

**PENGARUH KONSENTRASI SUBSTRAT DAN INOKULUM TERHADAP
PRODUKSI EKSPOLISAKARIDA DARI TETES TEBU OLEH
Lactobacillus plantarum DAN IDENTIFIKASI DENGAN FTIR**

SKRIPSI

Oleh:
AULIN RISYDA FAHMIA
NIM. 12630084



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

**PENGARUH KONSENTRASI SUBSTRAT DAN INOKULUM TERHADAP
PRODUKSI EKSPOLISAKARIDA DARI TETES TEBU OLEH
Lactobacillus plantarum DAN IDENTIFIKASI DENGAN FTIR**

SKRIPSI

Oleh:
AULIN RISYDA FAHMIA
NIM. 12630084

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 KONSENTRASI SUBSTRAT DAN INOKULUM TERHADAP
PRODUKSI EKSPOLISAKARIDA DARI TETES TEBU OLEH
Lactobacillus plantarum DAN IDENTIFIKASI DENGAN FTIR**

SKRIPSI

Oleh:
AULIN RISYDA FAHMIA
NIM. 12630084

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji :
Tanggal, 23 Januari 2017

Pembimbing I

Pembimbing II


Akyunul Jannah, S.Si, M.P
NIP. 19760611 200501 2 006


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


Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia

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

**PENGARUH KONSENTRASI SUBSTRAT DAN INOKULUM TERHADAP
PRODUKSI EKSPOLISAKARIDA DARI TETES TEBU OLEH
Lactobacillus plantarum DAN IDENTIFIKASI DENGAN FTIR**

SKRIPSI

Oleh:
AULIN RISYDA FAHMIA
NIM. 12630084

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 23 Januari 2016

Penguji Utama	: Elok Kamila Hayati, M.Si NIP. 19790620 200604 2 002	(.....)
Ketua Penguji	: Anik Maunatin, S.T, M.P NIPT. 20140201 2 412	(.....)
Sekretaris Penguji	: Akyunul Jannah, S.Si, M.P NIP. 19760611 200501 2 006	(.....)
Anggota Penguji	: Ahmad Hanapi, M.Sc NIDT. 19851225 20160801 1 069	(.....)

Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia :



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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Aulin Risyda Fahmia

NIM : 12630084

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Inokulum Terhadap

Produksi Eksopolisakarida Dari Tetes Tebu Oleh

Lactobacillus plantarum Dan Identifikasi Dengan FTIR.

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, 27 Januari 2017

Yang membuat pernyataan,



Aulin Risyda rahmia

NIM. 12630084

MOTTO

وَاصْبِرْ لِحُكْمِ رَبِّكَ فَإِنَّكَ بِأَعْيُنِنَا وَسَبِّحْ بِحَمْدِ رَبِّكَ حِينَ تَقُومُ

﴿الطور : ٤٨﴾

*Trau lieber deiner Kraft als deinem Glück
Percayalah pada kekuatanmu daripada keberuntunganmu*

***There is no limit of struggling
Tidak ada batasan dari perjuangan***



PERSEMBAHAN

Alhamdulillah, bersama syukur atas segala Rahmat dan KaruniaNya,,
serta shalawat kepada RasulNya...

Karya kecil ini kuperuntukkan kepada :

Ibuku, Ayahku dan Adikku... Terimakasih untuk setiap doa yang tiada henti...



Terimakasihku kepada pahlawan tanpa tanda jasa حَفِظَهُمُ اللَّهُ وَنَفَعَنَا
بِعُلُومِهِمْ atas ilmu serta bimbingannya..

Terimakasih juga kepada semua pihak yang telah mebantu dalam
penyelesaian tugas akhir ini, semua amal baik kembali pada
kalian semua....

KATA PENGANTAR



Alhamdulillah, puji syukur kehadiran Allah SWT yang Maha Rohman dan Rohim yang selalu melimpahkan Rahmat, Taufik, Hidayah serta InayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **PENGARUH KONSENTRASI SUBSTRAT DAN INOKULUM TERHADAP PRODUKSI EKSOPOLISAKARIDA DARI TETES TEBU OLEH *Lactobacillus plantarum* DAN IDENTIFIKASI PROFIL SENYAWA DENGAN FTIR** semaksimal mungkin.

Sholawat serta salam selalu kami haturkan kepada junjungan kita semua Nabi Agung Muhammad SAW yang telah membimbing kita semua dari zaman jahiliyah menuju zaman islamiyah sehingga kita bisa berada dalam jalan yang diridhoiNya. Semoga Allah melimpahkan atas beliau, rahmat yang sesuai dengan keutamaan amal beliau, serta kepada semua keluarga, sahabat dan para pengikutnya yang senantiasa setia kepada beliau.

Penulis menyadari kekurangan serta keterbatasan yang dimiliki penulis, sehingga selama berlangsung penelitian, penyusunan sampai pada tahap penyelesaian skripsi, tak terlepas dari bantuan, dukungan dan kerjasama berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Ayah Misbahudin dan almarhumah Ibu Latifatur Rosyidah sebagai orang tua kami serta keluarga besar kami yang senantiasa mendukung kami baik secara moril, materi maupun doa dengan keiklasan beliau, tanpa beliau kami tidak akan mampu menyelesaikan skripsi ini.

2. Ibu Akyunul Jannah, S.Si, M.P selaku pembimbing yang telah sedemikian sabar dan telaten serta meluangkan waktu untuk membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
3. Ibu Anik Maunatin, S.T, M.P selaku konsultan yang telah sedemikian sabar dan telaten serta meluangkan waktu untuk membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
4. Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc selaku pembimbing agamayang telah sedemikian sabar dan telaten serta meluangkan waktu untuk membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Warga kimia angkatan 2012 khususnya Kimia C sebagai teman senasib seperjuangan yang tak lelah berjalan bersama dalam payung suka dan duka.
5. Seluruh dosen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu pengetahuan, wawasan sebagai pedoman serta bekal bagi penulis.
6. Keluarga besar Pondok Pesantren Sabilurrosyad KH. Marzuki Mustamar, Bu Nyai Dra Hj. Saidatul Mustaghfiroh, Ustadz Murtadho Amin, Ustadz Aziz Husain yang telah banyak membimbing dan memberikan motivasi, nasehat serta doa kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas ini dengan tepat waktu dan semaksimal mungkin.
7. Keluarga besar santri pondok pesantren sabilur rosyad terutama kamar baru 1.
8. Calon imam yang namanya masih tersembunyi di lauhul mahfudz.
9. Kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah ikut memberikan bantuan dan motivasi selama pengerjaan skripsi sampai dengan tugas ini selesai disusun, yang tidak bisa kami sebutkan satu per satu

Teriring do'a serta harapan melalui salam ta'dzim penulis kepada mereka semua. Semoga apa yang telah mereka berikan kepada penulis, mendapatkan balasan yang lebih baik dari Allah SWT, Amin ya robbal alamin.

Tiada gading yang tak retak, begitu pula penulis menyadari bahwa laporan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik serta saran atas kekurangan laporan ini sangat diharapkan. Semoga dengan tersusunnya laporan ini dapat memberikan manfaat bagi kita semua.

Malang, 18 Januari 2017

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
LEMBAR PERNYATAAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
ABSTRAK	xv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan.....	6
1.4 Batasan Masalah.....	6
1.5 Manfaat.....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tetes Tebu.....	8
2.2 Pengukuran Brix	10
2.3 Pengukuran Kadar Gula Total Metode Sulfat Fenol.....	13
2.4 Eksopolisakarida	14
2.4.1 Dekstran	16
2.4.2 Kefiran.....	17
2.4.3 Gellan	18
2.4.4 Curdlan	18
2.4.5 Xanthan	19
2.4.6 Alginat.....	19
2.4.7 Pullulan	20
2.5 Fermentasi Eksopolisakarida	20
2.5.1 Faktor-faktor yang mempengaruhi Produksi Eksopolisakarida.....	21
2.5.1.1 Suhu	21
2.5.1.2 pH.....	22
2.5.1.3 Konsentrasi Substrat	22
2.5.1.4 Konsentrasi Inokulum.....	23
2.5.1.5 Media	24
2.6 Biosintesa Eksopolisakarida.....	25
2.7 Bakteri Asam Laktat	26
2.8 <i>Lactobacillus plantarum</i>	28
2.9 Teknik Biakan Murni	30
2.10 Instrumentasi FTIR	30

2.11	Spektrofotometer UV-VIS	32
BAB III	METODOLOGI PENELITIAN	
3.1	Waktu dan Tempat Penelitian	37
3.2	Alat dan Bahan	37
3.2.1	Alat	37
3.2.2	Bahan	37
3.3	Rancangan Penelitian	38
3.4	Tahapan Penelitian	39
3.5	Pelaksanaan Penelitian	39
3.5.1	Sterilisasi Alat	39
3.5.2	Preparasi Sampel dan Pengukuran Brix	40
3.5.3	Pembuatan Media MRSA (<i>de Man, Rogosa and Sharpe Agar</i>)	40
3.5.4	Pembuatan Media MRSB (<i>de Man, Rogosa and Sharpe Broth</i>)	41
3.5.5	Regenerasi <i>Lactobacillus plantarum</i>	41
3.5.6	Pembuatan Inokulum	41
3.5.7	Pengaruh variasi konsentrasi substrat terhadap produksi eksopolisakarida dari tetes tebu menggunakan <i>Lactobacillus plantarum</i>	41
3.5.8	Uji Produksi Eksopolisakarida	42
3.5.9	Uji Kadar Gula Total	42
3.5.9.1	Pembuatan Kurva Standar	42
3.5.9.2	Penetapan Kadar Total Gula	42
3.5.10	Identifikasi Profil Senyawa dengan FTIR	43
3.5.11	Analisa Data	43
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1	Preparasi Sampel	44
4.2	Pembuatan Media	45
4.3	Regenerasi dan Pembuatan Stok Inokulum	46
4.4	Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Inokulum terhadap Produksi Eksopolisakarida oleh <i>Lactobacillus plantarum</i>	48
4.5	Analisa Kadar Gula Terpakai Fermentasi	53
4.6	Identifikasi Senyawa Eksopolisakarida dengan FTIR	56
4.7	Pemanfaatan Molase Sebagai Media Fermentasi untuk Menghasilkan Eksopolisakarida dalam Perspektif Islam	58
BAB V	PENUTUP	
5.1	Kesimpulan	61
5.2	Saran	61
	DAFTAR PUSTAKA	62
	LAMPIRAN	68

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Komposisi Kimiawi Tetes Tebu	9
Tabel 4.1 Analisa molase 80% Brix.....	44
Tabel 4.2 Analisa kadar total gula tetes tebu sebelum fermentasi	45
Tabel 4.3 Kadar eksopolisakarida	51
Tabel 4.4 Uji lanjut beda nyata jujur terhadap konsentrasi substrat	52
Tabel 4.5 Uji lanjut beda nyata jujur terhadap konsentrasi inokulum	52
Tabel 4.6 Kadar gula terpakai fermentasi	55
Tabel 4.7 Uji lanjut beda nyata jujur terhadap substrat	55
Tabel 4.8 Gugus fungsi dan bilangan gelombang.....	57



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tetes Tebu	8
Gambar 2.2 <i>Hand Brix Refraktometer</i>	12
Gambar 2.3.1 Reaksi Ddehidrasi Karbohidrat	13
Gambar 2.3.2 Pentosa, Heksosa, 6-dioksiheksosa, Keto-heksosa	14
Gambar 2.5.1 Dekstran	17
Gambar 2.5.2 Kefiran.....	17
Gambar 2.5.3 Gellan	18
Gambar 2.5.4 Curdlan	18
Gambar 2.5.5 Xanthan	19
Gambar 2.5.6 Alginat.....	19
Gambar 2.5.7 Pullulan.....	20
Gambar 2.10 Instrumentasi FTIR	31
Gambar 2.11 Spektrofotometri UV-VIS	34
Gambar 4.1 Reaksi hidrolisis sukrosa	50
Gambar 4.6 Hasil analisa kadar eksopolisakarida dengan FTIR	56

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian	68
Lampiran 2. Skema Kerja	69
Lampiran 3. Pembuatan Larutan	74
Lampiran 4. Kurva Standar Glukosa.....	75
Lampiran 5. Analisis Kadar Gula Metode Sulfat Fenol.....	77
Lampiran 6. Analisis Kadar Eksopolisakarida.....	82
Lampiran 7. Data Analisis Spektrofotometer Uv-Vis.....	83
Lampiran 8. Data <i>Two Way ANOVA</i>	84
Lampiran 9. Perhitungan Jumlah Total Bakteri	91
Lampiran 10. Dokumentasi Penelitian.....	93



ABSTRAK

Fahmia, A.R. 2016. **Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Inokulum Terhadap Produksi Eksopolisakarida dari Tetes Tebu oleh *Lactobacillus plantarum* dan Identifikasi dengan FTIR**. Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing: Akyunul Jannah, S.Si, M.P, Anik Maunatin, S.T, M.P, dan Ahmad Hanapi, M.Sc.

Kata Kunci: Tetes Tebu, *Lactobacillus plantarum*, Konsentrasi Substrat, Konsentrasi Inokulum, dan Eksopolisakarida

Tetes tebu mengandung kadar gula cukup tinggi sehingga potensial sebagai media fermentasi untuk memproduksi eksopolisakarida. Eksopolisakarida adalah polisakarida yang disekresikan keluar sel oleh mikroba, contohnya dextran, pulullan, alginat, xanthan dan xhefiran. Eksopolisakarida dimanfaatkan sebagai pengental alami, stabiliser dan bahan pengisi dalam industri makanan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh konsentrasi substrat dan inokulum *Lactobacillum plantarum* terhadap produksi eksopolisakarida dari tetes tebu (molase).

Penelitian ini bersifat kuantitatif menggunakan Rancangan Acak Kelompok Faktorial (RAKF) yang terdiri dari dua faktor, yaitu konsentrasi substrat 25 %, 30 %, dan 35 % sedangkan konsentrasi inokulum 5 %, 10 %, dan 15%. Data yang diperoleh berupa kadar eksopolisakarida dan kadar gula terpakai. Setiap perlakuan dianalisis menggunakan Two Way ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) 5 %.

Kadar eksopolisakarida tertinggi diperoleh sebesar 2,862 mg/L pada konsentrasi substrat 35 % dan inokulum 15 %. Kadar gula terpakai eksopolisakarida tertinggi adalah 2,862 %. Hasil SPSS yang diperoleh menunjukkan interaksi hubungan antara konsentrasi substrat dan inokulum yang memberikan pengaruh terhadap produksi eksopolisakarida. Analisis dengan menggunakan FTIR menunjukkan hasil spektra eksopolisakarida dengan gugus $-OH$ (3320 cm^{-1}), $-C-H\text{ sp}^3$ (2924 cm^{-1}), $C-O-C$ (1096 cm^{-1}), $C=O$ (1631 cm^{-1}) $C-H$ Bending (1422 cm^{-1}), $C-O$ Alkohol (1141 cm^{-1}).

ABSTRACT

Fahmia, A.R. 2016. THE EFFECT OF SUBSTRATS AND INOCULUM CONCENTRATION TO PRODUCE EXOPOLYSACCHARIDE FROM MOLASES BY (*Lactobacillus plantarum*) AND IDENTIFICATION USING FTIR. Thesis. Chemistry Departement Science and Thecnology Faculty Islamic State University Maulana Malik Ibrahim Malang. Advisor I: Akyunul Jannah, S.Si M.P. Advisor II: Ahmad Hanapi, M.Sc. Consultant : Anik Maunatin, S.T M.P

Key Words : Exopolysaccharide, *Lactobacillus plantarum*, molases, variation concentration, *Flourier Transform InfraRed*.

Molases is one of side product after first sugar. Molasses consist of high sugar that had potential thing as the fermentation media to produced exopolysaccharide. Exopolysaccharide was a polysaccharide that out of from microbe. Exopolysachharide used to nature thickener for food industry. The aim of the research is to know the effect of substrat and inoculum concentration of *Lactobacillus plantarum* to produce exopolisaccharide from molases.

This research was quantitative because used factorial group random setting that consist of 2 factors. These were substrats concentration 25%, 30% and 35%. Inoculum concentration were 5%, 10% and 15%. These were two data, sugar total analysis and percent of exopolysaccharide. That data had analyzed using varians analysis two way ANOVA and continued with Honest Different Test 5%.

Lowest exopolysaccharide was 1,873 mg/L at substrat concentration 25% and inoculum 15%. Highly exopolysaccharide was 2,862 mg/L at substrats concentration 35% and inoculum 15%. High sugar using exopolysaccharide was 2,862%. A value of infra red spectra of exopolysaccharide were -OH (3320 cm^{-1}), -C-H sp^3 (2924 cm^{-1}), C-O-C (1096 cm^{-1}), C=O (1631 cm^{-1}), C-H Bending (1422 cm^{-1}), C-O alcohol (1141 cm^{-1}).

مستخلص البحث

فهمية، أ. ر. ٢٠١٦. تأثير تركيز الركيزة و القيقحة إلى إنتاج أوكزو عديد السكاريد من دبس السكر بلاكتوباسيلوس فلانتاروم و تحديدها بتحويل فورييه مطياف الأشعة تحت الحمراء. الأطروحة. قسم الكيمياء كلية العلوم والتكنولوجيا جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرفة الأولى: أعين اللجنة الماجستير. المشرف الثاني: أحمد حنفي الماجستير. مستشارة: أنيك معونة الماجستير.

كلمات البحث: أوكزو عديد السكاريد، لاكتوباسيلوس فلانتاروم، دبس السكر، اختلاف تركيز، استخراج و تحويل فورييه مطياف الأشعة تحت الحمراء.

دبس السكر نتيجة أخرى من عملية تصنيع السكر. يحتوي دبس السكر على درجة السكر عالية، كالكروز و السكر الاختزال. يستخدم دبس السكر لنمو ميكروب و ينطبق ذلك في عملية التخمر لأن له درجة السكر عالية فينتج أوكزو عديد السكاريد. و اما هدف البحث لمعرفة تأثير لتركيز الركيزة و القيقحة لاكتوباسيلوس فلانتاروم إلى إنتاج أوكزو عديد السكاريد من دبس السكر.

هذا البحث بحث كمي باستخدام خطة العشوائية جمعية عوامل التي تتكون من عاملين هما تركيز الركيزة ٢٥%، ٣٠%، و ٣٥% وأما تركيز القيقحة ٥%، ١٠%، و ١٥%. لكل التجربة ثلاث مرات. المعطيات الأخوذات من كل التجربة يحللها تحليل التباين ثم اختبار اختلاف الصدق الجالي ٥%.

درجة أوكزو عديد السكاريد الأذني 1,873 mg/L في تركيز الركيزة ٢٥% والقيقحة ٥%. أما درجة أوكزو عديد السكاريد الأعلى 2,862 mg/L في تركيز الركيزة ٣٥% والقيقحة ١٥%. يقام التحليل بتحليل التباين بمستوى ٠,٠٥ يشير إلى أن تركيز الركيزة و تركيز القيقحة يؤثران تأثيراً جلياً على إنتاج أوكزو عديد السكاريد. ظهرت نتيجة تحويل فورييه مطياف الأشعة تحت الحمراء على وجود OH- 3320 سم⁻¹ C-H sp³ 2924 سم⁻¹، C-O-C 1096 سم⁻¹، C=O 1631 سم⁻¹، C-H ١ سم⁻¹، Bending 1422 سم⁻¹ C-O alcohol 1141 سم⁻¹.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara penghasil gula terbesar di dunia. Terdapat 75 pabrik gula yang tersebar di berbagai daerah di Indonesia (Rofiq,2007). Proses produksi pabrik gula menghasilkan limbah yaitu tetes tebu. Tetes tebu adalah salah satu produk utama setelah gula pasir yang dihasilkan dari bermacam-macam tingkat pengolahan tebu menjadi gula Witono (2003). Tetes tebu yang dihasilkan pabrik gula biasanya mengandung gula sekitar 48-55 % Wanto (2007). Menurut Darwis (1992), tetes tebu mengandung sejumlah besar gula, baik sukrosa maupun gula reduksi.

Menurut Martoyo dkk (1991), tetes tebu di Indonesia umumnya mengandung sekitar 34-35 % sukrosa , 20-25 % gula reduksi dan pH-nya sekitar 5,5-5,6. Selain itu tetes tebu juga mengandung zat bukan gula yang terdiri dari vitamin, mineral, asam organik, dan sebagainya. Tetes tebu digunakan secara luas sebagai sumber karbon untuk denitrifikasi, pertumbuhan mikroba, dan diaplikasikan pada proses fermentasi karena memiliki kadar gula yang tinggi Hidayat (2006). Proses fermentasi dapat dikembangkan seperti fermentasi tetes tebu yang berupa alkohol dan fermentasi bakteri asam laktat yang menghasilkan eksopolisakarida (Narita,2005).

Islam mengajarkan kepada manusia untuk selalu bertadabbur atas segala kuasa Allah SWT. Karena dengan bertadabbur , manusia dapat mengambil sedikit ilmu pengetahuan untuk dikaji, diteliti dan dimanfaatkan sebagai suatu solusi

untuk permasalahan masyarakat. Permasalahan yang banyak terjadi di masyarakat adalah pencemaran limbah. Substrat yang digunakan dalam penelitian ini termasuk limbah dalam bentuk cairan yaitu tetes tebu. Menurut Noerwasito (2015), pencemaran pabrik gula dibagi menjadi dua yaitu dalam bentuk padatan berupa abu tebu dan dalam bentuk cairan berupa tetes tebu. Abu tebu dapat merugikan masyarakat dari segi pertanian karena dapat menurunkan kesuburan tanah. Dalam bentuk cairan yaitu tetes tebu dapat merusak ekosistem air. Hal ini sesuai dengan firman Allah SWT dalam surat ar-Ruum (30) ayat 41 :

ظَهَرَ الْفَسَادُ فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ بِمَا كَسَبَتْ أَيْدِي النَّاسِ لِيُذِيقَهُمْ بَعْضَ الَّذِي عَمِلُوا
لَعَلَّهُمْ يَرْجِعُونَ (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).”

