

**PENGARUH SUHU DAN LAMA FERMENTASI TERHADAP PRODUKSI
EKSOPOLISAKARIDA DARI TETES TEBU OLEH *Lactobacillus
plantarum* DAN IDENTIFIKASI SENYAWA GULA PENYUSUNNYA**

SKRIPSI

Oleh :
AIDA FITRIA
NIM. 12630099



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIKIBRAHIMMALANG
2017**

**PENGARUH SUHU DAN LAMA FERMENTASI TERHADAP PRODUKSI
EKSOPOLISAKARIDA DARI TETES TEBU OLEH *Lactobacillus
plantarum* DAN IDENTIFIKASI SENYAWA GULA PENYUSUNNYA**

SKRIPSI

Oleh:
AIDA FITRIA
NIM. 12630099

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)

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2017

**PENGARUH SUHU DAN LAMA FERMENTASI TERHADAP PRODUKSI
EKSOPOLISAKARIDA DARI TETES TEBU OLEH *Lactobacillus
plantarum* DAN IDENTIFIKASI SENYAWA GULA PENYUSUNNYA**

SKRIPSI

Oleh:
AIDA FITRIA
NIM. 12630099

Telah Diperiksa dan disetujui untuk Diuji
Tanggal: 25 Januari 2017

Pembimbing I

Pembimbing II


Akyunul Jannah, S.Si., M.P
NIP. 19750410 200501 2 009


Ahmad Abtokhi, M.Pd
NIP. 19761003 200312 1 004

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia


Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002



**PENGARUH SUHU DAN LAMA FERMENTASI TERHADAP PRODUKSI
EKSOPOLISAKARIDA DARI TETES TEBU OLEH *Lactobacillus
plantarum* DAN IDENTIFIKASI SENYAWA GULA PENYUSUNNYA**

SKRIPSI

**Oleh:
AIDA FITRIA
NIM. 12630099**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 25 Januari 2017**

Penguji Utama	: A. Ghanaim Fasya, M.Si NIP. 1977020200312 2 001	(..... )
Ketua Penguji	: Anik Maunatin, S.T., M.P NIPT. 20140201 2 412	(..... )
Sekretaris Penguji	: Akyunul Jannah, S.Si., M.P NIP. 19750410 200501 2 009	(..... )
Anggota Penguji	: Ahmad Abtokhi, M.Pd NIP. 19761003 200312 1 004	(..... )



**Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia**

**Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002**

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Aida Fitria

NIM : 12630099

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Pengaruh Suhu dan Lama Fermentasi terhadap Produksi
Eksopolisakarida dari Tetes Tebu oleh *Lactobacillus
plantarum* dan Identifikasi Senyawa Gula Penyusunnya

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

Malang, 25 Januari 2017

Yang membuat pernyataan,



Aida Fitria

NIM. 12630099

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbil ‘alamin, puji syukur kehadiran Ilahi Robbi yang telah melimpahkan taufiq, hidayah serta inayahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Pengaruh Suhu dan Lama Fermentasi terhadap Produksi Eksopolisakarida dari Tetes Tebu oleh *Lactobacillus plantarum* dan Identifikasi Gula Penyusunnya”** dengan tepat waktu, meskipun tak luput dari kekurangan.

Shalawat beriringkan salam keharibaan Abu Fathimah Az-Zahra Muhammad SAW, yang telah membimbing kita dari zaman kebodohan hingga zaman yang sarat akan penemuan dengan cahaya islam. Semoga kita dapat mendapatkan syafa’atnya kelak di hari kiamat.

Penulis menyadari masih terdapat banyak kekurangan dalam penulisan skripsi karena keterbatasan pengetahuan penulis, sehingga dalam penyelesaian skripsi ini penulis dibantu oleh beberapa pihak. Untuk itu dengan segala ketulusan hati penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. H. Mudjia Raharjo, M.Si, selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Dr. Hj. Bayyinatul M. drh, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si, selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Akyunul Jannah, M.P selaku dosen pembimbing penelitian yang telah membimbing dan memotivasi penulis untuk segera skripsi.

5. Bapak Abtokhi, M. Pd selaku dosen pembimbing agama yang telah memberikan pengarahan dan nasihat.
6. Ibu Anik Ma'unatin, M.P selaku konsultan penelitian dengan arahan dan bimbingan beliau semua dengan sabar dan semua ilmu yang diberikan kepada penulis, sehingga penulis dapat menyusun skripsi dengan memperoleh pengetahuan serta pengalaman yang sangat berharga.
7. Seluruh dosen, laboran dan karyawan jurusan kimia yang telah memberikan ilmu, pengalaman wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.

Akhirnya atas segala kekurangan dari penyusunan skripsi, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang bersifat konstruktif dari semua pembaca demi sempurnanya skripsi ini. Semoga skripsi yang telah penulis susun dapat bermanfaat bagi kita semua, Amin.

Malang, Januari 2017

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
ABSTRAK	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	8
1.4 Batasan Masalah	8
1.5 Manfaat Penelitian	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Tetes Tebu dalam Perspektif Islam	9
2.2 Kandungan Tetes Tebu	11
2.3 Fermentasi dalam Perspektif Islam	12
2.4 Fermentasi Eksopolisakarida oleh Bakteri Asam Laktat	14
2.5 Eksopolisakarida	19
2.6 Biosintesis Eksopolisakarida	24
2.7 Bakteri Asam Laktat	27
2.7.1 Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida	28
2.7.2 <i>Lactobacillus plantarum</i>	31
2.8 Pengukuran Brix	32
2.9 Pengukuran Kadar Total Gula Metode Sulfat-Fenol	34
2.10 Spektrofotometer UV-Vis	35
2.11 Analisis Eksopolisakarida Menggunakan <i>Fourier Transform</i> <i>Infra Red</i> (FTIR)	37
BAB III METODE PENELITIAN	41
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	41
3.2 Alat dan Bahan	41
3.2.1 Alat	41
3.2.2 Bahan	41
3.3 Rancangan Penelitian	41
3.4 Tahapan Penelitian	42
3.5 Pelaksanaan Penelitian	43
3.5.1 Preparasi Sampel	43
3.5.1.1 Sterilisasi Alat	43
3.5.1.2 Pengukuran Brix	43
3.5.1.3 Preparasi Tetes Tebu	43

3.5.2 Analisis Kadar Total Gula Metode Fenol H ₂ SO ₄	43
3.5.2.1 Pembuatan Kurva Standar Glukosa dengan Metode Fenol H ₂ SO ₄	43
3.5.2.2 Perhitungan Kadar Total Gula Tetes Tebu dengan Metode Fenol H ₂ SO ₄	44
3.5.3 Preparasi Bakteri <i>Lactobacillus plantarum</i>	44
3.5.3.1 Pembuatan media MRSA	44
3.5.3.2 Pembuatan media MRSB	44
3.5.3.3 Peremajaan <i>Lactobacillus plantarum</i>	45
3.5.3.4 Pembuatan stok inokulum	45
3.5.3.5 Pengukuran <i>Optical Density</i>	45
3.5.3.6 Pengukuran <i>Total Plate Count</i> (TPC)	45
3.5.4 Uji Pengaruh Suhu dan Lama Fermentasi Terhadap Produksi Eksopolisakarida	44
3.5.5 Isolasi Eksopolisakarida	44
3.5.6 Identifikasi Eksopolisakarida Menggunakan FTIR	44
3.5.7 Analisis Data	44
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	45
4.1 Preparasi Sampel	45
4.2 Pembuatan Media	47
4.3 Peremajaan dan Pembuatan Inokulum <i>Lactobacillus plantarum</i>	47
4.4 Pengukuran <i>Optical Density</i> dan Perhitungan <i>Total Plate Count</i>	49
4.5 Analisis Pengaruh Suhu dan Lama Fermentasi Terhadap Produksi Eksopolisakarida	50
4.6 Pengukuran Kadar Total Gula EPS	57
4.7 Pengukuran Kadar Gula Terpakai Selama Fermentasi	60
4.8 Hasil Analisis Menggunakan FTIR	61
4.9 Pemanfaatan Tetes Tebu untuk Memproduksi Eksopolisakarida dalam Perspektif Islam.....	62
BAB V PENUTUP	68
5.1 Kesimpulan	68
5.2 Saran	68
DAFTAR PUSTAKA	69
LAMPIRAN	76

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.2.	Tetes Tebu	11
Gambar 2.5.1	Struktur Dextran	20
Gambar 2.5.2	Stutur Kefiran	21
Gambar 2.5.3	Struktur Gellan	21
Gambar 2.5.4	Struktur Curdlan	22
Gambar 2.5.5	Struktur Xanthan	23
Gambar 2.5.6	Struktur Alginat	23
Gambar 2.5.7	Struktur Pullulan	24
Gambar 2.6.8	Jalur Biosintesis EPS	25
Gambar 2.7.2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	31
Gambar 2.8.1	Piknometer	32
Gambar 2.8.2	Hidrometer	33
Gambar 2.8.3	<i>Hand Brix Refractometer</i>	34
Gambar 2.9.1	Reaksi dehidrasi karbohidrat	34
Gambar 2.9.2	(a) Pentosa, (b) Heksosa, (c) 6-dioksiheksosa, (d) Keto-heksosa	35
Gambar 2.10	Bagian-bagian spektrometer UV-Vis dual beam	36
Gambar 2.11.1	Spektra FTIR eksopolisakarida dengan penambahan Se	38
Gambar 2.11.2	Spektra FTIR eksopolisakarida tanpa penambahan Se	38
Gambar 2.11.3	(a) spektra FTIR eksopolisakarida yang diproduksi oleh <i>L. plantarum</i> NTMI05, (b) spektra FTIR eksopolisakarida yang diproduksi oleh <i>L. plantarum</i> NTMI20	39
Gambar 4.5.1	Reaksi hidrolisis sukrosa (Iswanto, 2014)	54
Gambar 4.5.2	Hasil Produksi eksopolisakarida	55
Gambar 4.6.1	Reaksi dehidrasi karbohidrat	58
Gambar 4.8.1	Spektra FTIR perlakuan suhu 30 °C selama 18 jam	61
Gambar 7	Grafik kurva standar glukosa	87

DAFTAR TABEL

Tabel 2.2	Komponen yang terkandung dalam tetes tebu	12
Tabel 2.7.1	Kondisi fermentasi untuk menghasilkan EPS	30
Tabel 3.3	Kombinasi perlakuan antara suhu dan lama fermentasi	42
Tabel 4.1	Karakteristik bahan baku	47
Tabel 4.2.2	Kadar gula terpakai rata-rata molase	53
Tabel 4.2.3	Uji lanjut Beda Nyata Jujur (BNJ) suhu terhadap kadar gula terpakai	54
Tabel 4.5.1	Uji lanjut Beda Nyata Jujur (BNJ) interaksi suhu dengan lama fermentasi terhadap kadar eksopolisakarida	57
Tabel 4.6.1	Rata-rata kadar total gula EPS	59
Tabel 4.7.1	Uji lanjut Beda Nyata Jujur (BNJ) interaksi suhu dengan lama fermentasi terhadap kadar gula terpakai	60
Tabel 4.8.1	Gugus fungsi dari spektra FTIR perlakuan S ₂ L ₁	62
Tabel 7	Data absorbansi glukosa standar	86
Tabel 8.1.1	Absorbansi bahan baku	87
Tabel 8.1.2	Kadar total gula bahan baku	88
Tabel 8.2.1	Absorbansi sampel sebelum fermentasi	88
Tabel 8.2.2	Kadar total gula sampel sebelum fermentasi	89
Tabel 8.3.1	Absorbansi sampel setelah fermentasi	89
Tabel 8.3.2	Kadar total gula sisa fermentasi	90
Tabel 8.4.1	Kadar gula terpakai pada fermentasi ulangan I	91
Tabel 8.4.2	Kadar gula terpakai pada fermentasi ulangan II	91
Tabel 8.4.3	Kadar gula terpakai pada fermentasi ulangan III	92
Tabel 8.4.4	Rata-rata kadar gula terpakai	92
Tabel 8.5.1	Absorbansi eksopolisakarida	93
Tabel 8.5.2	Rata-rata kadar total gula eksopolisakarida	94
Tabel 9.1	Rata-rata hasil produksi eksopolisakarida	94
Tabel 9.2	Rata-rata kadar eksopolisakarida	95
Tabel 10.1	Perhitungan TPC ulangan I	95
Tabel 10.2	Perhitungan TPC ulangan II	96
Tabel 10.3	Perhitungan TPC ulangan III	96

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Diagram Alir	76
Lampiran 2 Skema Kerja	77
Lampiran 3 Perhitungan	83
Lampiran 4 Dokumentasi	97
Lampiran 5 Data Panjang Gelombang Maksimum	99
Lampiran 6 Kurva Standar Glukosa	100
Lampiran 7 Hasil Uji Statistik	102



ABSTRAK

Fitria, A. 2016. **Pengaruh Suhu dan Lama Fermentasi Terhadap Produksi Eksopolisakarida dari Tetes Tebu oleh *Lactobacillus plantarum* dan Identifikasi Gula Penyusunnya**. Pembimbing I: Akyunul Jannah, M.P; Pembimbing II: Ahmad Abtokhi, M.pd; Konsultan: Anik Maunatin, M.P.

Tetes tebu merupakan hasil samping dari proses pengolahan gula yang mengandung sumber karbon cukup tinggi, sehingga dapat dijadikan media fermentasi alternatif bagi *Lactobacillus plantarum* untuk memproduksi eksopolisakarida. Eksopolisakarida (EPS) adalah polisakarida yang disekresikan dari mikroba ke lingkungan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh suhu dan lama fermentasi terhadap produksi EPS dari tetes tebu. Produksi eksopolisakarida oleh *Lactobacillus plantarum* pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok Faktorial (RAKF) yang terdiri dari dua faktor, yaitu suhu (25, 30, dan 35 °C) dan lama fermentasi (18 dan 24 jam). Masing-masing perlakuan dilakukan tiga kali ulangan. Data kadar EPS, kadar total gula EPS dan kadar gula terpakai selama fermentasi dianalisis menggunakan *Two Way ANOVA* dengan selang kepercayaan 5 %, dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) 5 %. Hasil penelitian menunjukkan suhu dan Lama fermentasi berpengaruh nyata terhadap kadar EPS dan kadar gula terpakai selama fermentasi, lama fermentasi tidak berpengaruh nyata terhadap kadar total gula EPS. Diperoleh kadar EPS tertinggi 740 mg/L, kadar total gula EPS tertinggi 5,97 %, dan kadar gula terpakai tertinggi 14,67 % pada perlakuan suhu 30 °C dan lama fermentasi 18 jam. Spektra hasil analisis FTIR menunjukkan bahwa EPS termasuk polisakarida dengan adanya vibrasi peregangan C-H pada cincin gula mannanosa atau galaktosa dan sebuah gugus fungsi vibrasi peregangan (C-O) dari gugus eter.

Kata kunci: *Lactobacillus plantarum*; eksopolisakarida; tetes tebu; analisis FTIR

ABSTRACT

Fitria, A. 2016. **Effect of Temperature and Long Fermentation to The Exopolysaccharide Production from Molasses by *Lactobacillus plantarum* and Identification of its Sugar Compound.** Supervisor I: Akyunul Jannah, S.Si., M.P; Supervisor II: Ahmad Abtokhi, M.Pd; Consultant: Anik Maunatin, S.T., M.P.

Molasses is a side product from the sugar manufacturing process that contain high enough of carbon source, so it become fermentation medium alternative for *Lactobacillus plantarum* to produce exopolysaccharide. Exopolysaccharide (EPS) is polysaccharide that secreted from microbe to their external environment. The aim of this research were to determine effect of temperature and long fermentation on exopolysaccharide production from molasses. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus plantarum* in this study used Randomized Factorial Design that consist of two factors, those are temperature (25, 30, and 35°C) and long fermentation (18 and 24 hour). Each treatment was done in three replication. EPS content, total sugar content of EPS, and used sugar content from fermentation process was analyzed used Two Way ANOVA within 5 % interval of confidence, and continued by Tukey test 5 %. The result showed that temperature and long fermentation affect on EPS content and used sugar content. Long fermentation gave not significant different on total sugar content of EPS. The maximum of EPS content 740 mg/L, total sugar content from EPS 5,97 % and used sugar content from fermentation process 14,67 % at temperature 30 °C and long fermentation 18 hours. FTIR analysis showed that functional group suggested to polysaccharide, With presence C=C stretching vibration in the sugar ring mannosae and galactosae and stretching vibration (C-O) from ether are the typical absorption peaks of a polysaccharide.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*; exopolysaccharide; molasses; FTIR analysis

مُستَخْلِصُ البَحْثِ

فطرية، عا. ٢٠١٦. آثار الحرارة ووقت التخمر على إنتاج اكسو السكر من المولاس بواسطة لاكتوباسيلوس فلانتاروم وتحديد الهوية على صغاية السكر. المُشْرِفَةُ الأُولَى : أَعْيُنُ الحَنَّةِ الماجستيرة ؛ المشرف الثاني: أحمد ابطخي المَاجِسْتِير، المُشْتَشَارَةُ : أنيك معونة الماجستيرة

المولاس هو نتيجة الثانوية من معالجة السكر التي تحتوي على مصدر الكربون مرتفعة بما يكفي، بحيث يمكن استخدامه كوسائل الإعلام من التخمر البديل للاكتوباسيلوس فلانتاروم لإنتاج اكسو السكر. اكسو السكر هو السكر الذي يفرزها ميكروب في البيئة. وأما الغرض من هذه الدراسة لتعريف آثار الحرارة ووقت التخمر على إنتاج اكسو السكر من المولاس. إنتاج اكسو السكر من لاكتوباسيلوس فلانتاروم في هذه الدراسة يستخدم تصميم القطاعات العشوائية مضروب الذي يتكون من عاملين وهما درجة حرارة (٢٥، ٣٠ و ٣٥°C) و وقت التخمر (١٨ و ٢٤ ساعة). تم تنفيذ كل معاملة ثلاث مكررات. و تأثير عامل درجة الحرارة و وقت التخمر على مستويات السكريات الكلية و مستويات اكسو السكر يجلل باستخدام اتجاهين أنوفا (*ANOVA Two Way*) مع فاصل الثقة من ٥٪، ويستمر باختبار أقل الفرق الكبير (*Beda BNT/Nyata Terkecil*) ٥ ٪. وأظهرت النتائج أن درجة الحرارة و وقت التخمر تؤثران تأثيرا كبيرا على مستويات السكر غير المستخدمة ومستويات اكسو السكر. أظهر تفاعل عملي العلاج تأثيرا كبيرا على جميع المعلمات. وكان أعلى مستويات السكريات الكلية من اكسو السكر ٦٥ ± ١٤ ٪ عند ٢٥ °C درجة و وقت التخمر ٢٤ ساعة، في حين بلغت قيمة أعلى مستويات اكسو السكر يعني ٧٤ ملغم/لتر عند ٣٠ °C درجة و وقت التخمر ١٨ ساعة. ويشير أطياف نتيجية تحليل *FTIR* أن أكسو السكر من السكر مع إهتزاز تمتد $C=C$ على حلقات السكر و مجموعة وظيفية إهتزاز تمتد $C-O$ من مجموعات الكحول وأحماض الكربوكسيلية واسترات واثير التي كانت كلها متطابقة إلى ذروة امتصاص السكريات.

كلمات أساسية: لاكتوباسيلوس فلانتاروم ، المولاس ، اكسو السكر ، اكل السكريات تحويل فورييه تحليل الأشعة تحت الحمراء (*FTIR*).

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Eksopolisakarida (EPS) adalah suatu polisakarida yang diproduksi dan disekresikan dari mikroba ke lingkungan. EPS adalah polimer biosintetik terutama terdiri dari karbohidrat yang disekresikan oleh bakteri (Freitas dkk., 2009). EPS diteliti karena memiliki berbagai macam potensi, antara lain dalam bidang farmasi, pangan dan kesehatan. Potensi-potensi yang terdapat pada EPS merupakan suatu bukti bahwa segala yang Allah ciptakan baik di langit maupun di bumi pasti mengandung manfaat. Seperti halnya firman Allah SWT. dalam QS. Shaad: 27:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَطْلًا ۚ ذَٰلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا ۖ فَوَيْلٌ لِلَّذِينَ
كَفَرُوا مِنَ النَّارِ

Artinya: “dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya tanpa hikmah. yang demikian itu adalah anggapan orang-orang kafir, Maka celakalah orang-orang kafir itu karena mereka akan masuk neraka” (QS. Shaad: 27).

Tafsir ayat tersebut dalam tafsir al Qurthubi (2009) adalah Allah tidak bermain-main dalam menciptakan alam semesta. Tidak ada kesia-siaan dan tanpa arah tujuan yang benar. Seandainya penciptaan alam ini tanpa tujuan yang haq, maka apa yang dilakukan Allah SWT. yang menyangkut kehidupan dan kematian makhluk, serta penciptaan serta pemusnahannya dilakukan-Nya tanpa tujuan. Tetapi karena memang bertujuan untuk permainan, maka pastilah Allah yang

Maha kuasa itu tidak dapat membedakan antara yang berbuat baik dan buruk, lalu memberi ganjaran sesuai amal perbuatan masing-masing.

Kalimat *baathilaa* mengandung arti sia-sia atau tanpa hikmah jika kita pahami, makna sia-sia atau tanpa hikmah yaitu tidak terdapat manfaat yang diambil, dan hanyalah sebuah sifat yang tidak menguntungkan. Namun ciptaan Allah tidak demikian, Allah SWT menciptakan segala makhluk di dunia, baik itu makhluk hidup maupun benda mati selalu disertai manfaat yang melekat. Ada kalanya manfaat itu tidak dapat dirasakan secara langsung, namun harus melalui pengolahan akal fikiran manusia dengan memperluas wawasan keilmuan baik secara teoritis maupun eksperimental.

Menurut Malik, dkk. (2008) di bidang pangan, eksopolisakarida bermanfaat sebagai stabilisator, pengental, emulgator, pembentuk gel dan memiliki kemampuan mengikat air yang baik sehingga dapat mempertahankan tekstur makanan agar tetap lembut selama penyimpanan. EPS berperan penting dalam psikokimia, reologi produk, rasa komposisi makanan fermentasi (Yilmaz, dkk., 2015), dan memberikan manfaat bagi kesehatan manusia seperti aktivitas antitumor dengan rasio hambat sebesar $88,34 \pm 1,97$ % terhadap sel tumor lambung BGC-823 (Wang, dkk., 2014), dan $39,24$ % terhadap sel tumor usus HT-29 (Wang, dkk., 2015), antibakteri dengan zona hambat sebesar $15,67 \pm 1,53$ mm terhadap bakteri *E. coli* O157:H7 (Li, dkk., 2014), antioksidan dengan EC_{50} sebesar $1,07$ mg/mL terhadap radikal DPPH (Li, dkk., 2014), antibiofilm dengan rasio hambat terhadap pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* AC1 sebesar $45,13$ % (Wang, dkk., 2015). Menurut penelitian Dilna, dkk., (2015) EPS yang

diproduksi oleh *L. plantarum* RJF₄ dapat menurunkan konsentrasi kolesterol sebesar 42,24 % melalui adsorpsi.

Eksopolisakarida dapat diproduksi oleh Bakteri Asam Laktat (BAL). EPS yang diproduksi BAL berfungsi sebagai bentuk perlindungan sel bakteri terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim sebagai bentuk pertahanan diri dari sel lain dan bakteriofag. EPS yang diproduksi BAL mempunyai risiko kontaminasi toksik yang kecil sehingga dapat diaplikasikan pada makanan karena EPS aman dikonsumsi manusia (dalam kata lain GRAS—*Generally Recognized as Safe*) (Amalia, 2012). BAL yang bersifat probiotik memiliki kemampuan untuk menghasilkan eksopolisakarida seperti *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium longum* (Tallon, dkk., 2006), *Lactobacillus delbrueckii* B3, *Lactobacillus bulgaris* G12, *Streptococcus thermophiles* W22 (Yuksegdag dan Salim, 2008), *Pediococcus parvulus* (Velasco, dkk., 2006), *Lactobacillus paracasei* (Xu, dkk., 2010), *Micrococcus luteus* (Asker, dkk., 2014).

Diantara bakteri asam laktat yang dapat memproduksi EPS, *Lactobacillus plantarum* sering digunakan secara luas dalam industri fermentasi makanan seperti sayur-sayuran, dan produk olahan daging (Wang, dkk., 2015). *Lactobacillus plantarum* adalah salah satu spesies BAL yang banyak diteliti, karena pada umumnya beberapa strain tersebut bersifat probiotik (Zubaidah, dkk., 2008). Penelitian tentang EPS produksi *Lactobacillus plantarum* 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).

Beberapa penelitian tentang produksi eksopolisakarida menunjukkan bahwa eksopolisakarida yang dihasilkan oleh BAL dapat dipengaruhi oleh kondisi fermentasi antara lain suhu dengan EPS maksimum 354 mg/L pada suhu 38 °C (Kimmel, dkk., 1998), lama fermentasi dengan EPS maksimum 730 mg/L selama 60 jam (Lin dan Chien, 2007), medium fermentasi seperti sumber karbon dengan EPS maksimum 2843 mg/L menggunakan tetes tebu 5 % (Sirajunnisa, dkk., 2012) dan sumber nitrogen dengan perolehan EPS maksimum 1781 mg/L menggunakan $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,3% (Zubaidah, dkk., 2008). Selain itu juga dipengaruhi oleh pH dengan EPS maksimum 650 mg/L pada pH 6,5 (Haroun, dkk., 2013).

Berdasarkan alasan di atas, kondisi fermentasi harus dioptimalkan untuk mendapatkan hasil produksi eksopolisakarida terbaik dengan biaya yang efektif dan efisien (Freitas, dkk., 2011). Menurut Haroun, dkk., (2013) produksi eksopolisakarida dari substrat glukosa 20 g/L oleh *Lactobacillus plantarum* mencapai nilai maksimum sebesar 650 mg/L pada suhu 30 °C. Zubaidah, dkk., (2008) melaporkan bahwa produksi eksopolisakarida dari substrat sari buah murbei dengan penambahan laktosa dilakukan pada suhu 37 °C karena pada suhu tersebut *L. plantarum* B2 tumbuh optimum. Diperoleh total EPS kasar sebesar 1955,78 mg/L.

Lama fermentasi merupakan parameter lingkungan yang berpengaruh terhadap massa molekul, isi dan komposisi gula pada EPS yang dihasilkan (Lin dan Chien, 2005). Haroun, dkk., (2013) melaporkan bahwa hasil tertinggi

produksi EPS oleh *L. plantarum* NRLL-B4496 diperoleh pada lama fermentasi 24 jam dengan koefisien perhitungan hasil produksi eksopolisakarida sebesar 323 mg/g. Penelitian produksi eksopolisakarida oleh *Lactobacillus plantarum* C88 yang dilakukan oleh Zhang, dkk., (2013) menunjukkan hasil maksimum sebesar 69 mg/L ketika baru memasuki fase stasioner (32 jam).

Mikroba penghasil eksopolisakarida membutuhkan substrat yang mengandung glukosa, sukrosa, dan fruktosa demi menunjang hasil fermentasi (Fifendy, dkk., 2013). Salah satu substrat yang dapat digunakan adalah tetes tebu. Tetes tebu merupakan hasil samping dari pengolahan gula tebu (*Saccharum officinarum*) (Juwita, 2012). Tetes tebu banyak mengandung gula dan asam-asam organik. Kandungan gula dalam tetes tebu yaitu sukrosa 40–50 % (Simanjutak, 2009), glukosa 4–9 %, fruktosa 5–12 % dan gula reduksi lain 1–5 % (Toharisman dan Santosa, 1999). Tetes tebu mengandung cukup tinggi nutrisi untuk kebutuhan bakteri sehingga dapat dijadikan alternatif sumber karbon sebagai penyedia makro nutrien bagi *Lactobacillus plantarum* (Kusmiati, 2007).

Menurut pusat data dan sistem informasi pertanian (2014), Jumlah tetes tebu di Indonesia mencapai 0,55 juta ton/tahun. Adapun perkembangan produksi tetes tebu sejak tahun 1980–2013 memiliki rata-rata pertumbuhan 12,19 %. Simanjutak (2009) mengungkapkan bahwa tetes tebu dari industri gula di Indonesia lebih banyak diekspor ke luar negeri dengan harga yang relatif murah karena masih sedikit digunakan dan mengandung kalsium oksida yang dapat mencemari lingkungan.

Sebagai khalifah di bumi, manusia hendaknya menjaga kelestarian alam. Salah satunya dengan melakukan pengolahan limbah dari proses produksi agar

tidak menimbulkan kerusakan pada lingkungan. Oleh karena itu limbah tetes tebu harus diolah terlebih dahulu sebelum dibuang, atau digunakan untuk suatu hal yang lebih bermanfaat. Allah SWT sangat peduli terhadap kelestarian alam. Hal ini tercermin pada QS. al A'raf ayat 56:

وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا وَادْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا إِنَّ رَحْمَتَ اللَّهِ قَرِيبٌ مِّنَ الْمُحْسِنِينَ ﴿٥٦﴾

Artinya: “ Dan janganlah kamu membuat kerusakan di muka bumi sesudah Allah memperbaikinya, dan berdoalah kepada – Nya dengan rasa takut (tidak akan diterima) dan harapan (akan dikabulkan). Sesungguhnya rahmat Allah amat dekat kepada orang-orang yang berbuat baik (QS. al A'raf: 56).

Ayat tersebut dengan jelas merupakan sebuah larangan yang ditujukan kepada umat manusia terutama umat Islam, agar tidak melakukan kerusakan di muka bumi dalam bentuk apapun. Allah SWT. dengan kasih sayang-Nya yang tidak terbatas telah menganugerahkan kemampuan, kecerdasan dan bakat kepada manusia serta menjadikan manusia sebagai khalifah di muka bumi tak lain agar dapat memanfaatkan isi alam semesta secara bijaksana, demi terbentuknya keselarasan diantara makhluk hidup. Larangan Allah sekaligus mengandung perintah tersebut hendaknya kita amalkan dalam kehidupan, sehingga beberapa penelitian terdahulu menjadikan kelimpahan tetes tebu sebagai alternatif substrat fermentasi untuk produksi eksopolisakarida. Diharapkan dengan mengubah tetes tebu menjadi substrat, dapat mengurangi pencemaran lingkungan serta dapat memanfaatkan tetes tebu secara optimal.

Saat ini eksplorasi EPS dari BAL semakin meningkat karena EPS dinilai penting bagi kesehatan dan pengolahan makanan. Beberapa penelitian melaporkan bahwa esopolisakarida yang diproduksi oleh strain *Lactobacillus plantarum*

mengandung monomer-monomer gula penyusun. *Lactobacillus plantarum* EP56 memproduksi EPS yang terdiri dari glukosa, galaktosa dan N-asetilgalaktosamin (Tallon, dkk., 2006). Liu, dkk., (2011) melaporkan bahwa EPS yang diproduksi oleh *Lactobacillus plantarum* NTU102 mengandung senyawa monomer gula yang terdiri dari fruktosa, arabinosa, galaktosa, glukosa, mannososa dan maltosa. Wang, dkk., (2010) dari hasil penelitiannya menunjukkan bahwa *Lactobacillus plantarum* KF5 menghasilkan EPS yang terdiri dari mannososa, glukosa dan galaktosa. Sedangkan eksopolisakarida yang dihasilkan dari *Lactobacillus plantarum* BC-25 terdiri dari mannososa, galaktosa dan glukosa dengan rasio molar 92,21 : 1,79 : 6,00 (Zhou, dkk., 2010).

