

**PENCARIAN BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL EKSOPOLISAKARIDA
YANG MEMPUNYAI AKTIVITAS FRUKTANSUKRASE
DARI KOLEKSI ISOLAT ASAL SUMBER LOKAL**

TRI HANDAYANI

0606041163



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
PROGRAM EKSTENSI
DEPOK
2009**

**PENCARIAN BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL EKSOPOLISAKARIDA
YANG MEMPUNYAI AKTIVITAS FRUKTANSUKRASE
DARI KOLEKSI ISOLAT ASAL SUMBER LOKAL**

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

Oleh :

TRI HANDAYANI

0606041163



DEPOK

2009

SKRIPSI : PENCARIAN BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL
EKSOPOLISAKARIDA YANG MEMPUNYAI AKTIVITAS
FRUKTANSUKRASE DARI KOLEKSI ASAL SUMBER
LOKAL

NAMA : TRI HANDAYANI

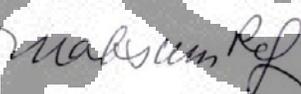
NPM : 0606041163

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JUNI 2009

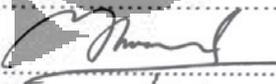

Dr. AMARILA MALIK, MSi

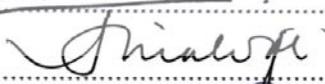
PEMBIMBING I


Dr. MAKSUM RADJI, M.Biomed

PEMBIMBING II

Tanggal Lulus Ujian Sidang Sarjana.....

Penguji I : Dr. Herman Suryadi, MS.....


Penguji II : Dra. Azizahwati, MS.....


Penguji III : Santi Purna Sari, Apt, Msi.....


KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbil'alamin, puji dan syukur kepada Allah SWT atas segala limpahan nikmat dan kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Skripsi ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ibu Dr. Amarila Malik, MSi, selaku pembimbing I, yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian ini, serta banyak memberikan bimbingan, ilmu, motivasi, dukungan, dan bantuan lainnya yang sangat bermanfaat selama penelitian dan penyusunan skripsi.
2. Bapak Dr. Maksun Radji, M.Biomed, selaku pembimbing II, yang telah memberikan bimbingan, ilmu, dan bantuan selama penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI atas bantuan dan dukungannya selama ini.
4. Bapak Dr. Abdul Mun'im, selaku Ketua Program Ekstensi Farmasi FMIPA UI atas bantuan dan dukungannya selama ini.

5. Ibu Dr. Katrin, M.S., selaku pembimbing akademis atas bantuan dan dukungannya selama ini penulis menempuh pendidikan di program Ekstensi Farmasi FMIPA UI.
6. Seluruh Staf pengajar, karyawan, laboran Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah membantu penulis selama masa pendidikan dan penelitian.
7. Kedua orang tua, kakakku, Jerry, Min Ho, Joe, Vale, dan Zai-zai yang senantiasa memberikan cinta, kasih sayang, semangat, dukungan, bantuan serta doa yang tiada hentinya kepada penulis selama ini.
8. Adinda, Amie, Anita, Christina, Eko, Gita, Wangi, dan Wilzar atas tim yang solid dan telah berbagi ilmu, suka dan duka selama penelitian
9. Teman-teman farmasi ekstensi angkatan 2006 atas dukungan kepada penulis, terutama sahabat penulis, Pita, Ingga, dan Nanda.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan bantuan hingga dapat terselesaikannya skripsi ini.

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

2009

ABSTRAK

Fruktansukrase merupakan salah satu enzim sukrase yang dapat menghasilkan eksopolisakarida (EPS) fruktan. Bakteri Asam Laktat (BAL) mampu menghasilkan EPS karena adanya aktivitas enzim sukrase, yaitu glukansukrase/ glukosiltransferase (*gtf*) dan fruktansukrase/ fruktosiltransferase (*ftf*). EPS yang diproduksi oleh mikroorganisme berpotensi untuk diaplikasikan dalam berbagai bidang seperti industri pangan, kesehatan, dan farmasi. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan BAL yang dapat menghasilkan EPS fruktan pada media raffinosa dengan menggunakan sukrosa sebagai substrat. Raffinosa digunakan sebagai sumber karbon pada media agar MRS dalam penelitian ini. Raffinosa adalah suatu trisakarida yang akan dipecah oleh enzim fruktansukrase menjadi molekul glukosa-galaktosa dan fruktosa bebas. Pengamatan BAL pembawa fruktansukrase akan menghasilkan EPS fruktan berupa lendir pada media agar MRS. Dari 22 BAL penghasil fruktan yang diamati lebih lanjut dan dibandingkan dengan hasil penelitian sebelumnya secara molekuler, diduga bahwa 5 diantaranya hanya menunjukkan aktivitas enzim glukansukrase, dan 17 BAL lainnya memiliki aktivitas fruktansukrase selain glukansukrase.

Kata kunci : Fruktansukrase, BAL, eksopolisakarida, raffinosa.

xi + 84 hlm; gbr; tab; lamp.

Bibliografi: 49 (1992-2009)

ABSTRACT

Fructansucrase is one of sucrose's enzyme that enable to produce exopolisaccharides (EPS) fructan. Lactic Acid Bacteria (LAB) are able to produce EPS because of the activity of sucrose genes, i.e. glucansucrase/ glucosyltransferase (*gtf*) and fructansucrase/fructosyltransferase (*ftf*). EPS which have been produced by microorganism has chance to be used in many potential applications, such as in food, health, and pharmaceutical industries. This study aimed to determine LAB which can produce EPS fructan on raffinose. Raffinose was used as carbon source in the modified MRS media used in this study. Raffinose is a trisaccharides which will be cleaved by fructansucrase enzyme generating glucose-galactose and free fructose molecules. LAB carries fructansucrase enzyme produced EPS fructan as observed on MRS-Raffinose agar medium as mucous colonies. Twenty-two fructan-producing LAB were further analyze by comparing to previous report obtained by molecular study; five LAB reveal as glucansucrase only, while seventeen LAB possessed both fructansucrase and glucansucrase activities.

Keyword: Fructansucrase, Lactic Acid Bacteria, exopolisaccharide, raffinose.

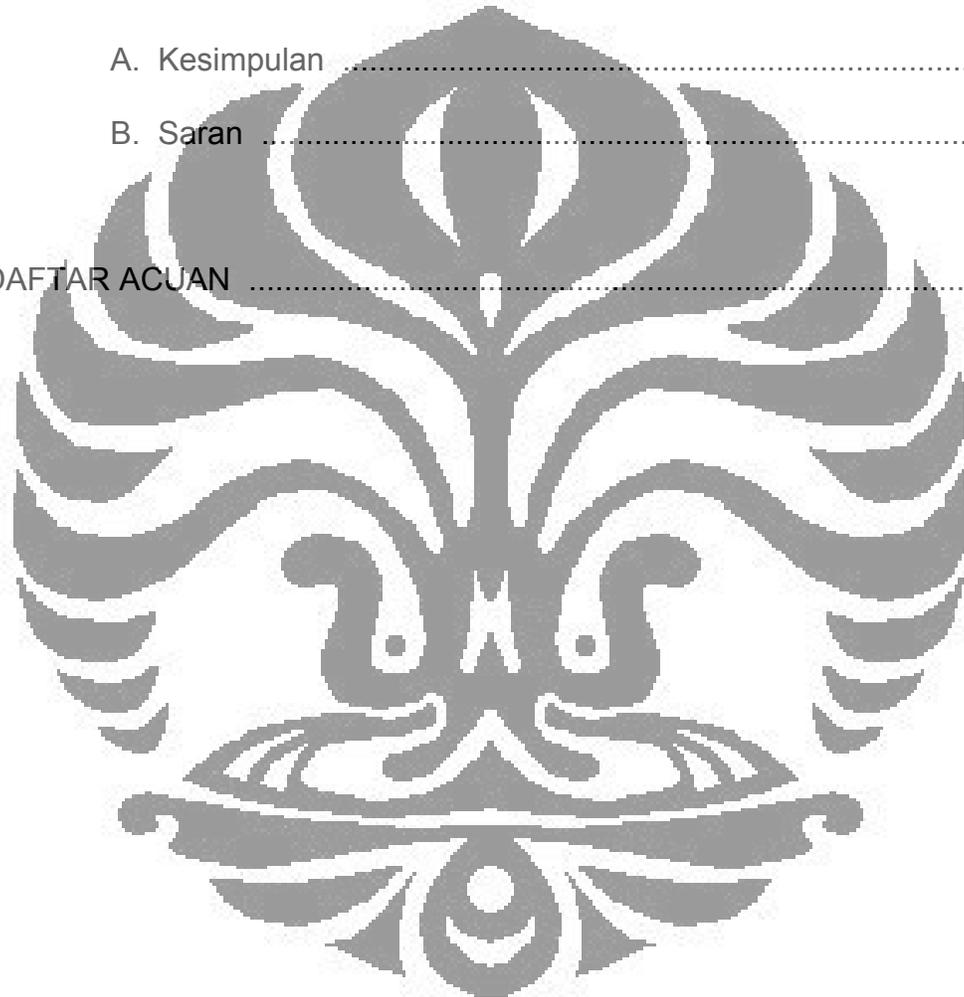
xi + 84 pages; figures; tables; appendixes.

Bibliografi: 49 (1992-2009)

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
ABSTRACT.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I. PENDAHULUAN.....	
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan Penelitian.....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	
A. Enzim Sukrase.....	5
B. Eksopolisakarida (EPS).....	9
C. Bakteri Asam Laktat (BAL).....	13
D. Sumber-sumber Isolasi BAL.....	16
BAB III. BAHAN, ALAT, DAN CARA KERJA.....	
A. Lokasi Penelitian.....	18
B. Bahan.....	18
C. Alat.....	19

D. Cara Kerja.....	20
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
A. Hasil.....	28
B. Pembahasan	30
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	
A. Kesimpulan	37
B. Saran	37
DAFTAR ACUAN	38



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur kimia raffinosa.....	8
2. Struktur inulin dan levan.....	12
3. Morfologi koloni tunggal BAL.....	48
4. Pewarnaan Gram	49
5. Produksi EPS BAL dari isolat BJK 1 yang diisolasi dari bajigur pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	50
6. Produksi EPS BAL dari isolat BJK 2 yang diisolasi dari bajigur pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	51
7. Produksi EPS BAL dari isolat BJK 3 yang diisolasi dari bajigur pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	52
8. Produksi EPS BAL dari isolat BJK 4 yang diisolasi dari bajigur pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	53
9. Produksi EPS BAL dari isolat WRS 3 yang diisolasi dari wedang ronde pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	54
10. Produksi EPS BAL dari isolat WRS 5 yang diisolasi dari wedang ronde pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	55

11.	Produksi EPS BAL dari isolat WRS 6 yang diisolasi dari wedang ronde pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	56
12.	Produksi EPS BAL dari isolat PUL 10 yang diisolasi dari puli pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	57
13.	Produksi EPS BAL dari isolat SBH 9 yang diisolasi dari es buah pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	58
14.	Produksi EPS BAL dari isolat PDG 2 yang diisolasi dari es puding pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	59
15.	Produksi EPS BAL dari isolat PDG 3 yang diisolasi dari es puding pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	60
16.	Produksi EPS BAL dari isolat PDG 4 yang diisolasi dari es puding pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	61
17.	Produksi EPS BAL dari isolat PDG 10(1) yang diisolasi dari es puding pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	62
18.	Produksi EPS BAL dari isolat PDG 14 yang diisolasi dari es puding pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	63
19.	Produksi EPS BAL dari isolat PDG 15 yang diisolasi dari es puding pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	64

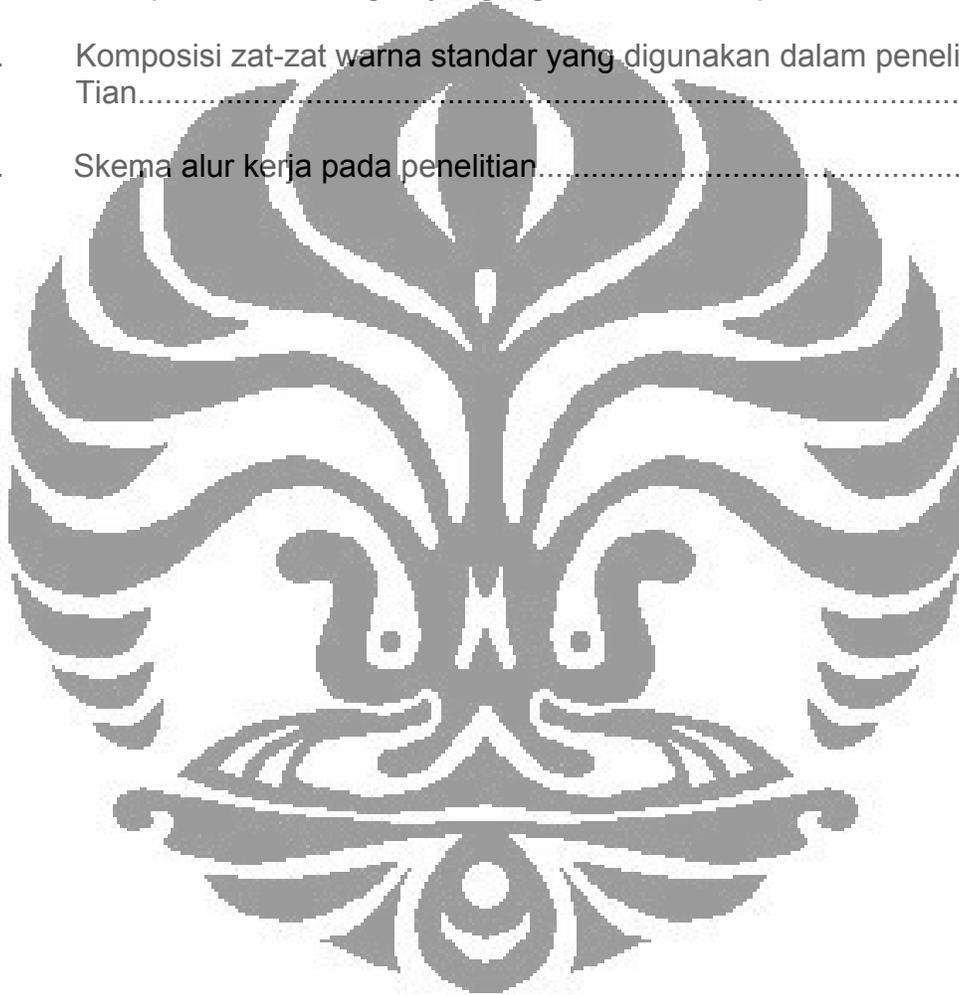
20.	Produksi EPS BAL dari isolat CNC 2 (1) yang diisolasi dari es cincau pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	65
21.	Produksi EPS BAL dari isolat CNC 3 (2) yang diisolasi dari es cincau pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	66
22.	Produksi EPS BAL dari isolat CNC 5 (2) yang diisolasi dari es cincau pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	67
23.	Produksi EPS BAL dari isolat CNC 6 yang diisolasi dari es cincau pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	68
24.	Produksi EPS BAL dari isolat CNC 7 (1) yang diisolasi dari es cincau pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	69
25.	Produksi EPS BAL dari isolat CNC 8 yang diisolasi dari es cincau pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	70
26.	Produksi EPS BAL dari isolat CNC 11 yang diisolasi dari es cincau pada medium agar MRS, MRS-raffinosa 5%, MRS-raffinosa 5%-glukosa1%, dan MRS-sukrosa10%.....	71

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Perbandingan hasil pengamatan bentuk morfologi dan warna koloni isolat dengan data sebelumnya serta sumber isolat pada medium MRS.....	73
2. Hasil pengamatan produksi EPS pada medium agar modifikasi MRS-sukrosa 10% hasil penelitian sebelumnya.....	75
3. Perbandingan jumlah EPS yang dihasilkan pada media agar modifikasi MRS-Sukrosa 10%, MRS-Raffinosa 5%, dan MRS-Raffinosa 5%-glukosa 1%.....	77

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Komposisi medium.....	80
2. Cara pembuatan reagen yang digunakan dalam penelitian.....	81
3. Komposisi zat-zat warna standar yang digunakan dalam penelitian.....	82
4. Skema alur kerja pada penelitian.....	83



BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Fruktosiltransferase (FTF) atau fruktansukrase adalah enzim yang digunakan oleh bakteri asam laktat (BAL) dalam sintesis eksopolisakarida (EPS) fruktan yang berasal dari substrat sukrosa. FTF akan menguraikan sukrosa dan menggunakan energi yang dihasilkan untuk membentuk rantai fruktan, sukrosa, atau air (1). FTF pada BAL mempunyai aktivitas levansukrase yang dapat mensintesis levan atau inulinsukrase untuk sintesis inulin. Selain sukrosa, raffinosa (α -galaktosa(1-6)- α -glukosa(1-2)- β -fruktosa) yang merupakan golongan trisakarida juga dapat berfungsi sebagai donor fruktosil untuk membentuk EPS fruktan. Produk hasil hidrolisis yang dikatalis oleh levansukrase dari raffinosa adalah laktosa (galaktosa-glukosa) dan fruktosa bebas (2, 3, 4).

Eksopolisakarida (EPS) merupakan suatu molekul besar yang mempunyai rata-rata 50-50.000 unit glikosil (5, 6). EPS adalah polimer polisakarida hasil produksi dari mikroorganisme yang memiliki potensi untuk aplikasi di beberapa bidang seperti industri kesehatan, farmasi dan pangan (7, 8, 9). EPS dapat berperan sebagai pengental, penstabil, *emulsifier*, *gelling agent*, dan bisa mengikat air sehingga dapat digunakan sebagai pembentuk tekstur ketika ditambahkan ke dalam produk makanan (10).

EPS dibedakan menjadi dua tipe, yaitu homopolisakarida dan heteropolisakarida. Untuk sintesis homopolisakarida dari sukrosa, BAL menggunakan enzim ekstraseluler berukuran besar, yang biasa disebut dengan glukosiltransferase (GTF) atau glukansukrase dan fruktosiltransferase (FTF) atau fruktansukrase (2, 3).

BAL merupakan salah satu kekayaan alam yang banyak tersebar di alam Indonesia. BAL dapat diisolasi dari berbagai macam sumber seperti sayuran busuk, buah-buahan busuk, produk-produk fermentasi, dan lain-lain (11). BAL sering digunakan dalam berbagai bidang industri, khususnya BAL penghasil EPS yang telah banyak digunakan dalam industri fermentasi baik makanan maupun minuman karena dapat berpengaruh terhadap *rheologi* dan memiliki status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (2, 12)

Berdasarkan penelitian-penelitian yang telah dilaporkan sebelumnya, isolasi BAL diperoleh dari berbagai sumber. Sumber-sumber tersebut antara lain berasal dari es cendol, es cincau, bajigur, es podeng, es buah wedang ronde, gatot dan berbagai sumber lainnya (13). Data yang diperoleh yaitu data produksi eksopolisakarida menggunakan medium agar modifikasi MRS-sukrosa 10%. Media modifikasi MRS-sukrosa 10% hanya mengandung sukrosa sebagai sumber karbon sehingga polimer EPS yang diproduksi berasal dari kerja sukrase terhadap substrat sukrosa yang berupa polimer glukosa maupun polimer fruktosa (13).

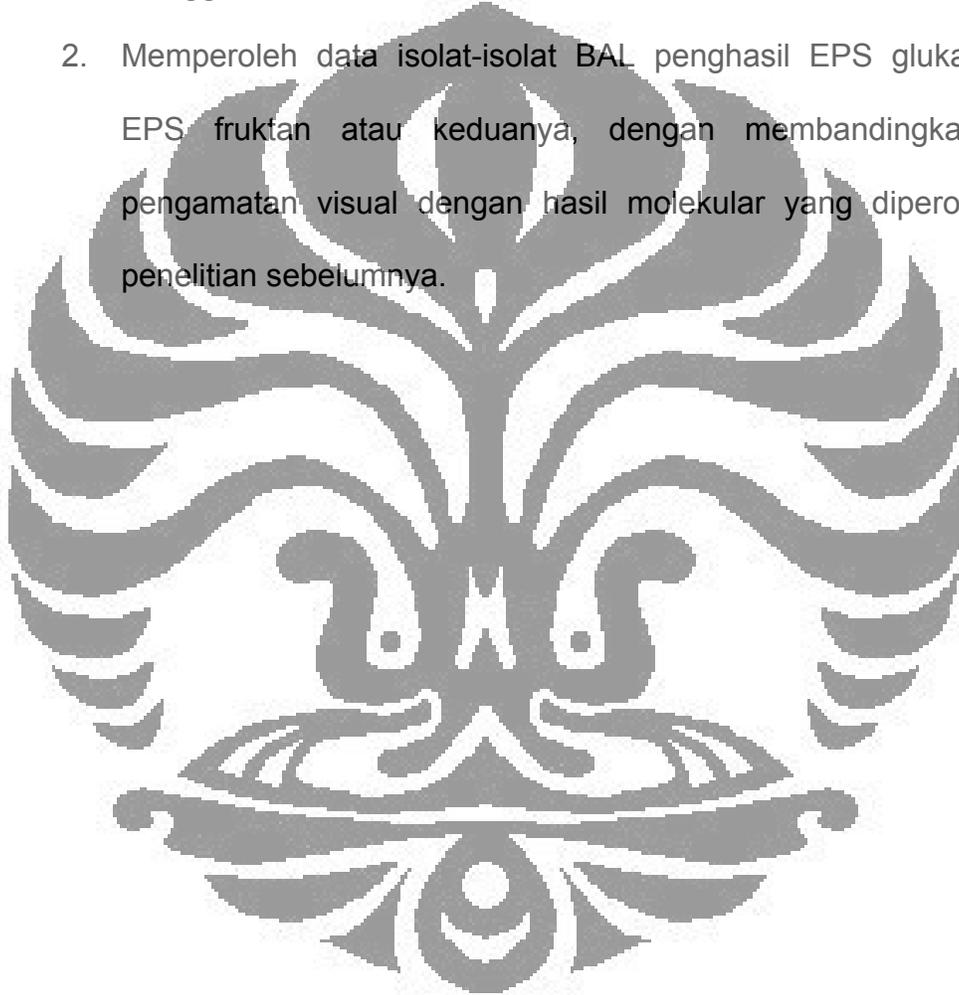
Data lain yang didapat adalah dari beberapa isolat BAL diprediksi mengandung glukosa dan atau fruktosa. Menurut data-data yang diperoleh

sebelumnya, informasi mengenai sintesis fruktan oleh bakteri asam laktat masih sangat terbatas (5). Berdasarkan pengamatan pada data sumber asal isolat, terlihat bahwa isolat-isolat BAL yang berasal dari makanan mengandung gula sukrosa berpeluang besar mengandung gen *gtf* maupun gen-gen sukrase lainnya termasuk *fff*. Salah satu faktor yang menentukan produksi EPS adalah media pertumbuhan khususnya sumber karbon yang digunakan (14). Dalam menghasilkan fruktan, selain menggunakan substrat sukrosa dapat digunakan raffinosa sebagai sumber karbon (2, 5, 15). Raffinosa merupakan trisakarida yang terdiri dari D-glukosa, D-fruktosa, dan D-galaktosa yang terhubung melalui ikatan glikosida. Raffinosa ini merupakan substrat yang digunakan oleh fruktansukrase (selain sukrosa) untuk menghasilkan polimer fruktosa (16).

