

**ISOLASI, PURIFIKASI, DAN ANALISA STRUKTUR
BIOPOLIMER FRUKTAN
DARI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL EKSOPOLISAKARIDA
DENGAN SPEKTROSKOPI RESONANSI MAGNET INTI**

CAROLINE

0305050116



**DEPARTEMEN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS INDONESIA**

2010

**ISOLASI, PURIFIKASI, DAN ANALISA STRUKTUR
BIOPOLIMER FRUKTAN
DARI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL EKSOPOLISAKARIDA
DENGAN SPEKTROSKOPI RESONANSI MAGNET INTI**

**Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi**

Oleh :

CAROLINE

0305050116



DEPOK

2010

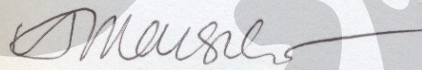
SKRIPSI : ISOLASI, PURIFIKASI, DAN ANALISA STRUKTUR
BIOPOLIMER FRUKTAN DARI BAKTERI ASAM
LAKTAT PENGHASIL EKSPOLISAKARIDA DENGAN
SPEKTROSKOPI RESONANSI MAGNET INTI

NAMA : CAROLINE

NPM : 0305050116

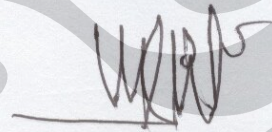
SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JANUARI 2010



Dr. AMARILA MALIK, MSi

PEMBIMBING I



Dr. M. HANAFI

PEMBIMBING II

Tanggal Lulus Ujian Sarjana: 11 Januari 2010

Penguji I : Dra. Juheini Amin, MS

Penguji II : Dra. Azizahwati, MS

Penguji III: Dr. Herman Suryadi, MS



Your word is a lamp to guide my feet and a light for my path.
Psalm 119: 105

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kepada Tuhan Yesus Kristus atas segala berkat, rahmat, anugerah, dan penyertaan-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Skripsi yang berjudul Isolasi, Purifikasi, dan Analisa Struktur Biopolimer Fruktan dari Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida dengan Spektroskopi Resonansi Magnet Inti ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih dan rasa hormat kepada:

1. Ibu Dr. Amarila Malik, MSi., selaku Pembimbing Pertama dan Pembimbing Akademik, yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk melakukan penelitian ini, serta memberikan bimbingan, saran, pengarahan, pengetahuan, dan bantuan baik moril maupun materil selama pendidikan, penelitian, hingga tersusunnya skripsi ini.
2. Bapak Dr. M. Hanafi, selaku Pembimbing Kedua, yang juga telah memberikan bimbingan, saran, dan bantuan selama penelitian hingga tersusunnya skripsi ini.
3. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS, Apt., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
4. Ibu Dr. Atiek Soemiati, MS, selaku Kepala Laboratorium Mikrobiologi

dan Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI.

5. Seluruh dosen, laboran, dan karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan bantuan selama penulis menempuh masa pendidikan dan dalam penelitian.
6. Bapak Nico Tjandra, Ph.D, dari *National Heart, Lung, and Blood Institute*, Amerika Serikat, yang telah memberikan saran, pengetahuan, dan bantuan selama penelitian.
7. Dr. Catherine Fontagné-Faucher, dari Institut Universitaire de Technologie-Université Paul Sabatier, Prancis, atas bantuan dalam pencarian jurnal.
8. Keluargaku, yang senantiasa memberikan kasih sayang, semangat, dorongan, bantuan, serta doa kepada penulis selama ini
9. Teman-teman farmasi reguler angkatan 2005 atas kebersamaan dan dukungannya pada penulis.
10. Semua pihak yang telah membantu penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis sangat menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang membangun. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan dan semua pihak yang memerlukan.

Penulis

2010

ABSTRAK

Beberapa Bakteri Asam Laktat (BAL) diketahui dapat memproduksi eksopolisakarida (EPS) yang memiliki nilai ekonomi yang penting karena berguna bagi industri makanan, farmasi, dan memiliki efek yang baik bagi kesehatan manusia. Berdasarkan komposisi dan mekanisme biosintesisnya, EPS yang dihasilkan BAL dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu homopolisakarida yang terdiri atas satu macam monosakarida dan heteropolisakarida yang terdiri atas lebih dari satu macam monosakarida.

Biopolimer fruktan adalah suatu homopolisakarida dengan komponen monomer fruktosa yang telah banyak diteliti dan dilaporkan disintesis dari berbagai sumber, baik tumbuhan maupun mikroorganisme.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh EPS dari BAL yang ditumbuhkan pada medium agar MRS. Media padat digunakan dalam produksi EPS untuk memperoleh EPS yang mudah untuk dipurifikasi, dibandingkan dengan EPS yang dihasilkan dari fermentasi menggunakan media cair. EPS yang dihasilkan BAL kemudian diisolasi dan dipurifikasi dengan presipitasi menggunakan etanol dengan suhu 4°C. EPS yang diperoleh dianalisis strukturnya dengan Spektrometer Resonansi Magnet Inti 500MHz ^1H dan ^{13}C .

Dari hasil analisis NMR proton dan karbon didapatkan bahwa EPS yang berasal dari galur MBF 8-2, CNC 2(1) dan CNC 6 yang ditanam pada medium padat tidak dapat diamati strukturnya.

Kata kunci : analisis struktur, bakteri asam laktat (BAL), eksopolisakarida (EPS), Spektroskopi Resonansi Magnet Inti (Spektroskopi NMR).

xiii + 86 hlm; gbr; tab; lamp.

Bibliografi: 64 (1965-2009)



ABSTRACT

Some Lactic Acid Bacteria (LAB) are known to produce exopolysaccharides (EPS) which have important economic values because its importance for food industry, pharmacy, and has many good effects for human health. Based on its composition and biosynthesis mechanism, EPS can be divided into 2 groups, homopolysaccharide that consist of one kind of monosaccharide and heteropolysaccharide that consist of more than one kind of monosaccharides.

Fructan biopolymer is a homopolysaccharide with fructose monomer component which had been studied and reported synthesized from various sources, either from plants or microorganisms.

This study aimed to obtain EPS from LAB which grown at MRS agar medium. Solid medium was used in the production of EPS in order to obtain EPS which can be easier to purify, compared to that produced by broth culture fermentation. EPS produced by LAB was then isolated and purified by precipitation using ethanol with 4°C of temperature. EPS obtained from isolation and purification process was then analyzed with ^1H and ^{13}C NMR Spectroscopy using D_2O as solvent.

From ^1H and ^{13}C NMR Spectroscopy analysis results, it was found that EPS samples from MBF 8-2, CNC 2(1) and CNC 6 grown in solid medium can not be observed.

Keywords : exopolysaccharide (EPS), lactic acid bacteria (LAB), NMR Spectroscopy, structure analysis.

xiii + 86 pages; pictures; tables; appendixes.

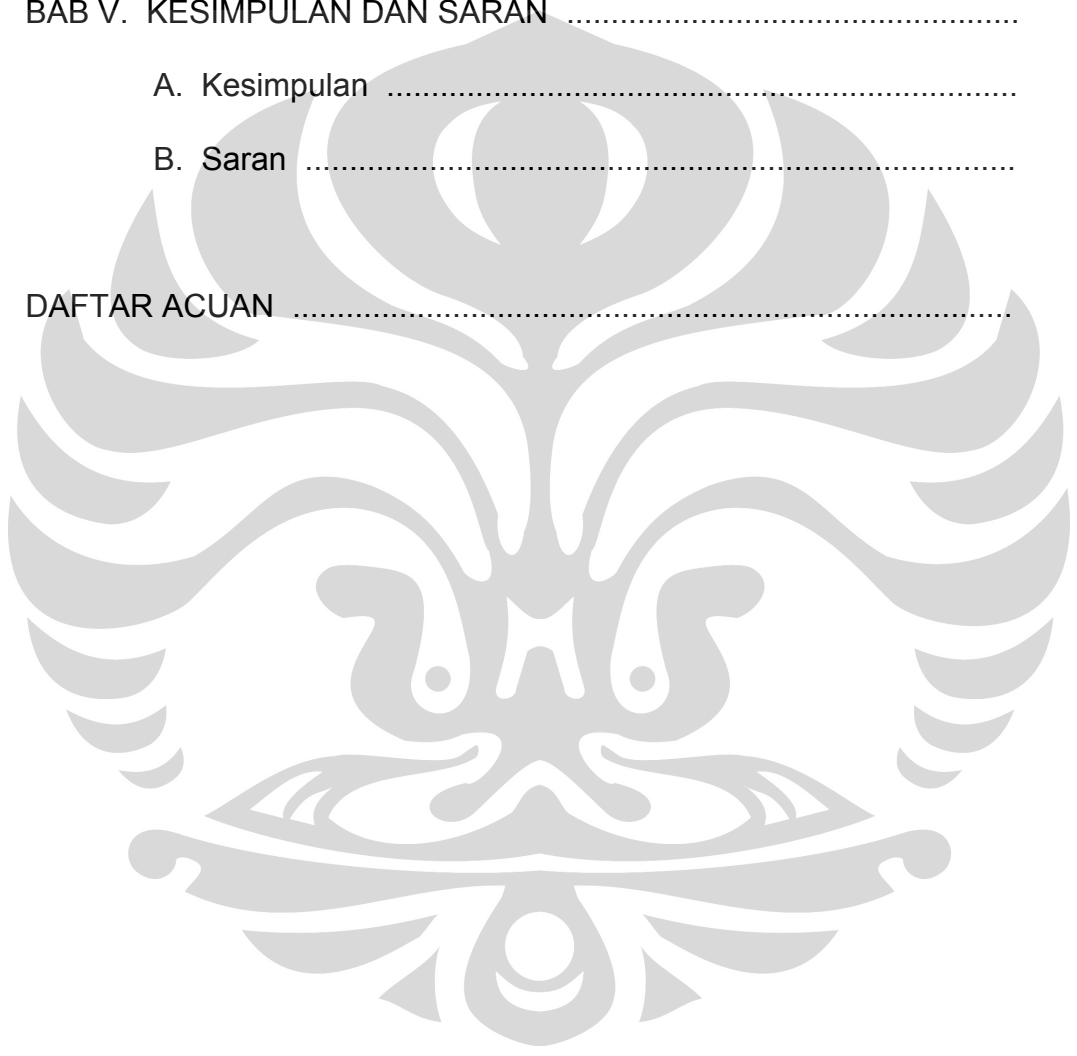
Bibliografi: 64 (1965-2009)



DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
ABSTRACT.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan Penelitian.....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Bakteri Asam Laktat (BAL).....	5
B. Eksopolisakarida.....	7
C. Spektroskopi Resonansi Magnet Inti.....	11
BAB III. BAHAN, ALAT, DAN CARA KERJA	
A. Lokasi Penelitian.....	14
B. Bahan.....	14
C. Alat.....	16
D. Pembuatan Medium.....	16

E. Cara Kerja.....	21
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
A. Hasil.....	25
B. Pembahasan	26
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	
A. Kesimpulan	34
B. Saran	35
DAFTAR ACUAN	36

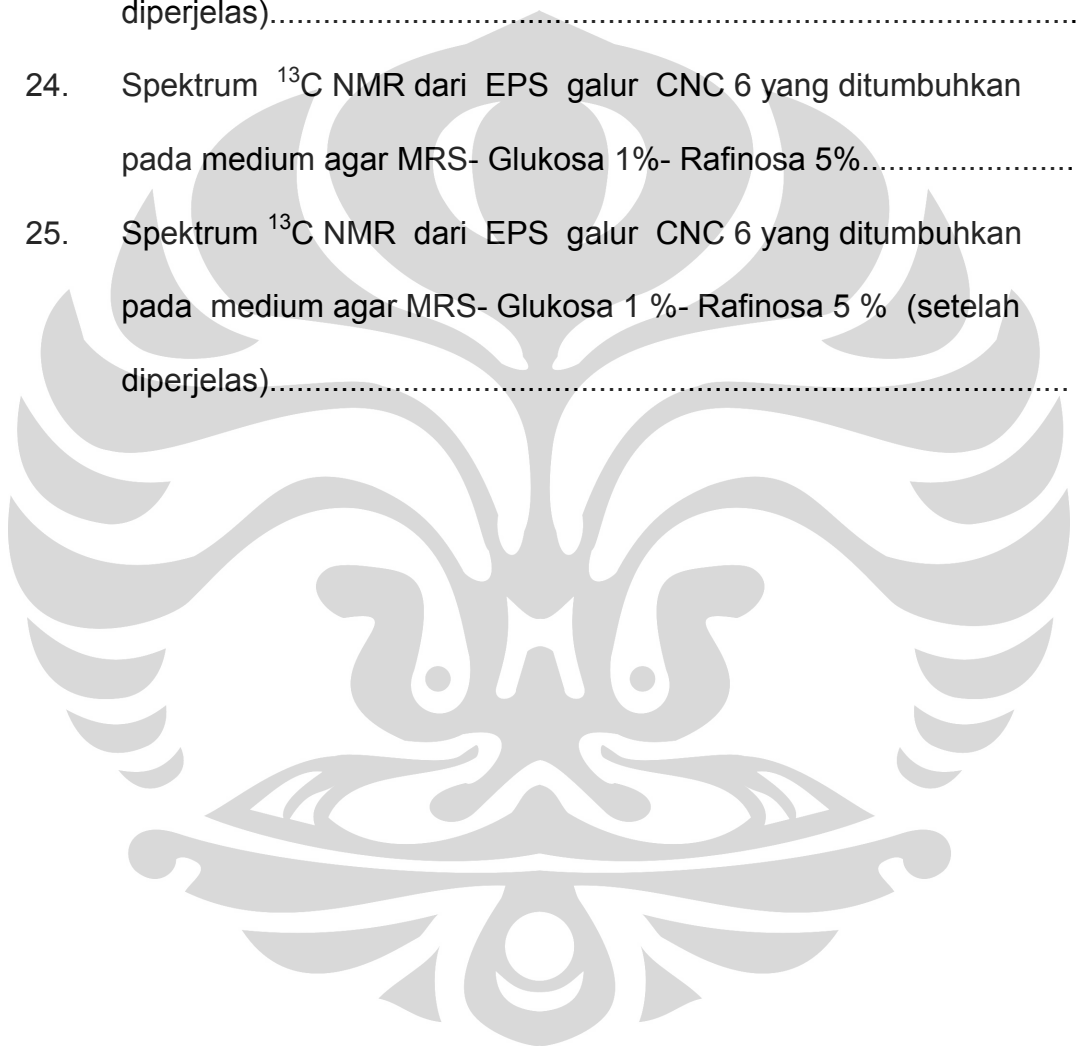


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur kimia Inulin (A) dan Levan (B).....	11
2. Struktur kimia rafinosa.....	46
3. Morfologi Koloni Tunggal BAL.....	47
4. Biomassa yang dihasilkan oleh galur MBF 5-4 (1) dan MBF 8-2 (2) pada medium agar MRS- sukrosa 10% (A), medium agar MRS- Rafinosa 5%-Glukosa 1% (B), dan medium agar MRS-rafinosa5%(C).....	48
5. Biomassa yang dihasilkan oleh galur CNC 2(1) [1] dan CNC 6 [2] pada medium agar MRS- sukrosa 10% (A), medium agar MRS- Rafinosa 5%-Glukosa 1% (B), dan medium agar MRS- rafinosa 5% (C).....	49
6. Hasil isolasi dan purifikasi EPS yang diproduksi dari berbagai isolat BAL pada medium agar MRS- Sukrosa 10%	50
7. Hasil isolasi dan purifikasi EPS yang diproduksi dari berbagai isolat BAL pada medium agar MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5%	51
8. Sentrifugator [Kubota 6800, Jepang; Tomy MX-305, Jepang].....	52
9. Deep Freezer [New Brunswick Scientific].....	53
10. Spektrum ¹ H NMR dari EPS galur MBF 8-2 yang ditumbuhkan pada medium cair MRS - Glukosa 1% - Rafinosa 5% yang digunakan sebagai pembanding.....	54

11.	Spektrum ^1H NMR dari EPS galur MBF 8-2 yang ditumbuhkan pada medium cair MRS - Glukosa 1% - Rafinosa 5% yang digunakan sebagai pembanding (setelah diperjelas).....	55
12.	Spektrum ^{13}C NMR dari EPS galur MBF 8-2 yang ditumbuhkan pada medium cair MRS - Glukosa 1 % - Rafinosa 5 % yang digunakan sebagai pembanding.....	56
13.	Spektrum ^{13}C NMR dari EPS galur MBF 8-2 yang ditumbuhkan pada medium cair MRS - Glukosa 1 % - Rafinosa 5 % yang digunakan sebagai pembanding (setelah diperjelas).....	57
14.	Spektrum ^1H NMR dari Standar Inulin.....	58
15.	Spektrum ^1H NMR dari Standar Inulin (setelah diperjelas).....	59
16.	Spektrum ^{13}C NMR dari Standar Inulin.....	60
17.	Spektrum ^{13}C NMR dari Standar Inulin (setelah diperjelas).....	61
18.	Spektrum ^1H NMR dari EPS galur MBF 8-2 yang ditumbuhkan pada medium agar MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5%.....	62
19.	Spektrum ^1H NMR dari EPS galur MBF 8-2 yang ditumbuhkan pada medium agar MRS- Glukosa 1 %- Rafinosa 5 % (setelah diperjelas).....	63
20.	Spektrum ^1H NMR dari EPS galur CNC 2(1) yang ditumbuhkan pada medium agar MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5%.....	64
21.	Spektrum ^1H NMR dari EPS galur CNC 2(1) yang ditumbuhkan pada medium agar MRS- Glukosa 1 %- Rafinosa 5 % (setelah diperjelas).....	65

22.	Spektrum ^1H NMR dari EPS galur CNC 6 yang ditumbuhkan pada medium agar MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5%.....	66
23.	Spektrum ^1H NMR dari EPS galur CNC 6 yang ditumbuhkan pada medium agar MRS- Glukosa 1 %- Rafinosa 5 % (setelah diperjelas).....	67
24.	Spektrum ^{13}C NMR dari EPS galur CNC 6 yang ditumbuhkan pada medium agar MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5%.....	68
25.	Spektrum ^{13}C NMR dari EPS galur CNC 6 yang ditumbuhkan pada medium agar MRS- Glukosa 1 %- Rafinosa 5 % (setelah diperjelas).....	69



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Asal Isolat BAL.....	71
2. Hasil pengamatan morfologi koloni galur BAL pada medium agar MRS dibandingkan dengan data penelitian sebelumnya	72
3. Data (OD) ₆₀₀ dari beberapa isolat BAL.....	73
4. Hasil pengamatan produksi EPS MRS-Sukrosa 10%.....	74
5. Hasil pengamatan produksi EPS MRS-Rafinosa 5%.....	75
6. Hasil pengamatan produksi EPS MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5%.....	76
7. Hasil Produksi EPS dari Berbagai Galur BAL dalam media agar MRS-Sukrosa 10%.....	77
8. Hasil Produksi EPS dari Berbagai Galur BAL dalam media Agar MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5%.....	77
9. Geseran kimia spektrum ¹ H NMR.....	78
10. Geseran kimia spektrum ¹³ C NMR.....	79

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Komposisi medium.....	81
2. Cara pembuatan reagen yang digunakan dalam penelitian.....	82
3. Skema alur kerja pada penelitian.....	83
4. Skema Isolasi dan Purifikasi EPS pada Penelitian Ini.....	85
5. Skema Isolasi dan Purifikasi EPS dari Sampel MBF 8-2 dari Penelitian Sebelumnya yang Ditanam pada Media Cair.....	86

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

BAL merupakan mikroorganisme yang berstatus GRAS (*generally regarded as safe*) sehingga pemanfaatannya diakui sangat aman dan tidak berbahaya untuk dikonsumsi dan digunakan bagi manusia. Beberapa BAL diketahui dapat memproduksi eksopolisakarida (EPS) yang memiliki nilai ekonomi yang penting karena berguna bagi industri makanan, farmasi, dan memiliki efek yang baik bagi kesehatan manusia (1, 2, 3, 4).