Penambahan suplemen terhadap medium fermentasi juga mungkin dapat merubah kandungan gula dalam EPS. Seperti halnya dalam penelitian Wang, dkk., (2015) menunjukkan bahwa penambahan suplemen 20 % (v/v) gliserol ke dalam medium MRSB menghasilkan EPS yang diproduksi oleh *Lactobacillus plantarum* YW32 mengandung monomer gula mannososa, fruktosa, galaktosa, dan glukosa dengan rasio molar 8,2:1:4,1:4,2, sehingga diharapkan pada penelitian kali ini, penggunaan substrat tetes tebu sebagai medium dapat memperbesar kadar monomer gula yang terkandung di dalam EPS, serta dapat memperbanyak jenis monomer gula lainnya. Penelitian ini menggunakan parameter fermentasi, seperti suhu dan lama fermentasi yang dioptimasi untuk substrat tetes tebu.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh suhu dan lama fermentasi terhadap produksi eksopolisakarida oleh *Lactobacillus plantarum* dari substrat tetes tebu?

2. Bagaimana profil senyawa gula yang terkandung dalam eksopolisakarida hasil produksi menggunakan FTIR?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui pengaruh suhu dan lama fermentasi terhadap produksi eksopolisakarida oleh *Lactobacillus plantarum* dari substrat tetes tebu.
2. Untuk mengetahui gugus fungsi senyawa gula yang terkandung dalam eksopolisakarida hasil produksi menggunakan FTIR.

1.4 Manfaat Penelitian

Masyarakat dapat mengetahui lama fermentasi dan suhu optimum produksi eksopolisakarida sehingga dapat memproduksi eksopolisakarida secara efisien dan menghasilkan randemen yang besar.

1.5 Batasan Masalah

1. Tetes tebu dari Pabrik Gula Kribet Malang.
2. Analisis gugus fungsi senyawa gula dari eksopolisakarida dengan kadar gula tertinggi menggunakan FTIR (*Fourier Transform Infra Red*).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tetes Tebu dalam Perspektif Islam

Tetes tebu merupakan limbah pabrik gula yang dikategorikan sebagai limbah cair yang diperoleh dari hasil pemisahan sirup *low grade* dimana gula dalam sirup tersebut tidak dapat dikristalkan lagi karena mengandung pecahan sukrosa yaitu glukosa dan fruktosa. Limbah ini memiliki kandungan sukrosa sekitar 30 % serta gula pereduksi sekitar 25 % berupa glukosa dan fruktosa. Sukrosa dalam tetes tebu merupakan komponen sukrosa yang sudah tidak dapat lagi dikristalkan di dalam industri gula (Pertiwi, 2009). Selain senyawa gula, senyawa-senyawa yang terkandung dalam tetes tebu diantaranya biotin, asam pantotenat, tiamin, fosfor dan sulfur. Kandungan nitrogen organik sedikit.

Pemanfaatan tetes tebu sangat dianjurkan, disamping karena senyawa-senyawa yang terkandung di dalamnya, pemanfaatan tetes tebu dapat mengurangi pencemaran lingkungan. Selain itu, kandungan tetes tebu yang kaya akan gula dapat dijadikan substrat fermentasi untuk membentuk senyawa lain yang lebih bermanfaat seperti halnya eksopolisakarida. Potensi pada tetes tebu terutama dalam bidang pangan dan farmasi berperan penting dalam pengembangan ilmu pengetahuan. Berdasarkan uraian di atas, sangat jelaslah bahwa segala sesuatu yang Allah ciptakan merupakan nikmat yang tidak ada sedikitpun kesia-siaan.

Sebagaimana firman Allah dalam surat Ali Imran ayat 190-191:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَأَخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِأُولِي الْأَلْبَابِ
 الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ
 السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ

Artinya: "Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda – tanda bagi orang – orang yang berakal, (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan 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 neraka" (QS. Ali Imran: 190-191).

Makna ayat tersebut dalam Tafsir Ibnu Katsir (2001) bahwa pada ketinggian dan keluasan langit dan juga kerendahan bumi serta kepadatannya, terdapat tanda-tanda kekuasaan-Nya pada segala sesuatu yang Allah ciptakan, baik berupa bintang-bintang, komet, daratan dan lautan, pegunungan dan pepohonan, tumbuh-tumbuhan, tanaman, buah-buahan, binatang, barang tambang, serta berbagai macam warna dan aneka ragam makanan dan bebauan. Semuanya itu merupakan ketetapan Allah yang Maha perkasa lagi Maha mengetahui dan merupakan tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal (Ulul Albab), yaitu mereka yang mempunyai akal yang bersih dan mengetahui hakikat banyak hal secara jelas dan nyata. Mereka tidak putus-putus berdzikir dalam setiap keadaan baik dengan hati maupun lisan mereka. Mereka juga memahami apa yang terdapat pada keduanya (langit dan bumi) dari kandungan hikmah yang menunjukkan keagungan al Khaliq (Allah), kekuasaan-Nya, keluasan ilmu-Nya, hikmah-Nya, pilihan-Nya dan juga rahmat-Nya.

2.2 Kandungan Tetes Tebu

Tetes tebu berwarna hitam gelap atau hitam kemerahan, mempunyai pH 5,5–6,5 yang disebabkan oleh adanya asam-asam organik bebas (Harahap, 2003). Tetes tebu mengandung kurang lebih 39 % selulosa dan 27,5 % hemiselulosa (Gusmailina, 2010).



Gambar 2.2. Tetes tebu

Tetes tebu yang mengandung nutrisi cukup tinggi untuk kebutuhan bakteri, telah dijadikan bahan alternatif untuk pengganti glukosa sebagai sumber karbon dalam media pertumbuhan mikroorganisme (Paturau, 1982). Komposisi rata-rata tetes tebu dipengaruhi oleh jenis tanah, suhu, kelembaban, musim produksi, varietas, dan proses produksi. Dari berbagai faktor tersebut berpengaruh pada kandungan nutrisi, rasa, warna, viskositas dan kadar gula (Pertiwi, 2009).

Pada umumnya tetes tebu digunakan sebagai media untuk produksi alkohol secara komersial pada industri fermentasi alkohol karena tetes tebu mudah didapatkan secara luas, murah, serta dianggap sebagai bahan baku yang berkualitas. Tetes tebu yang akan digunakan sebagai bahan baku terutama pada produksi alkohol harus memenuhi parameter % brix. Kondisi tetes tebu yang pekat menghasilkan konsentrasi gula dalam tetes tebu cukup tinggi sehingga dapat memberikan efek pengawetan pada tetes tebu (Prescott dan Dunn, 1990). Menurut

Prescott dan Dunn (1990), kualitas tetes tebu yang baik harus mempunyai % brix antara 85–95 % brix.

Berikut ini adalah tabel komponen yang terkandung dalam tetes tebu.

Tabel 2.2 Komponen yang terkandung dalam tetes tebu (Toharisman dan Santosa, 1999)

Kandungan	Kisaran (%)	Rata-rata (%)
Air	17–25	20
Senyawa organik		
Sakarosa	30–40	35
Glukosa	4–9	7
Fruktosa	5–12	9
Gula reduksi lain	1–5	3
Protein kasar	2,5–4,5	4
Asam amino	0,3–0,5	0,4
Senyawa anorganik		
K ₂ O		4,80
CuO		1,20
MgO		0,98
Na ₂ O		0,10
Fe ₂ O ₃		0,12
SO ₃		1,90
Cl		1,80
P ₂ O ₃		0,60
SiO ₂ tak larut		0,60
Wax, fosfolipid dan sterol		0,40
Vitamin		
Biotin (H)		2
Cholin (B4)		8,80
Asam folat (B kompleks)		0,35
Niacin (B kompleks)		23
Riboflavin (B2)		40
Asam panthotenat (B kompleks)		2,50
Pyridoxine (B6)		4
Thiamine (B1)		0,80

2.3 Fermentasi dalam Perspektif Islam

Produksi eksopolisakarida dari tetes tebu melalui serangkaian proses fermentasi. Fermentasi menurut pengertian ahli biokimia merupakan segala proses yang menghasilkan suatu produk dengan perombakan senyawa organik oleh kultur mikroorganisme. Fermentasi dapat juga dapat diartikan sebagai proses disimilasi senyawa-senyawa organik yang disebabkan oleh aktivitas

mikroorganisme. Disimilasi merupakan reaksi kimia yang membebaskan energi melalui perombakan nutrien (Sulistyaningrum, 2008). Asal kata fermentasi sebenarnya berasal dari bahasa Latin yaitu *ferfere*, yang berarti mendidih. Kata tersebut digunakan karena menggambarkan aksi ragi pada ekstrak buah selama pembuatan minuman berakohol.

Al Qur'an sebagai sumber acuan utama mengisyaratkan istilah fermentasi pada buah-buahan sebagaimana tertulis dalam surat an Nahl ayat 67:

وَمِنْ ثَمَرَاتِ النَّخِيلِ وَالْأَعْنَابِ تَتَّخِذُونَ مِنْهُ سَكَرًا وَرِزْقًا حَسَنًا إِنَّ فِي ذَلِكَ
لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ

Artinya: “Dan dari buah korma dan anggur, kamu buat minuman yang memabukkan dan rezki yang baik. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang memikirkan” (QS. an Nahl:67).

Berdasarkan ayat tersebut, kata *Sakaron* artinya adalah segala sesuatu yang bisa memabukkan. Istilah yang umum digunakan secara bahasa. Ibnu Abbas berkata, “Ayat ini turun sebelum pengharaman khamer dan yang dimaksud dengan sesuatu yang memabukkan adalah khamer. Ada pula yang berpendapat “Sesuatu yang memabukkan adalah perasan buah manis yang halal” dinamakan memabukkan karena sesuatu tersebut dapat memabukkan jika dibiarkan, jika telah sampai kepada kondisi yang memabukkan maka diharamkan. Sedangkan menurut tafsir al Qurthubi (2009) yang dimaksud *sakaron* dalam ayat ini adalah minuman baik dari kurma maupun anggur yang direndam dengan air jika telah lama akan mengalami fermentasi sehingga menjadi memabukkan (*sakaron*). Diantara faktor-faktor yang mempengaruhi fermentasi, suhu dan lama fermentasi berpengaruh terhadap hasil fermentasi.

2.4 Fermentasi Eksopolisakarida oleh Bakteri Asam Laktat

Secara umum, fermentasi adalah merupakan suatu bentuk respirasi anaerobik, akan tetapi Dirmanto (2006) mendefinisikan fermentasi sebagai respirasi dalam lingkungan anaerobik dengan atau tanpa akseptor elektron eksternal. Berikut adalah hal-hal yang mempengaruhi produksi EPS oleh BAL antara lain:

2.4.1 Media

Media yang digunakan untuk mengoptimalkan produksi EPS sangat beragam, karena rantai utama dari polimer ini adalah glukosa. Yilmaz, dkk., (2015) menggunakan ayran (minuman tradisional yogurt Turki) sebagai substrat pada produksi eksopolisakarida oleh *Streptococcus thermophilus* dan menghasilkan eksopolisakarida sebesar 29,31 mg/L, Ozkaya, dkk., (2007) menggunakan substrat susu skim (10 g/100 mL) untuk memproduksi eksopolisakarida oleh *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan menghasilkan EPS sebesar 350 mg/L. Sementara peneliti lainnya menggunakan substrat glukosa sebesar 30 g/L untuk menghasilkan EPS menggunakan isolat *L. delbrueckii* B-3 (Xu, dkk., 2010).

Bakteri biasanya memperoleh energi dari oksidasi kimia. Kebanyakan bakteri memperoleh nutrisi yang diperlukan selnya untuk mensintesis protoplasma dari berbagai sumber nutrien, seperti sumber karbon (misalnya karbohidrat), sumber nitrogen (protein atau amoniak), ion-ion anorganik tertentu, metabolit penting (vitamin, mungkin juga asam amino) dan air (Volk dan Wheeler, 1988).

1. Sumber Karbon

Kemampuan suatu isolat dalam memproduksi eksopolisakarida juga dipengaruhi oleh komposisi media (tidak hanya sumber karbon) (Ruas-Madiedo dan Gavilá, 2005). Media kultur harus mengandung semua elemen yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroba, dalam proporsi yang serupa dengan yang ada pada sel mikroba (Hidayat dkk., 2006). Sumber karbon yang biasa digunakan adalah karbohidrat berupa glukosa, hidrokarbon dan minyak sayuran seperti minyak kacang kedelai yang digunakan oleh bakteri dalam pertumbuhannya. Salah satu jenis sumber karbon dari limbah yang dapat digunakan adalah tetes tebu dan limbah kedelai (Kosaric, 1992).

Penggunaan beberapa sumber karbon seperti glukosa, laktosa, fruktosa sebagai suplemen dari komposisi media menunjukkan hasil yang bermacam-macam pada setiap spesies (Halim dan Zubaidah, 2013). Zubaidah, dkk., (2008) melaporkan bahwa medium fermentasi untuk *Lactobacillus plantarum* B2 dengan penambahan laktosa menghasilkan jumlah total eksopolisakarida kasar sebesar 1955,78 mg/mL, jumlah ini lebih besar dibandingkan dengan penambahan glukosa (1327,00 mg/mL) dan penambahan sukrosa (709,89 mg/mL).

Berbagai gula (karbohidrat) dapat ditambahkan pada media biakan. Medium macam ini dipakai untuk menentukan apakah jenis bakteri yang diidentifikasi itu mampu menggunakan gula untuk pertumbuhannya, dalam media jenis ini yang lazim dipakai adalah gula, seperti glukosa, manosa, galaktosa, sukrosa, galaktosa, maltosa dan laktosa. Di samping itu, digunakan pula alkohol-alkohol gula seperti manitol, gliserol dan dulsitol. Apabila gula digunakan oleh bakteri (Volk dan Wheeler, 1988).

2. Sumber Nitrogen

Semua protein dan asam nukleat mengandung nitrogen, sehingga sejumlah nitrogen dibutuhkan untuk pertumbuhan (Volk dan Wheeler, 1988). Nitrogen adalah salah satu dari beberapa unsur nutrisi yang mampu dimanfaatkan oleh mikroorganisme untuk kebutuhannya. Nitrogen ini terdapat dalam dua bentuk senyawa kimia yaitu N-organik dan N-anorganik. Senyawa N-organik merupakan senyawa utama yang paling dibutuhkan oleh mikroorganisme (Muharni, 2007).

Sumber nitrogen yang biasa digunakan adalah amonium nitrat (NH_4NO_3), urea, KNO_3 , NH_4Cl , dan NaNO_3 (Looijesteijn, dkk., 2001; Mozzi, dkk., 2006). Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mendapatkan rasio yang terbaik antara karbon, nitrogen, fosfor dan besi yang dibutuhkan untuk mendapatkan produksi yang tinggi (Huang, dkk., 2015).

Penelitian yang dilakukan oleh Zubaidah, dkk. (2008) menunjukkan bahwa penambahan sumber nitrogen dan fosfor berupa diamonium hidrogen fosfat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) sebesar 0,3 % ke dalam substrat sari buah murbei menghasilkan jumlah eksopolisakarida kasar paling tinggi yaitu 1618,67 mg/L, sedangkan jumlah eksopolisakarida kasar paling rendah diperoleh pada konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,1 % dengan jumlah eksopolisakarida kasar sebesar 1087,89 mg/L.

Unsur nitrogen dan fosfat sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan bakteri sebagai pembentukan dinding sel. Adanya penambahan $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ menyebabkan peningkatan jumlah nutrisi yang diperlukan oleh *L. plantarum* untuk tumbuh dan berkembang biak. Semakin tinggi kadar $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ menyebabkan peningkatan nilai total EPS kasar karena $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

merupakan sumber nitrogen dan fosfat pada pembentukan senyawa metabolit *L. plantarum*. (Zubaidah, dkk., 2008). Eksopolisakarida tersusun dari gugus asetil, fosfat, sn-gliserolfosfat dan N-asetilaminosakarida (Tallon, dkk., 2006). Menurut Harrah, dkk. (2006), unit penyusun heteropolisakarida kadang-kadang mengandung N-asetilglukosamin, N-asetilgalaktosamin, fukosa, asam glukuronat, dan gugus non-karbohidrat seperti fosfat, asetil, dan gliserol.

2.4.2 Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor yang cukup penting pertumbuhan mikroba. Suhu fermentasi yang terlalu tinggi akan berpengaruh terhadap mikroba dan enzim yang dihasilkan oleh mikroba itu sendiri. Suhu yang terlalu tinggi akan mengakibatkan enzim mengalami denaturasi sehingga akan rusak. Pada umumnya enzim bekerja sangat lambat pada suhu di bawah titik beku dan keaktifannya akan meningkat sampai suhu 45 °C. Haroun, dkk. (2013) melakukan penelitian mengenai produksi eksopolisakarida oleh *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 menggunakan variasi suhu (20, 25, 30, 35 dan 40 °C) untuk mengevaluasi pengaruh suhu terhadap produksi EPS. Hasil penelitian tersebut mengungkapkan bahwa eksopolisakarida mencapai nilai maksimum 650 mg/L pada suhu 30 °C.

2.4.3 Lama Fermentasi

Penggunaan variasi lama fermentasi (12, 18, 24, 36 dan 48 jam) untuk mengetahui pengaruh lama fermentasi terhadap pertumbuhan produksi eksopolisakarida oleh *Lactobacillus plantarum* NRLL B-4496 telah diteliti oleh Haroun dkk. (2013). Hasil produksi EPS sebesar 650 mg/L pada lama fermentasi 24 jam.

2.4.4 pH

pH merupakan salah satu parameter kritis lingkungan yang mempengaruhi total BAL dalam medium fermentasi, total asam laktat dan total eksopolisakarida kasar yang dihasilkan (Zubaidah, dkk., 2008). Produksi eksopolisakarida oleh *Lactobacillus plantarum* B2 pada produk probiotik berbasis buah murbei menghasilkan jumlah eksopolisakarida kasar paling tinggi yaitu 1955,78 mg/mL pada pH 4,33 (Zubaidah, dkk., 2008). Kimmel, dkk. (1998) menyebutkan bahwa produksi eksopolisakarida optimum dari isolat *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR adalah pada pH 5,0 dengan jumlah eksopolisakarida kasar sebesar 30 g/L setelah diprediksikan sebelumnya sebesar 295 mg/L. produksi EPS oleh *Streptococcus thermophilus* 1275 pada variasi pH 4,5, 5,5, dan 6,5 menghasilkan EPS tertinggi yaitu 458 mg/L pada pH 5,5 (Zisu dan Shah, 2003).

2.4.5 Konsentrasi Substrat

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

2.4.6 Konsentrasi Inokulum

Inokulum merupakan biakan bakteri yang dimasukkan kedalam media cair yang siap digunakan untuk fermentasi (Pelczar, dkk., 2007). Kadar inokulum pada

fermentasi menunjukkan pengaruh terhadap produk fermentasi. Hasil biosintesis EPS dengan variasi inokulum 1,0, 2,5, 5,0, 10, 15 dan 20 mL/L menghasilkan jumlah eksopolisakarida tertinggi yaitu 650 mg/L pada konsentrasi inokulum 10 mL/L (Haroun, dkk., 2013).

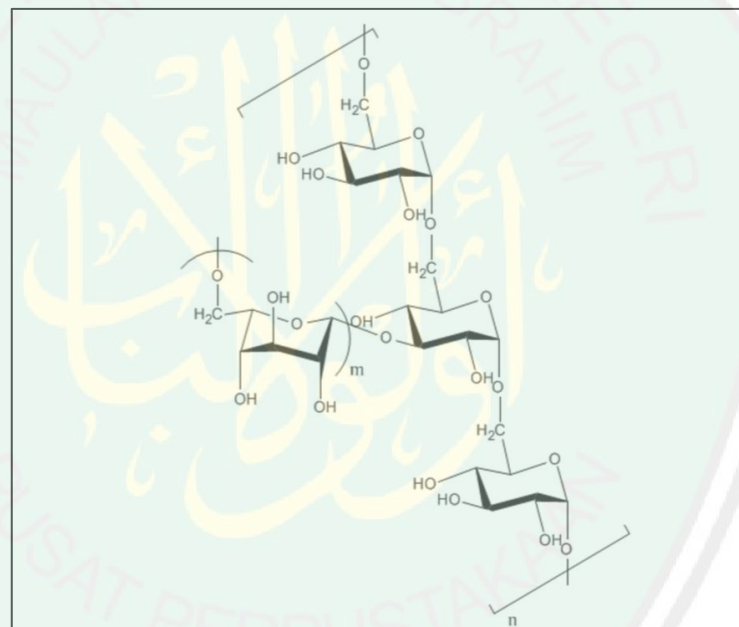
2.5 Eksopolisakarida

Eksopolisakarida (EPS) merupakan polimer dari gula pereduksi dengan berat molekul tinggi yang disekresikan oleh mikroorganisme ke lingkungan eksternalnya. Polimer ini merupakan salah satu polimer yang mampu disintesis oleh bakteri asam laktat. EPS umumnya terdiri dari monosakarida dan beberapa substituen non-karbohidrat seperti asetat, piruvat, suksinat, dan fosfat (Van Hijum, dkk., 2002) juga biomolekul seperti protein, asam nukleat, lipid dan zat humat (Vu, dkk., 2009).

EPS biasanya dihasilkan oleh bakteri asam laktat yang merupakan ciri kontribusi bakteri ini sebagai probiotik yang memiliki efek positif bagi kesehatan (Suresh dan Mody, 2009). Polimer ini memiliki daya bioaktivasi yang dapat digunakan dalam penggunaan obat seperti fungsinya sebagai anti virus, anti inflamasi (Llamas, dkk., 2010). EPS dalam industri makanan dapat berfungsi sebagai pengental, pembuatan gel hingga pengemulsi. Beberapa EPS yang telah banyak digunakan dalam bidang kesehatan diantaranya β -glukan, β -mannan, xanthan, curdlan, gellan, dan dekstran (Malik dkk, 2008). Struktur eksopolisakarida sangat beragam, beberapa jenis eksopolisakarida antara lain :

1. 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 10–150 kDa. Dekstran dalam bidang kesehatan memiliki fungsi yang beragam seperti anti inflamasi, anti trombotik, anti koagulan, hingga memiliki peran yang penting sebagai intraarterial dan intravenous (Veronese and Caliceti, 2006).

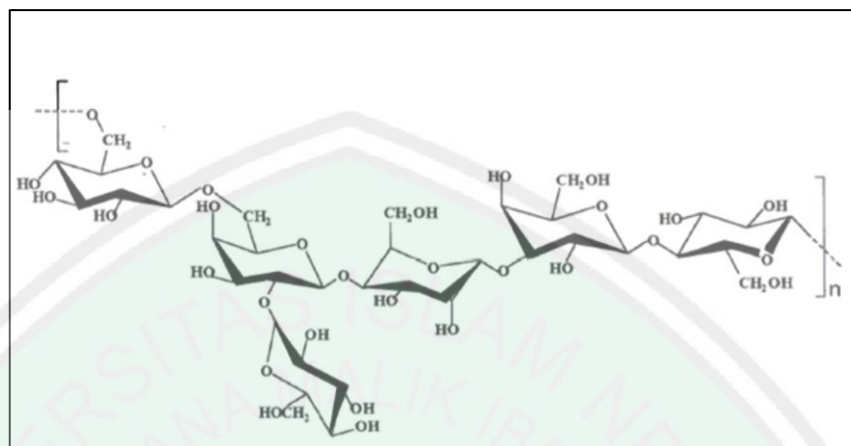


Gambar 2.5.1 Struktur Dekstran (Lapasin, 1999)

2. Kefiran

Kefiran merupakan kapsular polisakarida yang diproduksi oleh strain *Lactobacillus* pada pembuatan susu fermentasi kefir. Struktur polimer kefiran dibentuk dari monomer D-glukosa atau heteropolisakarida D-galaktosa yang mengalami percabangan pada dua unit rantai serta delapan

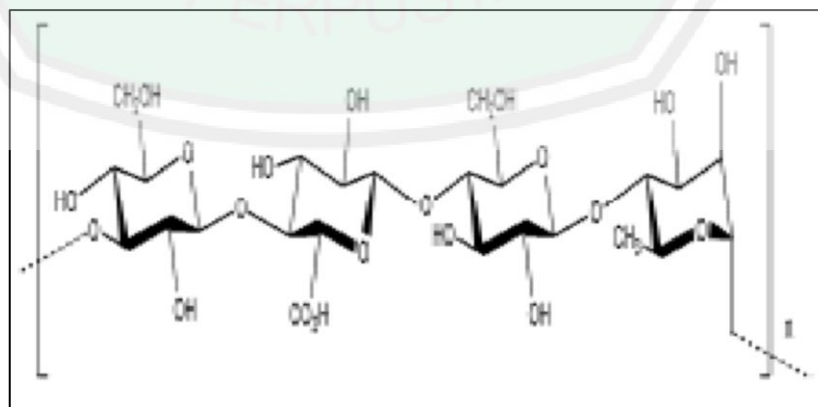
unit rantai. Polimer ini menunjukkan aktivitas anti bakteri, anti jamur, dan anti kanker (Vu, dkk., 2009).



Gambar 2.5.2 Struktur Kefiran (Micheli, dkk., 1999)

3. Gellan

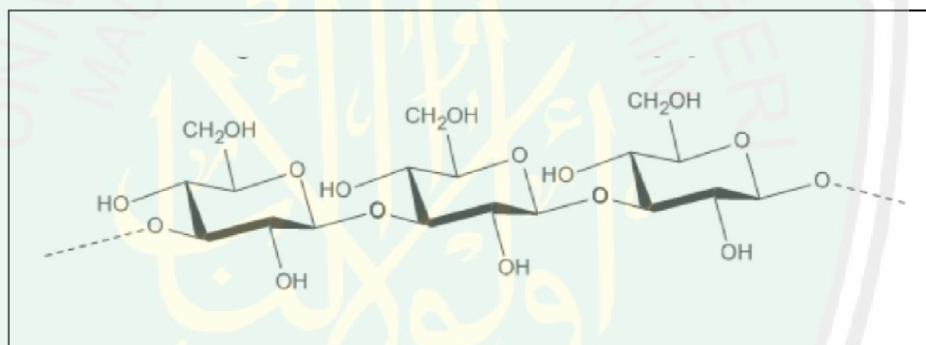
Gellan merupakan polimer linier yang bermuatan negatif (anionik polisakarida). Polimernya tersusun dari perulangan tetrasakarida unit yang merupakan kombinasi antara dua molekul glukosa dengan asam D-glukoronat atau L-ramnosa. Gellan biasanya digunakan untuk mensubstitusi agar, juga dapat digunakan sebagai eksipien obat sebagai bagian dari *drug delivery system* (Vu, dkk., 2009; Fialho, dkk., 2008).



Gambar 2.5.3. Struktur Gellan (Lapasin, 1999)

4. Curdlan

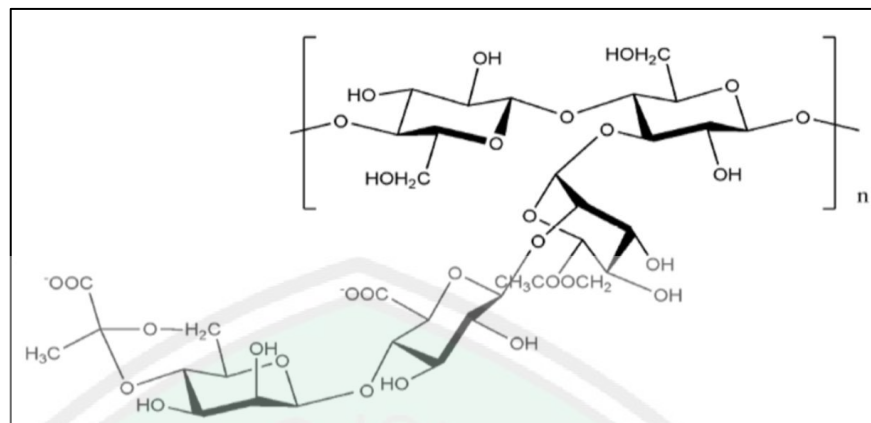
Curdlan merupakan polimer linier yang terbentuk dari ikatan β -1,3-glikosidik dari D-glukosa. Polimer ini bersifat sangat larut dalam air. Curdlan dapat dihasilkan dari bakteri strain *Alcaligenes faecalis* dan juga *Agrobacterium*. Keunikan curdlan adalah sifat gelnya yang elastis ketika dipanaskan pada suhu di atas 55 °C, sehingga sering digunakan untuk memperbaiki tekstur makanan dan dalam bidang farmasi dijadikan sebagai polimer yang berfungsi sebagai eksipien *drug delivery* (Rehm, 2009; Gumadi, dkk., 2005).



Gambar 2.5.4. Struktur Curdlan (Jin, dkk., 2010)

5. Xanthan

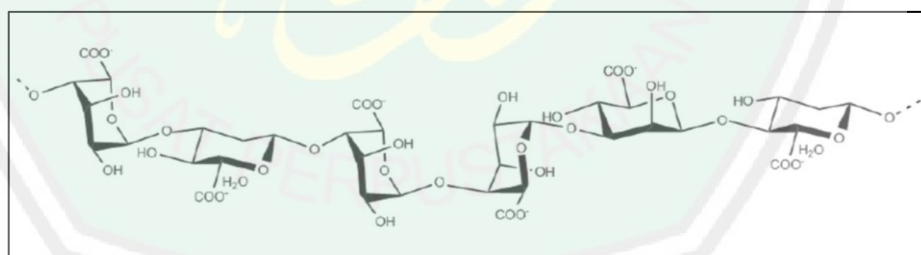
Xanthan merupakan heteropolimer anionik yang disusun oleh glukosa dengan rantai samping trisakarida dari α -D-manosa yang memiliki gugus asetil. Xanthan diproduksi oleh strain *Xanthomonas* dengan berat molekul yang sangat besar (Rehm, 2009). Sifat yang ditunjukkan xanthan adalah pseudoplastik dan pengemulsi yang stabil, sehingga kegunaannya sangat luas dibidang industri makanan, kosmetik, maupun farmasi (Sutherland, 1999).



Gambar 2.5.5. Struktur Xanthan (Sutherland, 2001)

6. Alginat

Alginat merupakan homopolimer linier dari kopolimer D-manuronat yang membentuk ikatan β -1,4-glikosidik dan epimer α -L-glukoronat. Alginat banyak ditemukan pada tumbuh-tumbuhan terutama rumput laut. Alginat dalam bidang farmasi digunakan untuk eksipien (gavicson, bisodol dan asilone) dan dapat membentuk gel yang stabil. Sediaan bahan obat yang banyak beredar di pasaran adalah kalsium alginat (Raymond, 2009).

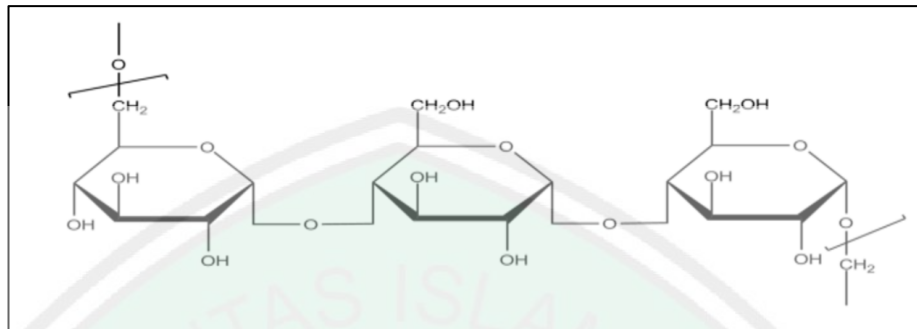


Gambar 2.5.6. Struktur Alginat (Ertesvag, 1998)

7. Pullulan

Pullulan merupakan polimer yang tersusun atas unit maltotriosa. Ikatan yang terdapat pada unit maltotriosa adalah α -1,4-glikosidik, sedangkan unit-unit maltotriosa dihubungkan dengan ikatan α -1,6-glikosidik.