Berdasarkan informasi tersebut maka dalam penelitian ini dilakukan verifikasi adanya EPS fruktan pada koleksi BAL yang diisolasi dari beberapa sumber minuman lokal pada penelitian sebelumnya, sebagai indikasi adanya aktivitas FTF dengan menggunakan medium raffinosa sebagai sumber karbon. FTF akan memutus ikatan glikosida pada raffinosa dan menghasilkan masing-masing glukosa-galaktosa dan fruktosa. Dengan dilakukannya penelitian ini, diharapkan dapat diketahui jenis BAL yang selain menghasilkan EPS glukon juga menghasilkan EPS fruktan yang dapat memperkaya jenis-jenis polimer dan kemanfaatannya baik di industri bidang farmasi, kesehatan, dan pangan (17)

B. TUJUAN PENELITIAN

1. Memperoleh isolat-isolat BAL penghasil eksopolisakarida yang mempunyai aktivitas fruktansukrase dengan pengamatan visual menggunakan substrat rafinosa.
2. Memperoleh data isolat-isolat BAL penghasil EPS glukon, atau EPS fruktan atau keduanya, dengan membandingkan hasil pengamatan visual dengan hasil molekular yang diperoleh dari penelitian sebelumnya.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. SUKRASE

Sukrase adalah enzim yang dapat memecah sukrosa dan menggunakan energi yang dilepaskan untuk menggabungkan unit gula sehingga membentuk rantai polimer gula (poligula) (1). Pada sintesis EPS yang termasuk homopolisakarida digunakan beberapa sukrase yaitu kelompok glukansukrase dan kelompok fruktansukrase (19).

Glukansukrase adalah enzim ekstraselular yang melakukan sintesis pada berbagai jenis glukosa dari sukrosa (5). Enzim ini memecah sukrosa sebagai sumber karbon dan menggunakan energi yang dihasilkan (antara glukosa dan fruktosa) untuk membentuk rantai poliglukosa (1). Terdapat beberapa variasi pada berbagai jenis glukosa yang disintesis oleh enzim ini, hal ini karena adanya perbedaan dalam tipe ikatan, banyak dan tipe dari cabang, panjang rantai glukosa, massa molekul, dan konformasi polimer. Perbedaan sifat yang terjadi itu memberikan kontribusi dalam sifat polisakarida spesifik yang dihasilkan seperti kelarutan, sifat alir, dan karakteristik fisika lainnya (15). Ada beberapa faktor seperti media pertumbuhan, temperatur, waktu inkubasi, konsentrasi sukrosa yang digunakan, enzim pendegradasi polisakarida yang akan mempengaruhi

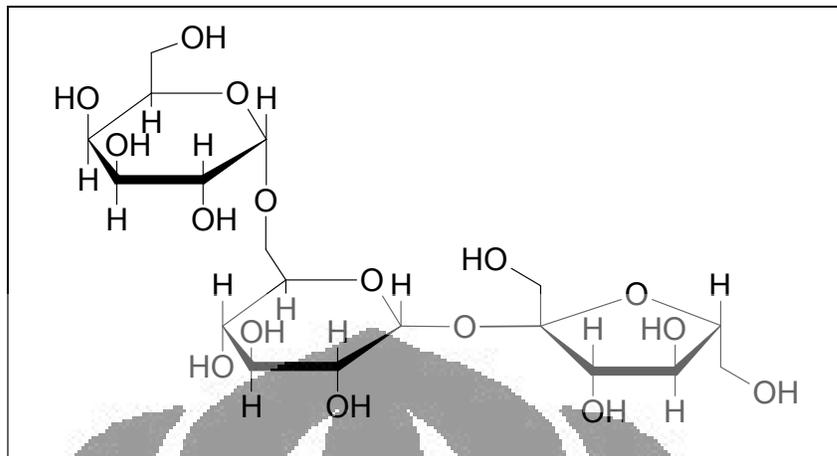
massa molekul, struktur, sifat fisika polimer yang disintesis oleh spesifik organisme (15).

Glukan diproduksi oleh berbagai bakteri asam laktat, seperti pada berbagai spesies *Leuconostoc*, dan *Streptococcus* serta *Lactobacillus* dan *Lactococcus* (15). Hampir semua glukan yang diproduksi oleh bakteri asam laktat adalah α -glukan. Terdapat lima jenis α -glukan yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yaitu dekstran $\alpha(1-6)$, mutan $\alpha(1-3)$, alternan $\alpha(1-3)/\alpha(1-6)$, reuteran $\alpha(1-4)/\alpha(1-6)$ dan glukan yang terdiri dari cabang $\alpha(1-2)$. Umumnya dekstran terdiri dari ikatan $\alpha(1-6)$ dengan beberapa titik cabang pada posisi 2, 3, atau 4. Dekstran dihasilkan oleh *Ln. mesenteroides* (15), Mutan dihasilkan oleh *Sreptococcus*. Berbeda dengan dekstran, persentase ikatan $\alpha(1-3)$ pada mutan tinggi, biasanya fraksi larut air banyak terdapat pada ikatan $\alpha(1-6)$ dan fraksi tidak larut air banyak terdapat pada ikatan $\alpha(1-3)$. Alternan terdiri ikatan $\alpha(1-6)$ dan $\alpha(1-3)$ yang berikatan dengan unit D-glukopiranosil pada rantai utama dan pada cabang $\alpha(1-6-3)$ disintesis oleh *Ln.mesenteroides*. Reuteran disintesis oleh *Lb. reuteri* 121, merupakan glukan dengan ikatan glikosidik $\alpha(1-6)$, $\alpha(1-4)$ dan cabang pada $\alpha(1-6-4)$. $\alpha(1-2)$ dihasilkan oleh jenis *Ln.mesenteroides* yaitu NRRL-B-1299 dan NRRL-B-1355 (15).

Mekanisme katalitik glukansukrase sangat rumit dan masih kurang dapat dimengerti. Glukansukrase memotong ikatan glikosidik substratnya, misalnya sukrosa dan menggunakan energi yang dilepaskan untuk membentuk glukan (poli glukosa) (1).

Fruktan disintesis oleh FTF, yang merupakan salah satu jenis sukrase. Enzim ekstraselular ini memotong ikatan glikosidik substratnya seperti sukrosa dan raffinosa, serta menggunakan energi yang dilepaskan membentuk unit fruktan (poli fruktosa) (1, 15).

Fruktansukrase pada bakteri dapat mensintesis levan oleh levansukrase atau inulin oleh inulosukrase. Pada levansukrase terjadi katalisis pada transfer residu d-fruktosil dari fruktosa yang memberikan ikatan $\alpha(2-6)$ yang dikarakterisasi sebagai levan (1). Selain dari sukrosa, levansukrase dapat dihasilkan dari trisakarida lain, seperti raffinosa (α -Gal(1-6)- α -Glc(1-2)- β -fru) yang berperan sebagai donor fruktosil. Raffinosa sendiri merupakan substrat untuk sintesis levan oleh levansukrase tetapi bukan untuk substrat glukansukrase. Produk yang dihasilkan dari hidrolisis katalis levansukrase pada raffinosa adalah laktosa (galaktosa-glukosa) dan fruktosa bebas (4). Inulosukrase secara eksklusif terdapat pada bakteri asam laktat, sedangkan levansukrase terdistribusi secara luas baik dalam bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif.



Gambar 1. Struktur kimia Raffinosa (27)

Sejumlah besar bakteri asam laktat mempunyai FTF tipe levansukrase. Sedangkan levansukrase lebih banyak dihasilkan oleh jenis bakteri asam laktat yang berasal dari flora normal, seperti *Streptococcus salivarius* dan *Streptococcus mutans* (20). Hanya *Streptococcus mutans*, *Leuconostoc citreum*, dan *Lactobacillus reuteri* yang dilaporkan memiliki inulosukrase (1). Beberapa bakteri yang memiliki levansukrase antara lain *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus safranciscensis*, *Streptococcus*, dan *Lactobacillus reuteri*. *Lactobacillus reuteri* LB 121 menggunakan glukansukrase dan levansukrase untuk mensintesis glukon dan levan dari sukrosa (21). Namun selain dari sumber-sumber tersebut diatas, FTF baik tipe levansukrase maupun inulosukrase juga ditemukan pada beberapa makanan dan minuman tradisional asli Indonesia yaitu pada es podeng, es cincau, wedang ronde, dan bajigur, berdasarkan hasil analisis sekuens

amplikon yang persentase homolognya sekitar 97-99% dibandingkan dengan sekuens yang terdapat pada GenBank (13).

B. EKSOPOLISAKARIDA

Eksopolisakarida (EPS) adalah gula polimer yang dihasilkan secara ekstraseluler oleh mikroorganisme, yang dapat melindungi sel dari lingkungan yang tidak sesuai seperti pengeringan dalam proses mengawetkan, bahan beracun, suhu rendah, tekanan osmotik yang tinggi, proses fagositosis, serangan fage, antibiotik dan predasi oleh protozoa. Pembentukan EPS ini dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kondisi dari media yang digunakan, dimana kelebihan karbohidrat pada media dan suhu yang rendah dapat menstimulasi produksinya. Selain itu produksinya juga dipengaruhi oleh faktor lain seperti pH, kadar oksigen, kecepatan agitasi, dan waktu inkubasi (22, 23, 34, 25).

Beberapa BAL memiliki kemampuan untuk menghasilkan EPS (26). EPS dapat digunakan sebagai bahan pengental, pengemulsi, prebiotik, atau bahan pengikat air baik dalam industri makanan ataupun bukan industri makanan. Selain itu polisakarida mempunyai manfaat terhadap kesehatan manusia, misalnya sebagai antitumor, antiulser, *immunomodulating*, atau menurunkan kolesterol (5).

EPS yang dihasilkan oleh BAL dapat dibedakan menjadi dua kelompok berdasarkan pada komposisi dan mekanisme biosintesisnya, yaitu

homopolisakarida, dimana hanya terdiri dari satu macam monosakarida dan heteropolisakarida, yang terdiri dari satu atau lebih monosakarida yang berbeda (12,19). Homopolisakarida BAL dapat dibedakan atas fruktan dan glukon. Pada proses sintesis homopolisakarida dari sukrosa, BAL menggunakan glukosiltransferase (GTF) yang berukuran besar atau glukansukrase dan fruktosiltransferase (FTF) atau fruktansukrase. Kegunaan dari enzim-enzim ini adalah untuk mensintesis EPS glukon atau EPS fruktan dengan bobot molekul besar dari substrat sukrosa (10). Fruktan sendiri dapat dibedakan lagi menjadi dua yaitu levan dan inulin, sedangkan glukon dibedakan atas reuteran, dekstran, mutan, alternan, serta polimer glukon. Heteropolisakarida terdiri dari bermacam-macam residu gula, terutama glukosa, galaktosa, fruktosa, dan ramnosa, serta dapat terdiri dari grup asetat, fosfat, dan gliserolfosfat pada beberapa kondisi tertentu (12).

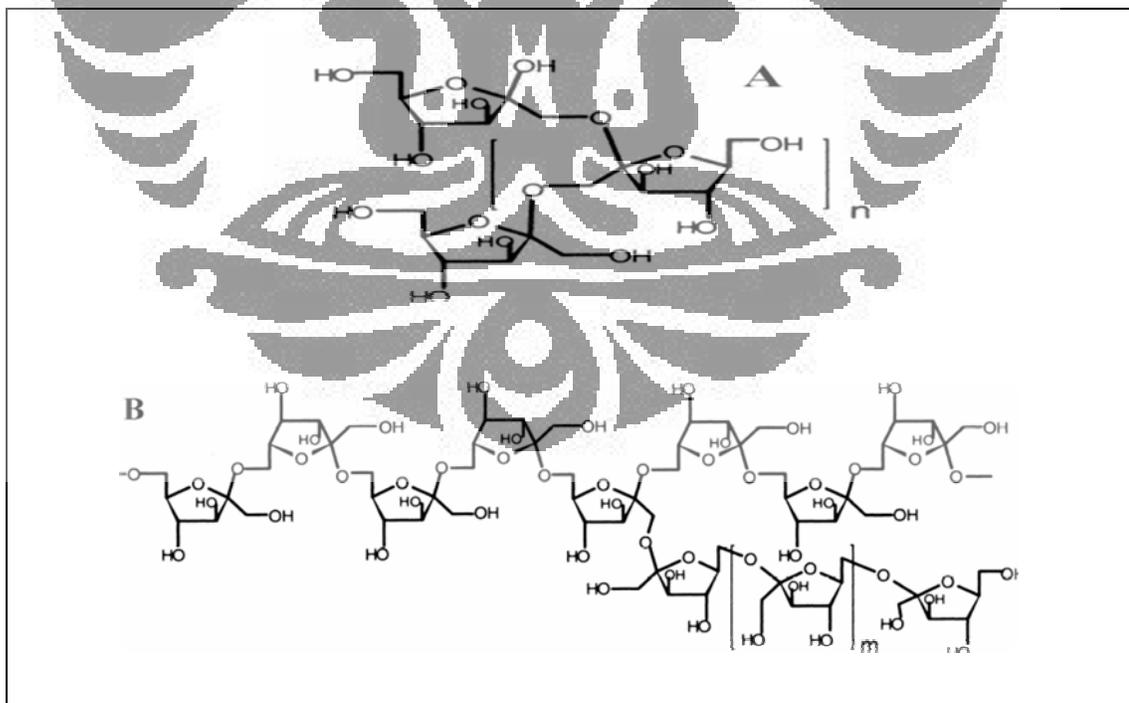
Homopolisakarida disintesis dari sukrosa oleh sukrase (glukansukrase dan fruktansukrase) dan dipelajari secara intensif pada *Leuconostoc*, *Streptococcus*, dan *Lactobacillus* (14, 16). Produksi homopolisakarida dari galur BAL lain seperti *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, dan *Weisella* belum dipelajari secara intensif, namun telah dilaporkan bahwa galur MBF 8-1 yang diidentifikasi sebagai *Weisella confusa* memiliki satu gen fruktansukrase dan dua gen glukansukrase (16). Selain itu, dilaporkan bahwa galur MBF 3-1 yang diidentifikasi sebagai *Leuconostoc mesenteroides* memiliki gen glukansukrase (14).

Beberapa contoh EPS yang dapat dimanfaatkan oleh manusia antara lain inulin, levan, β -mannan, dan dekstran. Inulin adalah salah satu komponen bahan pangan yang kandungan serat pangannya sangat tinggi (lebih dari 90 persen), dimanfaatkan dalam pangan fungsional. Inulin merupakan polimer dari unit-unit fruktosa, bersifat larut di dalam air, tidak dapat dicerna oleh enzim-enzim pencernaan, tetapi difermentasi mikroflora kolon (usus besar). Oleh karena itu, inulin berfungsi sebagai prebiotik (11). Inulin sendiri mulai diketahui sebagai salah satu jenis karbohidrat pada awal tahun 1800-an yang diisolasi dari bagian akar tanaman *Inula helenium*, dan sampai saat ini inulin telah banyak ditemukan pada beberapa jenis tanaman lain, contohnya pada beberapa sayuran dan buah-buahan (9).

Manfaat inulin di bidang pangan, antara lain sebagai pengganti lemak dan gula pada produk makanan rendah kalori serta sebagai bahan baku pembuatan sirup fruktosa, selain itu inulin juga dapat memberikan tekstur dan stabilitas yang baik pada beberapa produk seperti pada produk-produk hasil fermentasi. Sementara dalam bidang farmasi, inulin digunakan sebagai surfaktan, *emulsifier* dan penstabil produk farmasi. Inulin bersifat larut dalam air tetapi tidak dapat dicerna oleh enzim-enzim dalam sistem pencernaan mamalia sehingga mencapai usus besar tanpa mengalami perubahan struktur. Meskipun demikian, inulin dapat mengalami fermentasi akibat aktivitas mikroflora yang terdapat di dalam usus besar sehingga berimplikasi positif terhadap kesehatan tubuh. Di dalam usus besar, hampir seluruh inulin difermentasi menjadi asam-asam lemak rantai pendek dan beberapa

mikroflora spesifik menghasilkan asam laktat. Hal ini menyebabkan penurunan pH kolon sehingga pertumbuhan bakteri patogen terhambat. Mekanisme seperti ini berimplikasi pada peningkatan kekebalan tubuh (29).

Sedangkan levan memiliki beberapa fungsi pada berbagai macam bidang seperti dalam bidang kesehatan khususnya yang berkaitan dengan penghambatan pertumbuhan sel tumor. Levan juga telah digunakan di bidang farmasi sebagai bahan tambahan pada pembuatan tablet dan gel. Di bidang pangan levan dapat digunakan untuk meningkatkan ketahanan tanaman terhadap kekeringan dan tekanan suhu dingin, selain itu juga berfungsi sebagai makanan tambahan pada ternak, levan juga digunakan dalam produksi makanan maupun minuman fermentasi (30).



Gambar 2. Struktur kimia Inulin (A) dan Levan (B) (1)

Fungsi laksatif dimiliki oleh glukomannan, yang juga mempunyai manfaat lain seperti dapat mengatasi obesitas, diabetes, dan kolesterol tinggi. Glukomannan menimbulkan rasa kenyang sehingga dapat mengurangi keinginan untuk makan, dikarenakan seratnya yang membuatnya lebih lama berada dalam lambung. Setelah mengkonsumsi glukomannan, absorpsi karbohidrat dari makanan menjadi lebih lambat, yang dapat mengakibatkan peningkatan kadar gula darah yang tidak secepat biasanya, sehingga bermanfaat untuk mengatasi masalah diabetes (31).

Dekstran merupakan makromolekul yang terdiri dari subunit glukosa. Pemberian dekstran secara intra vena memiliki sejumlah efek farmakologis yang menguntungkan bagi kesehatan, seperti memiliki aktivitas antiplatelet dan antifibrin, sebagai penambah volume plasma pada keadaan hipovolemia, serta dapat menghalangi agregasi trombosit. Komplikasi dari penggunaan dekstran jarang terjadi (32). Selain itu, dekstran dilaporkan telah banyak diteliti dalam bidang farmasi sebagai salah satu matriks bagi sistem penghantaran obat baru berbentuk konjugat yang berikatan dengan protein (7).

C. BAKTERI ASAM LAKTAT

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri Gram-positif, yang tidak membentuk spora, non motil, dapat berbentuk batang atau kokus, serta tidak mempunyai sistem respirasi yang membuatnya menjadi sangat

bergantung pada metabolisme fermentatif, sehingga tidak dapat menghasilkan ATP. Oleh karena itu BAL dapat tumbuh dengan baik pada kondisi anaerob, karena tidak membutuhkan oksigen dalam menghasilkan energi (19, 33, 34). BAL juga disebut aerotoleran anaerob karena berbeda dengan organisme anaerob lainnya, dimana BAL tidak sensitif terhadap O₂ sehingga dapat tumbuh dalam lingkungan dengan atau tanpa O₂ (35).

Bakteri asam laktat mempunyai status GRAS (Generally Recognized as Safe), sehingga termasuk kedalam mikroorganisme yang aman dengan sifatnya yang tidak toksik dan tidak menghasilkan toksin, terlebih lagi karena tidak dapat membusukkan protein sehingga tidak dapat menghasilkan senyawa beracun, oleh karenanya dapat disebut *food grade microorganism* atau dikenal juga sebagai mikroorganisme yang tidak berisiko terhadap kesehatan. Bahkan bakteri asam laktat dapat bermanfaat untuk meningkatkan higienitas dan keamanan pangan melalui penghambatan secara alami terhadap mikroorganisme berbahaya yang bersifat patogen (36), serta produk makanan fermentasi yang stabil dalam penyimpanan, serta menghasilkan cita rasa, tekstur yang khas (37, 38). Berbagai *strain*nya secara luas digunakan sebagai pemula pada industri susu, daging, sayur, dan roti yang mana salah satu kontribusi yang paling penting dari mikroorganisme ini adalah memperpanjang waktu paruh produk fermentasi (39). Selain itu juga sifat BAL sebagai probiotik, sering dimanfaatkan dalam bidang kesehatan untuk mencegah infeksi saluran pencernaan melalui proses kompetisi dengan

bakteri patogen, menstimulasi sistem imun terutama pada mukosa usus, dan menjaga keseimbangan mikroflora normal pada usus (2, 23).

Berdasarkan proses fermentasi yang berlangsung, BAL dapat dikelompokkan menjadi kelompok homofermentatif, heterofermentatif, dan fakultatif heterofermentatif. Pada kelompok homofermentatif dihasilkan lebih dari 85% asam laktat sebagai produk utama dari fermentasi gula melalui jalur glikolisis (Embden-Meyerhof-Parnas). Pada kelompok heterofermentatif selain dihasilkan asam laktat sekitar 50%, dihasilkan juga produk sampingan seperti etanol, dan karbondioksida (CO₂) melalui jalur 6-fosfoglukonat/fosfoketolase (41, 43, 44). Sedangkan BAL yang termasuk kedalam kelompok fakultatif heterofermentatif, memproduksi asam laktat, asam asetat, dan karbondioksida melalui dua jalur pada kedua kelompok sebelumnya.

Perbedaan hasil produksi tersebut dikarenakan adanya perbedaan enzim yang dihasilkan antara BAL kelompok homofermentatif dengan kelompok heterofermentatif. BAL homofermentatif memiliki aldolase sedangkan BAL heterofermentatif memiliki fosfoketolase (35).

Pemanfaatan BAL dalam bidang industri bergantung pada sejumlah spesies yang menguntungkan dan tidak patogen, misalnya *Lactococcus* dan *Streptococcus thermophilus* yang digunakan dalam pembuatan produk susu; *Lactobacillus* yang digunakan dalam pembuatan produk susu, sayuran, dan sereal; *Leuconostoc* yang digunakan dalam pembuatan produk susu dan

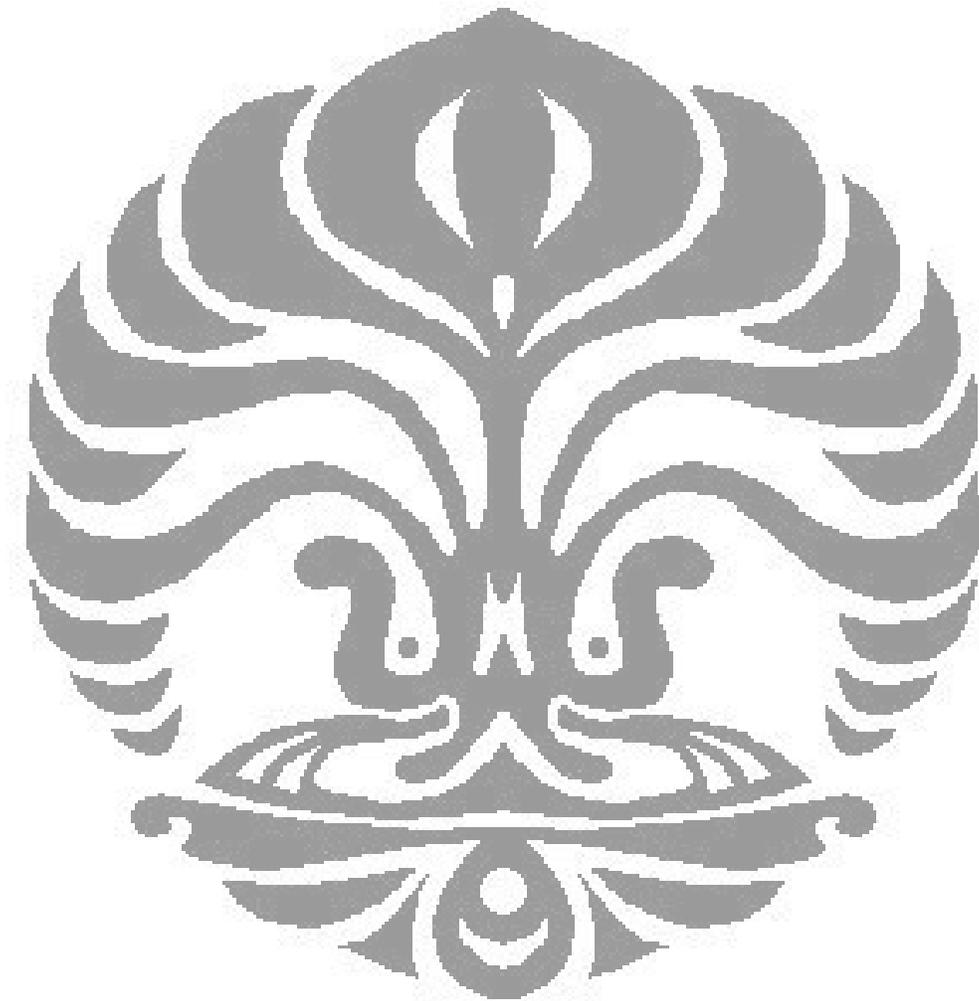
sayuran, dan *Oenococcus oeni* yang digunakan dalam pembuatan minuman anggur (1).

