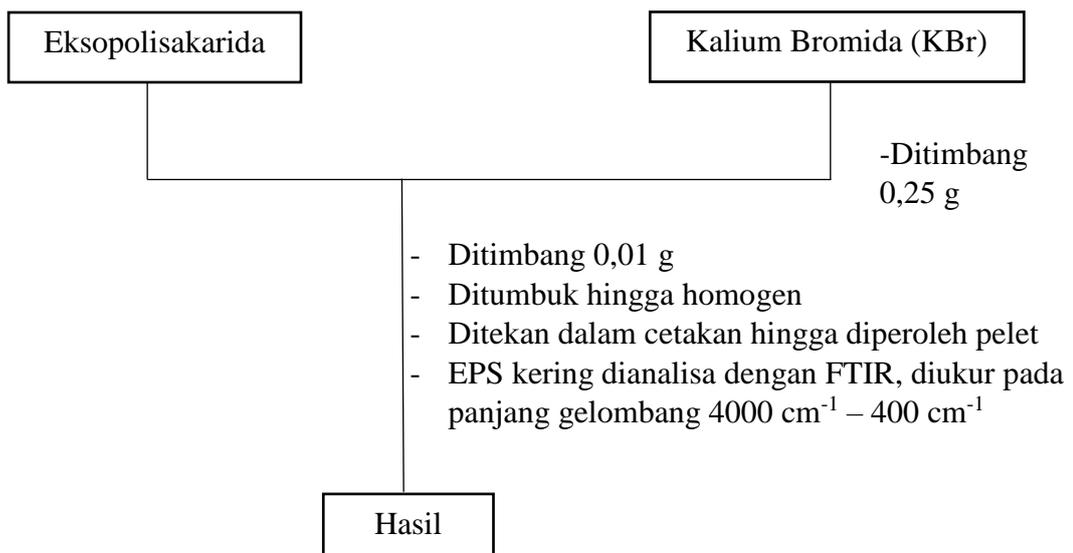
L.2.8.1 Pembuatan Kurva Standar *Bovine Serum Albumin*(BSA)



L.2.8.2 Analisa Kadar Protein EPS



L.2.9 Identifikasi Gugus Fungsi pada EPS dengan Menggunakan FTIR



Lampiran 3: Perhitungan

L.3.1 Pembuatan Larutan NaOH 2 N

Normalitas = M x valensi

$$\text{Molaritas} = \frac{\text{mol}}{\text{volume (L)}}$$

$$\text{Mol} = \frac{m}{Mr}$$

$$\text{Normalitas} = \frac{\text{massa}/Mr}{\text{Volume (L)}} \times \text{valensi}$$

$$2 \text{ N} = \frac{\text{massa}/40}{0,1 \text{ L}} \times 1$$

$$0,2 = \frac{\text{massa}}{40} \times 1$$

massa = 8 g

Keterangan :

Mr : Massa relative NaOH (40 g/mol)

m : Massa NaOH

Cara pembuatan : sebanyak 8 g NaOH ditimbang dan dimasukkan kedalam gelas beaker 100 ml, ditambahkan 50 ml aquades dan diaduk hingga larut. Selanjutnya dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, ditandabatkan dan dihomogenkan.

L.3.2 Pembuatan larutan HCl 2N

Konsentrasi (Normalitas) HCl pekat 37%

$$\begin{aligned} N &= \frac{(10 \times \% \text{ HCl} \times \text{berat jenis} \times \text{valensi})}{EM} \\ &= \frac{(10 \times 37 \% \times 1,19 \times 1)}{36,5} \\ &= 12,06 \text{ N} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan HCl 2N sebanyak 100 mL dengan cara pengenceran

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$12,06 \text{ N} \times V_1 = 2 \text{ N} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 16,58 \text{ mL}$$

Keterangan :

Berat jenis HCl : 1,19 g/mL

BM : berat molekul HCl (36,5 g/mol)

Cara pembuatan : sebanyak 50 mL akuades dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL. Kemudian ditambahkan sebanyak 16,58 mL HCl pekat secara perlahan (melalui dinding labu ukur). Larutan kemudian digoyangkan perlahan agar tercampur secara merata. Setelah itu, ditandabatkan dengan akuades hingga 100 mL dan dihomogenkan.