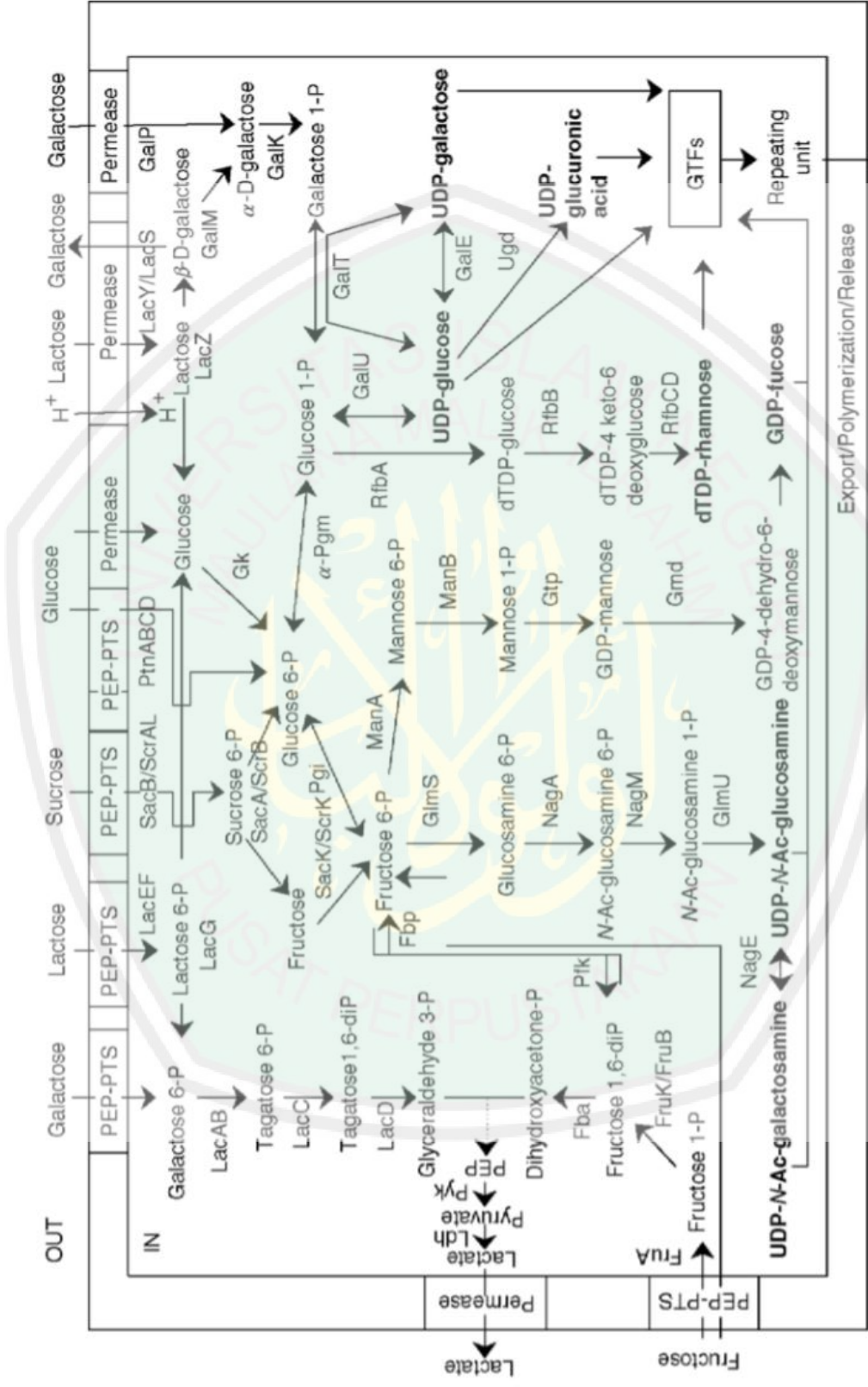
Penggunaan pullulan yang paling dikenal adalah pada produk-produk yang berhubungan dengan penyegar dan pembersih mulut (Raymond, 2009).



Gambar 2.5.7. Struktur Pullulan (Vu, dkk., 2009)

2.6 Biosintesis Eksopolisakarida

EPS disintesis oleh bakteri gram-positif atau gram-negatif, melalui dua mekanisme yang sangat berbeda. EPS Bakteri gram-positif (seperti: levan, alternan dan dextran) disintesis oleh proses ekstraseluler (Vanhooren, dkk., 1998) tapi pada bakteri gram-negatif, EPS disintesis secara intraseluler (seperti: xanthan, gellan, selulosa, suksinoglikan) (Sutherland, 2001). Berikut adalah gambar jalur biosintesis EPS:



Gambar 2.5.8 Jalur Biosintesis EPS (De Vuyst, dkk. 2007)

Biosintesis EPS jenis heteropolisakarida (HePS) menggunakan substrat berupa sukrosa terdiri atas beberapa tahapan. Substrat sukrosa diubah menjadi sukrosa 6-P melalui jalur *Phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system* (PEP-PTS), kemudian dihidrolisis menjadi fruktosa dan glukosa 6-P yang dikatalisis oleh enzim SacA/ScrB (sukrosa 6-fosfat hidrolase), fruktosa dan glukosa 6-P tersebut dapat diubah menjadi fruktosa 6-P dengan katalis enzim SacK/ScrK (6-fruktokinase). Fruktosa 6-P menjadi glukosamin 6-P dengan katalis enzim GlmS (glutamin-fruktosa 6-fosfat transaminase), glukosamin 6-P menjadi N-asetil-glukosamin 6-P dengan katalis enzim NagA (N-asetilglukosamin 6-fosfat deasetilase), N-asetilglukosamin 6-P menjadi N-asetilglukosamin 1-P dengan katalis enzim NagM (N-asetilglukosamin fosfomutase), N-asetilglukosamin 1-P menjadi UDP-N-asetilglukosamin dengan katalis enzim GlmU (UDP-N-asetilglukosamin pirofosforilase), UDP-N-asetilglukosamin melakukan pengulangan unit baik rantai maupun cabang dengan bantuan Glikosiltransferase. Setelah terjadi penggabungan, selanjutnya polisakarida yang terbentuk dikeluarkan dari sel dan terlarut di media fermentasi.

Biosintesis HePS melalui pengubahan Fruktosa 6-P menjadi mannosa 6-P dengan katalis enzim MannA (mannosa 6-fosfat isomerase), kemudian mannosa 6-P menjadi mannosa 1-P dikatalisis oleh enzim mannB (fosfomannomutase), mannosa 1-P menjadi GDP-mannosa dikatalisis oleh enzim Gtp (mannosa 1-fosfat guaniltransferase), GDP-mannosa menjadi GDP-4-dehidro-6-deoksimannosa dikatalisis oleh enzim Gmd (GDP-mannosa-4,6-dehidratase), GDP-4-dehidro-6-deoksimannosa menjadi GDP fukosa dikatalisis oleh enzim GDP-fukosa sintase, kemudian nukleotida gula berupa GTF (glikosiltransferase) berperan untuk

menggabungkan monosakarida-monosakarida yang melakukan pengulangan unit hingga membentuk HePS.

Biosintesis intraseluler diatur oleh enzim yang terletak pada berbagai bagian sel (Gambar 2.5.8.). Pada sitoplasma, glukosa-1-fosfat dikonversi ke molekul utama pada sintesis eksopolisakarida, uridin difosfat glukosa (UDP-glukosa). Setelah itu, pada membran periplasmik sel, glikosiltransferase mentransfer gula nukleosida difosfat (NDP) untuk membentuk pengulangan unit melekat pada sebuah lipid pembawa glikosil. Kemudian makromolekul dipolimerisasi dan disekresikan dalam bentuk eksopolisakarida (Kumar, dkk., 2007).

2.7 Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus* termasuk golongan organisme food-grade yang memiliki status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) dan diketahui memproduksi sejumlah jenis molekul ekstraseluler polisakarida (EPS) yang berkontribusi untuk tekstur pada makanan fermentasi. EPS dibagi dua golongan yaitu homopolisakarida dan heteropolisakarida. EPS dari bakteri ini memungkinkan pengembangan generasi baru dari *food-grade* polisakarida. Bakteri asam laktat juga sering berkontribusi positif pada rasa, bau, atau preservasi dari produk akhir (Van Hijum, dkk., 2002; De Vuyst, dkk., 2001).

Bakteri Asam Laktat (BAL) telah digunakan secara luas dalam industri pangan sebagai kultur starter untuk berbagai ragam fermentasi daging, susu, sayuran, roti, atau produk bakteri. Bakteri asam laktat dikenal pula sebagai agen biokontrol untuk meningkatkan keamanan pangan olah minimal yang direfrigerasi

tanpa penambahan asam (Rahmadi, dkk., 2002). Peranan bakteri asam laktat adalah untuk memperbaiki cita rasa, tetapi bakteri asam laktat ini ternyata juga memiliki efek pengawetan pada produk fermentasi yang dihasilkan. Bakteri asam laktat dapat memproduksi dan melakukan sekresi berupa senyawa penghambat selain asam laktat dan asam asetat, seperti hidrogen peroksida, bakteriosin, antibiotik, dan reuterin yang kurang dikenal atau belum terungkap kemampuannya sebagai senyawa penghambat.

Bakteri asam laktat bersifat Gram-positif, tidak membentuk spora dan dapat berbentuk koki, kokobasili atau batang, dan mempunyai komposisi basa DNA kurang dari 50 % mol G + C. Pada umumnya tidak mempunyai katalase, walupun katalase semu dideteksi dalam kultur yang ditumbuhkan pada konsentrasi gula rendah, dan membutuhkan karbohidrat yang dapat difermentasi untuk pertumbuhannya (Jenie, 1996, Djide, 2005). Glukosa akan dikonversi menjadi asam laktat (homofermentatif), atau karbon dioksida, etanol, atau menjadi asam asetat (heterofermentatif).

2.7.1 Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida

Bakteri asam laktat terutama dari genus *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, dan *Streptococcus* telah digunakan secara tradisional sebagai kultur starter untuk fermentasi makanan dan minuman karena kontribusinya terhadap pembentukan citarasa dan aroma serta penghambatan kerusakan (Jenie, 1996). Kontribusi terhadap sifat-sifat organoleptik dan pengawetan dilakukan dengan memproduksi secara in situ senyawa-senyawa seperti asam laktat dan asetat, hidrogen proksida, bakteriosin, dan lain-lain.

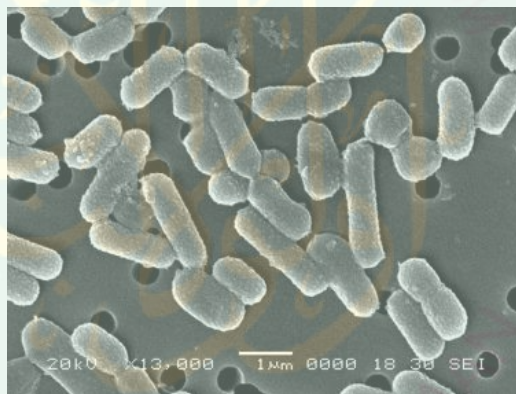
Terdapat kira-kira 30 spesies *Lactobacillus* yang dapat memproduksi EPS. Diantaranya adalah *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. johnsonii* dll. Spesies bakteri tersebut dikultivasi antara 30 sampai dengan 37 °C pada media MRS (Man Rogosa Sharp), susu atau turunannya (Badel, dkk., 2011). Turunan susu (media berbasis laktosa) dan MRS (media berbasis glukosa) adalah media yang paling disarankan untuk memproduksi EPS menggunakan *Lactobacillus*. Adanya media karbohidrat kompleks terutama dalam ekstrak ragi menegaskan bahwa media kompleks tidak tepat jika digunakan sebagai media untuk ekstraksi polisakarida dan analisis (Cerning, dkk., 1992). Beberapa jenis bakteri asam laktat penghasil EPS yang telah diteliti oleh beberapa peneliti kurun waktu 10 tahun terakhir dapat dilihat pada Tabel 2.7.1.

Tabel 2.7.1 Kondisi fermentasi untuk menghasilkan EPS

Strain Bakteri	Karakter Fermentasi	Produk EPS	Referensi
<i>Lactobacillus plantarum</i> 70810	Semi-Defined Broth dengan suhu 31°C selama 24 jam	641,7 mg/L	Wang, dkk., 2014
<i>Nostoc carneum</i>	Media 200 mL BG11, dengan suhu 30°C selama 49 hari	1210 mg/L	Hussein, dkk., 2015
<i>Micrococcus luteus</i>	Medium cair yang mengandung 30 g sukrosa, 1,0 g ekstrak daging sapi, 0,5 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2,5 g K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O, 2,5 g KH ₂ PO ₄ , 1,0 g NaCl, 0,2 g MgSO ₄ .7H ₂ O, dan 0,001 g FeSO ₄ .7H ₂ O dalam 1000 mL air pada pH 7,0 dengan suhu 30°C selama 5 hari	13600 mg/L	Asker, dkk., 2014
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MRS yang disuplementasi oleh gula (20 g/L: glukosa, galaktosa, sukrosa maltosa, laktosa) yang dikultivasi dalam bioreaktor 1,5 L	Glukosa: 130,08 mg/L Galaktosa: 81,08 mg/L Laktosa: 219,25 mg/L Sukrosa: 31,55 mg/L Maltosa: 37,37 mg/L	Berecka, dkk., 2013
<i>Pleurotus eryngii</i> SI-02	Media cair mengandung 200 g/L ekstrak kentang 20 g/L, glukosa 20 g/L, ekstrak ragi 3 g/L, pepton 0,3 g/L, KH ₂ PO ₄ 1,5 g/L, dan MgSO ₄ .7H ₂ O 1 g/L dengan pH alami dan diinkubasi pada 25°C selama 24 jam tanpa pengocokan	6150 mg/L	Sun, dkk., 2013

2.7.2 *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum adalah bakteri gram-positif, non patogen yang secara alami terdapat dalam air liur manusia dan sistem pencernaan. Bakteri ini termasuk ke dalam Bakteri Asam Laktat (BAL), dan secara umum digunakan pada fermentasi makanan. Jika digunakan sebagai probiotik, aplikasi bioterapi dari *Lactobacillus plantarum* meningkat. *Lactobacillus plantarum* berbentuk batang, dan mempunyai genom yang terbesar dibandingkan dengan BAL lainnya yang telah disekuensi. BAL ini dapat hidup dengan oksigen atau tanpa oksigen (fakultatif anaerobik) dan dapat merubah oksigen menjadi hidrogen peroksida pada jalur mangan-dependen (Jiang, dkk., 2016).



Gambar 2.7.2 Bakteri *Lactobacillus plantarum* (Arasu, dkk., 2015)

Genus bakteri ini juga bersifat mikroaerofilik, katalase negatif, gram positif dan memfermentasi gula dengan asam laktat sebagai produk utama. Berikut adalah

Klasifikasi ilmiah dari *L. plantarum*:

Kerajaan	:	Bacteria
Divisi	:	Firmicutes
Kelas	:	Bacilli
Ordo	:	Lactobacillales
Famili	:	Lactobacillaceae
Genus	:	<i>Lactobacillus</i>
Spesies	:	<i>L. plantarum</i>

2.8 Pengukuran Brix

Derajat brix adalah jumlah zat padat semu yang larut (satuan gram) dalam setiap 100 g larutan (Kuswurj, 2008). Diperlukan suatu alat ukur untuk mengetahui banyaknya zat padat yang terlarut dalam larutan (brix). Adapun pengukuran brix dapat dilakukan dengan berbagai cara sebagai berikut (Kuswurj, 2008):

1. Pengukuran brix dengan piknometer

Prinsip pengukuran brix dengan piknometer adalah dengan mengetahui volume piknometer pada suhu tertentu, maka kerapatan suatu zat dapat dihitung dengan membandingkan massa zat dengan volume piknometer. Alat ini terbuat dari gelas berbentuk seperti botol kecil dilengkapi dengan tutup lubang kapiler. Alat ini mempunyai volume tertentu dan dibuat sedemikian sehingga pada t° yang sama selalu terukur volume yang sama (Kuswurj, 2008).



Gambar 2.8.1. Piknometer

2. Penentuan brix dengan hidrometer (timbangan brix)

Alat ini paling umum digunakan di pabrik, karena pemakaiannya mudah dan cepat. Terbuat dari bahan gelas, berbentuk silindris yang bagian bawahnya berbentuk bola. Pada bagian atas meruncing dan terdapat skala yang menunjukkan derajat brix. Prinsip kerjanya adalah bahwa gaya ke atas yang dialami oleh suatu benda yang dicelupkan dalam cairan tergantung dari berat jenis cairan. Jadi semakin kecil berat jenis maka hidrometer semakin tenggelam. Kemudian brix akan ditunjukkan pada skala yang berada di permukaan cairan tersebut (Kuswurj, 2008).



Gambar 2.8.2. Hidrometer

3. Pengukuran brix dengan refraktometer

Menurut Kuswurj (2008), indeks bias suatu larutan gula atau nira mempunyai hubungan yang erat dengan brix. Indeks bias nira yang diukur, dapat digunakan untuk menghitung brix nira. Alat untuk mengukur brix dengan indeks bias disebut refraktometer. Kelebihan alat ini adalah sampel nira yang digunakan sedikit dan alatnya tidak mudah rusak. Metode pengukuran brix dengan refraktometer dipilih dalam penelitian ini karena dapat dilakukan dengan cepat dan mudah, dalam skala laboratorium. Kekurangan dalam metode ini adalah akan menjadi sangat tidak efektif dalam skala industri.

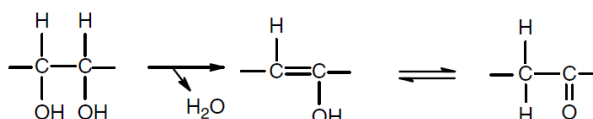


Gambar 2.8.3. *Hand Brix Refractometer*

2.9 Pengukuran Kadar Total Gula Menggunakan Metode Sulfat-Fenol

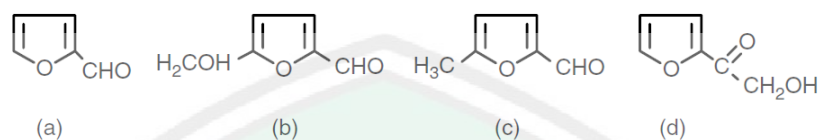
Metode kimia yang diterapkan pada penentuan gula total adalah metode sulfat-fenol dan metode anthron, merupakan metode klasik dengan sejarah yang panjang dalam penggunaannya, walaupun begitu metode sulfat-fenol lebih populer dibandingkan dengan metode anthrone. Metode sulfat-fenol dapat dimanfaatkan untuk menentukan kadar glukosa dalam sampel (Brummer, 2005).

Gula merupakan golongan karbohidrat. Apabila karbohidrat ditambahkan asam kuat dan dipanaskan, karbohidrat tersebut akan mengalami serangkaian reaksi yang mengarah pada pembentukan derivat furan seperti furanaldehid dan hidroksimetil furaldehida. Reaksi awal yaitu reaksi dehidrasi diikuti dengan pembentukan turunan furan (Brummer, 2005). Reaksi dehidrasi karbohidrat dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.9.1. Reaksi dehidrasi karbohidrat

Senyawa turunan furan yang terbentuk tergantung pada jenis karbohidrat yang ada. Turunan furan yang terbentuk dapat dilihat pada gambar 2.9.2



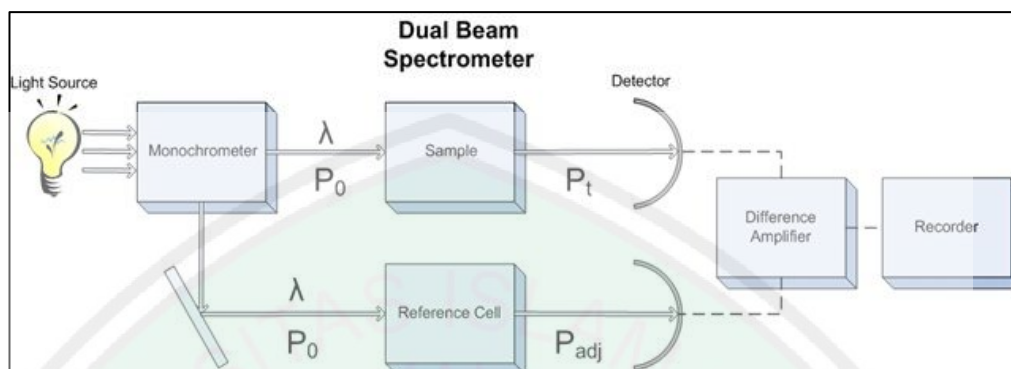
Gambar 2.9.2. (a) Pentosa, (b) Heksosa, (c) 6-dioksiheksosa, (d) Keto-heksosa

Prinsip dasar dari metode ini adalah bahwa karbohidrat, ketika didehidrasi melalui reaksi dengan asam sulfat pekat, menghasilkan turunan furfural. Reaksi selanjutnya antara turunan furfural dan fenol menghasilkan warna yang dapat dideteksi (Albalasmeh, 2013).

2.10 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer yang sesuai untuk pengukuran di daerah spektrum ultraviolet dan sinar tampak terdiri atas suatu sistem optik dengan kemampuan menghasilkan sinar monokromatis dalam jangkauan panjang gelombang 200–800 nm (Gandjar dan Rohman, 2007). Senyawa organik mampu mengabsorpsi cahaya, sebab semua senyawa organik mengandung elektron valensi yang dapat dieksitasi ke tingkat energi yang lebih tinggi. (Melanti, 2013). Penyelidikan spektroskopi senyawa-senyawa organik dilakukan pada daerah ultraviolet yang panjang gelombangnya lebih besar dari 185 nm. Pengabsorbsian sinar ultraviolet dan sinar tampak yang panjang gelombangnya lebih besar terbatas pada sejumlah gugus fungsional yang mengandung elektron valensi dengan energi eksitasi rendah (Pertiwi, 2009).

Berikut adalah gambar diagram skematis spektrofotometer UV-Vis (Gandjar dan Rohman, 2007):



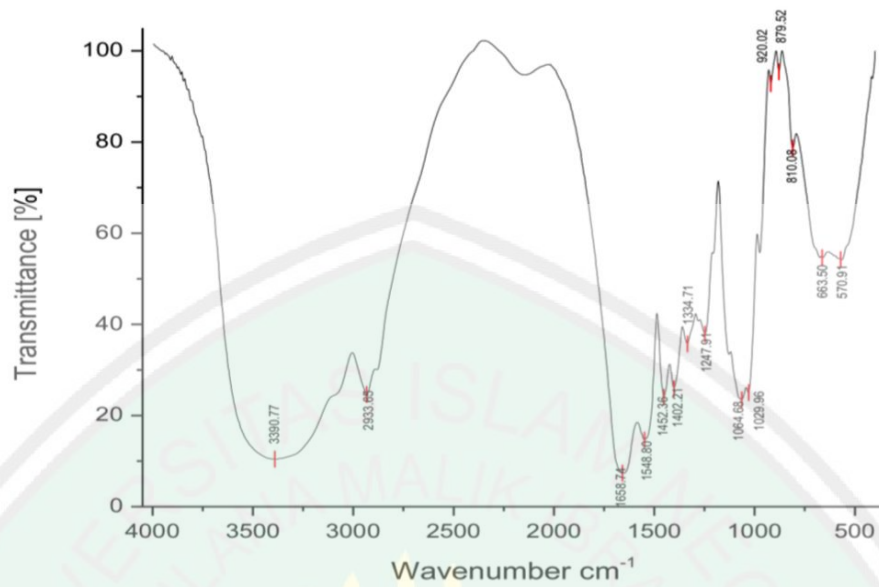
Gambar 2.10. Bagian-bagian spektrometer UV-Vis *double beam*

- 1) Sumber-sumber lampu; lampu-lampu yang digunakan untuk daerah UV pada panjang gelombang 190–350 nm, sementara lampu halogen kuarsa atau lampu tungsten digunakan untuk daerah visible (pada panjang gelombang antara 350–900 nm).
- 2) Monokromator; digunakan untuk mendispersikan sinar ke dalam komponen-komponen panjang gelombangnya yang selanjutnya akan dipilih oleh celah (*slit*). Monokromator berputar sedemikian rupa sehingga kisaran panjang gelombang dilewatkan pada sampel sebagai scan instrument melewati spektrum.
- 3) Optik-optik; dapat didesain untuk memecah sumber sinar sehingga sumber sinar melewati dua kompartemen, dan sebagaimana dalam spektrofotometer berkas ganda (*double beam*). Suatu larutan blanko dapat digunakan untuk mengoreksi pembacaan atau spectrum sampel. Balnko yang paling sering digunakan adalah semua pelarut yag digunakan untuk melarutkan sampel atau pereaksi.

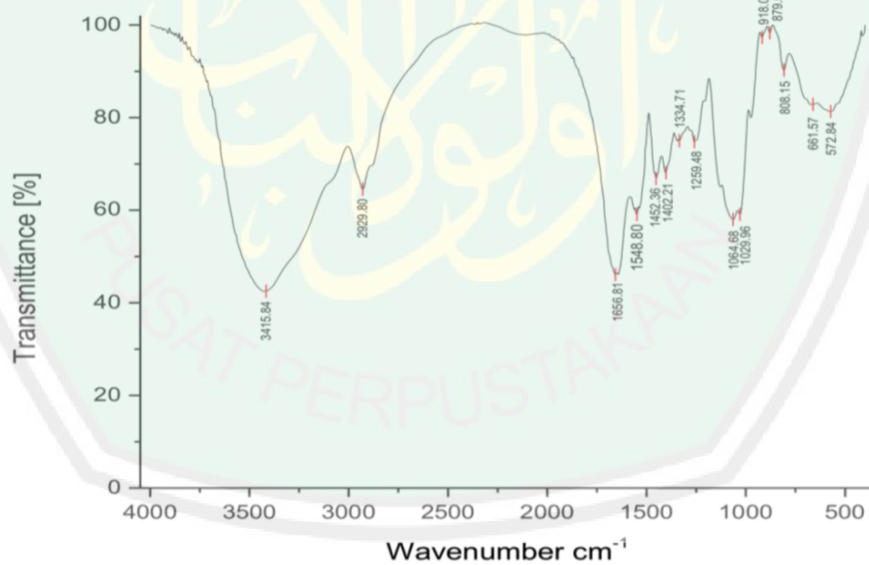
- 4) Detektor; berfungsi menangkap cahaya yang diteruskan dari sampel dan mengubahnya menjadi arus listrik. Detektor akan menangkap sinar yang diteruskan oleh larutan. Sinar kemudian diubah menjadi nyala listrik oleh amplifier dan dalam rekorder dan ditampilkan dalam bentuk angka-angka pada reader (komputer). Detektor dapat memberikan respons terhadap radiasi pada berbagai panjang gelombang.
- 5) Read out; merupakan suatu sistem baca yang menangkap besarnya isyarat listrik yang berasal dari detektor.

2.11 Analisis Eksopolisakarida Menggunakan *Fourier Transform Infra Red* (FTIR)

Analisis spektra menggunakan FTIR berfungsi untuk menentukan gugus fungsi yang terdapat dalam eksopolisakarida. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa dalam eksopolisakarida yang diproduksi oleh *Lactobacillus plantarum* mengandung beberapa gugus fungsi. Hasil analisis Eksopolisakarida yang diproduksi oleh *Lactobacillus plantarum* BC-25 dengan penambahan Se atau tanpa Se menggunakan *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) pada penelitian Zhou, dkk., (2016) ditunjukkan pada gambar berikut:



Gambar 2.11.1 Spektra FTIR eksopolisakarida dengan penambahan Se

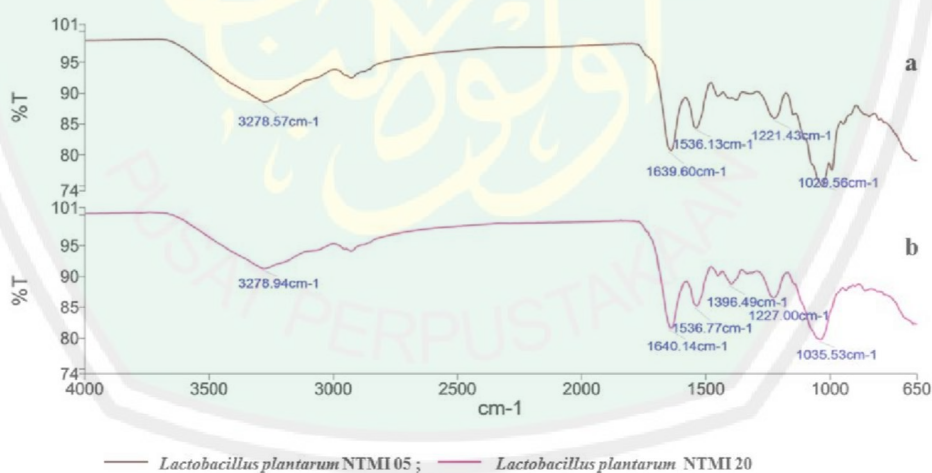


Gambar 2.11.2 Spektra FTIR eksopolisakarida tanpa penambahan Se

Puncak yang muncul sekitar $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ adalah gugus hidroksil (O-H) (Kanmani, dkk., 2011). Puncak pada 2930 cm^{-1} berhubungan dengan vibrasi peregangan C-H pada cincin gula. Puncak pada 1650 cm^{-1} termasuk vibrasi peregangan dari ikatan C=O, dan puncak pada 1064 cm^{-1} adalah puncak absorpsi

dari polisakarida. Puncak yang muncul pada daerah 1398 cm^{-1} sampai 1420 cm^{-1} , pada daerah 1335 cm^{-1} dan 1248 cm^{-1} berturut-turut adalah vibrasi peregangan C-O dan vibrasi bengkokan C-H dan vibrasi peregangan S=O. Absorpsi kuat yang tidak lebih dari daerah 950 cm^{-1} to 1200 cm^{-1} didominasi oleh cincin piranosa ikatan eter C-O-C dan vibrasi peregangan gugus hidroksil alkohol O-H (Ye, dkk., 2014). Absorpsi pada 1030 cm^{-1} menunjukkan glukosil (Patel, dkk., 2012), absorpsi pada 879 cm^{-1} dan 810 cm^{-1} berhubungan dengan adanya mannosa.

Sedangkan penelitian lainnya mengungkapkan bahwa analisis spektra FTIR dari eksopolisakarida yang diproduksi oleh *Lactobacillus plantarum* NTMI05 menunjukkan adanya peregangan yang luas pada daerah $3275,62\text{ cm}^{-1}$ (gugus O-H), dimana hal ini mewakili vibrasi peregangan dari gugus karboksil karbohidrat.