D. SUMBER-SUMBER ISOLASI BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL)

BAL telah banyak diteliti dan dikoleksi oleh peneliti dan praktisi industri baik dari dalam maupun luar negeri. Oleh karena itu, eksplorasi BAL yang banyak terdapat di alam Indonesia perlu ditingkatkan untuk menambah koleksi mikroba yang telah ada sebelumnya. BAL yang banyak tersebar di alam Indonesia ini dapat diisolasi dari berbagai sumber antara lain buah-buahan dan sayuran yang telah busuk, berbagai produk asinan yang dibuat dengan cara tradisional, susu yang difermentasi, feses dari ternak, maupun dari bayi, kecap ikan, acar ketimun, bekasam, growol, gatot, tempoyak, puli, dan lain-lain. Sebagai informasi tambahan, menurut data yang didapat dari luar negeri, telah dilakukan isolasi BAL dari berbagai macam sumber yang berbeda seperti dari krim asam, susu asam, gula tebu, telinga anjing, darah manusia, empedu manusia, cabai, tapai, tempe, hati burung kenari, sosis, daging asap/diasinkan, jus wortel, ikan fermentasi, dan biji coklat (28, 45). Oleh karenanya BAL yang akan digunakan perlu diseleksi terlebih dahulu untuk memperoleh isolat yang memiliki kualitas baik.

Penelitian yang dilakukan sebelumnya telah berhasil mengisolasi BAL dari beberapa jenis makanan dan minuman tradisional asli Indonesia yaitu es

cendol, es cincau, bajigur, es podeng, es buah, wedang ronde, puli, tapai ketan dan gatot (19, 13, 45).



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. Penelitian dilakukan dari bulan Februari sampai Mei 2009.

B. BAHAN

1. Isolat Stok Beku BAL

Isolat stok beku BAL yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat yang berasal dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI sebanyak 22 isolat yang memproduksi EPS dalam jumlah banyak, hasil penelitian sebelumnya (13, 45) (Tabel1).

Sebagai kontrol positif adalah *Weissella confusa* MBF 8-2 dan kontrol negatif adalah *Leuconostoc mesenteroides* TISTR Bangkok MIRCEN yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI dan pemberian *Universitas Indonesia Culture Collection* (UICC) (46).

2. Medium dan Bahan Kimia

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

Bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan medium yaitu pepton [Difco, USA], 'LAB-lemco' [Oxoid, UK], *yeast extract* [Difco, USA], dikalium hidrogen fosfat [Merck, Jerman], natrium asetat [Merck, Jerman], amonium sitrat [Merck, Jerman], magnesium sulfat [Merck, Jerman], mangan sulfat [Merck, Jerman], tween 80 [Merck, Jerman], dekstrosa [Sigma, USA], sukrosa [Difco, USA], raffinosa [Wako, Jepang], kalsium karbonat [Merck, Jerman], agar bakto [Pronadisa, Spanyol], medium MRS broth [Difco, USA].

Bahan Kimia yang digunakan HCl (asam klorida) [Mallinckrodt], NaOH (natrium hidroksida) [Merck] dan aquades.

C. ALAT

Peralatan yang digunakan selama penelitian adalah inkubator [Orbital Shaker Incubator], pemanas dengan *magnetic stirrer* [Torrey Pines Scientific, USA], autoklaf [Hirayama, Japan], *Laminar Air Flow*

Cabinet [Esco,Cina], pH meter [Eutech, Singapura], timbangan analitik [Scout Acculab, USA], lemari pendingin [Sansio dan Toshiba, Jepang], *deep freezer* -70°C [New Brunswick, Inggris], oven [Lab-line, USA dan WTC Binder, New Zealand], digital scanner [CanonScan 4400F, USA], tabung reaksi, cawan petri dan alat-alat lain yang biasa dipergunakan dalam laboratorium mikrobiologi dan bioteknologi.

D. CARA KERJA

Cara kerja pada penelitian ini diawali dengan pembuatan medium, pembuatan kultur stok dan kultur kerja. Setelah itu baru dilakukan pengamatan produksi eksopolisakarida dengan menggunakan medium modifikasi MRS-sukrosa 10%. Dilanjutkan dengan pengamatan produksi eksopolisakarida dengan menggunakan medium modifikasi MRS-rafinosa 5% dan MRS-rafinosa 5%-glukosa 1%. Kemudian melakukan verifikasi eksopolisakarida fruktan sebagai indikasi adanya enzim FTF.

1. Pembuatan Medium (50)

a. Medium Agar MRS (*de Mann Rogosa Sharpe*)

Komposisi medium MRS broth terdiri dari proteose pepton No 3 (10 gram), *beef extract* (10 gram), *yeast extract* (5 gram), dekstrosa (20 gram), polisorbat 80 (1 gram), ammonium sitrat (2 gram), sodium asetat (5 gram), magnesium sulfat (0,1 gram),

mangan sulfat (0,05 gram), dipotassium fosfat (2 gram), kemudian timbang 55 gram campuran bahan yang telah homogen tersebut untuk membuat 1 liter media, kemudian masukkan ke dalam Erlenmeyer. Setelah itu ditambahkan dengan aquades secukupnya dan dilarutkan dengan diaduk dengan *magnetic stirrer*. Larutan medium ini diukur pH nya dengan pH meter dan diatur agar berada pada kisaran pH $6,2 \pm 0,2$ dengan larutan Natrium hidroksida atau asam klorida 1N. Setelah itu volume dicukupkan hingga 1 liter dengan aquades dan dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga mendidih. Selanjutnya larutan medium ini dipindahkan ke labu bulat, dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 2 atm, selama 15 menit.

Dalam *Laminar Air Flow* (LAF) yang sebelumnya telah disiapkan selama 2 jam, medium yang masih hangat dituang secara aseptis ke cawan petri. Setelah membeku, cawan petri dibalik dan dibiarkan semalam dalam inkubator.

b. Medium Agar MRS untuk agar miring

Timbang sejumlah 55 gram MRS broth dan 10 gram CaCO_3 untuk membuat 1 liter media agar MRS untuk agar miring. Setelah itu, tambahkan aquades secukupnya dan dilarutkan dengan cara diaduk dengan *magnetic stirrer*. Kemudian larutan medium ini diukur pHnya dengan pH meter dan diatur agar berada pada

kisaran pH $6,2 \pm 0,2$ dengan larutan asam klorida atau natrium hidroksida. Setelah itu volume dicukupkan hingga 1 liter dengan aquades dan dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga mendidih. Dalam keadaan masih panas dan masih sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*, medium tersebut dipipet sebanyak 5 ml ke dalam tabung reaksi. Kemudian seluruh tabung reaksi disterilisasi dalam autoklaf pada suhu $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, tekanan 2 atm, selama 15 menit. Tabung reaksi dimiringkan hingga membeku dan dibiarkan semalaman di inkubator sebelum digunakan keesokan harinya.

c. Medium Modifikasi MRS-Sukrosa 10 %

Pepton 5 g, 'LAB-lemco' 4 g, *yeast extract* 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 bakto 7,5 g; ditimbang masing-masing, kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, kecuali agar bakto yang akan kita masukkan belakangan sesaat sebelum dipindahkan ke labu bulat. Setelah itu ditambahkan dengan aquades secukupnya dan dilarutkan dengan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Selanjutnya ditambahkan 0,25 ml (± 5 tetes) tween 80 dan diaduk kembali hingga homogen. Larutan medium ini diukur pH nya dengan pH meter dan diatur agar berada pada kisaran pH $6,2 \pm 0,2$ dengan larutan Natrium

hidroksida atau asam klorida 1N. Setelah itu volume dicukupkan hingga 250 ml dengan aquades dan dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga mendidih. Selanjutnya larutan medium ini dipindahkan ke labu bulat.

Sukrosa ditimbang sebanyak 50 g dan dimasukkan ke dalam labu bulat. Kemudian ditambahkan dengan aquades secukupnya dan panaskan di atas *hotplate* hingga mendidih. Setelah itu volume dicukupkan hingga volume 250 ml dengan aquades. Kedua medium tersebut disterilisasi dalam autoklaf secara terpisah pada suhu 121°C tekanan 2 atm, selama 15 menit.

Dalam *Laminar Air Flow* (LAF) yang sebelumnya telah disiapkan selama 2 jam, larutan sukrosa 10 % tersebut dicampurkan ke dalam medium agar MRS secara aseptis dan dihomogenkan. Medium yang masih hangat dituang secara aseptis ke cawan petri. Setelah membeku, cawan petri dibalik dan dibiarkan semalam dalam inkubator.

d. Medium Modifikasi MRS-Raffinosa 5%

Pepton 2 g, 'LAB-Lemco' 1,6 g; *yeast extract* 0,8 g; dikalium hidrogen fosfat 0,4 g; natrium asetat 0,6 g; amonium sitrat 0,4 g; magnesium sulfat 0,04 g; mangan sulfat 0,01 g; dan agar bakto 3 g, ditimbang masing-masing kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, kecuali agar bakto yang akan kita masukkan

belakangan sesaat sebelum dipindahkan ke labu bulat. Kemudian ditambahkan dengan aquades 50 ml dan dilarutkan dengan cara diaduk dengan *magnetic stirrer*. Selanjutnya ditambahkan 0,2 ml tween 80 dan diaduk kembali hingga homogen. Larutan medium ini diukur pH nya dengan menggunakan pH meter dan diatur agar berada pada kisaran pH $6,2 \pm 0,2$ dengan menggunakan larutan Natrium hidroksida atau asam klorida 1N. Setelah itu volume dicukupkan hingga 125 ml dengan aquadest dan dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga mendidih, kemudian dipindahkan ke labu bulat.

Raffinosa ditimbang sebanyak 12,5 g; kemudian dimasukkan ke dalam labu bulat yang berbeda dari larutan yang sebelumnya. Setelah itu ditambahkan dengan aquades 50 ml dan dilarutkan hingga larut homogen. Selanjutnya volume dicukupkan hingga volume 125 ml dengan aquadest. Kedua medium ini disterilisasi dalam autoklaf secara terpisah pada suhu 121°C , tekanan 2 atm, selama 15 menit.

Di dalam *Laminar Air Flow* (LAF), 50 ml larutan raffinosa dicampurkan ke dalam 50 ml medium modifikasi agar MRS secara aseptis dan dihomogenkan. Medium yang masih hangat dituang secara aseptis ke cawan Petri. Setelah membeku, cawan Petri dibalik dan dibiarkan semalam dalam inkubator.

e. Medium Modifikasi MRS-Raffinosa 5%-Glukosa 1%

Pepton 2 g, 'LAB-Lemco' 1,6 g; *yeast extract* 0,8 g; dikalium hidrogen fosfat 0,4 g; natrium asetat 0,6 g; amonium sitrat 0,4 g; magnesium sulfat 0,04 g; mangan sulfat 0,01 g; dan agar bakto 3 g, ditimbang masing-masing, lalu dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, kecuali agar bakto yang akan kita masukkan belakangan sesaat sebelum dipindahkan ke labu bulat. Kemudian ditambahkan dengan aquades 50 ml dan dilarutkan dengan cara diaduk dengan *magnetic stirrer*. Selanjutnya ditambahkan 0,2 ml tween 80 dan diaduk kembali hingga homogen. Larutan medium ini diukur pH nya dengan menggunakan pH meter dan diatur agar berada pada kisaran pH $6,2 \pm 0,2$ dengan menggunakan larutan Natrium hidroksida atau asam klorida 1N. Setelah itu volume dicukupkan hingga 125 ml dengan aquadest dan dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga mendidih, kemudian dipindahkan ke labu bulat.

Raffinosa ditimbang sebanyak 12,5 g dan glukosa sebanyak 2,5 g; kemudian dimasukkan ke dalam labu bulat yang berbeda dari larutan yang sebelumnya. Setelah itu ditambahkan dengan aquades 50 ml dan dilarutkan hingga larut homogen. Selanjutnya volume dicukupkan hingga volume 125 ml dengan aquades. Kedua

medium ini disterilisasi dalam autoklaf secara terpisah pada suhu 121° C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.

Di dalam *Laminar Air Flow* (LAF), larutan raffinosa dicampurkan ke dalam medium modifikasi agar MRS secara aseptis dan dihomogenkan. Medium yang masih hangat dituang secara aseptis ke cawan Petri. Setelah membeku, cawan Petri dibalik dan dibiarkan semalam dalam inkubator.

2. Pembuatan kultur stok dan kultur kerja

Isolat stok beku BAL koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI hasil penelitian sebelumnya (15, 40), disubkultur terlebih dahulu pada media agar MRS, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam. Koloni tunggal yang diperoleh kemudian disubkultur kembali ke media agar miring MRS dengan pengerjaan duplo, sebagai kultur kerja dan kultur stok, lalu diinkubasi selama 18-24 jam. Setelah itu, kultur kerja dan kultur stok disimpan pada suhu -4°C.

3. Pengamatan –produksi EPS dengan menggunakan medium modifikasi MRS-Sukrosa 10%

Isolat BAL dari agar miring MRS digoreskan pada medium modifikasi MRS-sukrosa 10% kemudian diinkubasi selama 18-24 jam. Produksi EPS diamati sebagai pertumbuhan yang berlendir pada medium modifikasi tersebut (5, 12).

4. Pengamatan produksi EPS fruktan dengan menggunakan medium modifikasi MRS-Raffinosa 5%.

Isolat BAL dari agar miring MRS digoreskan pada medium modifikasi MRS-raffinosa 5% kemudian diinkubasi selama 18-24 jam. Produksi EPS diamati sebagai pertumbuhan yang berlendir pada medium modifikasi tersebut (20).

5. Pengamatan produksi EPS fruktan dengan menggunakan medium modifikasi MRS-Raffinosa 5%-Glukosa 1%.

Isolat BAL dari agar miring MRS digoreskan pada medium modifikasi MRS-raffinosa 5%-glukosa 1% kemudian diinkubasi selama 18-24 jam. Produksi EPS diamati sebagai pertumbuhan yang berlendir pada medium modifikasi tersebut.

6. Perbandingan data pengamatan visual dengan data molekuler.

Data hasil pengamatan produksi EPS dan produksi fruktan yang didapat dengan menggunakan berturut-turut yaitu medium modifikasi MRS-sukrosa 10% dan medium modifikasi MRS-raffinosa 5% akan dibandingkan dengan data molekuler dari hasil penelitian sebelumnya. Dari perbandingan ini akan diperoleh kesimpulan mengenai prediksi BAL yang menghasilkan glukosa saja, fruktan saja, atau bahkan keduanya secara bersamaan.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Pengamatan Morfologi Koloni BAL

Morfologi koloni isolat BAL yang diremajakan dari stok beku pada medium MRS diamati secara visual, kemudian dibandingkan dengan hasil penelitian sebelumnya. Koloni isolat BAL yang dihasilkan berbentuk bulat dengan permukaan yang halus dan berwarna putih sampai putih kekuningan.

Hasil pengamatan morfologi koloni BAL dibandingkan dengan data penelitian sebelumnya dapat dilihat pada Tabel 1.

2. Pengamatan Visual Produksi EPS

Pengamatan terhadap produksi EPS isolat BAL pada medium modifikasi MRS-sukrosa 10% memberikan hasil bahwa secara keseluruhan isolat yang digunakan dalam penelitian ini menghasilkan EPS berupa lendir berwarna putih kekuningan. Hasil pengamatan ini dibandingkan dengan data penelitian sebelumnya dapat dilihat pada Tabel 3. Gambar pengamatan hasil dokumentasi terhadap EPS yang

dihasilkan pada media modifikasi MRS-sukrosa 10% dapat dilihat pada Gambar 5-26.

Hasil pengamatan terhadap EPS yang diproduksi oleh isolat BAL pada medium modifikasi MRS-raffinosa 5% adalah berupa lendir. Namun tidak semua BAL memproduksi EPS pada media tersebut, karena ada beberapa diantaranya yang memproduksi sedikit EPS atau bahkan tidak memproduksi EPS sama sekali. Hasil pengamatan ini dapat dilihat pada Tabel 3. Gambar pengamatan hasil dokumentasi terhadap EPS yang dihasilkan pada media modifikasi MRS-raffinosa 5% dapat dilihat pada Gambar 5-26.

Pengamatan produksi EPS dari isolat BAL pada medium modifikasi MRS-raffinosa 5%-glukosa 1% diperoleh hasil bahwa semua BAL menghasilkan EPS, berupa lendir yang berwarna putih kekuningan, hanya saja intensitasnya berbeda-beda. Hasil pengamatan ini dapat dilihat pada Tabel 3. Gambar pengamatan hasil dokumentasi terhadap EPS yang dihasilkan pada media modifikasi MRS-raffinosa 5%-glukosa 1% dapat dilihat pada Gambar 5-26.

B. PEMBAHASAN

Pada awal penelitian, hal yang pertama kali dilakukan adalah membuat media agar MRS dan modifikasinya. Pada pembuatan media kecuali untuk agar miring MRS, sumber karbon/gula dibuat terpisah dari bahan lain. Hal ini dilakukan untuk menghindari

karamelisasi/pengarangan, yang berpengaruh terhadap kestabilan antara senyawa karbohidrat dengan protein yang ada pada media. Kestabilan antara kedua senyawa tersebut dapat terganggu jika keduanya dicampur pada saat sterilisasi. Karamelisasi/pengarangan dapat menurunkan nutrisi pada media sehingga berpengaruh terhadap pertumbuhan/kehidupan bakteri pada media tersebut oleh karena itu kedua bahan dicampur sesaat sebelum dituang ke cawan petri (18).

Langkah selanjutnya adalah melakukan peremajaan isolat BAL dari kultur stok beku koleksi laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi FMIPA UI Departemen Farmasi. Isolat-isolat BAL tersebut berasal dari hasil isolasi yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya. Isolat BAL ini diisolasi dari beberapa sumber seperti es cincau, es cendol, bajigur, wedang ronde, es podeng, es buah, puli, tape ketan, dan gatot (13, 45).

Sebanyak 22 isolat BAL dipilih berdasarkan kemampuan memproduksi EPS pada media sukrosa, dan menurut data molekuler menunjukkan indikasi gen penyandi sukrase (45). Isolat-isolat ini diremajakan dengan cara menggunakan ose untuk mengambil BAL dari kultur stok beku, lalu menggoreskannya pada medium agar MRS secara aseptis. Kemudian isolat yang sudah berada pada media agar MRS yang merupakan medium selektif untuk pertumbuhan dan pemeliharaan BAL tersebut diinkubasi pada suhu 32°C selama 18-24 jam dalam keadaan aerob. Perlakuan ini dilakukan berdasarkan sifat BAL yang aerotoleran anaerob, dimana BAL tidak menggunakan oksigen untuk menghasilkan

energi, melainkan mengandalkan pada hasil fermentasi gula, namun tetap dapat tumbuh pada kondisi aerob (40, 42). Kemudian, isolat-isolat tersebut dikeluarkan dari inkubator dan diamati pertumbuhan koloninya. Koloni yang diinginkan adalah berupa koloni tunggal yang murni, cara tersebut diatas perlu dilakukan beberapa kali sampai didapat koloni tunggal yang murni. Gambar koloni tunggal yang murni dapat dilihat pada Gambar 3. Pada tahap ini diharapkan BAL tersebut telah tumbuh optimal untuk mencapai fase stasionernya dimana sebagian besar BAL sudah dapat memperlihatkan sifat fenotif maupun genotifnya (35).

Adanya perbedaan morfologi yang dihasilkan dengan penelitian sebelumnya dapat disebabkan oleh beberapa faktor yang dapat mempengaruhi seperti media yang digunakan, kondisi inkubasi (suhu), dan lama waktu inkubasi juga dapat mempengaruhi morfologi BAL. Pada penelitian sebelumnya digunakan media agar MRS Broth sedangkan pada penelitian sekarang digunakan media agar MRS racikan. Subjektifitas dari pengamat juga dapat mempengaruhi hasil yang diperoleh, data dapat dilihat di Tabel 1.

Setelah didapat koloni tunggal yang dimaksud, untuk memastikan bahwa bakteri yang dimaksud adalah BAL yang merupakan kelompok bakteri Gram positif maka dilakukan pewarnaan Gram. Hasil dari pewarnaan Gram dinyatakan positif jika memberikan warna ungu (Gram positif), dan negatif bila warna merah yang dihasilkan (Gram negatif) (48). Gambar hasil pewarnaan Gram dapat dilihat pada Gambar 4.

Langkah selanjutnya adalah memindahkan koloni isolat BAL ke media agar miring MRS dan dibuat duplo. Perbedaan agar miring MRS ini ada pada penambahan kalsium karbonat ke dalam medium agar MRS. Penambahan kalsium karbonat ini dilakukan karena kultur yang dibuat akan disimpan dan digunakan dalam jangka waktu yang cukup lama sebagai kultur kerja dan kultur stok. Hal ini untuk mencegah BAL mati karena pH media yang berubah menjadi asam/penurunan pH akibat dari asam laktat yang dihasilkan oleh BAL itu sendiri. Oleh karenanya kalsium karbonat ditambahkan ke dalam media agar miring MRS dimaksudkan untuk menjaga pH medium agar tidak terlalu asam. Tanpa penambahan kalsium karbonat asam laktat yang terbentuk dapat menurunkan pH media hingga menunjukkan angka 2 pada pH-meter sehingga dapat menyebabkan kematian dari bakteri (1, 42).

Proses selanjutnya yang dilakukan adalah penggosokan BAL dari kultur kerja yang ada di agar miring pada media modifikasi MRS-sukrosa 10%. Hal ini dilakukan untuk membandingkan hasil yang didapat pada penelitian ini dengan penelitian sebelumnya.

Dengan adanya enzim glukansukrase atau fruktansukrase yang dimiliki oleh BAL maka akan diperoleh produksi EPS sebagai hasil pemecahan enzim tersebut terhadap sukrosa yang menjadi sumber karbonnya yang terdapat dalam media. Proses yang terjadi menggunakan energi yang dilepaskan dari reaksi yang terjadi untuk

membentuk rantai polimer gula dari unit-unit gula yang terlibat didalamnya (1).

Hasil EPS yang didapat dari media modifikasi MRS-sukrosa 10% sesuai dengan data yang telah ada dari penelitian sebelumnya, walaupun beberapa diantaranya memberikan intensitas yang berbeda dari hasil penelitian sebelumnya. Hal ini mungkin terjadi karena pengaruh dari beberapa faktor seperti adanya perbedaan dari media atau koloni BAL yang digunakan, selain itu faktor suhu dan lamanya inkubasi juga dapat mempengaruhi hasil EPS yang dihasilkan. Namun medium sukrosa tidak dapat dijadikan acuan untuk menentukan tipe EPS yang dihasilkan berupa glukosa atau fruktan. Dengan demikian belum dapat ditentukan enzim sukrase apa saja yang dimiliki, glukansukrase, fruktansukrase atau keduanya. Untuk memproduksi polimer fruktan maka substrat gula sebagai sumber karbon yang digunakan pada media adalah menggunakan raffinosa sebagai pengganti sukrosa. Raffinosa merupakan salah satu jenis trisakarida yang tersusun dari α -galaktosa(1-6)- α -glukosa(1-2)- β -fruktosa, yang mana nantinya oleh FTF akan dipecah dan menghasilkan senyawa laktosa (galaktosa-glukosa) dan fruktosa sehingga akan didapat polimer fruktan yang diinginkan. Maka raffinosa dapat disebut sebagai media spesifik untuk mengetahui ada tidaknya aktivitas fruktansukrase (1).