Menurut Shihab (2003), kata *zhahara alfasad* pada surat ar-Ruum ayat 41 adalah kerusakan yang tampak oleh mata karena berada dipermukaan bumi. kerusakan tersebut diakibatkan oleh perbuatan manusia itu sendiri. Allah menampakkannya sebagai akibat dari perbuatan manusia itu sendiri supaya manusia tersadar akan kerusakan yang terjadi di bumi ini adalah perbuatannya sendiri. Manusia sebagai *khalifah* atau pemimpin di bumi hendaknya menjaga keindahan lingkungan dan sangat meminimalisir adanya kerusakan di bumi. Salah satu cara untuk mengetahui manfaat tersebut adalah mengintegrasikan al-quran sebagai pedoman dengan ilmu terapan seperti sains sebagai media untuk pembuktian ilmiah. Penelitian ilmiah pemanfaatan tetes tebus seperti proses fermentasi tetes tebu dengan menggunakan bantuan bakteri asam laktat.

Kelebihannya dari metode ini adalah mudah dilaksanakan, waktu yang relatif singkat, rendemen yang baik.

Fermentasi adalah proses yang menyebabkan terjadinya perubahan-perubahan kimia di dalam substrat organik melalui katalis biokimiawi (enzim) yang dihasilkan oleh mikroorganisme tertentu yang hidup didalamnya. Mikroorganisme yang sering digunakan adalah bakteri asam laktat (Paturau,1982). Faktor-faktor yang mempengaruhi proses fermentasi adalah konsentrasi substrat, konsentrasi inokulum, suhu, nutrisi dan pH. Bakteri asam laktat adalah kelompok bakteri yang membentuk asam laktat sebagai produk utama dalam metabolisme karbohidrat. Pemanfaatan bakteri asam laktat oleh manusia telah dilakukan sejak lama yaitu untuk proses fermentasi makanan. Bakteri asam laktat banyak ditemukan pada produk makanan olahan baik produk hewani dan nabati yang telah di fermentasi (Chabela *et al*, 2001).

Eksopolisakarida yang diproduksi bakteri asam laktat mempunyai risiko kontaminasi toksin yang kecil dan telah diidentifikasi oleh *Generally Recognized as Safe Foods (GRAS)* oleh Amerika (Choi *et al.*, 2006). Eksopolisakarida 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 (Van hijum *et al.*, 2002). Eksopolisakarida banyak diaplikasikan pada industri makanan sebagai pengental alami sehingga meningkatkan tekstur, viskositas dan sifat rheologi produk. Efek untuk kesehatan juga terdapat aktivitas immunostimulator, anti tumor dan aktivasi makrofage untuk meningkatkan ketahanan tubuh (Sutherland, 1998). Eksopolisakarida menghasilkan struktur dan

fungsi yang berbeda. Beberapa eksopolisakarida yang telah banyak digunakan dalam bidang kesehatan diantaranya β -glukan, β -mannan, xanthan, curdlan, gellan dan dekstran (Malik dkk, 2008).

Faktor konsentrasi substrat dan inokulum merupakan faktor penting dalam keberhasilan fermentasi Chabela *et al.*(2001). Penelitian yang dilakukan Zubaidah(2008) menunjukkan bahwa produksi eksopolisakarida dari substrat murbei dilakukan pada suhu 37°C karena pada suhu tersebut *L.plantarum* tumbuh optimum. Hasil produksi yang diperoleh adalah total eksopolisakarida kasar maksimum sebesar 1955,78 mg/L. Penelitian yang dilakukan Nudyanto(2015) yaitu produksi penghasil eksopolisakarida dari kimchi. Hasil yang diperoleh yaitu produksi eksopolisakarida tertinggi adalah 427 mg/L dengan konsentrasi kimchi yang digunakan adalah 20% dengan menggunakan *Lactobacillus plantarum* sebagai penghasil eksopolisakarida. Velasco, dkk. (2006) menggunakan konsentrasi glukosa sebanyak 75 g/L untuk memperoleh EPS sebanyak 1,08 g/L.

Pada penelitian Halim (2014) produksi eksopolisakarida menggunakan sawi asin dengan konsentrasi 18% menghasilkan eksopolisakarida sebesar 417 mg/L dengan isolat *Lactobacillus plantarum*. Penambahan inokulum pada produksi eksopolisakarida akan meningkatkan laju produksi eksopolisakarida (purnavita dkk,2014). Penambahan inokulum 3%-15% dengan menggunakan mikroba *Lactobacillus plantarum* pada produksi asam laktat menunjukkan hasil terbaik pada konsentrasi 5% sebesar 101g/L (Franca *et al*, 2009). Substrat tetes tebu menunjukkan bahwa konsentrasi 25 g/L dengan konsentrasu inokulum 5% dan 7,5% diperoleh yield asam tertinggi yaitu 3,15 % untuk *L. bulgaricus* dan 5,4% untuk *L. plantarum* (Evelyna,2010).

Bakteri asam laktat memiliki sifat terpenting yaitu kemampuannya untuk memfermentasi gula menjadi asam laktat. Bakteri asam laktat seperti golongan *Lactobacilli* juga merupakan bakteri yang mampu memproduksi eksopolisakarida. *Lactobacillus plantarum* merupakan salah satu jenis bakteri asam laktat homofermentatif dengan suhu optimum lebih dari 37°C. *Lactobacillus plantarum* mampu merombak senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan hasil akhir berupa asam laktat. Berbagai jenis strain dari *Lactobacillus plantarum* telah diteliti dapat menghasilkan eksopolisakarida. Diantara bakteri asam laktat mesofilik *Lactobacillus plantarum* sering digunakan dalam industri fermentasi (Tallon *et al.*, 2006). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Bibra *et al.*, (2015) menunjukkan bahwa isolat *Lactobacillus plantarum* menunjukkan isolat terbaik untuk produksi eksopolisakarida sebesar 435mg/L dibandingkan dengan isolat *Lactobacillus casei* yang hanya mampu menghasilkan eksopolisakarida sebesar 106,33 mg/L.

Berdasarkan penelitian-penelitian yang telah dilakukan bahwa bakteri asam laktat memiliki peranan penting dalam membantu proses produksi eksopolisakarida. Pembaharuan dalam penelitian ini adalah produksi eksopolisakarida oleh tetes tebu dengan bantuan bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat yang digunakan adalah *Lactobacillus plantarum* yang mana berdasarkan hasil penelitian bakteri tersebut sebagai penghasil terbanyak eksopolisakarida. Dalam penelitian ini variasi konsentrasi yang digunakan disini adalah 25%, 30% dan 35%. Konsentrasi inokulum yang digunakan adalah 5%, 10% dan 15%.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh konsentrasi tetes tebu dan inokulum *Lactobacillus plantarum* terhadap produksi eksopolisakarida (EPS) oleh *Lactobacillus plantarum* ?
2. Bagaimana profil senyawa eksopolisakarida (EPS) yang dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum* dengan identifikasi profil senyawa menggunakan FTIR ?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi tetes tebu dan inokulum *Lactobacillus plantarum* terhadap produksi eksopolisakarida (EPS) dari *Lactobacillus plantarum*.
2. Untuk mengetahui profil senyawa eksopolisakarida (EPS) yang dihasilkan dari *Lactobacillus plantarum* dengan identifikasi profil senyawa menggunakan FTIR.

1.4 Batasan Masalah

1. Bakteri yang digunakan untuk produksi eksopolisakarida adalah *Lactobacillus plantarum* dari Universitas Gadjah Mada.
2. Variasi konsentrasitetes tebu yang digunakan adalah 25%,30% dan 35%.
3. Variasi konsentrasi inokulum yang digunakan adalah 5%, 10% dan 15%.
4. Identifikasi profil senyawa eksopolisakarida menggunakan instrumentasi *FTIR*.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan bagi masyarakat mengenai produksi eksopolisakarida yang penting untuk kesehatan dan konsumsi pangan dalam kehidupan sehari-hari.
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan bagi masyarakat mengenai struktur Eksopolisakarida yang dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum* dengan menggunakan FTIR.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tetes Tebu

Tetes tebu merupakan hasil samping dari pembuatan gula. Gula perdagangan dibuat dari hasil perahan tebu. Selain larutan gula dan air, perahan tersebut juga mengandung campuran bahan nonsukrosa, termasuk gula-gula lain. Larutan-larutan tersebut disarikan untuk memisahkan bahan bukan gula sebanyak mungkin, dan dipekatkan dengan cara evaporasi menjadi sirup atau gula cair, gula didapat kembali dari sirup dengan sejumlah kristalisasi. Kristalisasi biasanya dilakukan sebanyak tiga kali. Hasil pertama dikenal dengan gula pertama dan cairan induk sisa yang dipisahkan dari proses sentrifugasi dikenal dengan nama tetes pertama. Gula pertama dikristalisasi ulang dengan sirup tambahan untuk mendapatkan hasil kedua dengan kualitas yang lebih rendah dan dikenal sebagai gula ketiga. Cairan induk yang dipisahkan ini dikenal dengan tetes ketiga/akhir, yang merupakan tetes perdagangan. Tujuan kristalisasi adalah memindahkan sukrosa dan meninggalkan bahan selain sukrosa dalam hasil. Konsekuensinya gula yang dihasilkan sekitar 96 % lebih murni (Hidayat dkk., 2006).



Gambar 2.1 Tetes tebu

Tetes tebu digunakan secara luas sebagai sumber karbon untuk denitrifikasi, fermentasi anaerobik, pengolahan limbah aerobik dan diaplikasikan

pada budidaya perairan. Tetes tebu berbeda dengan bahan baku umum yang digunakan dalam produksi alkohol. Bahan tersebut mengandung karbohidrat yang disimpan sebagai pati sehingga harus mengalami perlakuan awal misalnya dengan menambahkan enzim untuk menghidrolisis pati menjadi gula yang dapat difermentasi. Sebaliknya, karbohidrat dalam tetes tebu telah siap digunakan untuk fermentasi tanpa perlakuan pendahuluan karena sudah berbentuk gula (Hidayat dkk, 2006).

Menurut Martoyo dkk (1991), tetes tebu di Indonesia umumnya mengandung sekitar 34-35 % sukrosa dan 20-25 % gula reduksi, sedangkan padatan terlarutnya sekitar 90 %. di samping itu ada zat pereduksi lain yang berasal dari gula maupun bukan gula dengan persentase yang lebih kecil. Komposisi kimiawi tetes tebu disajikan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi kimiawi tetes tebu (Tetes tebu)

Unsur	Kisaran (%)	Rata-rata (%)
Air	17-25	20
Sukrosa	30-40	35
Dekstrosa (Glukosa)	4-9	7
Laevulosa (Fruktosa)	5-12	9
Bahan pereduksi lain	1-5	3
Karbohidrat lain	2-5	4
Abu	7-15	12
Unsur nitrogen	2-6	4,5
Unsur bukan nitrogen	2-8	5
Lilin, sterol, phospolipid	0,1-1,0	0,4
Pigmen	-	-
Vitamin	-	-

Sumber : Paturau (1982)

Tetes tebu yang dihasilkan pabrik biasanya mengandung gula sekitar 48-55 %. Konsentrasi gula tersebut terlalu pekat untuk pertumbuhan khamir. Konsentrasi gula yang terlalu pekat kurang baik karena akan menghasilkan alkohol yang terlalu tinggi konsentrasinya sehingga menghambat pertumbuhan

khamir. Tetes tebu yang akan digunakan diencerkan terlebih dahulu sehingga kadar gulanya mencapai 12-17 % atau secara kasar satu volume tetes tebu diencerkan menjadi empat volume total (Wanto, 1980).

2.2 Pengukuran Brix

Indeks bias merupakan salah satu dari beberapa sifat optis yang penting dari medium suatu bahan. Nilai indeks bias ini banyak diperlukan untuk menginterpretasi suatu jenis data spektroskopi. Indeks bias dari suatu bahan atau larutan merupakan parameter karakteristik yang sangat penting dan berkaitan erat dengan parameter-parameter lain seperti temperatur, konsentrasi dan lain-lain yang sering dipakai dalam bidang optik, kimia, dan industri obat-obatan. Indeks bias juga berperan penting dalam beberapa bidang diantaranya dalam teknologi film tipis dan fiber optik. Dalam bidang kimia, indeks bias dapat digunakan untuk mengetahui konsentrasi dan komposisi larutan, untuk menentukan kemurnian dan kadaluarsa dari oli, untuk menentukan kemurnian minyak goreng (Sutiah, 2008).

Indeks bias suatu larutan dapat diukur dengan menggunakan beberapa metode antara lain dengan metode interferometri seperti interferometri Mach-Zender, interferometri Fabry-Perot dan interferometri Michelson, menggunakan spektrometer dan refraktometer. Alat refraktometer modern mempunyai metode yang berbeda dalam pengukuran indeks bias, jangkauan pengukuran, tingkat akurasi, metode yang digunakan untuk merekam pergeseran cahaya, sifat dari sumber cahaya, pembuatan perangkat sampling dan pengukuran sel.

Indeks bias mutlak suatu medium adalah rasio dari kecepatan gelombang elektromagnetik dalam ruang hampa dengan kecepatannya dalam media tersebut.

Indeks bias relatif adalah rasio dari kecepatan cahaya dalam satu medium ke dalam medium lain yang berdekatan. Refraksi terjadi pada semua jenis gelombang tetapi umumnya terjadi pada gelombang cahaya. Indeks bias medium memiliki panjang gelombang yang berbeda-beda. Suatu efek yang dikenal sebagai dispersi, memungkinkan prisma memisahkan cahaya putih menjadi warna penyusunnya. Untuk warna tertentu, indeks bias medium bergantung pada kerapatan medium, yang juga merupakan fungsi dari konsentrasi. Nilai indeks bias refraktometer, juga dikenal sebagai nilai Brix. Nilai Brix adalah konstan untuk suatu zat pada kondisi suhu dan tekanan standar. Ukuran total padatan terlarut dalam larutan, berkorelasi erat dengan fraksi molar komponen. Brix telah banyak digunakan untuk menentukan konsentrasi zat-zat seperti obat-obatan, makanan, jus buah, formula diet, dan larutan nutrisi parenteral (Chang, 2004). Pengukuran menggunakan metode tersebut cenderung rumit dan memakan waktu yang lama sehingga dibutuhkan suatu alat yang dapat mengukur indeks bias secara mudah dan cepat (Pedrotti, 1993).

Hand Brix Refraktometer bekerja menggunakan prinsip pembiasan cahaya ketika melalui suatu larutan. Ketika cahaya datang dari udara ke dalam larutan maka kecepatannya akan berkurang. Fenomena ini terlihat pada batang yang terlihat bengkok ketika dicelupkan ke dalam air. *Hand Brix Refraktometer* memakai prinsip ini untuk menentukan jumlah zat terlarut dalam larutan dengan melewatkan cahaya ke dalamnya. Sumber cahaya ditransmisikan oleh serat optik ke dalam salah satu sisi prisma dan secara internal akan dipantulkan ke interface prisma dan sampel larutan. Bagian cahaya ini akan dipantulkan kembali ke sisi yang berlawanan pada sudut tertentu yang tergantung dari indeks bias larutannya.

Metode analisis kuantitatif refraktometrik pada berbagai media cair berkembang lebih pesat dan lebih luas menggantikan metode yang volumetri dan gravimetri yang lebih banyak memakan waktu dan kurang akurat.



Gambar 2.2 Hand Brix Refraktometer

Cara kalibrasi Alat *Hand Brix Refraktometer*:

- a) Letakkan satu atau dua tetes akuades diatas kaca prisma
- b) Tutup penutup kaca prisma dengan perlahan
- c) Pastikan akuades memenuhi permukaan kaca prisma
- d) Pembacaan skala melalui lubang teropong, pastikan garis batas biru tepat pada skala 0 °Brix
- e) Jika garis batas biru tidak tepat pada skala 0 °Brix, putar skrup pengatur skala hingga garis batas biru tepat pada skala 0 °Brix

Cara penggunaan alat *Hand Brix Refraktometer* ialah:

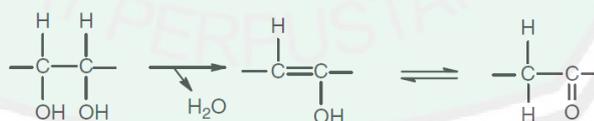
- 1) Alat dibersihkan terlebih dahulu dengan tisu ke arah bawah
- 2) Ditetesi dengan akuades atau larutan NaCl 5 % pada bagian prisma dan *day light plat*
- 3) Dibersihkan dengan kertas tissue sisa akuades/NaCl yang tertinggal
- 4) Sampel cairan ditetaskan pada prisma 1-3 tetes
- 5) Skala kemudian dilihat ditempat yang bercahaya dan dibaca skalanya

- 6) Kaca dan prisma dibilas dengan akuades/NaCl 5 % serta dikeringkan dengan tisu
- 7) Alat disimpan di tempat kering

2.3 Pengukuran Kadar Gula Total Menggunakan Metode Sulfat-Fenol

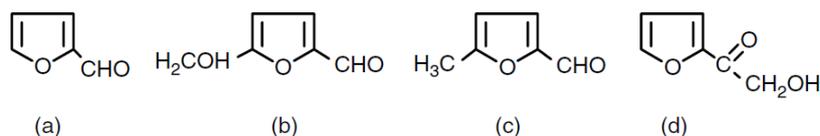
Metode kimia yang diterapkan pada penentuan gula total adalah metode sulfat-fenol dan metode anthrone, merupakan metode klasik dengan sejarah yang panjang dalam penggunaannya, walaupun begitu metode sulfat-fenol lebih populer dibandingkan dengan metode anthrone. Metode sulfat-fenol dapat dimanfaatkan 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 2.3.1 Reaksi dehidrasi karbohidrat

Senyawa turunan furan yang terbentuk tergantung pada jenis karbohidrat yang ada. Turunan furan yang terbentuk dapat dilihat pada gambar 2.4.



Gambar 2.3.2 (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).

2.4 Eksopolisakarida

Eksopolisakarida (EPS) adalah polimer gula atau polisakarida yang disekresikan oleh mikroba keluar sel. Eksopolisakarida yang dihasilkan mikroorganisme banyak digunakan pada industri karena sifat fisiko-kimianya serupa dengan polisakarida dari tanaman (selulosa, pektin dan pati) dan rumput laut (alginat dan karaginan). Eksopolisakarida juga berperan dalam rasa di mulut, tekstur, dan persepsi rasa dari produk fermentasi (Silalahi, 2000).

Eksopolisakarida juga banyak diaplikasikan pada industri makanan sebagai pengental sehingga meningkatkan tekstur, viskositas dan sifat rheologi produk. Selain itu EPS mempunyai efek kesehatan karena terdapat aktivitas immunostimulator, antitumor dan aktivasi makrofage dan limfosit untuk meningkatkan ketahanan tubuh, serta bersifat prebiotik (Tallon et al., 2006). Beberapa mikroba, termasuk bakteri asam laktat (BAL) yang bersifat probiotik memiliki kemampuan menghasilkan eksopolisakarida seperti

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium longum*. Berbagai jenis strain dari *L. plantarum* telah diteliti dapat menghasilkan eksopolisakarida (Tallon et al., 2006).

Fermentasi dengan substrat sari buah murbei merupakan diversifikasi dari buah murbei. Berdasarkan data dari Departemen Kehutanan (2001), saat ini terdapat 45.085,5 ha lahan murbei di Indonesia, namun pemanfaatannya masih terbatas dan belum banyak dikembangkan sebagai produk pangan. Padahal buah murbei merupakan buah yang cukup banyak tersedia di Indonesia dan memiliki rasa yang disukai. Penambahan bakteri *Lactobacillus plantarum* B2 penghasil EPS pada sari buah murbei, diharapkan diperoleh produk minuman fermentasi yang memberikan efek kesehatan yang bersifat multifungsional yaitu mengandung probiotik, eksopolisakarida, dan antosianin. Selain itu, pada penelitian ini dilakukan eksplorasi potensi *Lactobacillus plantarum* B2 sebagai isolat lokal yang menghasilkan eksopolisakarida.

Bakteri asam laktat mesofilik, *L. plantarum* sering digunakan secara luas dalam industri fermentasi makanan seperti sayur-sayuran dan sosis. *L. plantarum* adalah salah satu spesies BAL yang banyak diteliti, karena pada umumnya beberapa strain tersebut bersifat probiotik. Permasalahan dalam pembuatan minuman probiotik sari buah adalah rendahnya kandungan N dan P sehingga perlu ditambahkan sumber N dan P dari luar. Diamonium hidrogen fosfat ((NH₄)₂HPO₄) mengandung unsur N dan P yang sangat diperlukan mikrob guna menunjang pertumbuhan dan perkembangan sel. Selain itu menurut Harrah et al., (2006), unsur N dan PO₄ berguna dalam

pembentukan struktur eksopolisakarida. Dalam pertumbuhan dan perkembangan sel bakteri, selain sumber N dan P, juga diperlukan sumber karbon yang merupakan sumber energi utama. Penelitian Tallon t al., (2006), jenis gula sangat berpengaruh terhadap produksi 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 juga biomolekul seperti protein, asam nukleat, lipid dan zat humat (Surono, 2004)

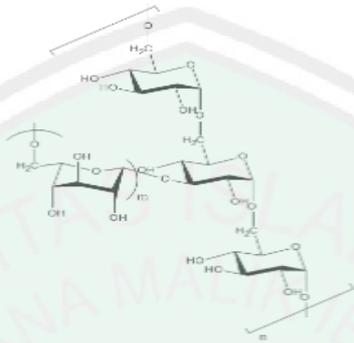
EPS biasanya dihasilkan oleh bakteri asam laktat yang merupakan ciri kontribusi bakteri ini sebagai probiotik yang memiliki efek positif bagi kesehatan (Vargas, 2003). Polimer ini memiliki daya bioaktivasi yang dapat digunakan dalam penggunaan obat seperti fungsinya sebagai anti virus, anti inflamasi (Stamer, 1979). Dalam industri makanan EPS 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 (Harrah, 2006).

Struktur eksopolisakarida sangat beragam, beberapa jenis eksopolisakarida antara lain :

2.4.1 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

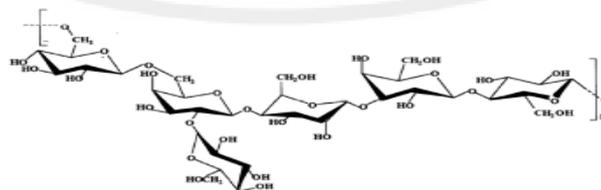
10-150 kDa. Dalam bidang kesehatan dekstran memiliki fungsi yang beragam seperti anti inflamasi, anti trombotik, anti koagulan, hingga memiliki peran yang penting sebagai intraarterial dan intravenous (Lapasin,1999).