Gambar 2.11.3 (a) spektra FTIR eksopolisakarida yang diproduksi oleh *L. plantarum* NTMI05, (b) spektra FTIR eksopolisakarida yang diproduksi oleh *L. plantarum* NTMI20

Peregangan gugus C-C ditunjukkan melalui pita absorpsi pada 1637.25 cm^{-1} (Gambar 2.11.3. a). Pita absorpsi pada daerah $1320\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$, biasanya mewakili vibrasi peregangan dari gugus alkohol, asam karboksilat, ester dan eter

(C-O), dimana seluruhnya identik dengan puncak absorpsi dari polisakarida. Pita absorpsi tajam pada $1026,46\text{ cm}^{-1}$ mewakili vibrasi peregangan C-O. Daerah frekuensi dari 1200 sampai 800 cm^{-1} adalah daerah fingerprint dan dapat digunakan untuk mengkarakterisasi polisakarida yang berbeda. Pita absorpsi pada 1218 cm^{-1} biasanya mewakili vibrasi peregangan dari C alkohol, asam karboksilat, ester dan eter. Spektra FTIR dari EPS yang diproduksi oleh *L. plantarum* NTMI20 ditunjukkan pada gambar 2.11.3 (b). pita absorpsi sekitar 3283.87 cm^{-1} (gugus O-H), 1644.56 cm^{-1} (gugus C=C), 1216.13 cm^{-1} (gugus C-O), 1409.87 , (C-C) dan 1025.53 (gugus C-O) adalah puncak absorpsi dari polisakarida.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei–November 2016 di Laboratorium Bioteknologi, Laboratorium Instrumentasi UV-Vis, Laboratorium Instrumentasi FTIR Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas beker 500 mL, pipet ukur 5 mL dan 10 mL, pipet tetes, gelas ukur 100 mL, erlenmeyer 250 mL, labu ukur 10 mL, 25 mL, dan 100 mL, bola hisap, botol semprot, spatula, gelas arloji, batang pengaduk, korek api, bunsen spiritus, kawat ose, corong gelas, cawan petri, penangas air, mikro pipet, *blue tip*, *hot plate*, tabung reaksi, rak tabung, tabung sentrifuge, sentrifuge, *magnetic stirrer*, *autoclave*, *shaker incubator*, lemari asap, oven, lemari es, *laminar air flow*, *vortex*, UV–Vis dan FTIR.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tetes tebu yang diperoleh dari limbah Pabrik Gula Kribet Malang, MRSA (*de Mann Rogose Sharpe Agar*) MRSB (*de Mann Rogose Sharpe Broth*), urea, etanol PA 96%, alkohol 70% untuk desinfektan, kertas saring halus, fenol 5%, H₂SO₄ 98%, NaOH 0,5 N, H₂C₂O₄ 0,5 N, NaCl, KBr, aquades, kapas, kertas label, aluminium foil, plastik wrap, plastik, karet, dan starter *Lactobacillus plantarum*.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini terdiri dari dua tahap. Tahap pertama merupakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) faktorial 2x3. Faktor pertama adalah variasi suhu (S₁= 25 °C, S₂= 30 °C, S₃=35 °C) dan faktor kedua adalah variasi lama fermentasi (L₁= 18 jam, dan L₂= 24 jam). Perlakuan dilakukan pengulangan

sebanyak tiga kali. Kombinasi perlakuan suhu dan lama fermentasi digambarkan pada Tabel 3.3.

Tabel 3.3 Kombinasi Perlakuan antara Suhu dengan Lama Fermentasi

L \ S	L ₁ =18 jam	L ₂ =24 jam
S ₁ =25 °C	S ₁ L ₁	S ₁ L ₂
S ₂ =30 °C	S ₂ L ₁	S ₂ L ₂
S ₃ =35 °C	S ₃ L ₁	S ₃ L ₂

Tahap kedua dari penelitian ini adalah deskriptif eksploratif untuk mengetahui komposisi senyawa gula beserta strukturnya dari hasil analisis menggunakan FTIR.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah suhu dan lama fermentasi, sedangkan variabel terikatnya adalah kadar eksopolisakarida, kadar total gula eksopolisakarida dan kadar gula terpakai selama fermentasi. Sampel tetes tebu diukur brixnya dan dibuat konsentrasi 18 % (v/v), kemudian dilakukan perhitungan kadar total gula menggunakan metode sulfat fenol. Setelah mengetahui kadar total gula yang terkandung dalam sampel tetes tebu sebelum fermentasi, dilakukan uji pengaruh suhu dan lama fermentasi terhadap produksi eksopolisakarida. Selanjutnya dilakukan perhitungan kadar gula sisa fermentasi untuk mengetahui kadar gula terpakai oleh *Lactobacillus plantarum* dalam proses fermentasi, kemudian dilakukan identifikasi komposisi senyawa gula penyusun eksopolisakarida dengan randemen tertinggi. Proses identifikasi komposisi senyawa gula penyusun dalam eksopolisakarida hasil produksi dengan randemen tertinggi dilakukan menggunakan instrumen *Fourier Transform Infra Red* (FTIR).

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui tahapan-tahapan berikut:

1. Preparasi sampel;
2. Analisis kadar total gula metode Fenol H₂SO₄;
3. Preparasi Bakteri *Lactobacillus plantarum*;

4. Uji pengaruh suhu dan lama fermentasi terhadap produksi eksopolisakarida;
5. Isolasi eksopolisakarida;
6. Identifikasi gugus fungsi eksopolisakarida menggunakan *Fourier Transform Infra Red* (FTIR);
7. Analisis data.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1. Preparasi Sampel

3.5.1.1 Srerilisasi Alat

Seluruh alat gelas yang akan digunakan dalam penelitian dicuci dan dikeringkan terlebih dahulu. Kemudian dibungkus dengan aluminium foil atau ditutup dengan kapas dan plastik wrap. Semua alat gelas disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit.

3.5.1.2 Pengukuran Brix (Kultsum, 2009)

Sebanyak 3 mL tetes tebu dimasukkan ke dalam alat *hand brix refractometer*, yaitu pada celah antara prisma penutup yang kering dengan yang basah. Diamati garis antara gelap dengan terang tepat pada titik potong sumbunya. Skala (berupa angka) dapat diketahui dengan mengatur ketepatan batas antara gelap dan terang tersebut, serta tidak boleh terlihat garis pelangi di antaranya.

3.5.1.3 Preparasi Tetes Tebu

Tetes tebu yang telah diketahui nilai brixnya dibuat dengan konsentrasi 18 % (v/v). Tetes tebu dimasukkan ke dalam 18 erlenmeyer 250 mL, masing-masing erlenmeyer diisi sebanyak 100 mL dan ditambahkan urea sebanyak 0,3 %. Selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit.

3.5.2 Analisis Kadar Total Gula Metode Fenol H₂SO₄ (Dubois dkk., 1956)

3.5.2.1 Pembuatan Kurva Standar Glukosa dengan Metode Fenol H₂SO₄ (Dubois dkk., 1956)

Sebanyak 2 mL larutan glukosa standar yang mengandung 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm glukosa masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 mL larutan fenol 5 % (b/v) dan divortex. Kemudian 5 mL asam

sulfat pekat ditambahkan dengan cepat, divortex lalu tempatkan dalam penangas air selama 15 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 485 nm. Selanjutnya ditentukan nilai regresi linier.

3.5.2.2 Perhitungan Kadar Total Gula Tetes Tebu dengan Metode Fenol H_2SO_4 (Dubois dkk., 1956)

Dipipet tetes tebu sebanyak 2 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 mL larutan fenol 5 % (b/v) dan divortex. Kemudian 5 mL asam sulfat pekat ditambahkan dengan cepat. Dibiarkan selama 10 menit, divortex lalu ditempatkan dalam penangas air selama 15 menit. Absorbansinya diukur pada panjang gelombang 485 nm. Dihitung kadar total gula pada tetes tebu dengan mensubstitusikan absorbansi tetes tebu ke persamaan regresi linier dari kurva standar larutan glukosa standar dan ditentukan nilai total gula tetes tebu dengan rumus (Lestari, 2013):

$$Y = ax + b$$

Keterangan: Y = nilai absorbansi
 a = slope
 b = intersep
 x = kadar gula yang dicari (ppm)

3.5.3 Preparasi Bakteri *Lactobacillus plantarum*

3.5.3.1 Pembuatan Media MRSA

MRS Agar ditimbang Sebanyak 6,2 gram, dilarutkan ke dalam 100 mL aquades, dihomogenkan dengan *hot plate* dan *magnetic stirrer* sampai homogen dan mendidih. Larutan tersebut kemudian dituangkan sebanyak masing-masing 5 mL ke dalam tabung reaksi dan ditutup memakai *cotton plug* (sumbat kapas) dan plastik wrap, dilanjutkan dengan sterilisasi menggunakan autoklaf 121 °C tekanan 15 psi selama 15 menit. Kemudian disimpan pada cetakan papan miring selama 1 malam sampai memadat.

3.5.3.2 Pembuatan Media MRSB

MRS Broth ditimbang sebanyak 5,515 gram, dilarutkan ke dalam 100 mL aquades, dihomogenkan dengan *hot plate* dan *magnetic stirrer* sampai homogen. Larutan tersebut kemudian dituangkan masing-masing sebanyak 50 mL ke dalam labu erlenmeyer 100 mL, ditutup memakai *cotton plug* (sumbat kapas) dan plastik

wrap, dilanjutkan dengan sterilisasi menggunakan autoklaf 121 °C tekanan 15 psi selama 15 menit.

3.5.3.3 Peremajaan *Lactobacillus plantarum* (Nudyanto dan Zubaidah, 2015)

Kultur diambil dua ose dan ditumbuhkan pada 5 mL media MRSA padat posisi miring, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Kultur tersebut dapat langsung digunakan dan diremajakan setiap dua minggu sekali. *L. plantarum* yang telah diremajakan digunakan untuk pembuatan stok inokulum.

3.5.3.4 Pembuatan Stok Inokulum (Kultsum, 2009)

Lactobacillus plantarum yang sudah diregenerasi diambil sebanyak 2 ose, dimasukkan ke dalam 100 mL media MRSB, ditutup dengan *cotton plug* (sumbat kapas) dan plastik wrap, kemudian dishaker dengan kecepatan 100 rpm pada suhu 30 °C selama 24 jam.

3.5.3.5 Pengukuran *Optical Density* (Yuliana termodifikasi, 2008)

Pengukuran OD menggunakan metode turbiditas dengan cara kultur diambil sebanyak 4 mL pada media MRSB, kemudian OD diamati menggunakan instrumen UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm. Hasil pengukuran OD diencerkan sampai nilai OD 0,5.

3.5.3.6 Pengukuran *Total Plate Count* (TPC) (Fardiaz termodifikasi, 1989)

Pengukuran TPC dilakukan dengan metode sebar, sebanyak 1 mL kultur pada media MRSB diinokulasikan ke dalam cairan NaCl fisiologis 0,85 % dengan metode pengenceran bertingkat mulai dari pengenceran 10^{-1} sampai dengan pengenceran 10^{-10} . Kemudian penanaman ke media MRSA dimulai dari pengenceran 10^{-3} sampai pengenceran 10^{-10} dan diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam.

3.5.4 Uji Pengaruh Suhu dan Lama Fermentasi Terhadap Produksi Eksopolisakarida dari Tetes Tebu (Trabelsi, dkk. termodifikasi, 2014)

Sebanyak 100 mL tetes tebu yang telah disterilisasi ditambahkan inokulum *Lactobacillus plantarum* sebanyak 10 %, kemudian dishaker dengan kecepatan 100 rpm selama waktu inkubasi (18 dan 24 jam) dan variasi suhu (25, 30 dan 35 °C).

3.5.5 Isolasi Eksopolisakarida (Nudyanto dan Zubaidah, 2015)

Sebanyak 25 mL sampel dimasukkan ke tabung sentrifuge 50 ml, kemudian disentrifugasi pada 5000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang mengandung EPS dari sel bakteri selanjutnya diendapkan dengan etanol dingin (96 %) (2 kali dari volume) selama semalam. Berikutnya disentrifugasi pada 5000 rpm selama 25 menit. Pellet yang diperoleh dikeringkan pada suhu 105 °C selama 15 menit lalu ditimbang berat kering EPS dan ditentukan randemennya dengan rumus:

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

3.5.6 Identifikasi Gugus Fungsi Eksopolisakarida Menggunakan FTIR (Zhou, dkk., 2016)

Hasil isolasi EPS sebanyak 1 mg digerus dengan bubuk KBr dan kemudian di tekan vakumkan hingga menjadi pellet. Selanjutnya dianalisis menggunakan FTIR pada rentang frekuensi 4000 cm⁻¹ sampai 400 cm⁻¹.

3.5.7 Analisis Data

Setelah dilakukan serangkaian prosedur penelitian di atas, maka diperoleh data dari dua tahapan penelitian. Data dari tahap pertama adalah kadar EPS, kadar total gula EPS dan kadar gula terpakai selama fermentasi, sedangkan data dari tahap kedua adalah gugus fungsi penyusun dari eksopolisakarida dengan kadar total gula tertinggi setelah dilakukan analisis menggunakan FTIR. Data dari tahap pertama dianalisis menggunakan analisis ragam varian (*Two Way ANOVA*) dan dilanjutkan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) menggunakan selang kepercayaan 5 %.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel

Analisis bahan baku meliputi pengukuran nilai % brix tetes tebu dan pengukuran kadar total gula tetes tebu. Menurut Hartina (2014), kadar total gula dan nilai % brix dari tetes tebu dipengaruhi oleh tingkat kematangan tebu, varietas tebu, kondisi iklim maupun kondisi tanah. Sampel tetes tebu berasal dari Pabrik Gula Kregbet Malang diperoleh dari agen tetes tebu di sekitar pabrik. Tetes tebu tersebut diukur nilai brix nya menggunakan *hand brix refractometer*. Hasil skala yang terbaca dikonversikan ke dalam % brix. Nilai % brix tetes tebu mempengaruhi kadar total gulanya. Semakin tinggi kadar total gula yang terkandung dalam tetes tebu maka semakin tinggi juga nilai % brix dan begitu juga sebaliknya. Kadar total gula tetes tebu diperoleh dengan mensubstitusikan absorbansi tetes tebu ke persamaan regresi linear dari kurva standar larutan glukosa standar. Hasil analisis bahan baku sebagaimana tertera pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Karakteristik bahan baku

Komponen Analisa	Hasil
Nilai % Brix	80,03 % brix
Kadar total gula rata-rata	46,90 %
Warna	Hitam

Berdasarkan tabel di atas, diperoleh nilai % Brix bahan baku tetes tebu sebesar 80,03%, dengan kadar total gula rata-rata sebesar 46,90 %. Media dengan kadar gula yang tinggi kurang baik digunakan sebagai media fermentasi karena

akan menyebabkan bakteri mengalami tekanan osmotik yang tinggi, sehingga bakteri tersebut akan mengalami stress dan sangat mempengaruhi kinerja fermentasi (Ishmayana, dkk., (2011). Menurut Wanto dan Soebagyo (1980) kadar gula dalam tetes tebu untuk media fermentasi harus mengandung 12–17% sehingga diencerkan terlebih dahulu dengan menambahkan air sebanyak empat kali volume tetes tebu. Oleh karena itu, tetes tebu yang telah diukur nilai % Brix diencerkan sehingga konsentrasinya menjadi 18% (b/v) dengan cara menimbang tetes tebu sebanyak 18 gram tetes tebu 80,03% Brix kemudian dilarutkan ke dalam 100 mL akuades. Selanjutnya tetes tebu dimasukkan ke dalam 18 erlenmeyer 250 mL, masing-masing Erlenmeyer diisi sebanyak 100 mL. Tetes tebu dengan konsentrasi 18 % dianalisis kadar total gula sebelum fermentasi. Rata-rata kadar total gula tetes tebu sebelum fermentasi adalah 15,47 %.

Urea sebanyak 0,3% ditambahkan sebagai sumber nitrogen karena menurut Zubaidah dkk. (2008) unsur nitrogen sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan bakteri yaitu sebagai pembentuk dinding sel. Selain itu, Nofemele dkk. (2012) dalam jurnalnya menyebutkan bahwa produksi etanol secara optimal setelah ditambahkan urea dengan konsentrasi 3 g/L atau sama dengan 0,3 g/mL ke dalam media tetes tebu, pada konsentrasi ini, hanya 2,4% (b/v) gula yang tidak terfermentasi. Berdasarkan hasil penelitian tersebut dapat diasumsikan bahwa adanya sumber nitrogen dalam media fermentasi dalam hal ini tetes tebu dapat meningkatkan nutrisi bagi bakteri sehingga bakteri dapat tumbuh dan berkembang dengan baik. Menurut Fardiaz (2003), nutrisi yang dibutuhkan oleh mikrob sebagai sumber energi untuk pertumbuhan, perkembangan dan biosintesis produk-produk metabolit meliputi air, sumber

karbon, sumber nitrogen, vitamin dan mineral. Sampel yang telah ditambahkan urea 0,3% disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit untuk menghilangkan kontaminan mikroorganisme.

4.2 Pembuatan Media

Media yang digunakan untuk regenerasi kultur *Lactobacillus plantarum* dan membuat inokulum adalah media dari jenis MRS, yaitu MRSA dan MRSB. Media MRSA dalam satu liter nya mengandung: pepton protease 10 gram, *beef extract* 10 gram, *yeast extract* 5 gram, dekstrosa 20 gram, polisorbitat 80 1 gram, ammonium sitrat 2 gram, sodium asetat 5 gram, magnesium sulfat 0,1 gram, mangan sulfat 0,05 gram, dipotassium fosfat 2 gram dan agar 15 gram. Media MRSB mempunyai komposisi yang sama, akan tetapi tidak mengandung agar. Penggunaan media MRS Agar dan Broth dalam penelitian ini karena MRS merupakan media selektif yang mengandung glukosa dan mineral yang lebih disukai oleh *Lactobacillus*. Hal ini didukung oleh hasil penelitian Haroun, dkk., (2013) yang menyebutkan bahwa dari lima macam media (M17 Broth, TGY Broth, MRS Broth, Nutrient Broth dan Brain Heart Infusion Broth), MRS Broth adalah medium yang terbaik dan menghasilkan yield EPS tertinggi, yaitu 650 mg/L.

4.3 Peremajaan dan Pembuatan Inokulum *Lactobacillus plantarum*

Setelah membuat media, maka tahapan selanjutnya adalah peremajaan bakteri *Lactobacillus plantarum*. Peremajaan bakteri bertujuan untuk memperbarui nutrisi makanan yang terkandung dalam media sehingga bakteri

akan tetap hidup. Peremajaan biakan bakteri *Lactobacillus plantarum* dilakukan dengan memindahkan atau memperbarui biakan bakteri dari biakan lama ke medium tumbuh yang baru secara berkala. Mahmud (2011) menyatakan bahwa teknik peremajaan biakan merupakan cara paling tradisional yang digunakan peneliti untuk memelihara koleksi isolat mikroba di laboratorium dan memberikan penyegaran pada nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri. Charlena, dkk., (2009) menjelaskan bahwa peremajaan bakteri dilakukan untuk mengaktifkan kembali bakteri yang inaktif karena disimpan dalam lemari pendingin sehingga bakteri dapat menghasilkan enzim secara optimal. Biakan *Lactobacillus plantarum* diremajakan dan diperbanyak dengan cara mengambil satu ose untuk ditumbuhkan pada 5 mL media MRSA padat dengan posisi miring dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Menurut Pelczar dan Chan (2008) waktu inkubasi yang digunakan untuk peremajaan pada umumnya adalah 24 jam.

Peremajaan ini menggunakan media MRSA, karena sifatnya yang memadat (agar), sehingga koloni bakteri *Lactobacillus plantarum* yang digoreskan menggunakan kawat ose pada permukaan media MRSA miring akan mudah diamati seperti goresan zig-zag berwarna putih. Proses penanaman bakteri hanya dilakukan di permukaan media saja. Teknik ini lebih efisien dalam segi ekonomi dan waktu, akan tetapi memerlukan keterampilan-keterampilan dalam menggoreskan kultur bakteri sehingga menghasilkan koloni yang terpisah di sepanjang goresan. Peremajaan kultur bakteri dengan menggunakan medium segar dengan jenis yang sama seperti medium awal bertujuan untuk mempercepat fase adaptasi dan mempersiapkan sel pada fase eksponensial. Menurut Hartanti (2010), bakteri yang berada dalam fase eksponensial atau tahap propagasi ini mensintesis

enzim dan mengatur aktivitasnya sehingga mampu tumbuh lebih efisien dalam kondisi baru. Peremajaan juga memberikan nutrisi baru bagi bakteri sehingga sel-selnya dapat tumbuh sehat.

Pembuatan inokulum *Lactobacillus plantarum* dilakukan menggunakan media MRSB yang berbentuk cair, karena dibandingkan medium berbentuk padat, medium cair memiliki beberapa kelebihan yaitu jenis dan konsentrasi komponen-komponen medium dapat diatur sesuai dengan yang diinginkan, dapat memberikan kondisi optimum untuk pertumbuhan, dan pemakaian medium lebih efisien. Adapun Proses fermentasi oleh *Lactobacillus plantarum* yang dilakukan dalam penelitian ini termasuk ke dalam kategori fermentasi anaerob karena tidak membutuhkan oksigen dalam pertumbuhannya. Hasil dari peremajaan diambil sebanyak dua ose dan dimasukkan ke dalam media MRSB. Kemudian di-shaker pada kecepatan 100 rpm selama 24 jam. Inokulum diambil pada jam ke-24 karena pada jam ke-24 merupakan jam akhir dari fase logaritmik. Berakhirnya fase logaritmik menunjukkan bahwa bakteri akan segera memasuki fase stasioner dimana metabolit sekunder terbentuk karena pada fase tersebut karena kondisi lingkungan merugikan, terutama kondisi sel yang menjadi kering, kekurangan nutrisi, komponen racun, kondisi stress dan antagonis. Menurut Yuliana (2007), bakteri asam laktat mencapai fase logaritmik pada inkubasi 18–24 jam tergantung media dan jenis BAL.

4.4 Pengukuran *Optical Density* dan Perhitungan *Total Plate Count*

Pengukuran *Optical Density* (OD) termasuk ke dalam metode pengukuran pertumbuhan mikroorganisme. Metode ini menggunakan kekeruhan/turbiditas

dengan melihat massa sel. Pertumbuhan sel bakteri dalam suatu medium cair meningkatkan kekeruhan media, sehingga akan mempengaruhi jumlah sinar yang dapat ditransmisikan menembus medium. Pengukuran OD dari inokulum ini dilakukan dengan cara mengambil inokulum induk sebanyak 4 mL kemudian diamati menggunakan spektrofotometer UV-Vis Cary pada panjang gelombang 600 nm. Dimana panjang gelombang yang digunakan disesuaikan dengan warna komplementer media yang digunakan. Melalui alat ini dapat ditentukan nilai absorbansi (a) atau kerapatan optik (*Optical Density*). Pengukuran OD dalam penelitian ini dilakukan sebanyak tiga kali, yaitu ulangan I, ulangan II dan ulangan III.

Perhitungan jumlah bakteri menggunakan metode *Total Plate Count*. Uji TPC menggunakan media padat MRSA dengan hasil akhir berupa koloni yang dapat diamati secara visual dan dihitung. Inokulum kerja yang akan di uji TPC harus diencerkan terlebih dahulu dengan tingkat pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-10} agar jumlah koloni yang muncul dapat dihitung. Perhitungan koloni dilakukan pada cawan petri dengan jumlah koloni antara 30–300. Hasil TPC dinyatakan sebagai jumlah koloni bakteri yang dapat dihitung, dikalikan faktor pengencerannya. Hasil pengukuran TPC dari masing-masing ulangan secara berturut-turut adalah $2,17 \times 10^9$ cfu, $2,76 \times 10^9$ cfu dan $2,05 \times 10^9$ cfu.

4.5 Analisis Pengaruh Suhu dan Lama Fermentasi Terhadap Produksi

Eksopolisakarida

Produksi eksopolisakarida dari tetes tebu oleh *Lactobacillus plantarum* dilakukan dengan variasi perlakuan suhu dan lama fermentasi. Hal ini bertujuan

untuk mengetahui suhu dan lama fermentasi optimum bagi pertumbuhan dan produksi metabolit sekunder (EPS) dari *Lactobacillus plantarum*. Tetes tebu dipilih sebagai substrat fermentasi karena tersedia dan mudah didapat; mengandung sumber karbon dan sumber nutrisi lainnya yang dibutuhkan bakteri untuk proses fermentasi; dan harga yang relatif murah. Proses fermentasi ini melibatkan *Lactobacillus plantarum* karena merujuk pada hasil penelitian Haroun, dkk., (2013) menyebutkan bahwa diantara lima strain *Lactobacillus*, (*Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495, *Lactobacillus delbrueckii* NRRL B-4525, *Lactobacillus plantarum* NRRL B-227, *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 dan *Lactobacillus plantarum* NRRL B-14768) *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 menghasilkan yield EPS tertinggi yaitu 650 mg/L. selain itu, bakteri dari genus *Lactobacillus* ini diketahui aman digunakan untuk fermentasi makanan, dan memiliki daya tahan hidup yang baik dalam saluran pencernaan, dan memiliki kemampuan untuk menghambat penyakit. *Lactobacillus Plantarum* tergolong dalam bakteri fakultatif anaerobik yang dapat hidup dengan oksigen atau tanpa oksigen, sehingga dapat meminimalisasikan tingkat aerasi dalam erlenmeyer yang merupakan fungsi dari kecepatan shaker.

Proses fermentasi eksopolisakarida dilakukan dengan menambahkan inokulum *Lactobacillus plantarum* sebanyak 10 % ke dalam tetes tebu yang telah disterilisasi, kemudian dishaker dengan kecepatan 120 rpm selama waktu inkubasi (18 dan 24 jam) dan suhu (25, 30 dan 35°C). Penggunaan erlenmeyer dalam fermentasi ini dapat memberikan aerasi yang cukup untuk proses fermentasi. Tonjolan-tonjolan pipih pada erlenmeyer mempunyai fungsi seperti *baffle* pada fermentor skala industri. Selama proses fermentasi berlangsung, erlenmeyer

diletakkan di atas shaker yang kecepatannya dapat diatur. Pengendalian suhu dilakukan melalui shaker yang dilengkapi dengan penangas air (*waterbath*). Gerakan berputar pada shaker ditambah dengan adanya tonjolan-tonjolan pipih di bagian dasar erlenmeyer menyebabkan medium bergerak sehingga terjadi aerasi.

Tetes tebu mengandung sumber nutrisi yang dibutuhkan oleh *Lactobacillus plantarum* untuk mensintesis protoplasma terutama sumber karbon. Sumber karbon utama yang terkandung dalam tetes tebu adalah sukrosa. Sukrosa tidak dapat dimanfaatkan secara langsung oleh *Lactobacillus plantarum*, akan tetapi disakarida ini melalui proses fermentasi. Proses fermentasi yang berlangsung merupakan proses katabolisme yang disebabkan oleh aktivitas *Lactobacillus plantarum* dimana senyawa substrat sukrosa (disakarida) diubah menjadi senyawa yang lebih sederhana atau tingkat energinya lebih rendah yaitu ke bentuk glukosa dan fruktosa (monosakarida). *Lactobacillus plantarum* memanfaatkan substrat sukrosa untuk menghasilkan enzim invertase. Enzim invertase adalah enzim yang berperan dalam pemecahan sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Reaksi hidrolisis sukrosa dapat dilihat pada Gambar 4.5.1.



Gambar 4.5.1 Reaksi hidrolisis sukrosa (Iswanto, 2014)

Glukosa dan fruktosa dimanfaatkan oleh *Lactobacillus plantarum* untuk pertumbuhan, metabolisme dan konversi EPS. Eksopolisakarida yang disekresikan ke luar sel bakteri dapat berupa homo EPS atau hetero EPS. Menurut Zhennai (2000), beberapa spesies BAL dapat menggunakan substrat spesifik berupa

sukrosa untuk memproduksi dextran. Genus bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus*, *Leunostoc* dan *Streptococcus* dikenal sebagai pembentuk EPS jenis dextran, meskipun masing-masing strain bakteri memproduksi sebuah glukosa yang khas.

Hasil dari produksi eksopolisakarida selanjutnya dimasukkan ke tabung sentrifuge sebanyak 25 mL, kemudian disentrifugasi pada 5000 rpm selama 20 menit untuk membuang atau memisahkan senyawa dengan sel bakteri. Supernatan yang mengandung EPS dari sel bakteri selanjutnya diendapkan dengan etanol dingin (96%) (2 kali dari volume) selama semalam untuk mengendapkan EPS dari supernatan. Volume pelarut 2 kali volume supernatan adalah untuk mempermudah laju difusi, karena semakin banyak pelarut maka distribusi partikel akan semakin besar sehingga dapat memperluas permukaan kontak. Jika rasio luas permukaan membran dengan volume pelarut besar, maka laju difusi akan berlangsung dengan cepat. Prosedur demikian merupakan metode pengendapan-dialisis. Dialisis adalah proses perpindahan molekul terlarut dari suatu campuran larutan yang terjadi akibat difusi pada membran semipermeabel (pemurnian). Berikutnya disentrifugasi pada 5000 rpm selama 25 menit untuk menghilangkan protein. Pellet yang diperoleh dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 menit lalu ditimbang berat kering EPS dan ditentukan kadarnya.



Gambar 4.5.2 Hasil produksi eksopolisakarida

Metode demikian dikenal dengan metode gravimetri. Analisis menggunakan metode gravimetri merupakan metode analisis kuantitatif berdasarkan berat konstan, dalam analisis ini, senyawa analit dipisahkan dari senyawa-senyawa lain yang dianalisis.

Kadar eksopolisakarida tertinggi (740 mg/L) dihasilkan dari perlakuan S₂L₁ yaitu suhu 30°C dan lama fermentasi 18 jam, sedangkan kadar eksopolisakarida terendah (274,7 mg/L) dihasilkan dari perlakuan S₁L₂ yaitu suhu 25°C dan lama fermentasi 24 jam. Hasil penelitian Haroun, dkk., (2013) mengungkapkan bahwa yields EPS meningkat seiring dengan meningkatnya suhu dan mencapai nilai maksimum sebesar 650 mg/L pada suhu 30°C dan lama fermentasi 24 jam. Produksi EPS oleh *Lactobacillus plantarum* menunjukkan bahwa EPS terakumulasi dalam media tetes tebu selama fase logaritmik yaitu jam ke-18 dari kurva pertumbuhan *Lactobacillus plantarum*, dan terkonversi ke biopolimer aktif selama fase asimilasi. Menurut Richard dan Maria (2003), sebagian besar produksi EPS terjadi pada waktu 12–24 jam lama fermentasi ketika asam laktat mulai mengakumulasi sebagian besar kuantitas medium.

Berdasarkan hasil analisis data menggunakan *Two Way ANOVA* menunjukkan bahwa suhu, lama fermentasi dan interaksi antara suhu dan lama fermentasi berpengaruh nyata ($\text{sig} < 0,05$) terhadap kadar eksopolisakarida, oleh karena itu dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji Beda Nyata Jujur (BNJ). Hasil analisis uji lanjut dapat dilihat pada Tabel 4.5.1.

Tabel 4.5.1 Uji lanjut Beda Nyata Jujur (BNJ) interaksi suhu dengan lama fermentasi terhadap kadar eksopolisakarida

Perlakuan	Kadar Eksopolisakarida (mg/L)
S ₁ L ₁	601,33 ^{cd}
S ₁ L ₂	274,67 ^a
S ₂ L ₁	740 ^d
S ₂ L ₂	660 ^d
S ₃ L ₁	489,33 ^{bc}
S ₃ L ₂	422,67 ^b

Keterangan : notasi yang sama menunjukkan bahwa perlakuan tidak beda nyata

Tabel 4.5.1 menunjukkan bahwa berdasarkan uji BNJ interaksi antara suhu dan lama fermentasi dapat ditentukan perbedaan nyata antar perlakuan. S₁L₁ berbeda nyata terhadap perlakuan S₁L₂, S₂L₁, S₂L₂, S₃L₁, dan S₃L₂. Perlakuan S₃L₁ tidak berbeda nyata dengan perlakuan S₃L₂, perlakuan S₁L₁ tidak berbeda nyata dengan perlakuan S₃L₁, perlakuan S₂L₁ tidak berbeda nyata dengan perlakuan S₂L₂. Kadar eksopolisakarida tertinggi adalah 740 mg/L pada perlakuan S₂L₁, sedangkan kadar eksopolisakarida terendah 274,67 mg/L pada perlakuan S₁L₂. Selain sumber N dan P dalam pertumbuhan dan perkembangan sel bakteri, sumber karbon merupakan sumber energi utama. Menurut Tallon, dkk., (2006) dalam Zubaidah, dkk., (2008), menyebutkan bahwa jenis gula sangat berpengaruh terhadap produksi eksopolisakarida.