Oleh karena itu dalam penelitian ini digunakan media modifikasi MRS-raffinosa 5% untuk mengetahui apakah isolat-isolat BAL yang

digunakan mempunyai aktivitas fruktansukrase selain glukansukrase. Dengan demikian BAL yang menghasilkan lendir EPS dapat dinyatakan bahwa BAL tersebut memiliki aktivitas fruktansukrase. EPS yang dihasilkan merupakan hasil pemecahan fruktansukrase terhadap raffinosa sebagai sumber karbon menjadi glukosa-galaktosa dan fruktosa bebas dan dirangkai menjadi polimer fruktosa disebut fruktan. Dengan bantuan energi yang dihasilkan dari reaksi kimia yang berlangsung didalamnya sehingga dapat membentuk fruktan (polimer fruktosa), selain itu GTF yang juga dimiliki BAL tidak dapat memecah ikatan antara glukosa dan galaktosa sehingga glukosa tidak dapat dibebaskan untuk menjadi polimer glukukan.

Beberapa faktor ikut mempengaruhi BAL dalam proses menghasilkan EPS, diantaranya adalah kondisi kultur yang berkaitan dengan pH dan suhu serta komposisi dari media yang digunakan terutama sumber karbon dan konsentrasi yang digunakan dalam media. Sedangkan konsentrasi gula yang digunakan sebagai sumber karbon berkaitan dengan viskositas dari EPS yang dihasilkan.

Pada penelitian ini dilakukan modifikasi pada media MRS yang digunakan. Adanya indikasi bahwa BAL memerlukan gula sederhana seperti glukosa untuk menginduksi pertumbuhan BAL yang optimum agar enzim *fff* yang dihasilkan mampu memecah raffinosa dan menghasilkan EPS (data belum dipublikasikan), oleh karena itu dilakukan penambahan glukosa 1% ke dalam komposisi media modifikasi MRS-raffinosa 5%.

Didapat hasil bahwa produksi EPS pada media modifikasi raffinosa 5%-glukosa 1% lebih baik daripada yang menggunakan media modifikasi MRS-raffinosa 5% saja. Dengan demikian diketahui bahwa pertumbuhan BAL memerlukan gula yang sederhana seperti glukosa. Hal ini terlihat jelas perbedaannya pada penggunaan media modifikasi MRS-sukrosa 10% yang tidak memerlukan penambahan glukosa, karena BAL dapat tumbuh dengan baik pada media tersebut dan menghasilkan EPS dalam jumlah yang banyak.

Tahap berikutnya adalah menggoreskan isolat BAL pada media modifikasi raffinosa 5%-glukosa 1%. Menurut pengamatan secara visual yang dilakukan didapat hasil bahwa seluruh BAL memproduksi EPS walaupun dengan intensitas yang berbeda satu sama lain. Hasil pengamatan dilakukan dengan membandingkan dengan hasil goresan pada media MRS saja.

Pada penelitian sebelumnya telah dilaporkan hasil isolat yang memiliki gen GTF menggunakan primer *degenerate* DegFor dan DedRev (13, 47). Dengan menggunakan primer ini maka dapat dilacak dengan baik kandungan gen GTF pada isolat BAL koleksi asal sumber lokal dengan teknik PCR, dapat dilihat pada Tabel 2 dan 3.

Pada penelitian ini diperoleh hasil pengamatan secara visual terhadap produksi EPS oleh BAL pada media modifikasi MRS-sukrosa 10%, MRS-raffinosa 5% dan modifikasi raffinosa 5%-glukosa 1%. Data hasil pengamatan terdapat pada Tabel 3.

Dari data hasil EPS yang diperoleh selama penelitian dan setelah dibandingkan produksinya dalam 3 media modifikasi yang berbeda, diketahui bahwa BJJ 2, BJJ 3, CNC 8, PDG 15, dan SBH 9 diduga hanya memiliki gen *gtf* saja. Hal ini dapat dilihat dari sangat sedikit/tidak adanya EPS yang diproduksi oleh kelima isolat tersebut pada medium MRS-raffinosa 5% dan modifikasi raffinosa 5%-glukosa 1%, dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar no 6, 7, 14, 21, 23.

Sedangkan untuk isolat BJJ1, BJJ 4, CNC 2(1), CNC 3(2), CNC 5(2), CNC 6, CNC 7(1), CNC 11, PDG 2, PDG 3, PDG 4, PDG 10(1), PDG 14, PUL 10, WRS 3, WRS 5, dan WRS 6 diduga memiliki gen *ftf* selain gen *gtf*. Hal ini dapat dilihat dari isolat-isolat tersebut yang dapat memproduksi EPS dalam jumlah sedang hingga banyak pada media MRS-raffinosa 5% dan modifikasi raffinosa 5%-glukosa 1%, dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar no 5, 6, 8-13, 15-20, 22, 24-26. Dengan ada perbedaan hasil dari penelitian sebelumnya, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut kearah molekuler dengan menggunakan PCR dengan primer FTF *Degenerate*, yang merupakan primer spesifik dalam melacak gen *ftf* pada isolat-isolat tersebut.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Hasil pengamatan secara visual yang dilakukan terhadap 22 isolat BAL, terdapat 17 isolat yang mengandung enzim fruktansukrase dan menghasilkan EPS pada media modifikasi MRS-raffinosa 5%-Glukosa 1%.
2. Hasil perbandingan dan pengamatan visual dengan data penelitian sebelumnya, dari 22 isolat terdapat 17 isolat BAL selain menghasilkan polimer glukosa (glukan) juga menghasilkan polimer fruktosa (fruktan).

B. SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan data molekuler dari enzim FTF pada isolat BAL dalam penelitian ini untuk mendapatkan kepastian mengenai keberadaan enzim tersebut.
2. Perlu dilakukan isolasi dan purifikasi EPS glukan dan fruktan untuk dianalisa struktur molekulnya dengan NMR.

DAFTAR ACUAN

1. Van Hijum SAFT, S Kralj, LK Ozimek, L Dijkhuizen, and GH Van Geel-Schutten. General Introduction. Dalam: Hijum SAFT van. *Fructosyltransferase of Lactobacillus reuteri: Characterization of Genes, Enzymes, and Fructan Polymers*. Enschede: Printpartners Ipskamp, 2004: 10-33.
2. Van Hijum SAFT, S Kralj, LK Ozimex, L Dijkhuizen, and GH Van Geel-Schutten. *Glucansucrases of Lactobacilli: Characterization of genes, enzymes, and products synthesized*. Ponsen & Looijen B.V, The Netherlands: Microbial Physiology Departement of the Groningen Biomolecular Science and Biotechnology Institute (GBB) of the University of Groningen, 2004. **150**:3681-3690.
3. Kralj S, GH Van Geel-Schutten, MMG Dondorff, S Kirsanovs, MJEC van der Maarel, L Dijkhuijen. Glucan Synthesis in the Genus *Lactobacillus*: Isolation and Characterization of Glucansucrase Genes, Enzymes and Glucan Products from Six Different Strains. *Microbiology*, 2004. **150**: 3681 – 3690.

4. Guoyu and Klaus Futterer. Donor substrate recognition in the Raffinose-Bound E342A mutant of Fructosyltransferase *Bacillus subtilis* Levansucrase. *BMC Structural Biology*, 2008: 1-12.
5. Van Geel-Schutten, GH Lactic Acid Bacteria and Exopolysaccharide Synthesis *Dalam : Exopolysaccharide Synthesis by Lactobacillus reuteri : Molecular Characterization of a Fructosyltransferase and a Glucansucrase*, 2003: 1-19.
6. Welman AD and SM Ian. Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria: Perspectives and Challenges. *Trends in Biotechnology*, 2003: 269-273.
7. Veronese RM dan P Caliceti. Custom-tailored Pharmacokinetics and Pharmacodynamics via Chemical Modification of Biotech Drug. *Dalam: Veronese RM dan Caliceti P. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Biotech Drug: Principles and Case Studies in Drug Development*. Meibohm: Wiley – CH Weinheim, 2006.
8. Van der Meulen R. Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. *International Journal of Food Microbiology*, 2007. **118** 250–258.
9. Coussement PAA. Inulin and Oligofructose: Safe Intakes and Legal Status. *The Journal of Nutrition*, 1999. **129** (7S): 1412S-1417S.
10. Frengova, I Ginka , ED Simova, DM Beshkova, and ZI Simov. Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria of Kefir

Grains. *Dalam: Giraffa G. Microbial Polysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria in the Dairy Industry. Industrie Alimentari, 1994. 33: 295-298.*

11. Misgiyarta dan S Widowati. *Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Indigenus*. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, 2003 : 374-380.
12. Klaenhammer T, E Altermann, F Arigoni, A Bolotin, F Breidt, J Broadbent, et al. Discovering Lactic Acid Bacteria by Genomics. *Antonie van Leeuwenhoek, 2002. 82 : 29 – 58*
13. Mahardhika. *Isolasi Bakteri Asam Laktat Dari Berbagai Makanan dan Minuman Tradisional dan Identifikasi Isolat-Isolatnya Secara Molekuler Menggunakan DNA Ribosomal 16S*. Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok, 2008.
14. Petry, S Furlan, MJ Crepeau, J Cerning, M Desmazeaud. Factor Affecting Exocellular Polysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* Grown in a Chemically Defined Medium. *Appl. Environ. Microbiol, 2000. 66 (8): 3427-343.*
15. Van Hijum SAFT, S Kralj, LK Ozimek, L Dijkhuizen, and GH van Geel-Schutten. Structure-Function Relationships of Glucansucrase and Fructansucrase Enzyme from Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review, 2006: 157-176.*

16. Sheilla. *Identifikasi Produk Eksopolisakarida dan Penentuan Viskositas Struktur dari Beberapa Isolat bakteri Asam Laktat*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI, 2007.
17. Geel-Schutten GH, F van Flesch, B ten Brink, MR Smith, L Dijkhurzen. Screening and Characterization of *Lactobacillus* Strain Producing Large amount of EPS. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 2004. 50: 697-703.
18. Belitz HD, W Grosch, P Schieberle. *Food Chemistry, Fourth Revised and Extended Edition*. Leipzig: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009: 270.
19. Malik A, Felicia, M Radji, dan A Oetari. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Asal Sumber Lokal Menggunakan Gen Penyandi 16S rRNA. *Sains Indonesia Vol 12 No. 2*, 2007: 1-6.
20. Monsan P, S Bozonnet, C Albenre, G Joucla, RM Willemot, M Remaud-Simleon. Homopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *International Dairy Journal II*, 2001: 675-685.
21. Van Geel-Schutten-GH, EJ Faber, E Smith, K Bonting, MR Smith, B Ten Brink, JP Kamerling, JFG Vuegenthart, and L Dijkhuizen. Biochemical and Structural Characterization of the Glucan and Fructan Exopolysaccharides Synthesized by *Lactobacillus reuteri* Wild-Type Strain and by Mutan Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999: 3008-3014.

22. Boels IC, A Ramos, K Michiel, WM de Vos. Functional Analysis of the *Lactococcus lactis* galU and galE Genes and their Impact on Sugar Nucleotide and Exopolysaccharide Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001. **67** (7): 3033 – 3040.
23. Savadogo A, CAT Outtara, PW Savadogo, N Barro, AS Outtara, AS Traore. Identification of Exopolysaccharides-producing Lactic Acid Bacteria from Burkina Faso Fermented Milk Samples. *African Journal of Biotechnology*, 2004. **3** (3): 189 – 194.
24. Battcock M & Azam-Ali. 1998. 12 hlm. Fermented Fruits and Vegetables. A Global Perspective-Chapter 5: Bacterial Fermentations. <http://www.fao.org/docrep/x0560e10.htm>, 2 januari 2009, pk. 02.43.
25. Gamar-Nourani L, K Blondeau, JM Simonet. Influence of Culture Conditions on Exopolisakarida Production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C38. *Journal of Applied Microbiology*, 1998. **85**(4): 664-672.
26. Kusumawati N, BSL Jenie, S Setyahadi, RD Hariyadi. Seleksi Bakteri Asam Laktat Indigenus sebagai Galur Probiotik dengan Kemampuan – Menurunkan Kolesterol. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 2001, **8** (2):39-43.
27. Le Blanc JG, A Silvestroni, C Connes, V Juillard, GS de Giori, JC Piard and F Sesma. Reduction of Non-digestible Oligosaccharides In Soymilk: Application of Engineered Lactic Acid Bacteria That Produce α -galactose. *Genet. Mol. Res*, 2004, **3** (3): 432-440.

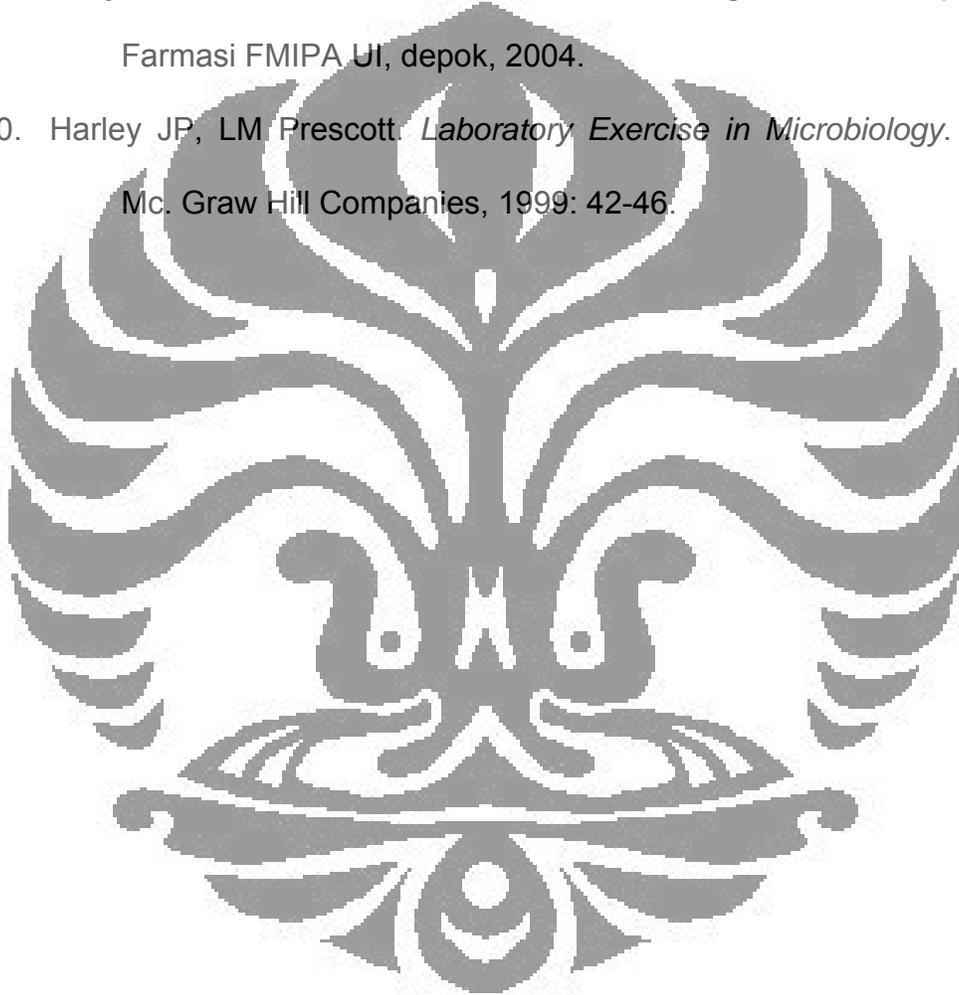
28. Bjorkroth K. Johanna, Schillinger Ulrich, Geisen Rolf, Weiss Norbert, Hoste Bart, Hozapfel Wilhelm, Korkeala Hannu, and Vandamme Peter. Taxonomic Study of *Weissella confuse* and Description of *Weissella cibaria* sp. Nov., Detected in Food and Clinical Samples. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 2002. **52**:141-148.
29. Marcel B. Roberfroid. Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*, 2005, **93**, Suppl. 1, S13–S25.
30. Steinbüchel, Alexander, SK Rhee. <http://books.google.com/books?id=WYdkTMqIw5wC&printsec=frontcover#PPA340>, M1. 22 Januari 2009, 02:28.
31. Anonim. Glukomannan. 1 hlm. <http://www.drugdigest.org/.DD/DVH/HerbsWho/0,3923,552514/Glucomannan,00.html>. 27 Desember 2008, pk 23.42 WIB.
32. Microsurgeon. Dextran. 1 hlm. <http://www.microsurgeon.Org/dextran.Htm>. 3 Januari 2009, pk 23.03 WIB.
33. Anonim. Fermented Fruits and and Vegetable a Global Perspective: Bacterial Fermentations. *FAO Corporate Document Repository*. www.fao.org, 2 Januari 2009, pk 01.13 WIB.

34. Van Hijum SAFT, S Kralj, LK Ozimek, L Dijkhuizen, and GH Van Geel-Schutten. *General Introduction: Fructosyltransferases of Lactic Acid Bacteria*. www.dissertation.ub.rug.nl. 2 Januari 2009, pk 01.17 WIB.
35. Reimer G and Carrol. Procedures for the storage of microorganism. Dalam: PR Murray Manual Of Clinical Microbiology, 2003: 5029-5031.
36. Anonim. *Biomolecular system: Pacific Northwest National Laboratory*. Operated by Battelle for The US Departement of Energy, DNA to RNA to Protein. Washington State University.
37. Vaningelgem F, M Zamfir, F Mozzi, T Andriany, M Vancanneyt, J Swings, Vuyst L de. Biodiversity of Exopolysaccharide Produced by *Streptococcus thermophilus* Strain is Reflected in their Production and their Molecular and Functional Characteristic. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004. **70** (2): 900-912.
38. Kojic M, M Vujcic, A Banina, P Coconcelli, J Cerning, and L Topisirovic. Analysis of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus casei* CG11, Isolated from Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992. **58** (12): 4086-4088.
39. Omar Nabil Ben, Abriouel Hikmate, Lucas Rosario, Martinez–Canamero Magdalena, Guyot, Jean-Pierre, Galvez, Antonio. Isolation of Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* strains from Ben Saalga, a Traditional Fermenteddd Gruel from Burkina Faso. *International Journal of Food Microbiology*, 2006. **112**: 44 – 50.

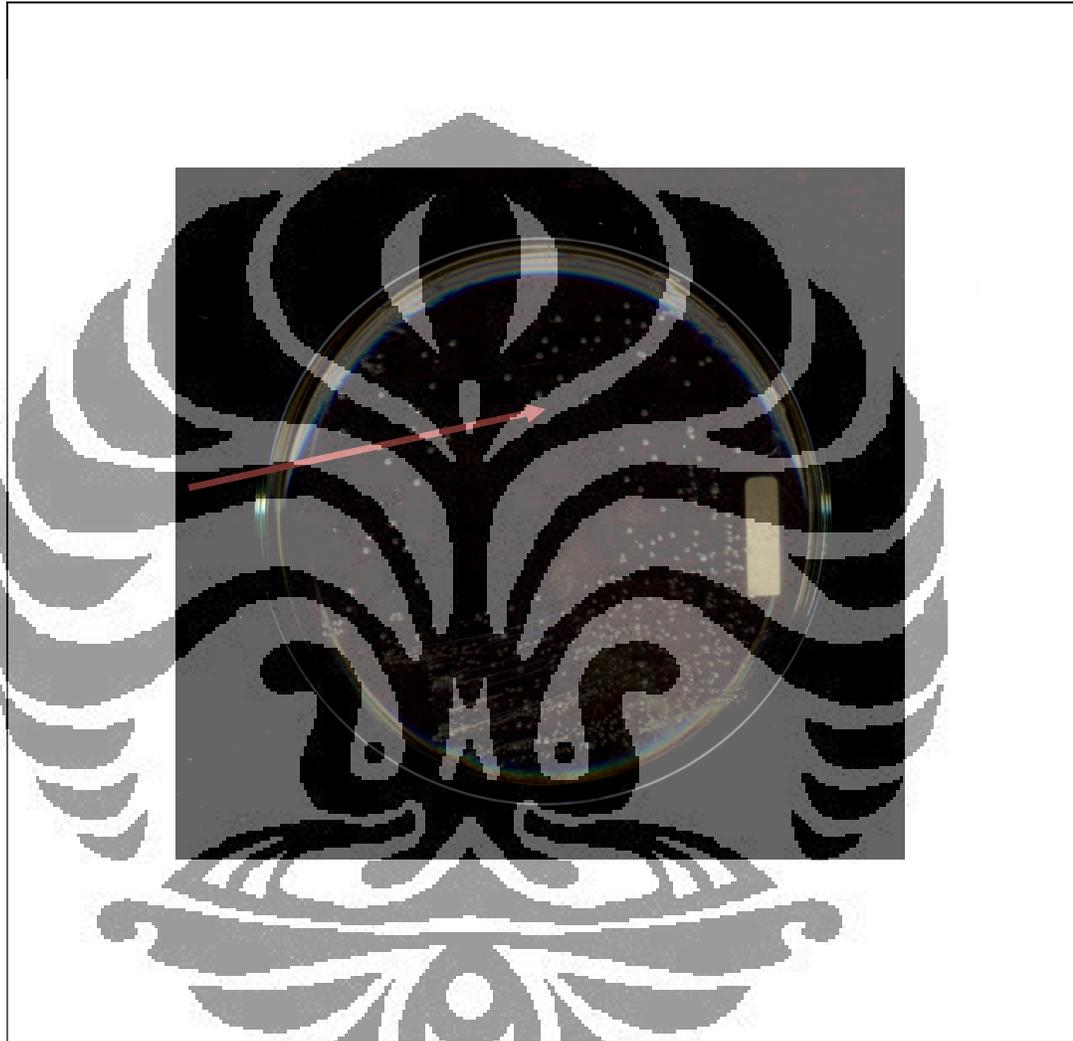
40. Perry, JJ, JT Staley. *Microbiology dynamics and Diversity*. Saunders College Publishing, New York, 1997: 479-486.
41. Anonim. Bacterial Fermentation. 15 hlm. <http://www.fao.org/docrep/x0560e/10.htm>. 2 Januari 2009, pk. 02.13.
42. Madigan MJ, M Martinko, J Parker. TD Brock, *Biology of Microorganism, 9th Edition*. Nem Jersey: Prentice Hall, 2000: 171-176, 434-435, 504-507, 718-724, 771-775, 794-797.
43. Wood BJB, WH Holzappel (Eds). *The Lactic Acid Bacteria Vol 2. The Genera of Lactic Acid Bacteria*. London: Blackie Academic and Professional, 1995: 10-11, 38-34.
44. Anonim. 2000. 4 hlm. Background Information on Lactic Acid Bacteria. www.lactospore.com/back.htm, 2 Januari 2009, pk. 02. 27.
45. Kurnia Hermawati, Ajitya. *Identifikasi Gen GTF Pada Koleksi Isolat Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Dari Beberapa Makanan dan Minuman Tradisional Dengan Teknik Polymerase Chain Reaction*. Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok, 2008.
46. Indriyani. *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.
47. Malik A, E Saepudin, A Oetari, S Krajl, L Dijkhuizen. *Identification of Two gtf and One ftf genes in Weisella sp. Isolated from Indonesia*.

International Meeting of the 2nd Symposium and Workshop of Carbohydrate Acting Enzymes Bioengineering, 2007.

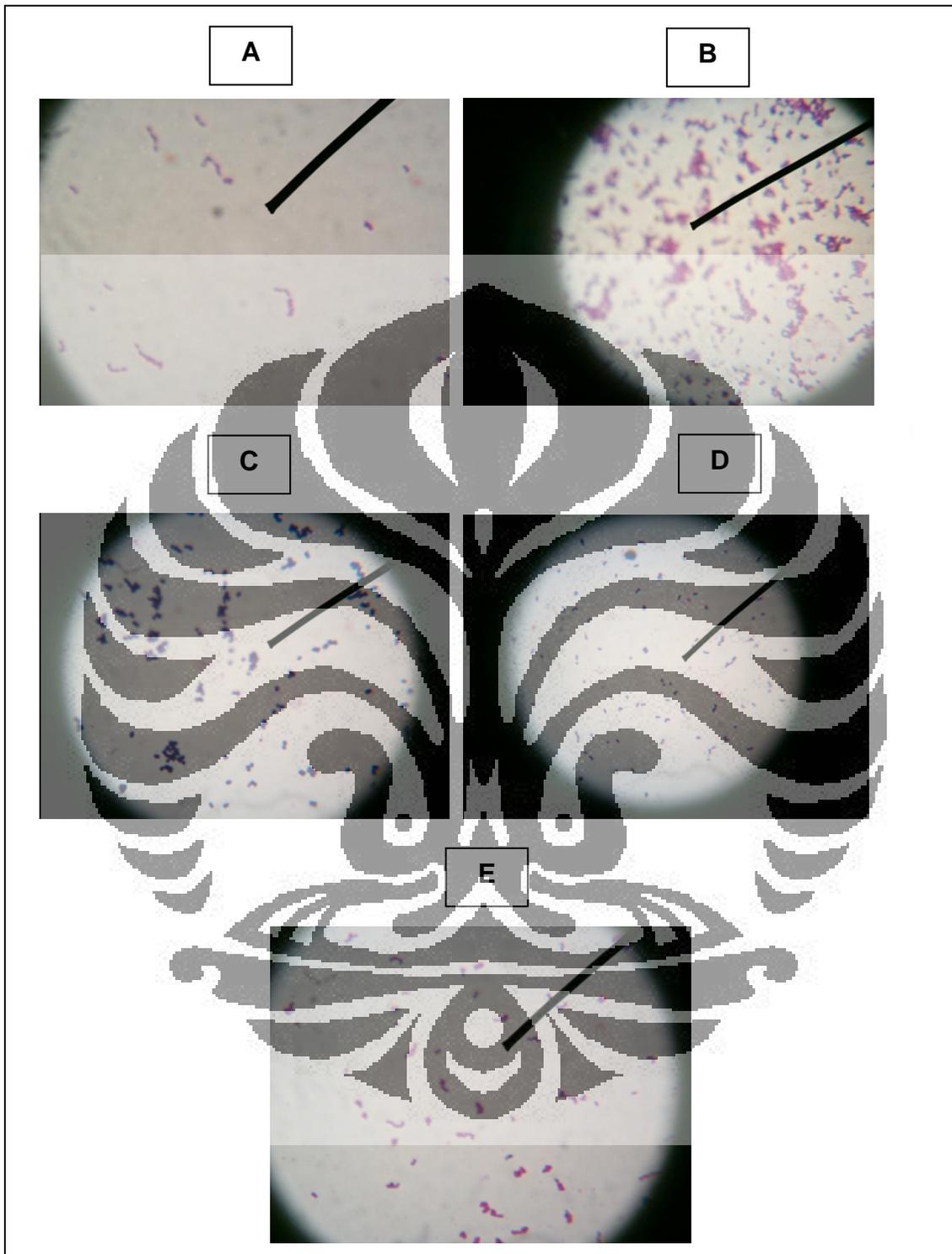
48. Staf pengajar FKUI. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran, ed revisi*. Jakarta : Binarupa Aksara. 1993.
49. Radji Maksum. *Penuntun Praktikum Mikrobiologi Farmasi*. Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok, 2004.
50. Harley JP, LM Prescott. *Laboratory Exercise in Microbiology*. Boston: Mc. Graw Hill Companies, 1999: 42-46.



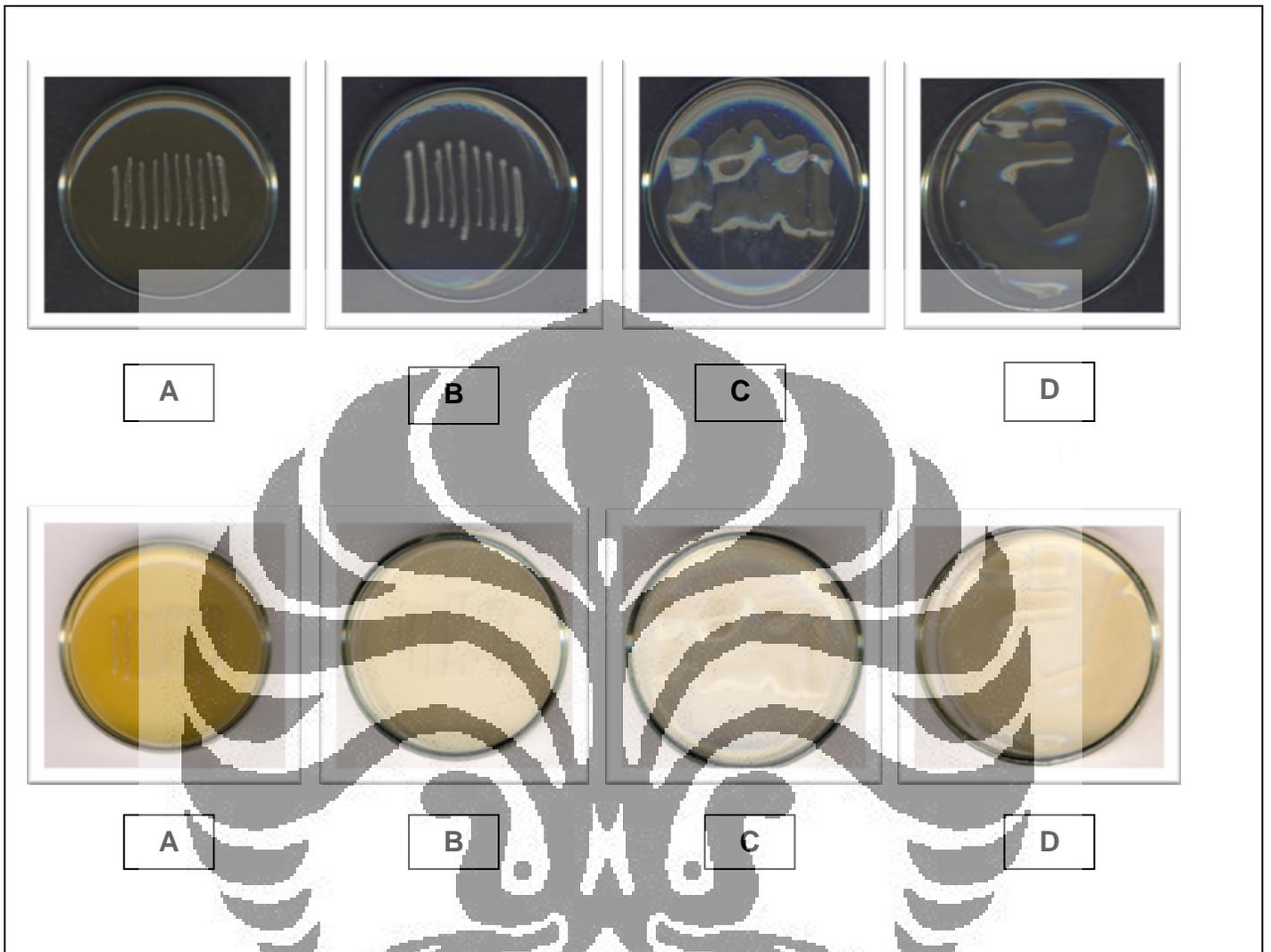




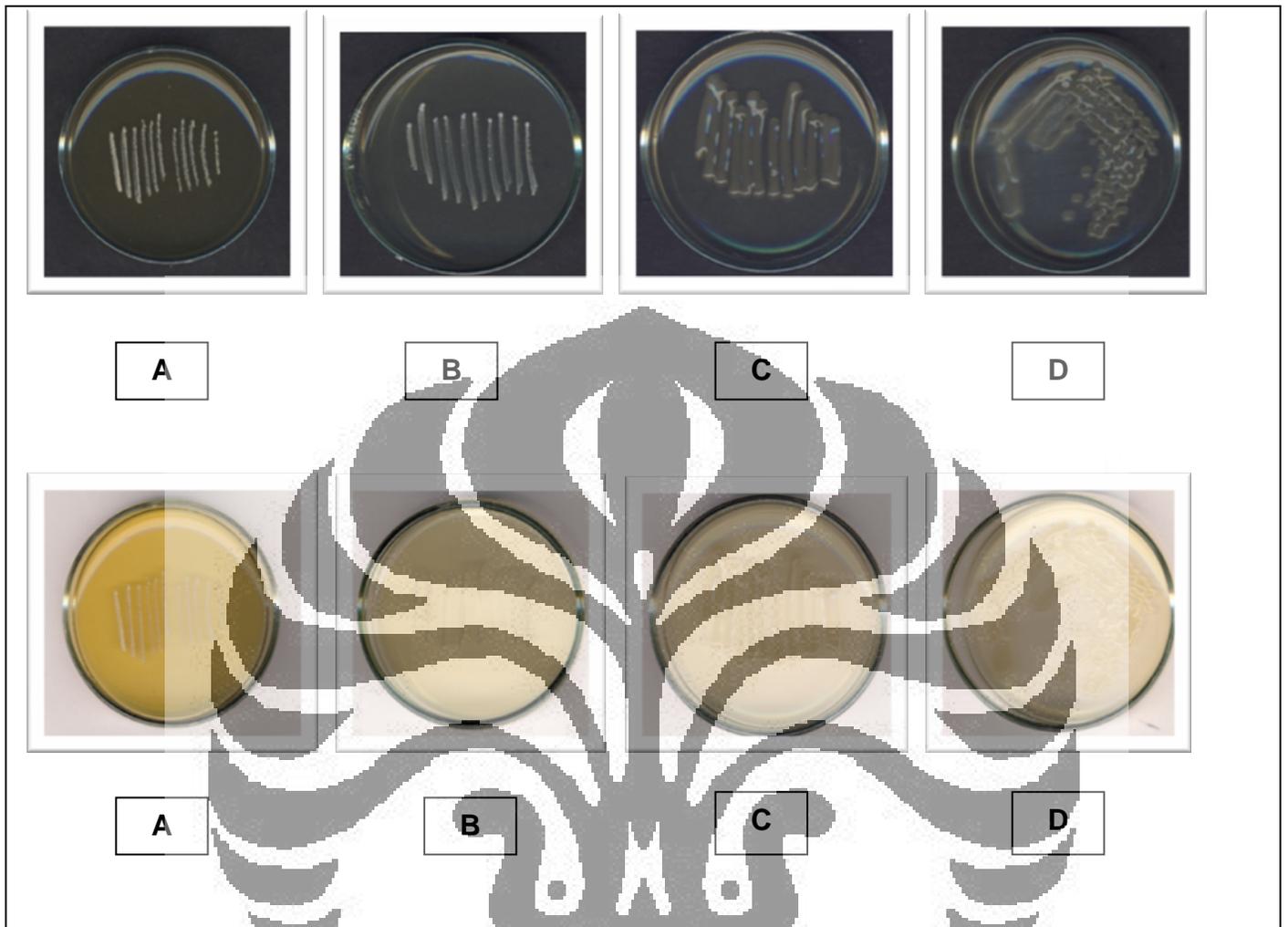
Gambar 3. Morfologi Koloni Tunggal BAL



Gambar 4. Pewarnaan Gram Isolat BJG 4 (A), CNC 7(1) (B), PDG 2 (C),
WRS 3 (D), PDG 14 (E)



Gambar 5. Produksi EPS BAL dari Isolat BJG-1 yang diisolasi dari bajigur pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa 1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



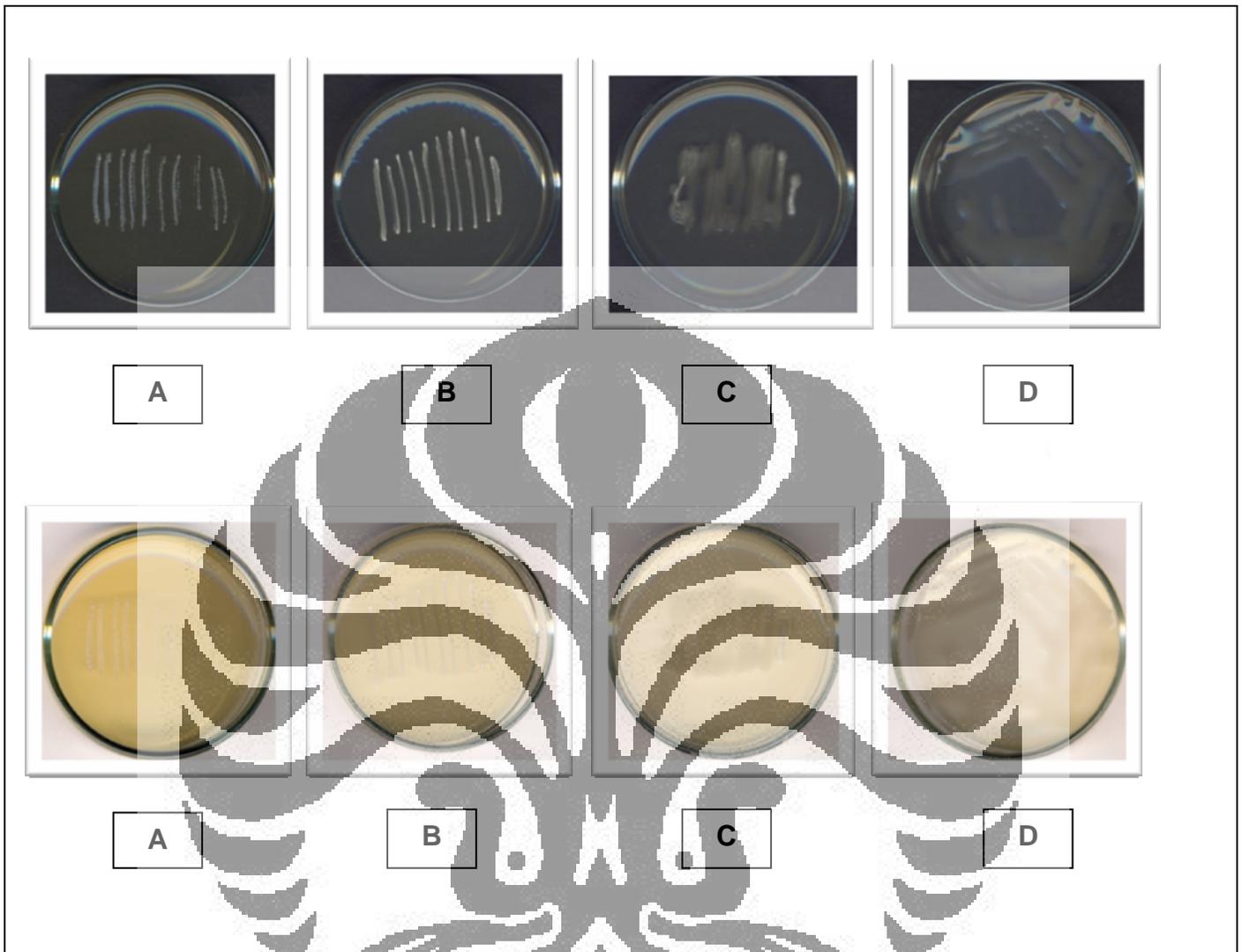
Gambar 6. Produksi EPS BAL dari Isolat BJK 2 yang diisolasi dari bajigur pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa 1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



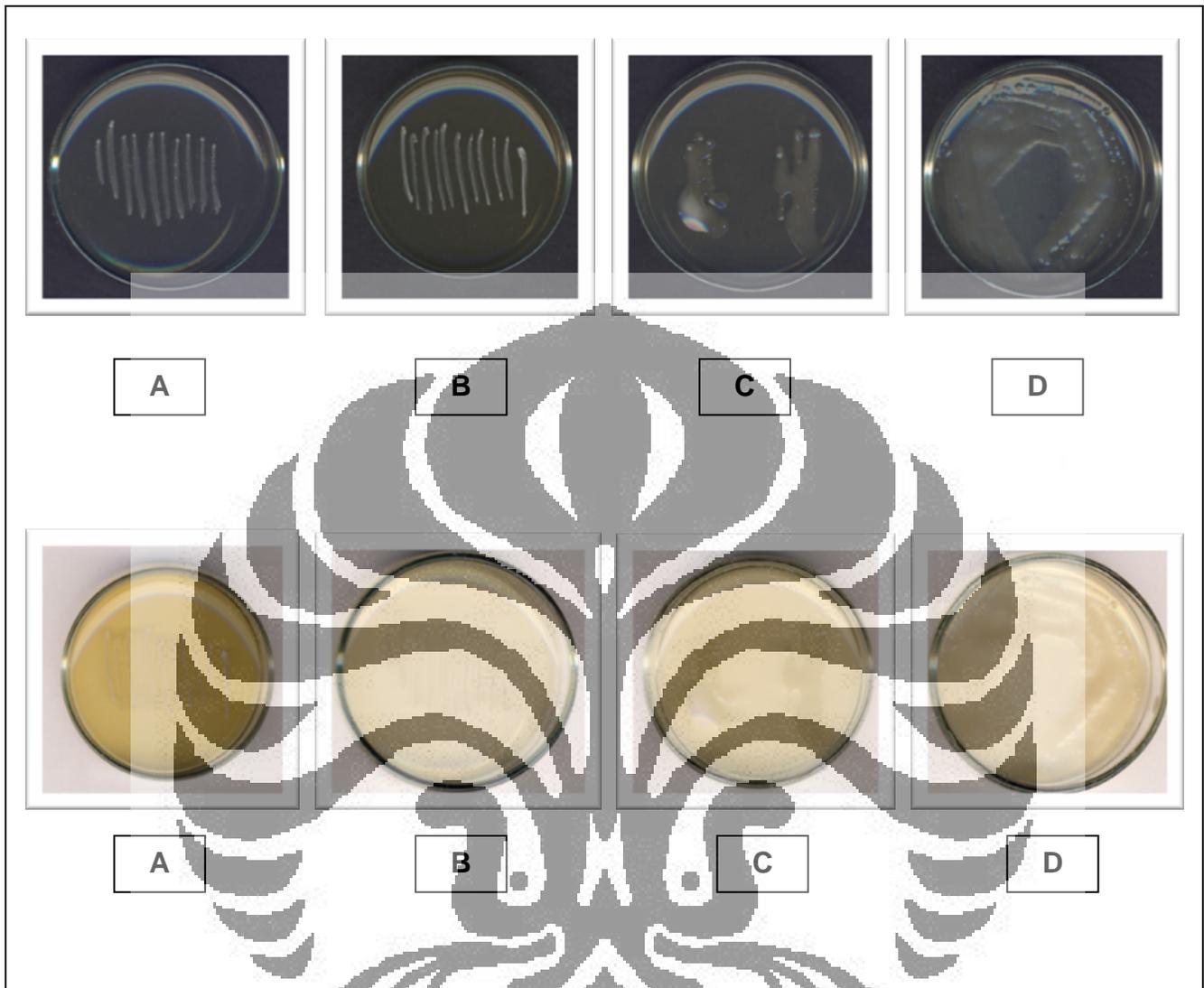
Gambar 7. Produksi EPS BAL dari Isolat BJG 3 yang diisolasi dari bajigur pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa 1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



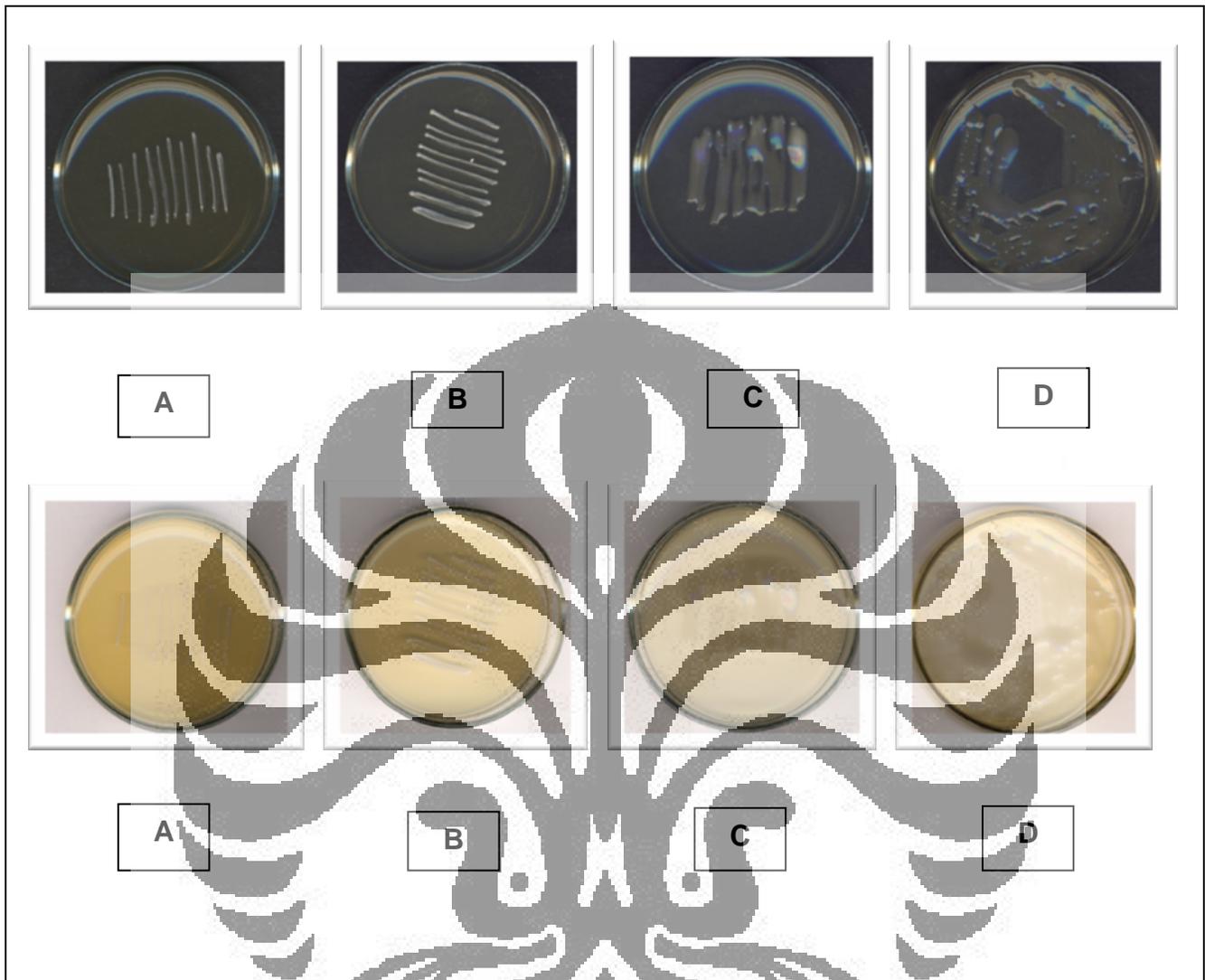
Gambar 8. Produksi EPS BAL dari Isolat BJG 4 yang diisolasi dari bajigur pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa 1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