Gambar 1. Struktur Dextran (Lapasin, 1999)

2.4.2 Kefiran

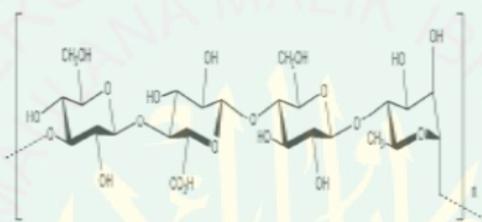
Kefiran merupakan kapsular polisakarida yang diproduksi oleh strain *Lactobacillus* pada pembuatan susu fermentasi kefir. Struktur polimer kefiran dibentuk dari monomer D-glukosa atau heteropolisakarida D-g alaktosa yang mengalami percabangan pada dua unit rantai serta delapan unit rantai. Polimer ini menunjukkan aktivitas anti bakteri, anti jamur, dan anti kanker (Lapasin., 1999).



Gambar 2. Struktur Kefiran (Micheli *et al.*, 1999)

2.4.3 Gellan

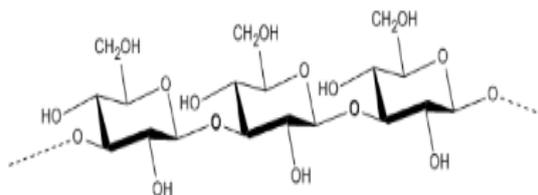
Gellan merupakan polimer linier yang bermuatan negatif (anionik polisakarida). Polimernya tersusun dari perulangan tetrasakarida unit yang merupakan kombinasi antara dua molekul glukosa dengan asam D-glukoronat atau Lramnosa. Gellan biasanya digunakan untuk mensubstitusi agar, juga dapat digunakan sebagai eksipien obat sebagai bagian dari drug delivery system (Lapasin, 1999).



Gambar 3. Struktur Gellan (Lapasin, 1999)

2.4.4 Curdlan

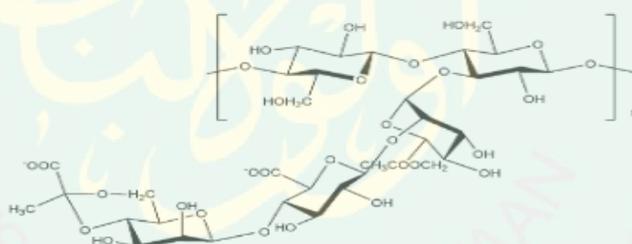
Curdlan merupakan polimer linier yang terbentuk dari ikatan β -1,3 glikosidik dari D-glukosa. Polimer ini bersifat sangat larut dalam air. Curdlan dapat dihasilkan dari bakteri strain *Alcaligenes faecalis* dan juga *Agrobacterium*. Keunikan curdlan adalah sifat gelnya yang elastis ketika dipanaskan 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 (Lapasin, 1999).



Gambar 4. Struktur Curdlan (Jin *et al.*, 2006)

2.4.5 Xanthan

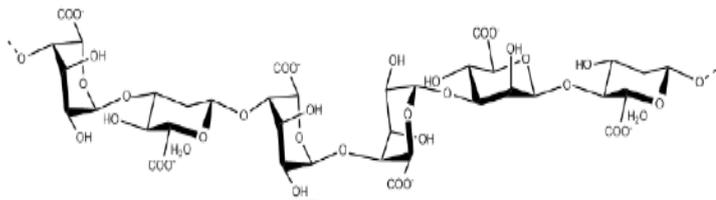
Xanthan merupakan heteropolimer anionik yang disusun oleh glukosa dengan rantai samping trisakarida dari α -D-manosa yang memiliki gugus asetil. Xanthan diproduksi oleh strain *Xanthomonas* dengan berat molekul yang sangat besar (Rehm, 2009). Sifat yang ditunjukkan xanthan adalah pseudoplastik dan pengemulsi yang stabil, sehingga kegunaannya sangat luas dibidang industri makanan, kosmetik, maupun farmasi (Sutherland,2001).



Gambar 5. Struktur Xanthan (Sutherland, 2001)

2.4.6 Alginat

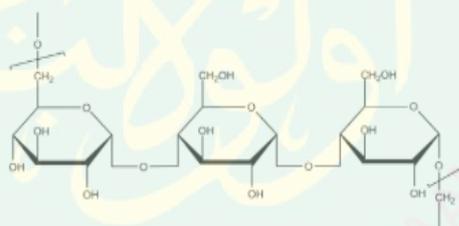
Alginat merupakan homopolimer linier dari kopolimer D-manuronat yang membentuk ikatan β -1,4-glikosidik dan epimer α -L-glukoronat. Alginat banyak ditemukan pada tumbuh-tumbuhan terutama rumput laut. Dalam bidang farmasi alginat digunakan untuk eksipien (gavicson, bisodol dan asilone) dan dapat membentuk gel yang stabil. Sediaan bahan obat yang banyak beredar di pasaran adalah kalsium alginat (Ertesvag, 1998).



Gambar 6. Struktur Alginat (Ertesvag, 1998)

2.4.7 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 (Vu *et al*, 2009).



Gambar 7. Struktur Pullulan (Vu *et al.*, 2009)

2.5 Fermentasi Eksopolisakarida

Fermentasi adalah suatu proses perubahan kimia pada substrat organik, baik karbohidrat, protein, lemak atau lainnya, melalui kegiatan biokatalis dan dikenal sebagai enzim yang dihasilkan oleh jenis mikroorganisme spesifik. Fermentasi anaerob adalah fermentasi yang tidak memerlukan oksigen, sedangkan fermentasi aerob adalah fermentasi yang memerlukan oksigen (Wanto, 1980).

Paturau (1982) mendefinisikan fermentasi sebagai proses yang menyebabkan terjadinya perubahan-perubahan kimia di dalam substrat organik melalui katalis biokimiawi (enzim) yang dihasilkan oleh mikroorganisme tertentu yang hidup didalamnya. Sedangkan Wang dkk (1979) mendefinisikan fermentasi sebagai semua kegiatan microbial atau ekstrak dari sel dalam menggunakan senyawa organik dan anorganik, yang meliputi kegiatan pertumbuhan, asimilasi, biosintesis dan disimilasi.

Paturau (1982) menyatakan, bahwa konsentrasi gula yang tepat untuk fermentasi adalah 14-18 %, sedangkan menurut Casida (1980), konsentrasi gula yang digunakan berkisar 10-18 %. Jika konsentrasi gula terlalu tinggi, aktivitas khamir dapat terhambat dan waktu fermentasi menjadi lebih lama serta tidak semua gula dapat difermentasi. Sebaliknya jika konsentrasi gula terlalu rendah akan mengakibatkan biaya produksi lebih tinggi (Kirk, 1963). Wanto dan Soebagyo (1980), menyatakan bahwa tetes tebu diencerkan sehingga kadar gulanya 12-17 % atau dengan menambahkan air sebanyak empat kali volume tetes tebu. Paturau (1982), menyatakan bahwa bahan bergula tersebut harus dipasteurisasi dahulu sebelum inokulasi sehingga mikroorganisme yang mengganggu fermentasi alkohol tidak aktif.

2.5.1 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Produksi Eksopolisakarida

Efisiensi fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu: suhu, pH, konsentrasi substrat, konsentrasi inokulum dan media (Velasco *et al.*, 2006).

2.5.1.1 Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor yang cukup penting dalam kehidupan mikroba, disamping itu suhu juga merupakan faktor abiotik yang berperan dalam

keberhasilan fermentasi. Suhu selama proses fermentasi akan mengalami perubahan, yaitu dari suhu rendah menjadi lebih tinggi karena reaksi eksotermis dan kemudian mengalami penurunan kembali seperti semula setelah reaksi selesai. Kondisi ini disebabkan oleh kerja khamir (ragi) dalam memetabolisme media. Pada umumnya enzim bekerja sangat lambat pada suhu di bawah titik beku dan keaktifannya akan meningkat sampai suhu 45 °C.

2.5.1.2 pH

Kebanyakan enzim mempunyai pH yang memungkinkan untuk melakukan aktifitas secara maksimal, dibawah atau diatas pH optimum aktivitas enzim akan mengalami penurunan. Untuk fermentasi alkohol, khamir memerlukan media dengan suasana asam, yaitu antara pH 5-6 (Paturau, 1982). Pada pH 3 khamir (ragi) sebenarnya masih dapat melakukan fermentasi, tetapi agak lambat. Karena sangat pentingnya pH maka pada sebagian besar proses fermentasi pH diatur dengan suatu sistem pengendali pH.

2.5.1.3 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 (Treggono dan Sutardi, 1990).

Produksi penghasil eksopolisakarida salah satunya adalah kimchi. Hasil yang diperoleh yaitu produksi eksopolisakarida tertinggi adalah 4,27 mg/L dengan konsentrasi kimchi yang digunakan adalah 20% dengan menggunakan *Lactobacillus plantarum* sebagai penghasil eksopolisakarida (Zubaidah,2015). Penelitian (Halim,2014) produksi eksopolisakarida menggunakan sawi asin juga dengan bantuan bakteri asam laktat. Hasil terbaik yang didapatkan adalah 4,17 mg/L dengan konsentrasi 25%.

2.5.1.4 Konsentrasi Inokulum

Teknik yang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme pada media agar memungkinkannya tumbuh dengan agak berjauhan dari sesamanya, juga memungkinkan setiap selnya berhimpun membentuk koloni, yaitu sekelompok massa sel yang dapat dilihat dengan mata telanjang. Bahan yang diinokulasikan pada medium disebut inokulum (Pelczar dkk, 2007).

Kadar inokulum pada fermentasi menunjukkan pengaruh terhadap produk fermentasi. Dengan bertambahnya inokulum maka kerja bakteri makin cepat untuk mengubah gula menjadi asam laktat. Makin banyak inokulum yang ditambahkan makin besar asam laktat yang dihasilkan dan kadarnya pun makin tinggi akan tetapi konsentrasi inokulum yang semakin besar juga tidak akan efisien ketika proses fermentasi seperti pada penelitian yang dilakukan (Franca *et al.*,2009).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi glukosa 25 g/L dan konsentrasi inokulum 2,5% untuk bakteri *L. bulgaricus* diperoleh yield asam total tertinggi yaitu 2,925%. Pada *L. plantarum* yield asam total tertinggi sebesar 1,6875% diperoleh pada konsentrasi glukosa 50 g/L dan konsentrasi inokulum 7,5%. Sedangkan untuk substrat tetes tebu konsentrasi tetes tebu 25 g/L dengan

konsentrasi inokulum 5% dan 7,5% diperoleh yield asam total tertinggi yaitu 3,15% untuk *L. bulgaricus* dan 5,4% untuk *L. plantarum* (Evelyna,2010).

2.5.1.5 Media

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).

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).

Media yang digunakan untuk mengoptimalkan produksi EPS sangat beragam, karena rantai utama dari polimer ini adalah glukosa. Banyak peneliti yang menggunakan glukosa sebagai sumber karbon pada media fermentasi. Velasco, dkk. (2006) menggunakan konsentrasi glukosa sebanyak 75 g/L untuk memperoleh EPS sebanyak 1,08 g/L pada akhir fermentasi (120 jam) oleh bakteri *Pediococcus parvulus* 2.6. Sementara peneliti lainnya menggunakan konsentrasi glukosa sebesar 30 g/L untuk menghasilkan EPS menggunakan isolat *L. delbrueckii* B-3, *L. bulgaris* G12 dan *Streptococcus thermophilus* W22. Hasil

yang diperoleh selama masa inkubasi 18 jam masing-masing 255 mg/L, 224 mg/L, dan 174 mg/L (Yuksekdag and Salim, 2008; Xu, dkk., 2010).

2.6 Biosintesis Eksopolisakarida

Beberapa penelitian diketahui bahwa sintesis EPS dalam media nutrient menunjukkan bahwa polimer ini secara kontinyu dieksresikan beberapa saat setelah pertumbuhan dan saat pembelahan sel berhenti. Di bawah kondisi optimal, sekitar 0,75 % karbohidrat dikonversi menjadi EPS tiap jam. Selanjutnya 0,25% glukosa dimanfaatkan untuk membentuk intraseluler polisakarida (glikogen). Kecepatan konversi yang tinggi hanya diperoleh dalam suspensi sel yang diaerasi dengan pemanfaatan karbohidrat yang maksimal dengan adanya ion-ion K^+ , Mg^{2+} , dan Ca^{2+} . Penurunan yang terbesar pada level ini diikuti oleh pengeluaran oksigen atau penghilangan K^+ . Produksi EPS sangat sedikit pada fase logaritma (Sutherland, 1977).

EPS disintesa dalam fase-fase pertumbuhan yang berbeda dengan kondisi yang bervariasi tergantung dari jenis mikroorganismenya. Proses sintesa dapat dibagi menjadi dua prinsip dasar yaitu tempat sintesa dan prekursor alami misalnya sintesa di luar dinding sel atau pada membran sel. Sintesa heteropolisakarida berbeda dengan sintesa monosakarida yang disintesa pada membran sitoplasma dengan memanfaatkan prekursor yang terbentuk intraseluler. Gula nukleotida berperan penting dalam sintesa heteropolisakarida sehingga peranannya dalam interkonversi monosakarida atau disakarida (gula) sebaik aktivasi gula yang dibutuhkan untuk polimerisasi monosakarida menjadi polisakarida (Cerning, 1990).

Heteropolisakarida disintesa dengan prekursor polimerisasi yang dibentuk dalam sel sitoplasma. Gula nukleotida berperan penting untuk pembawa isoprenoid lipida yang berlokasi dalam membran sitoplasma. Pembawa lipida berperan juga dalam sintesis lipopolisakarida dinding sel, peptidoglikan dan asam teikoat, juga berkompetisi dalam komponen membran terfasilitasi selama fase pertumbuhan yang berbeda. Kompetisi ini mungkin dapat dijelaskan sebagai munculnya eksopolimer dan kapsul selama fase pertumbuhan dengan kondisi yang berbeda. Beberapa enzim pada metabolisme karbohidrat adalah esensial pada pembentukan EPS. Lipida isoprenoid atau lipida pembawa glikosil juga membutuhkan sejumlah enzim (Marshall *et al.*, 1995).

2.7 Bakteri Asam Laktat

Dalam mikrobiologi, pengelompokan bakteri berdasarkan sifat pertumbuhannya pada makanan lebih penting daripada pengelompokan berdasarkan sifat – sifat lainnya. Dengan pengelompokan ini mudah untuk diduga perubahan – perubahan yang akan terjadi pada makanan jika suatu bakteri yang termasuk dalam suatu kelompok tumbuh pada makanan. Seperti bakteri asam asetat, bakteri asam laktat, bakteri asam butirat, bakteri asam propionat, bakteri proteolitik, bakteri lipolitik, bakteri sakarolitik, bakteri pektolitik, bakteri termofilik, bakteri psikotropik, bakteri halofilik, bakteri osmofilik, bakteri berpigmen, bakteri pembentuk lendir, bakteri pembentuk gas dan koliform. (Fardiaz, 1992).

Bakteri asam laktat yang memiliki sifat terpenting adalah kemampuannya untuk memfermentasi gula menjadi asam laktat. Sifat penting dalam pembuatan

produk – produk fermentasi seperti fermentasi sayuran, fermentasi susu, dan fermentasi ikan. Karena produksi asam oleh bakteri asam laktat berjalan secara cepat, maka pertumbuhan mikroba lain yang tidak diinginkan dapat terhambat. Yang termasuk bakteri asam laktat adalah famili Lactobacillae yaitu *Lactobacillus* dan famili *Streptococcaceae* (Tabucanon, 1998).

Jenis yang termasuk dalam kelompok bakteri basili gram positif yang tidak berspora adalah *Lactobacillus*. Bakteri ini berbentuk batang yang panjang, anaerobik fakultatif, dan katalase negatif. Bakteri ini menyerupai streptokoki dalam kebutuhannya akan nutrisi. Spesies dalam jenis *Lactobacillus* banyak yang dapat mensintesis vitamin sehingga digunakan dalam analisis vitamin dan banyak yang bersifat termotoleran yaitu tahan susu pasteurisasi, *Lactobacillus* sering ditemukan dalam makanan misalnya pada permukaan sayuran (berperan dalam fermentasi pickles), dan pada susu serta produk – produk susu. Jenis *Lactobacillus* dapat dibedakan atas dua kelompok yaitu (Fardiaz, 1992) :

1. Bersifat homofermentatif
2. Bersifat heterofermentatif.

Jenis bakteri homofermentatif memecah gula terutama menjadi asam laktat dan dapat tumbuh pada suhu 37 °C atau lebih. Spesies yang tergolong homofermentatif misalnya *L.bulgaricus*, *L.lactis*, *L.acidophilus*. laktobasili yang bersifat homofermentatif dan mempunyai suhu optimum pertumbuhan yang lebih rendah misalnya *L.plantarum*. (Fardiaz, 1992).

Bakteri asam laktat adalah kelompok bakteri yang mampu mengubah karbohidrat (glukosa) menjadi asam laktat. Efek bakterisidal dari asam laktat berkaitan dengan penurunan pH lingkungan menjadi 3 sampai 4,5 sehingga

pertumbuhan bakteri lain termasuk bakteri pembusuk akan terhambat (Amin dan Leksono, 2001). Pada umumnya mikroorganisme dapat tumbuh pada kisaran pH 6-8 (Buckle et al., 1987).

Pemanfaatan BAL oleh manusia telah dilakukan sejak lama, yaitu untuk proses fermentasi makanan. BAL merupakan kelompok besar bakteri menguntungkan yang memiliki sifat relatif sama. Saat ini BAL digunakan untuk pengawetan dan memperbaiki tekstur dan cita rasa bahan pangan (Chabela, dkk., 2001). Penelitian yang dilakukan (Zubaidah, 2015) yaitu produksi penghasil eksopolisakarida dari kimchi. Hasil yang diperoleh yaitu produksi eksopolisakarida tertinggi adalah 427 mg/L dengan konsentrasi kimchi yang digunakan adalah 20% dengan menggunakan *Lactobacillus plantarum* sebagai penghasil eksopolisakarida.

BAL mampu memproduksi asam laktat sebagai produk akhir perombakan karbohidrat, hidrogen peroksida, dan bakteriosin. Dengan terbentuknya zat antibakteri dan asam maka pertumbuhan bakteri patogen seperti *Salmonella* dan *E. coli* akan dihambat. Efektivitas BAL dalam menghambat bakteri pembusuk dipengaruhi oleh kepadatan BAL, strain BAL, dan komposisi media. Produk substansi penghambat dari BAL dipengaruhi oleh media pertumbuhan, pH dan suhu lingkungan (Ahn dan Afrianto Stiles, 1990).

2.8 *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum merupakan salah satu jenis BAL homofermentatif dengan temperatur optimal lebih rendah dari 37°C (Frazier

dan Westhoff, 1988). *L. plantarum* berbentuk batang (0,5-1,5 s/d 1,0-10 m) dan tidak bergerak (nonmotil). Bakteri ini memiliki sifat katalase negatif, aerob atau fakultatif anaerob mampu mencairkan gelatin, cepat mencerna protein, tidak mereduksi nitrat, toleran terhadap asam, dan mampu memproduksi asam laktat. (Buckle et al. 1978)

Dalam media agar, *L. plantarum* membentuk koloni berukuran 2-3 mm, berwarna putih opaque, conveks, dan dikenal sebagai bakteri pembentuk asam laktat (Kuswanto dan Sudarmadji, 1988). *L. plantarum* mampu merombak senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan hasil akhirnya yaitu asam laktat. Asam laktat dapat menghasilkan pH yang rendah pada substrat sehingga menimbulkan suasana asam. *L. plantarum* dapat meningkatkan keasaman sebesar 1,5 sampai 2,0% pada substrat (sarles et al., 1956).

Dalam keadaan asam, *L. plantarum* memiliki kemampuan untuk menghambat bakteri patogen dan bakteri pembusuk (Delgado et al., 2001). Pertumbuhan *L. plantarum* dapat menghambat kontaminasi dari mikroorganisme patogen dan penghasil racun karena kemampuannya untuk menghasilkan asam laktat dan menurunkan pH substrat, selain itu BAL dapat menghasilkan hidrogen peroksida yang dapat berfungsi sebagai antibakteri (Suriawiria, 1983). *L. plantarum* juga mempunyai kemampuan untuk menghasilkan bakteriosin yang berfungsi sebagai zat antibiotik (Jenie dan Rini, 1995). Klasifikasi ilmiahnya adalah sebagai berikut :

Kerajaan	:	<i>Bacteria</i>
Divisi	:	<i>Firmicutes</i>
Kelas	:	<i>Bacilli</i>
Ordo	:	<i>Lactobacillales</i>

Famili : *Lactobacillaceae*
Genus : *Lactobacillus*
Spesies : *L. plantarum*

2.9 Teknik Biakan Murni

Teknik yang digunakan untuk mendapatkan biakan murni ada dua, yaitu metode piringan goresan (*streak-plate method*) dan metode piringan tuangan (*pour-plate method*) (Volk dan Wheeler, 1988):

1. Metode piringan goresan (*streak-plate method*)

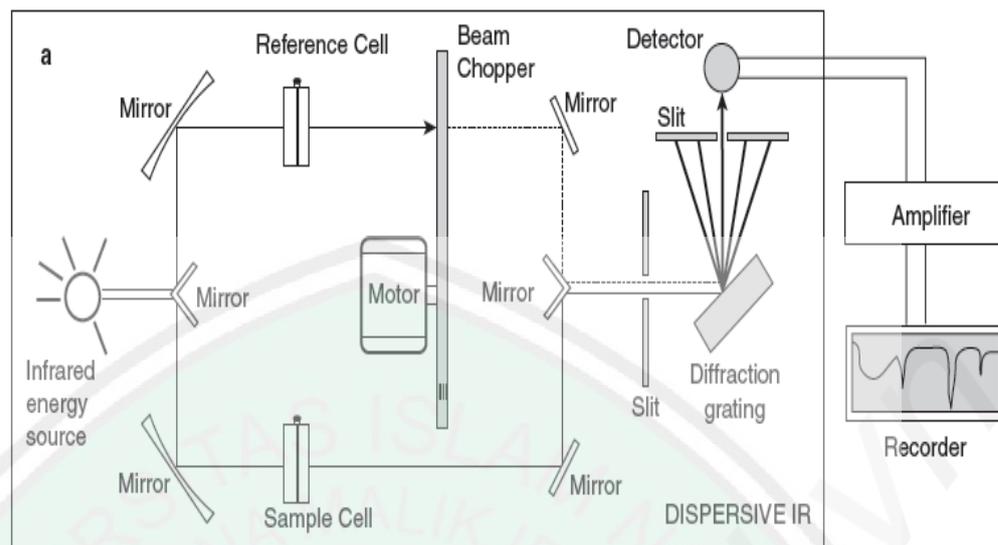
medium agar steril dicairkan pada suhu 45°C, kemudian dituangkan ke dalam cawan petri steril (cawan gelas dengan garis tengah 3 inci) dan dibiarkan sampai menjadi padat. Kemudian dengan menggunakan kawat ose, goresan dilakukan di atas permukaan agar.