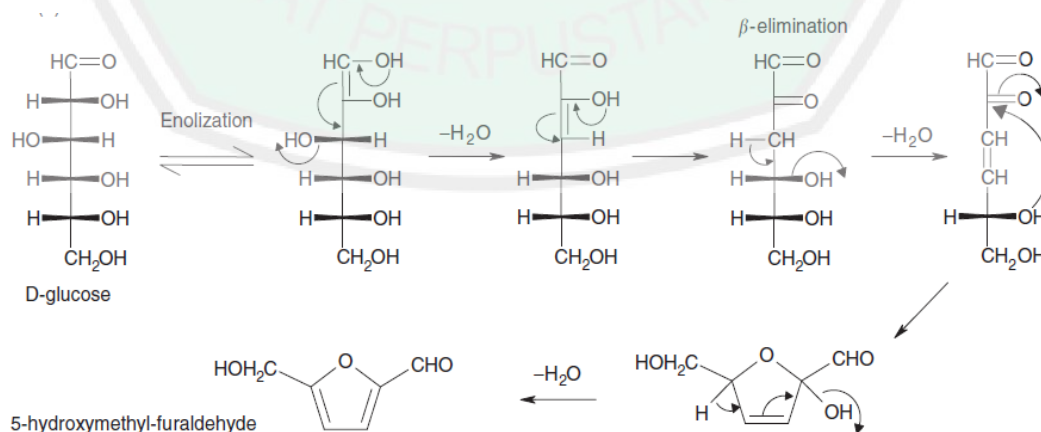
4.6 Pengukuran Kadar Total Gula EPS

Kadar total gula penting diukur untuk mengetahui kadar total gula sampel sebelum fermentasi dan kadar total gula setelah fermentasi, sehingga dapat diketahui kadar gula yang terpakai pada proses fermentasi dengan metode fenol H₂SO₄. Metode ini dipilih untuk mengetahui kadar total gula dalam tetes tebu maupun eksopolisakarida karena umum digunakan untuk menentukan kandungan

total karbohidrat dari polisakarida bakteri maupun tanaman sebagaimana dalam penelitian Ortega-Morales, dkk. (2007) dan Xu, dkk., (2010).

Fungsi dari penambahan fenol dalam metode ini adalah sebagai pereaksi yang akan membentuk senyawa berwarna jika direaksikan dengan furfural atau derivatnya. Larutan fenol dalam suasana asam dan berkondensasi dengan monomer gula yang dihasilkan dari proses degradasi akan membentuk senyawa kompleks berwarna jingga. Intensitas warna larutan berbanding lurus dengan kandungan karbohidrat dalam sel. Sedangkan penambahan Asam sulfat pekat berfungsi untuk menghancurkan sel dan mendegradasi polisakarida.

Reaksi ini dapat dijadikan reaksi pengenal untuk karbohidrat. Menurut Poedjiadi dan Supriyanti (2012) monosakarida umumnya stabil meskipun ditambahkan asam sulfat encer dan dipanaskan, akan tetapi jika dipanaskan dengan asam sulfat pekat maka monosakarida tersebut menghasilkan furfural atau derivatnya melalui reaksi dehidrasi atau pelepasan molekul air. Derivat furfural yang terbentuk tergantung pada jenis monosakarida yang berhasil didehidrasi melalui penambahan asam sulfat pekat dan dipanaskan.



Gambar 4.6.1 Reaksi dehidrasi karbohidrat (Iswanto, 2014)

Eksopolisakarida ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan ke dalam 10 mL larutan NaOH 0,5 N. Eksopolisakarida sukar larut dalam air, sehingga harus dilarutkan ke dalam pelarut asam maupun basa. Menurut Dian (2000) polisakarida yang dilarutkan dalam basa encer akan menghasilkan campuran monosakarida yang terdiri dari fruktosa, glukosa dan mannososa. Setelah melakukan analisis kadar total gula menggunakan metode fenol asam sulfat terhadap EPS, diperoleh data kadar total gula EPS sebagaimana ditunjukkan oleh tabel 4.6.1.

Tabel 4.6.1 Rata-rata kadar total gula EPS

Perlakuan	Kadar total gula (%)
S ₁ L ₁	4,24
S ₁ L ₂	3,97
S ₂ L ₁	5,97
S ₂ L ₂	5,93
S ₃ L ₁	3,07
S ₃ L ₂	2,99

Keterangan simbol S₁= 25 °C, S₂= 30 °C, S₃=35 °C, L₁= 18 jam, dan L₂= 24 jam

Hasil analisis *Two Way ANOVA* menunjukkan bahwa suhu berpengaruh nyata terhadap kadar total gula EPS, sedangkan lama fermentasi tidak berpengaruh nyata terhadap kadar total gula EPS. Hal ini dikarenakan tinggi rendahnya kadar total gula EPS sangat ditentukan oleh tinggi rendahnya kadar total gula dalam media fermentasi dan inversi selama proses fermentasi. Menurut Desroisier (1997), besarnya kadar total gula dipengaruhi oleh adanya dekomposisi sukrosa oleh mikroorganisme menjadi glukosa dan fruktosa, sehingga semakin tinggi suhu penguapan, laju inversi juga semakin tinggi. Nilai kadar total gula EPS tertinggi adalah 5,97% pada variasi perlakuan suhu 30°C dengan lama fermentasi 18 jam, sedangkan nilai kadar total gula EPS terendah adalah 2,99 % pada perlakuan suhu 35 °C dengan lama fermentasi 24 jam.

4.7 Pengukuran Kadar Gula Terpakai Selama Fermentasi

Setelah melakukan analisis kadar total gula menggunakan metode fenol asam sulfat terhadap tetes tebu baik sebelum dan sesudah fermentasi, diperoleh data kadar gula terpakai. Kadar gula terpakai merupakan kadar gula yang digunakan oleh bakteri asam laktat dalam proses fermentasi. Nilai kadar gula kadar gula terpakai paling tinggi adalah 14,67 % pada suhu 30°C dengan lama fermentasi 18 jam, sedangkan kadar gula terpakai paling rendah adalah 12,29 % pada perlakuan suhu 35 °C selama 24 jam. Berdasarkan hasil analisis data menggunakan *Two Way ANOVA* menunjukkan bahwa suhu, lama fermentasi dan interaksi antara suhu dan lama fermentasi berpengaruh nyata ($\text{sig} < 0,05$) terhadap kadar gula terpakai selama fermentasi, oleh karena itu dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji Beda Nyata Jujur (BNJ). Hasil analisis uji lanjut dapat dilihat pada Tabel 4.7.1.

Tabel 4.7.1 Uji lanjut Beda Nyata Jujur (BNJ) interaksi suhu dengan lama fermentasi terhadap kadar gula terpakai

Perlakuan	Kadar Gula Terpakai (%)
S ₁ L ₁	14,36 ^b
S ₁ L ₂	14,28 ^b
S ₂ L ₁	14,67 ^b
S ₂ L ₂	12,71 ^a
S ₃ L ₁	12,42 ^a
S ₃ L ₂	12,29 ^a

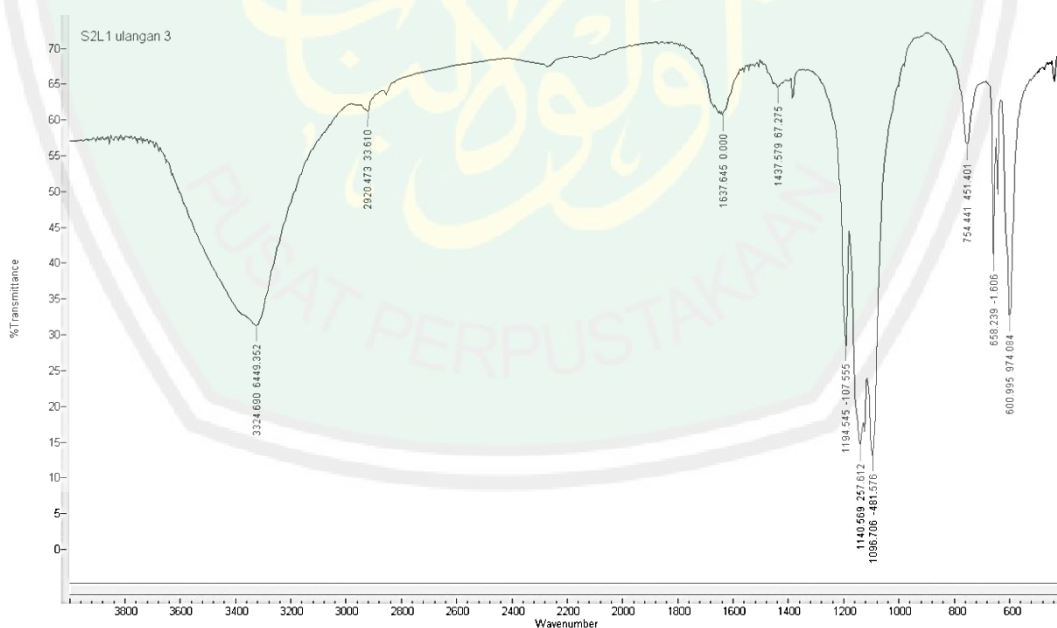
Keterangan : notasi yang sama seperti menunjukkan perlakuan tidak beda nyata

Berdasarkan Tabel 4.7.1, perlakuan S₂L₂ tidak berbeda nyata dengan perlakuan S₃L₁ dan S₃L₂, sedangkan perlakuan S₁L₁ tidak berbeda nyata dengan perlakuan S₁L₂ dan S₂L₁. Kadar gula terpakai tertinggi 14,67 % pada perlakuan S₁L₁, sedangkan kadar gula terpakai terendah 12,29 % pada perlakuan S₃L₂. Kadar gula terpakai tertinggi berkorelasi negatif terhadap kadar eksopolisakarida tertinggi, hal ini dikarenakan kadar gula yang terpakai pada proses fermentasi

tidak seluruhnya digunakan untuk memproduksi EPS akan tetapi juga digunakan oleh *Lactobacillus plantarum* untuk melakukan metabolisme. Selain itu menurut Zubaidah, dkk., (2008) menyebutkan bahwa medium dengan sumber gula sukrosa akan dipecah menjadi glukosa dan fruktosa, namun dengan adanya fruktosa akan menghambat aktivitas enzim pembentuk EPS.

4.8 Hasil Analisis Menggunakan FTIR

Hasil analisis eksopolisakarida dengan kadar gula tertinggi, yaitu pada perlakuan S2L1 ditunjukkan pada Gambar 4.8.1. Gugus fungsi yang utama EPS yang diproduksi oleh *Lactobacillus plantarum* dalam penelitian ini ditentukan menggunakan FTIR pada bilangan gelombang 400-4000 cm^{-1} , yang mengindikasikan pola absorpsi yang khas dari suatu polisakarida.



Gambar 4.8.1 Spektra FTIR perlakuan suhu 30 °C selama 18 jam

Menurut Wang, dkk., (2015), Pita serapan yang lemah pada 2920 cm^{-1} adalah vibrasi *stretching* asimetris C-H dari gugus CH_2 alifatik, dimana mengindikasikan adanya senyawa organik seperti protein, gula, dsb. Absorpsi

pada panjang gelombang 1637 cm^{-1} serupa dengan vibrasi *stretching* dari mannososa atau galaktosa (Kavita, dkk., 2014). Menurut Kang, dkk., (2016), pita serapan pada daerah 1430 cm^{-1} menunjukkan vibrasi *stretching* dari gugus C-O. Vibrasi *stretching* simetris pada daerah 1380 cm^{-1} menunjukkan gugus $-\text{COO}^-$ (Kavita, dkk., 2013). Pita serapan sekitar daerah $1200\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ didominasi oleh vibrasi cincin yang tumpang tindih antara vibrasi *stretching* dari C-OH dan vibrasi dari ikatan glikosidik C-O-C dari karbohidrat (Zhang, dkk., 2013).

Tabel 4.8.1 Gugus fungsi dari spektra FTIR perlakuan S_2L_1

Spektra hasil analisis (cm^{-1})	Spektra dari literatur (cm^{-1})	Gugus fungsi dari literatur	Sumber
3325	3600-3200	-OH <i>stretching</i> alkohol	Kanmani, dkk., (2011)
2920	2932	-C-H <i>stretching</i>	Wang, dkk., (2015)
2870	2870	Vibrasi <i>stretching</i> asimetris C-H	Yusbarina, (2013)
1638	1647	Vibrasi <i>stretching</i> C=C dari cincin mannososa atau galaktosa	Kavita, dkk., (2013)
1438	1440-1398	-C-O <i>stretching</i>	Kang, dkk., (2016)
1390	1384	-COO- <i>stretching</i> simetrik	Kavita, dkk., (2013)
1195	1193	Vibrasi <i>stretching</i> gugus C-O	Zhang, dkk., (2013)
1141	1150	Vibrasi C-O eter	Yusbarina, (2013)
1097	1080-1150	Vibrasi <i>stretching</i> O-H alkohol sekunder	Yusbarina, (2013)
754	750-650	Vibrasi O-H (ROH) deformasi keluar bidang	Yusbarina, (2013)
658	680-610	Vibrasi <i>stretching</i> simetrik C-H deformasi	Yusbarina, (2013)

4.9 Pemanfaatan Tetes Tebu untuk Memproduksi Ekspolisakarida dalam Perspektif Islam

Kebutuhan primer manusia yang meliputi sandang, pangan dan papan, menuntut manusia untuk selalu berusaha memenuhi kebutuhan-kebutuhannya.

Kebutuhan mendasar yang harus selalu terpenuhi setiap hari diantara tiga kebutuhan dasar (*Basic needs*) bagi manusia adalah makanan, dengan mengonsumsi makanan, manusia akan memperoleh energi untuk melakukan aktivitas seperti bernafas, berjalan, menggerakkan anggota badan maupun berpikir. Untuk memenuhi kebutuhan pangan tersebut, manusia mengembangkan sistem teknologi pertanian dan mendirikan industri makanan. Kegiatan ini pastilah akan menghasilkan limbah yang dapat mencemari lingkungan jika manusia tidak pandai untuk memanfaatkannya.

Fenomena kerusakan alam yang disebabkan oleh limbah dari sisa industri tampaknya masih menjadi persoalan yang belum terpecahkan. Limbah yang notabene merupakan bahan kimia berbahaya dan tidak ramah lingkungan tentunya harus diolah sedemikian rupa agar tidak menimbulkan pencemaran baik di darat maupun di laut.

Berkaitan dengan hal tersebut, Allah SWT. telah berfirman dalam al Qur'an surat ar Ruum ayat 41:

يَرْجِعُونَ لَعَلَّهُمْ يَعْمَلُوا الَّذِي بَعْضُ لِيذِيقَهُمُ النَّاسِ أَيِّدِي كَسَبَتْ بِمَا وَالْبَحْرِ الْبَرِّ فِي الْفَسَادِ ظَهَرَ ﴿٤١﴾

Artinya: "Telah nampak kerusakan di darat dan di laut disebabkan karena perbuatan tangan manusia, supaya Allah merasakan kepada mereka sebahagian dari (akibat) perbuatan mereka, agar mereka kembali (ke jalan yang benar)" (QS. ar Ruum: 41).

Al Qur'an sebagai pedoman hidup dan sumber hukum yang utama diturunkan oleh Allah di dunia agar manusia dapat mempelajari dan mengamalkan setiap kandungan ayatnya. Ayat tersebut secara jelas menggambarkan kerusakan di muka bumi yang tak lain karena ulah manusia sendiri. Kekayaan alam yang melimpah tanpa disertai kebijaksanaan dalam pengeksploasiannya cenderung

menimbulkan dampak yang buruk bagi lingkungan. Keserakahan manusia dalam usahanya untuk memenuhi kebutuhan tidak diimbangi dengan upaya untuk melestarikan alam, sehingga tak heran jika keanekaragaman hayati semakin berkurang. Oleh karena itu sebagai upaya menjaga keanekaragaman hayati dan menjaga lingkungan agar kehidupan selalu berjalan dinamis, hendaknya manusia selalu melakukan perbaikan. Mulai dari pemanfaatan limbah menjadi suatu produk yang bermanfaat terutama dalam bidang pangan dan farmasi. Salah satu limbah industri makanan yang banyak dijumpai di seluruh Indonesia adalah limbah pabrik gula berupa tetes tebu.

Tetes tebu merupakan limbah pabrik gula yang berupa cairan kental berwarna hitam kecoklatan dan tidak dapat membentuk kristal lagi pada saat proses kristalisasi. Menurut Baikow (1982) senyawa-senyawa penyusun tetes tebu antara lain bahan organik, bahan anorganik dan air. Total gula dalam tetes tebu sekitar 52 %, meliputi sukrosa, dekstrosa, glukosa dan fruktosa. Garam anorganik atau abu sekitar 10 %, sedangkan 10–20% adalah air, dan selebihnya adalah bahan organik non gula. Melihat begitu banyak kandungan gula dalam tetes tebu, maka jenis limbah ini dapat dimanfaatkan sebagai media fermentasi untuk memproduksi eksopolisakarida.

Eksopolisakarida adalah polisakarida yang dihasilkan oleh sel mikroorganisme berupa cairan yang disekresikan secara terus menerus keluar sel dan terlarut dalam media kultur. Senyawa ini termasuk ke dalam metabolit sekunder. Metabolit sekunder adalah senyawa kimia yang dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk interaksi antar individu dengan ekosistem. Peran utama EPS adalah untuk melindungi sel dari kondisi lingkungannya terutama dari

kondisi yang merugikan menjadi kering, kekurangan nutrisi, komponen racun, kondisi stres dan antagonis. Eksopolisakarida merupakan salah satu bukti kebesaran Allah yang harus selalu kita renungkan, kita pikirkan sehingga dapat memperkaya khazanah keilmuan dan menambah keimanan kita kepada Allah SWT. sebagaimana firman Allah SWT. dalam surat adz Dzariyat ayat 20–21:

تُبْصِرُونَ أَفَلَا أَنْفُسِكُمْ وَفِي ۞ لِّلْمُوقِنِينَ آيَاتِ الْأَرْضِ وَفِي ۞

Artinya: “Dan di bumi itu terdapat tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang yakin (20). Dan (juga) pada dirimu sendiri. Maka Apakah kamu tidak memperhatikan?” (21) (QS. adz Dzariyat: 20–21).

Maha suci Allah yang telah menciptakan makhluk hidup disertai kekurangan dan kelebihan. Allah SWT. dengan segala ke Maha kuasaan-Nya telah menciptakan mikroorganisme dengan ukuran mikron, untuk melihatnya saja kita harus menggunakan alat bantu berupa mikroskop. Dapat dibayangkan betapa kecilnya makhluk hidup tersebut. Akan tetapi Allah telah menganugerahkan kemampuan kepada mikroorganisme agar dapat mempertahankan hidupnya sendiri. Salah satunya adalah dengan memproduksi metabolit sekunder. Metabolit sekunder yang dikeluarkan disaat mikroorganisme merasa terancam hidupnya ternyata sungguh mengandung berbagai manfaat yang dapat kita rasakan secara langsung diantaranya sebagai antibakteri, antioksidan, meningkatkan viskositas yoghurt, dan sebagai sumber serat dan karbohidrat.

Hendaknya kita dapat mengambil pelajaran atas segala yang Allah ciptakan untuk kemaslahatan umat manusia. Allah menciptakan bakteri *Lactobacillus plantarum* yang dalam penelitian ini dapat menghasilkan senyawa

eksopolisakarida melalui fermentasi menggunakan media tetes tebu. firman Allah SWT. dalam surat an Nahl ayat 13:

﴿يَذَكِّرُونَ لِقَوْمٍ لَّا يَذَّكَّرُونَ فِي رَبِّ الْوَالُونَ مُخْتَلِفًا أَلْوَانًا لِّكُمْ ذُرَّاءُ وَمَا﴾

Artinya: "Dan Dia (menundukkan pula) apa yang Dia ciptakan untuk kamu di bumi ini dengan berlain-lainan macamnya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang mengambil pelajaran" (QS. an Nahl:13).

Tafsir ayat tersebut dalam tafsir al Qurthubi (2009) bahwa Allah mengendalikan apa-apa yang telah Dia ciptakan di muka bumi untuk manusia. Allah menciptakan berlainan bentuk dan penampilannya baik berupa binatang-binatang, pepohonan dan lain sebagainya agar manusia dapat mengambil nasihat dan mengetahui bahwa dalam pengendalian semua alam ciptaan ini terdapat tanda yang menunjukkan kepada ke Esa-an Allah SWT, dan tidak ada satupun selain Dia yang mampu melakukan demikian itu.

Kondisi berbeda baik dari faktor suhu maupun lama fermentasi dalam suatu fermentasi dapat memberikan hasil yang berbeda pula, karena setiap reaksi memiliki ketetapan masing-masing, seperti halnya kadar eksopolisakarida yang dihasilkan dalam penelitian ini, dipengaruhi oleh suhu dan lama fermentasi. sebagaimana firman Allah SWT dalam surat al Qomar ayat 49:

﴿بِقَدَرٍ خَلَقْنَاهُ شَيْءٌ كُلٌّ إِنَّا﴾

Artinya: "Sesungguhnya kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran (QS. Qomar : 49)".

Menurut Shihab (2003) kata **qadar** dalam segi bahasa berarti kadar tertentu yang tidak bertambah atau berkurang. Kata **qadar** juga dapat diartikan sebagai ketentuan dan sistem yang ditetapkan terhadap segala sesuatu. Ayat tersebut didukung oleh firman Allah Swt dalam surat al Furqaan ayat 2 :

رَهُ شَيْءٍ كُلِّ وَخَلَقَ الْمَلِكِ فِي شَرِيكَ لَهُ رِيكُنْ وَلَمْ يَلِدْ أَيَّتْخِذْ وَلَمْ يُولَدْ أَرْضِ السَّمَوَاتِ مُلْكُهُ الَّذِي
 تَقْدِيرًا فَقَدَ

Artinya: “Dan Dia menciptakan segala sesuatu dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya (QS. al-Furqaan : 2)”

Kedua ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah menetapkan suatu ukuran dan memberikan petunjuk terhadap semua makhluk kepada ketetapan tersebut (Katsir, 2007).



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

5.1.1 Suhu dan lama fermentasi berpengaruh nyata terhadap kadar EPS dan kadar gula terpakai selama fermentasi, sedangkan pada kadar total gula EPS, lama fermentasi tidak berpengaruh nyata. Kadar EPS tertinggi 740 mg/L pada perlakuan S₂L₁, sedangkan kadar EPS terendah 274,67 mg/L pada perlakuan S₁L₂. Kadar total gula EPS tertinggi 5,97 % pada perlakuan S₂L₁, sedangkan kadar total gula EPS terendah 2,99 % pada perlakuan S₃L₂. Kadar gula terpakai selama fermentasi tertinggi 14,67 % pada perlakuan S₂L₁, sedangkan kadar gula terpakai selama fermentasi terendah 12,29 % pada perlakuan S₃L₂.

5.1.2 Hasil analisis *FTIR* menunjukkan adanya pita serapan vibrasi *stretching* gugus hidroksil (O-H), vibrasi *stretching* dari gugus C=C, vibrasi *stretching* dari cincin mannosa atau galaktosa, vibrasi *stretching* gugus fungsi COO⁻, gugus fungsi C-O eter, dan vibrasi *stretching* dari gugus O-H alkohol sekunder.

5.2 Saran

Penelitian ini hanya menggunakan dua variasi lama fermentasi sehingga belum dapat menentukan grafik kinetika produksi eksopolisakarida berdasarkan beberapa variasi lama fermentasi, selain itu hasil *FTIR* hanya memberikan informasi gugus fungsi sehingga belum diketahui senyawa monosakarida penyusun dalam eksopolisakarida. Penelitian selanjutnya diharapkan dapat menambah variasi lama fermentasi dan identifikasi komposisi gula penyusun EPS menggunakan *HPLC*.

DAFTAR PUSTAKA

Al Qur'anul karim dan terjemahannya.

- Albalasmeh, A. A., Asmeret, A. B., Teamrat, A., Ghezzehei. 2013. A New Method for Rapid Determination of Carbohydrate and Total Carbon Concentrations Using UV Spectrophotometry. United State: *Carbohydrate Polymer* 97 : 253-261.
- Amalia, R. D. 2012. Eksplorasi Isolat Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Dari Sawi Asin (*Brassica juncea*). *Skripsi*. Universitas Brawijaya : Malang.
- Arasu, V. M., Al-Dhabi, N. A., Ilavenil, S., Choi, Ki C., dan Srigopalram, S. 2015. In-Vitro Importance of Probiotic *Lactobacillus plantarum* Related to Medical Field. *Saudi Journal of Biological Science*. 2015. 09. 022.
- Asker, M. M. S., EL Sayed, O. H., Mahmoud, M. G., dan Ramadan, M. F. 2014. Chemical structure and antioxidant activity of a new exopolysaccharide produced from *Micrococcus luteus*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* (2014) 12, 121–126.
- Badel, S., Bernardi, T., dan Michaud, P. 2011. New Perspectives for *Lactobacilli* Exopolysaccharide. *Biotechnology Advances* 29 (2011) 54-56.
- Brummer, Y., dan Cui, W., S. 2013. Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Application. France: Taylor and Francies Group, LLC.
- Carocho, M., Ferreira, I. C. 2013. *Food and Chemical Toxicology* 51 (2013) 15–25.
- Cerning, J., Bouillanne, C., dan Landon, M. 1992. Isolation and Characterization of Exopolysaccharide From Slime-Forming Mesophilic Lactic Acid Bacteria. *Journal Dairy Science* 1992;75:692-9.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M., dan Desmazeaud, M. 1994. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. Station de recherches laitières, INRA,CRJ,Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France. *Lait* (1995) 75, 463-472
- De Vuyst, L., dan Degeest, B. 2001. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23:153–177.
- Dilna, S. V., Surya, H., Aswathy, R. G., Varsha, K. K., Sakthikumar, D.N., Pandey, A., dan Nampoothiri, K.M. 2015. Characterization of an Exopolysaccharide with Potential Benefit Properties from a Probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF₄. *LWT - Food Science and Technology* 64 (2015) 1179-1186.
- Djide, M. N. 2005. Uraian Umum tentang Bakteri Asam Laktat. *Makalah*. Kursus Singkat Pemanfaatan BAL dalam bidang Pangan dan Kesehatan. Univ. Hasanuddin, Makassar 14-24 November 2005.

- Dubois, Michel, dkk. 1956. *Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substance*. University of Minnesota vol 28(3): 350-356.
- Fardiaz, S. 1989. *Analisa Mikrobiologi Pangan*. Jakarta : Raja Grafindo Persada.
- Fifendy, M., Eldini dan Irdawati. 2013. Pengaruh Pemanfaatan Molase Terhadap Jumlah Mikroba Dan Ketebalan Nata Pada Teh Kombucha. *Prosiding Seminar Bidang Biologi* ISBN-978-602-98559-2-0.
- Gandjar, I. G., dan Rohman, Abdul. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- 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* Vol. 1 No.1 p.129-137, Oktober 2013.
- Harahap, H. 2003. *Karya Ilmiah Produksi Alkohol*. Medan: USU digital library.
- Haroun, B. M., El-Menoufy, H. A., Amin, H. A. dan El-Waseif, A. A. 2013. Biosynthesis and Morphology of an Exopolysaccharide from a Probiotic *Lactobacillus plantarum* Under Different Growth Condition. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(2): 1256-1265, 2013.
- Hartina, F., Jannah, A., Maunatin, A. 2014. Fermentasi Tetes Tebu dari Pabrik Gula Pagotan Madiun Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* untuk Menghasilkan Bioetanol dengan Variasi pH dan Lama Fermentasi. *Alchemy*, Vol. 3 No. 1 Maret 2014.
- Hidayat, N., Padaga, M. C., dan Suhartini, S. 2006. *Mikrobiologi industri*. Yogyakarta: Andi Offset.
- Huang, R., Tao, X., Wan, C., Li, S., Xu, H., Xu, F., Shah, N. P. dan Wei, H. 2015. In Vitro Probiotic Characteristics of *Lactobacillus plantarum* ZDY 2013 and its Modulatory Effect on Gut Microbiota of Mice. *Journal of Dairy Science* Vol. 98 No. 9, 2015.
- Jenie, B. S. L. 1996. Peranan bakteri Asam Laktat sebagai Pengawet Hayati Makanan. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan* I (2) : 60 – 73.
- Jiang, M., Zhang, F., Wan, C., Xiong, Y., P. Shah, N., Wei, H. dan Tao, X. 2016. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 isolated from human breast milk. *Journal of Dairy Science* Vol. 99 No. 3 2016.
- Jin, M., Wang, Y., Xu, C., Lu, Z., Huang, M., dan Wang, Y. 2010. Preparation and Biological Activities of an Exopolysaccharide Produced by *Enterobacter cloacae* Z0206. *Carbohydrate Polymers*, 81, 607-611.

- Juwita, Ratna. 2012. Studi Produksi Alkohol dari Tetes Tebu (*Saccharum officinarum*) selama Proses Fermentasi. *Skripsi*. Jurusan Teknologi Pertanian Fakultas Pertanian: Universitas Hasanuddin Makassar.
- Kanmani, P., Kumar, R. S., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V., Arul, V., Bioresour. 2011. *Technology*. 102 4827-4833.
- Kavita, K., Singh, V. K., Mishra, A., Jha, B. 2014. *Carbohydrate Polymers*. 101 29-35.
- Kimmel, S. A., Roberts, R. F., dan Ziegler, G. R. 1998. Optimization of Exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 659-664.
- Kosaric, N. 1992. Biosurfactant in Industry. *Pure and Application Chemistry*. 64: 1731-1737.
- Kultsum, U. 2009. Pengaruh Variasi Nira Tebu (*Saccharum Officinarum*) dari Beberapa Varietas Tebu Dengan Penambahan Sumber Nitrogen (N) dari Tepung Kedelai Hitam (*Glycine Soja*) sebagai Substrat Terhadap Efisiensi Fermentasi Etanol. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang.
- Kumar, A. S.; Mody, K.; Jha, B., 2007. Bacterial exopolysaccharides a perception. *Journal of Basic Microbiology* 47, 103-117.
- Kusmiati, F., Rachmawati, S., Siregar, S. Nuswantara, A., Malik. 2007. *J. Makara (Seri Sains)* 10 (2006) 24-29.
- Kuswurj. R. 2008. *Sugar cane Research and Technology*. <http://www.risvank.com/tag/pol>. diakses tanggal 5 februari 2016.
- Lehninger, A. L. 1997. *Dasar-dasar Biokimia Jilid I*. Jakarta: Erlangga.
- Li, S., Huang, R., Shah, N. P., Tao, X., Xiong, Y., dan Wei, H. 2014. Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum* R315. *Journal of Dairy Science* Vol. 97 No. 12, 2014.
- Li, Y., Meng, S., Wang, L., Wang, Y., Zu, X., Yang, Y. dan Zhang, Z. 2014. Antioxidative Activity of Exopolysaccharide Extract from Fermented Wheat Distillers'dried Grains Using UV-Irradiation Degradation Pretreatment by *Preussia aemulans*. *Advance Journal of Food Science and Technology* 6(9): 1067-1075, 2014.
- Lin, T.Y. M. F., Chien, C. 2007. Exopolysaccharide Production as Affected by Lactic Acid Bacteria and Fermentation Time. *Food Chemistry* 100 (2007) 1419-1423.