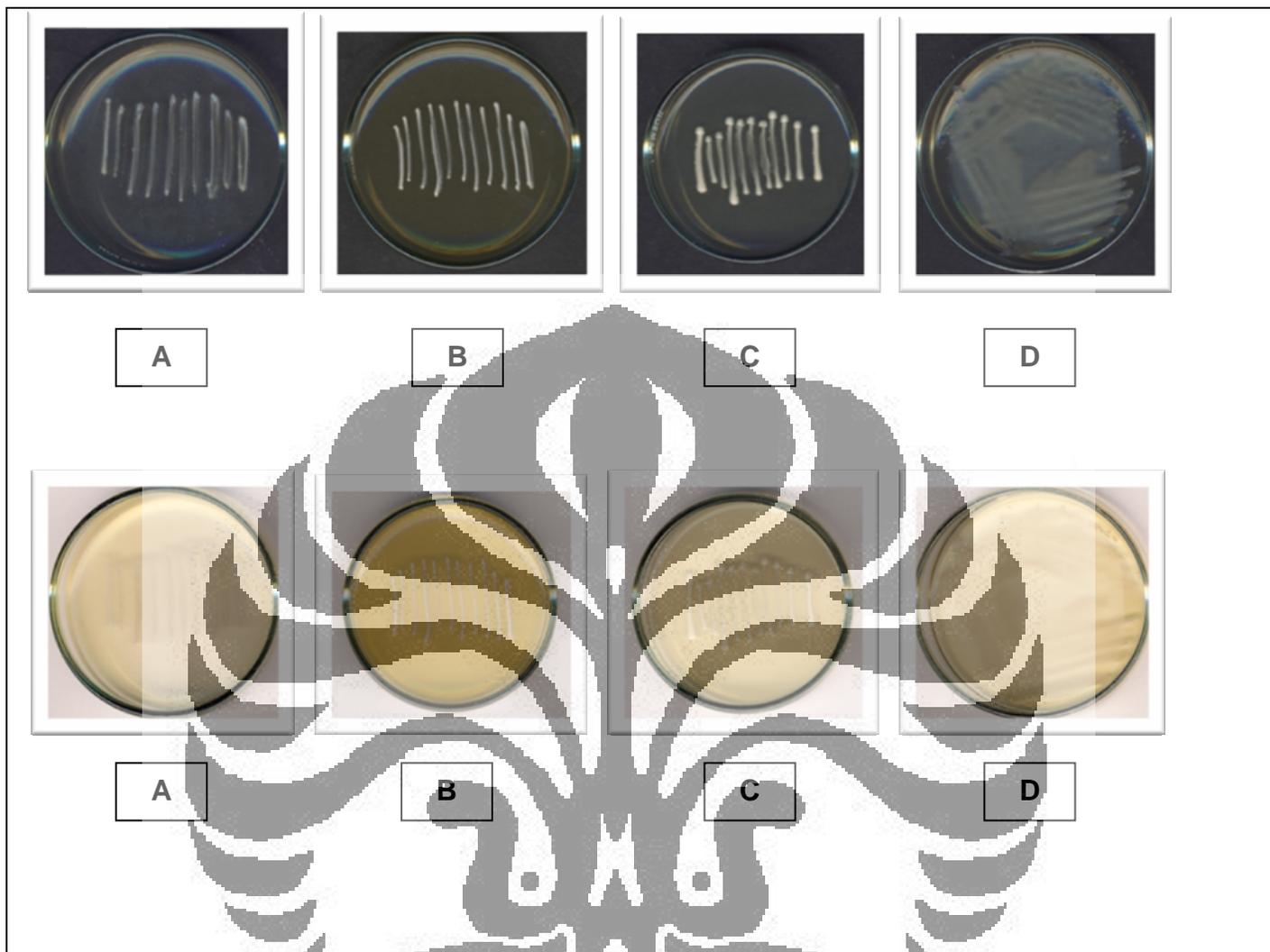
Gambar 9. Produksi EPS BAL dari Isolat WRS 3 yang diisofasi dari wedang ronde pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa 1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



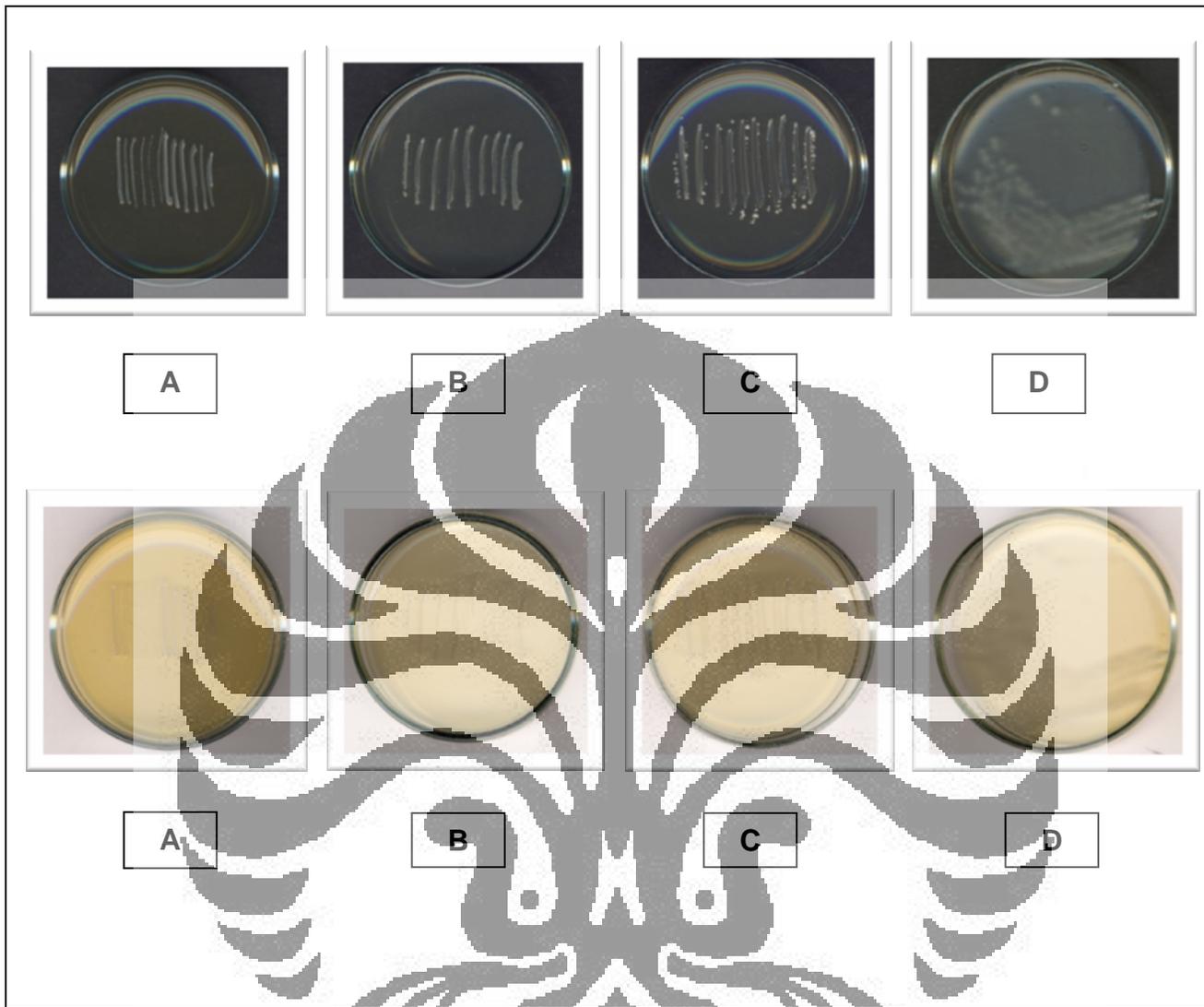
Gambar 10. Produksi EPS BAL dari Isolat WRS 5 yang diisolasi dari wedang ronde pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa 1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



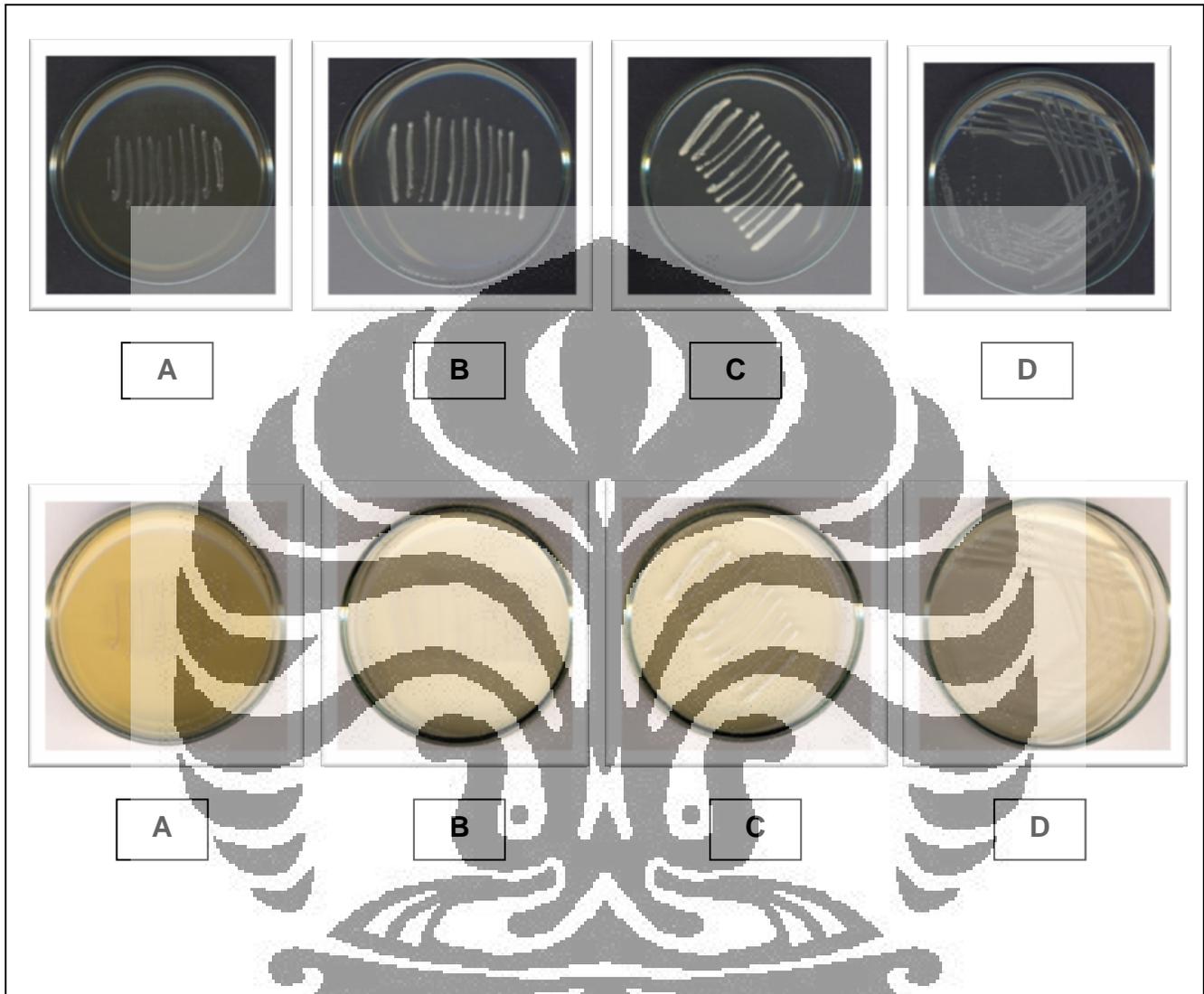
Gambar 11. Produksi EPS BAL dari Isolat WRS 6 yang diisolasi dari wedang ronde pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa 1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



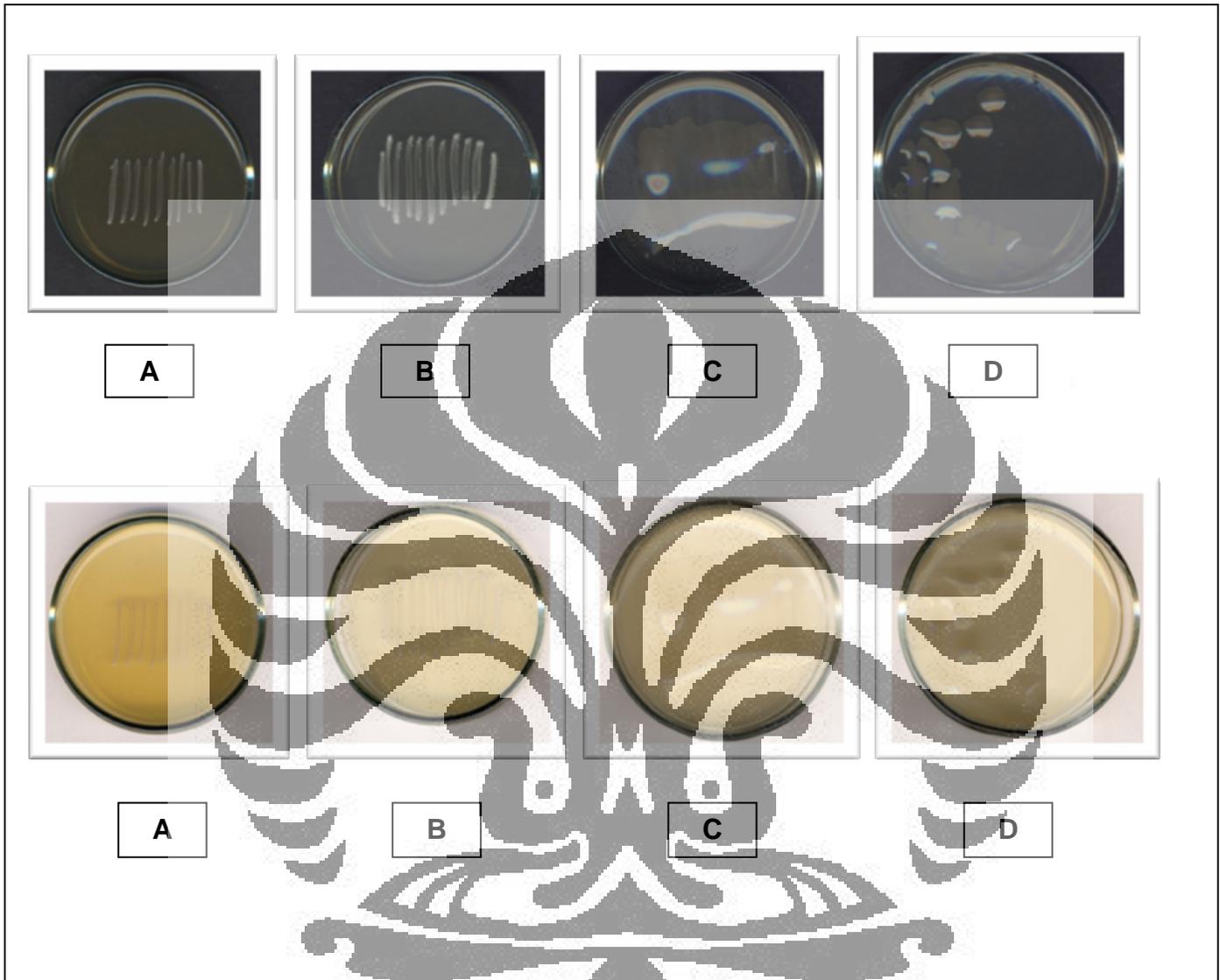
Gambar 12. Produksi EPS BAL dari Isolat PUL 10 yang diisolasi dari puli pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



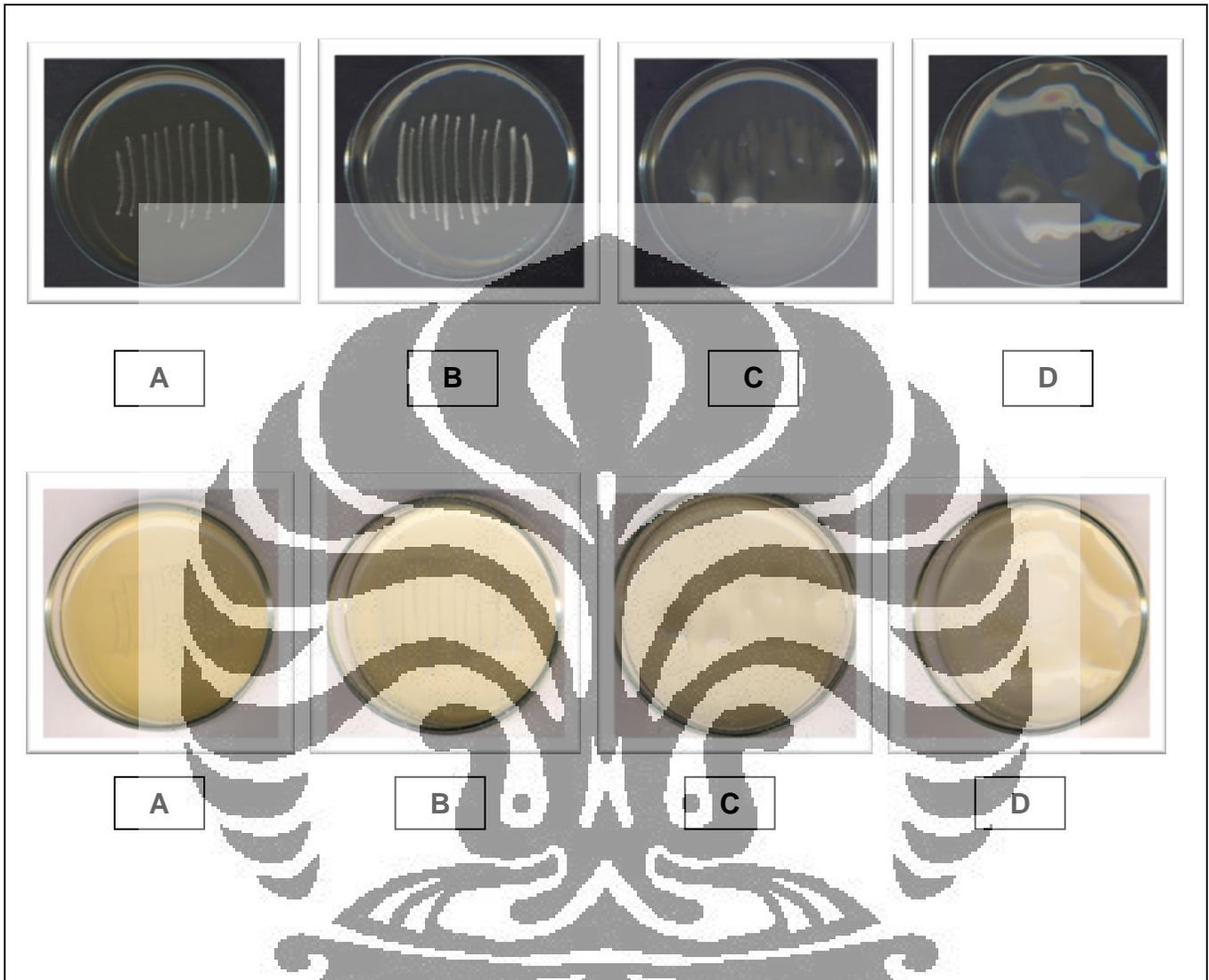
Gambar 13. Produksi EPS BAL dari Isolat SBH 9 yang diisolasi dari es buah pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa 1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



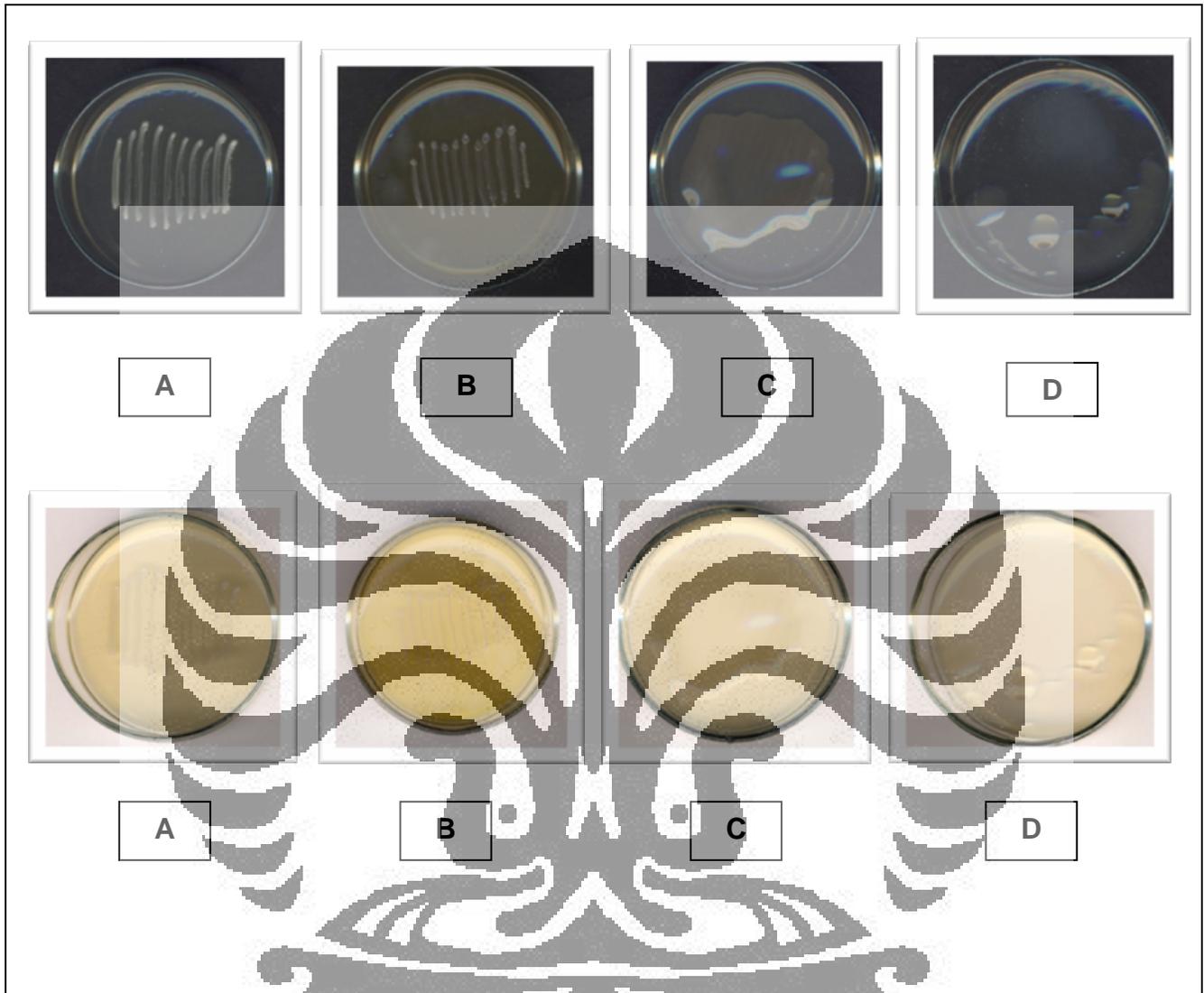
Gambar 14. Produksi EPS BAL dari Isolat PDG 2 yang diisolasi dari es podeng pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa 1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