2. Metode piringan tuangan (*pour-plate method*)

Bakteri diinokulasikan ke dalam tabung uji yang berisi media agar steril cair dan telah didinginkan pada suhu 45°C. Isinya diaduk untuk mencampurkan bakteri ke seluruh medium. Campuran itu kemudian dituangkan ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan menjadi padat.

2.10 Instrumentasi FTIR

Spektrofotometri FTIR merupakan metode yang digunakan untuk menentukan gugus fungsi, khususnya senyawa organik. Jika menggambar persen absorbansi atau persen transmitansi versus frekuensi maka akan dihasilkan spektrum inframerah (Sastrohamidjojo, 2007).



GAMBAR 2.10 Instrumentasi FTIR

FTIR terdiri dari 5 bagian utama, yaitu (Gritter, 1991): Sumber sinar, yang terbuat dari filament Nerst atau Globar yang dipanaskan menggunakan listrik hingga temperature 1000-1800 °C. Beam splitter, berupa material transparan dengan indeks relatif sehingga menghasilkan 50 % radiasi akan direfleksikan 50 % radiasi akan diteruskan. Interferometer, merupakan bagian utama dari FTIR yang berfungsi untuk membentuk interferogram yang akan diteruskan menuju detektor. Daerah cuplikan, dimana berkas acuan dan cuplikan secara bersesuaian. Detektor, merupakan piranti yang mengukur energi pancaran yang lewat akibat panas yang dihasilkan. Detektor yang sering digunakan adalah termokopel dan balometer.

Mekanisme yang terjadi pada alat FTIR yaitu sinar yang datang dari sumber sinar akan diteruskan, dan kemudian akan dipecah oleh pemecah sinar menjadi dua bagian sinar yang saling tegak lurus. Sinar ini kemudian dipantulkan oleh dua cermin yaitu cermin diam dan cermin bergerak. Sinar hasil pantulan

kedua cermin akan dipantulkan kembali menuju pemecah sinar untuk saling berinteraksi. Dari pemecah sinar, sebagian sinar akan diarahkan menuju cuplikan dan sebagian menuju sumber. Gerakan cermin yang maju mundur akan menyebabkan sinar yang sampai pada detektor akan berfluktuasi. Sinar akan saling menguatkan ketika kedua cermin memiliki jarak yang sama terhadap detektor, dan akan saling melemahkan jika kedua cermin memiliki jarak yang berbeda. Fluktuasi sinar yang sampai pada detektor ini akan menghasilkan sinyal pada detektor yang disebut interferogram. Interferogram ini akan diubah menjadi spektra IR dengan bantuan computer berdasarkan operasi matematika (Tahid, 1994).

Choudhury *et al.*, (2011) melaporkan hasil dari profil pullulan yang merupakan salah satu klasifikasi eksopolisakarida . *Wave number* (cm⁻¹)

Penentuan Standar pullulan (sigma)	Pullulan dari A.	pullulans RBF 4A3
3399.4	3397.7	O-H stretching
2924.7	2927.6	C-H stretching
1651.9	1652.2	O-C-O stretching
1418.6	1414.8	C-O-H stretching
1156	1155.7	C-O-C stretching
1022.1	1018.5	α -(1-6) -D-Glukosidik
852.8	849.5	α -D glukopiranosida
756	755.6	α -(1-4) -D-Glukosidik

FTIR pullulan yang dihasilkan A.Pullulans RBF-4A3 dibandingkan dengan standart Choudhury et al. (2011).

2.11 Spektrofotometri UV-VIS

Spektrofotometri UV-Vis adalah anggota teknik analisis spektroskopik yang memakai sumber REM (radiasi elektromagnetik) ultraviolet dekat (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780 nm) dengan memakai instrumen spektrofotometer. Spektrofotometri UV-Vis melibatkan energi elektronik yang

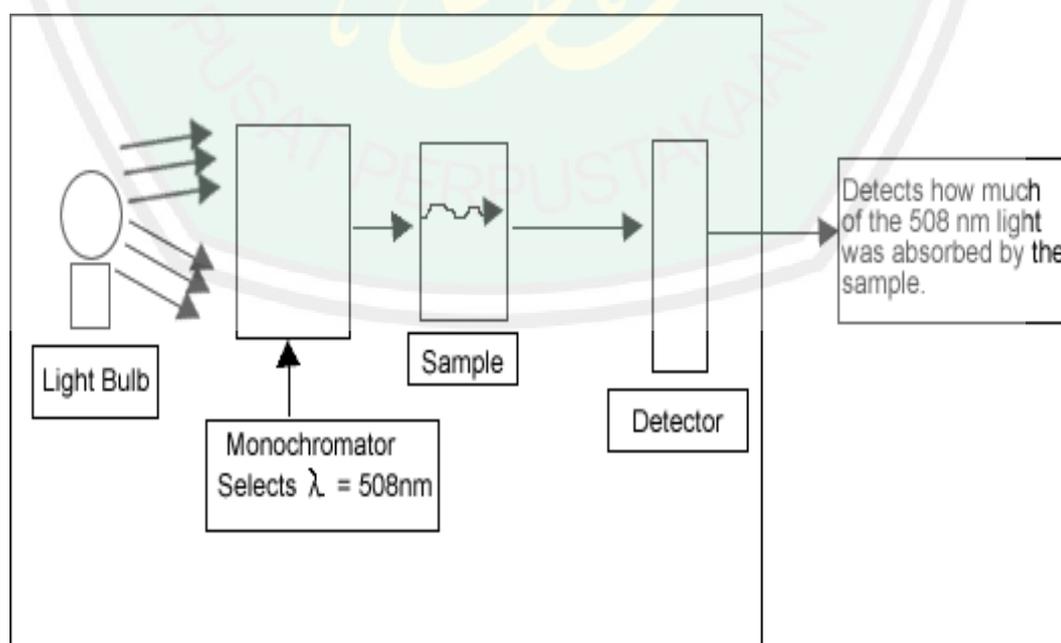
cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometri UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibandingkan kualitatif (Sastrohamidjojo, 2007).

Spektroskopi UV/VIS merupakan metode penting yang mapan, andal dan akurat. Dengan menggunakan spektroskopi UV/VIS, substansi tak dikenal dapat diidentifikasi dan konsentrasi substansi yang dikenal dapat ditentukan. Pelarut untuk spektroskopi UV harus memiliki sifat pelarut yang baik dan memancarkan sinar UV dalam rentang UV yang luas. Spektrofotometer Uv-Vis adalah alat yang digunakan untuk mengukur transmitansi, reflektansi dan absorpsi dari cuplikan sebagai fungsi dari panjang gelombang. Spektrofotometer sesuai dengan namanya merupakan alat yang terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi. Jadi spektrofotometer digunakan untuk mengukur energi cahaya secara relatif jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan atau diemisikan sebagai fungsi dari panjang gelombang (Tahid,1994).

Suatu spektrofotometer tersusun dari sumber spektrum sinar tampak yang sinambung dan monokromatis. Sel pengabsorpsi untuk mengukur perbedaan absorpsi antara cuplikan dengan blanko ataupun pembanding. Spektrofotometer Uv-Vis merupakan spektrofotometer yang digunakan untuk pengukuran didaerah ultra violet dan didaerah tampak. Semua metode spektrofotometri berdasarkan pada serapan sinar oleh senyawa yang ditentukan, sinar yang digunakan adalah sinar yang semonokromatis mungkin (Sastrohamidjojo, 2007).

Spektrofotometer UV-Vis (Ultra Violet-Visible) adalah salah satu dari sekian banyak instrumen yang biasa digunakan dalam menganalisa suatu senyawa kimia. Spektrofotometer umum digunakan karena kemampuannya dalam menganalisa begitu banyak senyawa kimia serta kepraktisannya dalam hal preparasi sampel apabila dibandingkan dengan beberapa metode analisa. Spektrofotometri UV/Vis melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometer UV/Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibanding kualitatif (Sastrohamidjojo,2007).

Spektrofotometri UV-vis adalah pengukuran serapan cahaya di daerah ultraviolet (200–350 nm) dan sinar tampak (350 – 800 nm) oleh suatu senyawa. Serapan cahaya uv atau cahaya tampak mengakibatkan transisi elektronik, yaitu promosi elektron-elektron dari orbital keadaan dasar yang berenergi rendah ke orbital keadaan tereksitasi berenergi lebih tinggi. Berikut adalah instrumentasi sederhana dari UV-VIS :



Gambar 2.11 Instrumentasi UV-VIS

Cara kerja spektrofotometer secara singkat adalah sebagai berikut. Tempatkan larutan pembanding, misalnya blangko dalam sel pertama sedangkan larutan yang akan dianalisis pada sel kedua. Kemudian pilih foto sel yang cocok 200nm-650nm (650nm-1100nm) agar daerah λ yang diperlukan dapat terliputi. Dengan ruang foto sel dalam keadaan tertutup “no1” galvanometer didapat dengan menggunakan tombol *dark-current*. Pilih h yang diinginkan, buka fotosel dan lewatkan berkas cahaya pada blangko dan “no1” galvanometer didapat dengan memutar tombol sensitivitas. Dengan menggunakan tombol transmitansi, kemudian atur besarnya pada 100%. Lewatkan berkas cahaya pada larutan sampel yang akan dianalisis. Skala absorbansi menunjukkan absorbansi larutan sampel (Gandjar dan Rohman, 2007).

Absorpsi untuk transisi electron seharusnya tampak pada panjang gelombang diskrit sebagai suatu spectrum garis atau peak tajam namun ternyata berbeda. Spektrum UV maupun tampak terdiri dari pita absorpsi, lebar pada daerah panjang gelombang yang lebar. Ini disebabkan terbaginya keadaan dasar dan keadaan eksitasi sebuah molekul dalam subtingkat-subtingkat rotasi dan vibrasi. Transisi elektronik dapat terjadi dari subtingkat apa saja dari keadaan dasar ke subtingkat apa saja dari keadaan eksitasi. Karena berbagi transisi ini berbeda energi sedikit sekali, maka panjang gelombang absorpsinya juga berbeda sedikit dan menimbulkan pita lebar yang tampak dalam spectrum itu (Sastrohamidjojo,2007).

Absorptivitas (a) merupakan suatu konstanta yang tidak tergantung pada konsentrasi, tebal kuvet dan intensitas radiasi yang mengenai larutan sampel. Absorptivitas tergantung pada suhu, pelarut, struktur molekul, dan panjang

gelombang radiasi. Satuan a ditentukan oleh satuan-satuan b dan c . Jika satuan c dalam molar (M) maka absorptivitas disebut dengan absorptivitas molar dan disimbolkan dengan ϵ dengan satuan $M^{-1}cm^{-1}$ atau $liter.mol^{-1}cm^{-1}$. Jika c dinyatakan dalam persen berat/volume (g/100mL) maka absorptivitas dapat ditulis dengan $E_{1cm}^{1\%}A_{1cm}^{1\%}$ (Gandjar dan Rohman, 2007).



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan april - oktober 2016 di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia, Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi 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 diantaranya adalah *autoclave*, inkubator, pengaduk gelas, gelas beker, *laminar air flow*, *vortex*, bunsen, ose, timbangan analitik, tabung reaksi, rak tabung, korek api, termometer, *shaker*, lemari asam, *hot plate*, oven, penangas air, pipet volume, pipet ukur, kuvet, sentrifuge, bunsen, erlenmeyer dan seperangkat alat FTIR.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tetes tebu atau limbah tetes tebu yang diperoleh dari limbah Pabrik Gula. Media yang digunakan adalah MRSB (*de Mann Rogose Sharpe Broth*), MRSA (*de Mann Rogose Sharpe Agar*), etanol 96%, kertas saring halus, spirtus, *phenol*, asam sulfat pekat, akuades, kapas, plastik, karet dan *Lactabacillus plantarum*.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan ini terdiri dari 2 (dua) tahap. Tahap pertama merupakan untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi substrat tetes tebu terhadap produksi eksopolisakarida oleh *Lactobacillus plantarum* dan mengetahui profil senyawa eksopolisakarida yang dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum* yang diidentifikasi menggunakan FTIR. Tahap kedua dari penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dua faktor. Faktor pertama adalah variasi konsentrasi substrat tetes tebu dari (S1=25%, S2= 30% dan S3=35%). Faktor kedua adalah variasi inokulum yaitu (I1=5%, I2=10% dan I3=15%). Perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Kombinasi perlakuan konsentrasi substrat dan inokulum dapat digambarkan pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan Antara Konsentrasi Substrat dan Inokulum

S	I		
	Inokulum 5 % (v/v)(I1)	Inokulum 10 % (v/v)(I2)	Inokulum 15 % (v/v)(I3)
Substrat 25 % (v/v) (S1)	S1I1	S1I2	S1I3
Substrat 30 % (v/v) (S2)	S2I1	S2I2	S2I3
Substrat 35 % (v/v) (S3)	S3I1	S3I2	S3I3

Penelitian ini dilakukan tiga kali ulangan dan 27 percobaan. Tujuan dari variasi konsentrasi tetes tebu dan inokulum ini dilakukan untuk mengetahui berapa konsentrasi terbaik penambahan substrat tetes tebu dan inokulum pada produksi eksopolisakarida. Variabel bebas yang digunakan adalah konsentrasi substrat tetes tebu 25%, 30% dan 35%. Variabel terikat yang digunakan adalah kadar eksopolisakarida dan kadar gula terpakai. Analisa yang digunakan adalah analisa

kadar ekopolisakarida, analisa kadar gula terpakai menggunakan metode Sulfat Fenol dan dilanjutkan dengan identifikasi profil senyawa Eksopolisakarida dengan instrumentasi FTIR.

3.4 Tahapan Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan tahapan – tahapan sebagai berikut :

1. Sterilisasi alat
2. Preparasi sampel dan pengukuran brix
3. Pembuatan media *MRSA*
4. Pembuatan media *MRSB*
5. Regenerasi *Lactobacillus plantarum*
6. Pembuatan inokulum *Lactobacillus plantarum*
7. Uji pengaruh variasi konsentrasi substrat tetes tebu terhadap produksi eksopolisakarida dari tetes tebu dengan menggunakan *Lactobacillus plantarum*.
8. Uji Produksi eksopolisakarida
9. Analisis kadar gula
10. Identifikasi profil eksopolisakarida dengan menggunakan FTIR
11. Analisa Data

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat

Seluruh alat gelas yang akan digunakan dalam penelitian dicuci dan dikeringkan terlebih dahulu dan dimasukkan dalam plastik tahan panas. Semua

alat gelas disterilisasi dalam autoclave pada suhu 121⁰C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit.

3.5.2 Preparasi Sampel dan pengukuran Brix (Wahyudi, 1997)

Sampel sebanyak 3-5 tetes dimasukkan dalam alat pengukur Brix (*Hand brix refraktrometer*) tepatnya pada celah antara prisma penutupnya yang kering dan basah. Diamati batas tajam antara garis terang dan gelap tepat pada titik potong sumbunya. Dengan mengatur ketepatan, batas tersebut hingga jelas, maka dapat diketahui skala (berupa angka) dan tidak boleh terlihat garis pelangi antaranya. Tetes tebu yang telah diketahui nilai Brix nya diencerkan dengan aquades 1000 mL hingga konsentrasi 25%, 30% dan 35% (v/v) dengan menggunakan rumus pengenceran (Mulyono,2006) :

$$V1 \times P1 = V2 \times P2$$

V=Volume dan P=Presentase dalam % (v/v). Tetes tebu dimasukkan dalam 250 mL erlenmeyer sebanyak 100 mL. Urea ditambahkan sebanyak 0,3%. Disetrilkan dengan autoklaf pada suhu 121⁰C dengan tekanan 15 psi selama 2 jam.

3.5.3 Pembuatan Media MRSA (*de Man, Rogosa and Sharpe Agar*) (Thontowi dkk., 2007)

Media MRSA (*deMan, Rogosa and Sharpe Agar*)dibuat dengan menimbang 13,65 gram MRSA yang dilarutkan dengan 200 mL akuades dan dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut. Media dimasukkan dalam erlenmeyer 500 mL, disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit dengan tekanan 15 psi. Larutan tersebut didinginkan dalam tabung reaksi pada keadaan miring hingga memadat. Media ini digunakan untuk regenerasi bakteri *Lactobacillus plantarum*.

3.5.4 Pembuatan Media MRSB (*de Mann Rogose Sharpe Broth*) (Thontowi dkk., 2007)

Media MRSB dibuat dengan menimbang 11,05 gram bubuk MRSB kemudian dilarutkan dalam 200 ml aquades sampai homogen. Media dimasukkan kedalam erlenmeyer sebanyak 500 mL dan disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit. Larutan didinginkan dalam erlenmeyer. Media ini digunakan untuk pembuatan inokulum. Dilakukan 3 kali ulangan.

3.5.5 Regenerasi *Lactobacillus plantarum* (Kultsum, 2009)

Lactobacillus plantarum yang sudah menjadi biakan diambil sebanyak 2 (dua) ose dan dimasukkan kedalam media MRSA miring. Diinkubasi selama 24jam pada suhu ruang. *Lactobacillus plantarum* yang sudah mengalami regenerasi digunakan untuk pembuatan stok inokulum.

3.5.6 Pembuatan Inokulum (Kultsum, 2009)

Pembuatan inokulum dilakukan dengan cara memindahkan 2 ose biakan *Lactobacillus plantarum* kedalam 100 mL media MRSB, kemudian di goyang dengan *shaker* pada kecepatan 150 rpm selama 18 jam pada suhu 30⁰ C dengan nilai OD (*Optical Density*) 0,5 yang setara dengan 2,98 x 10⁹ cfu/ml.

3.5.7 Pengaruh variasi konsentrasi substrat terhadap produksi eksopolisakarida dari tetes tebu menggunakan *Lactobacillus plantarum* (Trabelsi,dkk.2014)

Tetes tebu yang sudah steril dengan variasi konsentrasi substrat 25%,30% dan 35% didinginkan dan ditambahkan variasi konsentrasi inokulum 5%,10% dan 15%. Inkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C dan dikocok dengan *shaker* kecepatan 150 rpm pada suhu 30 °C. Perlakuan diatas diulang sebanyak 3 kali.

3.5.8 Uji Produksi Eksopolisakarida (Zubaidah, 2015)

25 mL sampel dimasukkan dalam tabung sentrifuge. Disentrifugasi dengan sentrifuge dingin 4 °C pada 6000 rpm selama 20 menit. Supernatan diambil dan ditambah etanol dingin 96% (2 kali volume) selama 24 jam. Kemudian disentrifugasi dengan sentrifugasi dingin 4°C pada 6000 rpm 20 menit. Pellet yang diperoleh dikeringkan pada suhu 105⁰C. Berat eksopolisakarida kering ditentukan dengan menggunakan rumus :

$$kadar = \frac{\text{Berat Eksopolisakarida Kering (mg)}}{\text{Volume (L)}}$$

3.5.9 Uji Kadar Total Gula dengan Metode Fenol H₂SO₄ (Dubois dkk, 1956)

3.5.9.1 Pembuatan Kurva Standar dengan Metode Fenol H₂SO₄ (Dubois dkk, 1956)

Pembuatan kurva standar dilakukan dengan cara 1 ml larutan glukosa standar yang mengandung 10,20,30,40,50 dan 60 ppm glukosa masing – masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Larutan fenol 1 mL dan dikocok. 5 mL asam sulfat pekat ditambahkan dengan cepat dan dibiarkan selama 10 menit. Dikocok dan ditempatkan dalam penangas air selama 15 menit dengan suhu 100°C dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 485 nm.

3.5.9.2 Penetapan Kadar Total Gula dengan Metode Fenol H₂SO₄ (Dubois dkk, 1956)

Total gula sampel dapat dihitung dengan cara 1 ml sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL larutan fenol 5% (b/v) dan dikocok. Kemudian asam sulfat pekat ditambahkan 5 ml dengan cepat. Dibiarkan selama 10 menit, dikocok dan ditempatkan dalam penangas air selama 15 menit dengan

suhu 100°C. Didinginkan dengan air mengalir dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm.

3.5.10 Identifikasi profil senyawa dengan FTIR (Anton, 2015)

Untuk mengetahui profil senyawa eksopolisakarida dilakukan dengan identifikasi FTIR. Membuat pellet KBr yaitu menumbuk sampel dengan 250 mg KBr kemudian ditekan dalam cetakan hingga diperoleh pellet KBr. Eksopolisakarida kering ditekan dengan KBr dan ditekan dengan penekan hidrolis dengan frekuensi 4000 - 450 cm^{-1} . Data yang diperoleh melalui uji dengan FTIR adalah kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif berupa informasi keberadaan gugus fungsional atau jenis ikatan tertentu pada bilangan gelombang tertentu yang diidentifikasi berdasarkan inframerah yang dihasilkan. Data kuantitatif berupa nilai absorbansi dari gugus fungsi yang terdeteksi.

3.5.11 Analisis Data

Data yang diperoleh adalah rendemen kasar eksopolisakarida dan kadar total gula. Data ini dianalisis dengan analisis ragam varian (Two Way ANOVA). Apabila terdapat adanya pengaruh, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan tingkat signifikansi 5 % dengan selang kepercayaan 1%-5% untuk mengetahui perlakuan yang berpengaruh atau beda nyata di antara perlakuan yang lain.

BAB IV

PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel

Tetes tebu yang bertindak sebagai sampel diperoleh dari Pabrik Gula Cukir Kabupaten Jombang. Preparasi sampel meliputi pengukuran kadar brix, kadar gula total bahan baku awal dan sebelum fermentasi pada tetes tebu. Kadar gula total dalam tetes tebu akan berpengaruh terhadap proses fermentasi. Kandungan gula dan brix tetes tebu dipengaruhi faktor eksternal dan internal. Faktor internalnya adalah varietas tebu dan kematangan tebu. Sedangkan eksternalnya adalah proses yang dilakukan didalam pabrik gula. Berikut adalah Tabel analisa tetes tebu 80 % Brix.

Tabel 4.1 Analisa tetes tebu 80 % Brix

Komponen	Hasil
Nilai % Brix	80,03 %
Kadar total gula	56,61 %
Warna	Coklat

Berdasarkan Tabel 4.1 menunjukkan bahwa tetes tebu mempunyai nilai % Brix yang cukup tinggi. Jika nilai % Brix tinggi maka kandungan gula yang ada didalam tetes tebu juga sangat tinggi. Dengan konsentrasi gula yang cukup tinggi, tetes tebu kurang baik apabila digunakan sebagai media fermentasi. Menurut Bafrcova (2008) konsentrasi gula yang tinggi menyebabkan bakteri mengalami tekanan osmotik yang sehingga akan menyebabkan bakteri mengalami stres dan pada akhirnya akan mempengaruhi kinerja fermentasi. Kadar gula yang tinggi juga menyebabkan kultur bakteri pertumbuhannya akan menurun karena terjadi

dehidrasi sel. Thonthowi (2007) mengatakan bahwa tetes tebu harus diencerkan terlebih dahulu sehingga kadar gulanya 12-17% atau dengan menambahkan air sebanyak empat kali volume tetes tebu.

Tetes tebu sebagai substrat diencerkan dengan variasi konsentrasi substrat 25 %, 30 % dan 35 % (b/v) dalam 100 mL akuades. Tetes tebu disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121⁰C untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi karena seluruh mikroba patogen akan mati, sehingga tidak dapat berkembang dan tidak menghambat proses fermentasi. Tetes tebu selanjutnya dianalisis kadar gula totalnya sebelum proses fermentasi. Hal ini bertujuan untuk mengetahui kandungan gula pada substrat tetes tebu dengan konsentrasi yang berbeda. Analisa hasil preparasi variasi konsentrasi substrat 25 %, 30 % dan 35 % (b/v) adalah sebagai berikut pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Analisa kadar total gula tetes tebu sebelum fermentasi

Konsentrasi Tetes tebu (%)	Rata-rata kadar total gula (%)
25	15,07
30	17,78
35	23,45

4.2 Pembuatan Media

Media adalah zat yang mengandung nutrisi yang berfungsi untuk menumbuhkan mikroba dan memperbanyak jumlah mikroba. Jika media memiliki nutrisi yang banyak maka akan lebih cepat dalam proses pertumbuhan bakteri (Balya,2011). Dalam penelitian ini, media yang digunakan adalah MRSA (*de Mann rogosa sharp agar*) dan MRSB (*de Mann rogosa sharpe broth*). Kedua media ini merupakan media yang tepat untuk menumbuhkan, mengisolasi dan

memperkaya jenis *Lactobacillus* dari seluruh jenis bahan. Media tersebut mengandung polysorbat, asetat, magnesium dan mangan yang diketahui dapat bertindak sebagai faktor pertumbuhan bagi *Lactobacillus*. Mikroba dapat tumbuh baik dalam suatu media ketika media tersebut memenuhi syarat – syarat seperti adanya sumber karbon, sumber nitrogen, air dan vitamin (Rustan,2013).

Pembuatan media MRSA dan MRSB dilakukan dengan menimbang media sebanyak 6,82 gram MRSA dan 5,51 gram MRSB kemudian dilarutkan dengan akuades masing-masing 100 ml kemudian dipanaskan yang bertujuan untuk membantu pelarutan media dan pengadukan dengan *stirer* untuk menghomogenkan media tersebut. Media disterilisasi dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121⁰C dan tekanan 15 psi. Media MRSA digunakan untuk regenerasi dan mempelajari secara fisiologi tampilan koloni bakteri sedangkan MRSB digunakan untuk membiakkan bakteri dalam jumlah besar dan bertindak sebagai stok inokulum.

4.3 Regenerasi dan Pembuatan Stok Inokulum *Lactobacillus plantarum*

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis *Lactobacillus plantarum*. Isolat *Lactobacillus plantarum* didapatkan dari Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta. Isolat disimpan dalam kulkas dengan tujuan penghambatan pertumbuhan bakteri menuju ke fase kematian. Isolat yang diperoleh diregenerasi didalam media MRSA. Regenerasi adalah tindakan pembaharuan, pertumbuhan dalam memperbanyak sel pada bakteri. Regenerasi penting dilakukan karena akan mendapatkan biakan bakteri yang baru dan aktif serta dapat optimal untuk proses fermentasi (Madigan,2010).

Regenerasi bakteri *Lactobacillus plantarum* dilakukan secara aseptik. Aseptik disini yaitu dengan menyalakan api disekitar mulut tabung reaksi. Isolat *Lactobacillus plantarum* di pindahkan ke media MRSA dengan penggoresan dua ose bakteri. Sebelum dipindahkan, mulut tabung reaksi dari isolat bakteri maupun MRSA di panaskan dengan api. Jarum ose yang digunakan untuk penggoresan, juga di pijarkan dengan api sampai warnanya memerah. Hal ini bertujuan untuk meminimalisir kontaminasi dan membunuh mikroorganisme yang lain.

Hasil dari regenerasi bakteri *Lactobacillus plantarum* diinkubasi selama 48 jam. Pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* ditandai dengan meningkatnya nilai densitas (kekeruhan) medium yang sejalan dengan meningkatnya lama waktu inkubasi. Populasi *Lactobacillus plantarum* belum mengalami pertumbuhan yang beradaptasi dan mengalami penyesuaian dalam medium yang baru. Menurut Madigan.(2010) dalam Astuti dan Rahmawati (2010), hal tersebut menyebabkan sel belum dapat melakukan reproduksi atau pembelahan, tetapi masih beradaptasi dengan medium atau lingkungan barunya. Pada fase ini, memungkinkan terjadinya penambahan ukuran sel, tetapi bukan pada jumlah selnya.

Menurut Madigan (2010), Fase pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* diketahui kecepatan tumbuh spesifik pada fase logaritmik. Fase logaritmik ditandai dengan populasi secara signifikan. Hal ini ditandai dengan perubahan yang terjadi dalam media tumbuh bakteri. Terdapat serat berwarna putih pada media pertumbuhan. Jumlah sel bakteri meningkat sampai jam ke-48. Pada fase ini bakteri dipanen dan diinokulasikan pada media MRSB untuk pembuatan stok inokulum.

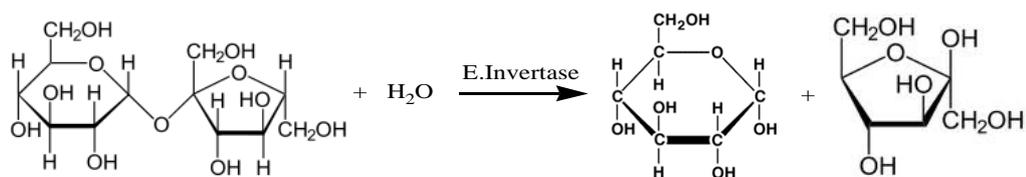
Inokulum adalah mikroorganisme yang diinokulasikan ke dalam sebuah medium, dimana mikroorganisme tersebut masih dalam keadaan hidup atau masih berada pada fase pertumbuhan yang sehat. Tujuan utama pembuatan inokulum adalah untuk starter dalam proses fermentasi. Inokulum sebaiknya diinokulasikan ke dalam medium fermentasi pada saat sel aktif melakukan metabolisme. Inokulasi adalah proses atau tahap kegiatan pemindahan mikroorganisme dari sumber asalnya ke sebuah medium yang baru dan telah disediakan sebelumnya. Pembuatan inokulum pada penelitian ini meliputi inokulum kerja dan inokulum induk. Inokulum kerja digunakan untuk fermentasi, dengan cara aseptik yaitu bebas dari pengaruh kontaminan mikroorganisme lain. Pembuatan stok inokulum dilakukan secara aseptik di dalam *Laminar air flow* dengan menyalakan api agar terhindar dari kontaminan udara. Pembuatan inokulum dibuat dengan menginokulasikan dua ose isolat bakteri *Lactobacillus plantarum* kedalam media MRSB dan di *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 18 jam. Pada saat inokulasi jarum ose yang digunakan untuk memindahkan mikroba harus dipijarkan diatas api segera, baik sebelum dan sesudah melakukan pemindahan. Pemanasan ini bertujuan untuk menghancurkan semua bentuk kehidupan yang ada pada permukaan jarum. Fase pertama adalah bakteri mengalami adaptasi dan belum terjadi pembelahan. Stok inokulum digunakan untuk starter pada proses fermentasi.

4.4 Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Inokulum Terhadap Produksi Eksopolisakarida oleh *Lactobacillus plantarum*

Dalam penelitian ini proses fermentasi dilakukan dengan variasi konsentrasi substrat (tetes tebu) 25 %, 30 % dan 35% dengan variasi inokulum

(*Lactobacillus plantarum*) 5 %, 10% dan 15 %. Fermentasi dilakukan dengan mencampurkan tetes tebu dan inokulum yang disertai dengan penambahan urea 0,3%. Fungsi penambahan urea adalah sebagai nutrisi. Adanya penambahan urea menyebabkan peningkatan jumlah nutrisi yang diperlukan oleh *Lactobacillus plantarum* untuk tumbuh dan berkembang biak. Menurut Fardiaz (2003), nutrisi bagi mikroba berfungsi sebagai sumber energi untuk pertumbuhan, membentuk sel, dan biosintesis produk – produk metabolit. Nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroba meliputi air, sumber karbon, sumber nitrogen, vitamin dan mineral.

Inokulum yang digunakan dalam penelitian ini pada proses fermentasi, dihitung jumlah sel bakterinya dengan menggunakan metode *total plate count* (TPC). Tujuan dari penghitungan sel bakteri ini adalah untuk mengetahui berapa banyak jumlah bakteri *Lactobacillus plantarum*. Jumlah sel bakteri yang digunakan adalah $2,98 \times 10^9$ cfu/ml yang setara dengan nilai *Optical Density* (OD) 0,5. Sampel yang digunakan di *shaker* selama 18 jam dengan kecepatan aerasi 120 rpm. Proses fermentasi oleh bakteri jenis *Lactobacillus plantarum* berlangsung secara anaerobik, akan tetapi oksigen diperlukan pada proses pembibitan sebelum fermentasi untuk berkembang biakan bakteri itu sendiri (Hidayat,2006). *Lactobacillus plantarum* dapat memanfaatkan disakarida seperti sukrosa sebagai sumber makanan karena bakteri dapat menghasilkan enzim invertase. Fungsi enzim invertase yaitu untuk hidrolisis sukrosa menjadi monosakarida yaitu glukosa dan fruktosa. Reaksi tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Reaksi hidrolisis sukrosa (Iswanto, 2014)

Reaksi hidrolisis sukrosa adalah :



Prinsip pengujian eksopolisakarida kasar dilakukan dengan pemisahan eksopolisakarida dari membran sel bakteri dengan menggunakan sentrifuse dingin dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit untuk mendapatkan supernatan. Supernatan yang mengandung eksopolisakarida dari sel bakteri kemudian di presipitasi dengan alkohol dingin selama semalam. Fungsi alkohol dingin adalah untuk menghasilkan endapan. Supernatan yang didapat juga terdapat protein didalamnya, dan untuk menghilangkan protein tersebut dilakukan pemisahan lagi dengan sentrifuse dingin dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit dan akhirnya didapatkan pellet. Pellet yang diperoleh dikeringkan dalam oven dengan suhu 105 °C untuk memperoleh berat konstan eksopolisakarida. Berat konstan yang diperoleh dihitung dengan dibagi volume yang dipakai agar diperoleh kadar eksopolisada dengan satuan mg/L. Randemen hasil ekstraksi eksopolisakarida dapat dilihat pada Tabel 4.3

Tabel 4.3 Kadar Eksopolisakarida

Perlakuan	Rata-rata kadar eksopolisakarida (mg/L)
S1I1	2,324
S1I2	2,730
S1I3	2,862
S2I1	2,817
S2I2	2,790
S2I3	2,164
S3I1	2,807
S3I2	2,300
S3I3	2,862

Tabel 4.4 menunjukkan bahwa variasi konsentrasi substrat dan inokulum berpengaruh terhadap kadar eksopolisakarida yang dihasilkan. Eksopolisakarida tertinggi dihasilkan dari perlakuan S3I3 dengan konsentrasi 35% dan konsentrasi inokulum 10%. Konsentrasi eksopolisakarida terendah dihasilkan dari perlakuan S1I1 dengan konsentrasi substrat 25% dan konsentrasi inokulum 5%. Tinggi rendahnya kadar eksopolisakarida dipengaruhi oleh jumlah inokulum dan keadaan lingkungan fermentasi selama inkubasi (Murti,2010). Menurut penelitian Halim (2014), menyatakan bahwa kadar eksopolisakarida tertinggi yaitu 25% dengan menggunakan murbei juga dengan bantuan bakteri asam laktat adalah 2,17 mg/L.

Berdasarkan hasil analisis uji statistik menggunakan *Two Way ANOVA* menunjukkan bahwa interaksi antara substrat dan inokulum tidak memberikan pengaruh signifikan terhadap kadar eksopolisakarida ($\text{Sig} > 0,05$). Sedangkan konsentrasi substrat (25%, 30%, 35%) dan konsentrasi inokulum (5%, 10%, 15%) memberikan pengaruh signifikan terhadap kadar eksopolisakarida, hal ini ditunjukkan dengan nilai ($\text{Sig} < 0,05$). Konsentrasi substrat dan konsentrasi inokulum memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar eksopolisakarida,

maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan *Tukey* yaitu uji Beda Nyata Jujur (BNJ). Hasil analisis uji lanjut dapat dilihat pada Tabel 4.5 untuk konsentrasi substrat dan Tabel 4.6 untuk konsentrasi inokulum:

Tabel 4.4 Uji lanjut Beda Nyata Jujur (BNJ) terhadap konsentrasi substrat

Konsentrasi Substrat (%)	Kadar Eksopolisakarida mg/L
25 (S1)	2,3240 ^a
30 (S2)	4,6820 ^b
35 (S3)	7,4760 ^c

Keterangan : notasi yang samamenunjukkan perlakuan tidak beda nyata

Tabel 4.5 Uji lanjut Beda Nyata Jujur (BNJ) terhadap konsentrasi Inokulum

Konsentrasi Inokulum (%)	Kadar Eksopolisakarida mg/L
5% (I1)	5,0844 ^a
10% (I2)	5,5800 ^b
15% (I3)	5,7600 ^b

Keterangan : notasi yang samamenunjukkan perlakuan tidak beda nyata

Tabel 4.6 Menunjukkan bahwa berdasarkan *Tukey* konsentrasi substrat 25%, 30%, dan 35% memberikan perlakuan beda nyata terhadap kadar eksopolisakarida. Semakin tinggi konsentrasi substrat maka semakin tinggi kadar eksopolisakarida yang dihasilkan. Penelitian yang dilakukan oleh Zubaidah (2015), Produksi eksopolisakarida salah satunya dengan menggunakan substrat kimchi. Produksi tertinggi dihasilkan pada konsentrasi 20% dengan menggunakan *Lactobacillus plantarum* dengan hasil 4,27 mg/L. Kecepatan reaksi akan meningkat apabila konsentrasi substrat meningkat. Semakin cepat kecepatan reaksi maka produk yang dihasilkan semakin tinggi. Peningkatan kecepatan reaksi ini akan semakin kecil hingga tercapai suatu titik batas yang pada akhirnya

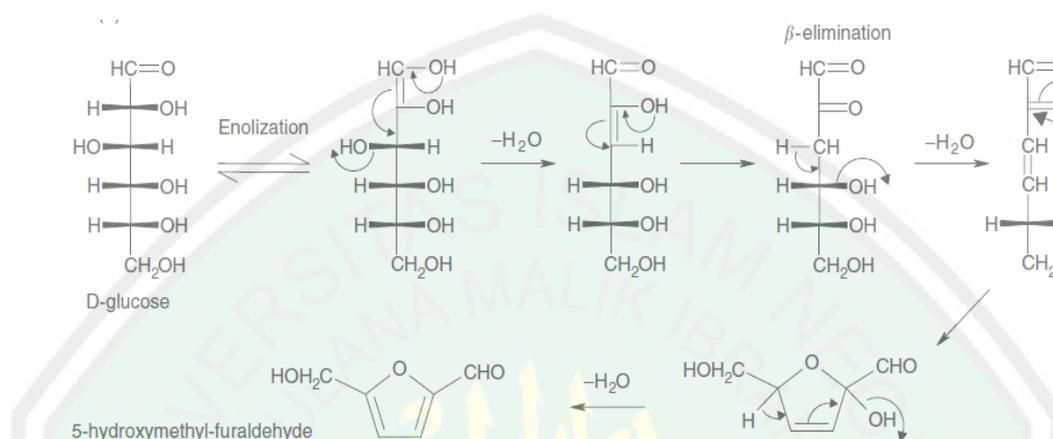
penambahan konsentrasi substrat hanya akan sedikit meningkatkan kecepatan reaksi (Lechniger, 1997).

Pada Tabel 4.6 menunjukkan bahwa berdasarkan *Tukey* konsentrasi inokulum 10% dan 15% memberikan perlakuan tidak beda nyata, sedangkan konsentrasi inokulum 5% memberikan perlakuan beda nyata terhadap eksopolisakarida. Semakin tinggi konsentrasi inokulum, kadar eksopolisakarida yang dihasilkan juga semakin tinggi. Hal ini sesuai dengan penelitian Purnavita (2014) dimana konsentrasi inokulum terbaik adalah 30% dari variasi konsentrasi inokulum 10-30%.

4.5 Analisa Kadar Gula Terpakai Fermentasi

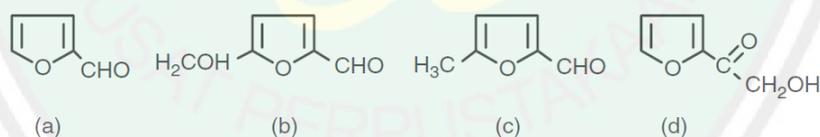
Gula terpakai adalah gula yang digunakan oleh *Lactobacillus plantarum* untuk berkembang biak pada saat proses fermentasi. Efisiensi fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu: suhu, pH, konsentrasi substrat, konsentrasi inokulum. Salah satunya adalah substrat, dimana substrat mengandung kadar gula dalam bentuk sukrosa yang digunakan untuk produksi eksopolisakarida. Gula merupakan golongan karbohidrat. Metode penentuan kadar gula disini adalah menggunakan metode sulfat fenol. Prinsip dasar metode ini adalah bahwa karbohidrat, ketika dehidrasi melalui reaksi dengan asam sulfat pekat menghasilkan turunan furfural. Tetes tebu 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 4.2.



Gambar 4.3 Reaksi dehidrasi karbohidrat

Senyawa turunan furan yang terbentuk tergantung pada jenis karbohidrat yang ada. Turunan furan yang terbentuk dapat dilihat pada gambar 4.3.



Gambar 4.4 (a) Pentosa, (b) Heksosa, (c) 6-dioksiheksosa, (d) Keto-heksosa

Turunan furan selanjutnya akan bereaksi dengan fenol dengan proses kondensasi untuk menghasilkan senyawa kompleks berwarna oranye. Kemudian senyawa kompleks tersebut diukur absorbansinya dengan Spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 485 nm karena warna tampak dari senyawa tersebut adalah oranye (Rover,2013). Kadar gula terpakai fermentasi didapatkan

dari hasil analisa sebelum fermentasi dikurangi dengan analisa setelah fermentasi. Analisa hasil kadar gula terpakai dalam proses fermentasi dapat dilihat Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Kadar gula terpakai fermentasi

Perlakuan	Kadar Gula (%)
S1I1	17,99
S1I2	17,89
S1I3	17,83
S2I1	21,74
S2I2	21,63
S2I3	21,67
S3I1	20,05
S3I2	26,69
S3I3	26,49

Berdasarkan hasil analisis uji statistik menggunakan *Two Way ANOVA* menunjukkan bahwa interaksi antara substrat dan inokulum tidak memberikan pengaruh signifikan ($\text{Sig} > 0,05$) terhadap kadar gula terpakai. Konsentrasi inokulum (5%, 10% dan 15%) juga tidak memberikan pengaruh signifikan ($\text{Sig} > 0,05$) terhadap kadar gula terpakai. Sedangkan konsentrasi substrat (25%, 30%, 35%) memberikan pengaruh signifikan terhadap kadar gula terpakai, hal ini ditunjukkan dengan nilai ($\text{Sig} < 0,05$). Konsentrasi substrat memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar gula terpakai, maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan *Tukey* yaitu uji Beda Nyata Jujur (BNJ). Hasil analisis uji lanjut konsentrasi substrat dapat dilihat pada Tabel 4.8 :

Tabel 4.8 Uji lanjut Beda Nyata Jujur (BNJ) terhadap konsentrasi substrat

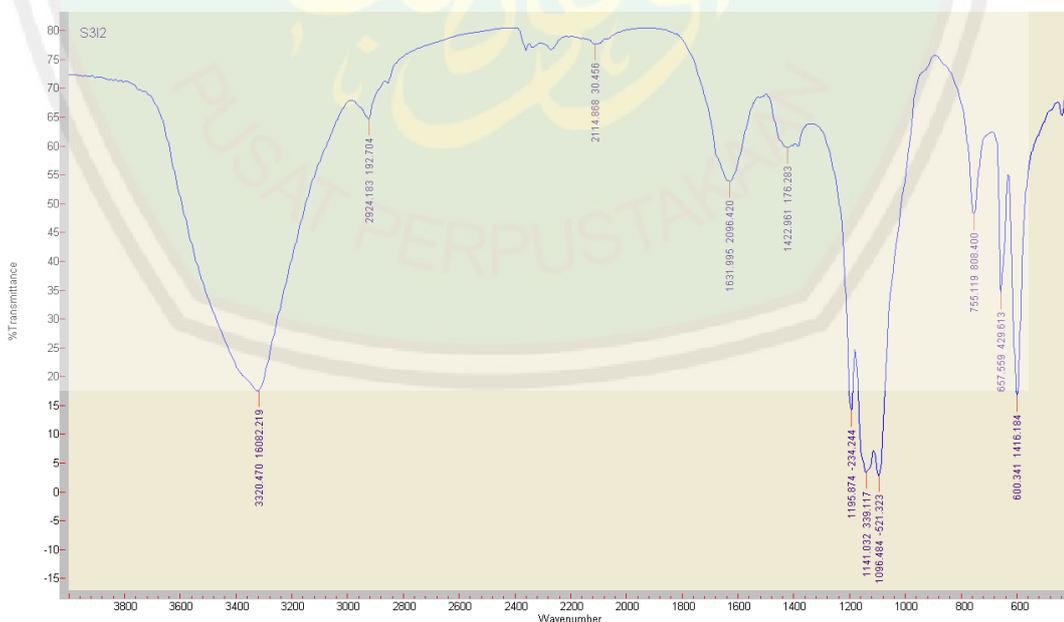
Konsentrasi Substrat (%)	Kadar Gula Terpakai (%)
25% (S1)	22,3160 ^a
30% (S2)	24,7589 ^b
35% (S3)	24,4760 ^b

Keterangan : notasi yang samamenunjukkan perlakuan tidak beda nyata

Tabel 4.8 menunjukkan berdasarkan *Tukey* konsentrasi substrat 25%, 30%, dan 35% memberikan perlakuan beda nyata terhadap kadar gula terpakai. Notasi yang sama yaitu pada konsentrasi 30% dan 35% menunjukkan kadar gula terpakai yang tinggi dan beda nyata dengan kadar gula terpakai dengan konsentrasi 25%. Tingginya kadar gula terpakai setelah fermentasi sangat menguntungkan secara komersial apabila terdapat keseimbangan tingginya kadar eksopolisakarida hasil fermentasi, karena dengan tingginya kadar gula terpakai tersebut media fermentasi dapat digunakan kembali untuk proses fermentasi selanjutnya.