- Liu, C., Chu, F., Chou, C., dan Yu, R. 2011. Genetical Toxicology. *Environment Mutagenicity*. 721 (2011) 157-162.
- Llamas, C., Mullany, L., dan Stockwell, P. 2007. *The Routledge Companion to Exopolysaccharide*. New York: Roulledge.
- Looijesteijn P. J, Trapet L, De vries E, Abee, T., Hugenholtz, J. 2001. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int J Food Microbiol* 64:71–80.
- Malik, Amalia, Donna M. Ariesranti, Anandayu Nurfachtiyanti, dan Arry Yanuar. 2008. Skrining Gen Glukonsiltransferase (GTF) Dari Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida. 2003. *Makara Sains*, Volume 12, No. 1, April 2008:1-6.
- Melanti, Rizka. 2013. Preparasi Porous Carbon dari Molase dan Aplikasinya dalam Penurunan Efek Browning Sari Buah Apel. *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.
- Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hebert, E. M., Van der Meulen, R., Foulquie-Moreno, M. R., Font de Valdez, S. G., dan De Vuyst, L. 2006. Diversity of Heteropolysaccharide Producing Lactic Acid Bacterium Strains and Their Biopolymers. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4431-4435.
- Nofemele, Z., Shukla, P., Trussler, A., Permaul, K., dan Singh, S. 2012. Improvement of Ethanol Production from Sugarcane Molasses Through Enhanced Nutrient Supplementation Using *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Brewing and Distilling* Vol. 3(2), pp. 29-35.
- Nudyanto, A., Zubaidah, E. 2015. Isolasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida dari Kimchi. *Jurusan teknologi hasil pertanian, FTP Universitas Brawijaya Malang*. Vol.3 No 2 p.743-748.
- Ozkaya, F. D., Aslim, B., Ozkaya, M. T. 2007. Effect of Exopolysaccharides (EPSs) Produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Strains to Bacteriophage and Nisin Sensitivity of the Bacteria. *LWT* 40 (2007) 564–568.
- Patel, S., Majumder, Avishek., dan Goyal, A. 2012. Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Indian Journal Microbiology (Jan–Mar 2012)* 52(1):3–12.
- Paturau, J, M. 1982. *By Product of Cane Sugar Industry*. Amsterdam: Elsevier Scientific Publ, Co.
- Pelczar, M. J. 2008. Dasar-dasar Mikrobiologi Sistem Fermentasi Cair. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*, Vol 1, No 1, Halm 139-149.
- Pertiwi, A. A. P., 2009. Pengaruh Temperatur Dan Waktu Karbonisasi Pada Sintesis Porous Carbon Berbahan Dasar Molase. *Skripsi*. Semarang : Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Diponegoro.

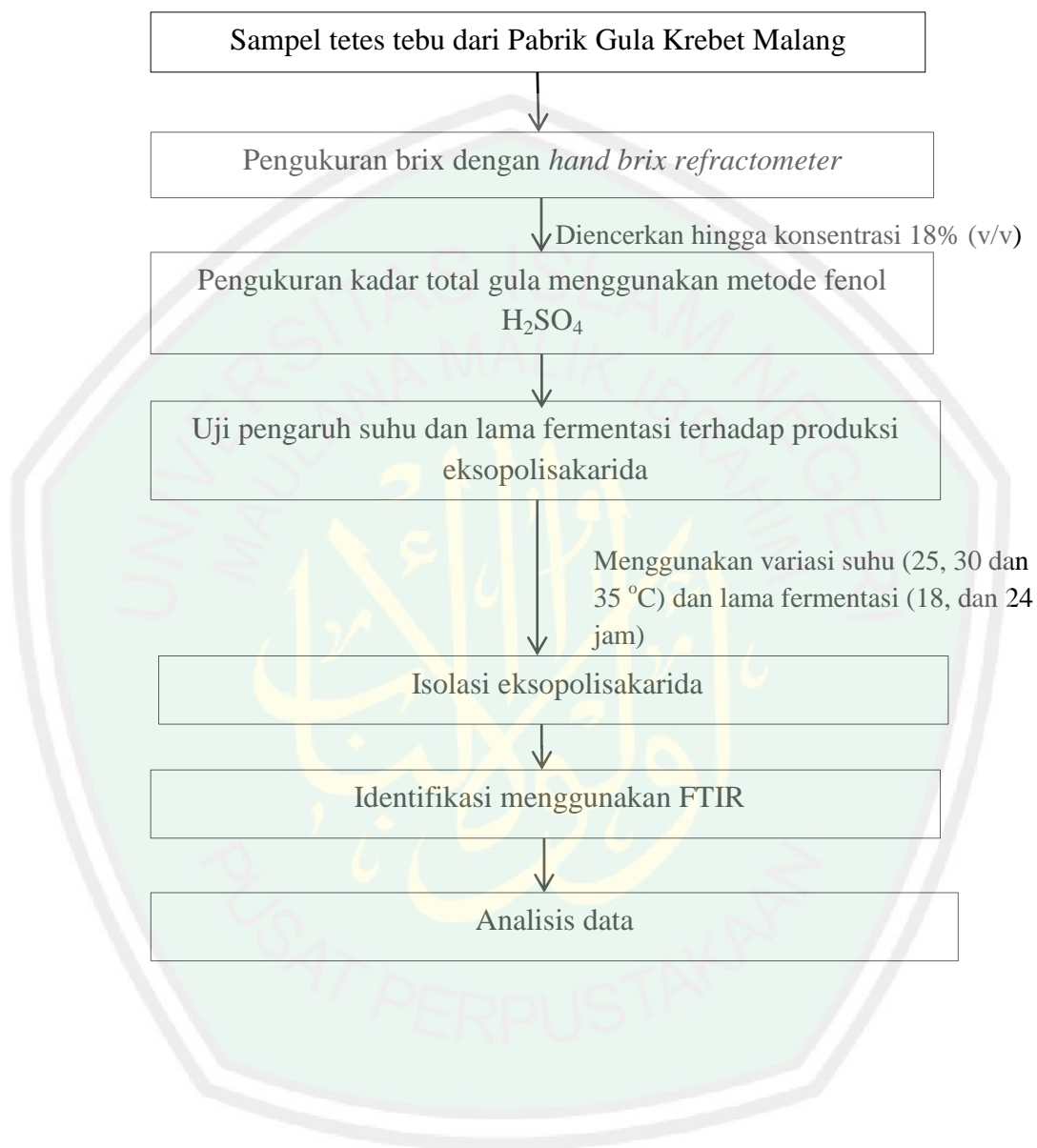
- Prescott, S. C. dan Dunn, G. C. 1990. *Industrial Microbiology Third Edition*. New York: Mc. Graw Hill Book Company. Inc.
- Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Sekretariat Jenderal Kementerian Pertanian. 2014. *Outlook Komoditi Tebu*. ISSN 1907-1507.
- Rahmadi, A. B. S. L., Jenie dan Andjaya, N. 2002. Pemanfaatan bakteri asam laktat untuk meningkatkan keamanan dan umur simpan apel malang olah minimal. *Prosiding Seminar Nasional PATPI*. Malang.
- Ramos, A., Boels, I. C., De Vos, W. M. Dan Santos, H. 2001. Relationship between Glycolysis and Exopolysaccharide Biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, No. 1.
- Ratningsih, Nining. 2008. Uji toksisitas Molase Terhadap respirasi Ikan *Mas*. *Journal Biotika*, Vol.6, No.1, 22-33.
- Rehm, B. H. A. 2009. *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: Applications and Perspectives*. Caister Academic Press.
- Ruas Madiedo, P., and de los Reyes-Gavilán, C. G. 2005. Invited Review: Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. 88:843-856.
- Ruas Madiedo, P., Salazar, N., dan De los Reyes-Gavilán, C. G. 2009. Biosynthesis and Chemical Composition of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. In *Bacterial Polysaccharide*. In M. Ullrich (Ed.), *Current Innovations and Future Trends* (pp. 279-310).
- Salazar, N., Prieto, A., Leal, J. A., Mayo, B., Bada-Gancedo, J. C., de los Reyes-Gavilán, C. G., dkk. 2009. Production of Exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains of Human Origin, and Metabolic Activity of the Producing Bacteria in Milk. *Journal of Dairy Science*, 92, 4158-4168.
- Simanjuntak, R., 2009. Studi Pembuatan Etanol Dari Limbah Gula (Molase). *Skripsi*, Departemen Teknologi Pertanian, Fakultas Pertanian: Universitas Sumatera Utara.
- Sirajunnisa, A., Vijayagopal, V., dan Viruthagiri, T. 2012. Effect of Synthetic Carbon Substrates and Cane Molasses, an Agro Waste, on Exopolysaccharide Production by *P. fluorescens*. *International Journal of Science and Engineering Applications (IJSEA)* Volume 1 Issue 1.
- 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 Juni 2012* Vol. 13 No. 2: 136-144.
- Sutherland, I. W. 1999. Polysaccharides for Microbial Exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymer*, 38, 319-328.

- Sutherland, I. W. 1998. *Bacterial Exopolysaccharid*. <http://www.blackwell-synergy>. Diakses tanggal 3 Maret 2016.
- Sutherland, I.W., 2001. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal* 11, 663-674.
- Tallon, R., P. Bressollier and M.C. Urdaci. 2006. Isolation and Characterization of Two Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus plantarum* EP56.
- Toharisman, A., dan santosa, H. 1999. *Mutu Bahan Baku dan Preparasi Medium Fermentasi Pelatihan Teknologi Alkohol*. Pasuruan: Pusat Penelitian Perkebunan Indonesia 95-96.
- 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* 74 (2015) 541–546.
- Trenggono dan Sutardi. 1990. *Biokimia dan Teknologi Pasca Panen*. Yogyakarta: UGM Press.
- Vanhooren, P.; Vandamme, E.J., 1998. Biosynthesis, physiological role, use and fermentation process characteristics of bacterial exopolysaccharides. *Recent Res. Devel. Ferment. Bioeng. 1*, 253–299.
- Volk, W. A. dan Wheeler, M. F. 1988. *Mikrobiologi Dasar Edisi kelima*. Jakarta: Erlangga.
- Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A., Yang, Z. 2015. Characterization and Bioactivities of an Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *International Journal of Biological Macromolecul* 74 (2015) 119-126.
- Wang, K., Li,W., Rui, X., Xiaohong, Jiang, M., Dong, M. 2014. Characterization of a Novel Exopolysaccharide with Antitumor Activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. *International Journal of Biological Macromolecules* 63 (2014) 133– 139.
- Wang, Y., Li, C., Liu, P., Ahmed, Z., Xiao, P., Bai, X. 2010. Physical Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 Isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers* 82 (2010) 895–903.
- Xu, R. H., Shen, Q., Ding X. L., Gao, W. G., dan LI, P. L. 2010. Chemical Characterization and Antioxidant Activity of an Exopolysaccharide Fraction Isolated from *Bifidobacterium animalis* RH. *European Food Research and Technology*, 232, 231-241.
- Ye, S., Zhang, M., Yang, H., Wang, H., Xiao, S., Liu, Y., dan Wang, J. 2014. Biosorption of Cu^{2+} , Pb^{2+} dan Cr^{6+} by a Novel Exopolysaccharide from *Arthrobacter* PS-5. *Carbohydrate Polymers*, 101, 50-56.

- Yilmaz , M. T., Dertli, E., Toker, O. S., Tatlisu, N. B., Sagdic, O., dan Arici, M. 2015. Effect of in situ exopolysaccharide production on physicochemical, rheological, sensory, and microstructural properties of the yogurt drink ayran: An optimization study based on fermentation kinetics. *Journal of Dairy Science* Vol. 98 No. 3, 2015.
- Yuliana, Neti. 2008. Kinetika Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Isolat T5 yang Berasal dari Tempoyak. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*, Volume 13, No. 2, September 2008.
- Zhang, L., Liub, C., Lia, D., Zhaoa, Y., Zhanga, X., Zenga, X., Yanga, Z., Lia, S. 2013. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *International Journal of Biological Macromolecules* 54 (2013) 270– 275.
- Zhou, S.K., K.T. Shanmugan, L.P. Yomano, T.B. Grabar and L.O. Ingram. 2006. *Fermentation of 12% glucose to 1,2M Lactate by Escherichia coli Strain SZ194 Using Minerals Salts Medium*. *Biotechnol. Lett.*, 28:663-670.
- Zhou, K., Zeng, Y, Yang, M., Chen, S., He, LI., Ao X., Zou, L., dan Liu, S. 2016. Production, Purification and Structural Study of an Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* BC-25. *Carbohydrate Polymers* (16) 30132-1.
- Zisu, B., dan Shah, N. P. 2003. Effects of pH, Temperature, Supplementation with Whey Protein Concentrate, and Adjunct Cultures on the Production of Exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *Journal of Dairy Science* Vol. 86, No. 11, 2003.
- Zubaidah, E., Liasari, Y., Saparianti, E. 2008. Produksi Eksopolisakarida oleh *Lactobacillus plantarum* B2 pada Produk Probiotik Berbasis Buah Murbei. *Jurnal Teknologi Pertanian* Vol. 9 No.1 (April 2008) 59 – 68.

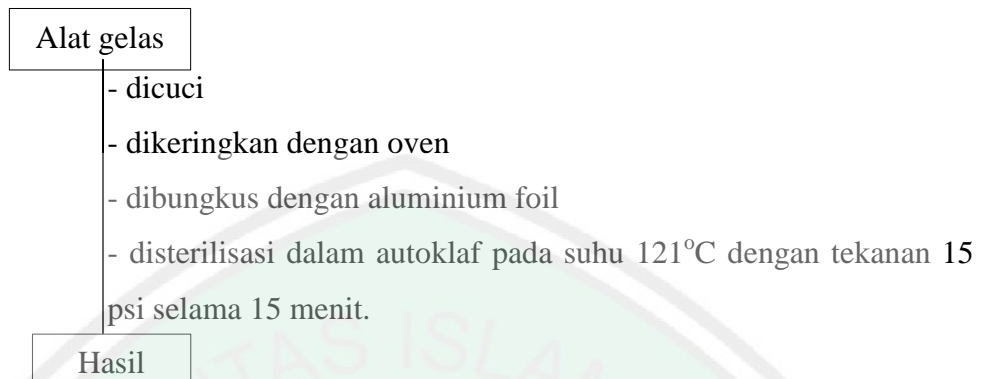
LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir

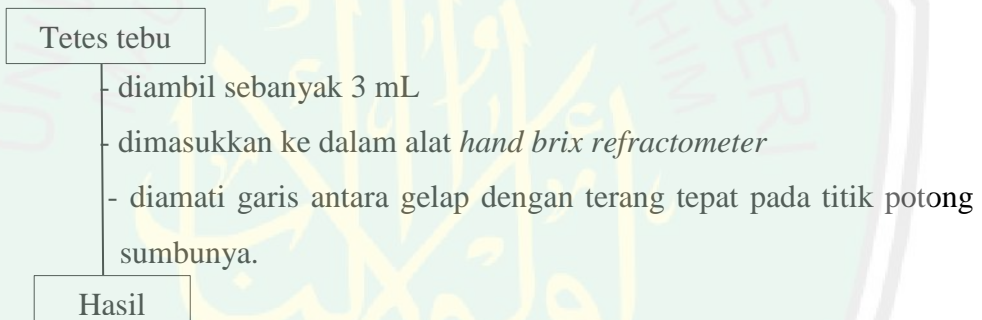


Lampiran 2. Skema Kerja

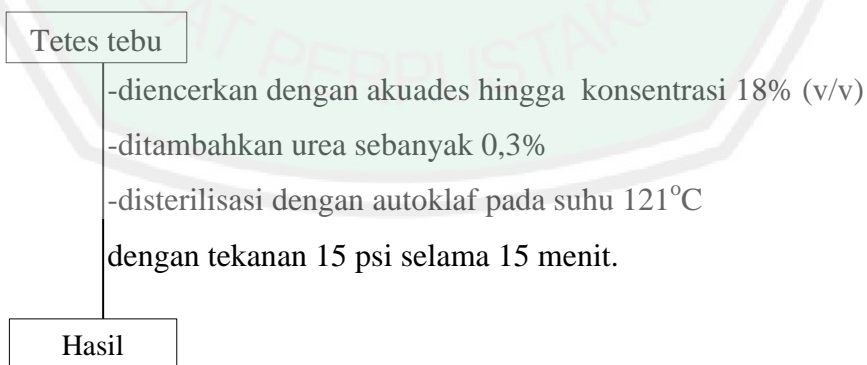
▪ Sterilisasi Alat



▪ Pengukuran Brix (Kultsum, 2009)



▪ Preparasi Tetes Tebu (Wahyudi, 1997)



- **Pembuatan Media MRSA**

MRS Agar

- ditimbang sebanyak 6,2 gram
- dilarutkan ke dalam 100 mL akuades
- dihomogenkan dengan *hot plate* dan *magnetic stirrer* sampai homogen
- dituangkan sebanyak masing-masing 5 mL ke dalam tabung reaksi
- ditutup dengan *cotton plug* (sumbat kapas) dan plastik wrap
- disterilisasi dengan autoklaf 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit
- disimpan pada cetakan miring selama 1 malam sampai memadat

Hasil

- **Pembuatan Media MRSB**

MRS Broth

- ditimbang sebanyak 5,515 gram
- dilarutkan ke dalam 100 mL akuades
- dihomogenkan dengan *hot plate* dan *magnetic stirrer* sampai homogen
- dituangkan masing-masing sebanyak 15 mL ke dalam Erlenmeyer 100 mL
- ditutup dengan *cotton plug* (sumbat kapas) dan plastik wrap
- disterilisasi dengan autoklaf 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit

Hasil

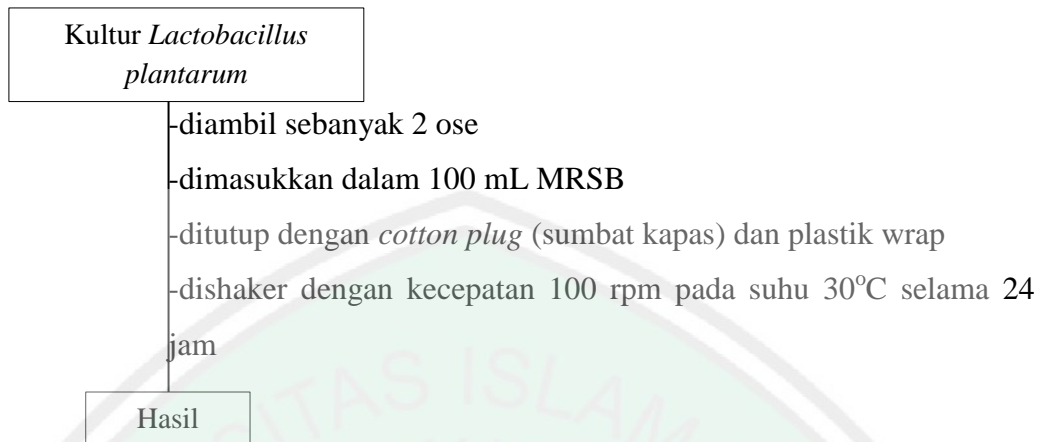
- **Peremajaan *Lactobacillus plantarum* (Nudyanto dan Zubaidah, 2015)**

Isolat *Lactobacillus plantarum*

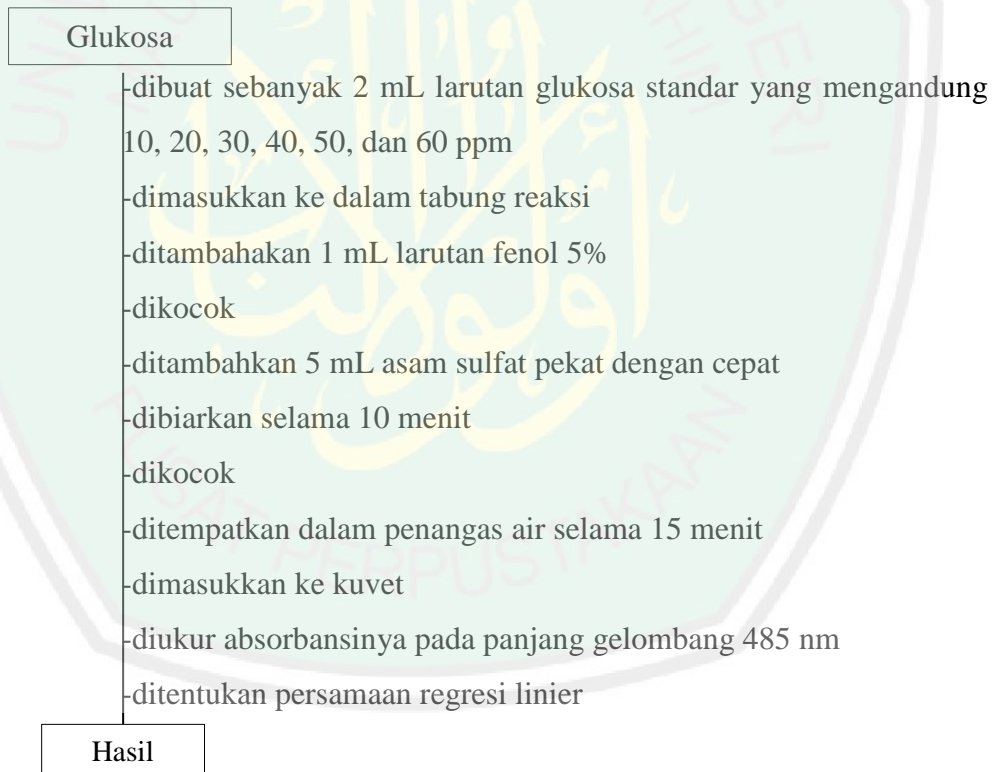
- ditumbuhkan pada 5 mL media MRSA padat pada posisi miring
- diinkubasi pada suhu ruang
- diremajakan setiap dua minggu sekali

Hasil

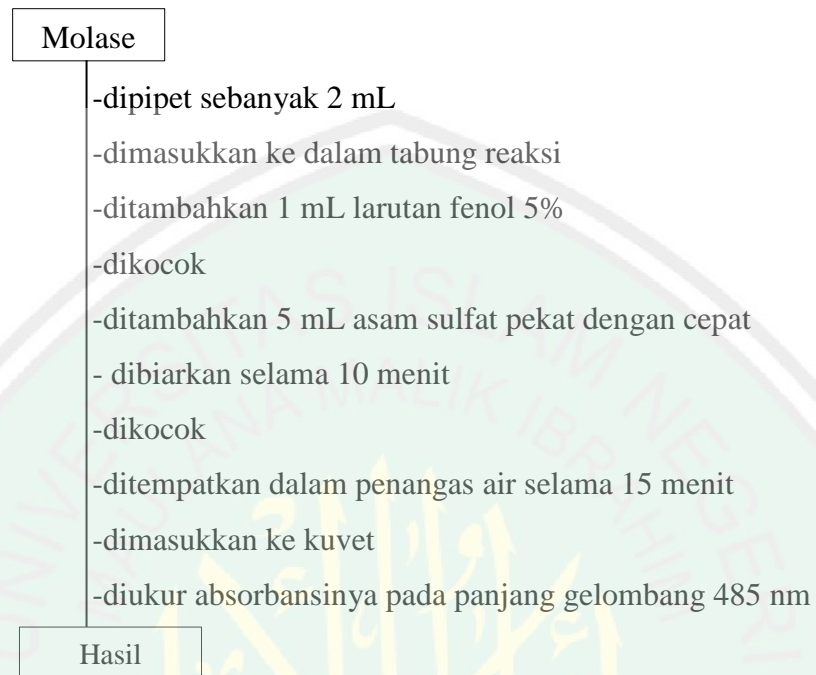
▪ **Pembuatan Stok Inokulum (Kultsum Termodifikasi, 2009)**



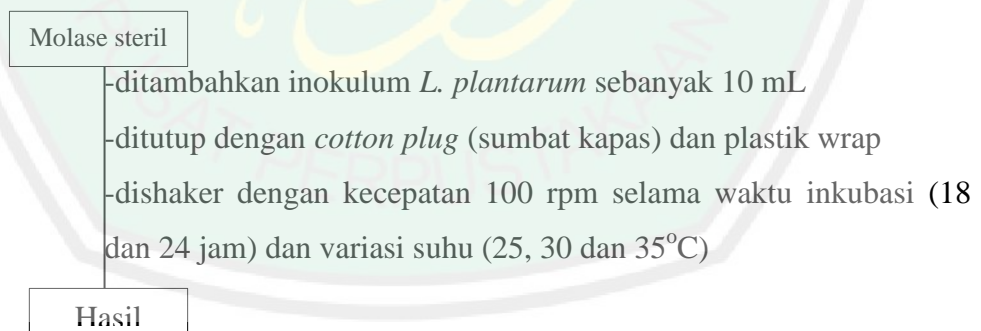
▪ **Pembuatan Kurva Standar Glukosa dengan Metode Fenol H₂SO₄ (Dubois dkk., 1956)**



- **Perhitungan Kadar Total Gula Sampel Tetes Tebu Sebelum dan Sesudah Fermentasi dengan Metode Fenol H₂SO₄ (Dubois dkk., 1956)**



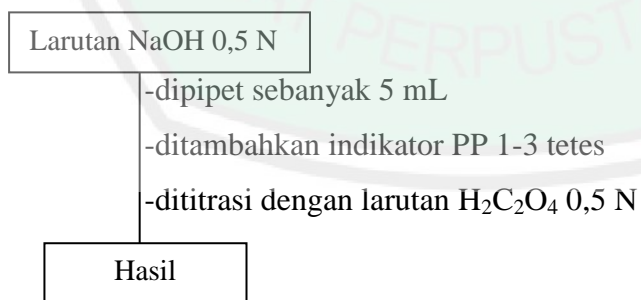
- **Uji Pengaruh Suhu dan Lama Fermentasi Terhadap Produksi Eksopolisakarida dari Tetes Tebu (Trabelsi, dkk. Termodifikasi, 2014)**



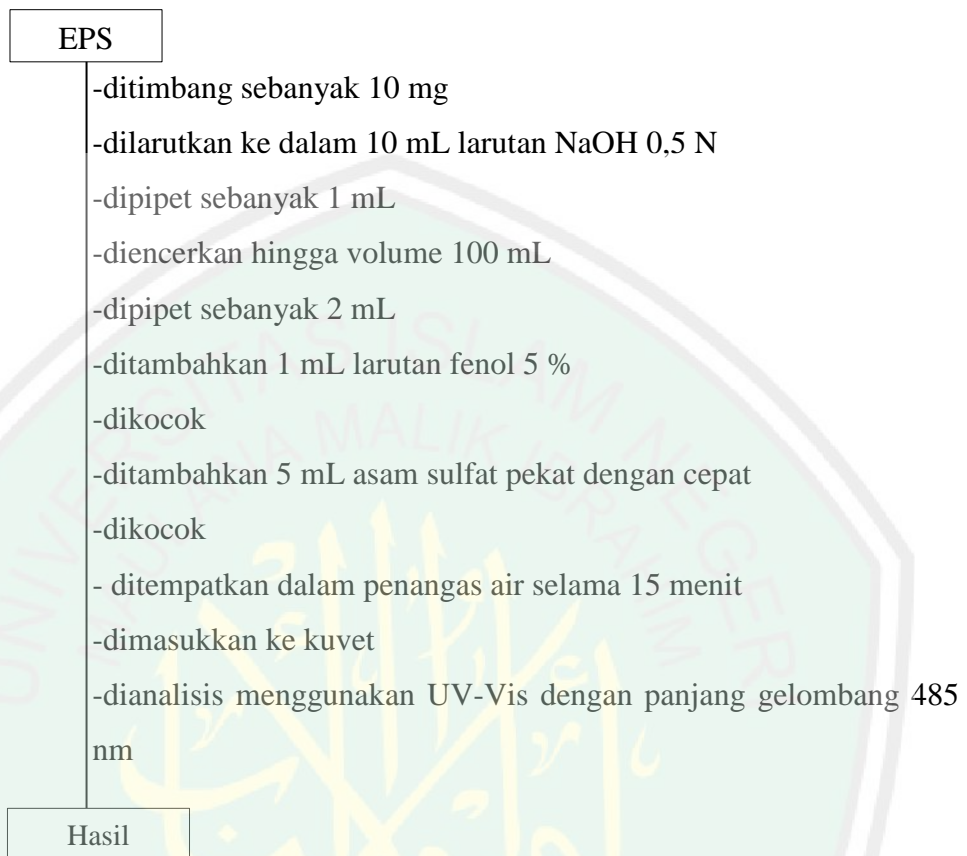
▪ **Isolasi Eksopolisakarida (Nudyanto dan Zubaidah, 2015)**



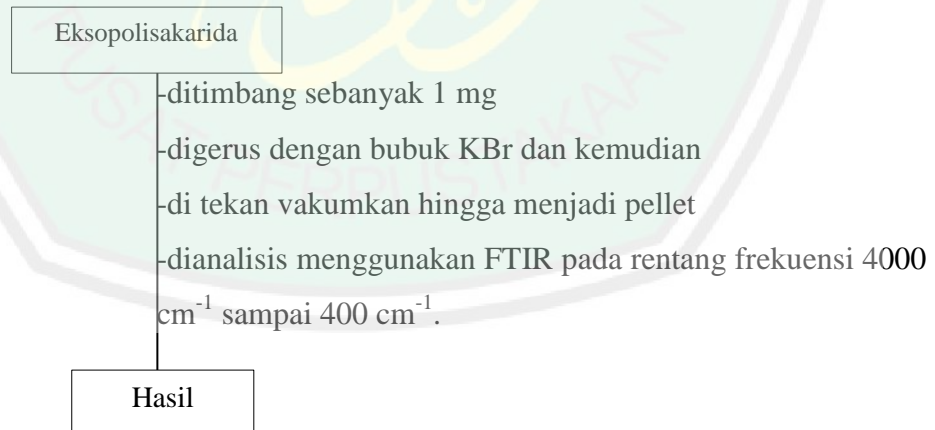
▪ **Pembakuan NaOH 0,5 N**



- **Perhitungan Kadar Total Gula Eksopolisakarida dengan Metode Fenol H_2SO_4 (Dubois dkk., 1956)**



- **Identifikasi Gugus Fungsi Eksopolisakarida Menggunakan FTIR**



Lampiran 3. Perhitungan

1. Pembuatan Tetes Tebu 18% (b/v)

$$\text{Tetes tebu 18\% (b/v)} = \frac{18 \text{ gram tetes tebu}}{100 \text{ mL akuades}}$$

Sebanyak 18 gram tetes tebu ditimbang menggunakan neraca analitik, kemudian ditambahkan akuades sebanyak 100 mL, diaduk hingga homogen dan dipindahkan ke dalam erlenmeyer 250 mL.

2. Pembuatan Larutan Fenol 5% (b/v)

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

Sebanyak 5 gram fenol ditimbang menggunakan neraca analitik, kemudian dimasukkan ke dalam gelas beker 100 mL, ditambahkan akuades dan diaduk hingga larut. Selanjutnya dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambahkan akuades sampai tanda batas dan dihomogenkan.

3. Pembuatan Larutan NaOH 0,5 N

Menghitung Normalitas NaOH

$$\text{Normalitas} = M \times v$$

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

$$N = \frac{m}{V} \times \frac{1}{Mr}$$

Keterangan:

M	= Molaritas
V	= valensi
M	= massa (gram)
Mr	= Massa molekul relatif (g/mol)
V	= Volume pelarut (Liter)

$$\text{Normalitas NaOH} = \frac{\frac{m}{40 \text{ g/mol}}}{\frac{1}{4\text{L}}} \times \text{valensi NaOH}$$

$$0,5 \text{ N} = \frac{4 \cdot m}{40 \text{ g/mol}} \times 1$$

$$0,5 \text{ N} \times 40 \text{ g/mol} = 4 \cdot m$$

$$m = \frac{0,5 \text{ N} \times 40 \text{ g/mol}}{4} = 5 \text{ gram}$$

NaOH dengan konsentrasi 0,5 N dibuat dengan cara ditimbang padatan NaOH sebanyak 5 gram kemudian dilarutkan dengan akuades sampai larut sempurna, selanjutnya dimasukkan ke dalam labu ukur 250 mL, ditambahkan akuades sampai tanda batas dan dihomogenkan.