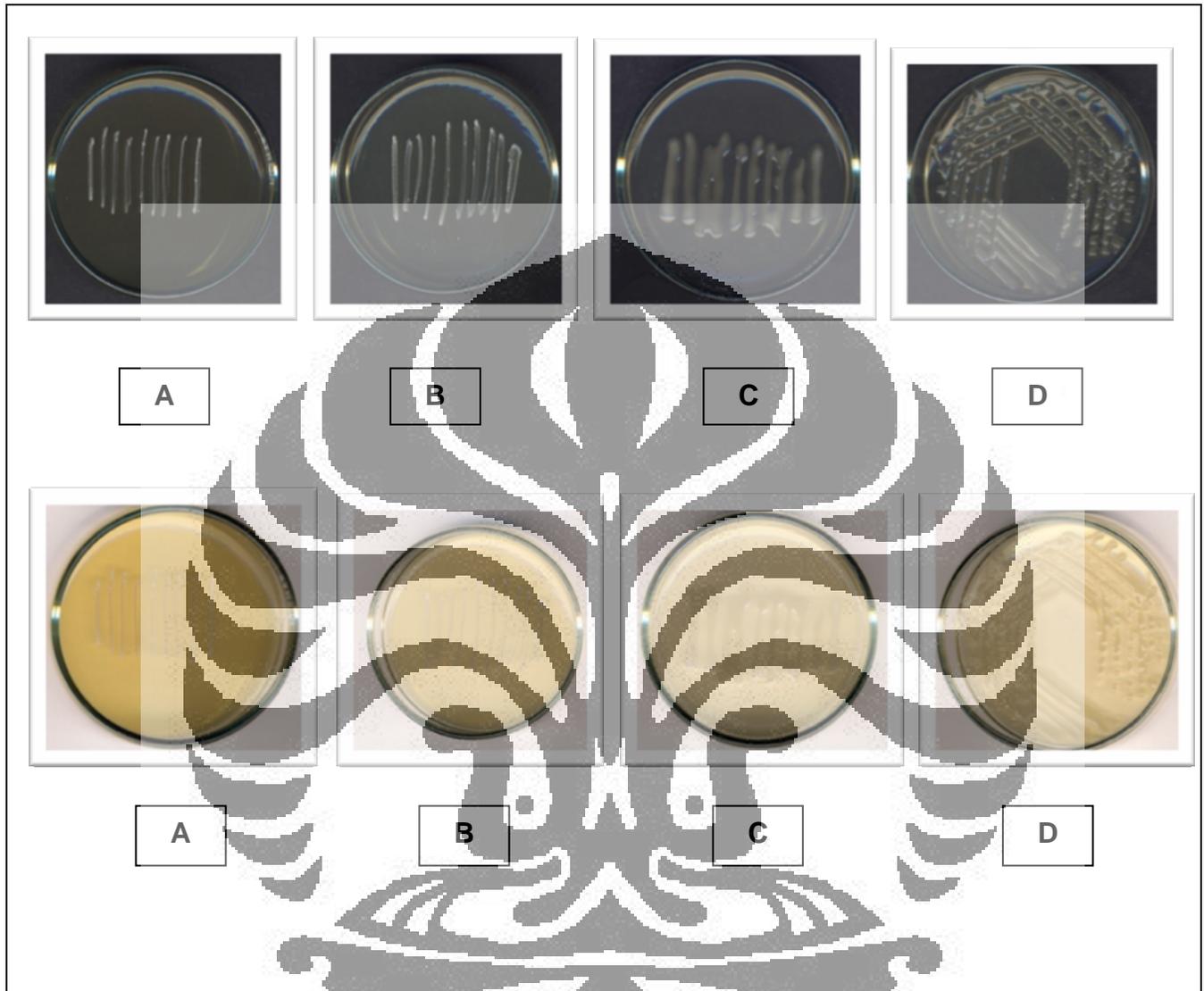
Gambar 15. Produksi EPS BAL dari Isolat PDG 3 yang diisolasi dari es podeng pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



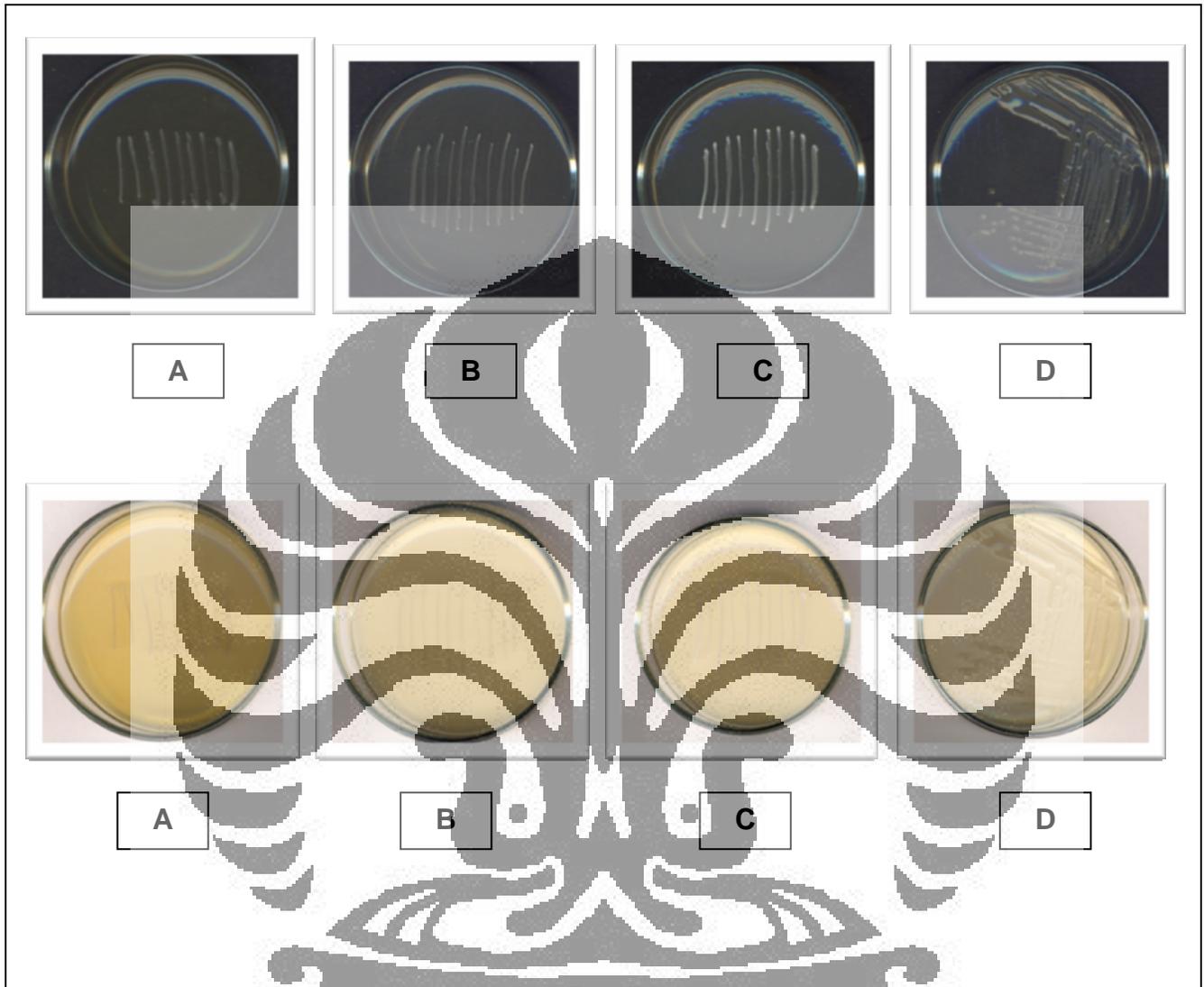
Gambar 16. Produksi EPS BAL dari Isolat PDG 4 yang diisolasi dari es podeng pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa 1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



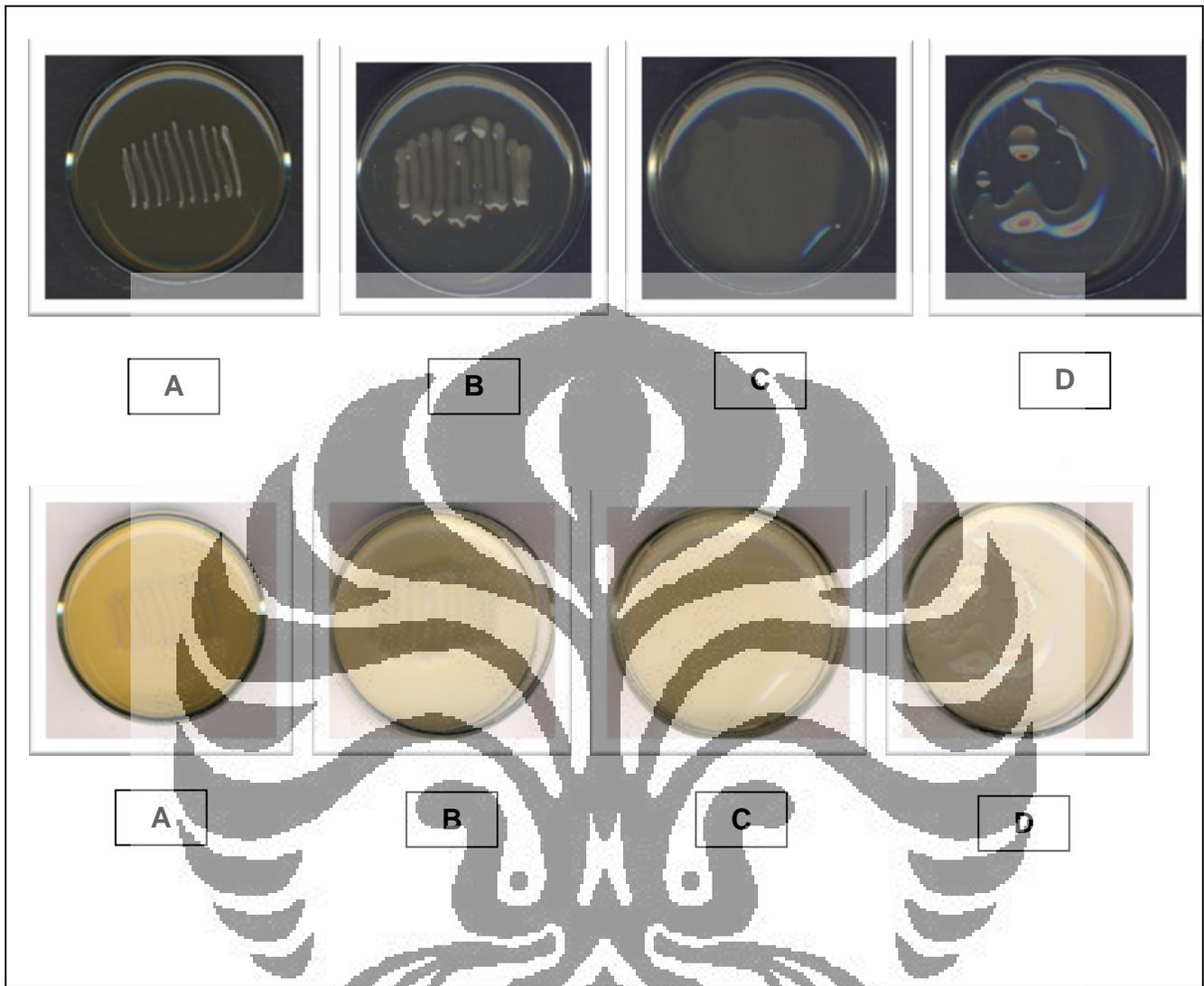
Gambar 17. Produksi EPS BAL dari Isolat PDG 10(1) yang diisolasi dari es podeng pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



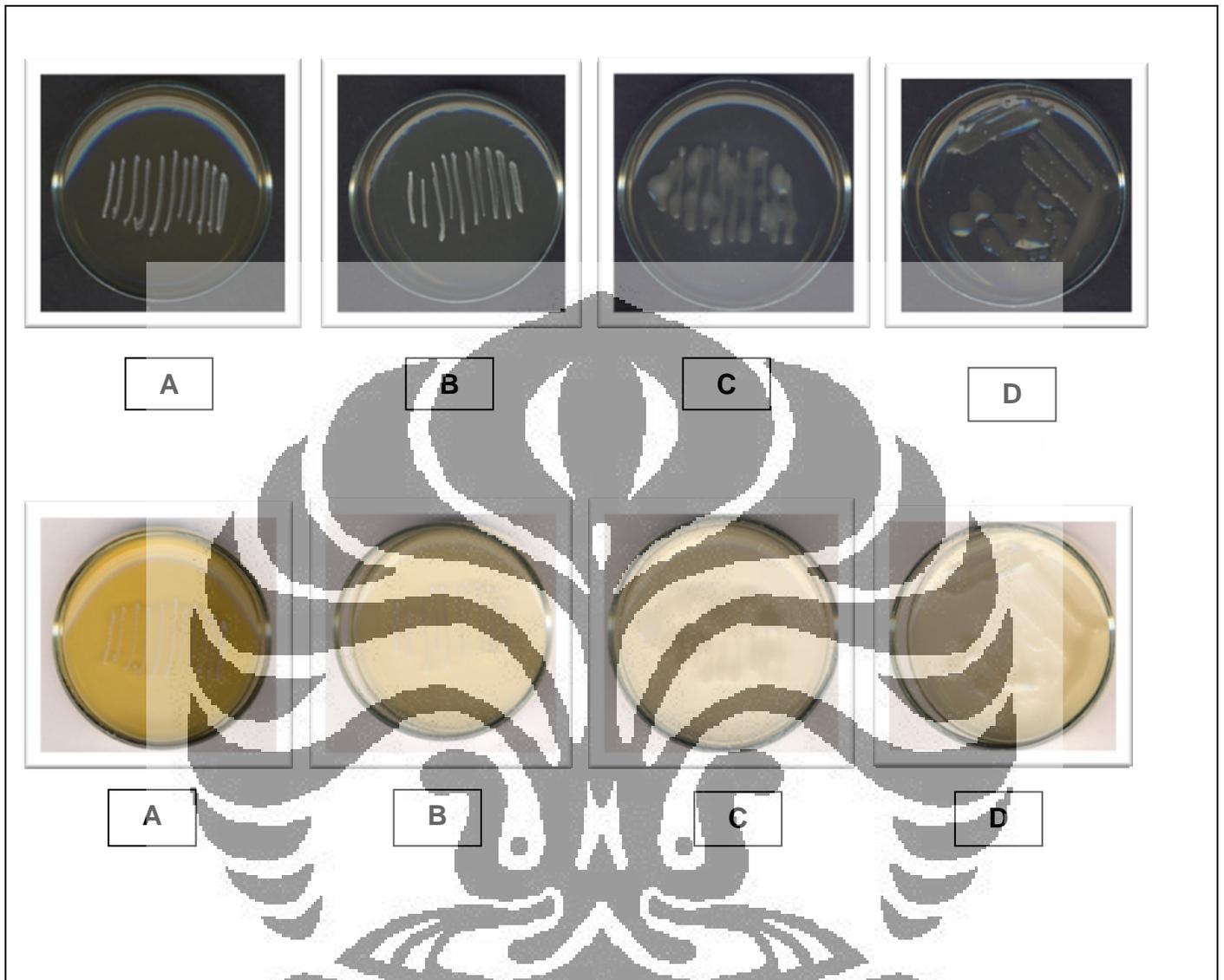
Gambar 18. Produksi EPS BAL dari Isolat PDG 14 yang diisolasi dari es podeng pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



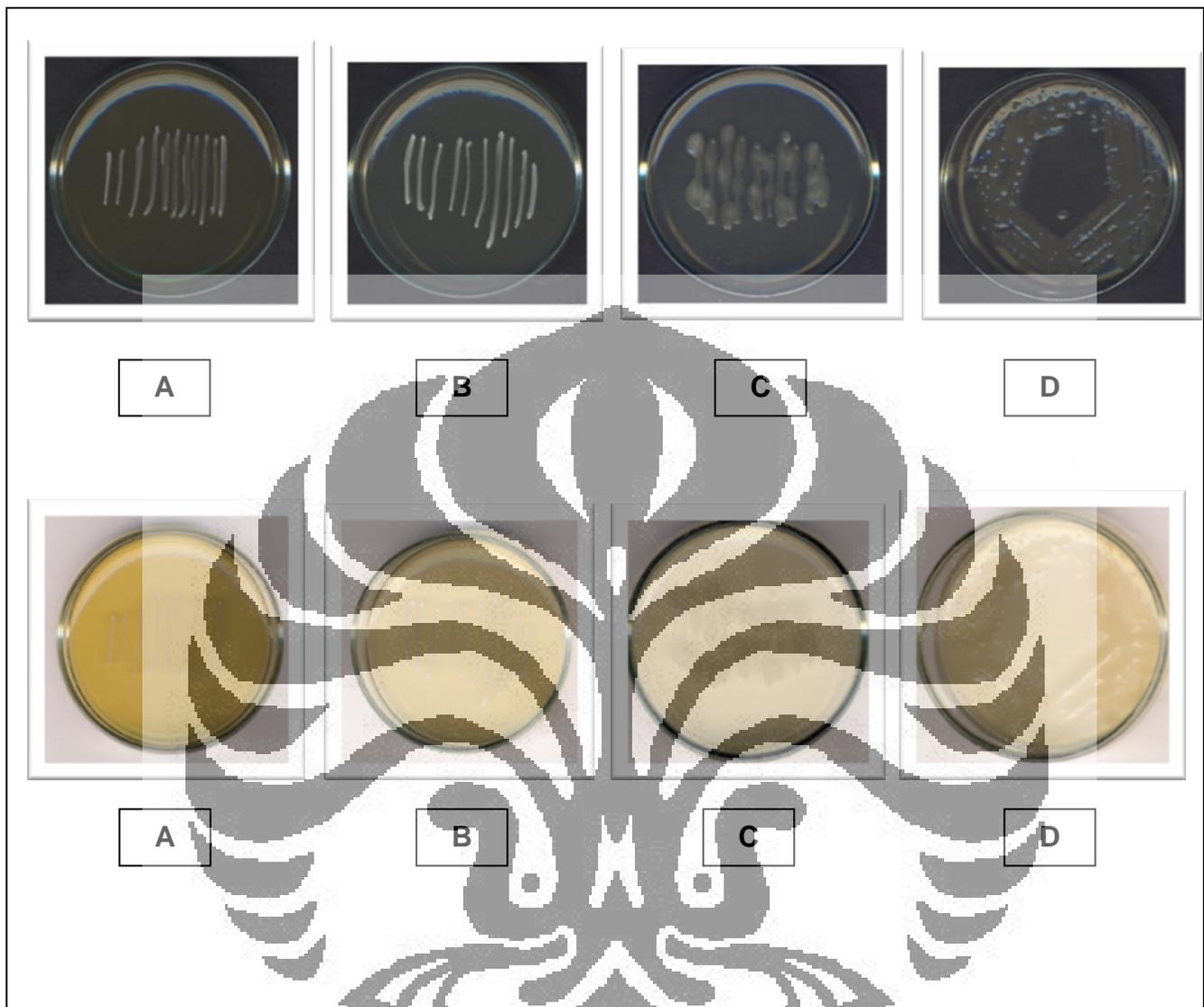
Gambar 19. Produksi EPS BAL dari Isolat PDG 15 yang diisolasi dari es podeng pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa 1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



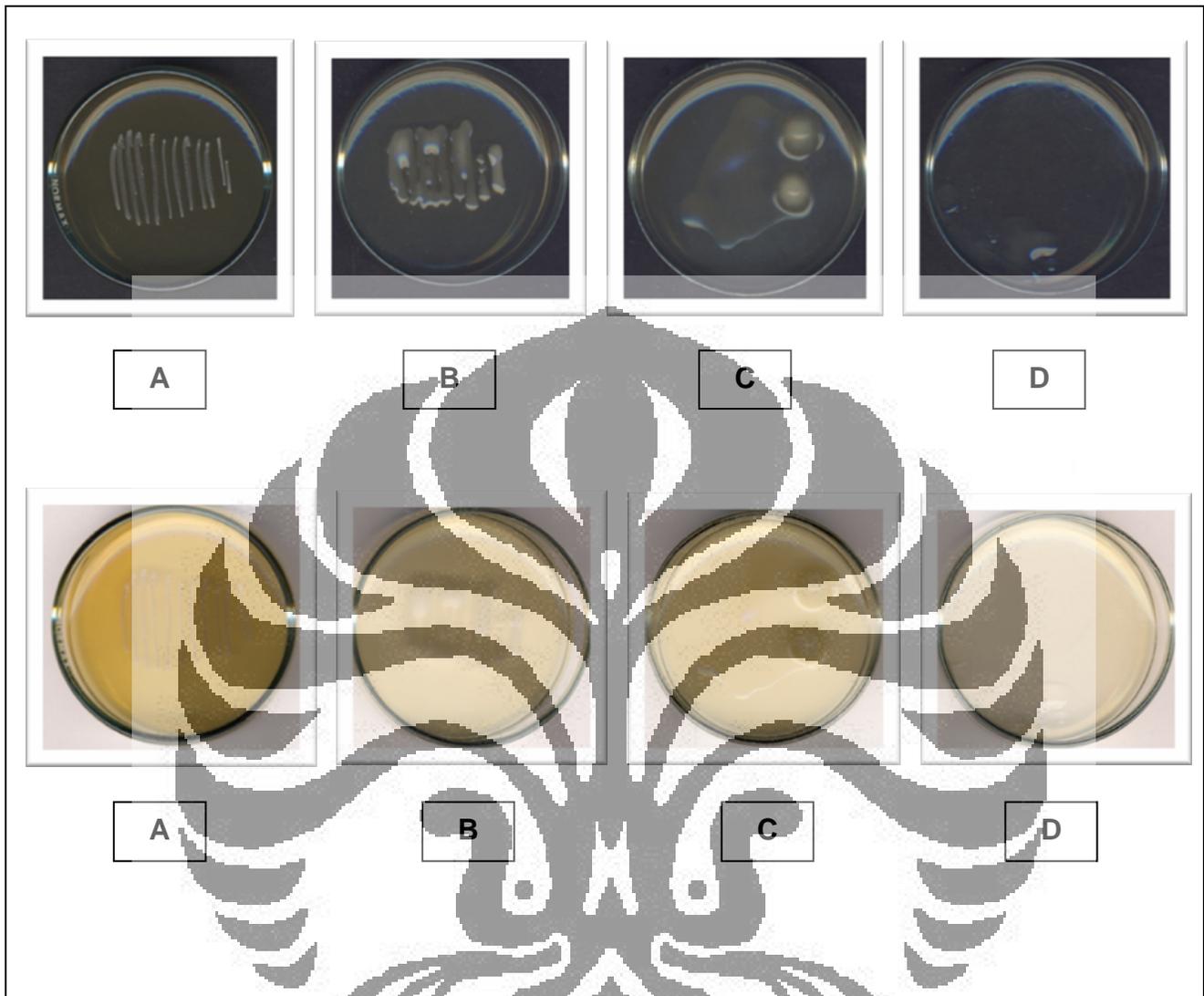
Gambar 20. Produksi EPS BAL dari Isolat CNC 2(1) yang diisolasi dari es cincau pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



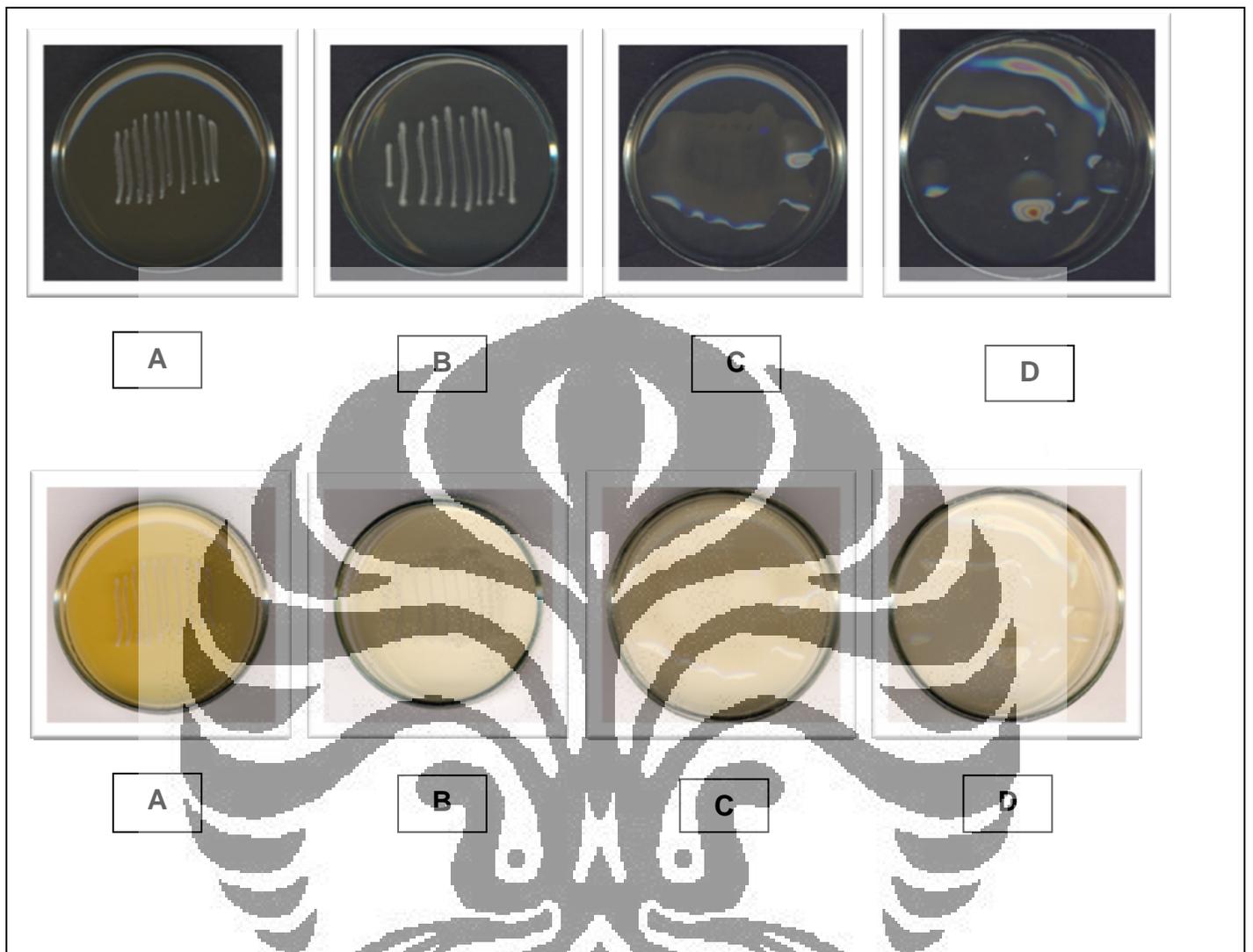
Gambar 21. Produksi EPS BAL dari Isolat CNC 3 (2) yang diisolasi dari es cinau pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