EPS telah dilaporkan mempunyai banyak aplikasi yang berpotensi dalam industri farmasi, kosmetik dan makanan, beberapa di antaranya adalah inulin, levan, dekstran dan lain-lain (4). Salah satu aplikasi yang berpotensi dari EPS adalah inulin, suatu fruktan yang banyak terdapat dalam tanaman sebagai cadangan karbohidrat. Inulin banyak digunakan dalam pola diet manusia, dan banyak terkandung di dalam tanaman. Dalam formulasi makanan, inulin secara signifikan meningkatkan karakteristik organoleptik, memungkinkan peningkatan rasa dan kenyamanan saat dikonsumsi.

Berdasarkan komposisi dan mekanisme biosintesisnya, EPS yang dihasilkan BAL dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu

homopolisakarida yang terdiri atas satu macam monosakarida dan heteropolisakarida yang terdiri atas lebih dari satu macam monosakarida (1, 4).

Homopolisakarida BAL dapat dibedakan atas fruktan dan glukukan. Fruktan dapat dibedakan lagi menjadi levan dan inulin (4, 5, 6, 7). Levan dan inulin yang diproduksi oleh bakteri mempunyai potensi dalam industri makanan maupun dalam industri lainnya. Biopolimer fruktan adalah suatu homopolisakarida dengan komponen monomer fruktosa yang telah banyak diteliti dan dilaporkan disintesis dari berbagai sumber, baik tumbuhan maupun mikroorganisme.

Oleh karena BAL penghasil EPS memiliki potensi dalam bidang industri dan kesehatan, maka sangatlah penting untuk melakukan identifikasi struktur biopolimer EPS dari BAL yang diisolasi dari sumber alam Indonesia, baik dari makanan maupun limbah makanan hasil penelitian sebelumnya.

Produksi dilakukan dengan menumbuhkan BAL pada media padat dengan menggunakan rafinosa sebagai substrat. Keunggulan penggunaan media padat untuk menumbuhkan BAL yaitu EPS yang dihasilkan memiliki tingkat kemurnian yang lebih baik dibandingkan apabila menggunakan media cair. Pada penggunaan media cair, terdapat kontaminasi dari komponen media dan kesulitan memisahkan EPS dari media. Namun penggunaan media cair memberikan

keuntungan berupa jumlah EPS yang dihasilkan lebih banyak dibandingkan menggunakan media padat.

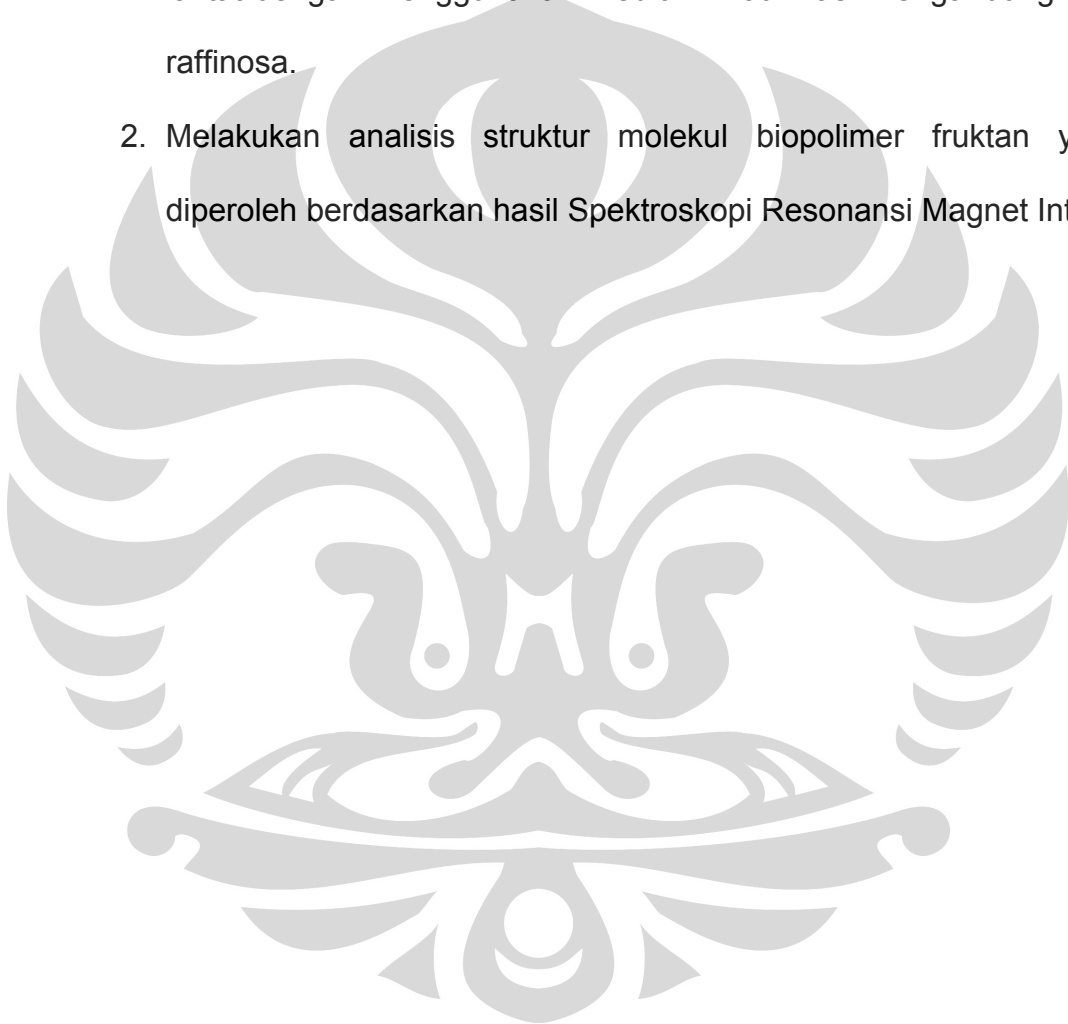
Untuk menghasilkan EPS tipe fruktan, dapat digunakan substrat sukrosa atau rafinosa sebagai sumber karbon (8, 9). Fruktansukrase atau fruktosiltransferase (FTF) memotong sukrosa dan rafinosa sebagai substrat dan menggunakan energi yang dilepaskan untuk mengikat unit fruktosil pada rantai fruktan yang sedang berkembang (8, 9).

Rafinosa merupakan substrat terpilih untuk menghasilkan EPS tipe fruktan dikarenakan rafinosa merupakan substrat bagi FTF namun bukan merupakan substrat bagi glukansukrase atau glukosiltransferase (GTF). Sedangkan sukrosa merupakan substrat bagi FTF maupun GTF.

EPS yang dihasilkan BAL kemudian diisolasi. EPS yang diperoleh dianalisis strukturnya dengan Spektrometer Resonansi Magnet Inti 500MHz ^1H dan ^{13}C .

B. TUJUAN PENELITIAN

1. Melakukan isolasi dan purifikasi eksopolisakarida untuk memperoleh biopolimer fruktan dari beberapa galur bakteri asam laktat dengan menggunakan medium modifikasi mengandung gula raffinosa.
2. Melakukan analisis struktur molekul biopolimer fruktan yang diperoleh berdasarkan hasil Spektroskopi Resonansi Magnet Inti



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. BAKTERI ASAM LAKTAT (11)

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri gram positif, biasanya nonmotil, tidak bersporulasi, toleran terhadap asam, berbentuk batang atau *coccus* yang diasosiasikan dengan karakteristik metabolik dan fisiologinya (10, 11). BAL terdistribusi secara luas di lingkungan, terutama dalam produk makanan hewan dan sayuran. BAL merupakan flora normal dalam saluran gastrointestinal unggas dan mamalia serta pada vagina mamalia. (12)

BAL menghasilkan asam laktat sebagai hasil akhir utama dari metabolisme fermentatif (11). BAL merupakan bakteri yang sangat penting dalam usaha fermentasi makanan, seperti pada fermentasi adonan roti asam, *sorghum beer*, susu fermentasi, singkong (untuk menghasilkan gari (makanan berbentuk granul yang dipanggang setelah difermentasikan) dan fufu (pasta berwarna putih krem) yang merupakan bahan pangan utama di Nigeria dan sebagian besar wilayah Afrika Barat) (13, 14, 15) dan pada mayoritas asinan sayuran seperti kimchi, olives, poi, sauerkraut, dan pickles (11, 14, 16).

BAL mengkonversi karbohidrat menjadi asam laktat, karbondioksida, serta asam organik lainnya tanpa perlu adanya oksigen. BAL dideskripsikan sebagai mikroaerofilik karena mereka tidak memanfaatkan oksigen. Oleh karena itu, perubahan yang dihasilkan oleh BAL tidak menyebabkan perubahan drastis pada komposisi makanan. Beberapa jenis BAL memiliki sifat homofermentatif karena hanya memproduksi asam laktat, sedangkan beberapa jenis lainnya bersifat heterofermentatif karena menghasilkan asam laktat, senyawa *volatile* lainnya dan alkohol. *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. caret*, *L. pentoaceticus*, *L. brevis* dan *L. thermophilus* adalah contoh BAL yang berperan dalam fermentasi makanan.

Beberapa BAL dapat memproduksi eksopolisakarida (EPS), yang diekskresikan dalam medium pertumbuhan sebagai lendir atau tetap berada dalam keadaan terikat pada dinding sel bakteri membentuk suatu EPS kapsuler. Dalam industri susu, BAL yang memproduksi EPS, termasuk genus *Streptococcus*, *Lactobacillus* dan *Lactococcus*, digunakan secara *in situ* untuk meningkatkan karakteristik tekstur dari produk susu fermentasi. BAL termasuk organisme yang aman ditambahkan dalam pangan karena bersifat tidak toksik dan tidak menghasilkan toksin, sehingga disebut *food grade organism*. BAL dapat memproduksi berbagai jenis EPS yang berbeda secara struktur dan memiliki potensi sebagai aplikasi baru

seperti gellan, pullulan, xanthan dan alginat bakteri yang saat ini telah diproduksi oleh bakteri *non-food-grade*. Karena BAL dianggap sebagai bahan alam dan telah banyak digunakan dalam makanan, BAL merupakan sumber yang baik bagi polimer yang berpotensi untuk digunakan dalam makanan sehat. Beberapa jenis BAL berguna bagi kesehatan, BAL juga bermanfaat untuk peningkatan kualitas kesehatan dan keamanan pangan melalui penghambatan secara alami terhadap flora berbahaya yang bersifat patogen.

B. EKSOPOLISAKARIDA

Mikroorganisme dapat mensintesis polisakarida yang penting untuk struktur dinding sel. Polisakarida yang dihasilkan mikroorganisme mempunyai sifat alir yang bisa dimanfaatkan dalam industri dan bisa diproduksi dalam jumlah besar dan memiliki tingkat kemurnian yang tinggi.

Polisakarida yang dihasilkan oleh mikroorganisme dibedakan berdasarkan tempat dihasilkannya yaitu *capsular polysaccharides* (CPS) dan eksopolisakarida (EPS) (17).

EPS merupakan polimer ekso-seluler yang membentuk lapisan berlendir yang terlepas dari permukaan sel atau disekresikan ke lingkungan (4). EPS memiliki berat molekul bervariasi antara 10

sampai 10^4 kDa (sekitar 50 sampai 50.000 unit glikosil) (17). Beberapa BAL memiliki kemampuan untuk menghasilkan EPS (4). Salah satu strain bakteri yang diketahui menghasilkan EPS adalah *Lactobacillus* (4).

EPS dapat digunakan sebagai bahan pengental, emulsifying, prebiotik atau bahan pengikat air baik dalam industri makanan maupun dalam industri lainnya (4, 7, 19, 20, 21, 22).

Berdasarkan komposisi dan mekanisme biosintesisnya, EPS yang dihasilkan BAL dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu homopolisakarida yang terdiri dari satu macam monosakarida dan heteropolisakarida yang terdiri atas lebih dari satu macam monosakarida.

Homopolisakarida BAL dapat dibedakan atas fruktan dan glukukan. Berdasarkan ikatan glikosidik antara unit fruktosanya, fruktan dibagi menjadi levan dan inulin (5, 7, 9). Levan dan inulin merupakan sebuah kelompok polimer fruktan dimana unit fruktosa terhubung melalui ikatan β -(2,1) (inulin) atau ikatan β -(2,6) (levan) (7, 9, 23, 24). Levan dan inulin yang diproduksi oleh bakteri mempunyai potensi dalam industri makanan maupun dalam industri lainnya.

Levan merupakan fruktan dengan ikatan β -2,6 yang ditemukan sebagai karbohidrat cadangan pada tumbuhan monokotil seperti *ryegrass* dan *cocksfoot*. Levan juga diproduksi oleh beberapa macam bakteri selama proses asimilasi sukrosa melalui aksi

levansukrase (7, 9, 25, 26). Levan yang diproduksi dari tanaman memiliki berat molekul yang lebih rendah dibandingkan dengan levan yang diproduksi dari bakteri.

Levan merupakan polimer D-fruktosa yang dihubungkan oleh ikatan $\beta(2\rightarrow6)$ yang membawa residu D-glukosa pada ujung akhir rantai. Walaupun struktur levan ditunjukkan dengan adanya rantai lurus $\beta(2\rightarrow6)$, namun sejumlah levan yang diproduksi oleh bakteri memiliki ikatan cabang $\beta(2\rightarrow1)$. Ikatan cabang ini umumnya pendek dan terkadang terdiri dari satu residu fruktosa.

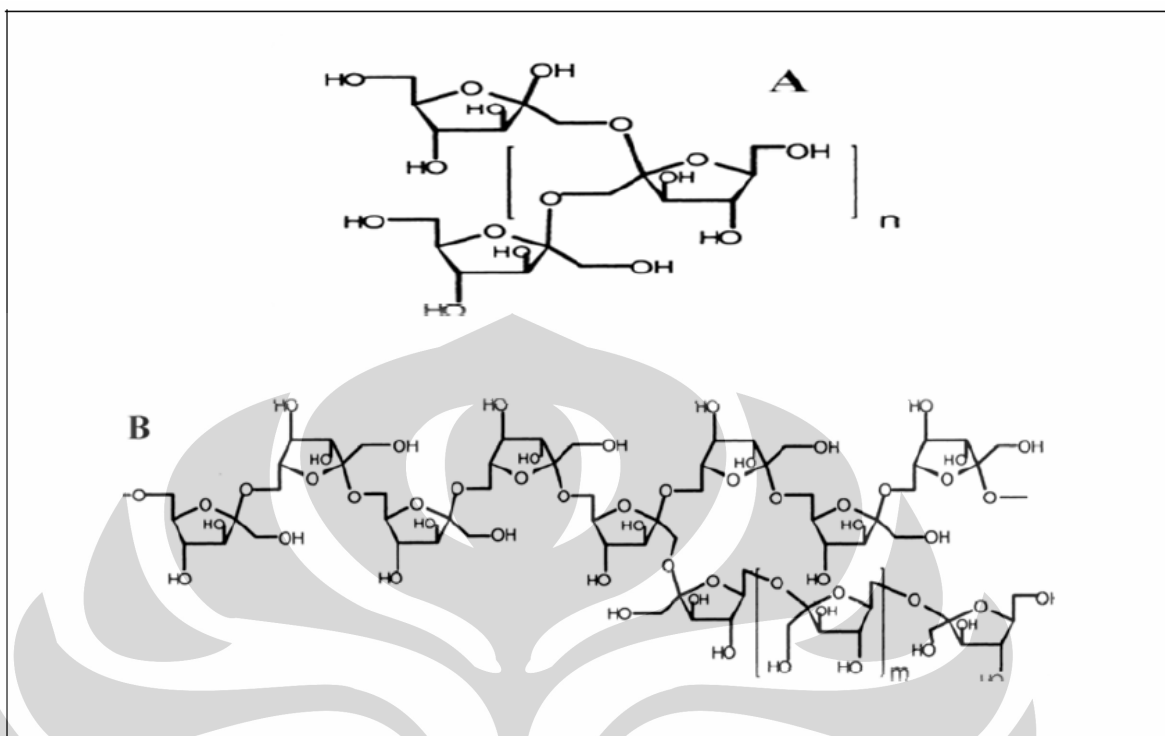
Komposisi dan sifat levan bergantung pada faktor lingkungan dimana mikroorganisme penghasilnya tumbuh (9). Levan bersifat *levorotatory*, berbentuk amorf atau mikrokristalin, dan memiliki kelarutan bervariasi dalam air dingin, sangat larut dalam air panas, dan tidak larut dalam etanol absolut. Levan pada umumnya lebih larut dibandingkan dengan inulin, yang hampir tidak larut (<0,5%) dalam air pada suhu kamar (9, 27).

Levan digunakan sebagai *emulsifier* atau agen enkapsulasi pada sejumlah besar produk, termasuk plastik *biodegradable*, kosmetik, lem, penyalut tekstil dan deterjen (9).

Selain itu levan juga digunakan dalam bidang medis untuk menggantikan dekstran untuk memperbesar volume plasma darah, dan telah diketahui bahwa levan memiliki aktivitas antitumor dan imunomodulator pada tikus (9).

Inulin, karbohidrat yang tidak tercerna, adalah fruktan yang tidak hanya ditemukan pada berbagai tanaman sebagai karbohidrat simpanan, namun juga menjadi bagian dalam diet harian manusia pada beberapa abad (28, 29, 31). Inulin terdapat dalam berbagai sayuran, buah-buahan dan sereal, termasuk bawang perai, bawang bombay, bawang putih, gandum, *chicory*, *artichoke*, dan pisang (30, 31).

Inulin digunakan sebagai bahan makanan fungsional yang menawarkan kombinasi unik antara sifat nutrisi dan keuntungan teknologi yang penting. Pada formulasi makanan, inulin secara signifikan meningkatkan karakteristik organoleptis, berperan dalam meningkatkan rasa dan perasaan pada mulut pada bermacam-macam aplikasi (29, 31). Inulin digunakan terutama untuk menggantikan lemak dan gula (9, 26, 29). Potensi inulin sebagai pengganti lemak ditemukan dan dipatenkan oleh Orafiti pada tahun 1992. Dengan menggunakan teknik pemrosesan yang spesifik, inulin dikombinasikan dengan air untuk menghasilkan tekstur dan *mouthfeel* yang sama dengan lemak (29). Secara partikuler, inulin meningkatkan stabilitas *foam* dan emulsi, juga menunjukkan sifat mirip lemak yang eksepsional saat digunakan dalam bentuk gel dalam air (9, 26, 29, 31).



Gambar 1. Struktur kimia Inulin (A) dan Levan (B) (18)

C. SPEKTROSKOPI RESONANSI MAGNET INTI (32, 33, 34, 35, 36, 37)

Spektroskopi Resonansi Magnet Inti, atau yang lebih dikenal dengan NMR *spectroscopy* (*Nuclear magnetic resonance spectroscopy*), adalah nama yang diberikan pada sebuah teknik yang mengacu pada sifat magnetik dari inti/nukleus tertentu. Aplikasi yang paling penting untuk kimia organik adalah spektroskopi proton

NMR dan karbon-13 NMR. Pada prinsipnya, NMR dapat diaplikasikan pada semua nukleus yang memiliki spin.

Berbagai tipe informasi bisa didapatkan dari spektrum NMR. Serupa dengan menggunakan Spektroskopi Inframerah/ *Infrared Spectroscopy* (*IR spectroscopy*) untuk mengidentifikasi grup fungsional, analisis dari spektrum NMR 1D memberikan informasi tentang jumlah dan tipe entitas kimia dalam sebuah molekul. Bagaimanapun juga, NMR memberikan lebih banyak informasi daripada IR.

Pengaruh yang kuat dari NMR dalam ilmu alam sudah bersifat substansial. NMR dapat digunakan untuk mempelajari campuran analit, untuk memahami efek dinamis seperti perubahan suhu dan mekanisme reaksi, dapat digunakan untuk memahami struktur dan fungsi dari protein dan asam nukleat. NMR dapat diaplikasikan untuk berbagai macam sampel, baik dalam bentuk larutan maupun dalam bentuk padat.