4. Pembuatan Larutan $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0,5 N

Menghitung Normalitas $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$

$$\text{Normalitas} = M \times v$$

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

$$= \frac{m}{M_r} \times V$$

Keterangan: M= Molaritas

v= valensi

m= massa (gram)

M_r = Massa molekul relatif (g/mol)

V= Volume pelarut (Liter)

$$\text{Normalitas } \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 = \frac{\frac{m}{90 \text{ g/mol}}}{\frac{1}{4\text{L}}} \times \text{valensi } \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$$

$$0,5 \text{ N} = \frac{m \times 4 \times 2}{90 \text{ g/mol}}$$

$$0,5 \text{ N} \times 90 \text{ g/mol} = 8 \times m$$

$$m = \frac{0,5 \text{ N} \times 90 \text{ g/mol}}{8} = 5,625 \text{ gram}$$

$H_2C_2O_4$ dengan konsentrasi 0,5 N dibuat dengan cara ditimbang padatan $H_2C_2O_4$ sebanyak 5,625 gram kemudian dilarutkan dengan akuades sampai larut sempurna, selanjutnya dimasukkan ke dalam labu ukur 250 mL, ditambahkan akuades sampai tanda batas dan dihomogenkan.

5. Pembuatan Larutan NaCl 0,85%

Larutan NaCl 0,85% dibuat dengan cara ditimbang padatan NaCl sebanyak 0,85 gram dan dilarutkan dengan akuades sampai larut sempurna, selanjutnya dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambahkan akuades sampai tanda batas dan dihomogenkan.

6. Pembuatan Konsentrasi Glukosa Standar 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm

$$\text{Stok glukosa baku} = \frac{100 \text{ mg glukosa anhidrat}}{0,1 \text{ L akuades}} = 1000 \text{ ppm}$$

Pembuatan larutan glukosa 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm dapat dilakukan dengan pengenceran larutan stok glukosa baku melalui 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:

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

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

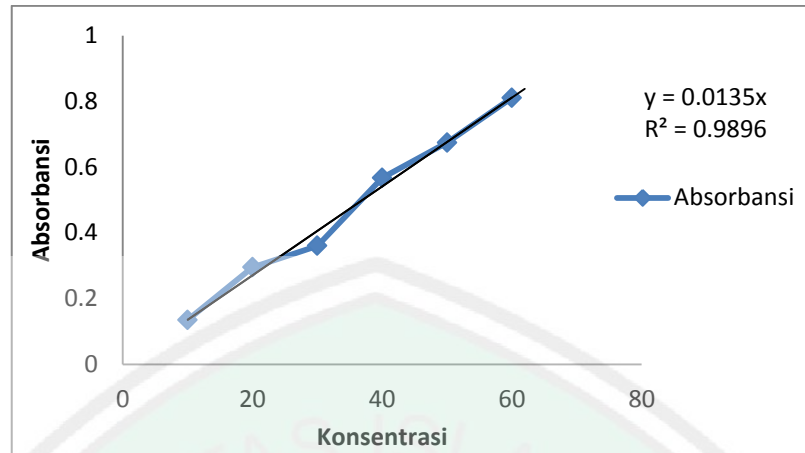
$$V_1 = 6 \text{ mL}$$

Pembuatan larutan glukosa adalah dengan dipipet larutan glukosa baku sesuai volume yang telah ditentukan, kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambahkan akuades hingga tanda batas dan dihomogenkan.

7. Kurva Standar Glukosa

Tabel 7. Data Absorbansi Glukosa Standar

Konsentrasi	Absorbansi
10 ppm	0,1349
20 ppm	0,2950
30 ppm	0,3606
40 ppm	0,5673
50 ppm	0,6741
60 ppm	0,8104



Gambar 7. Grafik Kurva Standar Glukosa

8. Analisis Kadar Total Gula Metode Fenol- H_2SO_4

8.1 Analisis Kadar Total Gula Bahan Baku

Analisis kadar total gula bahan baku dengan metode Fenol- H_2SO_4 yang diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis Cary 20 pada panjang gelombang 485 nm. Data absorbansi bahan baku dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 8.1.1. Absorbansi Bahan Baku

Nama	Absorbansi		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
Bahan baku	0,6370	0,6316	0,6354

Data absorbansi bahan baku tersebut diplotkan ke dalam persamaan regresi linear dari kurva standar glukosa yaitu $y = 0,0135x + 0,0016$ dengan y adalah absorbansi bahan baku dan x merupakan variabel yang dicari yaitu konsentrasi gula yang terkandung dalam bahan baku sebelum fermentasi memakai faktor pengenceran (fp) sebesar 10000 misalnya pada ulangan I :

$$y = 0,0135x + 0,0016$$

$$0,6370 = 0,0135x + 0,0016$$

$$0,6370 - 0,0016 = 0,0135x$$

$$x = (0,6370 - 0,0016) / 0,0135 = 47,07 \text{ ppm (konsentrasi berdasarkan kurva)}$$

$$\text{konsentrasi analisa} = 1 \text{ gram}/100 \text{ mL}$$

$$= 1000 \text{ mg}/0,1 \text{ L}$$

$$= 10000 \text{ ppm}$$

$$\text{Kadar gula (\%)} = \frac{\text{konsentrasi kurva} \times Fp \times 100\%}{\text{konsentrasi analisa}}$$

$$\text{Kadar gula (\%)} = \frac{47,07 \times 100 \times 100\%}{10000}$$

$$\text{kadar gula (\%)} = 47,07\%$$

Kadar total gula bahan baku dapat dilihat pada Tabel 8.1.2.

Tabel 8.1.2. Kadar Total Gula Bahan Baku

Nama	Kadar Total Gula (%)			Rata – rata (%)
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	
Bahan baku	47,07	46,67	46,95	46,90

8.2 Analisis Kadar Total Gula Sampel Sebelum Fermentasi

Analisis kadar total gula sebelum fermentasi dilakukan setelah tetes tebu dibuat dengan konsentrasi 18 % (b/v). Data absorbansi sampel sebelum fermentasi dapat dilihat pada Tabel 8.2.1.

Tabel 8.2.1. Absorbansi Sampel Sebelum Fermentasi

Nama	Absorbansi		
	Suhu 25°C	Suhu 30°C	Suhu 35°C
Tetes tebu 18%	0,2127	0,2045	0,2139

Data absorbansi sampel sebelum fermentasi tersebut diplotkan ke dalam persamaan regresi linear dari kurva standar glukosa yaitu $y = 0,0135x + 0,0016$ dengan y adalah absorbansi bahan baku dan x merupakan variabel yang dicari yaitu konsentrasi gula yang terkandung dalam bahan baku sebelum fermentasi.

Analisis sampel molase 18% menggunakan Faktor Pengenceran (FP) sebesar 10000 misalnya perhitungan dari ulangan I:

$$y = 0,0135x + 0,0016$$

$$0,2127 = 0,0135x + 0,0016$$

$$0,2127 - 0,0016 = 0,0135x$$

$$x = (0,2127 - 0,0016) / 0,0135 = 15,637 \text{ ppm (konsentrasi berdasarkan kurva)}$$

$$\text{konsentrasi analisa} = 0,01 \text{ gram/100 mL}$$

$$= 10 \text{ mg/0,1 L}$$

$$= 100 \text{ ppm}$$

$$\text{Kadar gula (\%)} = \frac{\text{konsentrasi kurva} \times \text{Fp} \times 100\%}{\text{konsentrasi analisa}}$$

$$\text{Kadar gula (\%)} = \frac{15,64 \times 100\%}{100}$$

$$\text{kadar gula (\%)} = 15,64\%$$

Kadar total gula sampel sebelum fermentasi dapat dilihat pada Tabel 8.2.2

Tabel 8.2.2. Kadar Total Gula Sampel Sebelum Fermentasi

Nama	Kadar Total Gula (%)			Rata – rata (%)
	Suhu 25°C	Suhu 30°C	Suhu 35°C	
Tetes tebu 18%	15,64	15,03	15,73	15,47

8.3 Analisis Kadar Total Gula Sisa Fermentasi

Analisis kadar total gula sisa fermentasi dilakukan setelah fermentasi. Data

absorbansi total gula sisa fermentasi dapat dilihat pada Tabel 8.3.1

Tabel 8.3.1. Absorbansi Sampel Setelah Fermentasi

Perlakuan	Absorbansi		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
S ₁ L ₁	0,1395	0,1536	0,1623
S ₁ L ₂	0,2112	0,1402	0,1356
S ₂ L ₁	0,1297	0,1053	0,1075
S ₂ L ₂	0,3891	0,3735	0,3597
S ₃ L ₁	0,4649	0,4662	0,3079
S ₃ L ₂	0,4528	0,4451	0,3955

Data absorbansi sampel setelah fermentasi tersebut diplotkan ke dalam persamaan regresi linear dari kurva standar glukosa yaitu $y = 0,0135x + 0,0016$ dengan y adalah absorbansi bahan baku dan x merupakan variabel yang dicari yaitu konsentrasi gula yang terkandung dalam bahan baku sebelum fermentasi menggunakan Faktor Pengenceran (FP) 1000. Misalnya pada perlakuan S_1L_1 ulangan I :

$$y = 0,0135x + 0,0016$$

$$0,1395 = 0,0135x + 0,0016$$

$$0,1395 - 0,0016 = 0,0135x$$

$$x = (0,1395 - 0,0016) / 0,0135 = 10,2148 \text{ ppm}$$

$$\text{kadar gula (\%)} = 10,2148 \times 1000 = 10214,8 \text{ ppm} = 1,02148 \%$$

Kadar total gula sampel sisa fermentasi dapat dilihat pada Tabel 8.3.2.

Tabel 8.3.2. Kadar Total Gula Sisa Fermentasi

Perlakuan	Kadar Total Gula (%)			Rata – rata (%)
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	
S_1L_1	1,02	1,13	1,19	1,11
S_1L_2	1,55	1,03	0,99	1,19
S_2L_1	0,95	0,77	0,78	0,83
S_2L_2	2,87	2,75	2,65	2,76
S_3L_1	3,43	3,44	2,27	3,05
S_3L_2	3,34	3,29	2,92	3,18

8.4 Analisis Kadar Gula Terpakai pada Proses Fermentasi

Kadar gula terpakai pada proses fermentasi dapat diketahui melalui pengurangan antara kadar gula sebelum fermentasi dengan kadar gula sisa fermentasi. Perolehan kadar gula terpakai pada proses fermentasi ditunjukkan pada tabel berikut ini:

Tabel 8.4.1. Kadar gula terpakai pada fermentasi ulangan I

Perlakuan	Kadar gula sebelum fermentasi (%)	Kadar gula sisa fermentasi (%)	Kadar gula terpakai (%)
S ₁ L ₁	15,47	1,02	14,45
S ₁ L ₂	15,47	1,55	13,92
S ₂ L ₁	15,47	0,95	14,52
S ₂ L ₂	15,47	2,87	12,6
S ₃ L ₁	15,47	3,43	12,04
S ₃ L ₂	15,47	3,34	12,13

Tabel 8.4.2. Kadar gula terpakai fermentasi ulangan II

Perlakuan	Kadar gula sebelum fermentasi (%)	Kadar gula sisa fermentasi (%)	Kadar gula terpakai (%)
S ₁ L ₁	15,47	1,13	14,34
S ₁ L ₂	15,47	1,03	14,44
S ₂ L ₁	15,47	0,77	14,7
S ₂ L ₂	15,47	2,75	12,72
S ₃ L ₁	15,47	3,44	12,03
S ₃ L ₂	15,47	3,29	12,18

Tabel 8.4.3. Kadar gula terpakai pada fermentasi ulangan III

Perlakuan	Kadar gula sebelum fermentasi (%)	Kadar gula sisa fermentasi (%)	Kadar gula terpakai (%)
S ₁ L ₁	15,47	1,19	14,28
S ₁ L ₂	15,47	0,99	14,48
S ₂ L ₁	15,47	0,78	14,69
S ₂ L ₂	15,47	2,65	12,82
S ₃ L ₁	15,47	2,27	13,2
S ₃ L ₂	15,47	2,92	12,55

Tabel 8.4.4. Rata-rata kadar gula terpakai

Perlakuan	Kadar gula terpakai (%)			Rata – rata (%)
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	
S ₁ L ₁	14,45	14,34	14,28	14,36
S ₁ L ₂	13,92	14,44	14,48	14,28
S ₂ L ₁	14,52	14,7	14,69	14,67
S ₂ L ₂	12,6	12,72	12,82	12,71
S ₃ L ₁	12,04	12,03	13,2	12,42
S ₃ L ₂	12,13	12,18	12,55	12,29

8.5 Analisis Kadar Total Gula Eksopolisakarida

Analisis kadar total gula EPS menggunakan metode yang sama, akan tetapi sebelum dilakukan perlakuan sebagaimana metode fenol H₂SO₄, sebanyak 10 mg EPS dilarutkan ke dalam 10 mL NaOH, kemudian diambil sebanyak 1 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambahkan larutan NaOH 0,5 N hingga tanda batas dan dihomogenkan. Data absorbansi total gula eksopolisakarida dapat dilihat pada Tabel 8.5.1.

Tabel 8.5.1. Absorbansi Eksopolisakarida

Perlakuan	Absorbansi		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
S ₁ L ₁	0,5945	0,5431	0,5830
S ₁ L ₂	0,4733	0,5392	0,5990
S ₂ L ₁	0,8063	0,8002	0,8084
S ₂ L ₂	0,8021	0,8026	0,8086
S ₃ L ₁	0,4179	0,4188	0,4251
S ₃ L ₂	0,4029	0,4115	0,4013

Data absorbansi sampel setelah fermentasi tersebut diplotkan ke dalam persamaan regresi linear dari kurva standar glukosa yaitu $y = 0,0135x + 0,0016$ dengan y adalah absorbansi bahan baku dan x merupakan variabel yang dicari yaitu konsentrasi gula yang terkandung dalam bahan baku sebelum fermentasi misalnya pada perlakuan S₁L₁ ulangan I :

$$y = 0,0135x + 0,0016$$

$$0,5945 = 0,0135x + 0,0016$$

$$0,5945 - 0,0016 = 0,0135x$$

$$x = (0,5945 - 0,0016) / 0,0135 = 43,9185 \text{ ppm (konsentrasi berdasarkan kurva)}$$

$$\text{konsentrasi analisa} = 0,01 \text{ gram/10 mL}$$

$$= 10 \text{ mg/0,01 L}$$

$$= 1000 \text{ ppm}$$

$$\text{Kadar gula (\%)} = \frac{\text{konsentrasi kurva} \times Fp \times 100\%}{\text{konsentrasi analisa}}$$

$$\text{Kadar gula (\%)} = \frac{43,92 \times 100 \%}{1000}$$

$$\text{kadar gula (\%)} = 4,39 \%$$

Kadar total gula sampel sisa fermentasi dapat dilihat pada Tabel 8.5.2

Tabel 8.5.2. Rata-rata kadar total gula eksopolisakarida

Perlakuan	Kadar Total Gula (%)			Rata – rata (%)
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	
S ₁ L ₁	4,39	4,01	4,31	4,24
S ₁ L ₂	3,49	3,98	4,43	3,97
S ₂ L ₁	5,96	5,98	5,98	5,97
S ₂ L ₂	5,93	5,93	5,92	5,93
S ₃ L ₁	3,08	2,98	3,14	3,07
S ₃ L ₂	2,97	3,04	2,96	2,99

9. Analisis Kadar Eksopolisakarida Hasil Fermentasi

Hasil produksi eksopolisakarida dari fermentasi menggunakan media tetes tebu ditunjukkan pada Tabel 9.1.

Tabel 9.1. Data hasil produksi rata-rata eksopolisakarida

Perlakuan	Berat EPS kering (mg)			Rata – rata (mg)
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	
S ₁ L ₁	16,1	13,5	15,5	15,03
S ₁ L ₂	7	7,1	6,5	6,87
S ₂ L ₁	19,4	18,5	17,6	18,5
S ₂ L ₂	17,2	16,5	15,8	16,5
S ₃ L ₁	14,7	10,5	11,5	12,23
S ₃ L ₂	11,8	11,1	8,8	10,57

Data pada Tabel 9.1 digunakan untuk menentukan kadar eksopolisakarida berdasarkan rumus:

$$\text{Kadar eksopolisakarida (mg/L)} = \frac{\text{Berat EPS kering (mg)}}{\text{Volume media (L)}}$$

Misalnya pada perlakuan S₁L₁ ulangan I:

$$\text{Kadar eksopolisakarida (mg/L)} = \frac{16,1 \text{ mg}}{0,025 \text{ L}} = 644 \text{ mg/L}$$

Kadar eksopolisakarida ditunjukkan pada Tabel 9.2

Tabel 9.2. Kadar rata-rata eksopolisakarida

Perlakuan	Kadar Eksopolisakarida (mg/L)			Rata – rata (mg/L)
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	
S ₁ L ₁	644	540	620	601,33
S ₁ L ₂	280	284	260	274,67
S ₂ L ₁	776	740	704	740
S ₂ L ₂	688	660	632	660
S ₃ L ₁	588	420	460	489,33
S ₃ L ₂	472	444	352	422,67

10. Perhitungan Jumlah Bakteri Menggunakan Metode TPC

10.1 Ulangan I

Pengenceran	Jumlah Koloni
10 ⁻³	Sprider
10 ⁻⁴	Sprider
10 ⁻⁵	Sprider
10 ⁻⁶	Sprider
10 ⁻⁷	217
10 ⁻⁸	81
10 ⁻⁹	34
10 ⁻¹⁰	7

$$\begin{aligned}
 \text{Perhitungan jumlah bakteri} &= \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{fp} \text{ cfu} \\
 &= 217 \times \frac{1}{10^{-7}} \text{ cfu} \\
 &= 217 \times 10^7 \text{ cfu} \\
 &= 2,17 \times 10^9 \text{ cfu}
 \end{aligned}$$

10.2 Ulangan II

Pengenceran	Jumlah Koloni
10^{-3}	Sprider
10^{-4}	Sprider
10^{-5}	Sprider
10^{-6}	Sprider
10^{-7}	276
10^{-8}	111
10^{-9}	61
10^{-10}	9

$$\begin{aligned}
 \text{Perhitungan jumlah bakteri} &= \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{fp} \text{ cfu} \\
 &= 276 \times \frac{1}{10^{-7}} \text{ cfu} \\
 &= 276 \times 10^7 \text{ cfu} \\
 &= 2,76 \times 10^9 \text{ cfu}
 \end{aligned}$$

10.3 Ulangan III

Pengenceran	Jumlah Koloni
10^{-3}	Sprider
10^{-4}	Sprider
10^{-5}	Sprider
10^{-6}	>300
10^{-7}	205
10^{-8}	102
10^{-9}	25
10^{-10}	4

$$\begin{aligned}
 \text{Perhitungan jumlah bakteri} &= \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{fp} \text{ cfu} \\
 &= 205 \times \frac{1}{10^{-7}} \text{ cfu} \\
 &= 205 \times 10^7 \text{ cfu} \\
 &= 2,05 \times 10^9 \text{ cfu}
 \end{aligned}$$

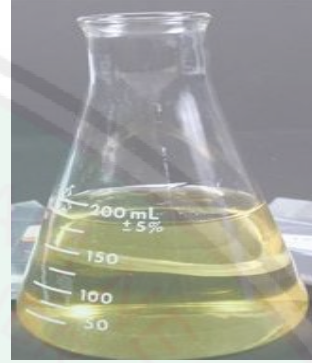
Lampiran 4

DOKUMENTASI

Pembuatan Media dan Pembuatan inokulum



Media padat (MRSA) untuk peremajaan bakteri



Media cair (MRSB) untuk pembuatan kultur bakteri

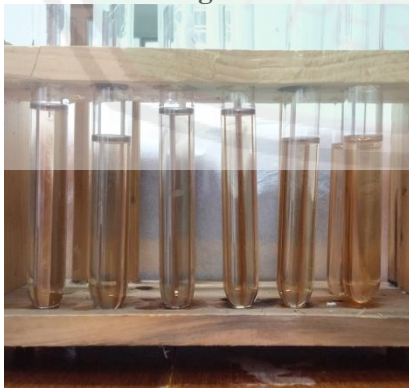


Pembuatan MRSB



Pembuatan inokulum bakteri selama 18 jam aerasi, media tampak keruh

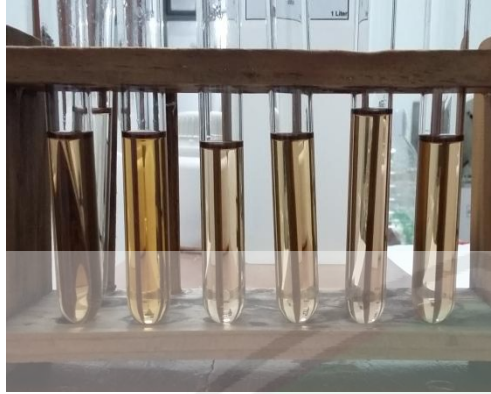
Analisis kadar total gula



Analisis kadar total gula setelah fermentasi suhu 25°C



Analisis kadar total gula setelah fermentasi suhu 30°C



Analisis kadar total gula setelah fermentasi suhu 35°C



Analisis kadar total gula EPS

Fermentasi



Preparasi molase



Perhitungan *Total Plate Count* (TPC)



Persiapan sterilisasi menggunakan autoklaf

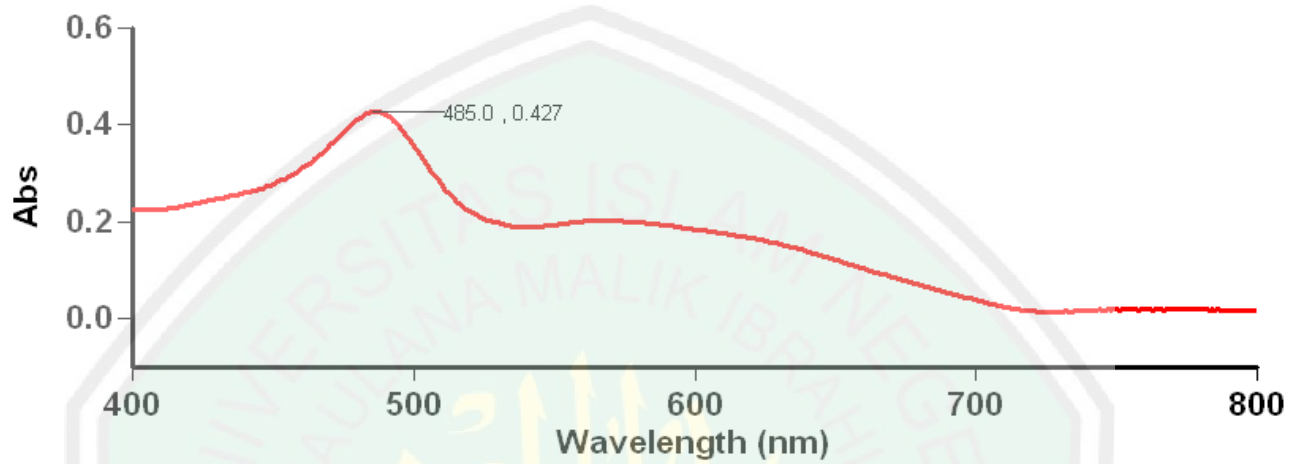


Fermentasi pada suhu 30°C selama 18 jam dan 24 jam menggunakan shaker

Lampiran 5. Data Panjang Gelombang Maksimum

Lamdha Maks

Tanggal Analisa : 14 Juni 2016



Scan Analysis Report

Report Time : Tue 14 Jun 11:54:14 AM 2016

Method:

Batch: D:\Aida Fitria\Lamdha Maks (14-06-2016).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

Sample Name: Glukosa 10 ppm

Collection Time 6/14/2016 11:45:01 AM

Peak Table

Peak Style Peaks

Peak Threshold 0.0100

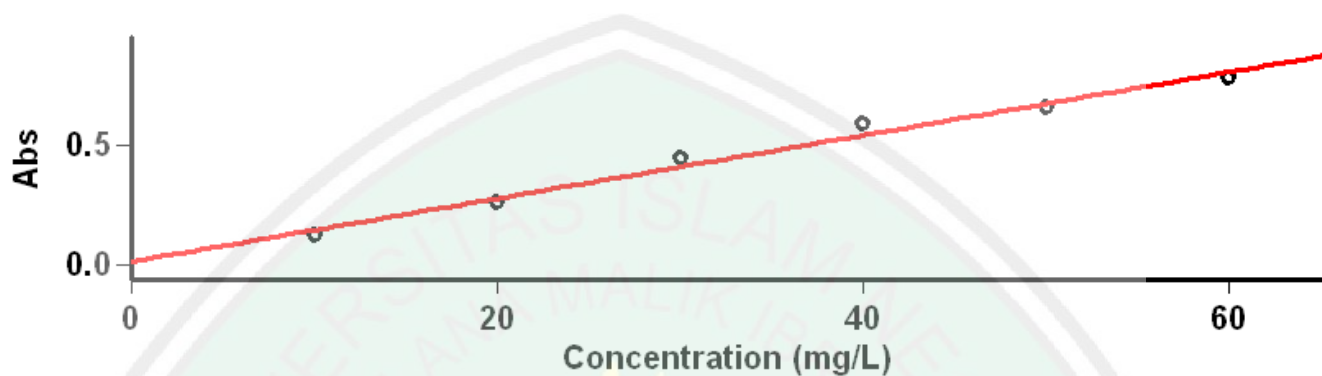
Range 800.0nm to 200.0nm

Wavelength (nm)	Abs
485.0	0.427

Lampiran 6. Kurva Standar Glukosa

Kurva Standar Glukosa

Tanggal Analisa : 23 Juni 2016



Concentration Analysis Report

Report time 6/23/2016 09:54:55 AM
 Method
 Batch name D:\Aida Fitria\Kurva Standar Glukosa
 (23-06-2016).BCN
 Application Concentration 3.00(339)
 Operator Rika

Instrument Settings

Instrument Cary 50
 Instrument version no. 3.00
 Wavelength (nm) 485.0
 Ordinate Mode Abs
 Ave Time (sec) 0.1000
 Replicates 3
 Standard/Sample averaging OFF
 Weight and volume corrections OFF
 Fit type Linear
 Min R² 0.95000
 Concentration units mg/L

Comments:

Zero Report

Read Abs nm

Zero (0.5345) 485.0

Calibration

Collection time 6/23/2016 10:55:34 AM

Standard	Concentration mg/L	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Std 1						0.1254
						0.1257
	10.0		0.1349	0.0001	0.12	0.1255
Std 2						0.2639
						0.2636
	20.0		0.2950	0.0001	0.04	0.2637
Std 3						0.4524
						0.4510
	30.0		0.3606	0.0012	0.27	0.4500
Std 4						0.5894
						0.5884
	40.0		0.5673	0.0009	0.15	0.5877
Std 5						0.6593
						0.6587
	50.0		0.6741	0.0003	0.04	0.6589
Std 6						0.7845
						0.7844
	60.0		0.8104	0.0004	0.05	0.7838

Calibration eqn Abs = 0.0135*Conc +0.0016

Correlation Coefficient 0.98341

Calibration time 6/23/2016 10:57:56 AM

Results Flags Legend

U = Uncalibrated

O = Overage

N = Not used in calibration

R = Repeat reading

Lampiran 7. Hasil Uji Statistik

7.1 Analisis Pengaruh Suhu dan Lama Fermentasi Terhadap Kadar Gula Terpakai

Univariate Analysis of Variance

Warnings

Post hoc tests are not performed for Lama_Fermentasi because there are fewer than three groups.

Between-Subjects Factors

		N
Lama_Fermentasi	1	9
	2	9
Suhu	1	6
	2	6
	3	6

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Kadar_Gula_Terpakai

Lama_Fermentasi	Suhu	Mean	Std. Deviation	N
1	1	14.53	.086	3
	2	14.20	.101	3
	3	12.68	.673	3
	Total	13.80	.918	9
2	1	14.45	.312	3
	2	12.27	.110	3
	3	12.55	.229	3
	Total	13.09	1.046	9
Total	1	14.49	.209	6
	2	13.24	1.058	6
	3	12.61	.456	6
	Total	13.45	1.023	18

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable:Kadar_Gula_Terpakai

F	df1	df2	Sig.
7.377	5	12	.002

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

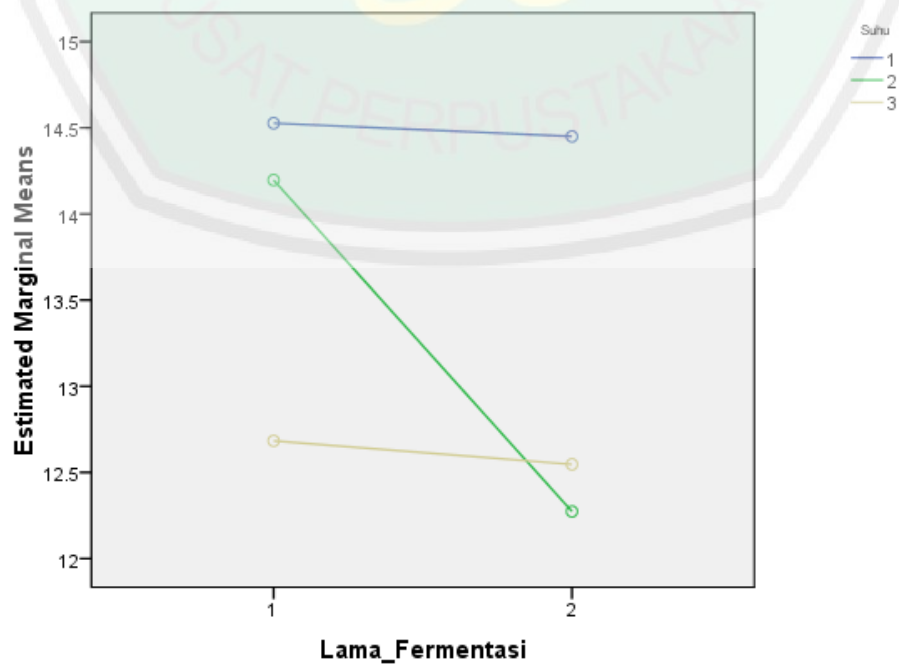
a. Design: Intercept + Lama_Fermentasi + Suhu + Lama_Fermentasi * Suhu

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Kadar_Gula_Terpakai

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	16.515 ^a	5	3.303	31.334	.000
Intercept	3254.362	1	3254.362	3.087E4	.000
Lama_Fermentasi	2.283	1	2.283	21.655	.001
Suhu	10.929	2	5.465	51.841	.000
Lama_Fermentasi * Suhu	3.303	2	1.651	15.667	.000
Error	1.265	12	.105		
Total	3272.142	18			
Corrected Total	17.780	17			

a. R Squared = .929 (Adjusted R Squared = .899)

Profile Plots**Estimated Marginal Means of Kadar_Gula_Terpakai**

Post Hoc Tests

Suhu

Multiple Comparisons

Kadar_Gula_Terpakai
Tukey HSD

(I) Suhu	(J) Suhu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	1.25 [*]	.187	.000	.75	1.75
	3	1.87 [*]	.187	.000	1.37	2.37
2	1	-1.25 [*]	.187	.000	-1.75	-.75
	3	.62	.187	.016	.12	1.12
3	1	-1.87 [*]	.187	.000	-2.37	-1.37
	2	-.62	.187	.016	-1.12	-.12

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .105.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Kadar_Gula_Terpakai

Tukey HSD

Suhu	N	Subset		
		1	2	3
3	6	12.61		
2	6		13.24	
1	6			14.49
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .105.

Estimated Marginal Means

1. Lama_Fermentasi

Dependent Variable:Kadar_Gula_Terpakai

Lama_Fermentasi	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
1	13.802	.108	13.566	14.038
2	13.090	.108	12.854	13.326

2. Suhu

Dependent Variable:Kadar_Gula_Terpakai

Suhu	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
1	14.488	.133	14.200	14.777
2	13.235	.133	12.946	13.524
3	12.615	.133	12.326	12.904

3. Lama_Fermentasi * Suhu

Dependent Variable:Kadar_Gula_Terpakai

Lama_Fermentasi	Suhu	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
1	1	14.527	.187	14.118	14.935
	2	14.197	.187	13.788	14.605
	3	12.683	.187	12.275	13.092
2	1	14.450	.187	14.042	14.858
	2	12.273	.187	11.865	12.682
	3	12.547	.187	12.138	12.955

7.2 Analisis Pengaruh Suhu dan Lama Fermentasi Terhadap Kadar Eksopolisakarida

Univariate Analysis of Variance

Warnings

Post hoc tests are not performed for Lama_Fermentasi because there are fewer than three groups.

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Lama_Fermentasi	1	18 Jam	9
	2	24 Jam	9
Suhu	1	25 C	6
	2	30 C	6
	3	35 C	6

Descriptive Statistics

Dependent Variable:Kadar_Eksopolisakarida

Lama_Fermentasi	Suhu	Mean	Std. Deviation	N
18 Jam	25 C	601.33	54.455	3
	30 C	740.00	36.000	3
	35 C	489.33	87.757	3
	Total	610.22	121.723	9
24 Jam	25 C	274.67	12.858	3
	30 C	660.00	28.000	3
	35 C	422.67	62.780	3
	Total	452.44	171.935	9
Total	25 C	438.00	182.389	6
	30 C	700.00	52.460	6
	35 C	456.00	77.398	6
	Total	531.33	165.751	18

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable:Kadar_Eksopolisakarida

F	df1	df2	Sig.
2.584	5	12	.083

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Lama_Fermentasi + Suhu + Lama_Fermentasi * Suhu

Tests of Between-Subjects Effects

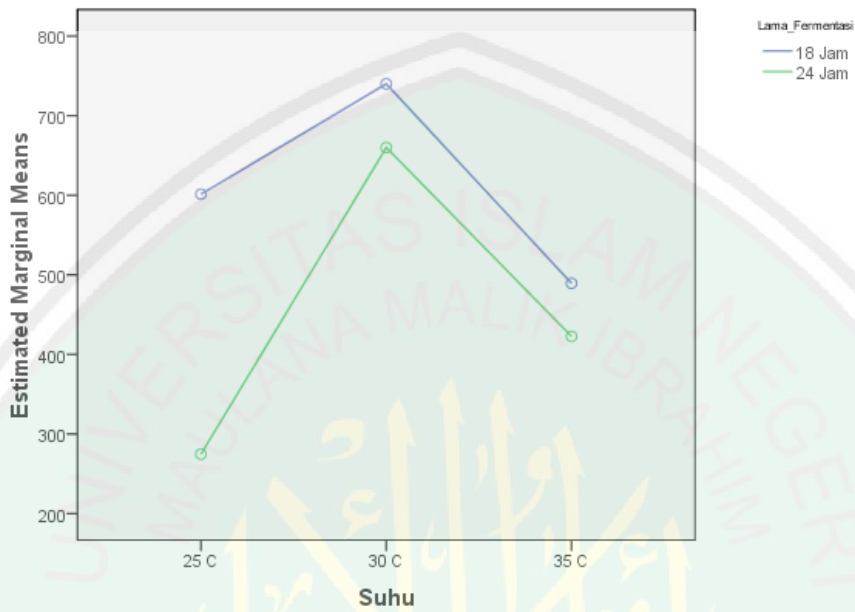
Dependent Variable:Kadar_Eksopolisakarida

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	433341.333 ^a	5	86668.267	30.855	.000
Intercept	5081672.000	1	5081672.000	1.809E3	.000
Lama_Fermentasi	112022.222	1	112022.222	39.881	.000
Suhu	257008.000	2	128504.000	45.749	.000
Lama_Fermentasi * Suhu	64311.111	2	32155.556	11.448	.002
Error	33706.667	12	2808.889		
Total	5548720.000	18			
Corrected Total	467048.000	17			

a. R Squared = .928 (Adjusted R Squared = .898)

Profile Plots

Estimated Marginal Means of Kadar_Eksopolisakarida



Post Hoc Tests

Suhu

Multiple Comparisons

Kadar_Eksopolisakarida
Tukey HSD

(I) Suhu	(J) Suhu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
25 C	30 C	-262.00*	30.599	.000	-343.63	-180.37
	35 C	-18.00	30.599	.829	-99.63	63.63
30 C	25 C	262.00*	30.599	.000	180.37	343.63
	35 C	244.00*	30.599	.000	162.37	325.63
35 C	25 C	18.00	30.599	.829	-63.63	99.63
	30 C	-244.00*	30.599	.000	-325.63	-162.37

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 2808.889.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Kadar_Eksopolisakarida

Tukey HSD

Suhu	N	Subset	
		1	2
25 C	6	438.00	
35 C	6	456.00	
30 C	6		700.00
Sig.		.829	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 2808.889.

Estimated Marginal Means

1. Lama_Fermentasi

Dependent Variable:Kadar_Eksopolisakarida

Lama_Fermentasi	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
18 Jam	610.222	17.666	571.731	648.714
24 Jam	452.444	17.666	413.953	490.936

2. Suhu

Dependent Variable:Kadar_Eksopolisakarida

Suhu	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
25 C	438.000	21.637	390.858	485.142
30 C	700.000	21.637	652.858	747.142
35 C	456.000	21.637	408.858	503.142

3. Lama_Fermentasi * Suhu

Dependent Variable:Kadar_Eksopolisakarida

Lama_Fermentasi	Suhu	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
18 Jam	25 C	601.333	30.599	534.664	668.003
	30 C	740.000	30.599	673.331	806.669
	35 C	489.333	30.599	422.664	556.003
24 Jam	25 C	274.667	30.599	207.997	341.336
	30 C	660.000	30.599	593.331	726.669
	35 C	422.667	30.599	355.997	489.336

7.3 Analisis Pengaruh Suhu dan Lama Fermentasi Terhadap Kadar Total Gula EPS

Univariate Analysis of Variance

Warnings

Post hoc tests are not performed for Lama_Fermentasi because there are fewer than three groups.

Between-Subjects Factors

		N
Suhu	25 C	6
	30 C	6
	35 C	6
Lama_Fermentasi	18 jam	9
	24 jam	9

Descriptive Statistics

Dependent Variable:Kadar_Total_Gula_EPS

Suhu	Lama_Fermentasi	Mean	Std. Deviation	N
25 C	18 jam	4.2367	.20033	3
	24 jam	3.9667	.47014	3
	Total	4.1017	.35544	6
30 C	18 jam	5.9733	.01155	3
	24 jam	5.9267	.00577	3
	Total	5.9500	.02683	6
35 C	18 jam	3.0667	.08083	3
	24 jam	2.9900	.04359	3
	Total	3.0283	.07167	6
Total	18 jam	4.4256	1.27118	9
	24 jam	4.2944	1.31650	9
	Total	4.3600	1.25721	18

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Kadar_Total_Gula_EPS

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	26.330 ^a	5	5.266	117.126	.000
Intercept	342.173	1	342.173	7610.417	.000
Suhu	26.209	2	13.105	291.463	.000
Lama_Fermentasi	.077	1	.077	1.720	.214
Suhu * Lama_Fermentasi	.044	2	.022	.490	.624
Error	.540	12	.045		
Total	369.043	18			
Corrected Total	26.870	17			

a. R Squared = ,980 (Adjusted R Squared = ,972)

Estimated Marginal Means

1. Grand Mean

Dependent Variable:Kadar_Total_Gula_EPS

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
4.360	.050	4.251	4.469

2. Suhu

Dependent Variable:Kadar_Total_Gula_EPS

Suhu	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
25 C	4.102	.087	3.913	4.290
30 C	5.950	.087	5.761	6.139
35 C	3.028	.087	2.840	3.217

3. Lama_Fermentasi

Dependent Variable:Kadar_Total_Gula_EPS

Lama_Fermentasi	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
18 jam	4.426	.071	4.272	4.580
24 jam	4.294	.071	4.140	4.448

Post Hoc Tests

Suhu

Multiple Comparisons

Dependent Variable:Kadar_Total_Gula_EPS

	(I) Suhu	(J) Suhu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	25 C	30 C	-1.8483	.12242	.000	-2.1749	-1.5217
		35 C	1.0733	.12242	.000	.7467	1.3999
	30 C	25 C	1.8483	.12242	.000	1.5217	2.1749
		35 C	2.9217	.12242	.000	2.5951	3.2483
	35 C	25 C	-1.0733	.12242	.000	-1.3999	-.7467
		30 C	-2.9217	.12242	.000	-3.2483	-2.5951
LSD	25 C	30 C	-1.8483	.12242	.000	-2.1151	-1.5816
		35 C	1.0733	.12242	.000	.8066	1.3401
	30 C	25 C	1.8483	.12242	.000	1.5816	2.1151
		35 C	2.9217	.12242	.000	2.6549	3.1884
	35 C	25 C	-1.0733	.12242	.000	-1.3401	-.8066
		30 C	-2.9217	.12242	.000	-3.1884	-2.6549

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,045.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Homogeneous Subsets

Kadar_Total_Gula_EPS

	Suhu	N	Subset		
			1	2	3
Tukey HSD ^{a,b}	35 C	6	3.0283		
	25 C	6		4.1017	
	30 C	6			5.9500
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

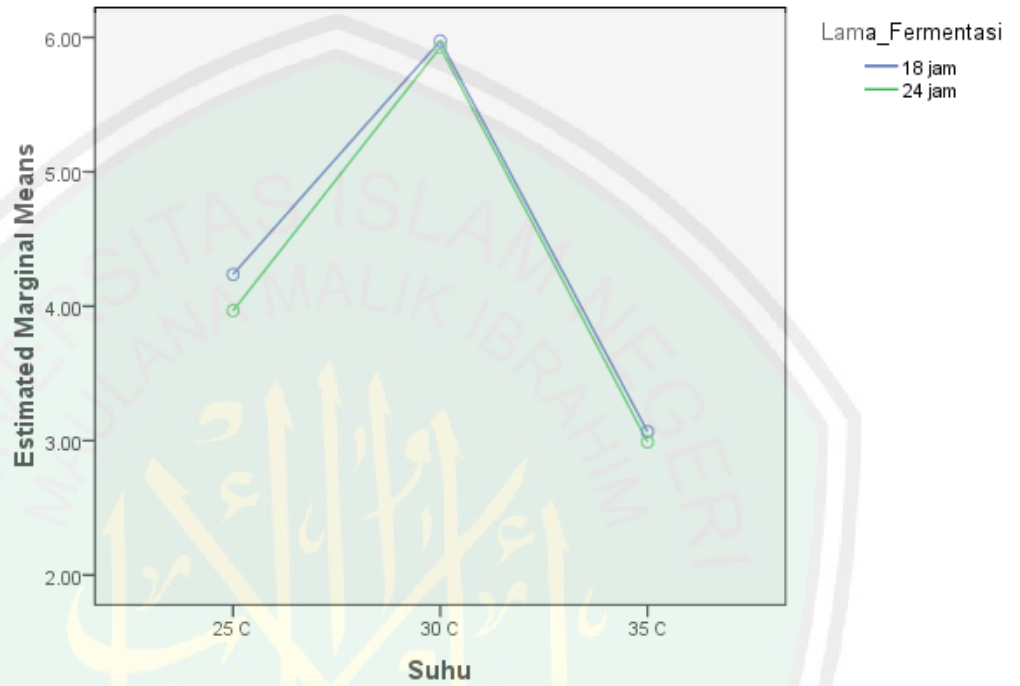
The error term is Mean Square(Error) = ,045.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

b. Alpha = ,05.

Profile Plots

Estimated Marginal Means of Kadar_Total_Gula_EPS



7.4 Analisis Interaksi Suhu dan Lama Fermentasi Terhadap Kadar Ekspolisakarida

Univariate Analysis of Variance

Warnings

Post hoc tests are not performed for lama_fermentasi because there are fewer than three groups.

Between-Subjects Factors

		N
suhu	25C	6
	30C	6
	35C	6
lama_fermentasi	18JAM	9
	24JAM	9
interaksi	25C,18JAM	3
	25C,24JAM	3
	30C,18JAM	3
	30C,24JAM	3
	35C,18JAM	3
	35C,24JAM	3

Descriptive Statistics

Dependent Variable: kadar_EPS

suhu	lama_fermentasi	interaksi	Mean	Std. Deviation	N
25C	18JAM	25C,18JAM	601,3333	54,45487	3
		Total	601,3333	54,45487	3
	24JAM	25C,24JAM	274,6667	12,85820	3
		Total	274,6667	12,85820	3
	Total	25C,18JAM	601,3333	54,45487	3
		25C,24JAM	274,6667	12,85820	3
Total		438,0000	182,38860	6	
30C	18JAM	30C,18JAM	740,0000	36,00000	3
		Total	740,0000	36,00000	3
	24JAM	30C,24JAM	660,0000	28,00000	3
		Total	660,0000	28,00000	3
	Total	30C,18JAM	740,0000	36,00000	3
		30C,24JAM	660,0000	28,00000	3
Total		700,0000	52,45951	6	
35C	18JAM	35C,18JAM	489,3333	87,75724	3
		Total	489,3333	87,75724	3
	24JAM	35C,24JAM	422,6667	62,78004	3
		Total	422,6667	62,78004	3
	Total	35C,18JAM	489,3333	87,75724	3
		35C,24JAM	422,6667	62,78004	3
Total		456,0000	77,39767	6	
Total	18JAM	25C,18JAM	601,3333	54,45487	3
		30C,18JAM	740,0000	36,00000	3
		35C,18JAM	489,3333	87,75724	3
		Total	610,2222	121,72282	9
	24JAM	25C,24JAM	274,6667	12,85820	3
		30C,24JAM	660,0000	28,00000	3
		35C,24JAM	422,6667	62,78004	3
		Total	452,4444	171,93539	9
	Total	25C,18JAM	601,3333	54,45487	3
		25C,24JAM	274,6667	12,85820	3
		30C,18JAM	740,0000	36,00000	3
		30C,24JAM	660,0000	28,00000	3
		35C,18JAM	489,3333	87,75724	3
		35C,24JAM	422,6667	62,78004	3
		Total	531,3333	165,75105	18

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: kadar_EPS

F	df1	df2	Sig.
2,584	5	12	,083

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + suhu + lama_fermentasi + interaksi + suhu * lama_fermentasi + suhu * interaksi + lama_fermentasi * interaksi + suhu * lama_fermentasi * interaksi

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: kadar_EPS

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	433341,333 ^a	5	86668,267	30,855	,000
Intercept	5081672,000	1	5081672,000	1809,140	,000
suhu	,000	0	.	.	.
lama_fermentasi	,000	0	.	.	.
interaksi	,000	0	.	.	.
suhu * lama_fermentasi	,000	0	.	.	.
suhu * interaksi	,000	0	.	.	.
lama_fermentasi * interaksi	,000	0	.	.	.
suhu * lama_fermentasi * interaksi	,000	0	.	.	.
Error	33706,667	12	2808,889		
Total	5548720,000	18			
Corrected Total	467048,000	17			

a. R Squared = ,928 (Adjusted R Squared = ,898)

Grand Mean

Dependent Variable: kadar_EPS

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
531,333 ^a	12,492	504,116	558,551

a. Based on modified population marginal mean.

Post Hoc Tests

suhu

Multiple Comparisons

Dependent Variable: kadar_EPS

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	25C	30C	-262,000*	30,59896	,000	-343,6339	-180,3661
		35C	-18,0000	30,59896	,829	-99,6339	63,6339
	30C	25C	262,000*	30,59896	,000	180,3661	343,6339
		35C	244,000*	30,59896	,000	162,3661	325,6339
	35C	25C	18,0000	30,59896	,829	-63,6339	99,6339
		30C	-244,000*	30,59896	,000	-325,6339	-162,3661
LSD	25C	30C	-262,000*	30,59896	,000	-328,6694	-195,3306
		35C	-18,0000	30,59896	,567	-84,6694	48,6694
	30C	25C	262,000*	30,59896	,000	195,3306	328,6694
		35C	244,000*	30,59896	,000	177,3306	310,6694
	35C	25C	18,0000	30,59896	,567	-48,6694	84,6694
		30C	-244,000*	30,59896	,000	-310,6694	-177,3306

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 2808,889.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

kadar_EPS

	suhu	N	Subset	
			1	2
Tukey HSD ^{a,b}	25C	6	438,0000	
	35C	6	456,0000	
	30C	6		700,0000
	Sig.			,829

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 2808,889.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

b. Alpha = ,05.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: kadar_EPS

	(I) interaksi	(J) interaksi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
.Tukey HSD	25C,18JAM	25C,24JAM	326,6667	43,27346	,000	181,3145	472,0188
		30C,18JAM	-138,6667	43,27346	,065	-284,0188	6,6855
		30C,24JAM	-58,6667	43,27346	,751	-204,0188	86,6855
		35C,18JAM	112,0000	43,27346	,174	-33,3521	257,3521
		35C,24JAM	178,6667	43,27346	,014	33,3145	324,0188
	25C,24JAM	25C,18JAM	-326,6667	43,27346	,000	-472,0188	-181,3145
		30C,18JAM	-465,3333	43,27346	,000	-610,6855	-319,9812
		30C,24JAM	-385,3333	43,27346	,000	-530,6855	-239,9812
		35C,18JAM	-214,6667	43,27346	,003	-360,0188	-69,3145
		35C,24JAM	-148,0000	43,27346	,045	-293,3521	-2,6479
	30C,18JAM	25C,18JAM	138,6667	43,27346	,065	-6,6855	284,0188
		25C,24JAM	465,3333	43,27346	,000	319,9812	610,6855
		30C,24JAM	80,0000	43,27346	,474	-65,3521	225,3521
		35C,18JAM	250,6667	43,27346	,001	105,3145	396,0188
		35C,24JAM	317,3333	43,27346	,000	171,9812	462,6855
	30C,24JAM	25C,18JAM	58,6667	43,27346	,751	-86,6855	204,0188
		25C,24JAM	385,3333	43,27346	,000	239,9812	530,6855
		30C,18JAM	-80,0000	43,27346	,474	-225,3521	65,3521
		35C,18JAM	170,6667	43,27346	,019	25,3145	316,0188
		35C,24JAM	237,3333	43,27346	,001	91,9812	382,6855
	35C,18JAM	25C,18JAM	-112,0000	43,27346	,174	-257,3521	33,3521
		25C,24JAM	214,6667	43,27346	,003	69,3145	360,0188
		30C,18JAM	-250,6667	43,27346	,001	-396,0188	-105,3145
		30C,24JAM	-170,6667	43,27346	,019	-316,0188	-25,3145
		35C,24JAM	66,6667	43,27346	,648	-78,6855	212,0188
	35C,24JAM	25C,18JAM	-178,6667	43,27346	,014	-324,0188	-33,3145
		25C,24JAM	148,0000	43,27346	,045	2,6479	293,3521
		30C,18JAM	-317,3333	43,27346	,000	-462,6855	-171,9812
30C,24JAM		-237,3333	43,27346	,001	-382,6855	-91,9812	
35C,18JAM		-66,6667	43,27346	,648	-212,0188	78,6855	
LSD	25C,18JAM	25C,24JAM	326,6667	43,27346	,000	232,3819	420,9514
		30C,18JAM	-138,6667	43,27346	,008	-232,9514	-44,3819
		30C,24JAM	-58,6667	43,27346	,200	-152,9514	35,6181
		35C,18JAM	112,0000	43,27346	,024	17,7152	206,2848
		35C,24JAM	178,6667	43,27346	,001	84,3819	272,9514
	25C,24JAM	25C,18JAM	-326,6667	43,27346	,000	-420,9514	-232,3819
		30C,18JAM	-465,3333	43,27346	,000	-559,6181	-371,0486
		30C,24JAM	-385,3333	43,27346	,000	-479,6181	-291,0486
		35C,18JAM	-214,6667	43,27346	,000	-308,9514	-120,3819
		35C,24JAM	-148,0000	43,27346	,005	-242,2848	-53,7152
	30C,18JAM	25C,18JAM	138,6667	43,27346	,008	44,3819	232,9514
		25C,24JAM	465,3333	43,27346	,000	371,0486	559,6181
		30C,24JAM	80,0000	43,27346	,089	-14,2848	174,2848
		35C,18JAM	250,6667	43,27346	,000	156,3819	344,9514
		35C,24JAM	317,3333	43,27346	,000	223,0486	411,6181

30C,24JAM	25C,18JAM	58,6667	43,27346	,200	-35,6181	152,9514
	25C,24JAM	385,3333	43,27346	,000	291,0486	479,6181
	30C,18JAM	-80,0000	43,27346	,089	-174,2848	14,2848
	35C,18JAM	170,6667	43,27346	,002	76,3819	264,9514
	35C,24JAM	237,3333	43,27346	,000	143,0486	331,6181
35C,18JAM	25C,18JAM	-112,0000	43,27346	,024	-206,2848	-17,7152
	25C,24JAM	214,6667	43,27346	,000	120,3819	308,9514
	30C,18JAM	-250,6667	43,27346	,000	-344,9514	-156,3819
	30C,24JAM	-170,6667	43,27346	,002	-264,9514	-76,3819
	35C,24JAM	66,6667	43,27346	,149	-27,6181	160,9514
35C,24JAM	25C,18JAM	-178,6667	43,27346	,001	-272,9514	-84,3819
	25C,24JAM	148,0000	43,27346	,005	53,7152	242,2848
	30C,18JAM	-317,3333	43,27346	,000	-411,6181	-223,0486
	30C,24JAM	-237,3333	43,27346	,000	-331,6181	-143,0486
	35C,18JAM	-66,6667	43,27346	,149	-160,9514	27,6181

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 2808,889.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Homogeneous Subsets

kadar_EPS						
	interaksi	N	Subset			
			1	2	3	4
Tukey HSD ^{a,b}	25C,24JAM	3	274,6667			
	35C,24JAM	3		422,6667		
	35C,18JAM	3		489,3333	489,3333	
	25C,18JAM	3			601,3333	601,3333
	30C,24JAM	3				660,0000
	30C,18JAM	3				740,0000
	Sig.			1,000	,648	,174

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

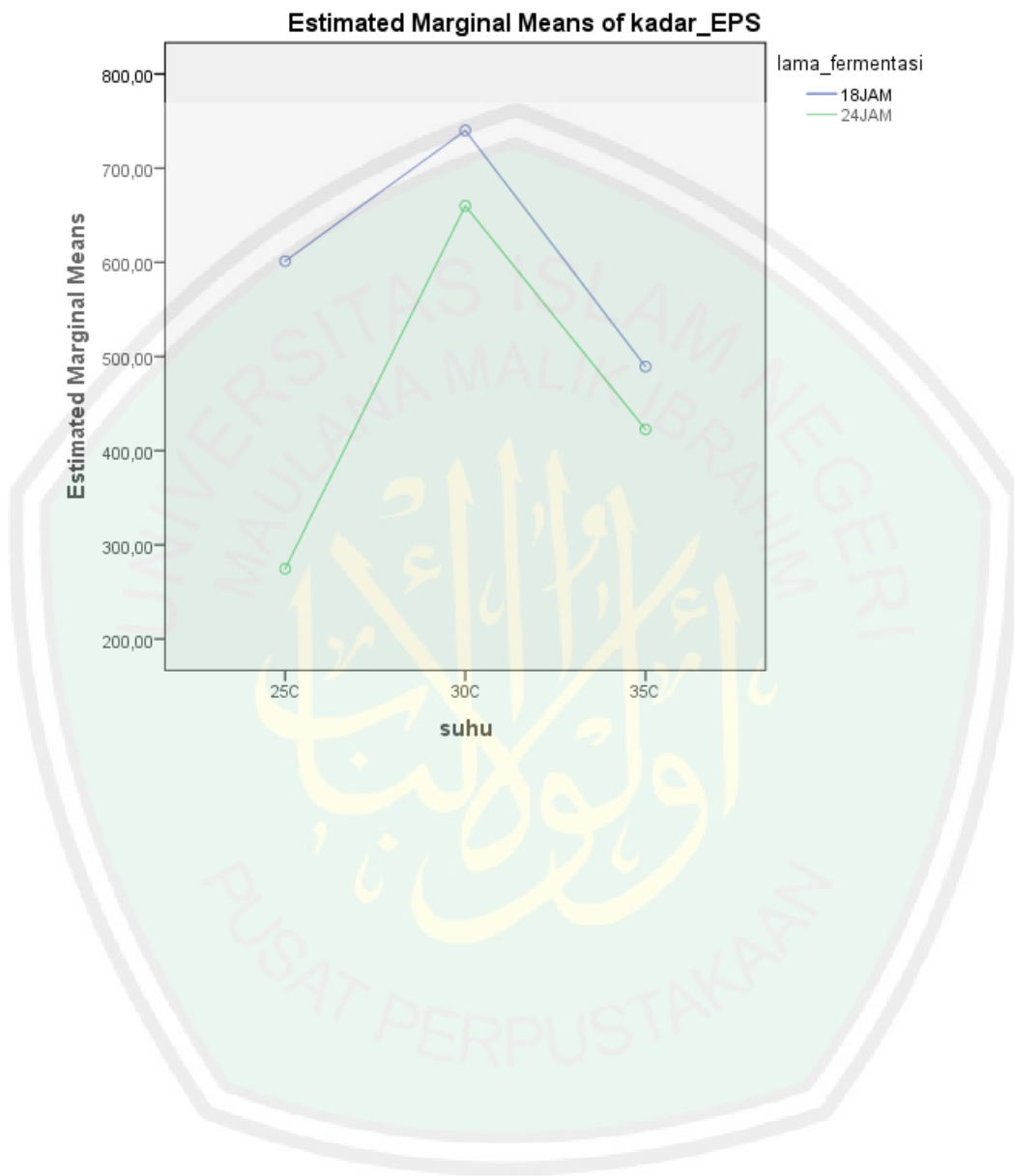
Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 2808,889.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

Profile Plots



7.5 Analisis Interaksi Suhu dan Lama Fermentasi terhadap Kadar Gula Terpakai Selama Fermentasi

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors		N
Suhu	25C	6
	30C	6
	35C	6
Lama_Fermentasi	18Jam	9
	24Jam	9
Interaksi	25C,18Jam	3
	25C,24Jam	3
	30C,18Jam	3
	30C,24Jam	3
	35C,18Jam	3
	35C,24Jam	3

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Kadar_Gula_Terpakai

Suhu	Lama_Fermentasi	Interaksi	Mean	Std. Deviation	N
25C	18Jam	25C,18Jam	14,5267	,08622	3
		Tota	14,5267	,08622	3
	24Jam	25C,24Jam	14,4500	,31241	3
		Total	14,4500	,31241	3
	Total	25C,18Jam	14,5267	,08622	3
		25C,24Jam	14,4500	,31241	3
Total		14,4883	,20923	6	
30C	18Jam	30C,18Jam	14,1967	,10116	3
		Total	14,1967	,10116	3
	24Jam	30C,24Jam	12,2733	,11015	3
		Total	12,2733	,11015	3
	Total	30C,18Jam	14,1967	,10116	3
		30C,24Jam	12,2733	,11015	3
Total		13,2350	1,05769	6	
35C	18Jam	35C,18Jam	12,6833	,67263	3
		Total	12,6833	,67263	3
	24Jam	35C,24Jam	12,5467	,22942	3
		Total	12,5467	,22942	3
	Total	35C,18Jam	12,6833	,67263	3
		35C,24Jam	12,5467	,22942	3
Total		12,6150	,45566	6	
Total	18Jam	25C,18Jam	14,5267	,08622	3
		30C,18Jam	14,1967	,10116	3
		35C,18Jam	12,6833	,67263	3
		Total	13,8022	,91768	9
	24Jam	25C,24Jam	14,4500	,31241	3
		30C,24Jam	12,2733	,11015	3
		35C,24Jam	12,5467	,22942	3
		Total	13,0900	1,04642	9
	Total	25C,18Jam	14,5267	,08622	3
		25C,24Jam	14,4500	,31241	3
		30C,18Jam	14,1967	,10116	3
		30C,24Jam	12,2733	,11015	3
Total	35C,18Jam	12,6833	,67263	3	
	35C,24Jam	12,5467	,22942	3	
	Total	13,4461	1,02268	18	

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Kadar_Gula_Terpakai

F	df1	df2	Sig.
7,377	5	12	,002

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Suhu + Lama_Fermentasi + Interaksi + Suhu * Lama_Fermentasi + Suhu * Interaksi + Lama_Fermentasi * Interaksi + Suhu * Lama_Fermentasi * Interaksi

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Kadar_Gula_Terpakai

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	16,515 ^a	5	3,303	31,334	,000
Intercept	3254,362	1	3254,362	30873,048	,000
Suhu	,000	0	.	.	.
Lama_Fermentasi	,000	0	.	.	.
Interaksi	,000	0	.	.	.
Suhu * Lama_Fermentasi	,000	0	.	.	.
Suhu * Interaksi	,000	0	.	.	.
Lama_Fermentasi *	,000	0	.	.	.
Interaksi	,000	0	.	.	.
Suhu * Lama_Fermentasi *	,000	0	.	.	.
Interaksi	,000	0	.	.	.
Error	1,265	12	,105		
Total	3272,142	18			
Corrected Total	17,780	17			

a. R Squared = ,929 (Adjusted R Squared = ,899)

Estimated Marginal Means

Grand Mean

Dependent Variable: Kadar_Gula_Terpakai

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
13,446 ^a	,077	13,279	13,613

a. Based on modified population marginal mean.

Post Hoc Tests

Suhu

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kadar_Gula_Terpakai

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Suhu	Suhu
Tukey HSD	25C	30C	1,2533 [*]	,18745	,000	,7532	1,7534
		35C	1,8733 [*]	,18745	,000	1,3732	2,3734
	30C	25C	-1,2533 [*]	,18745	,000	-1,7534	-,7532
		35C	,6200 [*]	,18745	,016	,1199	1,1201
	35C	25C	-1,8733 [*]	,18745	,000	-2,3734	-1,3732
		30C	-,6200 [*]	,18745	,016	-1,1201	-,1199
LSD	25C	30C	1,2533 [*]	,18745	,000	,8449	1,6617
		35C	1,8733 [*]	,18745	,000	1,4649	2,2817
	30C	25C	-1,2533 [*]	,18745	,000	-1,6617	-,8449
		35C	,6200 [*]	,18745	,006	,2116	1,0284
	35C	25C	-1,8733 [*]	,18745	,000	-2,2817	-1,4649
		30C	-,6200 [*]	,18745	,006	-1,0284	-,2116

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,105.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Homogeneous Subsets

Kadar_Gula_Terpakai

	Interaksi	N	Subset	
			1	2
Tukey HSD ^{a,b}	30C,24Jam	3	12,2733	
	35C,24Jam	3	12,5467	
	35C,18Jam	3	12,6833	
	30C,18Jam	3		14,1967
	25C,24Jam	3		14,4500
	25C,18Jam	3		14,5267
	Sig.			,644

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,105.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

Profile Plots