Gambar 22. Produksi EPS BAL dari Isolat CNC 5 (2) yang diisolasi dari es cincau pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



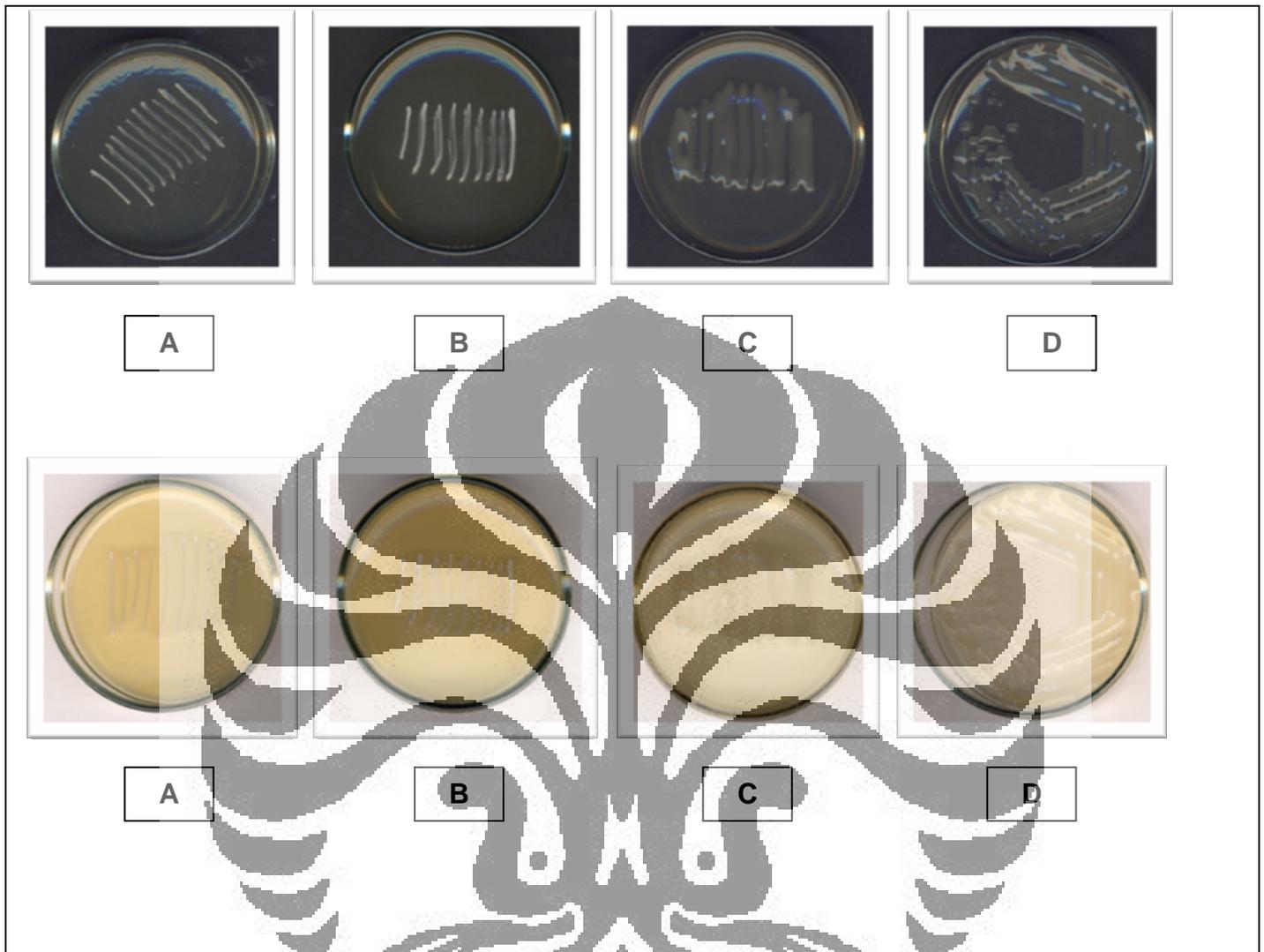
Gambar 23. Produksi EPS BAL dari Isolat CNC 6 yang diisolasi dari es cincau pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa 1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



Gambar 24. Produksi EPS BAL dari Isolat CNC 7(1) yang diisolasi dari es cinau pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa 1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



Gambar 25. Produksi EPS BAL dari Isolat CNC 8 yang diisolasi dari es cinau pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa 1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



Gambar 26. Produksi EPS BAL dari Isolat CNC 11 yang diisolasi dari es cinau pada Medium Agar MRS (A), MRS-raffinosa 5% (B), MRS-raffinosa 5%-glukosa 1% (C), MRS-sukrosa 10% (D)



Tabel 1

Pembandingan hasil pengamatan bentuk morfologi dan warna koloni isolat BAL dengan data penelitian sebelumnya serta sumber isolat pada medium MRS

	Nama Isolat	Warna morfologi koloni bakteri (data penelitian sebelumnya)	Warna morfologi koloni bakteri pada penelitian kali ini	Bentuk Koloni Bakteri	Sumber Isolat
1	BJG 1	Putih kekuningan	Putih	Koloni bulat	Bajigur
2	BJG 2	Putih	Putih	Koloni bulat	Bajigur
3	BJG 3	Putih kekuningan	Putih	Koloni bulat	Bajigur
4	BJG 4	Putih	Putih	Koloni bulat	Bajigur
5	CNC 2(1)	Putih	Putih	Koloni bulat	Es cincau
6	CNC 3(2)	Putih kekuningan	Putih	Koloni bulat	Es cincau
7	CNC 5(2)	Putih kekuningan	Putih	Koloni bulat	Es cincau
8	CNC 6	Putih	Putih	Koloni bulat	Es cincau
9	CNC 7(1)	Putih kekuningan	Putih kekuningan	Koloni bulat	Es cincau
10	CNC 8	Putih	Putih	Koloni bulat	Es cincau

11	CNC11	Putih	Putih	Koloni bulat	Es cincau
12	PDG 2	Putih kekuningan	Putih	Koloni bulat	Es podeng
13	PDG 3 (1)	Putih	Putih	Koloni bulat	Es podeng
14	PDG 4	Putih	Putih	Koloni bulat	Es podeng
15	PDG 10(1)	Putih kekuningan	Putih	Koloni bulat	Es podeng
16	PDG 14	Putih	Putih	Koloni bulat	Es podeng
17	PDG 15	Putih kekuningan	Putih	Koloni bulat	Es podeng
18	PUL 10	Putih	Putih	Koloni bulat	Puli
19	SBH 9	Putih	Putih	Koloni bulat	Es buah
20	WRS 3	Putih	Putih	Koloni bulat	Wedang ronde
21	WRS 5	Putih	Putih	Koloni bulat	Wedang ronde
22	WRS 6	Putih	Putih	Koloni bulat	Wedang ronde

Tabel 2

Pembandingan hasil pengamatan produksi EPS
pada medium agar modifikasi MRS-sukrosa 10% dengan hasil penelitian
sebelumnya

No	Nama Isolat	Identitas	Skринing gen <i>gtf</i>	Produksi EPS (penelitian sebelumnya)	Produksi EPS (penelitian sekarang)
1	BJG 1	<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>gtf</i>	+++	+++
2	BJG 2	BD	BD	+++	++
3	BJG 3	BD	BD	+++	++
4	BJG 4	BD	BD	+++	++
5	CNC 2(1)	<i>Weisella salipiscis</i>	<i>gtf</i>	+++	+++
6	CNC 3(2)	BD	BD	+++	++
7	CNC 5(2)	BD	BD	+++	++
8	CNC 6	BD	BD	+++	+++
9	CNC 7(1)	BD	BD	+++	+++
10	CNC 8	<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>gtf</i>	+++	+++
11	CNC11	<i>Weisella cibaria</i>	<i>gtf</i>	+++	++
12	PDG 2	<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>gtf</i>	+++	++
13	PDG 3	BD	BD	+++	+++
14	PDG 4	BD	BD	+++	+++

15	PDG 10(1)	<i>Weisella confusa</i>	<i>gtf</i>	+++	+++
16	PDG 14	BD	BD	+++	++
17	PDG 15	<i>Leuconostoc citreum</i>	BD	+++	++
18	PUL 10	BD	BD	+++	+
19	SBH 9	BD	BD	+++	+
20	WRS 3	<i>Weisella cibaria</i>	BD	+++	++
21	WRS 5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	BD	+++	++
22	WRS 6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>gtf</i>	+++	++

Ket :

+++ : Banyak

BD : Belum dilakukan

gtf: gen glukosiltransferase

Tabel 3
Pembandingan jumlah EPS yang dihasilkan pada media agar modifikasi MRS-sukrosa 10%, MRS-Raffinosa 5%, dan MRS-Raffinosa 5%-Glukosa 1%

NO	Nama Isolat	Identitas	Skrining gen <i>gtf</i> (47)	Produksi EPS di media MRS-sukrosa 10%	Produksi EPS di media MRS-Raffinosa 5%	Produksi EPS di media MRS-Raffinosa 5%-glukosa 1%
1	BJG 1	<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>Gtf</i>	+++	+	+++
2	BJG 2	BD	BD	++	+/-	++
3	BJG 3	BD	BD	++	+/-	-
4	BJG 4	BD	BD	++	+	++
5	CNC 2(1)	<i>Weisella salipiscis</i>	<i>gtf</i>	+++	+++	++++
6	CNC 3(2)	BD	BD	++	+	++
7	CNC 5(2)	BD	BD	++	+	++
8	CNC 6	BD	BD	+++	+++	++++
9	CNC 7(1)	BD	BD	+++	+	+++
10	CNC 8	<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>gtf</i>	+++	+/-	++

11	CNC11	<i>Weisella cibaria</i>	<i>gtf</i>	++	+	++
12	PDG 2	<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>gtf</i>	++	+	+
13	PDG 3	BD	BD	+++	+	++++
14	PDG 4	BD	BD	+++	+	+++
15	PDG 10(1)	<i>Weisella confusa</i>	<i>gtf</i>	+++	++	++++
16	PDG 14	BD	BD	++	+	++
17	PDG 15	<i>Leuconostoc citreum</i>	BD	++	+/-	+/-
18	PUL 10	BD	BD	+	+	+
19	SBH 9	BD	BD	+	+/-	+/-
20	WRS 3	<i>Weisella cibaria</i>	BD	++	+	+++
21	WRS 5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	BD	++	+/-	+++
22	WRS 6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Gtf</i>	++	+	++

Ket:

++++ : banyak sekali

+++ : banyak

++ : sedang

+ : sedikit

+/- : pertumbuhan tidak sempurna

- : tidak ada pertumbuhan

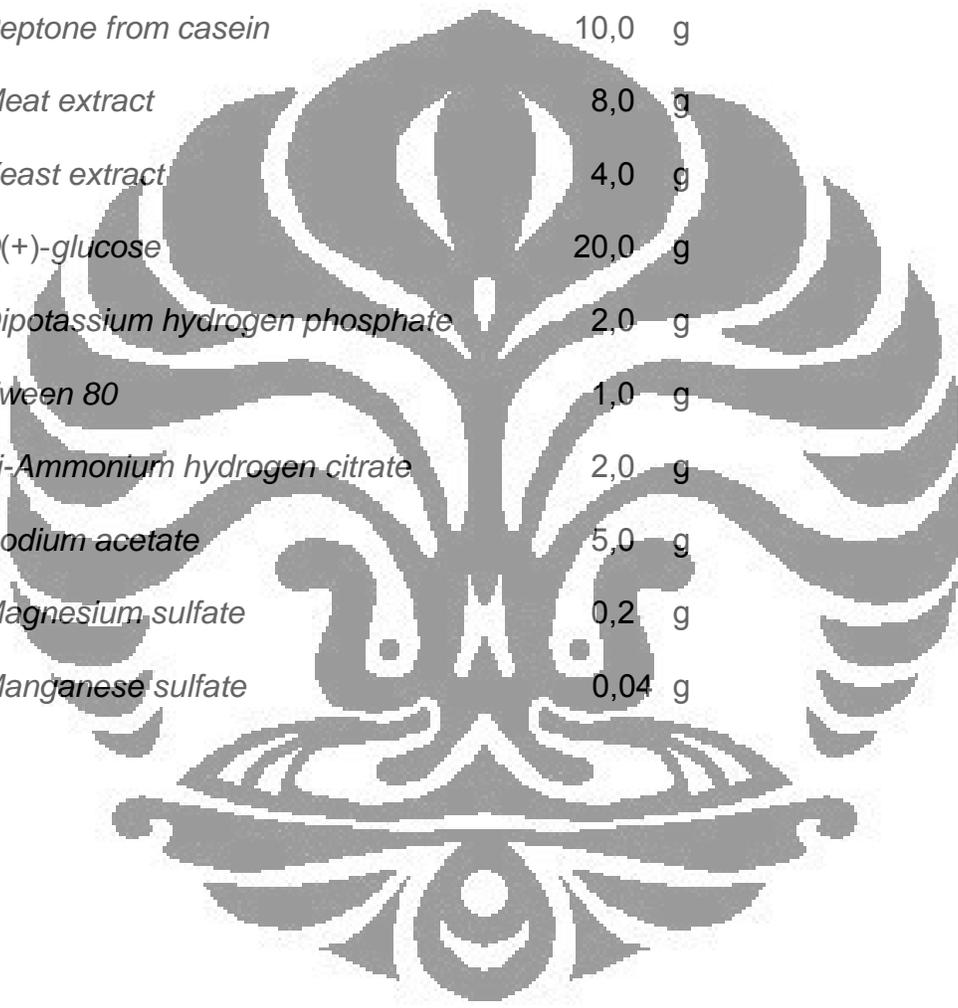


Lampiran 1

Komposisi medium

Medium de Man Rogosa Sharpe (MRS) (27)

Setiap 1 L mengandung :

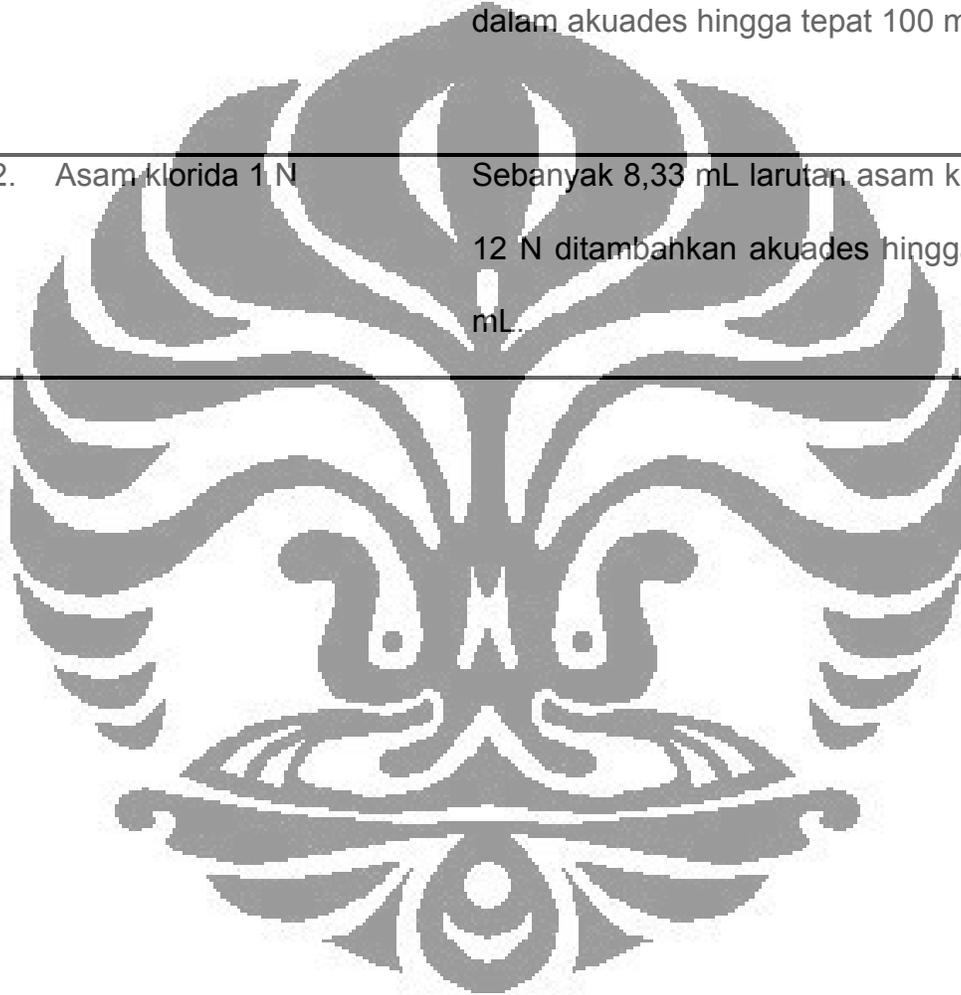


<i>Peptone from casein</i>	10,0 g
<i>Meat extract</i>	8,0 g
<i>Yeast extract</i>	4,0 g
<i>D(+)-glucose</i>	20,0 g
<i>Dipotassium hydrogen phosphate</i>	2,0 g
<i>Tween 80</i>	1,0 g
<i>di-Ammonium hydrogen citrate</i>	2,0 g
<i>Sodium acetate</i>	5,0 g
<i>Magnesium sulfate</i>	0,2 g
<i>Manganese sulfate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

Lampiran 2

Cara pembuatan reagen yang digunakan dalam penelitian

No	Nama Reagen dan Dapar	Cara Pembuatan
1.	Natrium hidroksida 1 N	Sebanyak 4 g 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.



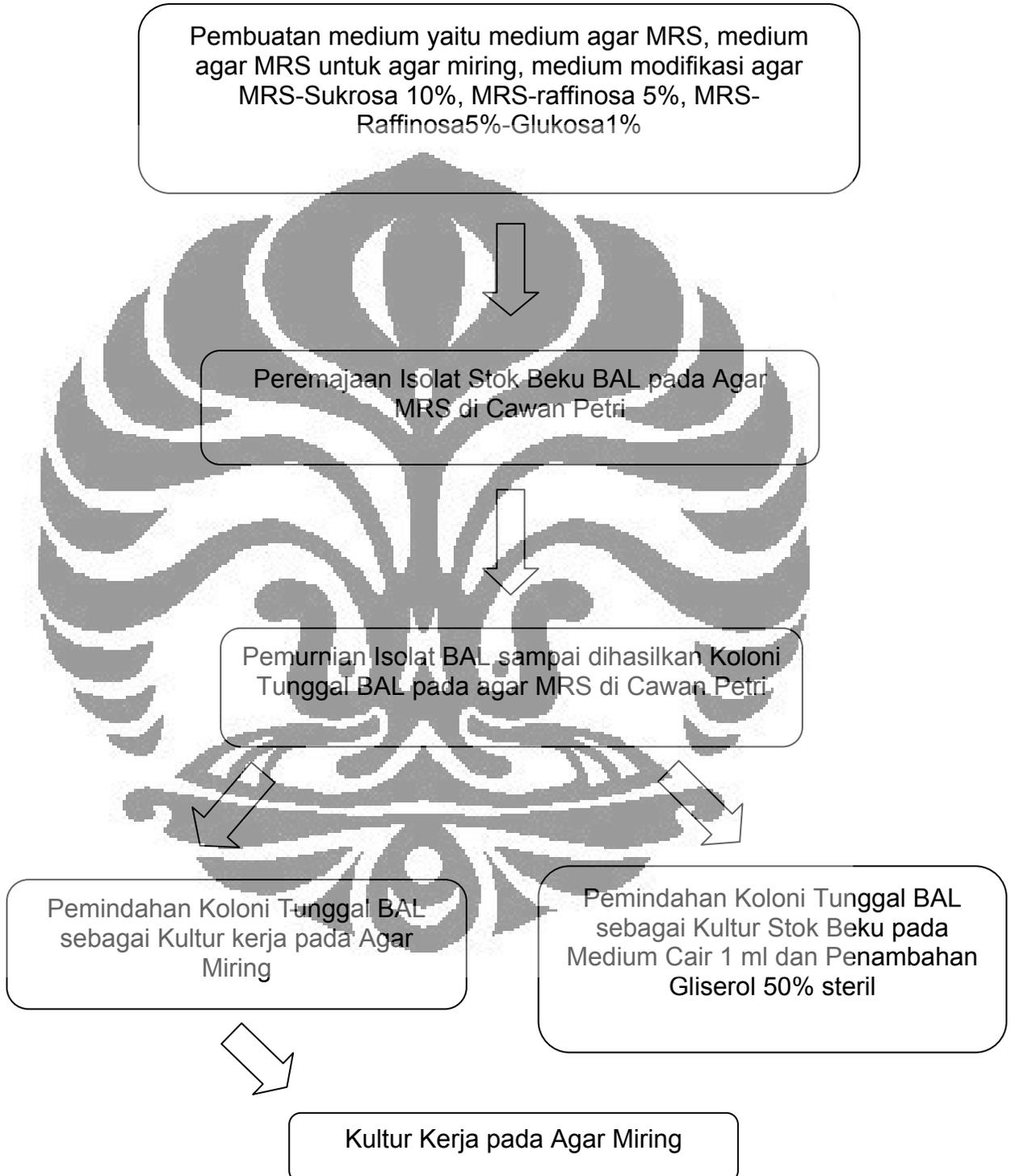
Lampiran 3

Komposisi zat-zat warna standar yang digunakan dalam penelitian (49)

Ungu gentian (ungu kristal) dalam alkohol	13,87 gram per 100
ml	
Cairan lugol (larutan iod dari garam)	
Iod	1
gram	
Kalium iodida	2
gram	
Air suling	300
ml	
Air fukhsin	0,39 gram per 100
ml	

Lampiran 4

Skema Alur Kerja Pada Penelitian



Kultur Kerja pada Agar Miring

Transfer pada agar MRS-
Sukrosa 10% di cawan
petri kemudian diinkubasi

Transfer pada agar MRS-
Raffinosa 5% di cawan
petri kemudian diinkubasi

Transfer pada agar MRS-
Raffinosa 5%-Glukosa 1%
di cawan petri kemudian
diinkubasi

Pengamatan Produksi EPS

Pembandingan dengan Hasil/Data dari
penelitian sebelumnya