Saat ditempatkan dalam medan magnet, nukleus aktif NMR (misalnya ^1H atau ^{13}C) mengabsorpsi pada frekuensi tertentu karakteristik isotop. Frekuensi resonansi, energi absorpsi dan intensitas sinyal berbanding secara proporsional dengan kekuatan medan magnet.

Bergantung pada lingkungan kimia lokal, proton yang berbeda dalam sebuah molekul beresonansi pada frekuensi yang sedikit

berbeda. Karena baik pergeseran frekuensi dan frekuensi resonansi fundamental berbanding lurus dengan kekuatan medan magnet, pergeseran ini dikonversikan menjadi sebuah nilai tanpa dimensi yang bergantung medan yang dikenal sebagai *chemical shift*. *Chemical shift* dilaporkan sebagai sebuah ukuran relatif dari beberapa frekuensi resonansi referensi (untuk inti ^1H , ^{13}C , dan ^{29}Si , TMS (tetrametilsilan) umum digunakan sebagai referensi). Antara frekuensi sinyal dan frekuensi dari zat referensi dibedakan oleh frekuensi dari sinyal referensi untuk memberikan *chemical shift*. Pergeseran frekuensi sangat kecil dibandingkan dengan frekuensi NMR fundamental.

Karena adanya gerakan molekuler pada suhu ruang, maka proton berdegenerasi dan membentuk sebuah *peak* pada *chemical shift* yang sama. Bentuk dan ukuran *peak* merupakan indikator dari struktur kimia.

BAB III

BAHAN, ALAT, DAN CARA KERJA

A. LOKASI

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Untuk pengukuran sampel menggunakan Spektroskopi Resonansi Magnet Inti dilakukan di Pusat Penelitian Kimia, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Penelitian dilakukan dalam waktu 6 bulan.

B. BAHAN

1. Galur stok beku BAL

Galur BAL yang digunakan dalam penelitian ini adalah empat galur stok beku yaitu *Leuconostoc mesenteroides* MBF 5-4, *Weissella confusa* MBF 8-2 (38), *Weissella confusa* CNC 2(1), dan CNC 6 (39), yang berasal dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI sebagaimana tercantum pada Tabel 1.

2. Medium

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium agar MRS, medium cair MRS, medium agar MRS untuk agar miring, medium agar modifikasi MRS-sukrosa 10%, medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5%, medium agar modifikasi MRS-glukosa 1%-rafinosa 5%.

Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan medium yaitu medium MRS Broth [Difco, Amerika Serikat], pepton [Difco, Amerika Serikat], LAB-Lemco [Oxoid, Inggris], ekstrak khamir [Difco, Amerika Serikat], dikalium hidrogen fosfat [Merck, Jerman], natrium asetat [Merck, Jerman], ammonium sitrat [Merck, Jerman], kalsium karbonat [Merck], magnesium sulfat [Merck, Jerman], mangan sulfat [Merck, Jerman], tween 80 [Merck, Jerman], sukrosa [Difco, Amerika Serikat], kalsium karbonat [Merck, Jerman], agar Bacto [Pronadisa, Spanyol], glukosa [Oxoid, Inggris] dan rafinosa [Wako, Jepang].

3. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah natrium hidroksida [Merck, Jerman], asam klorida [Merck, Jerman], etanol 96% [Merck, Jerman], akuades steril, akuabides steril [Otsuka, Jepang].

C. ALAT

Peralatan yang digunakan selama penelitian adalah *Laminair Air Flow* (LAF) *Cabinet* [Esco, Cina], Deep Freezer -70°C [New Brunswick], *Spectrophotometer* JNM ECA 500 [Jeol], Spektrofotometer UV-Vis Gene-Quant® [GE Healthcare, Swedia], sentrifugator [Kubota 6800, Jepang; Tomy MX-305], mikropipet [Gilson], tabung Falcon 50 ml [Biologix, Corning], alat vortex [Health], kamera digital [Canon], dan alat-alat lain yang biasa digunakan dalam laboratorium mikrobiologi dan bioteknologi.

D. PEMBUATAN MEDIUM (21, 40, 41)

1. Medium Agar MRS

Masing-masing bahan ditimbang dengan ukuran sebagai berikut: medium cair MRS 26 g, dan agar Bacto 7,5 g. Keduanya dimasukkan ke dalam labu bulat, ditambahkan dengan akuades secukupnya, sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Kemudian volume dicukupkan hingga 500mL dengan akuades. Medium disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 2 atm. Di dalam *Laminair Air Flow* (LAF) yang telah disiapkan selama 2 jam, medium yang masih hangat dituang

secara aseptis ke cawan Petri. Setelah membeku, cawan Petri dibalik dan disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C.

2. Medium Cair MRS

Medium cair MRS ditimbang sebesar 5,2 g, kemudian dimasukkan ke dalam labu bulat. Setelah itu ditambahkan dengan akuades secukupnya dan dipanaskan di atas hotplate sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga mendidih. Kemudian volume dicukupkan hingga 100 mL dengan akuades. Medium tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 10mL. Seluruh tabung reaksi disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 2 atm. Setelah dingin, medium dapat langsung digunakan atau disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C.

3. Medium MRS untuk Agar Miring

Masing-masing bahan ditimbang dengan ukuran sebagai berikut: medium MRS 5,2 g, agar Bacto 1,5 g, dan kalsium karbonat 0,5 g. Semua bahan dimasukkan ke dalam labu bulat, ditambahkan dengan akuades secukupnya, sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Kemudian volume dicukupkan hingga 100 mL

dengan akuades. Dalam keadaan panas dan tetap sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*, medium tersebut dipipet sebanyak 5 mL ke dalam tabung reaksi. Kemudian seluruh tabung reaksi disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 2 atm. Tabung reaksi dimiringkan hingga membeku dan dimasukkan ke dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C untuk digunakan keesokan harinya.

4. Medium agar modifikasi MRS-sukrosa 10% (21)

Masing-masing bahan ditimbang dengan ukuran sebagai berikut: pepton 5 g, LAB-Lemco 4 g, ekstrak khamir 2 g, dikalium hidrogen fosfat 1 g, natrium asetat 2,5 g, amonium sitrat 1 g, magnesium sulfat 0,1 g, mangan sulfat 0,025 g, dan agar Bacto 7 g. Semua bahan dimasukkan ke dalam labu bulat, ditambahkan dengan akuades secukupnya, sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*, kemudian ditambahkan 0,25 mL Tween 80. Setelah itu, pH diatur menggunakan pH meter hingga $\text{pH } 6,2 \pm 0,2$ dengan menggunakan larutan asam klorida 1 N atau natrium hidroksida 1 N. Kemudian volume dicukupkan hingga 250 mL dengan akuades. Sementara itu, sukrosa ditimbang sebanyak 50 g, masukkan dalam labu bulat. Tambahkan dengan akuades secukupnya, dan dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk dengan *magnetic*

stirrer. Kemudian volume dicukupkan hingga 250 mL dengan akuades. Kedua medium ini disterilisasi dengan autoklaf masing-masing selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 2 atm. Di dalam *Laminair Air Flow* (LAF) yang telah disiapkan selama 2 jam, larutan sukrosa dicampurkan dalam medium agar MRS secara aseptis dan dihomogenkan. Medium yang masih hangat dituang secara aseptis ke dalam cawan Petri. Setelah membeku, cawan Petri dibalik dan disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C.

5. Medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5% (40, 41)

Masing-masing bahan ditimbang dengan ukuran sebagai berikut: pepton 5 g, LAB-Lemco 4 g, ekstrak khamir 2 g, dikalium hidrogen fosfat 1 g, natrium asetat 2,5 g, ammonium sitrat 1 g, magnesium sulfat 0,1 g, mangan sulfat 0,025 g, dan agar Bacto 7 g. Semua bahan dimasukkan ke dalam labu bulat, ditambahkan dengan akuades secukupnya, sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*, kemudian ditambahkan 0,25 mL Tween 80. Setelah itu, pH diatur menggunakan pH meter hingga pH $6,2 \pm 0,2$ dengan menggunakan larutan asam klorida 1 N atau natrium hidroksida 1 N. Kemudian volume dicukupkan hingga 250 mL dengan akuades. Sementara itu, rafinosa ditimbang sebanyak 25 g, masukkan

dalam labu bulat. Tambahkan dengan akuades secukupnya, dan dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Kemudian volume dicukupkan hingga 250 mL dengan akuades. Kedua medium ini disterilisasi dengan autoklaf masing-masing selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 2 atm. Di dalam *Laminair Air Flow* (LAF) yang telah disiapkan selama 2 jam, larutan rafinosa dicampurkan dalam medium agar MRS secara aseptis dan dihomogenkan. Medium yang masih hangat dituang secara aseptis ke dalam cawan Petri. Setelah membeku, cawan Petri dibalik dan disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C.

6. Medium agar modifikasi MRS-glukosa 1%-rafinosa 5% (40, 41)

Masing-masing bahan ditimbang dengan ukuran sebagai berikut: pepton 5 g, LAB-Lemco 4 g, ekstrak khamir 2 g, dikalium hidrogen fosfat 1 g, natrium asetat 2,5 g, ammonium sitrat 1 g, magnesium sulfat 0,1 g, mangan sulfat 0,025 g, dan agar Bacto 7 g. Semua bahan dimasukkan ke dalam labu bulat, ditambahkan dengan akuades secukupnya, sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*, kemudian ditambahkan 0,25 mL Tween 80. Setelah itu, pH diatur menggunakan pH meter hingga $\text{pH } 6,2 \pm 0,2$ dengan menggunakan larutan asam klorida 1 N atau natrium hidroksida 1

N. Kemudian volume dicukupkan hingga 250 mL dengan akuades. Sementara itu, rafinosa ditimbang sebanyak 25 g dan glukosa ditimbang sebanyak 5 g, masukkan dalam labu bulat. Tambahkan dengan akuades secukupnya, dan dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Kemudian volume dicukupkan hingga 250 mL dengan akuades. Kedua medium ini disterilisasi dengan autoklaf masing-masing selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 2 atm. Di dalam *Laminair Air Flow* (LAF) yang telah disiapkan selama 2 jam, larutan glukosa-rafinosa dicampurkan dalam medium agar MRS secara aseptis dan dihomogenkan. Medium yang masih hangat dituang secara aseptis ke dalam cawan Petri. Setelah membeku, cawan Petri dibalik dan disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C.

E. CARA KERJA

1. Peremajaan dan Pembuatan Kultur Kerja BAL

Kultur stok beku BAL yang sudah terdapat pada Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI masing-masing diremajakan kembali. Dengan menggunakan ose, galur bakteri digoreskan pada medium agar MRS secara aseptis, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada

suhu 30°C. Setelah diperoleh koloni tunggal, galur ditanam kembali pada MRS agar miring dan diremajakan setiap dua minggu sekali dengan cara memindahkan kembali kultur dari agar miring ke cawan petri. Jika telah diperoleh koloni tunggal pada cawan petri, maka galur ditanam kembali pada MRS agar miring sebagai kultur kerja.

2. Pembuatan Inokulum Cair

Galur BAL dari agar miring MRS digoreskan pada medium agar MRS di cawan Petri, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Kultur dari cawan petri ini kemudian ditanam pada medium cair MRS, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C.

3. Produksi EPS (16, 43)

Inokulum cair diukur $(OD)_{600}$ dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis Gene-Quant®, kemudian ditanam dengan $(OD)_{600} \times \text{volume transfer}$ senilai 1,5245 pada medium agar modifikasi MRS-sukrosa 10%, MRS-rafinosa 5%, dan MRS-glukosa 1%-rafinosa 5%, kemudian diinkubasi selama 5 hari pada suhu 30°C. Penginokulasian galur BAL ke masing-masing medium dilakukan secara triplo. Proses produksi, isolasi, dan purifikasi

EPS diulangi sampai didapatkan hasil serbuk EPS dalam jumlah yang cukup untuk pengukuran EPS dengan Spektroskopi Resonansi Magnet Inti ^1H dan ^{13}C .

4. Isolasi dan Purifikasi Biopolimer Fruktan (16, 26, 42, 43, 44)

Medium MRS Agar modifikasi yang berisi lendir hasil bentukan galur BAL diberi akuades steril secukupnya, kemudian lendir dikerok menggunakan batang pengaduk steril secara perlahan. Setelah semua lendir lepas dari medium, akuades berisi lendir dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi untuk disentrifugasi pada 6000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh didekantasi kemudian ditambahkan ke dalam larutan etanol 96% dengan suhu 4°C sebanyak dua kali volume supernatan. Campuran ini didiamkan semalaman atau lebih pada suhu 4°C sampai diperoleh endapan putih. Endapan yang diperoleh kemudian disentrifugasi selama 15 menit pada 3000 rpm. Kemudian endapan disuspensikan kembali ke dalam akuabides secukupnya sambil dihangatkan pada penangas air pada suhu 37°C sampai larut. Suspensi tersebut kemudian ditambahkan ke dalam larutan etanol 96% dengan suhu 4°C sebanyak dua kali volume supernatan. Tahapan purifikasi ini

diulangi kembali sebanyak dua kali. Kemudian endapan yang diperoleh dikeringkan dengan cara disimpan dalam desikator.

5. Analisa Struktur Fruktan dengan Spektroskopi NMR Proton dan Karbon

Sebanyak 5- 12 mg EPS dalam D₂O ditentukan dengan spektrum ¹H NMR dan ¹³C NMR. Pengukuran dilakukan pada frekuensi 500 MHz, temperatur 17°C. Pembanding yang digunakan adalah inulin dari tanaman *chicory* dan sampel EPS yang berasal dari galur *Weissella confusa* MBF 8-2 dari penelitian sebelumnya menggunakan pengeringan dengan *freeze dryer*.

Analisa struktur dilakukan dengan membandingkan sinyal yang didapat pada spektrum dengan standar inulin, sampel EPS yang berasal dari galur *Weissella confusa* MBF 8-2 dari penelitian sebelumnya menggunakan pengeringan dengan *freeze dryer*, dan literatur.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Hasil produksi EPS dari berbagai galur BAL

Hasil produksi EPS dari tiga galur BAL yaitu *Weissella confusa* MBF 8-2 (38), *Weissella confusa* CNC 2(1), dan CNC 6 (39) berupa serbuk EPS yang berwarna putih sampai kuning kecoklatan. Hasil produksi EPS dapat dilihat pada Tabel 6 dan 7.

2. Hasil analisis EPS dengan Spektroskopi ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR

Analisis struktur biopolimer fruktan berdasarkan hasil spektroskopi NMR proton dan karbon menunjukkan bahwa EPS yang berasal dari galur *Weissella confusa* MBF 8-2 (38), *Weissella confusa* CNC 2(1), dan CNC 6 (39) tidak dapat diamati strukturnya menggunakan spektroskopi NMR proton dan karbon.

B. PEMBAHASAN

Pertama-tama, galur stok beku BAL ditumbuhkan pada medium MRS agar. Hal ini dimaksudkan untuk peremajaan dan untuk memperoleh koloni tunggal murni yang akan ditanam pada media prakultur.

Media untuk prakultur yang dipergunakan adalah media cair MRS dengan glukosa sebagai sumber karbon dan tidak mengandung sukrosa. Media tersebut digunakan untuk menghindari terbentuknya polimer EPS yang berlebihan akibat kerja sukrase yang terinduksi oleh adanya sukrosa.

Pada masa tersebut, BAL dioptimalkan terlebih dahulu kondisinya sehingga siap untuk ditanam pada media untuk kultur produksi EPS. Dengan demikian, fase lag pada saat produksi EPS dapat dipersingkat waktunya.

Produksi EPS dilakukan pada media padat berupa media agar, hal ini dikarenakan pada media agar koloni BAL dan hasil EPS hanya ada pada permukaan agar sehingga didapatkan hasil isolasi yang diperkirakan lebih murni dibandingkan dengan bila koloni BAL ditumbuhkan pada media cair.

Pada penelitian sebelumnya menggunakan pengeringan dengan *freeze dryer*, digunakan media cair untuk produksi EPS.

Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C, tanpa agitasi, dan terlindung dari cahaya selama 5 hari.

Isolasi dan purifikasi EPS dari media cair ini dilakukan secara bertahap. Tahap pertama dilakukan dengan cara sentrifugasi selama 30 menit pada 6000 rpm untuk memisahkan biomassa. Supernatan yang mengandung EPS, kemudian diendapkan dengan menggunakan etanol 96% dengan suhu 4°C sebanyak dua kali volume supernatan dan didiamkan semalaman atau lebih pada suhu 4°C, untuk memperoleh produk EPS. Kemudian sampel disentrifugasi kembali selama 15 menit pada 3000 rpm untuk memisahkan produk EPS sebagai bagian endapan. Endapan EPS yang diperoleh dilarutkan dengan menggunakan akuades kualitas tinggi (akuabides) pada suhu 37°C untuk membantu pelarutan. Sentrifugasi dan pengendapan dilakukan berulang kali untuk memperoleh EPS yang lebih murni (44). Selanjutnya, suspensi EPS didekantasi, kemudian dibekukan pada suhu -20°C, kemudian dikeringkan dengan liofilisasi (*freeze dried*) (44).

Pada penggunaan media padat, produksi EPS lebih sedikit dibandingkan dengan bila menggunakan media cair sehingga penggunaan media pada produksi EPS menjadi lebih boros. Hal ini dikarenakan bakteri hanya tumbuh di permukaan media sehingga produk EPS hanya terdapat di permukaan media. Oleh karena itu, jumlah EPS yang dihasilkan sangat bergantung pada luas permukaan

media. Pada penggunaan media cair, bakteri tumbuh pada keseluruhan volume media sehingga dihasilkan EPS dalam jumlah yang lebih besar dibandingkan dengan penggunaan media padat. Selain itu pada penggunaan media padat, produksi biomassa dan metabolit primer tidak dapat dilakukan secara berkesinambungan. Hal ini dikarenakan nutrisi bagi mikroba lama-kelamaan akan habis dan metabolit toksik akan disekresikan oleh mikroba itu sendiri, sehingga mikroba tersebut akhirnya memasuki fase kematian.

Pada media untuk produksi EPS digunakan media agar modifikasi MRS-sukrosa 10%, MRS-rafinosa 5%+glukosa 1%, dan MRS-rafinosa 5%. Penggunaan media agar modifikasi MRS-sukrosa 10% adalah untuk verifikasi terhadap produksi EPS pada media agar modifikasi MRS-rafinosa 5%+glukosa 1%, dan MRS-rafinosa 5%. Pemilihan media tersebut berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya (39, 40).

Berdasarkan orientasi yang dilakukan, dipilih $(OD)_{600} \times \text{volume transfer}$ senilai 1,5245. Inkubasi dilakukan selama 5 hari pada suhu 30°C (44).

Isolasi dan purifikasi EPS dilakukan secara bertahap. Tahap pertama dilakukan perolehan biomassa dengan cara mengumpulkan biomassa dari permukaan medium menggunakan batang pengaduk gelas yang steril setelah ditambahkan akuades steril terlebih dahulu. Setelah semua biomassa lepas dari medium, campuran tersebut

ditampung ke dalam tabung Falcon 50 ml untuk disentrifugasi pada 6000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh didekantasi kemudian ditambahkan ke dalam larutan etanol 96% yang suhunya 4°C sebanyak dua kali volume supernatan. Produk EPS perlahan-lahan akan mengendap setelah disimpan selama beberapa waktu dalam lemari pendingin suhu 4°C (2-7hari).

Penggunaan etanol 96% dimaksudkan karena pada kadar tersebut etanol dapat mengendapkan polisakarida, sedangkan bila digunakan etanol 80%, beberapa polisakarida dan oligosakarida masih larut. Adapun penggunaan etanol yang dingin dengan suhu 4°C, dimaksudkan karena pada suhu dingin polisakarida akan memiliki kelarutan yang kecil, sehingga proses pengendapan lebih baik.

Kemudian sampel kembali disentrifugasi untuk memisahkan produk EPS sebagai bagian endapan. Endapan EPS yang diperoleh dilarutkan dengan menggunakan akuades dengan kualitas tinggi (akuabides) pada suhu 37°C untuk membantu pelarutan. Sentrifugasi dan pengendapan dilakukan berulang kali sebagai tahap purifikasi. Hal ini dimaksudkan untuk memperoleh EPS yang lebih murni.

Sampel EPS yang sudah murni, dikeringkan dalam desikator. Desikator digunakan untuk mengeringkan EPS karena diharapkan didapatkan hasil endapan EPS yang lebih baik dan lebih murni dibandingkan dengan metode penelitian sebelumnya, dimana pada

metode penelitian sebelumnya digunakan *freeze dryer* untuk mengeringkan sampel EPS.

Pada penggunaan *freeze dryer*, sampel berupa larutan dibekukan pada suhu -20°C , kemudian dikeringkan dengan menggunakan *freeze dryer* sehingga jika ada pengotor yang terlarut, maka pengotor tersebut akan terjerap dalam massa EPS selama pemrosesan. Sedangkan pada metode penelitian dengan menggunakan desikator, endapan EPS dipisahkan dari larutan, kemudian dikeringkan sehingga pengotor yang terdapat pada endapan EPS akan lebih sedikit. Hal ini dapat dilihat pada spektrum ^1H NMR dari EPS galur MBF 8-2 yang ditumbuhkan pada medium cair MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5% dari penelitian sebelumnya menggunakan *freeze dryer* dibandingkan dengan spektrum ^1H NMR dari EPS galur BAL yang ditumbuhkan pada medium agar MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5% dari penelitian ini menggunakan desikator. Pada spektrum ^1H NMR dari EPS galur MBF 8-2 yang ditumbuhkan pada medium cair MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5% dari penelitian sebelumnya menggunakan *freeze dryer* muncul *peak* yang berasal dari pengotor, dimana jumlah *peak* tersebut lebih banyak dibandingkan dengan jumlah *peak* yang muncul pada spektrum ^1H NMR dari EPS galur BAL yang ditumbuhkan pada medium agar MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5% dari penelitian ini menggunakan desikator.

Setelah kering, sampel dikirimkan ke Pusat Penelitian Kimia LIPI Serpong untuk diukur dengan menggunakan Spektrometer NMR 500MHz proton dan karbon. Setelah didapatkan hasil pengukuran NMR, dilakukan analisis berdasarkan hasil yang didapatkan dengan membandingkan sinyal yang terdapat pada spektrum sampel dengan sinyal yang terdapat pada spektrum standar inulin, spektrum MBF 8-2 yang ditumbuhkan pada medium cair MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5% yang berasal dari penelitian sebelumnya menggunakan pengeringan dengan *freeze dryer* serta berdasarkan literatur.

Spektrum ^1H NMR dari sampel EPS yang berasal dari MBF 8-2 yang ditumbuhkan pada medium cair MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5% yang berasal dari penelitian sebelumnya menggunakan pengeringan dengan *freeze dryer* muncul pada geseran kimia (δ) 5,036- 3,573 ppm, sedangkan D₂O yang digunakan sebagai pelarut muncul pada geseran kimia (δ) sekitar 4,818 ppm.

Adanya sinyal doublet pada δ 5,032 ppm dimana daerah tersebut merupakan daerah anomerik ($\delta = 5,3 - 4,3$ ppm), menunjukkan adanya proton anomerik. Kemudian, setelah menghitung tetapan *J coupling*, didapat bahwa senyawa yang terdeteksi pada spektrum sampel adalah bentuk alfa, hal ini dicirikan dengan nilai tetapan *J coupling* dari karbon nomor dua yang memiliki *J coupling* yang rendah. Apabila tetapan *J-coupling* yang dimiliki suatu senyawa bernilai tinggi ($J \geq 6$), maka senyawa tersebut memiliki bentuk β . Berdasarkan

perbandingan dengan literatur, didapatkan bahwa proton anomerik pada spektrum merupakan tipe α - (1 \rightarrow 6).

Adanya proton anomerik menunjukkan bahwa senyawa yang terdeteksi adalah tipe glukana. Hal ini dikarenakan adanya proton anomerik merupakan ciri khas dari glukana, sedangkan fruktana tidak memiliki proton anomerik.

Pada pengukuran sampel EPS dari MBF 8-2 yang ditumbuhkan pada medium cair MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5% yang berasal dari penelitian sebelumnya menggunakan pengeringan dengan *freeze dryer* didapatkan hasil analisis struktur senyawa berupa glukana tipe α - (1 \rightarrow 6), hal ini kemungkinan dikarenakan enzim glukansukrase masih tetap aktif sehingga dihasilkan senyawa glukana. Namun dari penelitian yang dilaporkan (Malik et al., 2009), dinyatakan adanya gen penyandi enzim fruktansukrase. Hasil isolasi EPS ini ternyata tidak dapat mendukung data molekuler tersebut. Kemungkinan enzim fruktansukrase yang dimiliki oleh BAL yang dipilih dalam penelitian ini tidak aktif pada kondisi yang diaplikasikan.

Pada spektrum NMR dari MBF 8-2, CNC 2(1) dan CNC6 yang ditumbuhkan pada medium agar MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5% hanya ditemukan sinyal yang berasal dari pelarut D₂O dan gugus metil dan metilen yang berasal dari etanol yang dipergunakan dalam purifikasi EPS. Sedangkan senyawa EPS tidak memberikan sinyal pada spektrum NMR. Hal ini dikarenakan sampel EPS sukar larut

dalam D₂O. Hal ini mungkin disebabkan oleh polisakarida masih terikat dengan enzim sehingga tidak dapat terdeteksi atau polisakarida yang diproduksi adalah polisakarida rantai panjang sehingga tidak dapat diamati dengan NMR.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Produksi EPS dari BAL penghasil EPS galur *Weissella confusa* MBF 8-2 (38), *Weissella confusa* CNC 2(1), dan CNC 6 (39) pada media agar modifikasi MRS-sukrosa 10% dan media agar modifikasi MRS-rafinosa 5%+glukosa 1% menghasilkan serbuk EPS berwarna putih sampai kuning kecoklatan.
2. Analisis struktur biopolimer fruktan berdasarkan hasil spektroskopi NMR proton dan karbon menunjukkan bahwa EPS yang berasal dari galur *Weissella confusa* MBF 8-2 (38), *Weissella confusa* CNC 2(1), dan CNC 6 (39) tidak dapat diamati strukturnya menggunakan spektroskopi NMR proton dan karbon

B. SARAN

1. Untuk memperoleh hasil produksi EPS yang optimal, perlu dilakukan optimasi pertumbuhan EPS, yang meliputi konsentrasi sumber karbon dan lamanya waktu produksi EPS.

2. Penggunaan desikator dengan pompa vakum akan lebih membantu cepatnya pengeringan EPS.
3. Agar didapatkan struktur senyawa dengan bobot molekul yang lebih rendah sehingga dapat dianalisa dengan Spektroskopi NMR, perlu dilakukan hidrolisis parsial pada EPS.



DAFTAR ACUAN

1. Van der Meulen R, Grosu-Tudor S, Mozzi F, Vaningelgem F, Zamfir M, de Valdez GF & De Vuyst L. Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and gene involved. *Intl. J. of Food Microbiol.* 118, 2007: 250-258.
2. Sandford PA & J Bard. Industrial utilization of polysaccharides. Dalam: Aspinall, G.O.(ed.), *The Polysaccharides*, Volume 2. New York: Academic Press, 1983: 411-490.
3. Sutherland IW. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol.* 16, 1998: 41-46.
4. Ruas-Madiedo P & de los Reyes-Gavilán CG. Invited Review: Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *J. Dairy Sci.* 88, 2005: 843-856.
5. Vereyken IJ, Chupin V, Islamov A, Kuklin A, Hinch DK & de Kruijff B. The Effect of Fructan on the Phospholipid Organization in the Dry State. *Biophysical Journal.* 85, 2003: 3058-3065.
6. You-Li Fu. Isolation, purification, and structural elucidation of a fructan from *Arctium lappa L.*: Short Communication. *J. of Med. Plants Res.* 3(3), 2009: 171-173.
7. Frengova GI, Simova ED, Beshkova DM & Simov ZI. Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria of Kefir Grains. *Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung* 57c, 2002: 805-810

8. Meng G & Futterer K. Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase: Research Article. *BMC Structural Biol.* 8, 2008: 16.
9. Banguela A & Hernandez L. Fructans: from natural sources to transgenic plants. *Biotechnologia Aplicada* 23, 2006: 202-210.
10. Brock TD & Madigan MJ. *Biology of Microorganism: 6th Edition*. New Jersey: Prentice Hall , 1991: 771-775
11. Anonim. *Fermented Fruits and Vegetables: A Global Perspective, Chapter 5: Bacterial Fermentations*. FAO Corporate Document Repository. <http://www.fao.org/docrep/x0560e/x0560e10.htm>. (5 Maret 2009, pk.10:34:49)
12. Harley JP & Prescott LM. *Laboratory exercises in microbiology, 4th Edition*. Boston :McGraw Hill Book Company, 1999: 42-46, 182-183.
13. Fagbemi AO & Ijah UJJ. Microbial population and biochemical changes during production of protein-enriched fufu. *World J. of Microbiol. and Biotechnol.* 22, 2006: 635-640.
14. Iliev I, Ivanova I & Ignatova C. Glucansucrases from lactic acid bacteria (LAB). *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 20, 2006.
15. Savadogo A, Ouattara CAT, Savadogo PW, Barro N, Ouattara AS & Traoré AS. Full Length Research paper: Identification of Exopolysaccharides-Producing Lactic Acid Bacteria from Burkina Faso Fermented Milk Samples. *African J. of Biotechnol.* 3(3), 2004: 189-194.

16. Tortora GJ, Funke BR & Case CL. *Microbiology: An Introduction*, Media Update, 7th ed. San Fransisco :Benjamin Cummings , 2002: 775-783.
17. Broadbent JR, McMahon DJ, Welker DL, Oberg CJ & Moineau S. Biochemistry, Genetics, and Applications of Exopolysaccharide Production in *Streptococcus thermophilus*: A Review. *J. of Dairy Sci.* 86, 2003: 407-423.
18. Van Hijum SAFT, Kralj S, Ozimek LK, Dijkhuizen L & Van Geel-Schutten GH. General Introduction. Dalam: Van Hijum SAFT. *Fructosyltransferases of Lactobacillus reuteri: Characterization of genes, enzymes, and fructan polymers*. Enschede: Printpartners Ipskamp, 2004: 9-18.
19. Oberg CJ, Broadbent JR & McMahon DJ. Applications of EPS production by LAB. *J. of Dairy Sci.* 85(1).
20. Champagne CP, Gardner NJ & Lacroix C. Fermentation technologies for the production of exopolysaccharide-synthesizing *Lactobacillus rhamnosus* concentrated cultures. *E-J. of Biotechnol.* 10(2), 2007.
21. Geel-Schutten GH, Van Flesch F, ten Brink B, Smith MR & Dijkhuizen L. Screening and Characterization of *Lactobacillus* strains Producing Large Amounts of Exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 1998: 697- 703.
22. Goldman D, Lavid N, Schwartz A, Shoham G, Danino D & Shoham Y. Two Active Forms of *Zymomonas mobilis* Levansucrase: An Ordered Microfibril Structure of The Enzyme Promotes Levan Polymerization. *J. of Biol. Chem.* 2008.

23. Saito K, Goto H, Yokota A & Tomita F. Purification of Levan Fructotransferase from *Arthrobacter nicotinovorans* GS-9 and Production of DFA IV from Levan by The Enzyme. *Biosci., Biotechnol., and Biochem.* 61(10), 1997: 1705-1709.
24. Abdel-fattah AF, El-Refai HA & Mostafa FA. Biosynthesis of levansucrase by free and immobilized cells of *Bacillus circulans* including continuous fermentation. *Acta Pharmaceutica Scientia* 50, 2008: 203-212.
25. Anwar MA, Kralj S, van der Maarel MJEC & Dijkhuizen L. The Probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 Produces High-Molecular-Mass Inulin from Sucrose by Using an Inulosucrase Enzyme. *Appl. and Environ. Microbiol.* 74(11), 2008: 3426-3433.
26. Phelps CF. The physical properties of inulin solutions. *Biochem J* 95, 1965: 41-47.
27. Niness KR. Inulin and Oligofructose: What Are They? . *J. of Nutr.* 129, 1999: 1402S-1406S.
28. Coussement PAA. Inulin and Oligofructose: Safe Intakes and Legal Status. *J. of Nutr.* 129, 1999: 1412S-1417S.
29. Pool-Zobel BL. Inulin-type Fructans and Reduction in Colon Cancer Risk: Review of Experimental and Human Data. *Brit. J. of Nutr.* 93(1), 2005: S73-S90.
30. Roberfroid MB. Introducing Inulin-type Fructans. *Brit. J. of Nutr.* 93(1), 2005: S13-S25.

31. Harmita. *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI, 2006.
32. Harmita. *Buku Elusidasi Struktur*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI, 2007.
33. Friebolin H. *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Second, enlarged edition*. New York, USA: VCH Publishers, 1993.
34. Bretmaier E. *Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry: A Practical Guide*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd., 1993.
35. Becker ED. *High Resolution NMR: Theory and Chemical Applications, 3rd ed.* California: Academic Press, 2000.
36. Breitmaier E & Voelter W. *Carbon-13 NMR Spectroscopy: High-Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry, 3rd completely revised ed.* New York: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1990.
37. Malik A, Radji M, Kralj S & Dijkhuizen L. Screening of Lactic Acid Bacteria from Indonesia Reveals Glucansucrase and Fructansucrase Genes in Two Different *Weissella confusa* Strains from Soya. *FEMS Microbiol Lett.* 300, 2009: 131-138.
38. Malik A, Hermawati AK, Hestiningtyas M, Soemiati A & Radji M. Isolasi dan Skrining Molekuler Bakteri Asam Laktat Pembawa Gen Glukansukrase dari Sumber- sumber Mengandung Gula. *Makara (Sains, accepted)*.
39. Pratiwi, Tri Vita. *Skrining Aktivitas Fruktansukrase Terhadap Koleksi Bakteri Asam Laktat Menggunakan Medium Rafinosa*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI, 2009.

40. Handayani, Tri. *Pencarian Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida yang Mempunyai Aktivitas Fruktansukrase dari Koleksi Isolat Asal Sumber Lokal*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI, 2009.
41. Di Cagno R, de Angelis M, Limitone A, Minervini F, Carnevali P, Corsetti A, Gaenzle M, Ciati R & Gobetti M. Glucan and Fructan Production by Sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *J. of Agricultural and Food Chem.* 54, 2006: 9873-9881.
42. Tajima K, Kanio T, Kobayashi Y, Kohno H, Fujiwara M, Shiba T, Erata T, Munekata M & Takai M. Cloning and Sequencing of the Levansucrase Gene from *Acetobacter xylinum* NCI 1005. *DNA Res.* 7, 2000: 237-242.
43. Sheilla. *Identifikasi Produk Eksopolisakarida dan Penentuan Viskositas Struktur dari Beberapa Isolat Bakteri Asam Laktat*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI, 2007.
44. Indriani. *Pemeriksaan Kandungan Bakteri Asam Laktat pada Beberapa Minuman Susu Fermentasi yang Beredar di Pasaran dengan Teknik PCR Menggunakan Gen Penyandi RNA Ribosomal 16S*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI, 2007.
45. Radji M. *Penuntun Praktikum Mikrobiologi Farmasi*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI, 2004.
46. Franck A & De Leenheer L. Inulin. *Orafti Belgium*: 439-447
47. Bounaix MS, Gabriel V, Morel S, Robert H, Rabier P, Remaud-Siméon M, Gabriel B & Fontagné-Faucher C. Biodiversity of Exopolysaccharides Produced from Sucrose by Sourdough Lactic Acid Bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 57, 2009: 10889-10897.

48. Van Geel-Schutten GH. Exopolysaccharide synthesis by *Lactobacillus reuteri*: Molecular Characterization of a fructosyltransferase and a glucansucrase. *Centrum voor Koolhydraat Bio-engineering TNO-RUG*, 2000.
49. Perry JJ & Staley JT. *Microbiology dynamics and diversity*. New York: Saunders College Publishing, 1997: 479-486.
50. Weyens G, *et al.* Production of tailor-made fructans in sugar beet by expression of onion fructosyltransferase genes. *Plant Biotechnol. J.* 2, 2004: 321-327.
51. De Jonge J, Amorij JP, Hinrichs WLJ, Wilschut J, Huckriede A, Frijlink HW. Inulin sugar glasses preserve the structural integrity and biological activity of influenza virosomes during freeze-drying and storage. *Eur. J. of Pharm. Sci.* 32, 2007: 33-44.
52. Van Hijum SAFT, Szalowska E, van der Maarel MJEC & Dijkhuizen L. Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiol.* 150, 2004: 621-630.
53. Oyewole OB & Odunfa SA. Characterization and distribution of lactic acid bacteria in cassava fermentation during fufu production. *J. of Appl. Bacteriol.* 68, 1990: 145-152.
54. Ozimek LK, Kralj S, van der Maarel MJE & Dijkhuizen L. The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiol.* 152, 2006.
55. Bauman RW. *Microbiology*. San Fransisco: Pearson Benjamin Cummings, 2004: 744-748.
56. Fett WF, Osman SF & Dunn MF. Characterization of Exopolysaccharides Produced by Plant-Associated Fluorescent

Pseudomonads. *Appl. and Environ. Microbiol.* 55(3), 1989: 579-583.

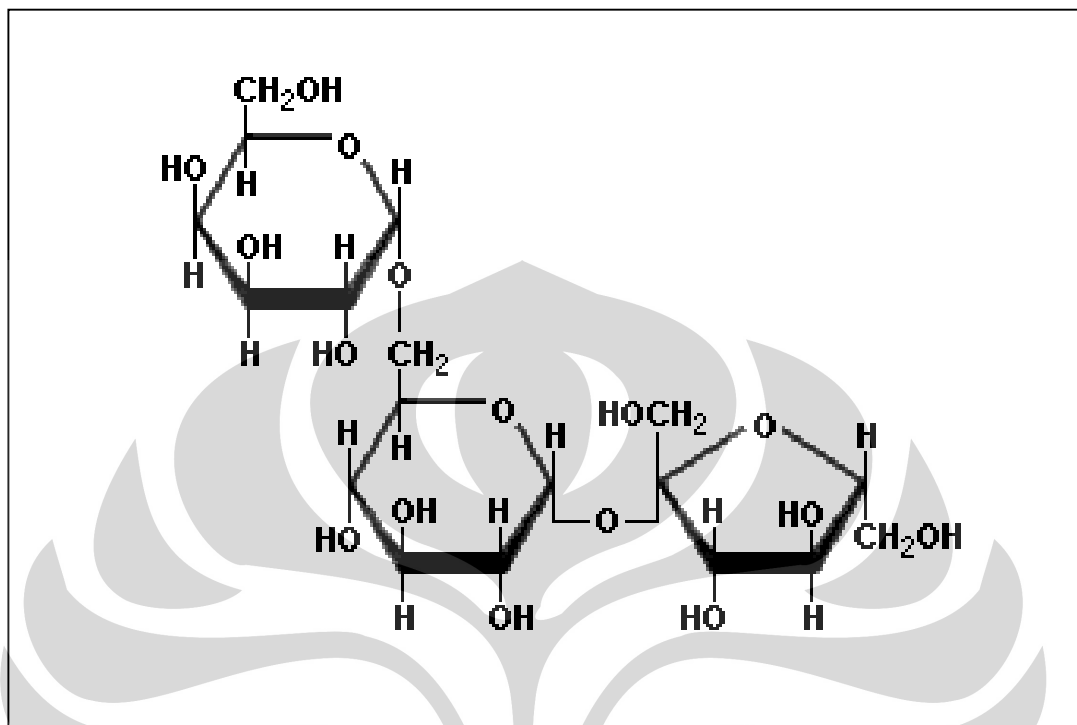
57. Osman SF, Fett WF & Fishman ML. Exopolysaccharides of the Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J. of Bacteriol.* 166(1), 1986: 66-71.
58. Semjonovs P, Jasko J, Auzina I & Zikmanis P. The Use of Exopolysaccharide-Producing Cultures of Lactic Acid Bacteria to Improve the Functional Value of Fermented Foods. *J. of Food Technol.* 6(2), 2008: 101-109.
59. El-Tayeb TS & Khodair TA. Enhanced Production of Some Microbial Exopolysaccharides by Various Stimulating Agents in Batch Culture. *Res. J. of Agriculture and Bio. Sci.* 2(6), 2006: 483-492.
60. Tiekling M, Korakli M, Ehrmann MA, Gänzle MG & Vogel RF. In Situ Production of Exopolysaccharides during Sourdough Fermentation by Cereal and Intestinal Isolates of Lactic Acid Bacteria. *Appl. and Environ. Microbiol.* 69(2), 2003: 945-952.
61. Levander F, Svensson M & Rådström P. Methodology article: Small-Scale Analysis of Exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* Grown In A Semi-defined Medium. *BMC Microbiol.* 1, 2001:23.
62. Azeredo J & Oliveira R. A New Method for Precipitating Bacterial Exopolysaccharides. *Biotechnol. Techniques.* 10(5), 1996: 341-344.
63. Sanni AI, Onilude AA, Ogunbanwo ST, Fadahunsi IF & Afolabi RO. Production of Exopolysaccharides by Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Fermented Foods In Nigeria. *Eur. Food Res. Technol.* 214, 2002: 405-407.
64. Abrams SA, Griffin IJ, Hawthorne KM, Liang L, Gunn SK, Darlington G & Ellis KJ. A Combination of Prebiotic Short- and Long Chain

Inulin-type Fructans Enhances Calcium Absorption and Bone Mineralization In Young Adolescents. *The Am. J. of Clin. Nutr.* 82, 2005: 471-476.

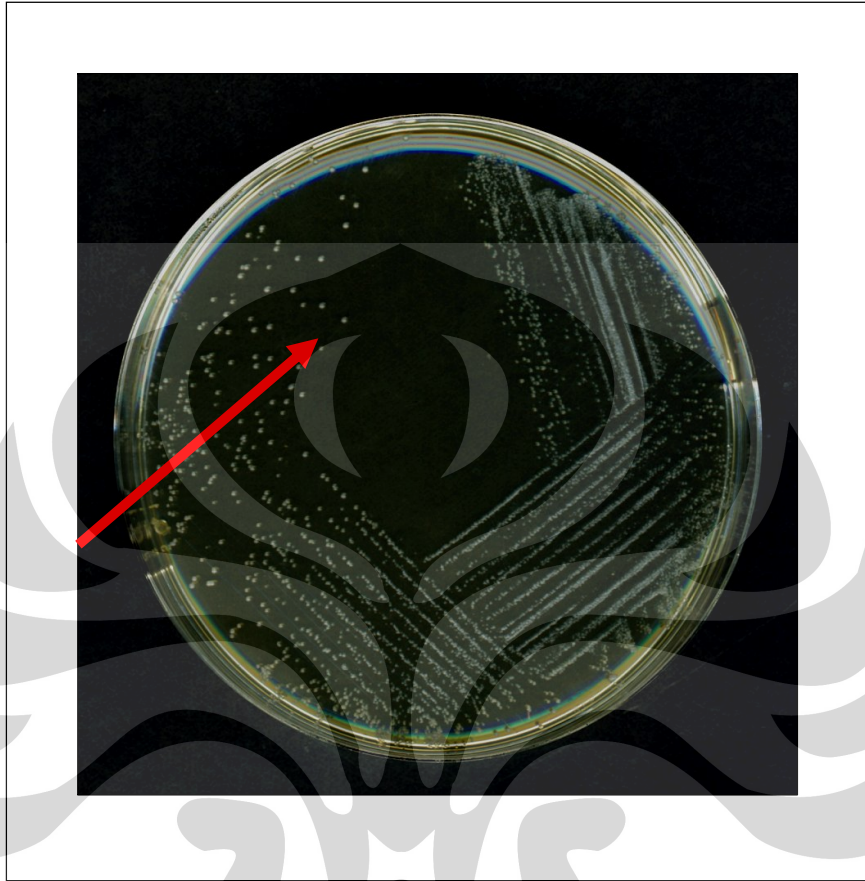




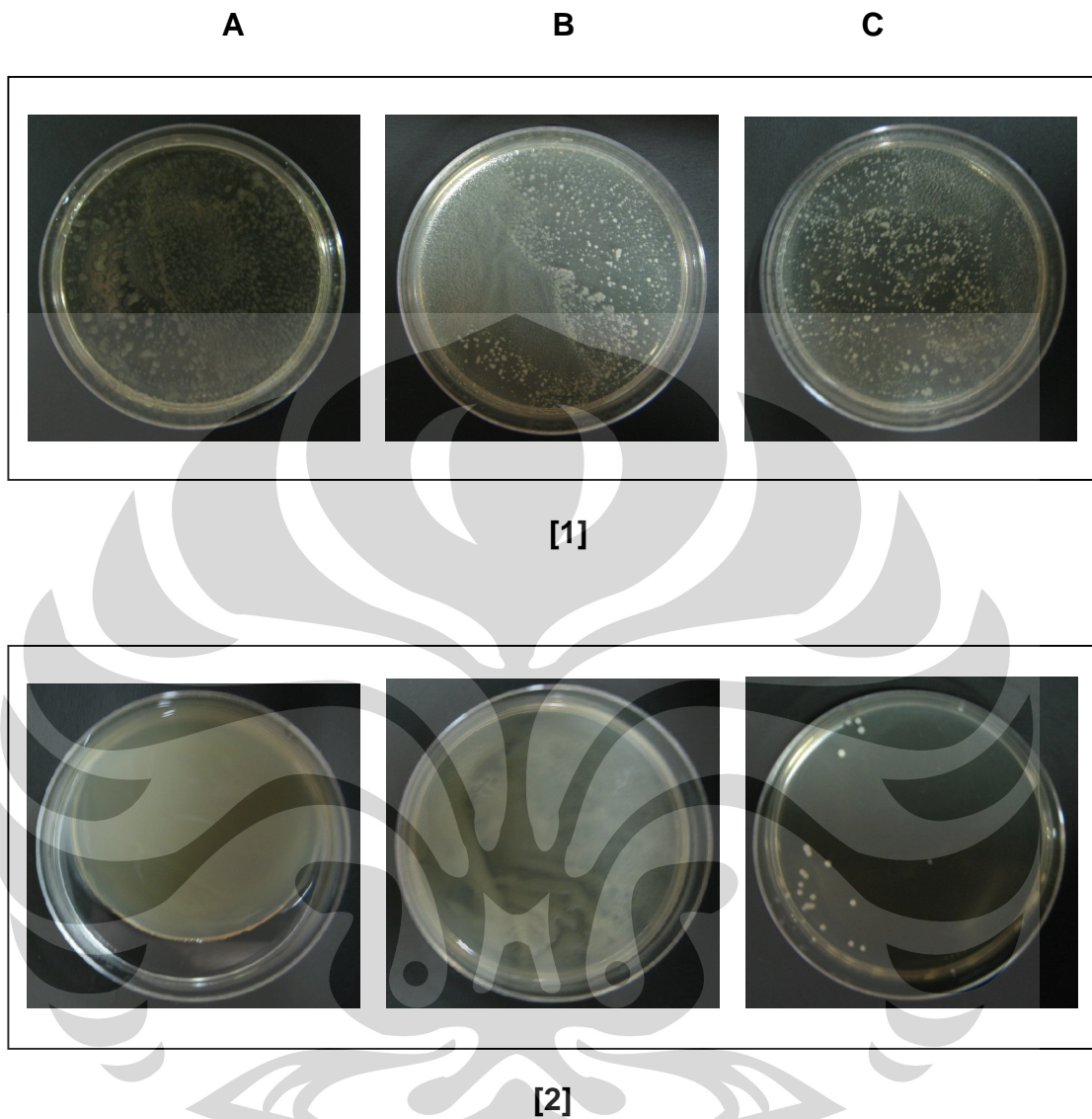
GAMBAR



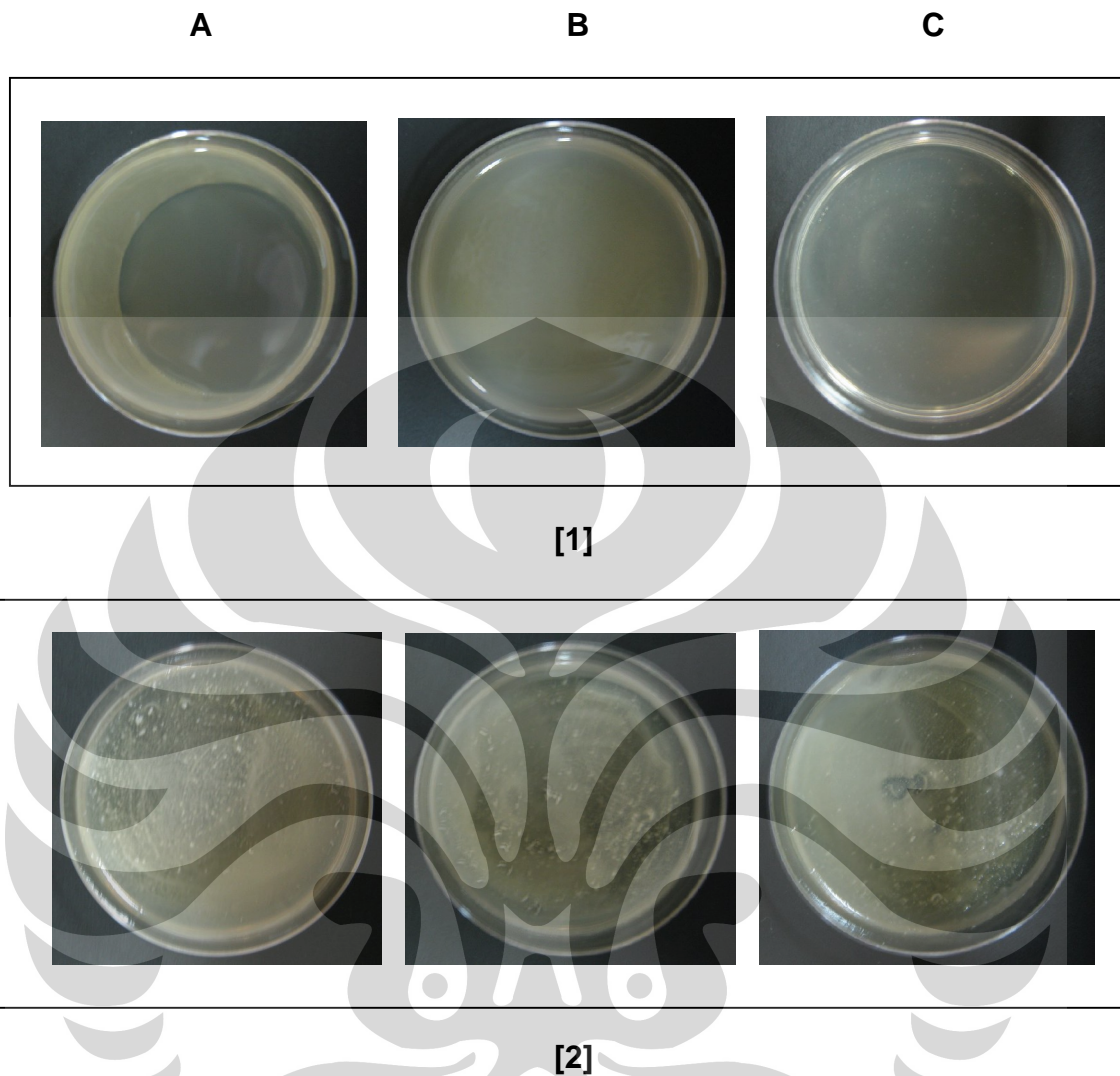
Gambar 2. Struktur Kimia Rafinosa



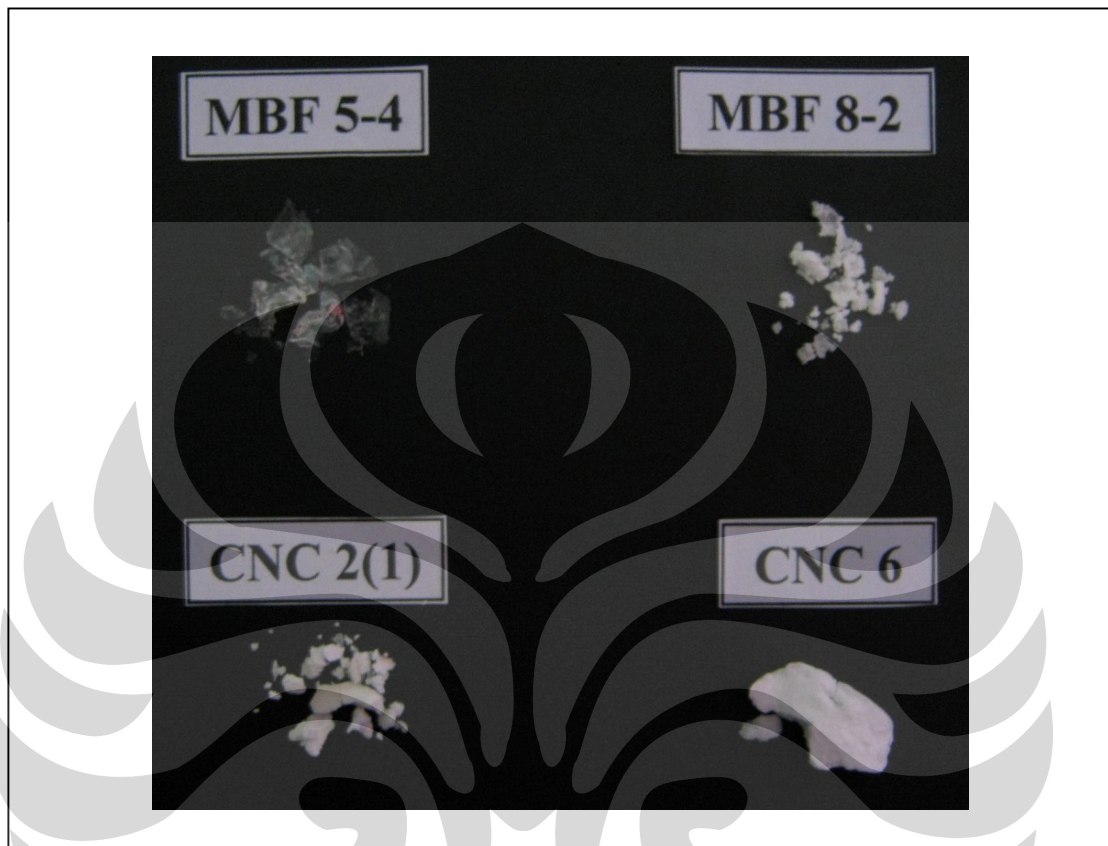
Gambar 3. Morfologi Koloni Tunggal BAL



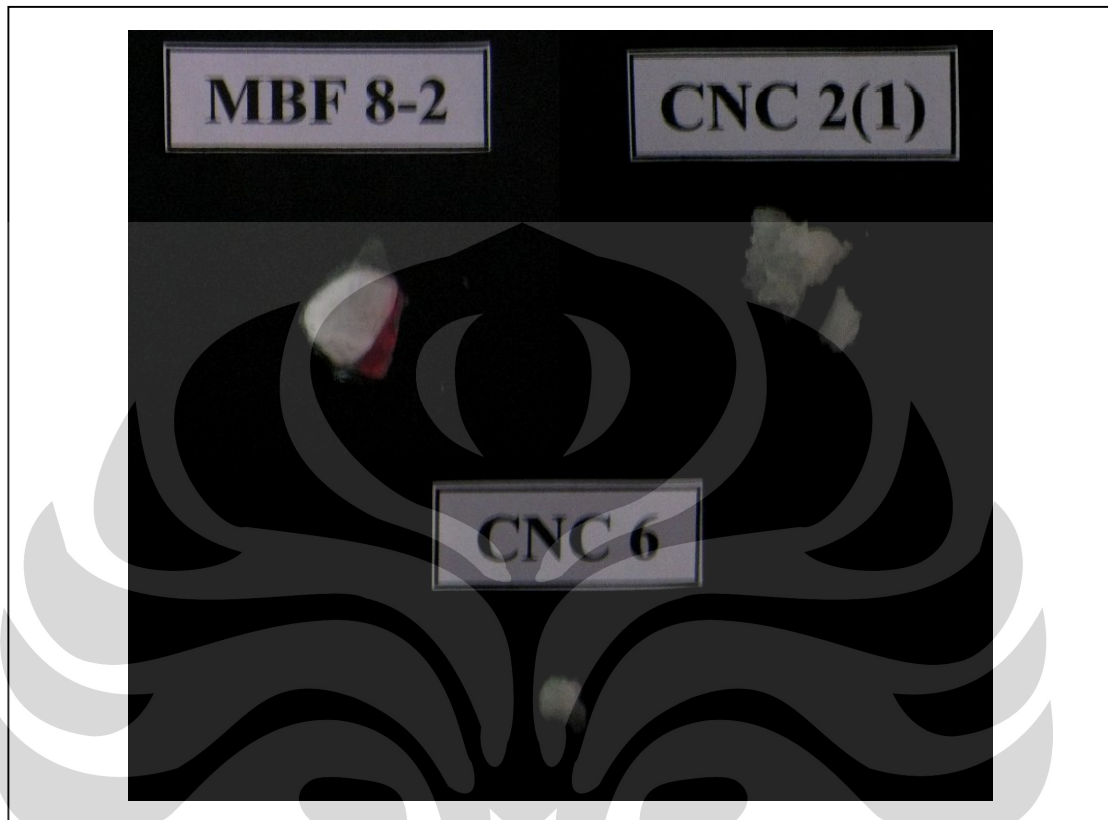
Gambar 4. Biomassa yang dihasilkan oleh galur MBF 5-4 (1) dan MBF 8-2 (2) pada medium agar MRS- sukrosa 10% (A), medium agar MRS- Rafinosa 5%- Glukosa 1% (B), dan medium agar MRS- rafinosa 5% (C).



Gambar 5. Biomassa yang dihasilkan oleh galur CNC 2(1) [1] dan CNC 6 [2] pada medium agar MRS- sukrosa 10% (A), medium agar MRS- Rafinosa 5%-Glukosa 1% (B), dan medium agar MRS- rafinosa 5% (C).



Gambar 6. Hasil isolasi dan purifikasi EPS yang diproduksi dari berbagai isolat BAL pada medium agar MRS- Sukrosa 10%



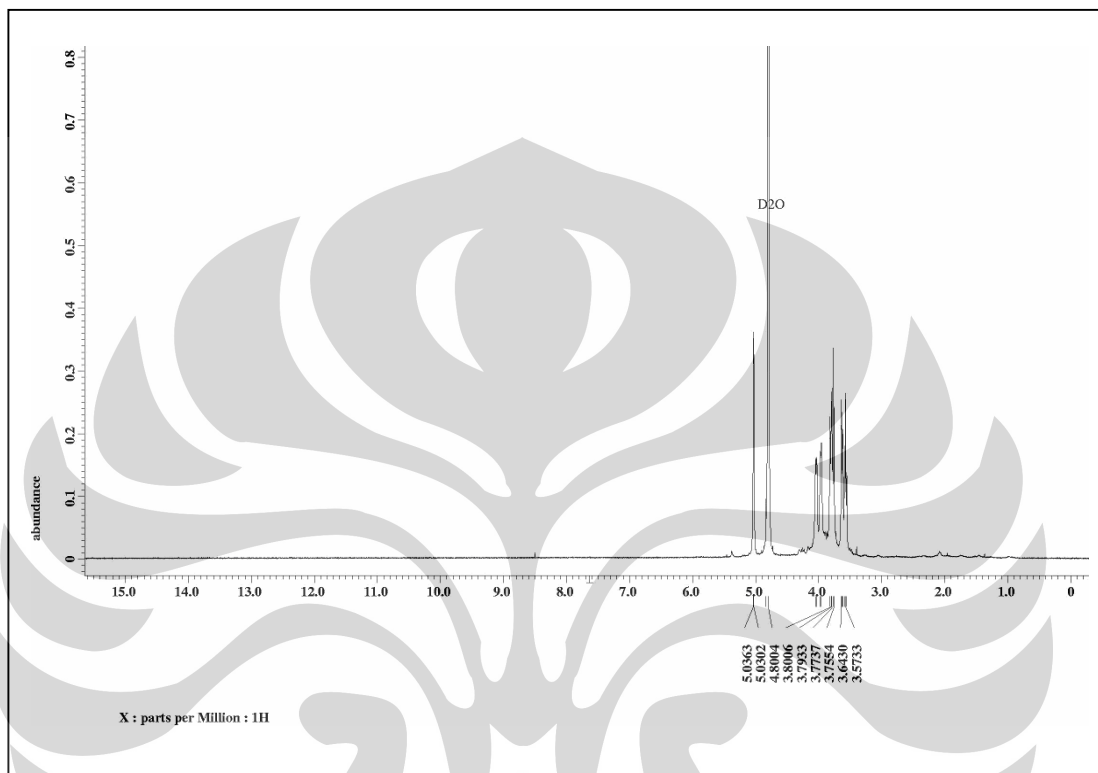
Gambar 7. Hasil isolasi dan purifikasi EPS yang diproduksi dari berbagai isolat BAL pada medium agar MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5%

**A****B**

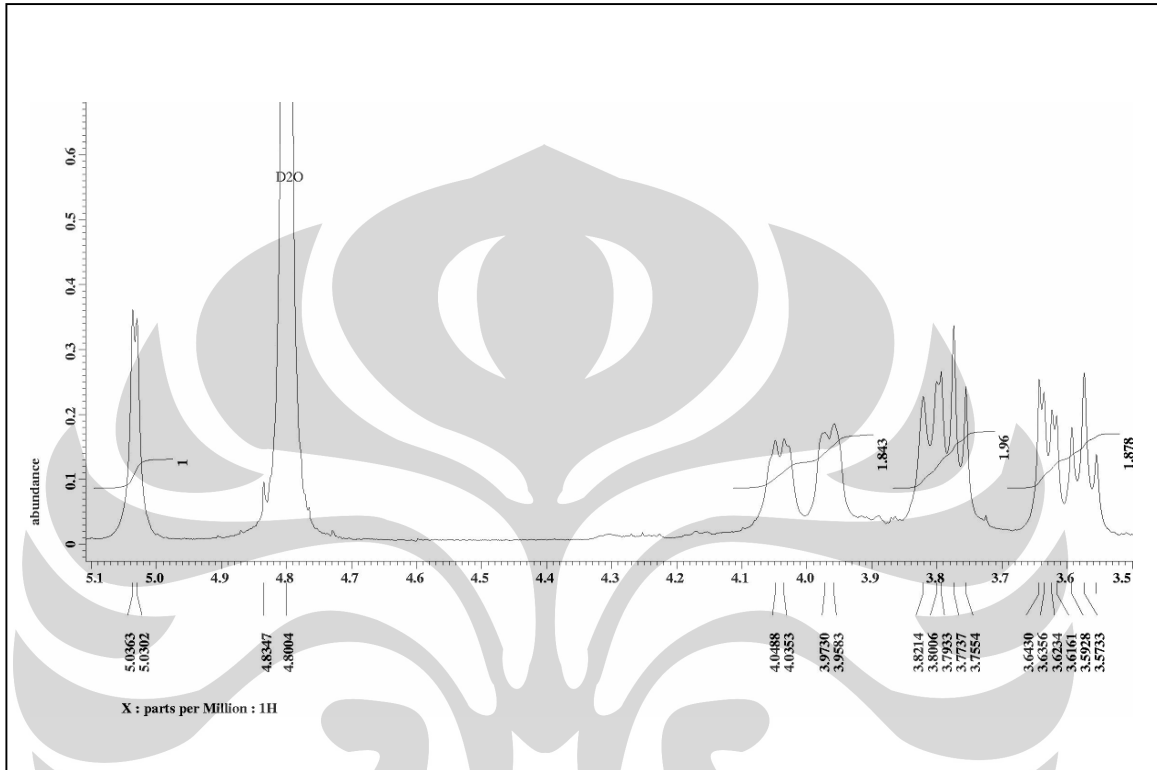
Gambar 8. Sentrifugator Kubota 6800 [A], Tomy MX-305 [B]



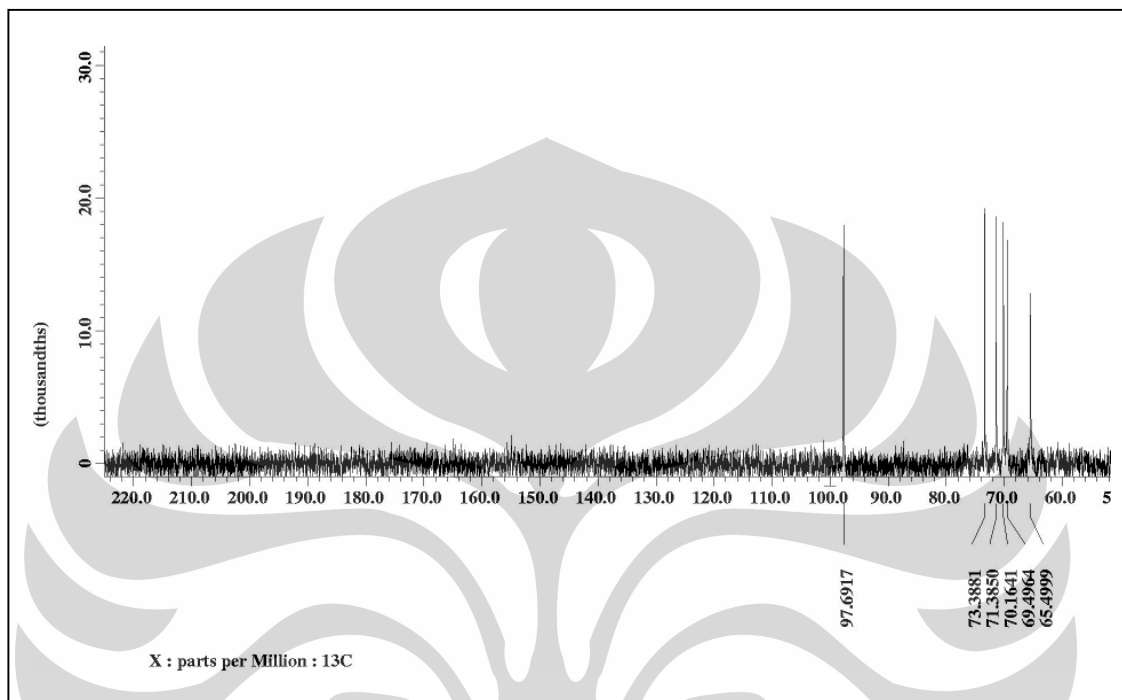
Gambar 9. *Deep Freezer* [New Brunswick Scientific]



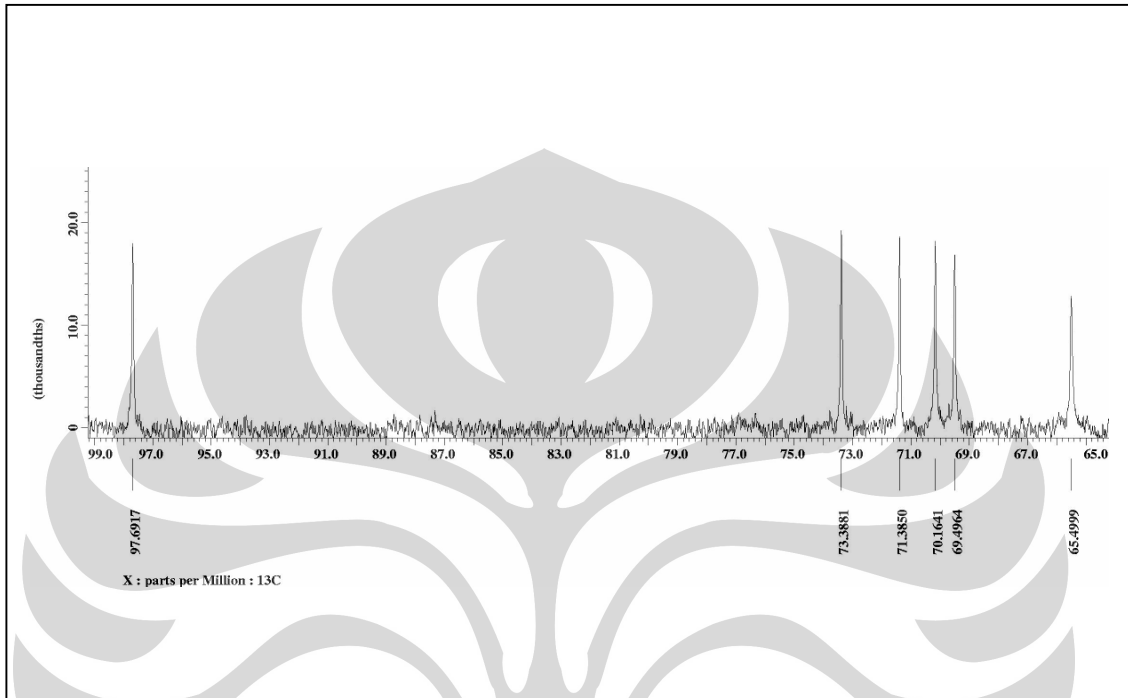
Gambar 10. Spektrum ^1H NMR dari EPS galur MBF 8-2 yang ditumbuhkan pada medium cair MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5% yang digunakan sebagai pembanding



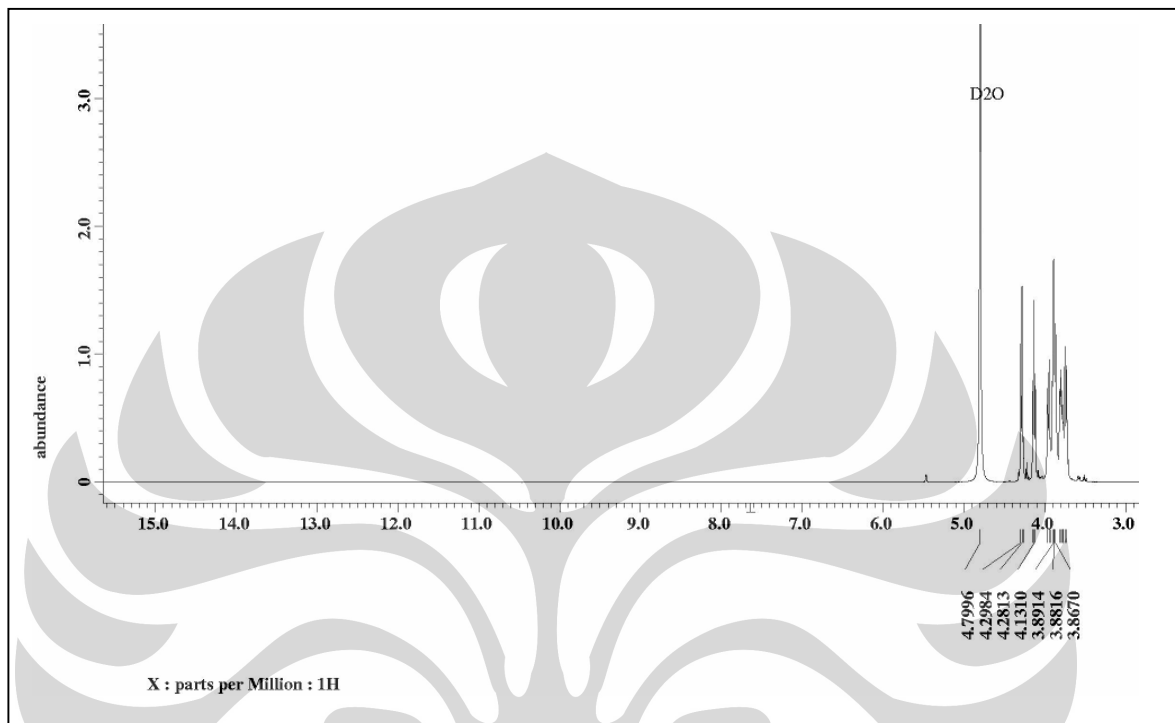
Gambar 11. Spektrum ^1H NMR dari EPS galur MBF 8-2 yang ditumbuhkan pada medium cair MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5% yang digunakan sebagai pembanding (setelah diperjelas).



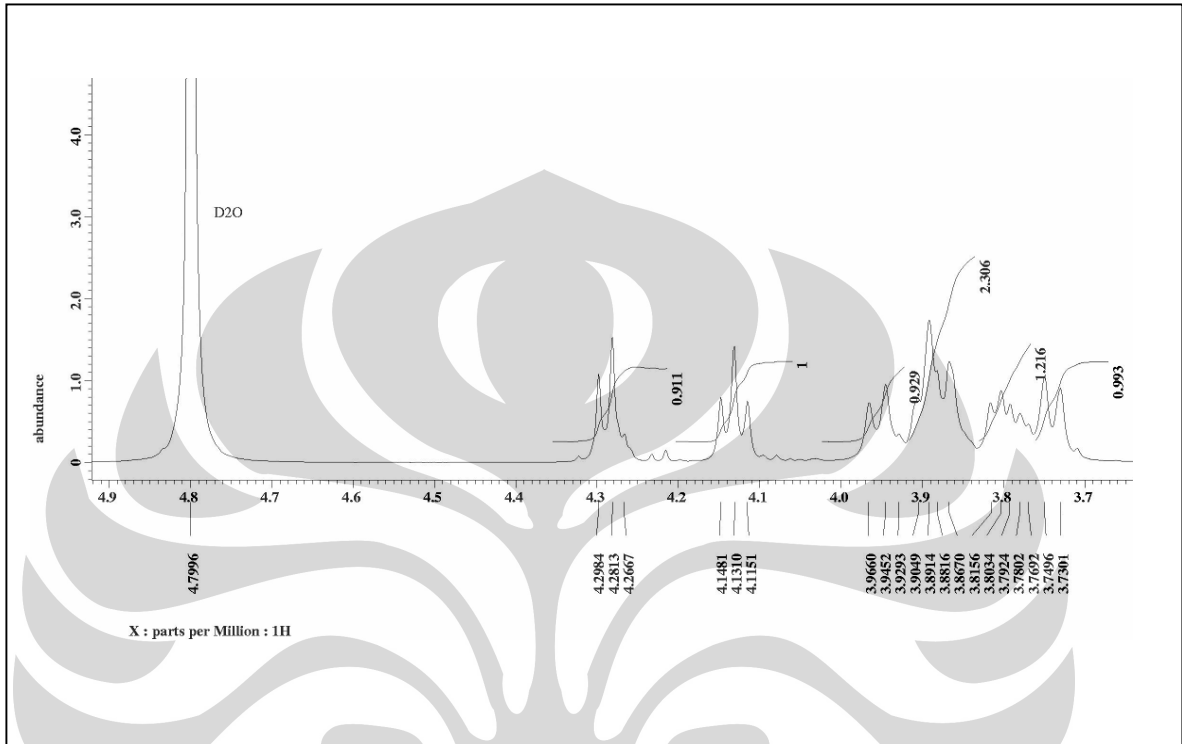
Gambar 12. Spektrum ^{13}C NMR dari EPS galur MBF 8-2 yang ditumbuhkan pada medium cair MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5% yang digunakan sebagai pembanding.



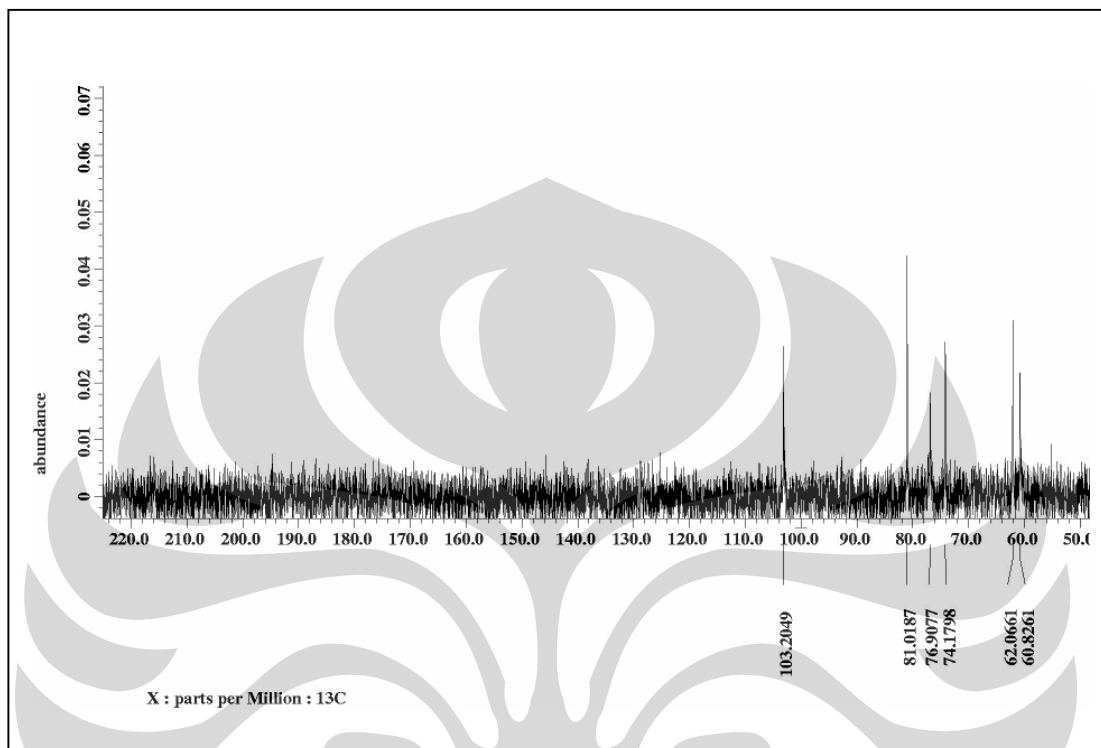
Gambar 13. Spektrum ^{13}C NMR dari EPS galur MBF 8-2 yang ditumbuhkan pada medium cair MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5% yang digunakan sebagai pembanding (setelah diperjelas)



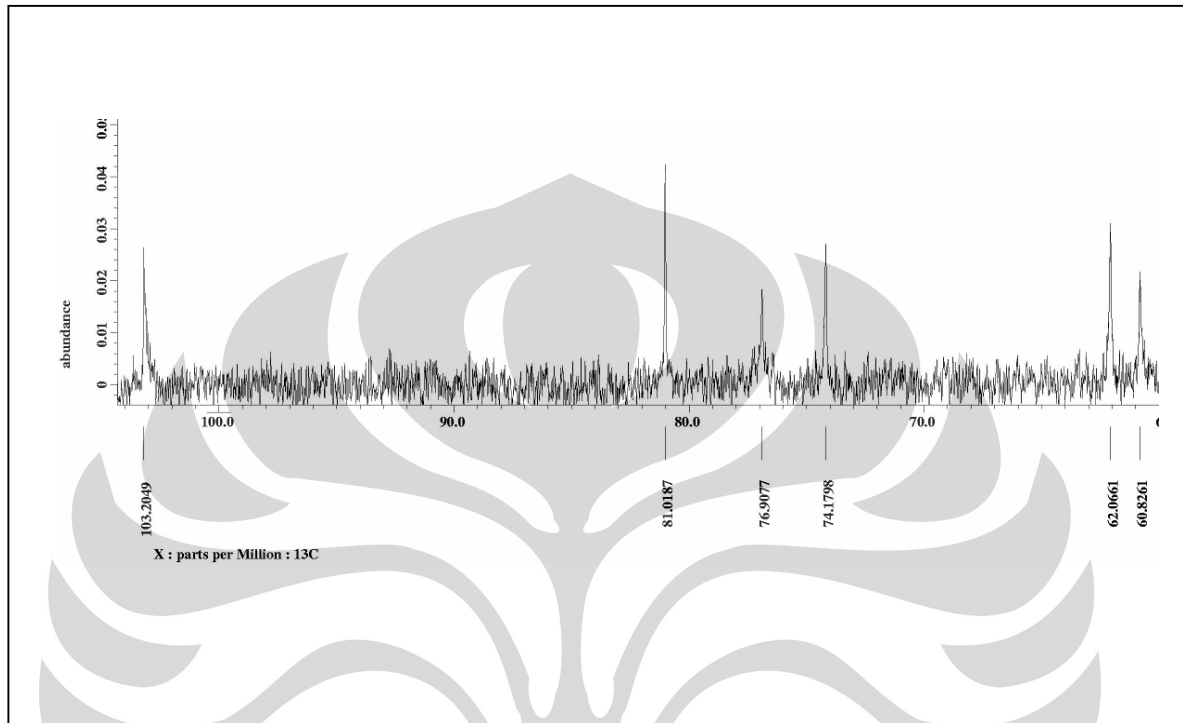
Gambar 14. Spektrum ^1H NMR dari Standar Inulin



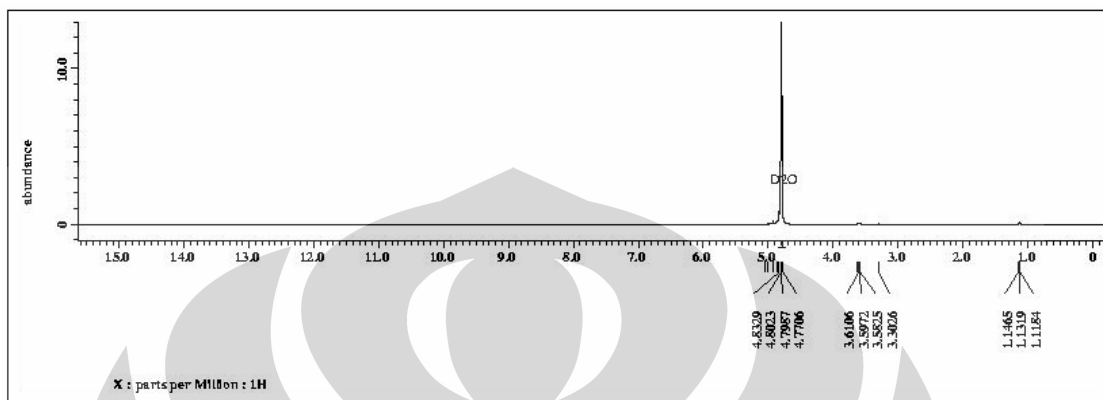
Gambar 15. Spektrum ^1H NMR dari Standar Inulin (setelah diperjelas)



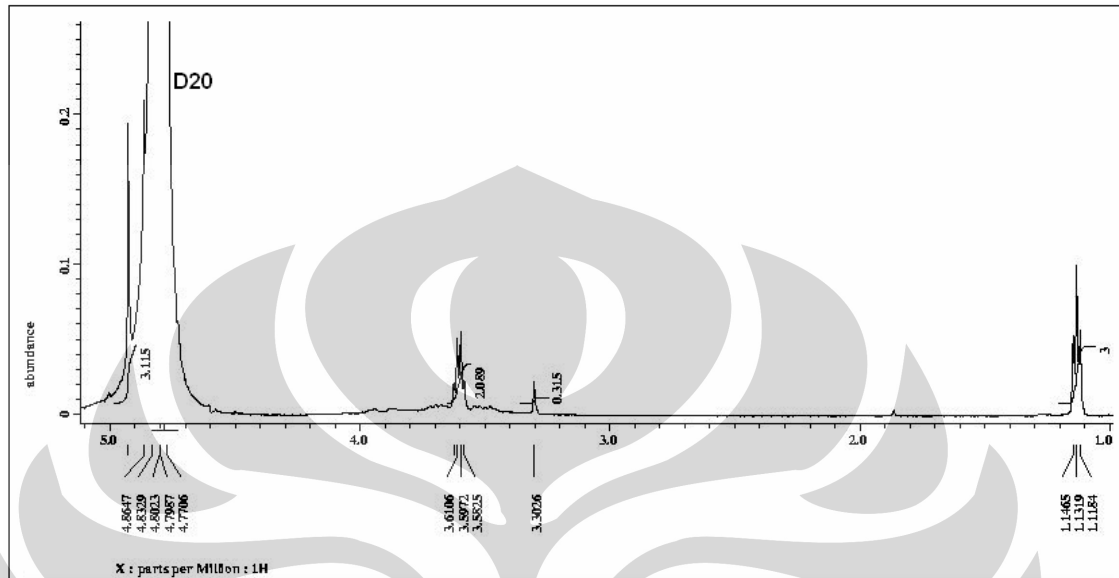
Gambar 16. Spektrum ^{13}C NMR dari Standar Inulin



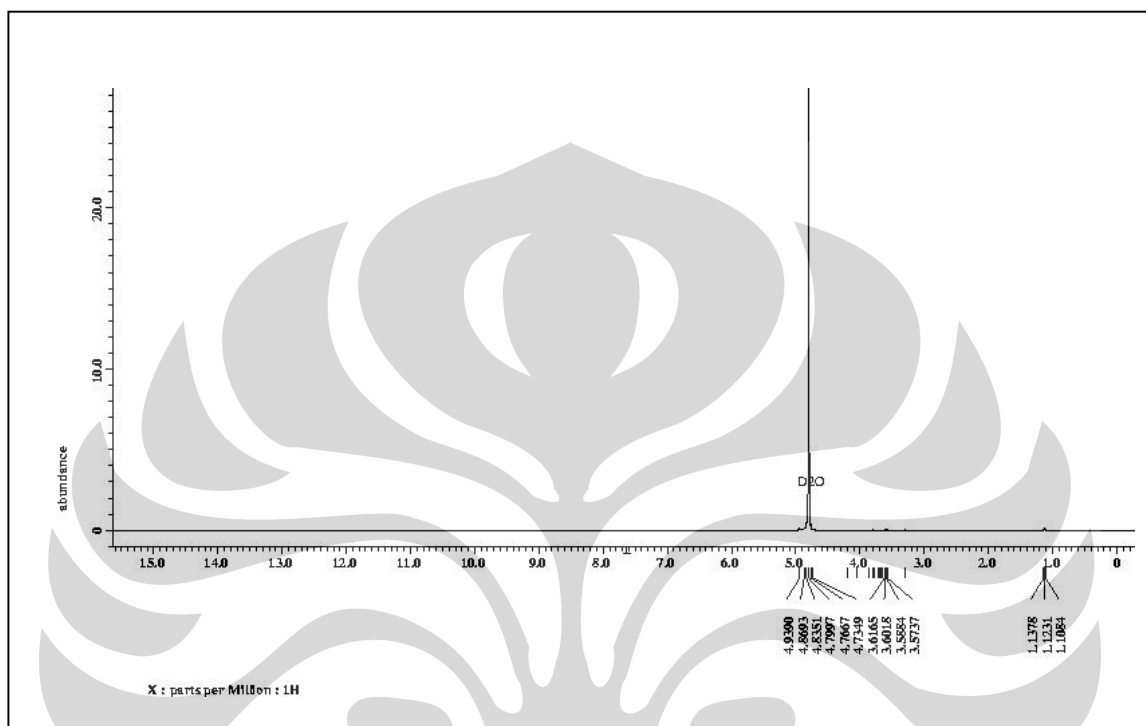
Gambar 17. Spektrum ^{13}C NMR dari Standar Inulin (setelah diperjelas)



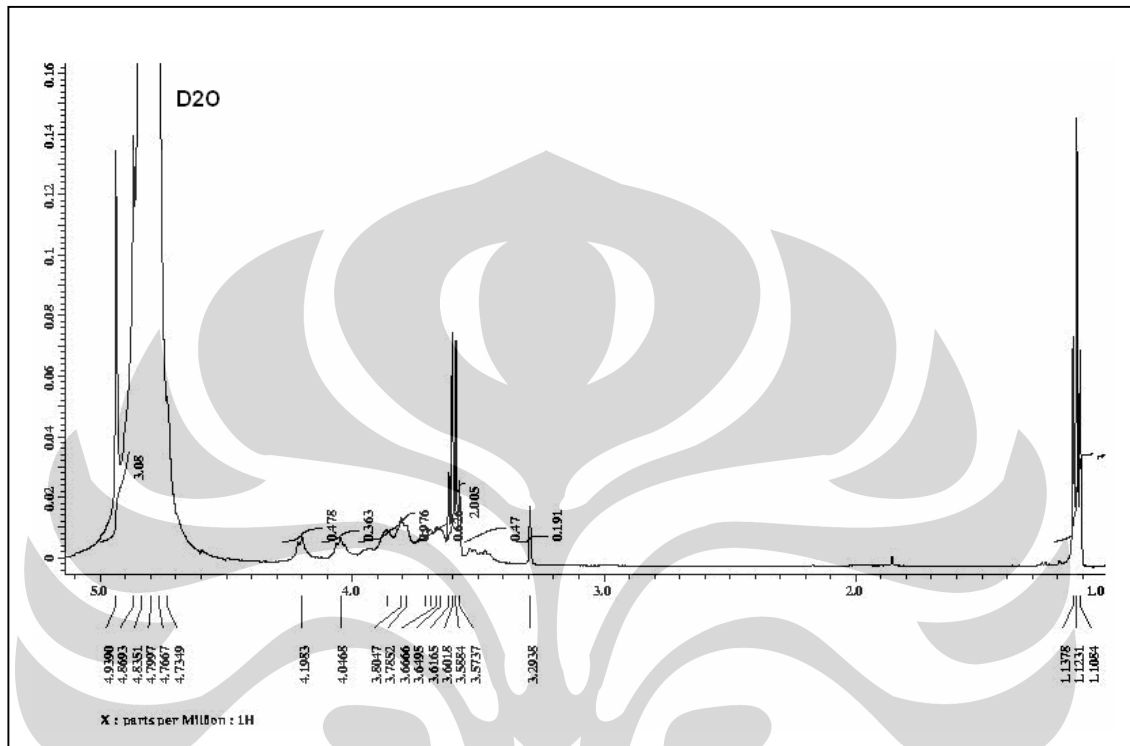
Gambar 18. Spektrum ^1H NMR dari EPS galur MBF 8-2 yang ditumbuhkan pada medium agar MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5%



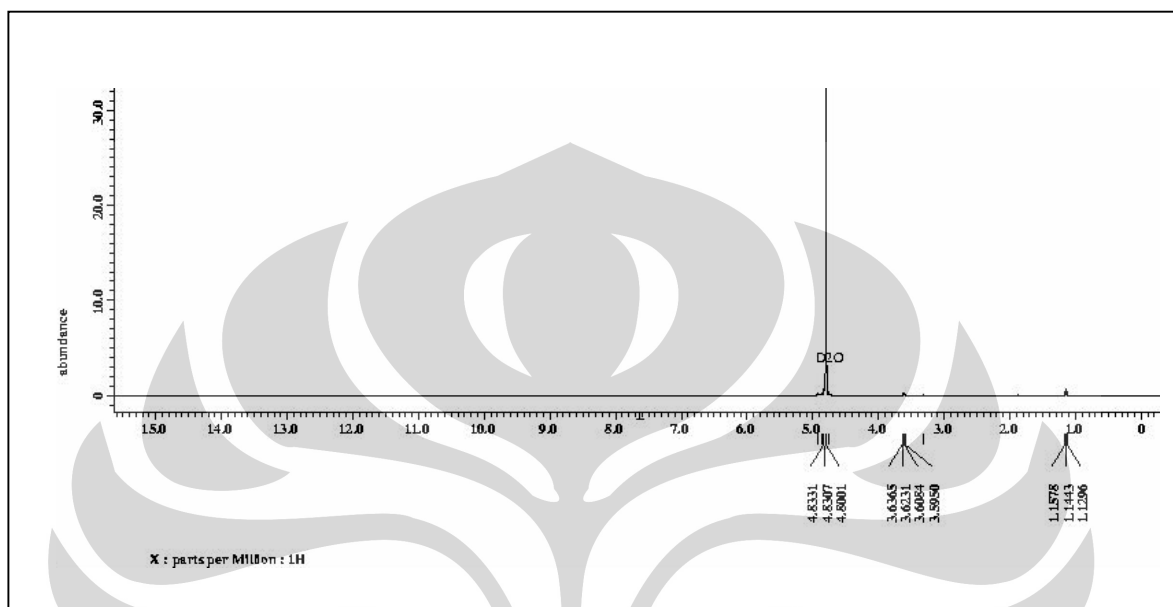
Gambar 19. Spektrum ^1H NMR dari EPS galur MBF 8-2 yang ditumbuhkan pada medium agar MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5% (setelah diperjelas)



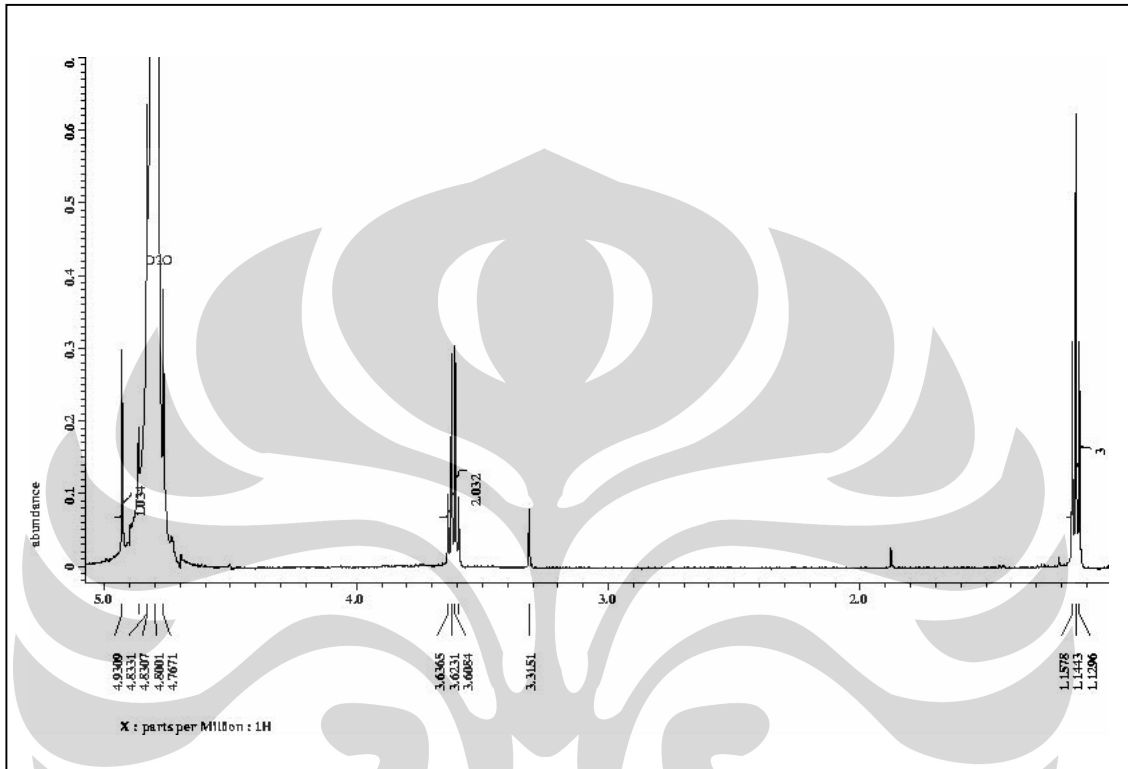
Gambar 20. Spektrum ^1H NMR dari EPS galur CNC 2(1) yang ditumbuhkan pada medium agar MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5%



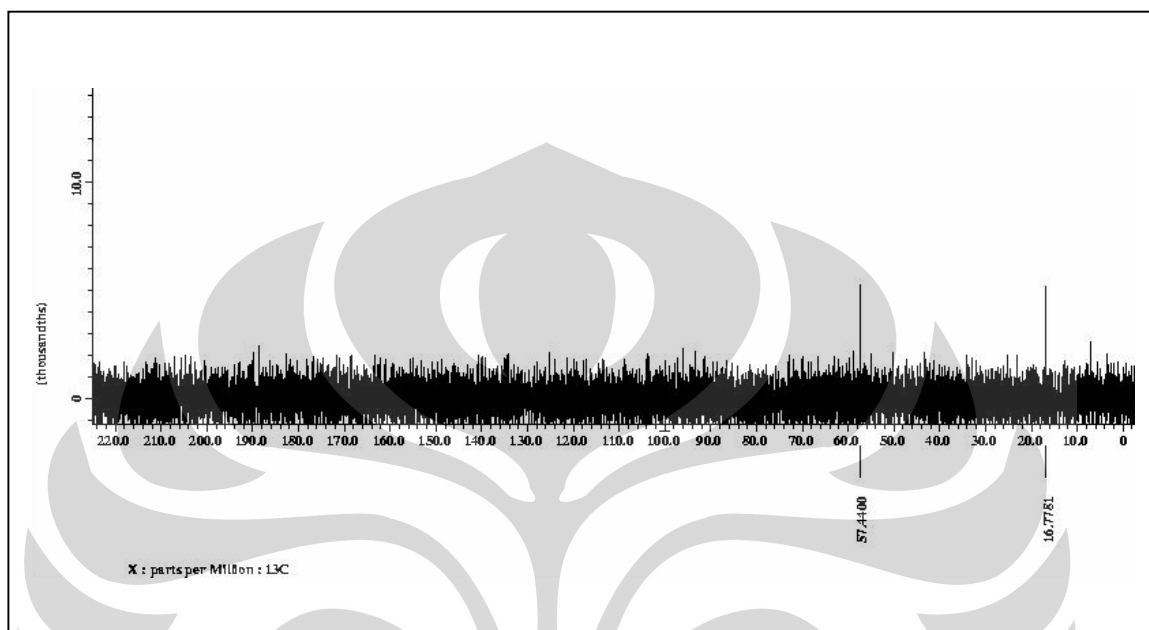
Gambar 21. Spektrum ^1H NMR dari EPS galur CNC 2(1) yang ditumbuhkan pada medium agar MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5% (setelah diperjelas)



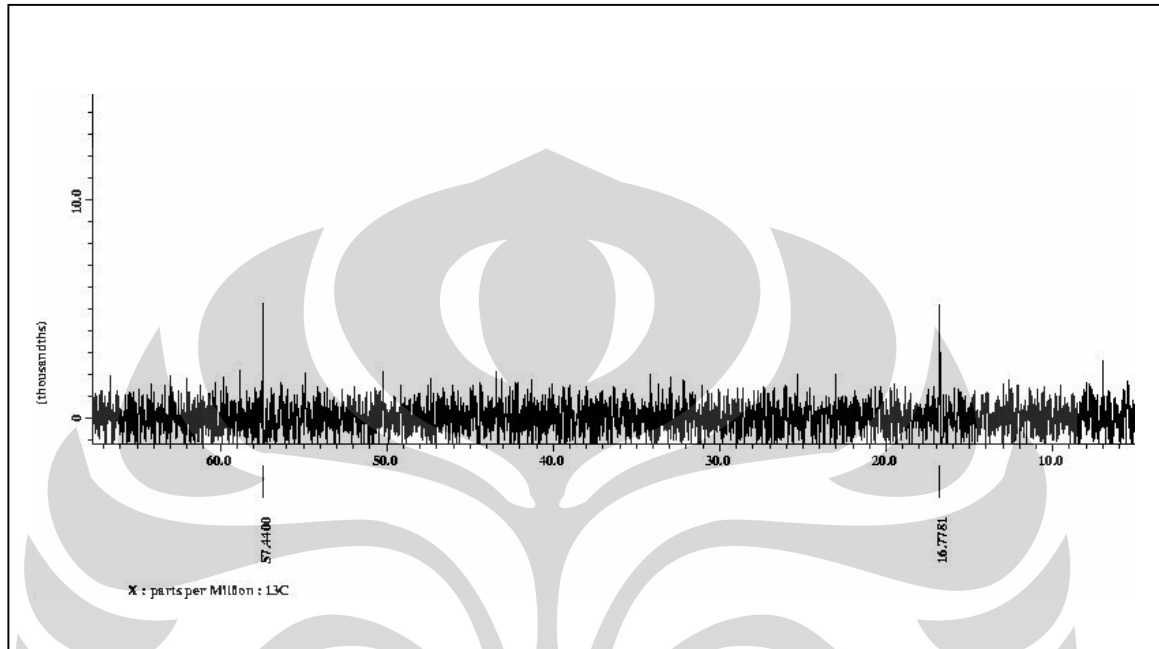
Gambar 22. Spektrum ^1H NMR dari EPS galur CNC 6 yang ditumbuhkan pada medium agar MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5%



Gambar 23. Spektrum ^1H NMR dari EPS galur CNC 6 yang ditumbuhkan pada medium agar MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5% (setelah diperjelas)



Gambar 24. Spektrum ^{13}C NMR dari EPS galur CNC 6 yang ditumbuhkan pada medium agar MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5%.



Gambar 25. Spektrum ^{13}C NMR dari EPS galur CNC 6 yang ditumbuhkan pada medium agar MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5% (setelah diperjelas)



Tabel 1

Asal Galur BAL

Nama Galur	Sumber	Bakteri*
MBF 5-4	Tanah	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
MBF 8-2	Susu Kacang	<i>Weissella confusa</i>
CNC 2(1)	Es Cincau	<i>Weissella confusa</i>
CNC 6	Es Cincau	BD

Keterangan:

BD : Belum dilakukan

* ditentukan dengan 16s rRNA

Tabel 2

Hasil pengamatan morfologi koloni galur BAL pada medium agar MRS
dibandingkan dengan data penelitian sebelumnya

No	Nama galur	Morfologi koloni data penelitian ini		Morfologi koloni data penelitian sebelumnya	
		Warna	Permukaan	Warna	Permukaan
1	MBF 5-4	Putih	Halus	Putih	Halus
		kekuningan		kekuningan	
2	MBF 8-2	Putih	Halus	kekuningan	Halus
3	CNC 2(1)	Putih	Halus	Putih	Halus
4	CNC 6	Putih	Halus	Putih	Halus

Tabel 3
Data (OD)₆₀₀ dari beberapa isolat BAL

Galur BAL	(OD) ₆₀₀	Vol. Transfer (mL)	(OD) ₆₀₀ x Vol. Transfer
	2,381	0,640	1,5245
	1,935	0,788	1,5245
MBF 5-4	2,915	0,523	1,5245
	3,188	0,478	1,5245
	3,625	0,421	1,5245
	2,826	0,539	1,5245
MBF 8-2	3,949	0,386	1,5245
	3,370	0,452	1,5245
	3,049	0,5	1,5245
	4,14	0,368	1,5245
CNC 2(1)	4,762	0,320	1,5245
	3,802	0,401	1,5245
	2,062	0,739	1,5245
	1,481	1,029	1,5245
CNC 6	1,452	1,05	1,5245
	1,013	1,505	1,5245

Tabel 4

Hasil pengamatan produksi EPS MRS-Sukrosa 10%

Galur	Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3	Hari ke-4	Hari ke-5
MBF 5-4	+	+	++	++	++
MBF 8-2	+++	+++	+++	++++	++++
CNC 2(1)	+++	+++	+++	++++	++++
CNC 6	+	+	+	+	+

Keterangan:

++++ : sangat banyak

+++ : banyak

++ : sedang

+ : sedikit

Tabel 5
 Hasil pengamatan produksi EPS MRS- Rafinosa 5%

Galur	Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3	Hari ke-4	Hari ke-5
MBF 5-4	+	+	+	+	+
MBF 8-2	-	-	+	+	+
CNC 2(1)	-	-	-	+	+
CNC 6	+	+	+	+	+

Keterangan :

++++ : sangat banyak

+++ : banyak

++ : sedang

+ : sedikit

- : tidak ada pertumbuhan

Tabel 6

Hasil pengamatan produksi EPS MRS- Glukosa 1%- Rafinosa 5%

Galur	Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3	Hari ke-4	Hari ke-5
MBF 5-4	+	+	+	+	+
MBF 8-2	+/-	+	++	++	++
CNC 2(1)	+/-	+	+	+	+
CNC 6	+	+	+	+	+

Keterangan :

++++ : sangat banyak

+++ : banyak

++ : sedang

+

: sedikit

+/- : pertumbuhan tidak sempurna

Tabel 7
 Hasil Produksi EPS dari Berbagai Galur BAL
 dalam media agar MRS-Sukrosa 10%

Galur BAL	Warna Sampel EPS	Bentuk Sampel EPS
MBF 5-4	Tanpa warna	Serbuk hablur
MBF 8-2	Putih	Serbuk
CNC 2(1)	Putih kekuningan	Serbuk
CNC 6	Putih- Kuning kecoklatan	Serbuk

Tabel 8
 Hasil Produksi EPS dari Berbagai Galur BAL
 dalam media agar MRS-Glukosa 1%-Rafinosa 5%

Galur BAL	Warna Sampel EPS	Bentuk Sampel EPS
MBF 8-2	Putih kekuningan	Serbuk
CNC 2(1)	Putih Kekuningan	Serbuk
CNC 6	Putih kekuningan	Serbuk

Tabel 9

Geseran kimia spektrum ^1H NMR

MBF 8-2 media cair MRS- Glu 1%- Raf 5%	Inulin
$\delta=4,93$; d; $J=3,05$ Hz	$\delta=4,28$; t; $J=8,55$ Hz
$\delta=3,94$; d; $J=6,75$ Hz	$\delta=4,13$; t; $J=8,55$ Hz
$\delta=3,86$; d; $J=7,9$ Hz	$\delta=3,95$; bd; $J=10,4$ Hz
$\delta=3,68$; q; $J=12,25$ Hz	$\delta=3,9$; t; $J=4,9$ Hz
$\delta=3,94$; dd; $J=12,85$ Hz	$\delta=3,81$; m; $J=3,05$ Hz
$\delta=3,47$; t; $J=9,15$ Hz	$\delta=3,74$; d; $J=9,75$ Hz

Pelarut : D₂O; Frekuensi : 500 MHz; Baku Dalam: TMS; s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet; bd, broad doublet; δ , geseran kimia (dalam ppm); J , konstanta kopling

Tabel 10
Geseran kimia spektrum ^{13}C NMR (6, 26, 48)

Posisi	MBF 8-2 media cair MRS- Glu 1%- Raf 5%	Inulin	Levan	α -glukan
C1	97,7299	60,8261	60,74	93,58
C2	70,2023	103,2049	105,06	72,43
C3	73,4262	76,9077	77,12	73,85
C4	69,5537	74,1798	76,04	70,84
C5	71,4232	81,0187	81,13	73,65
C6	65,5571	62,0661	64,20	61,20



Lampiran 1
Komposisi Medium

Medium de Man Rogosa Sharpe (MRS)

Setiap 1 L mengandung :

<i>Peptone from casein</i>	10,0 g
<i>Meat extract</i>	8,0 g
<i>Yeast extract</i>	4,0 g
<i>D(+)-glucose</i>	20,0 g
<i>Dipotassium hydrogen phosphate</i>	2,0 g
<i>Tween 80</i>	1,0 g
<i>di-Ammonium hydrogen citrate</i>	2,0 g
<i>Sodium acetate</i>	5,0 g
<i>Magnesium sulfate</i>	0,2 g
<i>Manganese sulfate</i>	0,04 g

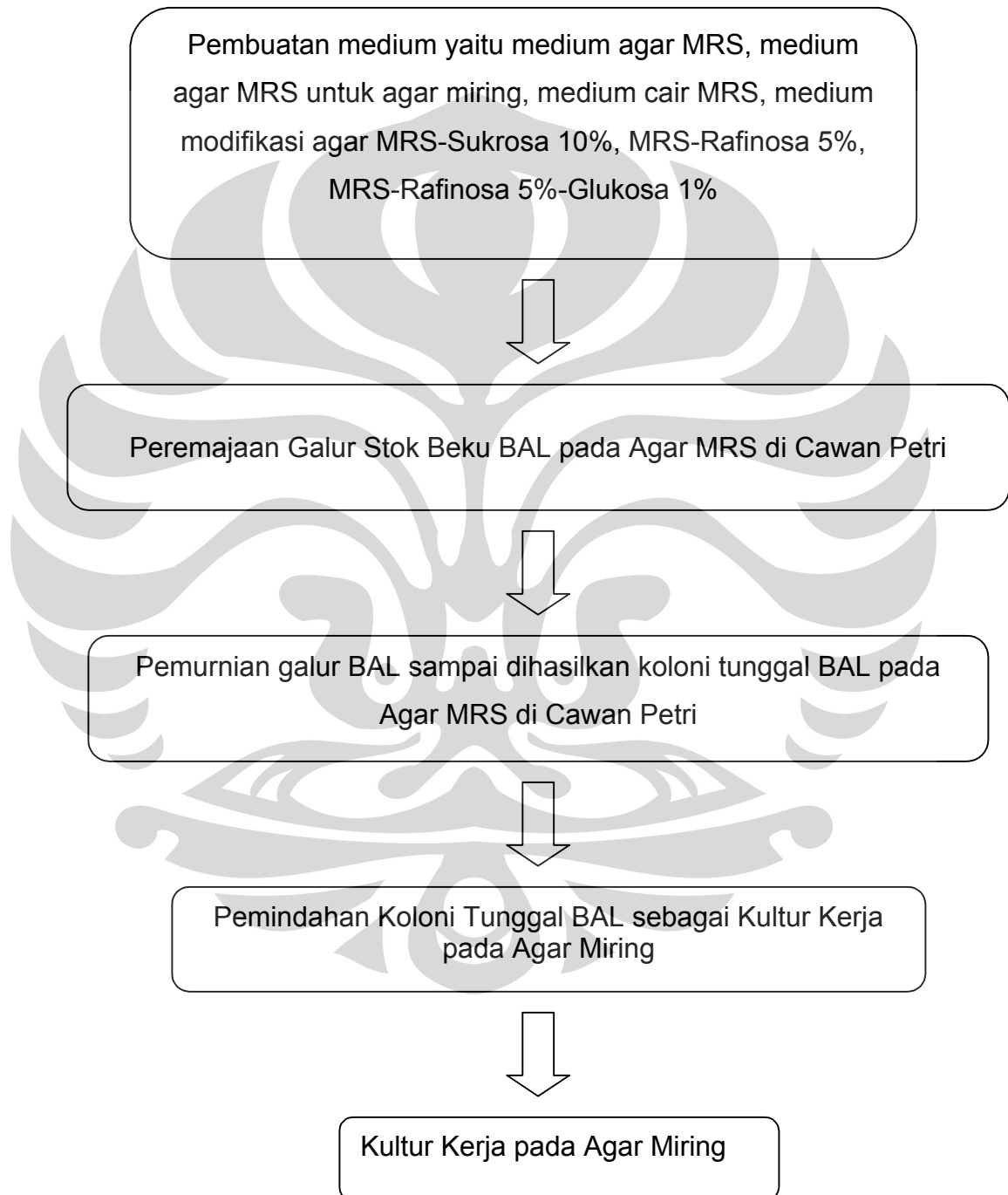
Lampiran 2

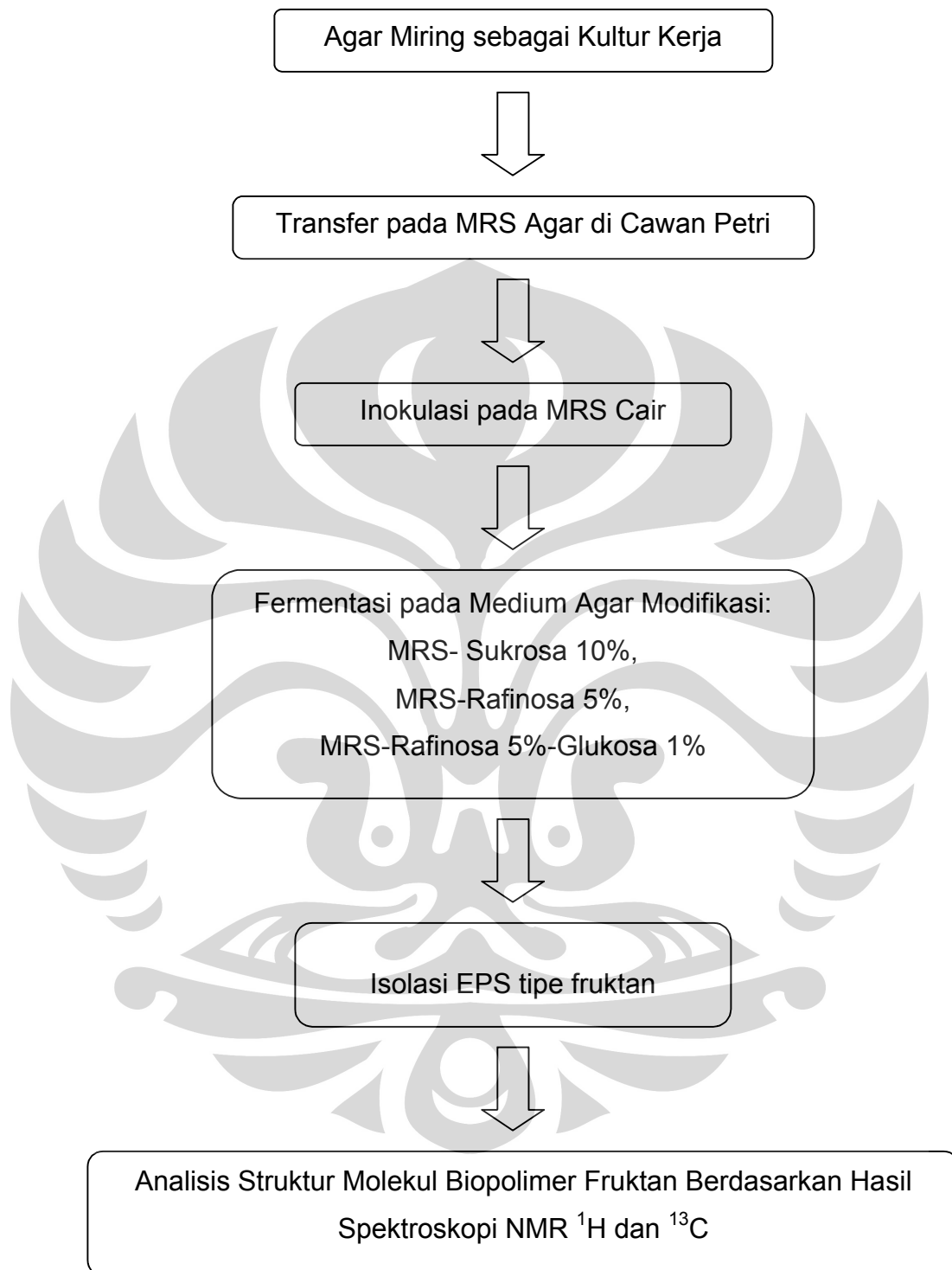
Cara pembuatan reagen yang digunakan dalam penelitian

No.	Nama Reagen	Cara Pembuatan
1	Natrium hidroksida 1 N	Sebanyak 4 gram natrium hidroksida dilarutkan dalam akuades hingga tepat 100 mL
2	Asam klorida 1 N	Sebanyak 8,33 mL larutan asam klorida pekat 12 N ditambahkan akuades hingga tepat 100 mL.

Lampiran 3

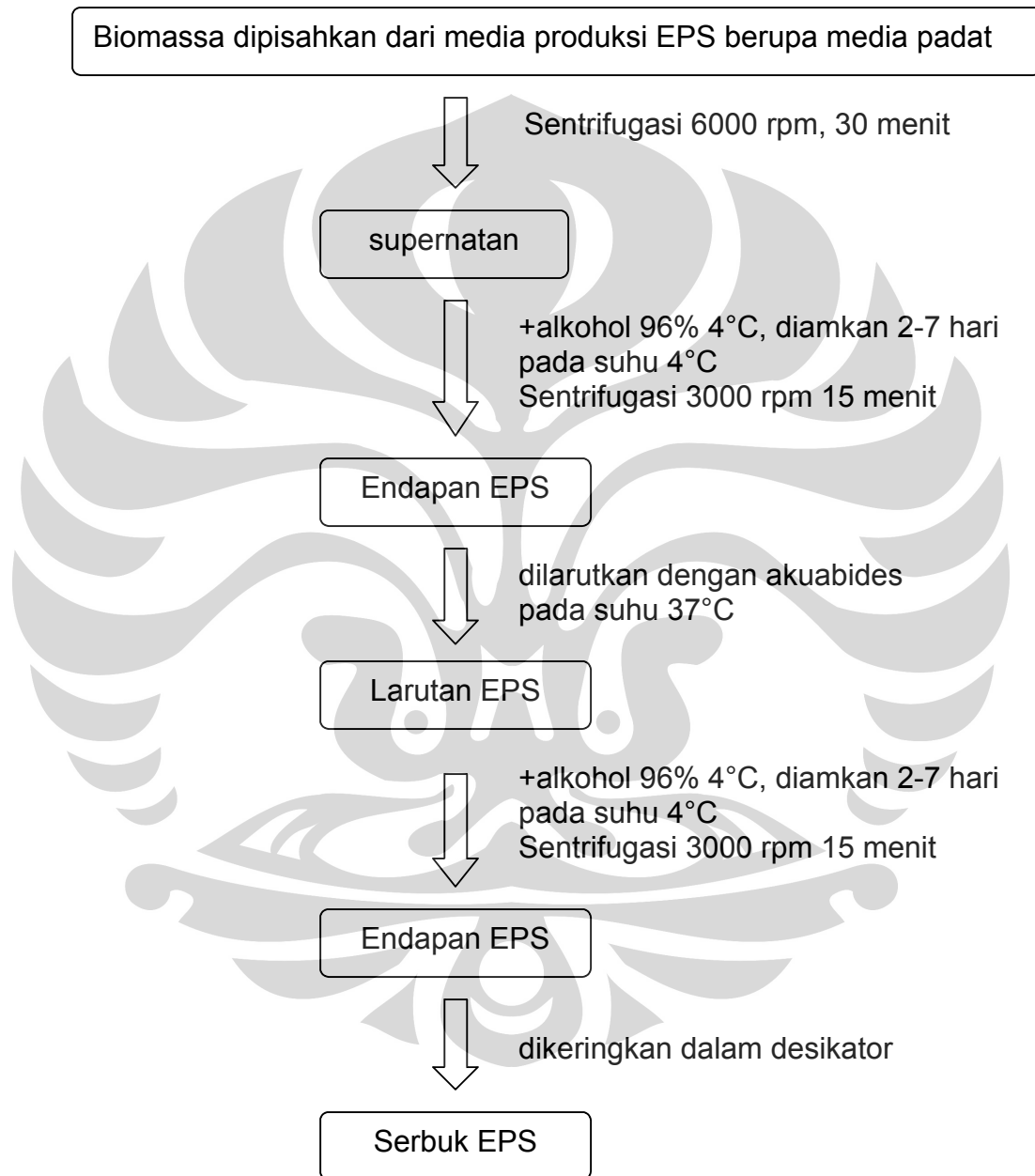
Skema alur kerja pada penelitian





Lampiran 4

Skema Isolasi dan Purifikasi EPS pada Penelitian Ini



Lampiran 5

Skema Isolasi dan Purifikasi EPS dari Sampel MBF 8-2
dari Penelitian Sebelumnya yang Ditanam pada Media Cair