4.6 Identifikasi Senyawa Eksopolisakarida Menggunakan FTIR

Identifikasi menggunakan FTIR digunakan untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam eksopolisakarida. Gambar 4.5 merupakan spektra FTIR eksopolisakarida.



Spektra hasil FTIR pada Gambar 4.5 menunjukkan adanya serapan gugus -OH dengan profil melebar yang khas pada bilangan gelombang 3320 cm^{-1} .

Serapan gugus C-H sp^3 dari gugus metoksi muncul pada bilangan gelombang 2924 cm^{-1} yang didukung adanya gugus C-O-C pada bilangan gelombang 1096 cm^{-1} . Serapan gugus C=O pada bilangan gelombang 1631 cm^{-1} dengan profil tajam. Serapan gugus C-H bending muncul pada serapan bilangan gelombang 1422 cm^{-1} . Serapan Gugus C-O alkohol muncul pada serapan bilangan gelombang 1141 cm^{-1} (Socrates, 1988). Tabel 4.7 adalah tabel gugus fungsi dan serapan bilangan gelombang yang didapatkan oleh spektra FTIR.

Tabel 4.7 Gugus Fungsi dan Bilangan Gelombang

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang Eksopolisakarida	Bilangan Gelombang Refrensi
-OH	3320 cm^{-1}	3280-3650 cm^{-1}
C-H sp^3	2924 cm^{-1}	2853-2962 cm^{-1}
C-O-C	1096 cm^{-1}	1086-1270 cm^{-1}
C=O	1631 cm^{-1}	1625-1650 cm^{-1}
C-H bending	1422 cm^{-1}	1300-1470 cm^{-1}
C-O alkohol	1141 cm^{-1}	1100-1247 cm^{-1}

Sumber : Socrates, 1988

Menurut Santi (2008), analisa FTIR karakterisasi eksopolisakarida bahwa gugus fungsional utama yang dihasilkan oleh *L.plantarum* terdiri atas -OH, -CH, -C=C, dan C-O-C. Gugus fungsional tersebut ada yang bersifat polar (hidrofilik) dan adapula yang bersifat non polar (hidrofobik). Puncak 3406 cm^{-1} mengindikasikan keberadaan ikatan hidrogen gugus OH. Gugus tersebut pembawa sifat hidrofilik pada eksopolisakarida. Selain itu sifat hidrofilik juga dibawa oleh gugus C-H pada puncak 2927 cm^{-1} . Absorpsi lemah pada puncak 2365 cm^{-1} yang menandakan ada hidrogen dalam bentuk ikatan -OH didalam rangkaian eksopolisakarida ini dan -C=O pada puncak 1630 cm^{-1} . Puncak 1058

cm^{-1} yang terdapat antara bilangan gelombang $1170\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ menandakan adanya ikatan glikosidik.

4.7 Pemanfaatan Tetes tebu Sebagai Media Fermentasi untuk Menghasilkan Eksopolisakarida dalam Perspektif Islam

Penelitian ini mengkaji tentang senyawa eksopolisakarida yang di produksi oleh tetes tebu atau tetes tebu yang memiliki banyak manfaat seperti sebagai antioksidan, pengental alami dan berbagai manfaat lainnya. Menurut Imam al Ghazali, jalan untuk mengenal Allah dan mendekatkan diri kepada-Nya adalah memikirkan dan merenungkan hikmah yang terkandung dalam ciptaan-Nya. Allah SWT memberikan gelar *Ulul Albab* pada orang yang berfikir melalui aspek mata akal (fikir dan nadzar), observasi (pengamatan), mata hati (dzikir), dan instropeksi (muhasabah, perenungan, dan penghayatan) (Syafuruddin, 2003). Sebagaimana firman Allah SWT dalam surat Ali Imran (3) :190 sebagai berikut :

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ (١٩٠) الَّذِينَ
يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا
خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ (١٩١)

“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 keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): “Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia. Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka”. (QS. ali Imran: 190-191).”

Lafadz *al-albab* adalah jamak dari lafadz *lubbun* yang artinya adalah akal, sehingga lafadz *ulil albab* berarti orang-orang yang memiliki akal (Mustafa,

1993). Akal tersebut digunakan untuk merenungkan fenomena alam raya hingga pada bukti yang nyata tentang keesaan Allah SWT. Semua yang ada dan terjadi di alam tidak berjalan dengan sendirinya, melainkan dengan kehendak Allah SWT seperti manfaat yang terkandung di dalam ciptaan-Nya serta perubahan yang terjadi padanya. Sehingga, melalui kegiatan berfikir, merenungkan, serta menganalisis ciptaan-ciptaan Allah SWT maka akan tumbuh rasa tawakkal, berserah diri, serta mengakui kelemahan diri sendiri terhadap kebesaran Allah SWT.

Lafadz *alalbab* juga memiliki makna akal-akal sempurna dan cerdas. Orang yang berakal akan mampu berfikir tentang tanda-tanda kekuasaan Allah yang dapat disaksikan secara jelas dan besar seperti gunung-gunung dan padang pasir, pepohonan, tumbuh-tumbuhan, tanaman, buah-buahan, berbagai macam hewan, barang-barang tambang, serta berbagai manfaat yang beraneka warna, rasa, bau atau aromanya, serta manfaatnya (Dimasyqi, 2000).

Salah satu bentuk berfikir adalah dengan melakukan penelitian tentang manfaat tetes tebu atau tetes tebu yang dapat digunakan untuk produksi eksopolisakarida. Berdasarkan penelitian ini, eksopolisakarida diperoleh kadar eksopolisakarida tertinggi yaitu 2,862 mg/L dengan konsentrasi substrat 35% dan inokulum 15%. Eksopolisakarida merupakan metabolit sekunder yang banyak memiliki manfaat bagi dunia industri dan kesehatan. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk membuktikan bahwa ciptaan Allah SWT ini memiliki manfaat yang penting sehingga kewajiban kita sebagai hamba-Nya untuk mentauhidkan-Nya.

Seperti halnya tetes tebu orang menganggapnya sebagai limbah. Akan tetapi, melalui penelitian ini dapat dibuktikan bahwa tetes tebu dapat dimanfaatkan untuk industri dan kesehatan. Ketika dilaksanakan proses fermentasi, pengukuran kadar gula dan uji produksi eksopolisakarida, berdasarkan data yang ada bahwa eksopolisakarida memiliki potensi yang sangat tinggi untuk industri dan kesehatan.



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Kadar eksopolisakarida tertinggi yaitu 2,862 mg/L pada perlakuan percobaan S3I3 dengan konsentrasi substrat 35% dan konsentrasi inokulum 15% sehingga variasi konsentrasi substrat dan inokulum memberikan pengaruh untuk hasil produksi eksopolisakarida.
2. Hasil yang didapatkan dari eksopolisakarida kasar dengan menggunakan FTIR yaitu terdapat serapan gugus -OH dengan bilangan gelombang 3320 cm^{-1} . Serapan C-H sp^3 pada bilangan gelombang 2924 cm^{-1} . gugus C-O-C pada bilangan gelombang 1096 cm^{-1} . Serapan gugus C=O pada bilangan gelombang 1631 cm^{-1} . Serapan gugus C-H bending pada bilangan gelombang 1422 cm^{-1} . Serapan Gugus C-O alkohol pada bilangan gelombang 1141 cm^{-1} .

5.2 Saran

1. Perlu adanya penelitian lanjutan menggunakan variasi substrat tetes tebu dan inokulum lebih dari 35%:15% untuk menghasilkan rendemen eksopolisakarida yang lebih tinggi.
2. Perlu diperhatikan untuk penggunaan *Lactobacillus plantarum* dalam hal :
 - a. Minimal regenerasi bakteri 2 minggu sekali.
 - b. Pembuatan starter maksimal 18 jam karena diatas 18 jam aktivitasnya menurun.

DAFTAR PUSTAKA

- Albalasmeh, A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *97* : 253-261
- Anton, N. dan Zubaidah, E. (2015). Isolasi bakteri asam laktat penghasil eksopolisakarida dari kimchi. *Jurnal Universitas Brawijaya Malang*. *3* (2) 743-748
- Balya, M. J. (2011). Perbedaan konsentrasi substrat terhadap lama fermentasi pada buah murbei. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*. *1* (1), 139-149. Jakarta: Universitas Indonesia. Sistem Fermentasi Cair
- Barfncova, S.C, and Dum, C.G. (2008). Microbiology. *E- Book Co. Ltd*. 567-573. New York: McGraw-Hill
- Bibra, F. (2015). Pembuatan etanol dari molase secara fermentasi menggunakan el *Saccharomyces cerevisiae* yang terimobilisasi pada kalsium alginat. *Jurnal Teknologi Proses, Departemen Kimia, Fakultas MIPA Universitas Sumatera Utara*, *2* (3) 75-80
- Brummer, Y. and Cui, W.S. (2005). Food carbohydrates for chemistry, physical properties, and application. *E-book*. 432-439. France: Taylor and francies group, LLC
- Buckle, K.A. and Edwards, G.H. (1987). Exopolysaccharide production from micro substrate and identified the molecule. *1* (5) 7-9
- Casida, S. And Vane, L.M. (1980). Multi-stage continuous culture fermentation of glucose-xylose mixtures to fuel ethanol using genetically engeneered *Saccharomyces cerevisiae* 424s. *Journal 1* (2), 12-14
- Cerning, J., Bouilanne, and Landon, M. (1992). Isolation and characterization of exopolysaccharide from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *Journal Dairy Science 3* (5), 9-12
- Chabela, G., Fince, B. R., and Case, C. L. (2001). Introduction microbiology part 7. *E-book*. 76-83. San Fransisco: Addison Weasly angman
- Chang, W.K., MClave, and Chao, Y. C. (2004). Enhancing interpretation of gastric residual volume by refractometry. *Journal 19* (5): 62-72
- Choi, X. (2013). Extraction and in Vitro Antioxidant Activity of exopolysaccharide by *Pleurotus eryngii* SI-02. *Brazilian Journal of Microbiology 44*,(4), 1081-1088

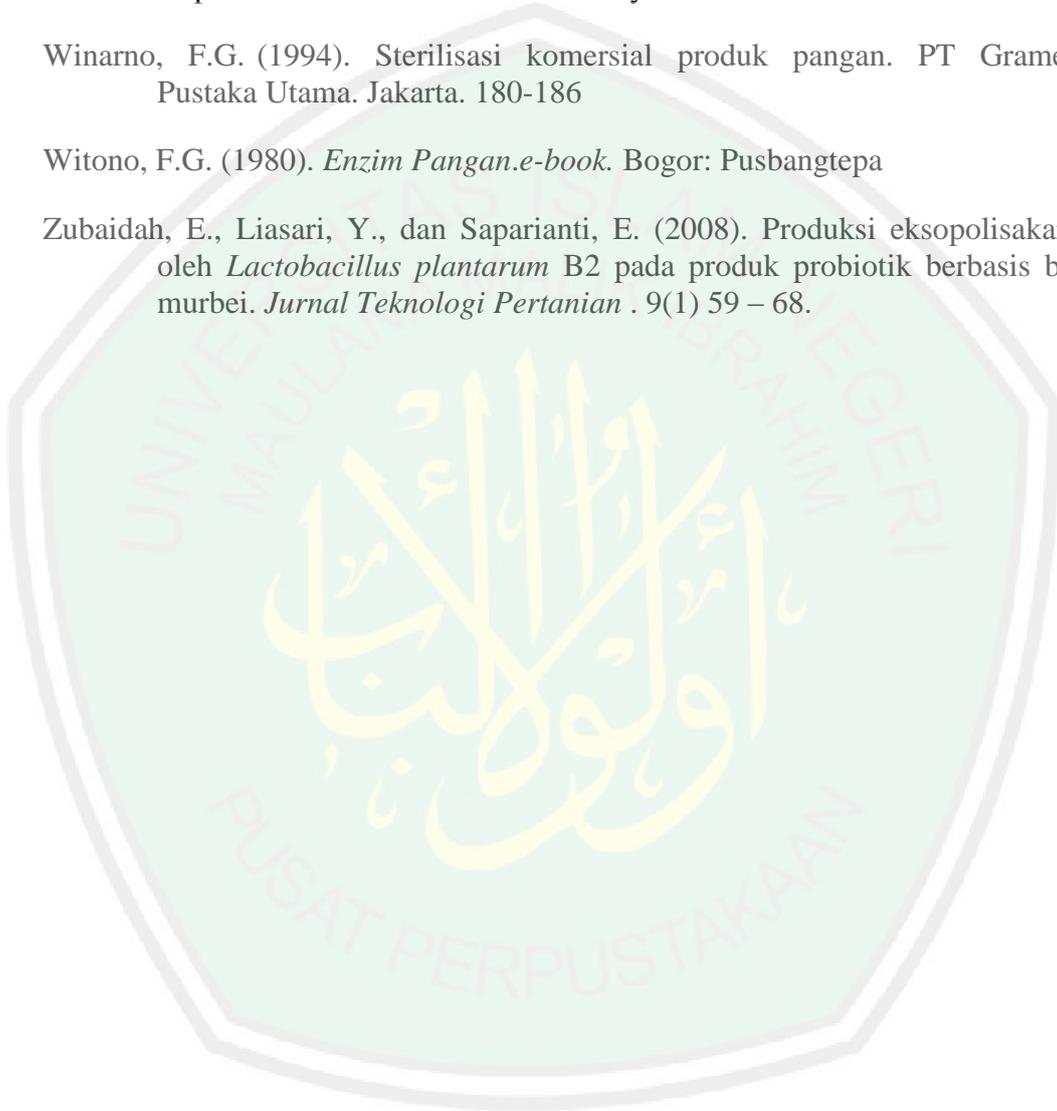
- Choudhoy N., Pradip K.R., and Aradhana S. (2011). Lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1 (2), 7-10
- Darwis, M. T., Dertli, E., Toker, O. S., Tatlisu, N. B., Sagdic, O., and Arici, M. (1992). Effect of in situ exopolysaccharide production on physicochemical, rheological, sensory, and microstructural properties of the yogurt drink ayran: An optimization study based on fermentation kinetics. *Journal of Dairy Science*, 98 (3) 20-25
- Delgado E., O. Spiricheva, S., and Varfolomeyev,. (2001). Rhizopusoryzae fungus cells producing L (+)-lactic acid kinetic and metabolic parameters of free and PVA-cryogel-entrapped mycellium. *Journal Appl Microbial Biotechnol*, 72, 480-485
- Dimasyqi. (2012). Tafsir surah ar Rum. Diakses tanggal 20 November 2016
- Djide, M.N. (2005). Uraian umum tentang bakteri asam laktat. *E-book singkat pemanfaatan BAL dalam bidang Pangan dan Kesehatan*. Univ. Hasanuddin, Makassar 144-240
- Dubois, M.K., A. Gilles., Hamilton, P.A., Rebers, and Fred Smith. (1956). Colorimetric method for detremination of sugar and related substance. *Journal of University of Minnesota* 28 (3): 350-356
- Ertesvag, M.J. (1998). Modern food microbiology fifth edition. Chapman and Hall. New York, USA. 661
- Evelyna, P.D., Wuryanti., dan Anam, K. (2010). Purifikasi dan karakterisasi α -amilase dari *Lactobacillus plantarum* FNCC 3012. *Skripsi Semarang: Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro*, 55-67
- Fardiaz, S. (1992). Mikrobiologi pangan. *E-Book*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 320-332
- Franca, A. J. (2009). Fundamental principles of bacteriology. *E-book*. Kogakusha Company, Ltd. Tokyo. 812-817
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A. (2007). Kimia farmasi analisis. Yogyakarta: Pustaka Pelajar, 67-78
- Grik, K., Charles, A.L., Guu, Y.K., Yen, T.B., and Chiu, H.C. (1963). Optimization actic acid production from molasses renewable raw material through response surface methodology with lactobacillus casei M-15. *Journal Procedia*, 8 (2) , 194-198
- Grizer, S.M., Koo and Jee, L. (1991). Production of lactic acid from paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation. *Journal biotechnol*, 8 (7), 173-194

- Harrah, T., Panilaitis, and Kaplan. (2006). Microbial exopolysaccharides isolation. *Journal* 2 (1), 9-14. <http://www.jds.fass.org/cgi/content/full.html>.
- Hartina, F. (2013). Fermentasi tetes tebu dari pabrik gula pagotan madiun menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* untuk menghasilkan bioetanol dengan kajian variasi pH dan lama fermentasi. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, 55-64
- Helferich, W. and Westhoff. (1980). All about fermentation. *E-book*. Prentice-Hall Inc., Englewood, 432-443
- Hendayana, S. (2006). Kimia pemisahan metode kromatografi dan elektroforesis modern. *e-book*. Bandung: Remaja Rosdakarya, 35-38
- Hidayat, N.M., Padaga dan Suhartini, S. (2006). Mikrobiologi industri. *E-book*. Andi: Yogyakarta, 26-32
- Ishmayana, S., Learmonth, P.R., and Kennedy, J.U. (2011). Fermentation performance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in media with high sugar concentration. *journal proceeding of the 2th International Seminar on Chemistry*, pp 379-385
- Jenie, S.L., dan Shinta E.R. (1995). Aktivitas antimikroba dari beberapa spesies *Lactobacillus* terhadap mikroba patogen dan perusak makanan. *jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 7(2) , 46-51
- Jiang, M., Zhang, F., Wan, Cuixiang, Xiong, Yonghua., *at all*. (2016). Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 isolated from human breast milk. *Journal of Dairy Science*, 99 (3) 20-26
- Jin, J. M. 2006. Modern Food Microbiology. Chapman and Hall. New York
- Kultsum,U. (2009). Pengaruh variasi nira tebu dari beberapa varietas penambahan sumber N dari tepung kedelai hitam sebagai substrat terhadap efisiensi fermentasi etanol. *Skripsi*. Malang : Jurusan kimia fakultas saintek uin malang, 43-47
- Kumar, R.S., Shankar and Anandapandian. (2007). Characterization of alcohol resistant yeast *Saccharomyces cerevisiae* isolated from toddy. *International Research Journal of Microbiology*, 2 (10), 399-405
- Kuswanto, K.R., dan Slamet, S. (1988). Proses-proses mikrobiologi pangan. *E-book* PAU Pangann dan Gizi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 160-166
- Lapasin, D. and Haines, P.J. (1999) Analytical chemistry. New York: BIOS Scientific Publishers Limited

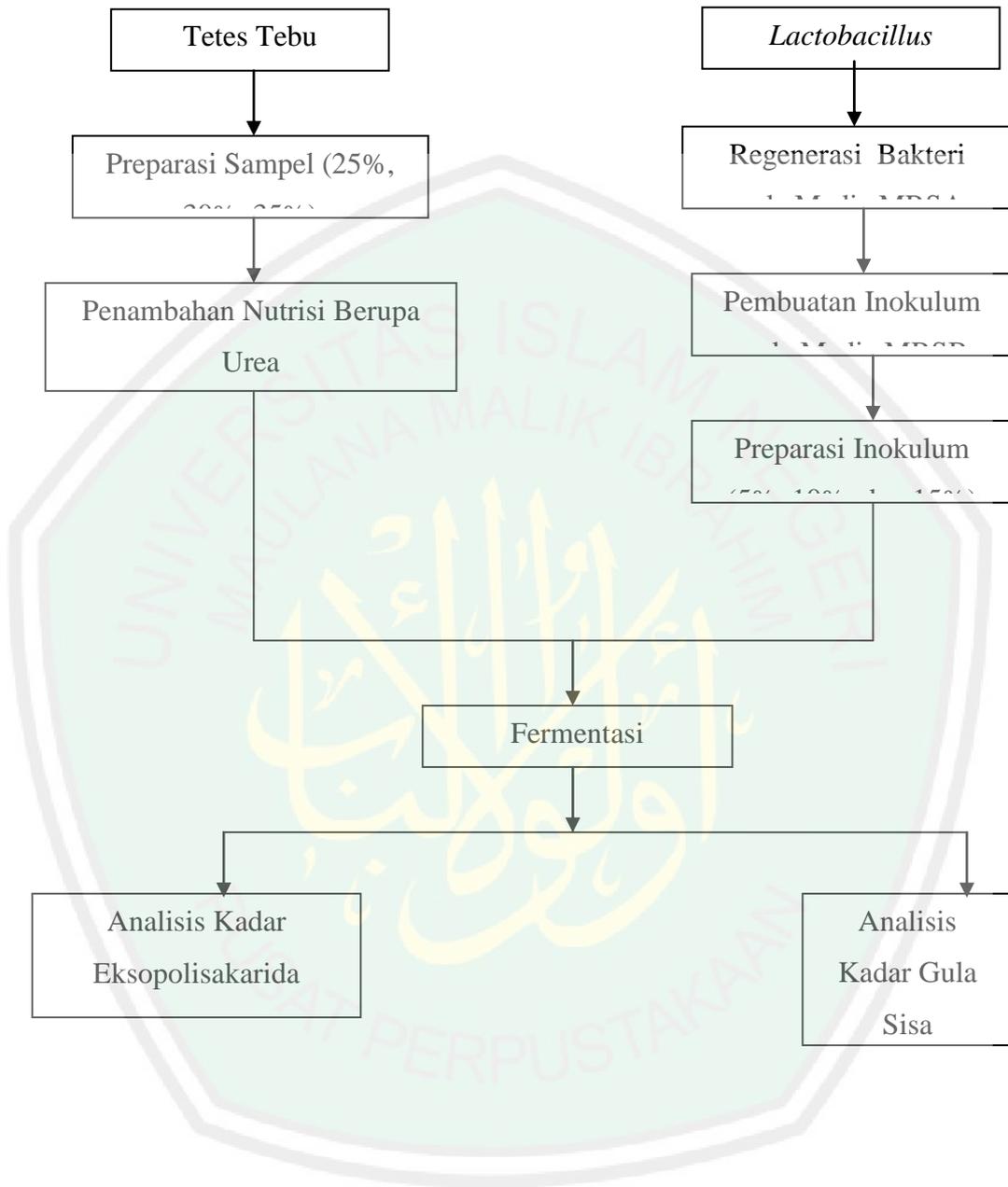
- Lehninger, A.L. (1997). Dasar-dasar biokimia jilid I. Jakarta: Erlangga
- Li, Yiting., Meng, Shili., Wang, Linbo., Wang, Yuepeng., Zu, Xiaoyan., Yang, Yingnan and Zhang, Zhenya. (2014). Antioxidative activity of exopolysaccharide extract from fermented wheat distillers' dried grains using UV-irradiation degradation pretreatment by *preussia aemulans*. *Advance Journal of Food Science and Technology* 6(9): 1067-1075
- Malik, I.N., Aryantini, Ni.P.D., Nursini, Ni.W., Cakrawati, C.I.D., Juliasari, and Ni L.M.E. (2012). Eksopolisakarida dari *Lactobacillus sp.* isolat susu kuda sumbawa dan potensinya sebagai prebiotik. *Jurnal Veteriner* 13 (2) 136-144
- Marshall, L.S and Stouvenel, A. R. (1995). Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis* subs *Lactis* isolated from sugar cane plants. *Journal Pontificia Universidad Catollica de Valparalso*. 9 (1). 32-37
- Martoyo, Theresia, E. S., Bambang dan Bachtiar. (1991). Diktat Analisis Kadar Gula Total dalam Tetes (Molase). *E- book* Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia. 46-57
- Narita, V. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* dan *Lactobacillus plantarum* dalam memproduksi gula. Jakarta: Gramedia Pustaka. 67-72
- Noerwasito, Suharjono, dan Novita. (2015). Pengaruh konsentrasi gula reduksi sari hati nanas dan inokulum *Saccharomyces cerevisiae* pada fermentasi etanol. *Jurnal teknologi Pertanian*. 2(1). 68-77
- Nudyanto, A dan Zubaidah, E. (2015). Isolasi bakteri asam laktat penghasil eksopolisakarida dari kimchi. *Jurnal Jurusan teknologi hasil pertanian, FTP Universitas Brawijaya Malang*. 3 (2). 743-748
- Pedrotti, F.L. (1993). Introduction to optics second edition. *Journal New Jersey: Prentice-Hall*. 3 (1). 44-47
- Prescott, S.C, and Dum, C.G. (1981). Industrial microbiology. *Journal New York: Mc Graw-Hill Book Co. Ltd*. 2 (1). 39-46
- Rofiq, A. (2012). Kajian variasi konsentrasi ragi tape dan waktu fermentasi limbah padat industri tapioka (onggok) menjadi bioetanol. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim
- Rover, M.R. (2013). Analysis of sugars and phenolic compound in bio-oil. *theses*. Iowa: Iowa State University
- Rustan, I.R. (2013). Studi isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat dari fermentasi cabai rawit (*Capsicum frutencens*). *Skripsi*. Makassar: Fakultas Pertanian Universitas Hasanuddin

- Santi, S.S. (2008). Pembuatan alkohol dengan proses fermentasi buah jambu mete oleh khamir *Saccharomyces cerevisiae*. *Jurnal Penelitian Ilmu Teknik*, 8(2),104-111
- Sarles. (1956). Effect of the operational condition on lactic acid production by *rhizopus oryzae*, *Cienc. Journal Tecnol. Alinment*. 2(3). 113-118
- Sastrohamidjojo. (2001). Spektroskopi. Jakarta: Liberty
- Shihab. (2012). Tafsir surah ar Rum. Diakses Tanggal 20 November 2013
- Socrates,W. (1988). *Instrumental Thecnique Mechanism and Identification Spechtrometry*. Food Technol. BioTechnol., 44: 163-172
- Sutherland I. W. (1998). Bacterial exopolysaccharides. <http://www.blackwell-synergy>. *Journal I*(1). 12-18
- Sutiah. (2008). Studi kualitas minyak goreng dengan parameter piskositas dan indeks bias. *Skripsi*. Semarang: FMIPA Universitas Diponegoro
- Tabucanon, L.V. (1998). Molasses general consideration molasses in animal nutrition. *Theses*. New York
- Tahid, F. (1994). Media, isolasi, sterilisasi, peremajaan, dan penyimpanan mikroba. PPT Diterbitkan
- Tallon, R.P., Bressollier, and Urdaci. (2006). Isolation and characterization of two uses. CRC Press, USA
- Thontowi, A., Kusmiati., dan Nuswantara, S. (2007). Produksi β -glukan *Saccharomyces cerevisiae* dalam media dengan sumber nitrogen berbeda pada air-lift fermentor. *Jurnal Biodiversitas Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI)*, 8(4) 253-256
- Tranggono dan Sutardi. (1990). Biokimia dan teknologi pasca panen. Yogyakarta: UGM Press
- Van hijum, Avishek M., and Arun G. (2002). Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian journal microbiology*, 52(1) 3–12
- Vargas, F.D. and Lopez. (2003). Natural colorants for food and nutraceutica. *I* (1). 28-36
- Volk, W.A. and Wheeler, M.F. (1988). Mikrobiologi dasar edisi kelima. Jakarta: Erlangga
- Vu, M.H. (2009). The chemistry of rancidity in foods in J.C. Allen and R. J. Hamilton, editor. Rancidity in Foods. London : *Applied Science Publisher*

- Wang, Kun., Li,Wei., Rui, Xin., Chen, Xiaohong., Jiang, Mei., and Mingsheng. (2014). Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. *International Journal of Biological Macromolecules*. 6 (3) 133– 139
- Wanto, E. P. dan Soebagyo. (1980). Dasar-dasar mikrobiologi industri. Jakarta: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan RI
- Winarno, F.G. (1994). Sterilisasi komersial produk pangan. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 180-186
- Witono, F.G. (1980). *Enzim Pangan.e-book*. Bogor: Pusbangtepa
- Zubaidah, E., Liasari, Y., dan Saparianti, E. (2008). Produksi eksopolisakarida oleh *Lactobacillus plantarum* B2 pada produk probiotik berbasis buah murbei. *Jurnal Teknologi Pertanian* . 9(1) 59 – 68.



Lampiran 1. Rancangan Penelitian



Lampiran 2. Skema Kerja

➤ Pembuatan Media

- Media MRSA (*Man, Rogosa and Sharpe Agar*)

MRSA (*Man, Rogosa and Sharpe Agar*)

- Ditimbang 6,82 gr
- Dilarutkan dengan 100 mL aquades
- Dipanaskan sampai mendidih dan diaduk
- Dimasukkan kedalam erlenmeyer 250 mL
- Disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121 °C, tekanan 15 psi selama 15 menit
- Didinginkan dalam keadaan miring

Hasil

- Media MRSB (*Man, Rogosa and Sharpe Broth*)

MRSB (*Man, Rogosa and Sharpe Broth*)

- Ditimbang 5,515 gr
- Dilarutkan dengan 100 mL aquades
- Dipanaskan sampai mendidih dan diaduk
- Dimasukkan kedalam erlenmeyer 250 mL
- Disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121 °C, tekanan 15 psi selama 15 menit
- Didinginkan

Hasil

➤ **Regenerasi *Lactobacillus plantarum***

Lactobacillus plantarum

- Diambil 2 ose
- Digoreskan pada media MRSA miring
- Diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang

Hasil

➤ **Pembuatan Inokulum**

Lactobacillus plantarum

- Diambil 2 ose
- Dipindahkan kedalam 100 mL media MRSB dan ditutup dengan kapas
- Dishaker dengan kecepatan 150 rpm selama 18 jam sampai fase stasioner pada suhu 35⁰C

Inokulum

➤ **Preparasi Tetes tebu Untuk Fermentasi**

Tetes tebu

- Diukur brix awal
- Diencerkan 20 brix
- Ditambahkan urea sebanyak 3 g/L
- Diambil sesuai dengan variasi konsentrasi molase yang dibutuhkan ketika fermentasi yaitu 25%, 30% dan 35%
- disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121⁰C selama 2 jam

Hasil

➤ **Uji Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Inokulum Terhadap Produksi Ekspolisakarida dari Tetes tebu oleh *Lactobacillus plantarum***

Tetes tebu dengan Substrat 25, 30, dan 35%

- Ditambahkan inokulum *Lactobacillus plantarum* dengan konsentrasi 5%, 10% dan 15%
- Ditungkup dengan kapas
- Diinkubasi selama 48 jam sambil *dishaker* dengan kecepatan 120 rpm
- Dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali

Hasil

➤ **Pembakuan NaOH 0,1 N**

Larutan NaOH 0,1 N 5 ml

- Ditambahkan indikator pp sebanyak 1-3 tetes
- Dititrasi dengan $H_2C_2O_4$ 0,1 N

Hasil

➤ **Pengukuran Brix**

Tetes

- Diambil 3 tetes
- Dimasukkan dalam alat *Hand Brix Refraktometer*
- Diamati dengan cermat batas tajam antara garis terang dan gelap tepat pada titik potong sumbunya (tidak boleh terlihat garis pelangi diantaranya)

Hasil

➤ **Pembuatan Kurva Glukosa dengan Metode Sulfat fenol (Dubois dkk., 1956)**

Larutan glukosa 10, 20, 30, 40,
50, dan 60 ppm

- Diambil masing-masing sebanyak 2 mL
- Dimasukkan dalam tabung reaksi
- Ditambahkan 1 mL larutan fenol 5%
- Dikocok
- Ditambah 5 ml H₂SO₄ p.a
- Didiamkan selama 10 menit
- Dimasukkan dalam penangas air yang bersuhu 100 °C selama 15 menit
- Didinginkan
- Dipindahkan dalam kuvet
- Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 485 nm menggunakan *spectrofotometer UV-Vis*

Hasil

➤ **Analisa Kadar Total Gula dengan Metode Sulfat fenol (Dubois dkk., 1956)**

Tetes

- Diambil masing-masing sebanyak 2 mL
- Dimasukkan dalam tabung reaksi
- Ditambahkan 1 mL larutan fenol 5%
- Dikocok
- Ditambahkan 5 ml H₂SO₄ p.a
- Didiamkan selama 10 menit
- Dimasukkan dalam penangas air yang bersuhu 100 °C selama 15 menit
- Didinginkan

- Dipindahkan dalam kuvet
- diukur absorbansinya pada panjang gelombang 485 nm menggunakan *spectrofotometer UV-Vis*

Hasil

➤ **Perhitungan Jumlah Sel Bakteri (Harmita, et al, 2008)**

NaCl 0,9%

- Dimasukkan kedalam 10 tabung reaksi dengan volume masing-masing 9 ml
- Ditambahkan inokulum bakteri sebanyak 1 ml pada tabung pertama dan dikocok
- Dipipet larutan dalam tabung 1 sebanyak 1 ml
- Dimasukkan dalam tabung 2
- Dilakukan perlakuan yang sama sampai tabung ke 10
- Dihitung jumlah total bakteri dengan metode *total plate count (TPC)*

Hasil

Lampiran 3. Pembuatan Larutan

1. Pembuatan Larutan NaOH 0,1 N

$$N = M \times \text{Valensi}$$

$$M = \frac{\text{mol}}{V}$$

$$\text{mol} = \frac{m}{M_r}$$

$$N = \frac{m/M_r}{V}$$

$$0,1 \text{ N} = \frac{m/40}{0,25\text{L}}$$

$$0,1 \text{ N} = \frac{m \times 4}{40}$$

$$m = 1 \text{ gr}$$

Ket : m : Massa NaOH

Mr : Massa relative NaOH (40 gr/mol)

Cara pembuatan : Ditimbang 1 gram NaOH dan dimasukkan kedalam beaker glass 100 ml kemudian ditambah dengan aquades secukupnya sampai NaOH larut, selanjutnya dimasukkan larutan kedalam labu ukur 250 ml, ditandabatkan dan dihomogenkan.

2. Pembuatan Larutan H₂C₂O₄ 0,1 N

$$N = M \times \text{Valensi}$$

$$M = \frac{\text{mol}}{V}$$

$$\text{mol} = \frac{m}{M_r}$$

$$N = \frac{m/M_r}{V} \times \text{Valensi}$$

$$0,1 \text{ N} = \frac{m/126}{0,1\text{L}} \times 2$$

$$0,1 \text{ N} = \frac{m \times 10}{126} \times 2$$

$$m = 0,63 \text{ gram}$$

3. Pembuatan Larutan NaCl 0,9 %

Cara Pembuatan : Larutan NaCl 0,9% dibuat dengan menimbang sebanyak 0,9 gram NaCl dan dilarutkan dengan aquades sampai 100 ml

4. Pembuatan Larutan Fenol 5%

Cara Pembuatan : Larutan fenol 5% dibuat dengan menimbang sebanyak 5 gram fenol dan dilarutkan dengan aquades sampai 100 ml.

Lampiran 4. Kurva Standar Glukosa

1. Pembuatan Konsentrasi Glukosa Standart 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 mg/L (ppm)

$$\begin{aligned} \text{Stok glukosa baku} &= m/V \\ &= \frac{50 \text{ mg glukosa}}{0,05 \text{ L}} = 1000 \text{ ppm} \end{aligned}$$

Cara pembuatan larutan stok 1000 ppm : Ditimbang glukosa sebanyak 50 mg, kemudian dimasukkan kedalam beaker glass, selanjutnya ditambahkan dengan aquades secukupnya sampai glukosa larut. Selanjutnya larutan dimasukkan kedalam labu ukur 50 ml, kemudian ditandabatkan dan dihomogenkan. Larutan ini akan digunakan sebagai larutan stok untuk pembuatan larutan glukosa standart.

Pembuatan larutan glukosa standar 10, 20, 30, 40, 60, dan 80 ppm dapat dilakukan dengan pengenceran larutan stok glukosa baku. Pembuatan larutan glukosa tersebut dapat dilakukan sebagai berikut :

- a. Konsentrasi 10 ppm :

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ V_1 \times 1000 \text{ ppm} &= 10 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL} \\ V_1 &= 1 \text{ mL} \end{aligned}$$

- b. Konsentrasi 20 ppm :

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ V_1 \times 1000 \text{ ppm} &= 20 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL} \\ V_1 &= 2 \text{ mL} \end{aligned}$$

- c. Konsentrasi 30 ppm :

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ V_1 \times 1000 \text{ ppm} &= 30 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL} \\ V_1 &= 3 \text{ mL} \end{aligned}$$

- d. Konsentrasi 40 ppm :

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ V_1 \times 1000 \text{ ppm} &= 40 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL} \\ V_1 &= 4 \text{ mL} \end{aligned}$$

- e. Konsentrasi 50 ppm :

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ V_1 \times 1000 \text{ ppm} &= 50 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$V1 = 5 \text{ mL}$$

f. Konsentrasi 60 ppm :

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

$$V1 \times 1000 \text{ ppm} = 60 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

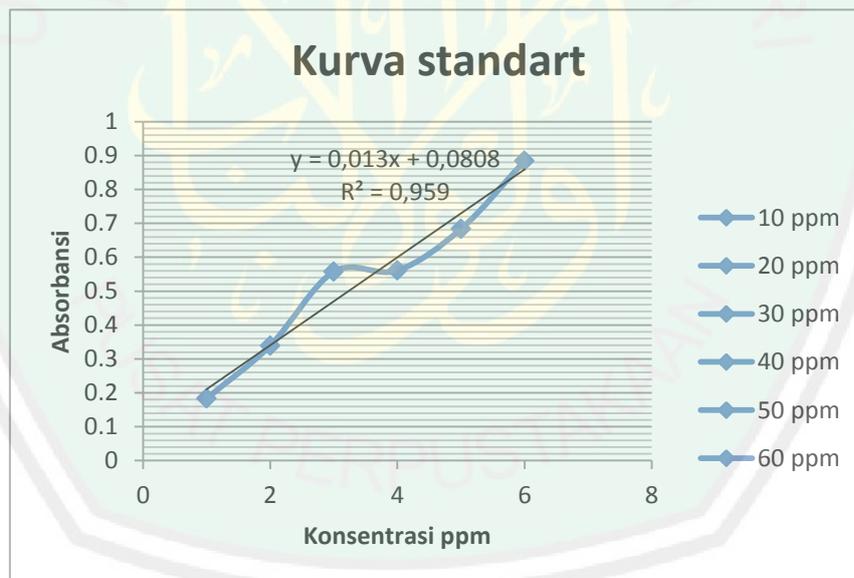
$$V1 = 6 \text{ mL}$$

2. Kurva Standar Glukosa

Tabel Data Absorbansi Glukosa

Konsentrasi	Absorbansi
10 ppm	0,1836
20 ppm	0,3394
30 ppm	0,5573
40 ppm	0,5609
50 ppm	0,6836
60 ppm	0,8846

Gambar Kurva standart glukosa



Lampiran 5. Kadar Gula Metode Sulfat Fenol

1. Analisis Kadar Gula Bahan Baku

Kadar gula total bahan baku molase dianalisis menggunakan metode Sulfat Fenol dan diukur absorbansinya dengan Spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 485 nm. Perolehan absorbansi diplotkan ke dalam persamaan linier kurva standart glukosa yaitu $y = 0,013x + 0,0808$ dengan ($y =$ absorbansi) dan x merupakan variable yang dicari yakni kadar total glukosa bahan baku, sedangkan faktor pengenceran 10000 :

$$y = 0.013 X + 0.0808$$

$$0,6167 - 0,0808 = 0,013 X$$

$$0,5315 = 0,013 X$$

$$X = 41,22 \text{ ppm (Konsentrasi berdasarkan kurva)}$$

$$\text{Konsentrasi analisa} = 1 \text{ gr}/100 \text{ ml}$$

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

$$= 10000 \text{ ppm}$$

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

$$\text{Kadar gula (\%)} = \frac{41,22 \times 100 \times 100\%}{10000}$$

$$\text{Kadar gula (\%)} = 41,22\%$$

Data absorbansi dan kadar gula bahan baku dapat dilihat pada Tabel:

Tabel Absorbansi bahan baku

Perlakuan	Hasil Absorbansi			Kadar (%)			Total (%)	Rata-rata (%)
	UI 1	UI 2	UI 3	UI 1	UI 2	UI 3		
Bahan baku	0,6167	0,5069	0,6024	41,2	38,9	40,1	120,2	40,06

2. Analisis Kadar gula Awal Sebelum Fermentasi

Analisis kadar total gula sampel sebelum fermentasi dilakukan setelah proses pengenceran molase menjadi 25%, 30%, dan 35% (v/v) substrat. Hasil absorbansi sampel dapat dilihat pada Tabel:

Tabel Absorbansi sampel sebelum fermentasi

Perlakuan	Hasil Absorbansi		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
25% (v/v)	0,2768	0,3768	0,3258
30% (v/v)	0,3120	0,4015	0,4127
35% (v/v)	0,3857	0,4525	0,4873

Perolehan absorbansi selanjutnya diplotkan ke dalam persamaan linier kurva standart glukosa yaitu $y = 0,013x + 0,0808$ dengan ($y =$ absorbansi) dan x merupakan variable yang dicari yakni kadar total glukosa sebelum fermentasi, konsentrasi molase 25%, 30 % dan 35 % memakai faktor pengenceran (fp) sebesar memakai faktor pengenceran 10000 :

$$y = 0,013 X + 0,0808$$

$$0,2768 - 0,0808 = 0,013 X$$

$$0,196 = 0,013 X$$

$$X = 15,07 \text{ (Konsentrasi berdasarkan kurva)}$$

$$\text{Konsentrasi analisa} = 1 \text{ gr}/100 \text{ ml}$$

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

$$= 10000 \text{ ppm}$$

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

$$\text{Kadar gula (\%)} = \frac{15,07 \times 1000 \times 100\%}{10000}$$

$$\text{Kadar gula (\%)} = 15,07\%$$

Kadar total gula sebelum fermentasi dapat dilihat pada Tabel :

Perlakuan	Kadar Gula (%)		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
25 %(v/v)	15,07	22,28	18,84
30 %(v/v)	17,78	24,66	25,53
35 %(v/v)	23,45	28,59	31,26

3. Analisis Kadar Gula Setelah Fermentasi

Data absorbansi total gula setelah fermentasi dapat dilihat pada Tabel :

Perlakuan	Hasil Absorbansi		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
S1I1	0,1979	0,1825	0,1875
S1I2	0,2114	0,1986	0,2013
S1I3	0,2151	0,2206	0,2154
S2I1	0,1989	0,1994	0,1905
S2I2	0,2004	0,2018	0,2116
S2I3	0,2132	0,2112	0,2472
S3I1	0,1999	0,1432	0,2002
S3I2	0,2065	0,1988	0,2165
S3I3	0,2147	0,2145	0,2347

Perolehan absorbansi selanjutnya diplotkan ke dalam persamaan linier kurva standart glukosa yaitu $y = 0,013x + 0,0808$ dengan ($y =$ absorbansi) dan x merupakan variable yang dicari yakni kadar total glukosa setelah fermentasi :

$$y = 0,013 X + 0,0808$$

$$0,1979 - 0,0808 = 0,013 X$$

$$0,1171 = 0,013 X$$

$$X = 9,00x \text{ fp}$$

$$X = 9,00 \times 1000 = 10530 \text{ ppm}$$

Kadar total gula setelah fermentasi dapat dilihat pada Tabel :

Tabel Kadar total gula setelah fermentasi

Perlakuan	Kadar Gula (%)		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
S1I1	0,90	0,48	0,82
S1I2	0,90	0,78	0,84
S1I3	0,91	0,90	0,91
S2I1	0,92	0,90	0,92
S2I2	0,96	0,91	1,00
S2I3	1,00	0,93	1,03
S3I1	1,03	1,00	1,04
S3I2	1,01	1,02	1,18
S3I3	1,55	1,07	1,20

4. Analisis Kadar Gula Terpakai Pada Proses Fermentasi

Analisis kadar gula setelah fermentasi dapat diketahui dari pengurangan kadar total gula awal sebelum fermentasi dengan kadar gula setelah fermentasi. Perolehan kadar gula yang terpakai pada proses fermentasi ditunjukkan pada Tabel dibawah ini :

Tabel Kadar gula terpakai pada proses fermentasi ulangan I

Perlakuan	Kadar Gula Sebelum Fermentasi (%)	Kadar Gula Sesudah Fermentasi (%)	Kadar Gula Terpakai (%)
S1I1	15,07	0,90	14,17
S1I2	15,07	0,90	14,17
S1I3	15,07	0,91	14,16
S2I1	17,78	0,92	16,86
S2I2	17,78	0,96	16,82
S2I3	17,78	1,00	16,78
S3I1	23,45	1,03	22,42
S3I2	23,45	1,01	22,44
S3I3	23,45	1,55	21,9

Tabel Kadar gula terpakai pada proses fermentasi ulangan 2

Perlakuan	Kadar Gula Sebelum Fermentasi (%)	Kadar Gula Sesudah Fermentasi (%)	Kadar Gula Terpakai (%)
S1I1	22,28	0,48	21,8
S1I2	22,28	0,78	21,5
S1I3	22,28	0,90	21,38
S2I1	24,66	0,90	23,76
S2I2	24,66	0,91	23,55
S2I3	24,66	0,93	23,73
S3I1	28,59	1,00	27,59
S3I2	28,59	1,02	27,57
S3I3	28,59	1,07	27,52

Tabel Kadar gula terpakai pada proses fermentasi ulangan 3

Perlakuan	Kadar Gula Sebelum Fermentasi (%)	Kadar Gula Sesudah Fermentasi (%)	Kadar Gula Terpakai (%)
S1I1	18,84	0,82	18,02
S1I2	18,84	0,84	18
S1I3	18,84	0,91	17,93
S2I1	25,53	0,92	24,61
S2I2	25,53	1,00	24,53
S2I3	25,53	1,03	24,5
S3I1	31,26	1,04	30,22
S3I2	31,26	1,18	30,08
S3I3	31,26	1,20	30,06

Tabel Kadar gula terpakai rata-rata

Perlakuan	Ulangan 1 (%)	Ulangan 2 (%)	Ulangan 3 (%)	Jumlah (%)	Rata-rata (%)
S1I1	14,17	21,8	18,02	53,99	17,99
S1I2	14,17	21,5	18	53,67	17,89
S1I3	14,16	21,38	17,93	53,47	17,83
S2I1	16,86	23,76	24,61	65,23	21,74
S2I2	16,82	23,55	24,53	64,9	21,63
S2I3	16,78	23,73	24,5	65,01	21,67
S3I1	22,42	27,59	30,22	80,23	20,05
S3I2	22,44	27,57	30,08	80,09	26,69
S3I3	21,9	27,52	30,06	79,48	26,49

Lampiran 6. Analisis Kadar Eksopolisakarida

1. Analisis kadar eksopolisakarida

Analisis kadar eksopolisakarida dilakukan untuk mengetahui berapa mg hasil eksopolisakarida.

Tabel kadar eksopolisakarida

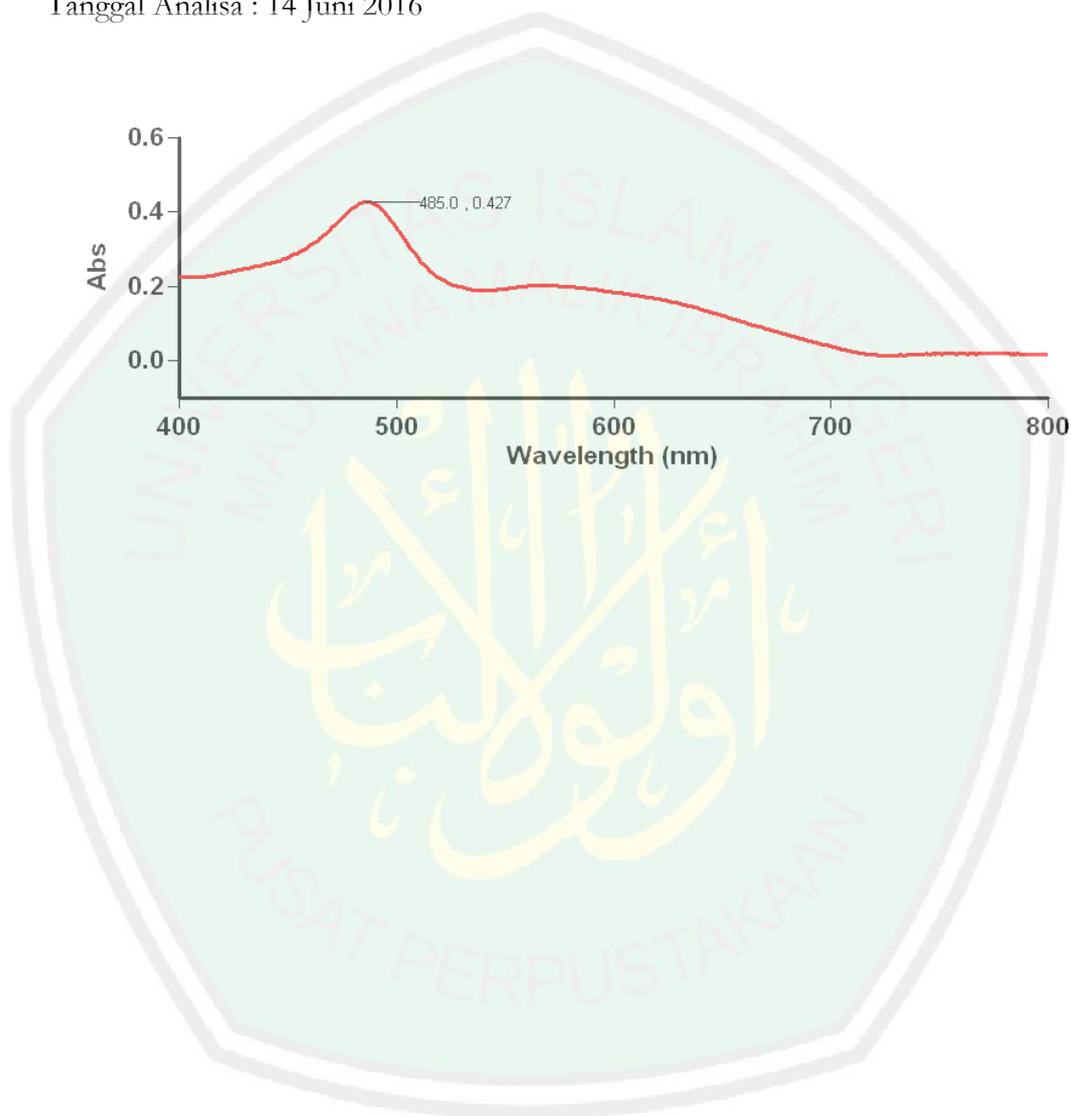
Perlakuan	Eksopolisakarida			Total	Rata-rata
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III		
S1I1	2,660	2,324	1,988	6,972	2,324
S1I2	2,924	3,132	2,136	8,192	2,730
S1I3	2,432	1,968	1,112	5,512	1,873
S2I1	3,500	2,448	2,640	8,588	2,862
S2I2	2,608	2,460	3,304	8,372	2,790
S2I3	2,424	2,148	1,920	6,492	2,164
S3I1	2,156	2,888	3,384	8,428	2,809
S3I2	3,120	3,144	2,188	8,452	2,817
S3I3	2,220	2,424	2,256	6,90	2,300

Lampiran 7. Data Analisis Spektrofotometer Uv-Vis

1. Data Analisis Spektrofotometer Uv-Vis

Lamdha Maks

Tanggal Analisa : 14 Juni 2016



Lampiran 8. Data Two Way ANOVA

1. Analisis Kadar Gula Terpakai

```
UNIANOVA kadar_gula_terpakai BY konsentrasi_substrat konsentrasi_inokulum
/METHOD=SSTYPE(3)
/INTERCEPT=INCLUDE
/POSTHOC=konsentrasi_substrat konsentrasi_inokulum(TUKEY LSD)
/CRITERIA=ALPHA(0.05)

/DESIGN=konsentrasi_substrat konsentrasi_inokulum konsentrasi_substrat*
konsentrasi_inokulum.
```

Univariate Analysis of Variance

[DataSet1] J:\spss masukkan data.sav

Between-Subjects Factors

		N
konsentrasi_substrat	25.00	25
	30.00	25
	35.00	25
konsentrasi_inokulum	5.00	22
	10.00	22
	15.00	22

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:kadar_gula_terpakai

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	318.640 ^a	11	28.967	5.744	.000
Intercept	2132.285	1	2132.285	422.832	.000
konsentrasi_substrat	308.683	2	154.342	30.606	.000
konsentrasi_inokulum	2.387	3	.796	.158	.924
konsentrasi_substrat * konsentrasi_inokulum	7.569	6	1.262	.250	.954
Error	121.029	24	5.043		
Total	2571.953	36			
Corrected Total	439.669	35			

a. R Squared = .725 (Adjusted R Squared = .599)

Post Hoc Tests

konsentrasi_substrat

Multiple Comparisons

Dependent Variable:kadar_gula_terpakai

	(I)	(J)	Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Difference (I-J)	Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	konsentra si_substrat t	25.00	30.00	-4.0325*	.91678	.001	-6.3220	-1.7430
		35.00	-7.1533*	.91678	.000	-9.4428	-4.8639	
	30.00	25.00	4.0325*	.91678	.001	1.7430	6.3220	
	35.00	-3.1208*	.91678	.006	-5.4103	-.8314		
	35.00	25.00	7.1533*	.91678	.000	4.8639	9.4428	
	30.00	3.1208*	.91678	.006	.8314	5.4103		
LSD	konsentra si_substrat t	25.00	30.00	-4.0325*	.91678	.000	-5.9246	-2.1404
		35.00	-7.1533*	.91678	.000	-9.0455	-5.2612	
	30.00	25.00	4.0325*	.91678	.000	2.1404	5.9246	
	35.00	-3.1208*	.91678	.002	-5.0130	-1.2287		
	35.00	25.00	7.1533*	.91678	.000	5.2612	9.0455	
	30.00	3.1208*	.91678	.002	1.2287	5.0130		

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 5.043.

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

kadar_gula_terpakai

	konsentra si_substrat t	N	Subset		
			1	2	3
Tukey HSD ^a	25.00	25	22.3160		
	30.00	25		24.7589	
	35.00	25			27.476
	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) = 5.043.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12.000.

konsentrasi_inokulum

Multiple Comparisons

Dependent Variable:kadar_gula_terpakai

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	5.00	5.00	.0600	1.05860	1.000	-2.8603	2.9803
		10.00	-.0256	1.05860	1.000	-2.9458	2.8947
		15.00	-.5789	1.05860	.947	-3.4992	2.3414
	10.00	5.00	.0856	1.05860	1.000	-2.8347	3.0058
		10.00	.0256	1.05860	1.000	-2.8947	2.9458
		15.00	-.5533	1.05860	.953	-3.4736	2.3669
	15.00	5.00	.6389	1.05860	.930	-2.2814	3.5592
		10.00	.5789	1.05860	.947	-2.3414	3.4992
		1.00	.5533	1.05860	.953	-2.3669	3.4736
LSD	5.00	2.50	.0600	1.05860	.955	-2.1248	2.2448
		10.00	-.0256	1.05860	.981	-2.2104	2.1593
		15.00	-.5789	1.05860	.590	-2.7637	1.6060
	10.00	2.50	.0856	1.05860	.936	-2.0993	2.2704
		5.00	.0256	1.05860	.981	-2.1593	2.2104
		15.00	-.5533	1.05860	.606	-2.7382	1.6315
	15.00	2.50	.6389	1.05860	.552	-1.5460	2.8237
		5.00	.5789	1.05860	.590	-1.6060	2.7637
		10.00	.5533	1.05860	.606	-1.6315	2.7382

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 5.043.

Homogeneous Subsets

kadar_gula_terpakai			
	konsentra si_inokulu m	N	Subset 1
Tukey HSD	5.00	9	7.5600
	10.00	9	7.5856
	15.00	9	8.1389
	Sig.		.930

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 5.043.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

2. Analisis Kadar Eksopolisakarida

```
UNIANOVA kadar_eksopolisakarida BY konsentrasi_substrat konsentrasi_inokulum
/METHOD=SSTYPE(3)
/INTERCEPT=INCLUDE
/POSTHOC=konsentrasi_substrat konsentrasi_inokulum(TUKEY LSD)
/CRITERIA=ALPHA(0.05)

/DESIGN=konsentrasi_substrat konsentrasi_inokulum konsentrasi_substrat*
konsentrasi_inokulum.
```

Univariate Analysis of Variance

[DataSet1] J:\spss masukkan data.sav

Between-Subjects Factors		
		N
konsentrasi_substrat	25.00	25
	30.00	25
	35.00	25
konsentrasi_inokulum	5.00	22
	10.00	22

15.00	22
-------	----

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:kadar_eksopolisakarida

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	190.543 ^a	11	17.322	26.972	.000
Intercept	985.123	1	985.123	1.534E3	.000
konsentrasi_substrat	175.393	2	87.697	136.552	.000
konsentrasi_inokulum	8.617	3	2.872	4.473	.012
konsentrasi_substrat * konsentrasi_inokulum	6.533	6	1.089	1.695	.165
Error	15.413	24	.642		
Total	1191.079	36			
Corrected Total	205.956	35			

a. R Squared = .925 (Adjusted R Squared = .891)

Post Hoc Tests

konsentrasi_substrat

Multiple Comparisons

Dependent Variable:kadar eksopolisakarida

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	konsentra si_substrat t	konsentra si_substrat t	-2.1275 [*]	.32717	.000	-2.9445	-1.3105
		35.00	-5.3683 [*]	.32717	.000	-6.1854	-4.5513
	30.00	25.00	2.1275 [*]	.32717	.000	1.3105	2.9445
		35.00	-3.2408 [*]	.32717	.000	-4.0579	-2.4238
	35.00	25.00	5.3683 [*]	.32717	.000	4.5513	6.1854
		30.00	3.2408 [*]	.32717	.000	2.4238	4.0579
LSD	25.00	30.00	-2.1275 [*]	.32717	.000	-2.8027	-1.4523

	35.00		-5.3683*	.32717	.000	-6.0436	-4.6931
	30.00	25.00	2.1275*	.32717	.000	1.4523	2.8027
		35.00	-3.2408*	.32717	.000	-3.9161	-2.5656
	35.00	25.00	5.3683*	.32717	.000	4.6931	6.0436
		30.00	3.2408*	.32717	.000	2.5656	3.9161

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .642.

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

kadar_eksopolisakarida

	konsentra si_substrat	N	Subset		
			1	2	3
Tukey HSD ^a	25.00	25	2,3240		
	30.00	25		4,6820	
	35.00	25			7,4760
	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) = .642.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12.000.

konsentrasi_inokulum

Multiple Comparisons

Dependent Variable:kadar_eksopolisakarida

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	5.00	5.00	.5844	.37778	.426	-.4577	1.6266
		10.00	-.4956	.37778	.565	-1.5377	.5466
		15.00	-.6756	.37778	.303	-1.7177	.3666

	10.00	5.00	1.0800*	.37778	.040	.0379	2.1221
		10.00	.4956	.37778	.565	-.5466	1.5377
		15.00	-.1800	.37778	.964	-1.2221	.8621
	15.00	5.00	1.2600*	.37778	.014	.2179	2.3021
		10.00	.6756	.37778	.303	-.3666	1.7177
		15.00	.1800	.37778	.964	-.8621	1.2221
LSD	5.00	5.00	.5844	.37778	.135	-.1953	1.3641
		10.00	-.4956	.37778	.202	-1.2753	.2841
		15.00	-.6756	.37778	.086	-1.4553	.1041
	10.00	5.00	1.0800*	.37778	.009	.3003	1.8597
		10.00	.4956	.37778	.202	-.2841	1.2753
		15.00	-.1800	.37778	.638	-.9597	.5997
	15.00	5.00	1.2600*	.37778	.003	.4803	2.0397
		10.00	.6756	.37778	.086	-.1041	1.4553
		15.00	.1800	.37778	.638	-.5997	.9597

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .642.

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

Kadar eksopolisakarida

	konsentra si_inokulu m	N	Subset	
			1	2
Tukey HSD ^a	5.00	9	5.0844	5.0844
	10.00	9		5.5800
	15.00	9		5.7600
	Sig.		.426	.303

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .642.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

Lampiran 9. Perhitungan Jumlah Total Bakteri

1. Ulangan 1

Pengenceran	Jumlah Koloni
10^{-3}	Sprider
10^{-4}	Sprider
10^{-5}	Sprider
10^{-6}	Sprider
10^{-7}	298
10^{-8}	69
10^{-9}	27
10^{-10}	10

$$\begin{aligned}
 \text{Perhitungan jumlah bakteri} &= \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{fp} cfu \\
 &= 298 \times \frac{1}{10^{-7}} cfu \\
 &= 298 \times 10^7 cfu \\
 &= 2,98 \times 10^9 cfu
 \end{aligned}$$

2. Ulangan 2

Pengenceran	Jumlah Koloni
10^{-3}	Sprider
10^{-4}	Sprider
10^{-5}	Sprider
10^{-6}	Sprider
10^{-7}	294
10^{-8}	125
10^{-9}	60
10^{-10}	8

$$\begin{aligned}
 \text{Perhitungan jumlah bakteri} &= \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{fp} cfu \\
 &= 294 \times \frac{1}{10^{-7}} cfu \\
 &= 294 \times 10^7 cfu \\
 &= 2,94 \times 10^9 cfu
 \end{aligned}$$

3. Ulangan 3

Pengenceran	Jumlah Koloni
10^{-3}	Sprider
10^{-4}	Sprider
10^{-5}	Sprider
10^{-6}	>300
10^{-7}	257
10^{-8}	109
10^{-9}	30
10^{-10}	6

Perhitungan jumlah bakteri

$$\begin{aligned}
 &= \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{fp} cfu \\
 &= 257 \times \frac{1}{10^{-7}} cfu \\
 &= 257 \times 10^7 cfu \\
 &= 2,57 \times 10^9 cfu
 \end{aligned}$$

Lampiran 10. Dokumentasi Penelitian



Gambar 10.1 Pembuatan MRSB



Gambar 10.2 Preparasi Tetes Tebu



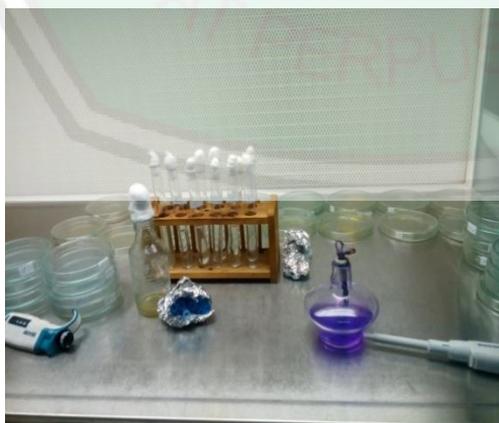
Gambar 10.3 Larutan Standar Glukosa



Gambar 10.4 Sterilisasi



Gambar 10.5 Fermentasi



Gambar 10.6 TPC



Gambar 10.7 Ekspolisakarida





KEMENTERIAN AGAMA RI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MALIKI MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

JURUSAN KIMIA

Gedung Sains dan Teknologi UIN Malang Lt.2 Jl. Gajayana 50 Malang Telp./Fax +62341558933
www.uin-malang.ac.id Email: info@uin-malang.ac.id, kimia@uin-malang.ac.id

KARTU KONSULTASI PENELITIAN

Nama : Aulin Risyda Fahma
NIM : 12630064
Judul Skripsi : Pengaruh konsentrasi substrat dan inokulum terhadap produksi etanolisitas dari tetes tebu oleh *Lactobacillus plantarum* dan identifikasi dengan FTIR
Pembimbing Utama : Akyunul Jannah, S.Si, M.P.
Pembimbing Agama : A. Hanafi, M.Sc.
Konsultan : Anik Maunaha, S.T, M.P.

No	Tanggal	Materi Konsultasi	Caraan/ditulis tangan	Handa tangan (Pembimbing)
1.	21-12-15	• Kerangka berpikir • Rancangan penelitian	• Perbaiki redaksinya, Enote • Buat sistematis	Anik
2.	23-12-15	• BAB III (metode) • BAB I	• Perbanyak referensi jurnal internasional	Anik
3.	05-02-16	• BAB I	• Perubahan variabel • perbanyak literatur	Anik
4.	12-02-16	• BAB I	• Perbaiki redaksi • Cari jurnal platform dan sumber berbeda	Anik
5.	12-02-16	• Jurnal	• Perbanyak jurnal untuk alternatif	Anik
6.	24-02-16	• BAB I dan BAB III	• BAB I fokuskan pada produk • BAB III peritelar HPLC	Anik
7.	29-02-16	• BAB I dan BAB III	• BAB I rumusan masalah • BAB III Menyesuaikan hasil swai	Anik
8.	10-03-16	• BAB I dan BAB III	• BAB III rumus perhitungan • rumus kombinasi perlakuan variabel	Anik
9.	11-03-16	• BAB I, II, III	• BAB III rancangan penelitian • Bab analisis data • BAB II - faktor mempengaruhi	Anik
10.	14-03-16	BAB I, II, III	revisi La tab Bkg metode	Anik
11.	15-03-16	BAB I dan BAB III	• Revisi BAB I dan BAB II	Anik
12.	16-03-16	BAB I, II, III	ok	Anik
13.	16-03-16	Acc proposal		Anik
14.	16-03-16	Acc proposal		Anik



Kepuasan Spiritual, Keagamaan, Akhlak, Keahlian Ilmu dan Keterampilan Profesional