L.3.3 Pembuatan larutan Fenol 5% (b/v)

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

Cara pembuatan: 5 g fenol ditimbang menggunakan neraca analitik, kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker 100 mL, dilarutkan dengan akuades kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, lalu ditandabatkan dan dihomogenkan.

L.3.4 Pembuatan larutan H₂SO₄

Perhitungan molaritas H₂SO₄ pekat (96%)

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

Pembuatan larutan H₂SO₄ 1M sebanyak 50 mL dengan cara pengenceran

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

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

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

Keterangan :

M = molaritas

Mr = massa molekul relative

V = Volume

BM : berat molekul H₂SO₄ (1,84 g/mol)

Cara pembuatan : sebanyak 20 mL akuades dimasukkan kedalam labu ukur 50 mL. Kemudian ditambahkan sebanyak 2,8 mL H₂SO₄ pekat secara perlahan (melalui dinding labu ukur). Larutan kemudian digoyangkan perlahan agar tercampur secara merata. Setelah itu, ditandabatkan dengan akuades hingga 50 mL dan dihomogenkan.

L.3.5 Pembuatan kurva standar 10, 20, 30, 40, 50, 60 ppm

$$\text{Glukosa stok (1000 ppm)} = \frac{100 \text{ mg glukosa anhidrat}}{0,1 \text{ L akuades}}$$

Cara pembuatan : ditimbang glukosa sebanyak 100 mg menggunakan neraca analitik, kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker kemudian dilarutkan dengan akuades. Dimasukkan larutan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian ditandabatkan dan dihomogenkan. Larutan ini digunakan sebagai larutan stok glukosa standar. Pembuatan larutan glukosa 10, 20, 30, 40, 50 dan 60 ppm dilakukan dengan pengenceran dari larutan glukosa stok dengan perhitungan sebagai berikut:

- a. Konsentrasi 10 ppm:

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

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 10 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1 \text{ mL}$$

- b. Konsentrasi 20 ppm

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

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 20 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

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

- c. Konsentrasi 30 ppm

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

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 30 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 3 \text{ mL}$$

- d. Konsentrasi 40 ppm

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

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 40 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 4 \text{ mL}$$

e. Konsentrasi 50 ppm

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

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 50 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 5 \text{ mL}$$

f. Konsentrasi 60 ppm

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

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 60 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 6 \text{ mL}$$

L.3.6 Pembuatan Kurva Standar *Bovine Serum Albumin* (BSA)

$$\text{BSA induk} \left(\frac{30 \text{ mg BSA}}{10 \text{ mL akuades}} \right) = 3000 \text{ ppm}$$

Kurva standar BSA dibuat dengan melarutkan BSA dengan konsentrasi 5 mg/mL, kemudian diambil volume 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mL mengikuti perhitungan berikut:

a. Volume 0,1 mL:

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

$$M_1 \times 5 \text{ mL} = 3000 \text{ ppm} \times 0,04 \text{ mL}$$

$$M_1 = 20 \text{ ppm}$$

b. Volume 0,2 mL

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

$$M_1 \times 5 \text{ mL} = 3000 \text{ ppm} \times 0,08 \text{ mL}$$

$$M_1 = 40 \text{ mL}$$

c. Volume 0,3 mL

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

$$M_1 \times 0,12 \text{ mL} = 3000 \text{ ppm} \times 0,12 \text{ mL}$$

$$M_1 = 60 \text{ ppm}$$

d. Volume 0,4 mL

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

$$M_1 \times 5 \text{ mL} = 3000 \text{ ppm} \times 0,16 \text{ mL}$$

$$M_1 = 80 \text{ ppm}$$

e. Volume 0,5 mL

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

$$M1 \times 5 \text{ mL} = 3000 \text{ ppm} \times 0,2 \text{ mL}$$

$$M1 = 100 \text{ ppm}$$

Larutan BSA dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100 ppm diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis.