

**SKRINING AKTIVITAS FRUKTANSUKRASE BAKTERI ASAM LAKTAT
MENGUNAKAN MEDIUM MENGANDUNG RAFINOSA**

TRI VITA PRATIWI

0606041176



UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

DEPARTEMEN FARMASI

PROGRAM EKSTENSI

DEPOK

2009

**SKRINING AKTIVITAS FRUKTANSUKRASE BAKTERI ASAM LAKTAT
MENGUNAKAN MEDIUM MENGANDUNG RAFINOSA**

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

Oleh :

TRI VITA PRATIWI

0606041176



DEPOK

2009

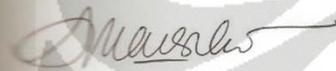
SKRIPSI : SKRINING AKTIVITAS FRUKTANSUKRASE BAKTERI ASAM LAKTAT
MENGUNAKAN MEDIUM MENGANDUNG RAFINOSA

NAMA : TRI VITA PRATIWI

NPM : 0606041176

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, APRIL 2009



Dr. AMARILA MALIK, M.Si

PEMBIMBING I



Dr. MAKSUM RADJI, M.Biomed

PEMBIMBING II

Tanggal Lulus Ujian Sarjana :

Penguji I : Prof. Dr. Atiek Soemiati, M.S


Penguji II : Drs. Hayun, M.Si


Penguji III : Sutriyo, M.Si


KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan anugrah-Nya yang telah membantu penulis dalam 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 ini ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya pada :

1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
2. Bapak Dr. Abdul Mun'im, selaku Ketua Program Ekstensi Farmasi FMIPA UI.
3. Ibu Dr. Amarila Malik, M.Si selaku pembimbing I dan Bapak Dr. Maksum Radji, M.Biomed selaku pembimbing II yang telah memberikan bimbingan serta saran selama penelitian dan penyusunan skripsi.
4. Ibu Dr. Katrin, M.Si, selaku pembimbing akademis yang telah memberikan bimbingan dan bantuan selama penulis menempuh pendidikan di Program Ekstensi Farmasi FMIPA UI.
5. Seluruh staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan yang diberikan selama ini.

6. Karyawan serta Laboran Departemen Farmasi FMIPA UI terutama Mbak Tini, Mbak Catur dan Mas Tri yang telah membantu penulis selama menempuh pendidikan, khususnya selama penelitian ini berlangsung.
7. Kedua orang tua dan kakak-kakakku, serta Kafka yang baru saja mengisi hari-hariku; yang senantiasa memberikan kasih sayang, semangat, bantuan, serta doa.
8. Teman-teman Ekstensi Farmasi angkatan 2006, terutama Almh. Nancy, Eti, Netty, Vidya, Riswanto, Tri, Irvan, Esty, Pita, dan Usi; Teman-teman “Rumahku Carnesia”, terutama Terry dan Riris; atas kebersamaannya selama ini, serta Rafiq, Zimo, dan Yogie yang telah banyak membantu penulis dalam penyusunan skripsi ini.
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang telah memberikan bantuan kepada penulis selama penulis melakukan penelitian dan menyusun skripsi ini.

Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan dan semua pihak yang memerlukan.

Penulis,

2009

ABSTRAK

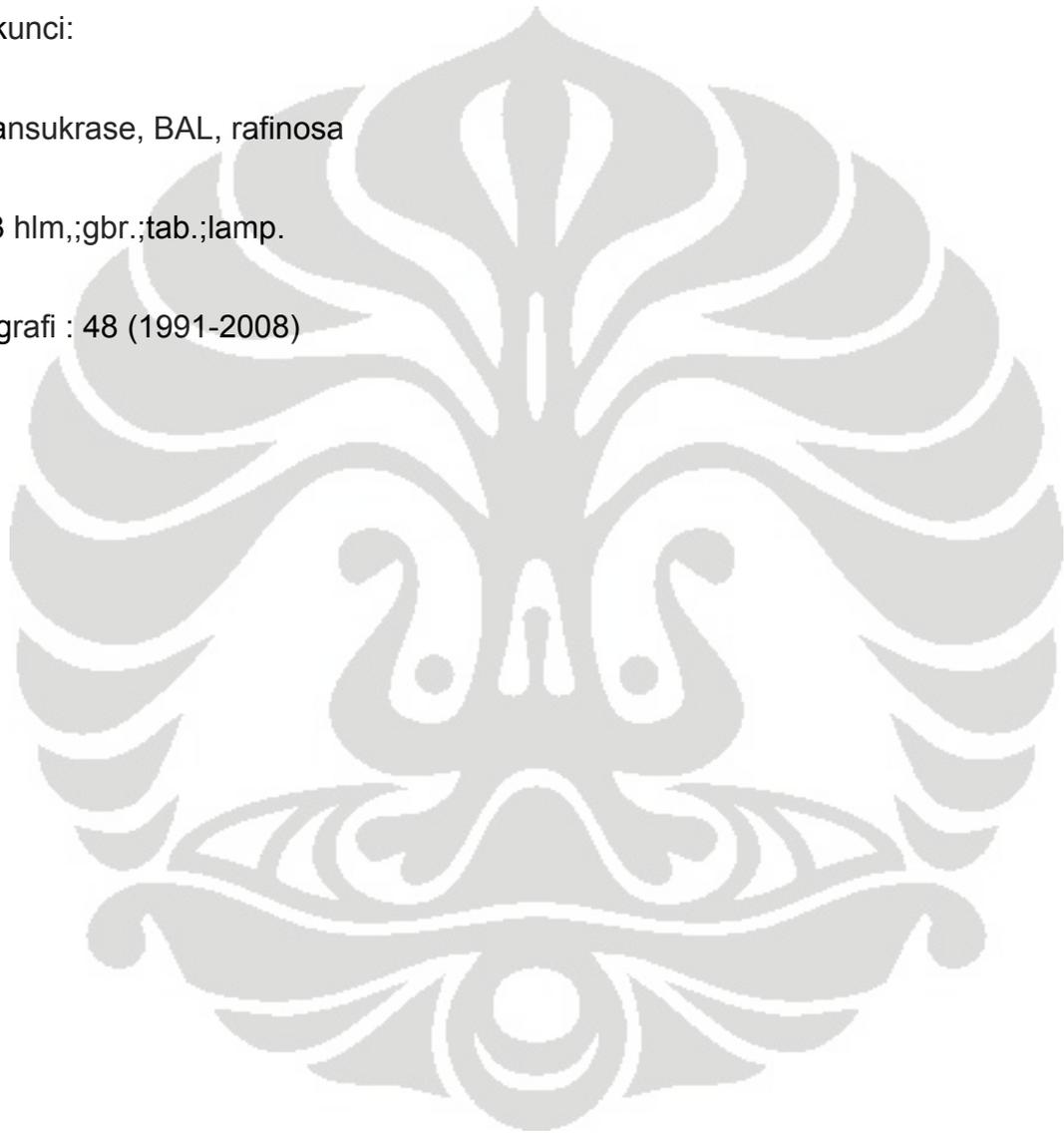
Fruktansukrase merupakan salah satu jenis enzim sukrase yang dapat menghasilkan eksopolisakarida (EPS) fruktan. Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan suatu mikroorganisme yang memiliki kemampuan menghasilkan EPS. EPS fruktan dapat dimanfaatkan dalam berbagai industri makanan ataupun industri lainnya dan bermanfaat bagi kesehatan sebagai prebiotik. Pada penelitian ini dilakukan skrining terhadap isolat-isolat BAL untuk mengetahui aktivitas fruktansukrase dalam menghasilkan EPS fruktan. Isolat-isolat BAL ditumbuhkan pada medium mengandung rafinosa untuk menghasilkan lendir EPS berupa polimer fruktosa. Fruktansukrase akan memotong rafinosa sebagai sumber karbon menjadi glukosa-galaktosa dan fruktosa bebas. Hasil dari penelitian ini adalah sebanyak 13 isolat dari total 28 isolat BAL menunjukkan adanya aktivitas fruktansukrase dalam menghasilkan EPS fruktan. Adapun beberapa isolat telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya membawa gen *gtf* adalah sebanyak 6 isolat. Hal ini menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut selain menghasilkan EPS glukosa juga menghasilkan EPS fruktan.

Kata kunci:

Fruktansukrase, BAL, rafinosa

x + 73 hlm.,;gbr.;tab.;lamp.

Bibliografi : 48 (1991-2008)



ABSTRACT

Fructansucrase is a kind of sucrase's enzyme which can produce exopolysaccharide (EPS) fructan. Lactic Acid Bacteria (LAB) is a microorganism which has capability in producing exopolysaccharides (EPS). EPS fructan can be used in food industries or others and has potency in human health as prebiotics. Through this study, screening activity of fructansucrase in LAB's isolates has been done. The aim of this study was to know activity of fructansucrase in producing EPS fructan. LAB's isolates which were grown in medium containing raffinose, produce EPS which is known as fructose polymer. Fructansucrase cleaves raffinose then glucose-galactose and free fructose are released. The result of this study show that 13 out of 28 LAB's isolates were capable in showing activity of fructansucrase in producing EPS fructan. Some isolates of LAB which have been reported as having *gtf* genes were 6 isolates. This finding indicates that besides producing EPS glucan, it also produces fructan.

Keyword :

Fructansucrase, LAB, raffinose.

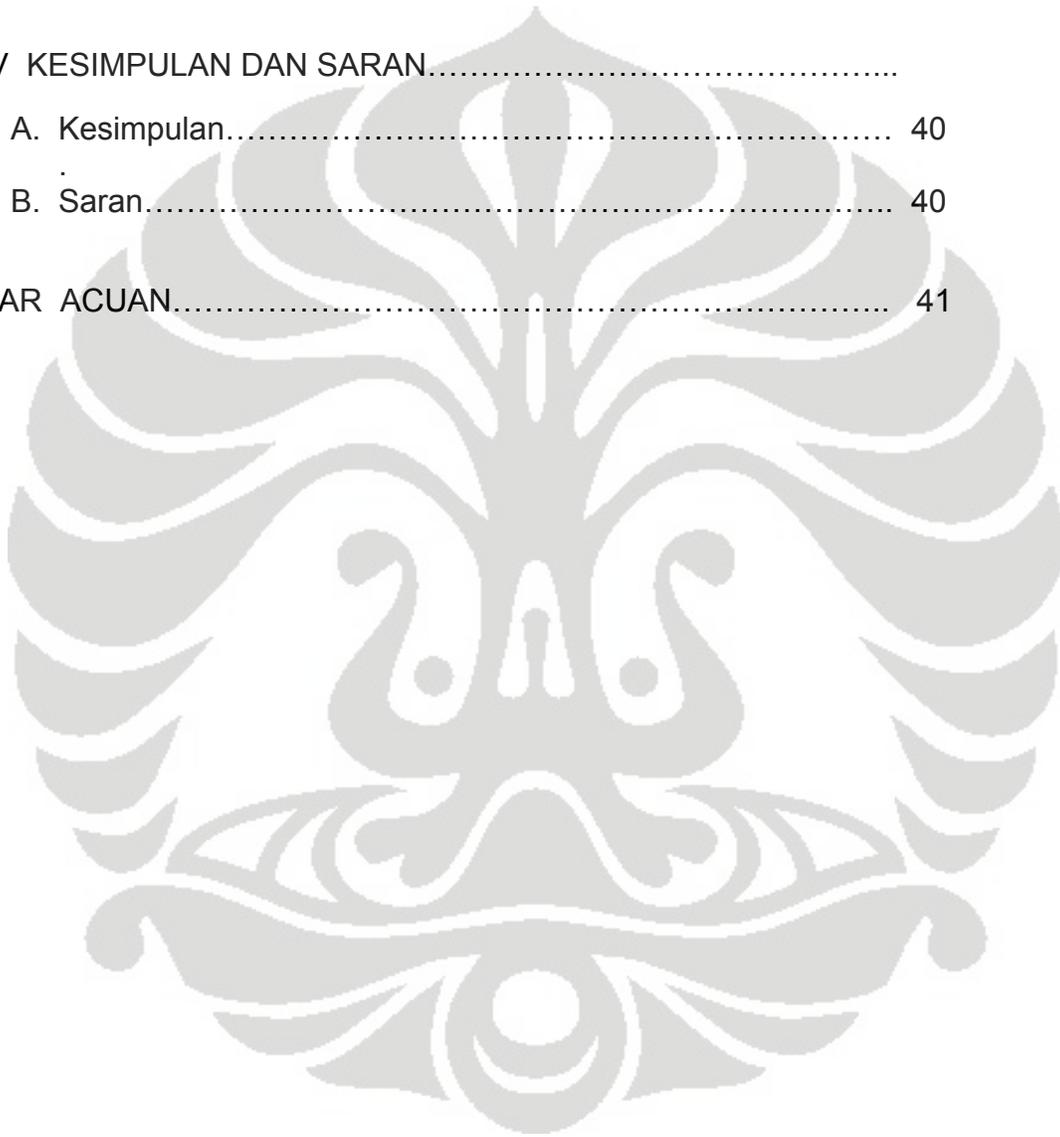
x + 73 pages; figures; tables; appendixes

Bibliography : 48 (1991-2008)

DAFTAR ISI

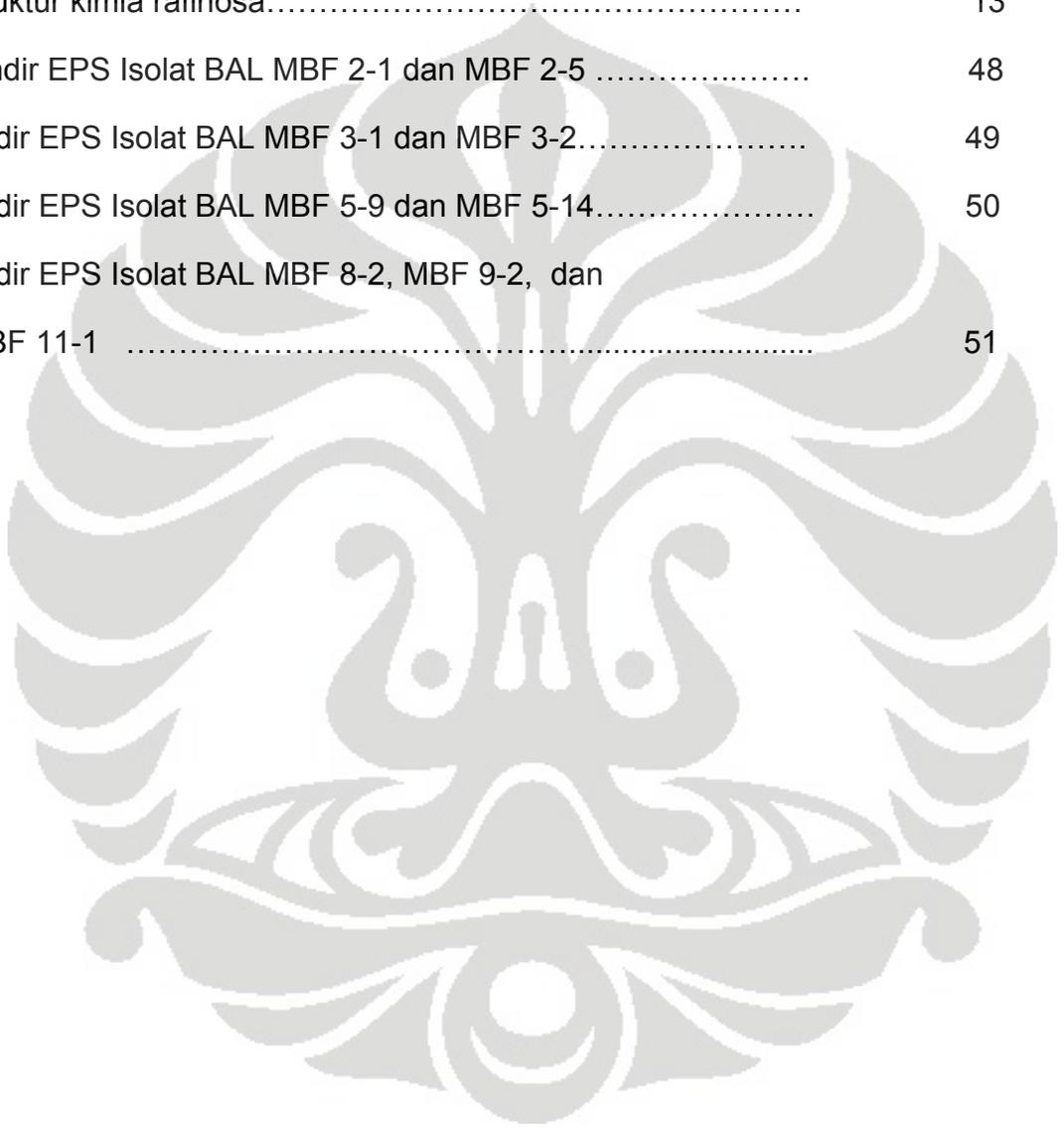
	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
ABSTRACT.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I PENDAHULUAN.....	
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	
A. Eksopolisakarida.....	4
B. Bakteri Asam Laktat.....	9
C. Enzim Sukrase.....	12
D. Sumber-sumber isolasi BAL.....	14
BAB III BAHAN, ALAT, DAN CARA KERJA.....	
A. Lokasi Penelitian.....	16
B. Bahan.....	16
C. Alat.....	17
D. Cara Kerja.....	18

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	
A. Hasil.....	27
B. Pembahasan.....	29
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	
A. Kesimpulan.....	40
B. Saran.....	40
DAFTAR ACUAN.....	41



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur kimia rafinosa.....	13
2. Lendir EPS Isolat BAL MBF 2-1 dan MBF 2-5	48
3.Lendir EPS Isolat BAL MBF 3-1 dan MBF 3-2.....	49
4.Lendir EPS Isolat BAL MBF 5-9 dan MBF 5-14.....	50
5.Lendir EPS Isolat BAL MBF 8-2, MBF 9-2, dan MBF 11-1	51



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil pengamatan bentuk dan warna pigmen morfologi koloni koleksi BAL serta sumber isolat pada medium agar MRS.....	54
2. Hasil pengamatan lendir EPS pada medium agar MRS-sukrosa 10%.....	56
3. Hasil pengamatan lendir EPS pada medium agar MRS-rafinosa 5%	58
4. Hasil pengamatan lendir EPS pada medium agar MRS-glukosa1%-rafinosa %	59
5. Korelasi hasil pengamatan penelitian yang dilakukan dengan data hasil penelitian sebelumnya	61

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Komposisi medium.....	69
2. Cara pembuatan reagen.....	70
3. Skema alur kerja penelitian.....	71



BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Eksopolisakarida (EPS) adalah suatu polisakarida yang dapat diproduksi dan dieksresikan oleh bakteri asam laktat (BAL). EPS telah lama dilaporkan memiliki potensi untuk dapat diaplikasikan dalam bidang industri farmasi, kesehatan, dan pangan (1).

Contoh EPS yang diaplikasikan dalam bidang farmasi adalah inulin. Dari beberapa penelitian, inulin diketahui mempunyai peranan sebagai penstabil protein, liposom, *lipoplex*, dan *polyplex* (2,3,4). Dalam bidang kesehatan, inulin berperan sebagai prebiotik (5).

Dalam bidang pangan misalnya pada industri susu, EPS yang diproduksi oleh BAL berperan dalam memperbaiki tekstur dan sifat alir dari produk fermentasi yang dihasilkan. Contoh EPS yang digunakan dalam industri susu misalnya xantan yang berperan sebagai bahan penstabil (6,7).

Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan suatu mikroorganisme Gram-positif dengan status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) yang menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir selama fermentasi karbohidrat dan berpotensi sebagai penghasil EPS. Spesies-spesies BAL yang masih belum banyak

diketahui sebagai penghasil EPS antara lain *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Oenococcus*, *Vagococcus*, dan *Weisella*. Galur-galur dari BAL penghasil EPS yang telah dilaporkan adalah dari genus *Leuconostoc*, *Streptococcus*, dan *Lactobacillus* (8).

EPS dibedakan menjadi dua tipe, yaitu homopolisakarida dan heteropolisakarida. Untuk sintesis homopolisakarida dari sukrosa, BAL memperkerjakan enzim ekstraseluler berukuran besar, yaitu glukosiltransferase (GTF) atau glukansukrase, dan fruktosiltransferase (FTF) atau fruktansukrase. Enzim-enzim ini berguna untuk sintesis EPS glukana atau EPS fruktana berbobot molekul besar dari substrat sukrosa (9,10).

Berdasarkan penelitian-penelitian yang telah dilakukan, informasi mengenai sintesis fruktana oleh bakteri asam laktat masih sangat terbatas (11). Salah satu faktor yang menentukan produksi EPS adalah media pertumbuhan, khususnya sumber karbon yang digunakan (12). Dalam menghasilkan fruktana, selain menggunakan substrat sukrosa dapat digunakan rafinosa sebagai sumber karbon (11,13).

Rafinosa merupakan trisakarida yang terdiri dari (α -galaktosa(1-6)- α -glukosa(1-2)- β -fruktosa) yang terhubung melalui ikatan glikosida. Rafinosa merupakan substrat yang digunakan oleh fruktansukrase (selain sukrosa) untuk menghasilkan polimer fruktosa (14). FTF akan memotong rafinosa sebagai substrat dan dihasilkan glukosa-galaktosa dan fruktosa bebas (14).

Berdasarkan informasi tersebut maka dalam penelitian ini dilakukan skrining aktivitas fruktansukrase dengan mengamati adanya EPS fruktana

menggunakan medium mengandung rafinosa. Dengan dilakukannya penelitian ini, dapat diketahui isolat-isolat BAL yang selain menghasilkan EPS glukon juga menghasilkan EPS fruktan yang akan memperkaya jenis-jenis polimer dan kemanfaatannya baik di industri bidang farmasi, kesehatan, dan pangan (8).

B. TUJUAN PENELITIAN

1. Melakukan skrining untuk mengetahui adanya aktivitas fruktansukrase terhadap isolat-isolat BAL yang diperoleh dari penelitian sebelumnya menggunakan substrat rafinosa.
2. Membandingkan hasil skrining dengan hasil-hasil yang dilaporkan sebelumnya untuk mengetahui isolat-isolat BAL yang selain menghasilkan EPS glukon juga menghasilkan EPS fruktan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. EKSOPOLISAKARIDA

Mikroorganisme dapat mensintesis polisakarida yang penting untuk struktur dinding sel seperti peptidoglikan dan asam lipoteikoat pada bakteri Gram positif dan lipopolisakarida pada membran luar dari bakteri Gram negatif (15). Kebanyakan polisakarida yang berasal dari tanaman digunakan sebagai bahan pengental, bahan penstabil, bahan pembentuk tekstur, dan bahan pembentuk gel dalam industri makanan. Dalam sepuluh tahun terakhir, selain berasal dari tanaman, eksopolisakarida yang berasal dari bakteri dapat dijadikan alternatif penghasil polisakarida. Polisakarida yang dihasilkan bakteri mempunyai sifat alir yang dapat dimanfaatkan dalam industri dan dapat diproduksi dalam jumlah besar serta memiliki tingkat kemurnian yang tinggi (16).

Polisakarida yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat, misalnya *Lactobacillus safranciscensis* dapat dibedakan berdasarkan tempat dihasilkan yaitu : *capsular polysaccharides* (CPS) yang berhubungan dengan permukaan sel (16). Jenis polisakarida yang kedua adalah eksopolisakarida (EPS) yang merupakan polimer ekso-seluler yang membentuk lapisan berlendir yang terlepas dari permukaan sel atau disekresikan ke lingkungan (15,17). Beberapa BAL

memiliki kemampuan untuk menghasilkan EPS (7). Strain bakteri yang diketahui menghasilkan EPS misalnya *Lactobacillus* (11,16).

EPS diyakini memegang peranan penting dalam melindungi sel bakteri terhadap proses fagositosis, serangan fage, antibiotik atau senyawa toksik, predasi oleh protozoa, dan tekanan osmosis (18).

Beberapa contoh EPS yang dapat digunakan dalam bidang kesehatan misalnya β -glukan, β -mannan, dan dekstran (1,9). Secara umum β -1,3 glukan memiliki beberapa manfaat antara lain sebagai anti infeksi terhadap mikroorganisme seperti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*; suatu imunomodulator yang dapat meningkatkan sistem imun tubuh; antitumor dan regenerasi sel; berpotensi sebagai antioksidan, serta mampu menyembuhkan luka (19)

Contoh EPS yang lain yaitu glukomannan bisa digunakan sebagai laksatif. Selain itu juga diteliti mengenai manfaatnya dalam mengatasi obesitas, diabetes, dan kolesterol tinggi. Dalam mengatasi masalah diabetes, glukomannan menimbulkan rasa kenyang sehingga dapat mengurangi keinginan untuk makan. Hal ini disebabkan karena seratnya lebih lama berada dalam lambung. Dengan dikonsumsinya glukomannan, absorpsi karbohidrat dari makanan menjadi lebih lambat sehingga, kadar gula darah meningkat tidak secepat biasanya (20).

Produksi EPS dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti waktu serta temperatur inkubasi, pH, kadar oksigen, dan media pertumbuhan khususnya

sumber karbon yang digunakan. Produksi EPS akan tetap meningkat sampai fase stasioner. Hal ini disebabkan pembentukan dinding sel dan produksi EPS, keduanya membutuhkan isoprenoid fosfat sebagai pembawa. Dengan demikian, pada saat pertumbuhan terhenti, maka tersedia lebih banyak isoprenoid fosfat yang dibutuhkan untuk pembentukan EPS. Selain itu, enzim sukrase yang dihasilkan oleh BAL akan tetap berada dalam kultur walaupun BAL sendiri sudah memasuki fase kematian. Hal itu yang menyebabkan EPS tetap disintesis meskipun BAL sudah mati (12). Berdasarkan komposisi dan mekanisme biosintesisnya, EPS yang dihasilkan BAL dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu homopolisakarida, yang hanya terdiri dari satu macam monosakarida dan heteropolisakarida, yang terdiri dari satu atau lebih monosakarida (1,21).

Homopolisakarida BAL dapat dibedakan atas fruktan dan glukkan. Untuk sintesis homopolisakarida dari sukrosa, BAL memperkerjakan enzim ekstraseluler berukuran besar, yaitu glukosiltransferase (GTF) atau glukansukrase dan atau fruktosiltransferase (FTF) atau fruktansukrase.

Enzim – enzim ini berguna untuk sintesis EPS glukkan atau EPS fruktan berbobot molekul besar dari substrat sukrosa (9,10). Glukkan dibedakan atas reuteran, dekstran, mutan, dan alternan. Salah satu contoh glukkan misalnya dekstran yang merupakan suatu 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 (22). 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 (23).

Fruktan memiliki potensi untuk dapat diaplikasikan baik dalam industri makanan ataupun industri lainnya. Fruktan dapat dibedakan lagi menjadi levan dan inulin (21). Selain itu juga fruktan memiliki peranan bagi kesehatan sebagai prebiotik (24). Prebiotik adalah *non-digestible food ingredient* yang mempunyai pengaruh baik terhadap inang dengan memicu aktivitas, pertumbuhan yang selektif, atau keduanya terhadap satu jenis atau lebih bakteri penghuni kolon (25).

Salah satu jenis fruktan yang diaplikasikan dalam bidang industri, misalnya levan, berperan sebagai *emulsifier* atau bahan enkapsulasi seperti plastik *biodegradable*, kosmetik, lem, *textile coating*, dan detergen. Levan juga dapat diaplikasikan dalam bidang kesehatan. Polimer ini dapat menggantikan dekstran sebagai *blood plasma volume extender* dan diketahui mempunyai efek anti tumor dan immunomodulator pada tikus (24).

Dari beberapa penelitian, inulin yang merupakan jenis lain dari fruktan yang diketahui mempunyai peranan sebagai penstabil protein, liposom, lipoplex, dan polyplex (2, 3, 4). Dalam bidang kesehatan, inulin berperan sebagai prebiotik (5).

Oligosakarida terdiri dari 2-10 monosakarida yang terikat oleh ikatan glikosidik, dapat dihidrolisis oleh asam atau enzim spesifik menjadi monosakarida-monosakarida pembentuknya. Oligosakarida diketahui mempunyai peranan dalam meningkatkan pertumbuhan mikroflora normal usus tertentu misalnya *Bifidobacteria*, menstimulasi penyerapan mineral, mempunyai efek anti karsinogenik, perbaikan kolesterol plasma dan glukosa darah (26).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, glukooligosakarida (GOS) yang dihasilkan oleh *Gluconobacter oxydans* NCIMB 4943 dengan maltodekstrin sebagai sumber karbon diketahui mempunyai efek dalam meningkatkan jumlah *Bifidobacteria* dan *Lactobacillus/Enterococcus*. Contoh glukooligosakarida adalah oligodekstran. Oligodekstran dengan berbagai berat molekul telah diketahui secara in vitro mempunyai efek sebagai prebiotik (27).

Fruktooligosakarida (FOS) merupakan oligosakarida rantai pendek yang tersusun atas D-fruktosa dan D-glukosa. FOS difermentasi oleh mikroflora usus menjadi asam lemak rantai pendek. Asam lemak ini diketahui mempunyai berbagai keuntungan bagi kesehatan, yaitu sebagai antimikroba, antikanker, menurunkan kadar lipid, menurunkan kadar gula darah, anti osteoporosis. FOS sering dikombinasikan dengan bakteri probiotik dan biasanya merupakan bahan yang sering digunakan dalam produk makanan (28).

B. BAKTERI ASAM LAKTAT

Bakteri asam laktat (BAL) termasuk kelompok bakteri Gram-positif, tidak mempunyai sistem pernapasan, tidak berspora, berbentuk batang atau berbentuk *coccus*. Bakteri asam laktat menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir pada fermentasi karbohidrat (29,30).

BAL bersifat fakultatif aerob yaitu BAL dapat hidup pada keadaan adanya oksigen, tetapi BAL tidak dapat menggunakannya untuk respirasi karena BAL tidak mempunyai sistem pernapasan. Oleh karena itu, satu-satunya cara BAL memperoleh energi adalah melalui fermentasi gula. Ketika terpapar oksigen, BAL akan memproduksi H_2O_2 yang bersifat racun terhadap sel. Namun, BAL tidak mampu menghasilkan enzim katalase yang berfungsi untuk mendegradasi peroksida dan karena itu disebut sebagai organisme yang bersifat katalase negatif, tetapi BAL memiliki enzim lain yaitu peroksidase yang dapat mendegradasi H_2O_2 . Selain itu juga BAL memiliki enzim superoksida dismutase, yang dapat mendekomposisi superoksida yang merupakan bentuk toksik dari oksigen. Oleh karena kerja dari enzim-enzim tersebut, maka BAL dapat bertahan hidup dengan adanya oksigen.(31,32).

Berdasarkan kemampuannya dalam menghasilkan asam laktat, fermentasi bakteri ini dikelompokkan ke dalam dua jenis, yaitu : homofermentatif dan heterofermentatif. Pada homofermentatif dihasilkan asam laktat sebagai satu-satunya produk dari fermentasi gula melalui jalur glikolisis (Embden-

Meyerhoft-Parnas). Pada heterofermentatif dihasilkan asam laktat, etanol, dan karbondioksida (CO₂) melalui jalur 6-fosfoglukonat/fosfoketolase (11,30,31,32).

Bakteri asam laktat termasuk mikroorganisme yang aman karena sifatnya tidak toksik dan tidak menghasilkan toksin karena tidak dapat membusukkan protein sehingga tidak dapat menghasilkan senyawa beracun, maka disebut *food grade microorganism* atau dikenal sebagai mikroorganisme yang tidak berisiko terhadap kesehatan. Bakteri asam laktat bermanfaat untuk peningkatan kualitas higienis dan keamanan pangan melalui penghambatan secara alami terhadap mikroorganisme berbahaya yang bersifat patogen (33).

Salah satu jenis BAL yaitu *Lactobacillus reuteri* berperan sebagai probiotik. Probiotik dapat menghambat patogenesis mikroorganisme, sebagai antimutagenik dan antikarsinogenik, meningkatkan respon imun serta menurunkan kadar kolesterol. BAL digunakan sebagai probiotik untuk mengontrol adanya kelainan dalam saluran pencernaan, seperti intoleransi laktosa, gastroenteritis akut yang disebabkan oleh rotavirus atau patogen enterik lainnya, konstipasi, *inflammatory bowel disease*, yaitu dengan mensekresi zat antibakteri seperti asam laktat, peroksida, dan bakteriosin (11).

Pemanfaatan BAL dalam bidang industri bergantung pada sejumlah spesies yang menguntungkan dan tidak patogen, misalnya *Lactococcus* 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 (34).

C. ENZIM SUKRASE

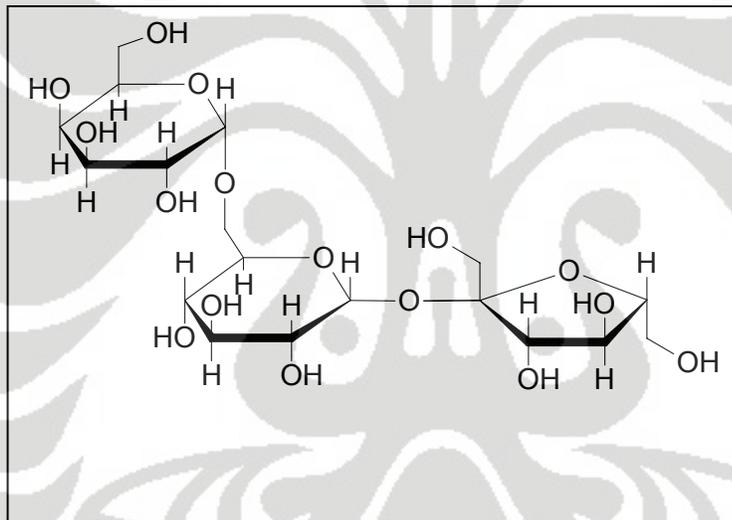
Sintesis EPS homopolisakarida melibatkan enzim-enzim sukrase yaitu kelompok glukansukrase dan kelompok fruktansukrase (35). Glukansukrase merupakan enzim ekstraselular yang mensintesis berbagai jenis glukana dari sukrosa. Berbagai faktor yang mempengaruhi sintesis berbagai jenis glukana adalah medium pertumbuhan, keadaan inkubasi, konsentrasi sukrosa yang digunakan, enzim yang mendegradasi polisakarida (11).

Glukana diproduksi oleh berbagai genus bakteri asam laktat, seperti *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* dan *Lactococcus* (13). Hampir semua glukana yang diproduksi oleh bakteri asam laktat adalah α -glukana. Berbagai jenis α -glukana yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yaitu dekstran $\alpha(1-6)$, mutan $\alpha(1-3)$, alternan $\alpha(1-3)/\alpha(1-6)$, serta reuteran $\alpha(1-4)/\alpha(1-6)$. Dekstran dihasilkan oleh *Ln. mesenteroides*, mutan dihasilkan oleh berbagai jenis *Streptococcus*, alternan disintesis oleh *Ln. mesenteroides*, dan reuteran disintesis oleh *Lb. reuteri* 121 (29).

Mekanisme katalitik glukansukrase sangat rumit dan masih sulit dimengerti. Enzim glukansukrase memotong ikatan glikosidik substratnya, misalnya sukrosa dan menggunakan energi yang dilepaskan untuk membentuk glukana (poli glukosa) (21).

Fruktan disintesis oleh fruktansukrase atau FTF, yang merupakan salah satu jenis enzim sukrase. Enzim ekstraselular ini memotong ikatan glikosidik substratnya

misalnya sukrosa dan juga rafinosa, serta menggunakan energi yang dilepaskan membentuk unit fruktan (poli fruktosa) (21,29). Fruktansukrase pada bakteri mensintesis levan (levansukrase) atau inulin (inulosukrase) (36). Selain sukrosa, levansukrase dapat dihasilkan dari trisakarida, yaitu rafinosa (α -Galaktosa(1-6)- α -Glukosa-(1-2)- β -fruktosa) sebagai donor fruktosil. Rafinosa merupakan substrat untuk sintesis levan oleh levansukrase tetapi bukan untuk substrat glukansukrase. Produk hasil hidrolisis katalis levansukrase dari rafinosa adalah melibiosa (Galaktosa-Glukosa) dan fruktosa bebas (14).



Adanya inulosukrase hanya terbatas pada bakteri asam laktat, sedangkan levansukrase terdistribusi secara luas baik dalam bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif. Sebagian besar bakteri asam laktat mempunyai FTF tipe levansukrase. Levansukrase kebanyakan dihasilkan oleh jenis bakteri asam laktat yang berasal dari flora normal, misalnya *Streptococcus salivarius* dan *Streptococcus mutans* (36). Hanya *Streptococcus mutans*, *Leuconostoc citreum*, dan *Lactobacillus reuteri* yang dilaporkan memiliki inulosukrase (21). Beberapa bakteri yang memiliki enzim levansukrase antara

lain : *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus safranciscensis*, dan *Lactobacillus reuteri*. *Lactobacillus reuteri* LB 121 mempekerjakan enzim glukansukrase dan levansukrase untuk mensintesis glukran dan levan dari sukrosa (21).

D. SUMBER-SUMBER ISOLASI BAL

Secara alami BAL hidup pada media yang kaya akan bahan – bahan organik, seperti pada produk makanan, saluran pencernaan, dan sayuran (37). Bakteri asam laktat banyak diisolasi dari berbagai makanan fermentasi Indonesia, diantaranya kecap ikan, asinan kubis (*sauerkraut*), acar ketimun, bekasam, growol, gatot, tempoyak, dan tape ketan (38).

Penelitian yang dilakukan oleh Felicia, 2006 telah berhasil mengisolasi BAL dari asinan, sekoteng, tanah, susu kacang, ampas tahu, dan ampas kecap (39). Sumber isolasi BAL lainnya adalah dari kubis busuk, asinan sawi, sawi busuk, kacang panjang busuk, selada busuk, tomat busuk, *sauerkraut*, limbah tahu, feses bayi, susu terkontaminasi, susu kedelai, pisang busuk, pepaya busuk, nanas busuk, dan sirsak busuk (40). Disamping itu, BAL banyak diisolasi dari daging (41).

BAB III

BAHAN, ALAT, DAN CARA KERJA

A. LOKASI PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Penelitian dilakukan dari bulan September 2008 sampai bulan Januari 2009.

B. BAHAN

1. Isolat BAL

Isolat BAL yang digunakan dalam penelitian ini adalah koleksi isolat stok beku Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI. Isolat BAL yang digunakan pada penelitian ini berjumlah 28 isolat.

Kontrol positif yang digunakan adalah MBF 8-1 dan kontrol negatif adalah MBF 3-1 yang juga merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI (42).

2. Medium dan Bahan Kimia

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium agar 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 pepton [Difco], 'lab-lemco' [Oxoid], *yeast extract* [Difco], dikalium hidrogen fosfat [Merck], natrium asetat [Merck], amonium sitrat [Merck], magnesium sulfat [Merck], mangan sulfat [Merck], tween 80 [Merck], dekstrosa [Merck], sukrosa [Difco], kalsium karbonat [Merck], agar bakto [Pronadisa], dan rafinosa [Merck].

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

C. ALAT

Peralatan yang digunakan selama penelitian adalah autoklaf [Hirayama, Japan], oven [Lab-line dan WTC Binder], timbangan analitik [Scout dan Acculab], *magnetic stirrer* yang dilengkapi dengan pemanas [Torrey Pines Scientific], pH meter [Eutech], Laminar Air Flow Cabinet [Esco], inkubator [*Orbital Shaker Incubator*], lemari pendingin [Sansio dan Toshiba], kamera digital [Canon], *deep*

freezer -70 °C [New Brunswick Scientific], dan alat-alat lain yang biasa dipergunakan dalam laboratorium mikrobiologi dan bioteknologi.

D. CARA KERJA

1. Pembuatan Medium (43)

a. Medium agar MRS

Pepton, 'lab lemco', *yeast extract*, dikalium hidrogen fosfat, natrium asetat, ammonium sitrat, magnesium sulfat, mangan sulfat, dan agar bakto masing-masing ditimbang sebanyak 5 g; 4 g; 2g; 1 g; 2,5 g; 1 g; 0,1 g; 0,025 g; dan 7 g; dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml; dilarutkan dengan 200 ml aquadest dengan bantuan magnetic stirrer hingga homogen. Tween 80 ditambahkan sebanyak 0,25 ml (\pm 5 tetes) pada larutan medium kemudian diaduk kembali hingga homogen; dilakukan pengukuran dan pengaturan pH larutan medium dengan penambahan HCl 1 N atau NaOH 1 N sampai kisaran pH $6,2 \pm 0,2$; volume larutan medium dicukupkan hingga 250 ml dan dipindahkan ke dalam labu bulat.

Selanjutnya, dekstrosa ditimbang sebanyak 10 g kemudian dimasukkan ke dalam labu bulat lainnya; dilarutkan dengan 200 ml aquadest dengan bantuan magnetic stirrer; dicukupkan volumenya hingga 250 ml.

Larutan medium dan larutan dekstrosa disterilisasi dengan autoklaf secara terpisah pada suhu 121 °C tekanan 2 atm, selama 15 menit.

Larutan dekstrosa dicampurkan ke dalam larutan medium agar di dalam Laminar Air Flow (LAF) secara aseptis dan dihomogenkan. Medium yang masih hangat dituang secara aseptis ke dalam cawan petri, setelah membeku cawan petri dibalik dan dibiarkan semalaman dalam inkubator.

b. Medium agar MRS untuk agar miring

Pepton, 'lab lemco', *yeast extract*, dikalium hidrogen fosfat, natrium asetat, ammonium sitrat, magnesium sulfat, mangan sulfat, agar bakto, kalsium karbonat, dan dekstrosa masing-masing ditimbang sebanyak 5 g; 4 g; 2g; 1 g; 2,5 g; 1 g; 0,1 g; 0,025 g; 7 g; 2,5 g; 5 g; dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml; dilarutkan dengan 200 ml aquadest dengan bantuan magnetic stirrer hingga homogen. Tween 80 ditambahkan sebanyak 0,25 ml (\pm 5 tetes) pada larutan medium kemudian diaduk kembali hingga homogen; dilakukan pengukuran dan pengaturan pH larutan medium dengan penambahan HCl 1 N atau NaOH 1 N sampai kisaran pH $6,2 \pm 0,2$; volume larutan medium dicukupkan hingga 250 ml; dipanaskan di atas hotplate sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga mendidih; dipipet sebanyak 5 ml ke dalam tabung reaksi.

Seluruh tabung reaksi disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 2 atm, selama 15 menit. Tabung reaksi dimiringkan hingga

membeku dan dibiarkan semalaman sebelum digunakan keesokan harinya.

c. Medium agar modifikasi MRS-sukrosa 10%

Pepton, 'lab lemco', *yeast extract*, dikalium hidrogen fosfat, natrium asetat, ammonium sitrat, magnesium sulfat, mangan sulfat, dan agar bakto masing-masing ditimbang sebanyak 5 g; 4 g; 2g; 1 g; 2,5 g; 1 g; 0,1 g; 0,025 g; dan 7 g; dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml; dilarutkan dengan 200 ml aquadest dengan bantuan magnetic stirrer hingga homogen. Tween 80 ditambahkan sebanyak 0,25 ml (\pm 5 tetes) pada larutan medium kemudian diaduk kembali hingga homogen; dilakukan pengukuran dan pengaturan pH larutan medium dengan penambahan HCl 1 N atau NaOH 1 N sampai kisaran pH $6,2 \pm 0,2$; volume larutan medium dicukupkan hingga 250 ml dan dipindahkan ke dalam labu bulat.

Selanjutnya, sukrosa ditimbang sebanyak 50 g kemudian dimasukkan ke dalam labu bulat lainnya; dilarutkan dengan 200 ml aquadest dengan bantuan magnetic stirrer; dicukupkan volumenya hingga 250 ml.

Larutan medium dan larutan sukrosa disterilisasi dengan autoklaf secara terpisah pada suhu $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ tekanan 2 atm, selama 15 menit.

Larutan sukrosa dicampurkan ke dalam larutan medium agar di dalam Laminar Air Flow (LAF) secara aseptis dan dihomogenkan. Medium yang

masih hangat dituang secara aseptis ke dalam cawan petri, setelah membeku cawan petri dibalik dan dibiarkan semalaman dalam inkubator.

d. Medium agar modifikasi MRS–rafinosa 5%

Pepton, 'lab lemco', *yeast extract*, dikalium hidrogen fosfat, natrium asetat, ammonium sitrat, magnesium sulfat, mangan sulfat, dan agar bakto masing-masing ditimbang sebanyak 5 g; 4 g; 2g; 1 g; 2,5 g; 1 g; 0,1 g; 0,025 g; dan 7 g; dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml; dilarutkan dengan 200 ml aquadest dengan bantuan magnetic stirrer hingga homogen. Tween 80 ditambahkan sebanyak 0,25 ml (\pm 5 tetes) pada larutan medium kemudian diaduk kembali hingga homogen; dilakukan pengukuran dan pengaturan pH larutan medium dengan penambahan HCl 1 N atau NaOH 1 N sampai kisaran pH $6,2 \pm 0,2$; volume larutan medium dicukupkan hingga 250 ml dan dipindahkan ke dalam labu bulat.

Selanjutnya, rafinosa ditimbang sebanyak 25 g kemudian dimasukkan ke dalam labu bulat lainnya; dilarutkan dengan 200 ml aquadest dengan bantuan magnetic stirrer; dicukupkan volumenya hingga 250 ml.

Larutan medium dan larutan rafinosa disterilisasi dengan autoklaf secara terpisah pada suhu 121°C tekanan 2 atm, selama 15 menit.

Larutan rafinosa dicampurkan ke dalam larutan medium agar di dalam Laminar Air Flow (LAF) secara aseptis dan dihomogenkan. Medium yang

masih hangat dituang secara aseptis ke dalam cawan petri, setelah membeku cawan petri dibalik dan dibiarkan semalaman dalam inkubator.

e. Medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5%-glukosa 1%

Pepton, 'lab lemco', *yeast extract*, dikalium hidrogen fosfat, natrium asetat, ammonium sitrat, magnesium sulfat, mangan sulfat, dan agar bakto masing-masing ditimbang sebanyak 5 g; 4 g; 2g; 1 g; 2,5 g; 1 g; 0,1 g; 0,025 g; dan 7 g; dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml; dilarutkan dengan 200 ml aquadest dengan bantuan magnetic stirrer hingga homogen. Tween 80 ditambahkan sebanyak 0,25 ml (\pm 5 tetes) pada larutan medium kemudian diaduk kembali hingga homogen; dilakukan pengukuran dan pengaturan pH larutan medium dengan penambahan HCl 1 N atau NaOH 1 N sampai kisaran pH $6,2 \pm 0,2$; volume larutan medium dicukupkan hingga 250 ml dan dipindahkan ke dalam labu bulat.

Selanjutnya, rafinosa dan glukosa ditimbang sebanyak 25 g; 5 g kemudian dimasukkan ke dalam labu bulat lainnya; dilarutkan dengan 200 ml aquadest dengan bantuan magnetic stirrer; dicukupkan volumenya hingga 250 ml.

Larutan medium dan larutan rafinosa-glukosa disterilisasi dengan autoklaf secara terpisah pada suhu 121°C tekanan 2 atm, selama 15 menit.

Larutan rafinosa-glukosa dicampurkan ke dalam larutan medium agar di dalam Laminar Air Flow (LAF) secara aseptis dan dihomogenkan. Medium yang masih hangat dituang secara aseptis ke dalam cawan petri, setelah membeku cawan petri dibalik dan dibiarkan semalaman dalam inkubator.

2. Pembuatan agar miring sebagai kultur kerja

Sebanyak 28 isolat stok beku BAL Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI hasil penelitian sebelumnya (39), disubkultur terlebih dahulu pada media agar MRS, kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 18-24 jam.

Koloni tunggal yang diperoleh kemudian disubkultur kembali ke medium agar miring MRS dengan pengerjaan duplo, sebagai kultur kerja lalu diinkubasi selama 18-24 jam. Setelah itu dilakukan pengamatan bentuk koloni isolat BAL, yaitu pengamatan secara makroskopik berupa koloni bulat berwarna putih kekuningan.

3. Pengamatan produksi eksopolisakarida dengan menggunakan medium agar modifikasi MRS-sukrosa 10%

Isolat BAL dari agar miring MRS digoreskan pada medium agar modifikasi MRS-sukrosa 10% kemudian diinkubasi selama 18-24 jam. Penggoresan

isolat BAL ke medium agar modifikasi MRS-sukrosa 10% dilakukan secara duplo. Produksi EPS diamati sebagai pertumbuhan yang berlendir pada medium

4. Pengamatan produksi eksopolisakarida dengan menggunakan medium modifikasi MRS-rafinosa 5%

Isolat BAL dari agar miring MRS digoreskan pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5 % kemudian diinkubasi selama 18-24 jam. Pada uji pendahuluan dilakukan penggoresan isolat BAL pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 2% kemudian diinkubasi selama 18-24 jam, tetapi karena EPS yang dihasilkan sedikit dilakukan penggoresan pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5%. Penggoresan isolat BAL ke medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5% dilakukan secara duplo. Produksi EPS diamati sebagai pertumbuhan yang berlendir pada medium.

5. Pengamatan produksi eksopolisakarida dengan menggunakan medium modifikasi MRS-rafinosa 5%-glukosa 1%

Isolat BAL dari agar miring MRS digoreskan pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5%-glukosa 1% kemudian diinkubasi selama 18-24 jam. Penggoresan isolat BAL ke medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5%-

glukosa 1% dilakukan secara duplo. Produksi EPS diamati sebagai pertumbuhan yang berlendir pada medium

6. Verifikasi EPS glukon sebagai indikasi adanya aktivitas glukansukrase dan EPS fruktan sebagai indikasi adanya aktivitas fruktansukrase

Dilakukan verifikasi adanya EPS glukon sebagai indikasi adanya aktivitas glukansukrase serta EPS fruktan sebagai indikasi adanya aktivitas fruktansukrase. Adanya EPS glukon yang dihasilkan dari penggoresan isolat BAL pada medium agar modifikasi MRS-sukrosa 10% mengindikasikan adanya aktivitas glukansukrase dan adanya EPS fruktan yang dihasilkan pada penggoresan isolat BAL pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5% serta pada medium modifikasi rafinosa 5%- glukosa 1 % mengindikasikan adanya aktivitas fruktansukrase.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Pengamatan Morfologi Koloni Isolat

Hasil pengamatan morfologi koloni isolat BAL adalah beberapa isolat yang diremajakan pada medium agar MRS membentuk koloni bulat dengan permukaan yang halus. Koloni isolat BAL yang dihasilkan berwarna putih kekuningan.

Hasil pengamatan morfologi koloni BAL dapat dilihat dalam Tabel 1.

2. Hasil Pengamatan lendir EPS

Hasil pengamatan lendir EPS isolat BAL pada medium agar modifikasi MRS-sukrosa 10% adalah bahwa keseluruhan isolat yang digunakan pada penelitian ini menghasilkan lendir. Hasil pengamatan lendir EPS isolat BAL pada medium agar modifikasi MRS-sukrosa 10% dapat dilihat dalam Tabel 2. Beberapa gambar lendir EPS isolat BAL pada medium agar modifikasi MRS-sukrosa 10% dapat dilihat pada Gambar 2, Gambar 3, Gambar 4, dan Gambar 5.

Hasil pengamatan lendir EPS isolat BAL pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5% adalah diperoleh lendir EPS dengan berbagai konsistensi pada 12 isolat

BAL. 16 isolat BAL lainnya hanya terlihat pertumbuhan BAL yang tidak sempurna dan tidak dihasilkan EPS. Hasil pengamatan lendir EPS isolat BAL pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5% dapat dilihat dalam Tabel 3. Beberapa gambar lendir EPS isolat BAL pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5% dapat dilihat pada Gambar 2, Gambar 3, Gambar 4, dan Gambar 5.

Hasil pengamatan lendir EPS isolat BAL pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5%- glukosa 1% adalah diperoleh lendir pada semua isolat BAL tetapi ada perbedaan intensitas lendir diantara koleksi BAL. Hasil pengamatan lendir EPS beberapa isolat BAL pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5%-glukosa 1% dapat dilihat dalam Tabel 4. Beberapa gambar lendir EPS isolat BAL pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5%-glukosa 1% dapat dilihat pada Gambar 2, Gambar 3, Gambar 4, dan Gambar 5.

B. PEMBAHASAN

Sebagai tahap awal dari penelitian ini, sebanyak 28 isolat BAL kultur stok beku koleksi laboratorium mikrobiologi dan bioteknologi FMIPA UI diremajakan kembali pada medium agar MRS dengan cara menggoreskan isolat beku BAL pada medium agar MRS dan disebar. Isolat-isolat BAL yang digunakan dalam penelitian ini telah diisolasi dari penelitian sebelumnya, berasal dari berbagai sumber seperti asinan, sekoteng, tanah, susu kedelai, ampas tahu, dan ampas kecap (39). Isolat-isolat BAL yang telah disebar tersebut diinkubasi secara aerob pada suhu 30 °C selama 18-24

jam. Setelah diinkubasi selama 18-24 jam, diamati pertumbuhan koloni BAL. Jika belum dihasilkan bentuk koloni tunggal BAL, harus terus dilakukan pemindahan BAL dari medium agar MRS ke medium agar MRS yang lain. Hal ini dilakukan agar dihasilkan bentuk koloni tunggal BAL yang jelas sehingga mempermudah pengamatan dalam pemindahan BAL ke medium selanjutnya.

Medium agar MRS merupakan medium yang selektif untuk menumbuhkan dan memelihara BAL (39). Inkubasi BAL dilakukan secara aerob karena BAL termasuk bakteri fakultatif aerob yang tidak menggunakan oksigen untuk produksi energinya, melainkan bergantung pada fermentasi gula (31,32). Waktu inkubasi BAL yaitu sekitar 18-24 jam memberikan waktu yang cukup bagi bakteri untuk mencapai fase akhir pertumbuhan atau fase stasionernya. Pada fase ini, sebagian besar bakteri telah dewasa dan mampu menunjukkan sifat fenotif dan genetik yang sempurna (44).

Koloni yang dihasilkan oleh Isolat BAL pada penelitian ini secara morfologi sama dengan data yang didapatkan dari penelitian yang telah dilakukan sebelumnya (39), yaitu berupa koloni bulat dengan permukaan yang halus berwarna putih kekuningan. Bentuk koloni isolat BAL dapat dilihat pada Tabel 1. Setelah didapatkan bentuk koloni tunggal, koloni BAL tersebut dipindahkan ke medium agar miring, dikerjakan secara duplo sebagai kultur kerja.

Agar miring MRS dibuat dengan menambahkan kalsium karbonat ke dalamnya. Kalsium karbonat biasa dipindahkan ke dalam medium jika kultur yang ditanam akan disimpan dan digunakan dalam jangka waktu cukup lama sebagai kultur kerja. Fungsi kalsium karbonat ini adalah untuk menjaga pH agar tidak terlalu asam akibat

asam laktat yang dihasilkan oleh isolat BAL. Akibat asam laktat, pH medium dapat turun mencapai pH 2 yang kemudian dapat menyebabkan kematian BAL (32). Untuk mencegah kematian BAL maka pengerjaan mutlak dilakukan secara duplo (39).

Tahap selanjutnya pada penelitian ini adalah pemindahan BAL dari kultur kerja ke medium agar modifikasi MRS-sukrosa 10%. Pada penelitian ini, alasan dilakukan kembali penggoresan BAL ke medium agar modifikasi MRS-sukrosa 10% adalah sebagai perbandingan dengan data yang telah didapatkan dari penelitian sebelumnya.

BAL dilaporkan dapat menghasilkan peningkatan jumlah EPS dengan menggunakan sukrosa sebagai sumber karbon (11). Dengan adanya kandungan enzim sukrase yang dimiliki oleh BAL, yaitu glukansukrase dan atau fruktansukrase akan memecah sukrosa dan menggunakan energi yang dilepaskan untuk menggabungkan unit gula sehingga membentuk rantai polimer gula (poli gula) yaitu EPS. Enzim yang berperan dalam sintesis polimer glukosa dapat disebut sebagai glukosiltransferase (GTF), sedangkan enzim yang berperan dalam sintesis polimer fruktosa disebut sebagai fruktosiltransferase (FTF) (11).

Lendir EPS yang dihasilkan menggunakan medium agar modifikasi MRS-sukrosa 10% sesuai dengan data yang telah didapatkan dari penelitian yang telah dilakukan sebelumnya (39) sebagaimana ditampilkan pada Tabel 2. Medium sukrosa sebagai sumber karbon bagi BAL dapat digunakan dalam menghasilkan EPS tetapi karena enzim yang dimiliki oleh BAL yaitu enzim sukrase akan memecah sukrosa membentuk rantai polimer glukosa (glukan) dan atau membentuk rantai

polimer fruktosa (fruktan), hal ini menjadikan sukrosa tidak spesifik dalam menentukan jenis polimer gula yang dihasilkan.

Salah satu faktor yang mempengaruhi produksi EPS adalah sumber karbon yang digunakan (13). Oleh karena itu, dalam penelitian ini digunakan rafinosa sebagai sumber karbon bagi BAL dalam menghasilkan polimer fruktosa (fruktan). Rafinosa merupakan trisakarida yang terdiri dari (α -galaktosa(1-6)- α -glukosa(1-2)- β -fruktosa). Enzim sukrase yang dimiliki BAL, yaitu fruktosiltransferase atau fruktansukrase akan memotong rafinosa menjadi melibiosa (galaktosa-glukosa) dan fruktosa bebas dan membentuk polimer fruktosa (fruktan) (14). Hal ini menjadikan rafinosa bisa digunakan sebagai medium yang spesifik bagi BAL dalam menghasilkan fruktan dan secara tidak langsung dapat melacak ada/tidaknya aktivitas fruktansukrase.

Pada penelitian ini dilakukan skrining menggunakan medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5% untuk memastikan isolat-isolat BAL itu mempunyai aktivitas glukansukrase dan atau fruktansukrase. Dengan dilakukannya modifikasi medium menggunakan rafinosa sebagai sumber karbon, dapat diketahui bahwa isolat-isolat BAL yang menghasilkan lendir EPS pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5% seperti ditunjukkan pada Tabel 3 mempunyai aktivitas fruktansukrase.

Kerja fruktansukrase pada substrat rafinosa yang berperan sebagai sumber karbon bagi BAL adalah memotong rafinosa menjadi glukosa-galaktosa dan fruktosa bebas. Energi yang dilepaskan akan digunakan untuk membentuk polimer fruktosa (fruktan) (14), sedangkan GTF pada substrat rafinosa tidak mempunyai aktivitas pemotongan pada bagian glukosa sehingga polimer glukosa tidak bisa dihasilkan.

Jenis bakteri, kondisi kultur, dan komposisi medium akan mempengaruhi jumlah produksi EPS. Jenis karbon yang digunakan mempunyai pengaruh yang besar terhadap produksi EPS. Hal ini dibuktikan pada penelitian yang telah dilakukan oleh J.H Leita, 1995 dijelaskan bahwa *Lactococcus lactis* subsp. *cremonis* memproduksi EPS sekitar sembilan kali lebih banyak menggunakan glukosa dibandingkan dengan fruktosa sebagai sumber karbon pada kondisi asam (7). Salah satu faktor yang menentukan produksi EPS selain sumber karbon yang digunakan adalah konsentrasi sumber karbon yang digunakan (16).

Untuk mendapatkan hasil yang lebih jelas maka pada penelitian ini dilakukan modifikasi medium. Modifikasi medium ini dilakukan untuk mempermudah pengamatan. Medium agar MRS merupakan medium yang sesuai bagi pertumbuhan BAL (39). Pada medium agar MRS, yang berperan sebagai sumber karbon adalah glukosa. Peningkatan jumlah glukosa yang digunakan selama proses fermentasi BAL dalam menghasilkan eksopolisakarida akan menyebabkan peningkatan viskositas EPS yang dihasilkan (45).

Pada penelitian ini dilakukan modifikasi medium dengan menambahkan rafinosa sebanyak 5% dan glukosa sebanyak 1%. Ada indikasi bahwa galur BAL memerlukan pertumbuhan dengan diinduksi oleh gula sederhana, dalam hal ini adalah glukosa (data belum dipublikasikan). Dengan dilakukannya penggoresan BAL pada medium agar modifikasi rafinosa 5%- glukosa 1%, dapat terlihat jelas koloni BAL yang tumbuh pada medium agar modifikasi rafinosa 5%- glukosa 1% tetapi tidak tumbuh sempurna pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5% mendapatkan karbon dari glukosa.

Tahap selanjutnya pada penelitian ini adalah dilakukan penggoresan terhadap isolat-isolat BAL pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5%-glukosa 1%. Hasil pengamatan dari penggoresan pada medium ini yaitu semua isolat BAL menghasilkan lendir dengan intensitas yang berbeda, dapat dilihat pada Tabel 4.

Pada saat dilakukan penggoresan isolat BAL kembali pada medium modifikasi MRS-rafinosa 5%-glukosa 1%, jika terdapat kesulitan dalam menentukan EPS yang dihasilkan, maka dilakukan pengamatan dengan membandingkan koloni yang terbentuk pada agar MRS dengan medium agar modifikasi MRS - rafinosa 5%-glukosa 1%. Jika EPS yang dihasilkan pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5%-glukosa 1% lebih konsisten dibandingkan dengan medium agar MRS maka dapat dikatakan bahwa isolat tersebut menghasilkan polimer fruktosa.

Pada penelitian sebelumnya telah dilaporkan hasil analisis monomer EPS BAL menggunakan KCKT. EPS BAL diisolasi dan dipurifikasi dari kultur cair BAL yang ditumbuhkan pada medium MRS yang dimodifikasi dengan sukrosa 10% (46). Dari isolat-isolat yang digunakan tersebut didapatkan hasil analisis monomer menggunakan KCKT (46) seperti yang ditunjukkan pada Tabel 5.

Pada penelitian terdahulu, juga dilaporkan isolat-isolat yang memiliki gen *gtf* menggunakan primer *degenerate* DegFor dan DegRev (8). Primer ini dapat melacak dengan baik kandungan gen *gtf* pada isolat BAL koleksi asal sumber lokal dengan teknik PCR (8). Isolat-isolat BAL yang dideteksi gen *gtf* menggunakan PCR dapat dilihat pada Tabel 5.

Pada penelitian ini diperoleh hasil pengamatan terhadap isolat-isolat BAL pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5% dalam menghasilkan lendir EPS, yang dapat dilihat dalam Tabel 3. Isolat-isolat yang paling banyak menghasilkan lendir EPS adalah 9 isolat, yaitu MBF 4-2, MBF 4-9, MBF 5-14, MBF 6-13, MBF 7-5, MBF 7-8, MBF 7-15, MBF 9-1, dan MBF 11-1. Isolat-isolat BAL juga digoreskan pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5%-glukosa 1% dan dihasilkan lendir dengan intensitas yang berbeda. Hasil pengamatannya dapat dilihat pada Tabel 4. Isolat-isolat yang paling banyak menghasilkan lendir EPS adalah 10 isolat, yaitu MBF 4-2, MBF 4-9, MBF 5-4, MBF 5-14, MBF 6-13, MBF 7-5, MBF 7-8, MBF 7-15, MBF 9-1, dan MBF 11-1.

Pembandingan dengan hasil-hasil penelitian sebelumnya yang sudah dilakukan secara molekuler dengan PCR dan terhadap produk EPS menggunakan KCKT adalah terhadap isolat MBF 2-5, MBF 3-1, MBF 3-2, MBF 8-1, MBF 8-2, dan MBF 9-2. Isolat MBF 2-5 saat digoreskan pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5%, dihasilkan pertumbuhan koloni BAL yang tidak sempurna serta tidak dihasilkan lendir EPS. Berdasarkan hasil pengamatan tersebut, maka MBF 2-5 tidak mempunyai aktivitas fruktansukrase. Hasil ini sesuai dengan laporan data penelitian yang telah dilakukan sebelumnya bahwa isolat MBF 2-5 hanya menghasilkan monomer glukosa (46) dan terdeteksi memiliki gen *gtf* (8). Untuk isolat MBF 9-2 juga memperlihatkan hasil yang sama.

Pada penelitian sebelumnya, Isolat MBF 3-1 diketahui menghasilkan monomer glukosa dan juga fruktosa (46). Data tersebut tidak sesuai dengan hasil yang didapatkan dalam penelitian ini karena MBF 3-1 ketika digoreskan pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5% pertumbuhannya tidak sempurna serta tidak dihasilkan

lendir EPS. Hal ini menjelaskan bahwa MBF 3-1 hanya menghasilkan monomer glukosa dan hal ini sesuai dengan terdeteksinya gen *gtf* (8) pada isolat ini. Untuk isolat BAL yang lain seperti MBF 8-1 juga memperlihatkan hasil yang sama.

Untuk isolat MBF 3-2 didapatkan hasil yang sesuai dengan data yang dilaporkan dari penelitian terdahulu. Isolat MBF 3-2 menghasilkan monomer glukosa dan fruktosa (46) yang ditandai dengan dihasilkannya lendir EPS ketika digoreskan pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5%. Dihasilkannya lendir EPS pada isolat ini menunjukkan adanya aktivitas fruktansukrase.

Menurut hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, isolat MBF 8-2 selain dideteksi mengandung gen *gtf* (8) dan *fff* (data belum dipublikasikan), juga mengandung monomer glukosa dan juga fruktosa (46), tetapi ketika dilakukan skrining menggunakan medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5% tidak dihasilkan pertumbuhan koloni BAL, kemudian Isolat ini ketika ditanamkan pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5%-glukosa 1% ternyata menghasilkan lendir EPS yang intensif. Hal ini menjelaskan bahwa isolat MBF 8-2 mempunyai aktivitas fruktansukrase dalam menghasilkan polimer fruktosa.

Adanya perbedaan hasil dalam menentukan kandungan monomer gula pada isolat-isolat BAL menggunakan KCKT mungkin dapat disebabkan oleh adanya pengaruh dalam proses hidrolisis EPS menjadi monomer gula baik glukosa ataupun fruktosa. Kondisi pada proses hidrolisis perlu dioptimalkan. Proses optimalisasi dilakukan dari segi asam yang digunakan, konsentrasi asam yang digunakan, temperatur reaksi, maupun lamanya reaksi (46). Dengan adanya perbedaan hasil

tersebut, perlu dilakukan penelitian lain ke arah molekuler menggunakan PCR dengan primer FTF *Degenerate*, yang merupakan primer spesifik dalam melacak gen *fff* pada isolat-isolat BAL tersebut.

Dari pengamatan yang dilakukan terhadap isolat-isolat BAL dalam penelitian ini, terdapat 6 isolat BAL yang selain mempunyai aktivitas glukansukrase dalam menghasilkan EPS glukon juga mempunyai aktivitas fruktansukrase yang terlihat dengan dihasilkannya EPS fruktan ketika digoreskan pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5%, yaitu MBF 2-1, MBF 3-2, MBF 5-14, MBF 6-13, MBF 8-2, dan MBF 10-2. Adanya aktivitas glukansukrase tersebut terlihat dengan terdeteksinya gen *gff* menggunakan PCR (8). Oleh karena itu, isolat-isolat BAL tersebut mungkin dapat menghasilkan lebih dari satu homopolisakarida, yaitu bisa berupa glukon dan fruktan, beserta oligosakaridanya (GOS dan FOS).

GOS dan FOS dapat berperan sebagai prebiotik (47). Prebiotik didefinisikan sebagai suatu unsur makanan yang *non-digestible*, yang memberi pengaruh menguntungkan bagi inang karena secara efektif menstimulasi pertumbuhan dan atau aktivitas metabolik dari satu atau sejumlah terbatas bakteri dalam kolon, sehingga memperbaiki kesehatan inang (47). FOS diketahui dapat mempertahankan kadar glukosa darah agar tetap konstan, berperan sebagai prebiotik, menurunkan pH sehingga dapat mengeliminasi bakteri patogen, menyebabkan absorpsi karbohidrat menjadi lebih lambat sehingga membantu dalam penurunan berat badan (48). Saat ini sejumlah penelitian lebih dipusatkan pada FOS. Dibandingkan dengan karbohidrat simpleks maupun kompleks lainnya, FOS difermentasikan secara selektif oleh hampir semua strain Bifidobakteri. Bila FOS dikonsumsi dalam jumlah yang cukup banyak,

maka FOS secara dramatik dan konsisten merangsang proliferasi Bifidobakteria menjadi mikroflora yang predominan dalam kolon.

Untuk isolat-isolat lainnya yang belum dilakukan identifikasi gen sukrase menggunakan PCR dan belum dianalisis jenis monomernya menggunakan KCKT, hasil pengamatannya dapat dilihat pada Tabel 5, yaitu MBF 4-2, MBF 4-9, MBF 7-5, MBF 7-8, MBF 7-15, MBF 9-1, dan MBF 11-1. Ke-7 isolat tersebut harus diidentifikasi secara molekuler dengan PCR untuk menentukan apakah disamping mempunyai aktivitas fruktansukrase juga memiliki gen penyandi glukansukrase dengan menggunakan primer spesifik seperti DegFor dan DegRev (8). Dari hasil skrining yang dilakukan, maka diperoleh total 6 isolat BAL yang menunjukkan adanya aktivitas fruktansukrase berdasarkan pengamatan adanya EPS fruktan saat ditumbuhkan pada medium spesifik mengandung rafinosa.

DAFTAR ACUAN

1. Vaningelgem, F., M. Zamfir, F. Mozzi, T. Adriany, M. Vancanneyt, J. Swings, L. De Vuyst. Biodiversity of Exopolysaccharides Produced by *Streptococcus thermophilus* Strains is Reflected in Their Production and Their Molecular and Functional Characteristic. *Appl. Environ. Microbiol*, 2004. (70) : 900-912
2. De Jonge, J., Jean-Pierre Amorij, Wouter L. J Hinrichs, Jan Wilschut, Anke Huckriede, Henderik W. Frijlink. Inulin Sugar Glasses Preserve the Structural Integrity and Biological Activity of Influenza Virosomes During Freeze-drying and Storage. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 2007. (32) : 33-34
3. Hinrich, W. L. J., F. A. Mancenido, N. N. Sanders, K. Braeckmans, S. C. De Smedt, J. Demeester, H. W. Frijlink. The Choice of a Suitable Oligosaccharide to Prevent Aggregation of PEGylated Nanoparticles During Freeze Thawing and Freeze Drying. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006. (311) : 237-244
4. Hinrich, W. L. J., M. G. Prisen, H. W. Frijlink. Inulin Glasses for the Stabilization of Therapeutic Proteins. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001. (215) : 163-174
5. Kolida, S., K. Tuohy, and G. R. Gibson. Prebiotic Effect of Inulin and Oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 2002. (87) : 193-197
6. Boels, Ingelborg C., Richard van Kranenburg, Marja W. Kanning, Barrie Fong Chong, Willem M. de Vos, and Michiel Kleerebezem. Increased Exopolysaccharide Production in *Lactococcus lactis* due to Increased Levels of Expression of the NIZO B40 eps Gene Cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003. **69** (8) : 5029-5031
7. Looijesteijn, Petronelia.J., Ingeborg C. Boels, Michiel Kleerebezem, and Jeroen Hugenholtz. Regulation of Exopolysaccharide Production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremonis* by the Sugar Source. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999. **65** (11) : 5003-5008.
8. Malik, A., D.M. Ariestanti, A. Nurfachtiyani, A. Yanuar. Skrining Gen Glukosiltransferase (*gtf*) dari Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida. *Makara (seri sains)*, 2008. (12) : 1-6
9. Kralj S., G. H. van Geel-Schutten, M. M. G. Dondorff, S. Kirsanovs, M. J. E. C. van der Maarel, and 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.

10. Kralj, S., G.H. van Geel-Schutten, M. J. E. C. van der Maarel, and L. Dijkhuizen. Efficient Screening Methods for Glucosyltransferase Genes in *Lactobacillus* Strains. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2003. **21** (4 – 5) : 181 – 187
11. Van Geel Schutten, G. H. Lactic Acid Bacteria and Exopolysaccharide Synthesis. *Dalam : Exopolysaccharide Synthesis by Lactobacillus reuteri : Molecular Characterization of a Fructosyltransferase and a Glucansucrase*, 2003. 1-19
12. Petry, Sandrine, S. Furlan, Marie-Jane 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
13. Van Hijum, S.A.F.T., S. Kralj, L. K. Ozimek, L. Dijkhuizen, and G. H. van Geel-Schutten. Structure-Function Relationships of Glucansucrase and Fructansucrase Enzyme from Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 2006. **70** (1) : 157-176
14. Meng, Guoyu and Klaus Futterer. Donor Substrate Recognition in the Raffinose-Bound E342A Mutant of Fructosyltransferase *Bacillus subtilis* Levansucrase. *Bio Medical Central Structural Biology*, 2008. **8** (16) : 1-12
15. Ruas-Madiedo, P., C. G. de los Reyes-Gavilan. Invited Review : Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *J. Dairy Sci*, 2005. **88** : 843-856
16. Korakli, M. *Sucrose Metabolism and Exopolysaccharide Production by Lactobacillus safranciscensis*. Doctoral Thesis Fakultat Wissenschaftszentrum Weihenstephan fur Ernährung, Landnutzung und Umwelt. Freising, 2002 : 1-6
17. Van Geel-Schutten, F. Van Flesch, B. Ten Brink, M. R. Smith, and L. Dijkhuizen. Screening and Characterization of *Lactobacillus* Strains Producing Large Amount of Exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 1998. **50** : 697-703
18. Savadogo, A., Outtara C. A. T., Savadogo P. W., Barro. N, Outtara A. S, Traore A. S. Identification of Exopolysaccharides producing Lactic Acid Bacteria from Burkina Faso Fermented Milk Samples. *African Journal of Biotechnology*, 2004. **3** (3) : 189 – 194
19. Kusmiati, F. Rachmawati, S. Siregar, S. Nuswantara, A. Malik. Produksi Beta-1,3 Glukan dari *Agrobacterium* dan Aktivitas Penyembuhan Luka Terbuka Pada Tikus Putih. *Makara (Seri Sains)*, 2006. **10** (1) : 24 – 29
20. Anonim. Glukomannan. 1 hlm. [http : // www. drugdigest.org/. DD/ DVH/ HerbsWho/ 0,3923, 552514/ Glucomannan, 00. html](http://www.drugdigest.org/DD/DVH/HerbsWho/0,3923,552514/Glucomannan,00.html). 26 Agustus 2008, pk 10.14 WIB
21. Van Hijum, S. A. F. T., S. Kralj, L. K. Ozimek, L. Dijkhuizen, G.H. Van Geel-Schutten. General Introduction. *Dalam : Hijum, S. A. F. T van. Fructosyltransferase of Lactobacillus reuteri: Characterization of Genes,*

Enzymes, and Fructan Polymers. Enschede: Printpartners Ipskamp, 2004 : 10 – 33

22. Microsurgeon. Dextran. 1 hlm. [http:// www. microsurgeon. Org / dextran. Htm](http://www.microsurgeon.Org/dextran.Htm). 29 Agustus 2008, pk 22.44 WIB
23. Veronese R. M and Caliceti P. Custom–Tailored Pharmacokinetics and Pharmacodynamics via Chemical Modification of Biotech Drug. Dalam : Veronese R. M. and Caliceti P. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Biotech Drug: Principles and Case Studies in Drug Development*. 2006. Meibohm : Wiley – C. H Weinheim
24. Banguela, A. Fructans: from Natural Sources to Transgenic Plants. *Biotechnologia Aplicada*, 2006. **23** (3) : 202-210
25. Sudarmo, S. M., R. G. Ranuh, P. Soeparto, L. S. Djupri. *Kontribusi Prebiotik pada Formula untuk Pemeliharaan Ekosistem Mikrobiota Normal pada Usus*. Laboratorium/SMF Ilmu Kesehatan Anak R. S. Dr. Soetomo/Fakultas Kedokteran Unair : 1-6
26. Nakakuki, T. Present Status and Future of Functional Oligosaccharide Development in Japan. *Pure Appl.Chem*, 2002. **74** (7)1245-1251
27. Wichienchot, S., P. Prasertsan, T. Hongpattarakere, G. R. Gibson, and R. A. Rastall. In vitro Three-stage Continuous Fermentation of Gluco-oligosaccharides Produce by *Gluconobacter oxydans* NCIMB 4943 by Human Colonic Microflora. *Current Issues Intestinal Microbiology*, (7) : 13-18
28. Anonim. Fructooligosaccharides. www.suplementnews.org. Tanggal 10 November 2008, pk 12.45
29. Van Hijum, S.A.F. T., S. Kralj, L. K Ozimek, L. Dijkhuizen, and G. H. Van Geel Schutten. *General Introduction : Fructosyltransferases of Lactic Acid Bacteria*. www.dissertation.ub.rug.nl. 26 Agustus 2008, pk 15.45 WIB
30. Anonim. Fermented Fruits and and Vegetable a Global Perspective : Bacterial Fermentations. *FAO Corporate Document Repository*. www.fao.org, 27 Agustus 2008, pk 16.06 WIB
31. Brock, T. D., M. J. Madigan. *Biology of Microorganism 6th edition*. Prentice Hall, New Jersey, 1991: 718-724
32. Perry, J. J., J. T. Staley. *Microbiology dynamics and Diversity*. Saunders College Publishing, New York, 1997 : 479-486
33. Liliana Saragih. *Modifikasi Metode PCR dalam Penentuan Identitas Bakteri Asam Laktat dari Koleksi Isolat yang Berasal dari Berbagai Jenis Minuman Fermentasi yang Mengandung Kultur Probiotik Menggunakan Metode 16 S rDNA*. Departemen Farmasi, FMIPA UI, Depok, 2008.

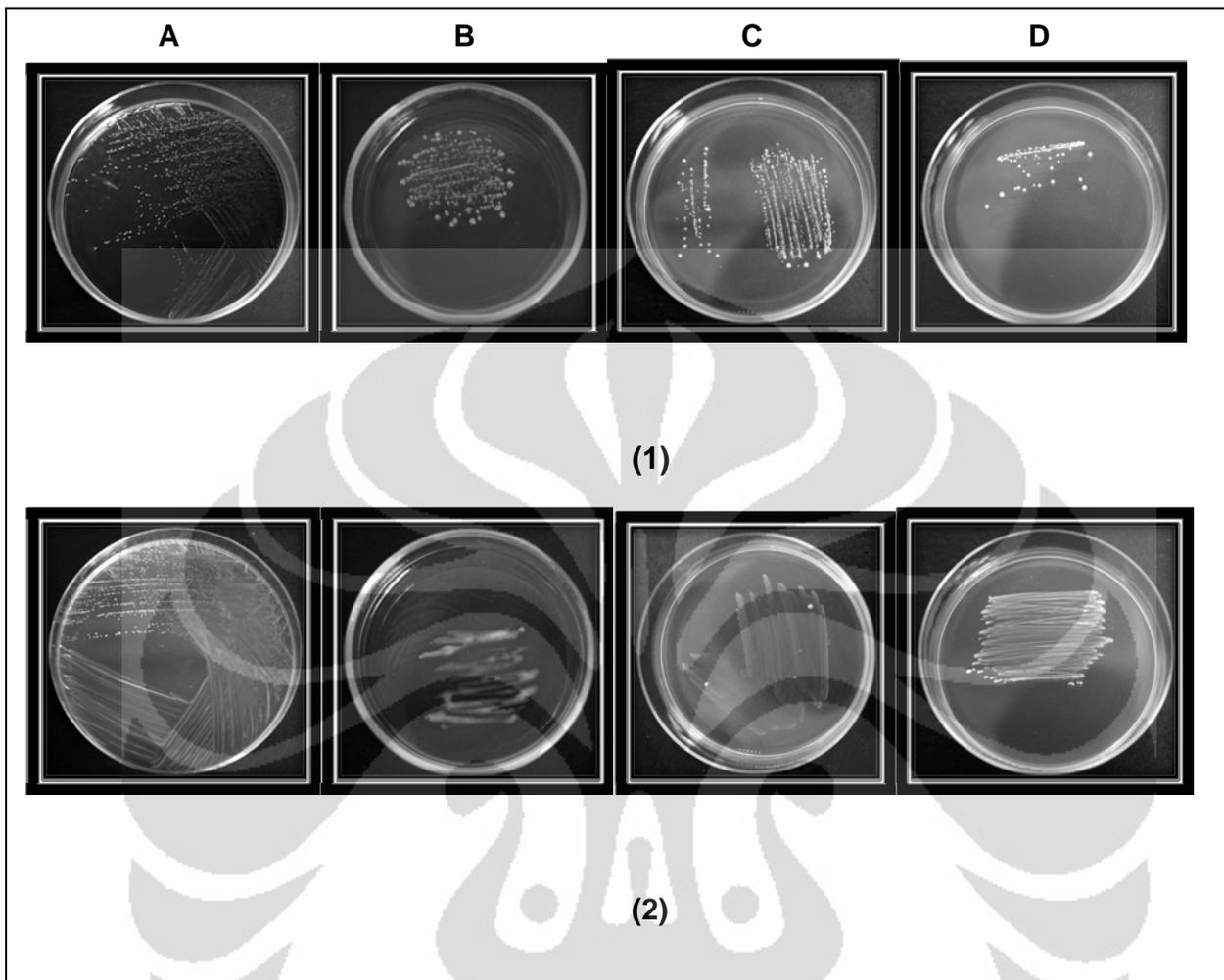
34. Klaenhammer, T., Altermann E., Arigoni F., Bolotin A., Breidt F., Broadbent J., et al. Discovering Lactic Acid Bacteria by Genomics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002. **82** : 29 – 58
35. Malik, A, Felicia, M. Radji, dan A. Oetari. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Asal Sumber Lokal Menggunakan Gen Penyandi 16S rRNA. *Sains Indonesia*, 2007. **12** (2) : 1-6
36. Monsan, Pierre, Sophie Bozonnet, Ciecile Albenre, Gilles Joucla, Renie-Marc Willemot, Magali Remaud-Simleon. Homopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *International Dairy Journal II*, 2001. (11) : 675-685
37. Renault Pierre. Genetically Modified Lactic Acid Bacteria: Application to Food or Healthy and Risk Assesment. *Biochimie*, 2002. **84** : 1073 – 1084
38. Kusumawati, N., B. S. L. Jenie, S. Setyahadi, R.D. Hariyadi. Seleksi Bakteri Asam Laktat Indigenus sebagai Galur Probiotik dengan Kemampuan Menurunkan Kolesterol. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 2001. **8** (2) : 39 – 43
39. Felicia. *Skrining, Isolasi, dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Menggunakan Gen Penyandi 16S Ribosomal RNA*. Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok, 2006
40. Misgiyarta dan S. Widowati. *Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Indigenus*. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, 2003 : 374-380
41. Lewus, Chaterine B., Kaiser Alan, Montville Thomas J. Inhibition of Food – Borne Bacterial Pathogens by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991. **57** (6) : 1683 – 1688
42. 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
43. Ajitya Kurnia Hermawati. *Identifikasi Gen gtf pada Koleksi Isolat BAL Penghasil Eksopolisakarida dari beberapa makanan dan minuman tradisional dengan teknik Polymerase Chain Reaction*. Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok, 2008
44. Reimer G & Carrol K. C. Procedures for the Storage of Microorganism. *Dalam* : Murray P. R. *Manual of Clinical Microbiology*, 2003 : 5029-5031
45. Martensson, O., M. Duenas-Chasco, A. Irastorza, R. Oste, and O. Holst. Comparison of Growth Characteristics and Exopolysaccharide Formation of Two Lactic Acid Bacteria Strains, *Pediococcus damnosus* 2.6 and *Lactobacillus brevis* G-77 in an Oat-based, Non Dairy Medium. *Swiss Society of Food Science and Technology*, 2003. (36): 353-357

46. Sheilla. *Identifikasi Produk Eksopolisakarida dan Penentuan Viskositas Struktur dari Beberapa Isolat Bakteri Asam Laktat*. Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok, 2007
47. Lisal, Johan.S., Konsep Prebiotik dan Probiotik Untuk Modulasi Mikrobiota Usus Besar. *J.Med Nus*. 2005. **26** (4) : 256-262
48. Anonim. Herbs and Supplement Encyclopedia : Fructooligosaccharides. 1hlm. www.truestarhealth.com. 24 April 2009, pk 05.15 WIB

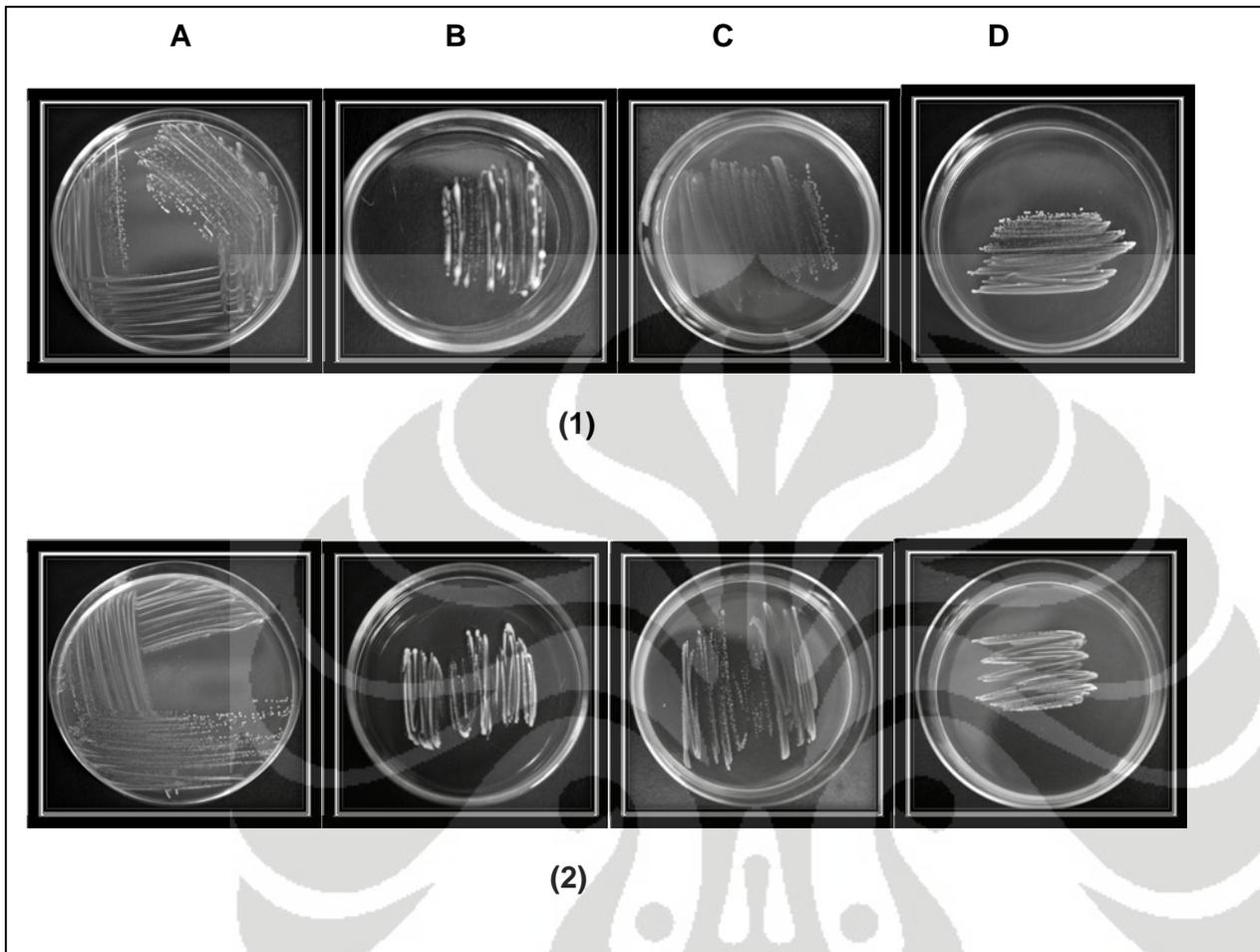




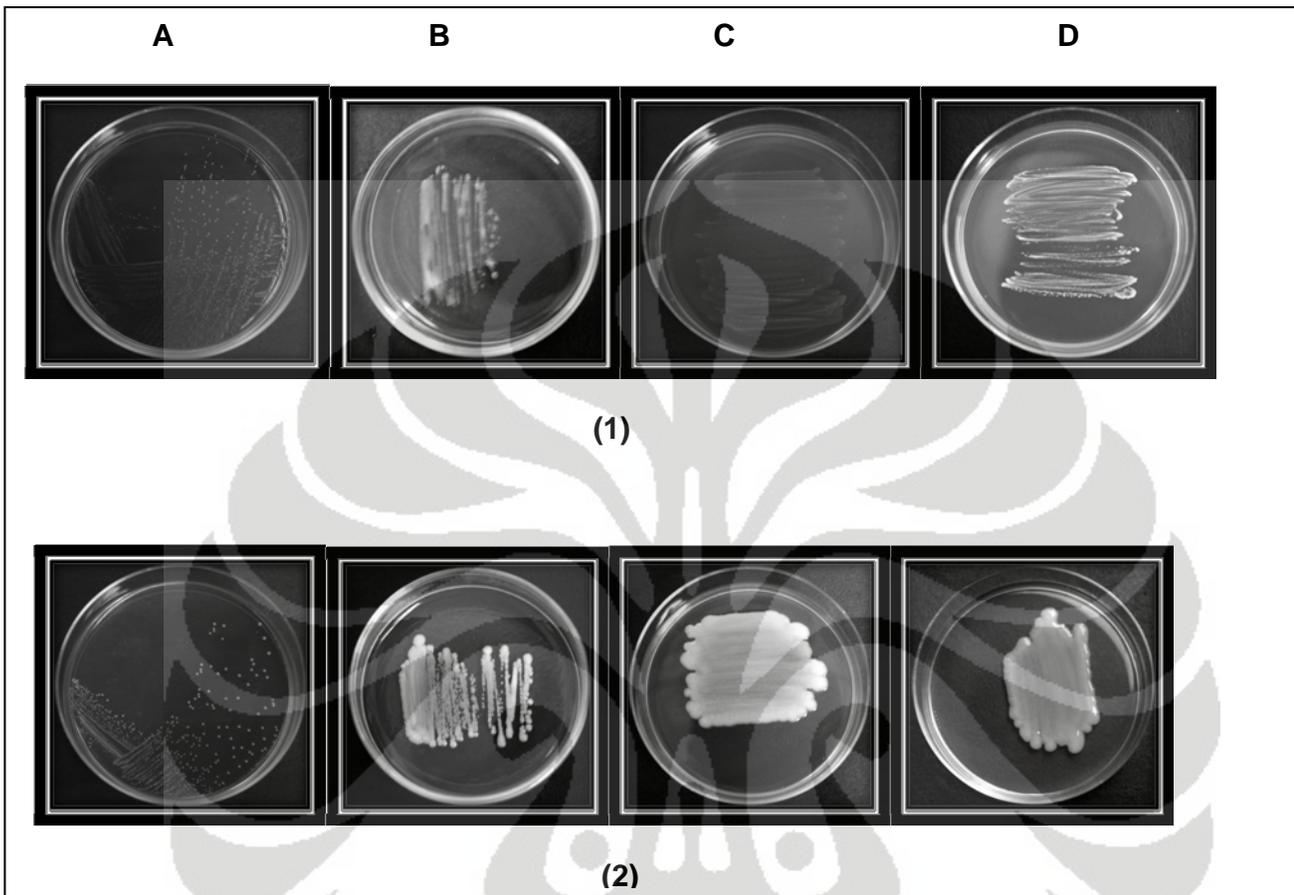
GAMBAR



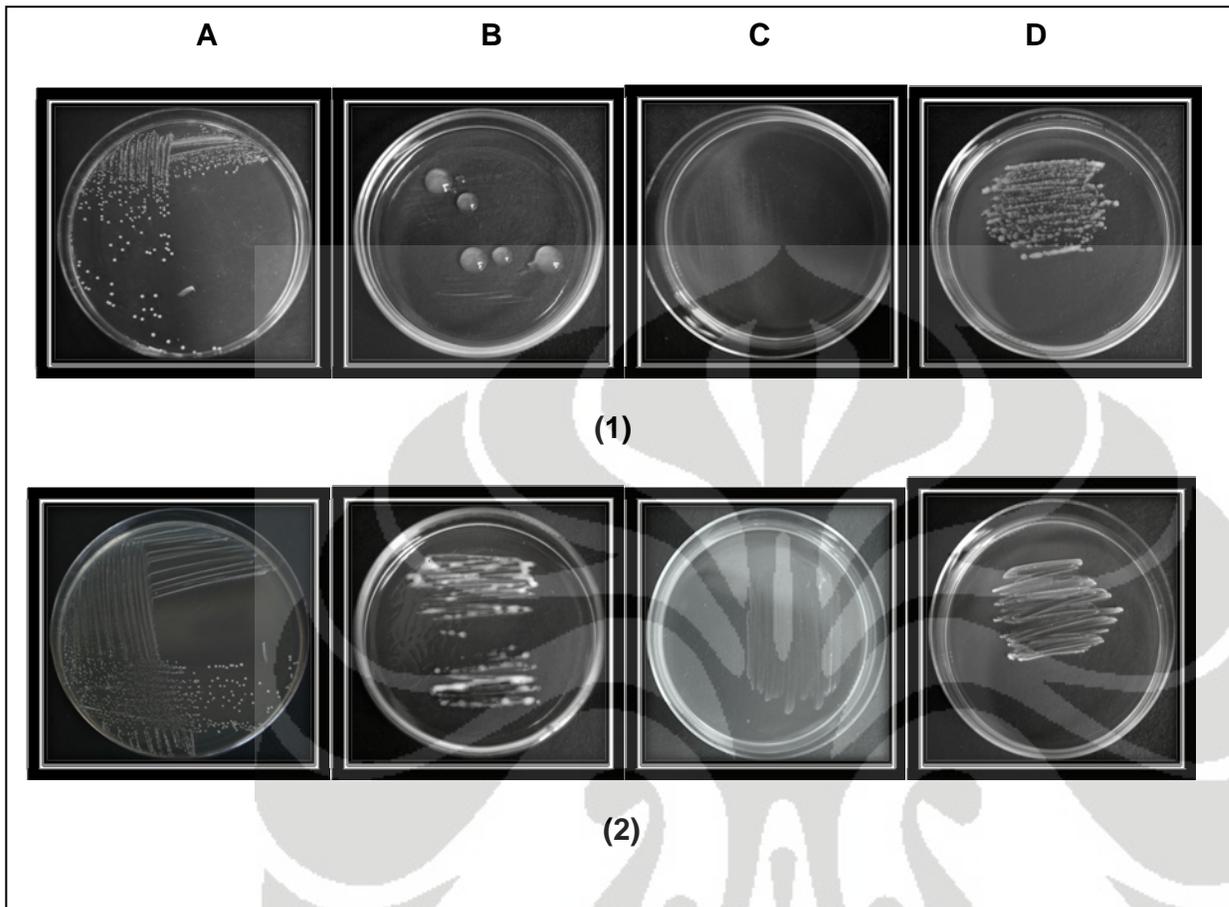
Gambar 2. lendir EPS yang dihasilkan oleh isolat MBF 2-1 (1) dan MBF 2-5 (2) pada medium agar MRS (A), medium agar MRS-sukrosa 10% (B), medium agar MRS-rafinosa 5% (C) dan medium agar MRS- rafinosa 5%- glukosa 1% (D)



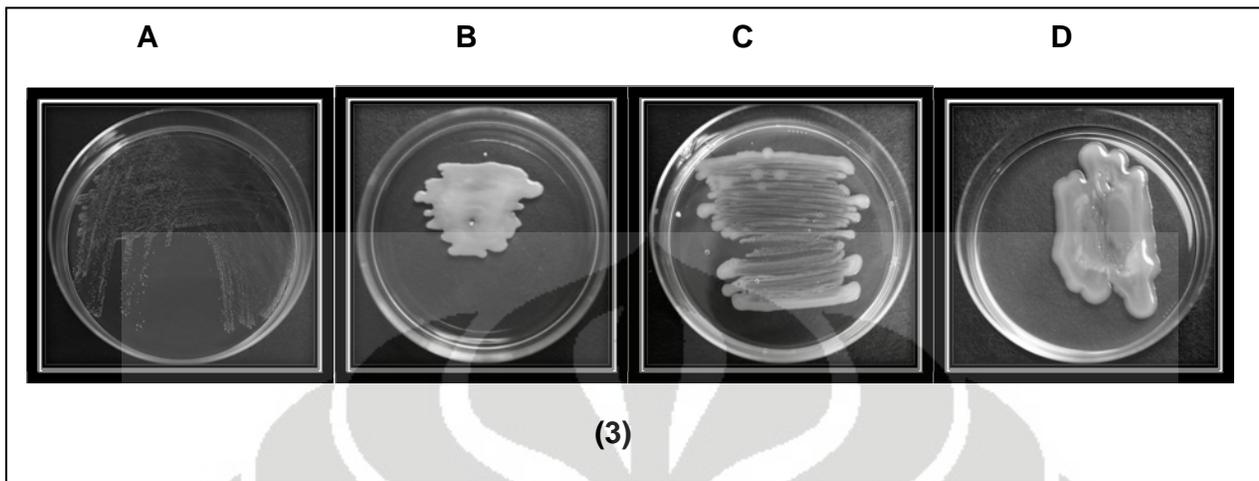
Gambar 3. Lendir EPS yang dihasilkan oleh isolat MBF 3-1 (1) dan MBF 3-2 (2) pada medium agar MRS (A), medium agar MRS-sukrosa 10% (B), medium agar MRS-rafinosa 5% (C) dan medium agar MRS-rafinosa 5%- glukosa 1 % (D)



Gambar 4. Lendir EPS yang dihasilkan oleh isolat MBF 5-9 (1) dan MBF 5-14 (2) pada medium agar MRS, medium agar MRS-sukrosa 10% (B), medium agar MRS-rafinosa 5% (C) dan medium agar MRS-rafinosa 5%- glukosa 1% (D)



Gambar 5. Lendir EPS yang dihasilkan oleh isolat MBF 8-2 (1); isolat MBF 9-2 (2) pada medium agar MRS (A), medium agar MRS-sukrosa 10% (B), medium agar MRS-rafinosa 5% (C) dan medium agar MRS-glukosa 1%-rafinosa 5% (D)



Gambar 5 (lanjutan) : Lendir EPS yang dihasilkan oleh isolat MBF 11-1 (3) pada medium agar MRS (A); medium agar MRS-sukrosa 10% (B), medium agar MRS-rafinosa 5% (C) dan medium agar MRS-glukosa 1%-rafinosa 5% (D)



Tabel 1

Hasil pengamatan bentuk dan warna pigmen morfologi koloni koleksi BAL serta sumber isolat pada medium agar MRS

No	Nama Isolat	Warna Pigmen	Bentuk Koloni	Sumber isolat [39]
		Morfologi Koloni Bakteri	Bakteri	
1	MBF 2-1	Putih kekuningan	Koloni bulat kecil	Asinan
2	MBF 2-2	Putih kekuningan	Koloni bulat kecil	Asinan
3	MBF 2-4	Putih kekuningan	Koloni bulat	Asinan
4	MBF 2-5	Putih kekuningan	Koloni bulat	Asinan
5	MBF 3-1	Putih kekuningan	Koloni bulat	Sekoteng
6	MBF 3-2	Putih kekuningan	Koloni bulat	Sekoteng
7	MBF 3-4	Putih kekuningan	Koloni bulat	Sekoteng
8	MBF 3-5	Putih kekuningan	Koloni bulat	Sekoteng
9	MBF 4-2	Putih kekuningan	Koloni bulat	Tanah
10	MBF 4-9	Putih kekuningan	Koloni bulat	Tanah
11	MBF 5-4	Putih kekuningan	Koloni bulat kecil	Tanah
12	MBF 5-6	Putih kekuningan	Koloni bulat	Tanah
13	MBF 5-9	Putih kekuningan	Koloni bulat	Tanah
14	MBF 5-14	Putih kekuningan	Koloni bulat	Tanah
15	MBF 6-9	Putih kekuningan	Koloni bulat kecil	Tanah
16	MBF 6-13	Putih kekuningan	Koloni bulat	Tanah

Tabel 1 (lanjutan)

Hasil pengamatan bentuk dan warna pigmen morfologi koloni koleksi BAL serta sumber isolat pada medium agar MRS

No	Nama Isolat	Warna Pigmen	Bentuk Koloni	Sumber Isolat
		Morfologi Koloni	Bakteri	[39]
		Bakteri		
17	MBF 7-4	Putih kekuningan	Koloni bulat	Tanah
18	MBF 7-5	Putih kekuningan	Koloni bulat	Tanah
19	MBF 7-8	Putih kekuningan	Koloni bulat	Tanah
20	MBF 7-15	Putih kekuningan	Koloni bulat	Tanah
21	MBF 7-17	Putih kekuningan	Koloni bulat	Tanah
22	MBF 8-1	Putih kekuningan	Koloni bulat	Susu kedelai
23	MBF 8-2	Putih kekuningan	Koloni bulat	Susu kedelai
24	MBF 9-1	Putih kekuningan	Koloni bulat kecil	Ampas tahu
25	MBF 9-2	Putih kekuningan	Koloni bulat	Ampas tahu
26	MBF 10-2	Putih kekuningan	Koloni bulat kecil	Ampas tahu
27	MBF 11-1	Putih kekuningan	Koloni bulat kecil	Ampas kecap
28	MBF 11-2	Putih kekuningan	Koloni bulat kecil	Ampas kecap

Tabel 2

Hasil pengamatan lendir EPS pada medium agar modifikasi MRS-sukrosa 10%

No	Nama Isolat	Produksi EPS
1	MBF 2-1	++
2	MBF 2-2	+++
3	MBF 2-4	++
4	MBF 2-5	++
5	MBF 3-1	++
6	MBF 3-2	+++
7	MBF 3-4	++
8	MBF 3-5	++
9	MBF 4-2	+++
10	MBF 4-9	+++
11	MBF 5-4	+++
12	MBF 5-6	++
13	MBF 5-9	++
14	MBF 5-14	+++
15	MBF 6-9	++
16	MBF 6-13	++
17	MBF 7-4	++

Tabel 2 (lanjutan)

Hasil pengamatan lendir EPS pada medium agar modifikasi MRS-sukrosa 10%

No	Nama Isolat	Produksi EPS
18	MBF 7-5	+++
19	MBF 7-8	+
20	MBF 7-15	+++
21	MBF 7-17	++
22	MBF 8-1	+++
23	MBF 8-2	+++
24	MBF 9-1	++
25	MBF 10-2	++
26	MBF 11-1	+++
27	MBF 11-2	++
28	MBF 9-2	++

Keterangan :

+++ : Banyak

++ : Sedang

+ : Sedikit

Tabel 3

Hasil pengamatan lendir EPS pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5%

No	Nama Isolat	Hasil Verifikasi menggunakan medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5%
1	MBF 2-1	++
2	MBF 2-2	+/-
3	MBF 2-4	+/-
4	MBF 2-5	+/-
5	MBF 3-1	+/-
6	MBF 3-2	+
7	MBF 3-4	+/-
8	MBF 3-5	+/-
9	MBF 4-2	+++
10	MBF 4-9	+++
11	MBF 5-4	+/-
12	MBF 5-6	+/-
13	MBF 5-9	+/-
14	MBF 5-14	+++
15	MBF 6-9	+/-
16	MBF 6-13	+++
17	MBF 7-4	+/-

Tabel 3 (lanjutan)

Hasil pengamatan lendir EPS pada medium agar modifikasi MRS-rafinosa 5%

No	Nama Isolat	Hasil Verifikasi menggunakan medium agar modifikasi MRSA-rafinosa 5%
18	MBF 7-5	+++
19	MBF 11-2	+/-
20	MBF 7-8	+++
21	MBF 7-15	+++
22	MBF 7-17	+/-
23	MBF 8-1	+/-
24	MBF 8-2	-
25	MBF 9-1	+++
26	MBF 9-2	+/-
27	MBF 10-2	++
28	MBF 11-1	+++

Keterangan :

- +++ : Banyak
- ++ : Sedang
- + : Sedikit
- +/- : Pertumbuhan tidak sempurna
- : Tidak ada pertumbuhan



Tabel 4

Hasil pengamatan lendir EPS pada medium agar MRS-glukosa1%-rafinosa %

No	Nama Isolat	Hasil Verifikasi menggunakan medium agar modifikasi MRS-glukosa 1%-rafinosa 5%
1	MBF 2-1	++
2	MBF 2-2	+
3	MBF 2-4	+
4	MBF 2-5	++
5	MBF 3-1	+
6	MBF 3-2	+
7	MBF 3-4	+
8	MBF 3-5	++
9	MBF 4-2	+++
10	MBF 4-9	+++
11	MBF 5-4	+++
12	MBF 5-6	+
13	MBF 5-9	++
14	MBF 5-14	+++
15	MBF 6-9	++
16	MBF 6-13	+++
17	MBF 7-4	+

Tabel 4 (lanjutan)

Hasil pengamatan lendir EPS pada medium agar MRS-glukosa 1%-rafinosa 5%

No	Nama Isolat	Hasil verifikasi menggunakan medium agar modifikasi MRS-glukosa 1%-rafinosa 5%
18	MBF 7-5	+++
19	MBF 11-2	+
20	MBF 7-8	++
21	MBF 7-15	+++
22	MBF 7-17	++
23	MBF 8-1	+
24	MBF 8-2	++
25	MBF 9-1	+++
26	MBF 9-2	+
27	MBF 10-2	+++
28	MBF 11-1	+++

Keterangan :

+++ : banyak

++ : sedang

+ : sedikit

Tabel 5

Korelasi hasil pengamatan penelitian yang dilakukan dengan data hasil penelitian sebelumnya

No	Nama Isolat	Lendir EPS pada Berbagai medium			Hasil penelitian sebelumnya		
		Bentuk koloni bakteri pada MRSA	Modifikasi MRS-sukrosa 10%	Modifikasi MRS-rafinosa 5%	Modifikasi MRS-glukosa 1%-rafinosa 5%	Hasil PCR untuk gen sukrase [8]	Hasil analisis HPLC lendir EPS [46]
1	MBF 2-1	Koloni bulat kecil	++	++	++	<i>gtf</i>	BD
2	MBF 2-2	Koloni bulat kecil	+++	+/-	+	<i>gtf</i>	BD
3	MBF 2-4	Koloni bulat	++	+/-	+	BD	BD
4	MBF 2-5	Koloni bulat	++	+/-	++	<i>gtf</i>	Glukan
5	MBF 3-1	Koloni bulat	++	+/-	+	<i>gtf</i>	Glukan dan fruktan
6	MBF 3-2	Koloni bulat	+++	+	+	<i>gtf</i>	Glukan dan fruktan
7	MBF 3-4	Koloni bulat	++	+/-	+	BD	BD

Tabel 5 (lanjutan)

Korelasi hasil pengamatan penelitian yang dilakukan dengan data hasil penelitian sebelumnya

No	Nama Isolat	Lendir EPS pada berbagai medium agar			Hasil penelitian sebelumnya		
		Bentuk koloni bakteri pada MRSA	Modifikasi MRS-sukrosa 10%	Modifikasi MRS-rafinosa 5%	Modifikasi MRS-glukosa 1%-rafinosa 5%	Hasil PCR untuk gen sukrase [8]	Hasil analisis HPLC lendir EPS [46]
8	MBF 3-5	Koloni bulat	++	+/-	++	<i>gtf</i>	BD
9	MBF 4-2	Koloni bulat	+++	+++	+++	BD	BD
10	MBF 4-9	Koloni bulat	+++	+++	+++	BD	BD
11	MBF 5-4	Koloni bulat kecil	+++	+/-	+++	BD	BD
12	MBF 5-6	Koloni bulat	++	+/-	+	BD	BD
13	MBF 5-9	Koloni bulat	++	+/-	++	<i>gtf</i>	BD
14	MBF 5-14	Koloni bulat	+++	+++	+++	<i>gtf</i>	BD

Tabel 5 (lanjutan)

Korelasi hasil pengamatan penelitian yang dilakukan dengan data hasil penelitian sebelumnya

No	Nama Isolat	Lendir EPS pada berbagai medium agar			Hasil penelitian sebelumnya		
		Bentuk koloni bakteri pada MRSA	Modifikasi MRS-sukrosa 10%	Modifikasi MRS-rafinosa 5%	Modifikasi MRS-glukosa 1%-rafinosa 5%	Hasil PCR untuk gen sukrase [8]	Hasil analisis HPLC lender EPS [46]
15	MBF 6-9	Koloni bulat kecil	++	+/-	++	<i>gtf</i>	BD
16	MBF 6-13	Koloni bulat	++	+++	+++	<i>gtf</i>	BD
17	MBF 7-4	Koloni bulat	++	+/-	+	BD	BD
18	MBF 7-5	Koloni bulat	+++	+++	+++	BD	BD
19	MBF 7-8	Koloni bulat	+	+++	++	BD	BD
20	MBF 7-15	Koloni bulat	+++	+++	+++	BD	BD
21	MBF 7-17	Koloni bulat	++	+/-	++	<i>gtf</i>	BD

Tabel 5 (lanjutan)

Korelasi hasil pengamatan penelitian yang dilakukan dengan data hasil penelitian sebelumnya

No	Nama Isolat	Lendir EPS pada berbagai medium agar			Hasil penelitian sebelumnya		
		Bentuk koloni bakteri Pada MRSA	modifikasi MRS-sukrosa 10%	modifikasi MRS-rafinosa 5%	modifikasi MRS-glukosa 1%-rafinosa 5%	Hasil PCR untuk gen <i>sukrase</i> [8]	Hasil analisis HPLC lendir EPS [46]
22	MBF 8-1	Koloni bulat	+++	+/-	+	<i>gtf</i>	Glukan dan fruktan
23	MBF 8-2	Koloni bulat	+++	-	++	<i>gtf</i>	Glukan dan fruktan
24	MBF 9-1	Koloni bulat kecil	++	+++	+++	BD	BD
25	MBF 9-2	Koloni bulat	++	+/-	+	<i>gtf</i>	Glukan
26	MBF 10-2	Koloni bulat kecil	++	++	+++	<i>gtf</i>	BD
27	MBF 11-1	Koloni bulat kecil	+++	+++	+++	BD	BD
28	MBF 11-2	Koloni bulat kecil	++	+/-	+	BD	BD

Keterangan :

+++ : banyak

++ : sedang

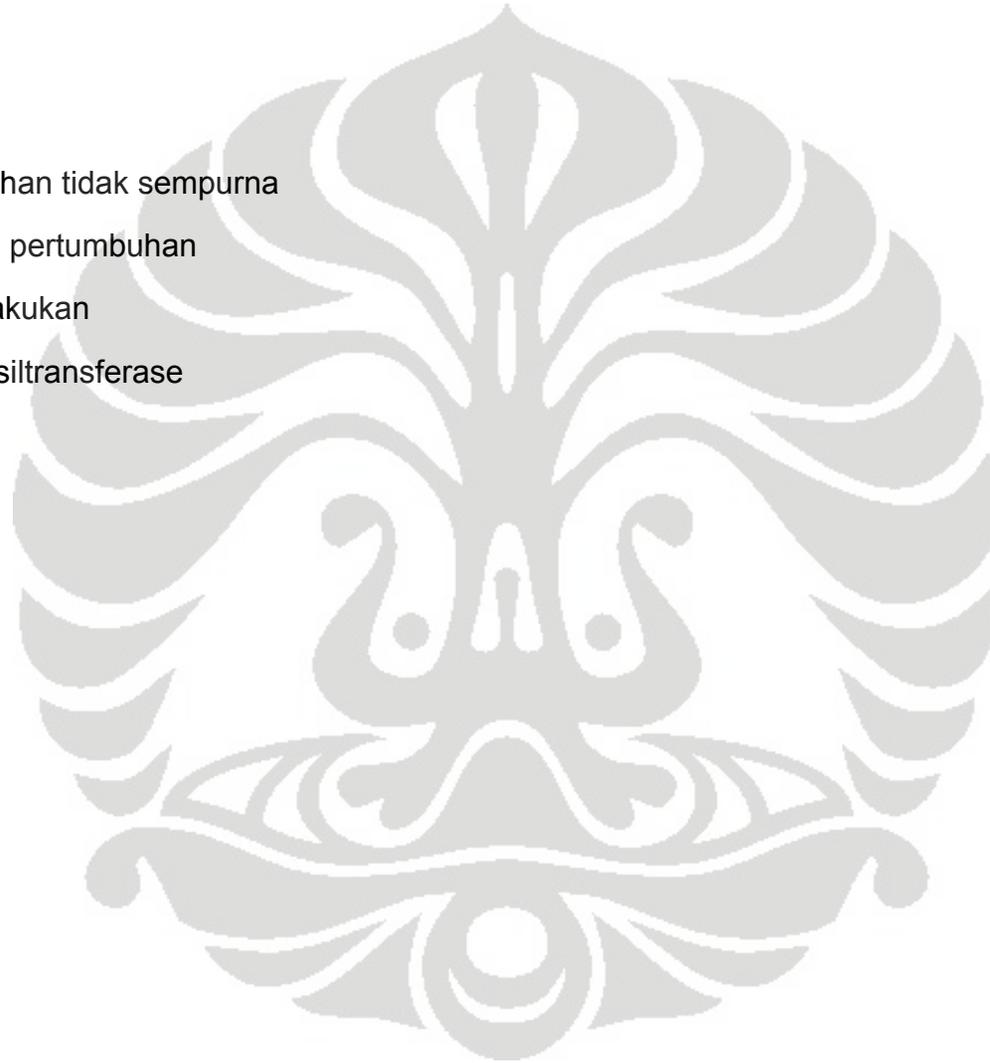
+ : sedikit

+/- : pertumbuhan tidak sempurna

- : Tidak ada pertumbuhan

BD : Belum dilakukan

gtf : gen glukosiltransferase





LAMPIRAN

Lampiran 1
Komposisi Medium

Medium de Man Rogosa Sharpe (MRS) [Pronadisa] (44)

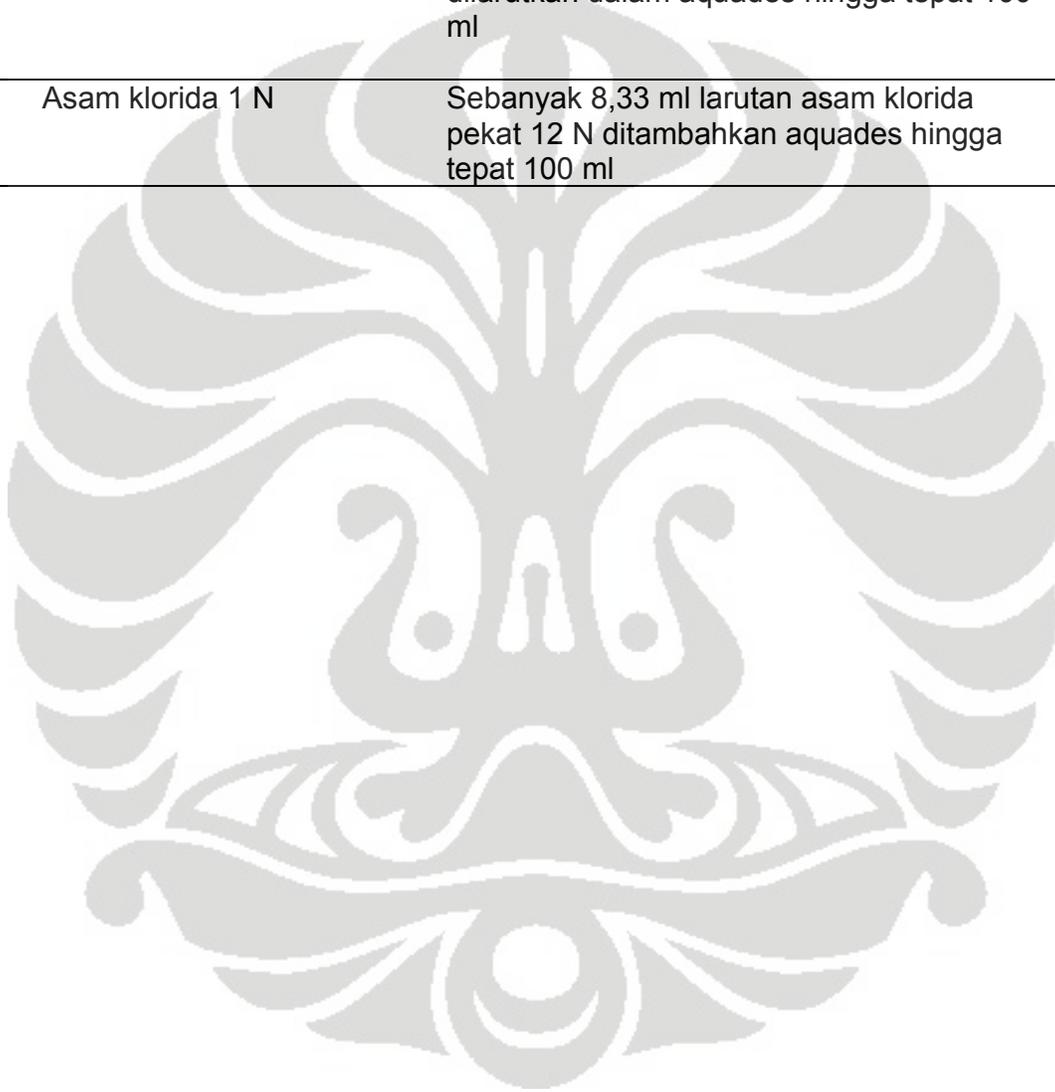
Setiap 1 L mengandung :

Peptone from casein	10,0 gram
Meat extract	8,0 gram
Yeast extract	4,0 gram
Dextrose	20,0 gram
Dipotassium hydrogen phosphate	2,0 gram
Tween 80	1,0 gram
di-Ammonium hydrogen citrate	2,0 gram
Sodium acetate	5,0 gram
Magnesium sulfate	0,2 gram
Manganese sulfate	0,04 gram

Lampiran 2

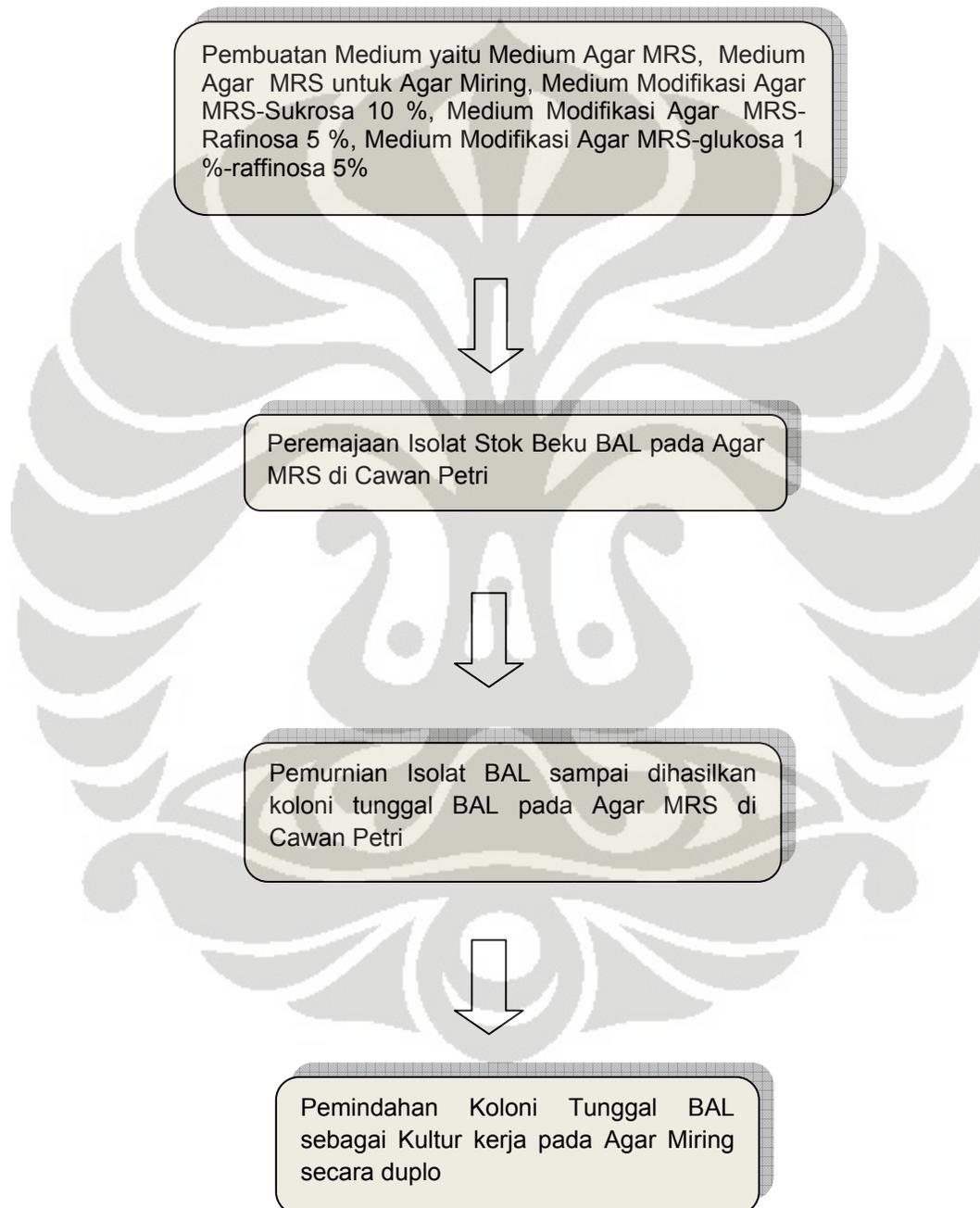
Cara pembuatan reagen yang digunakan dalam penelitian

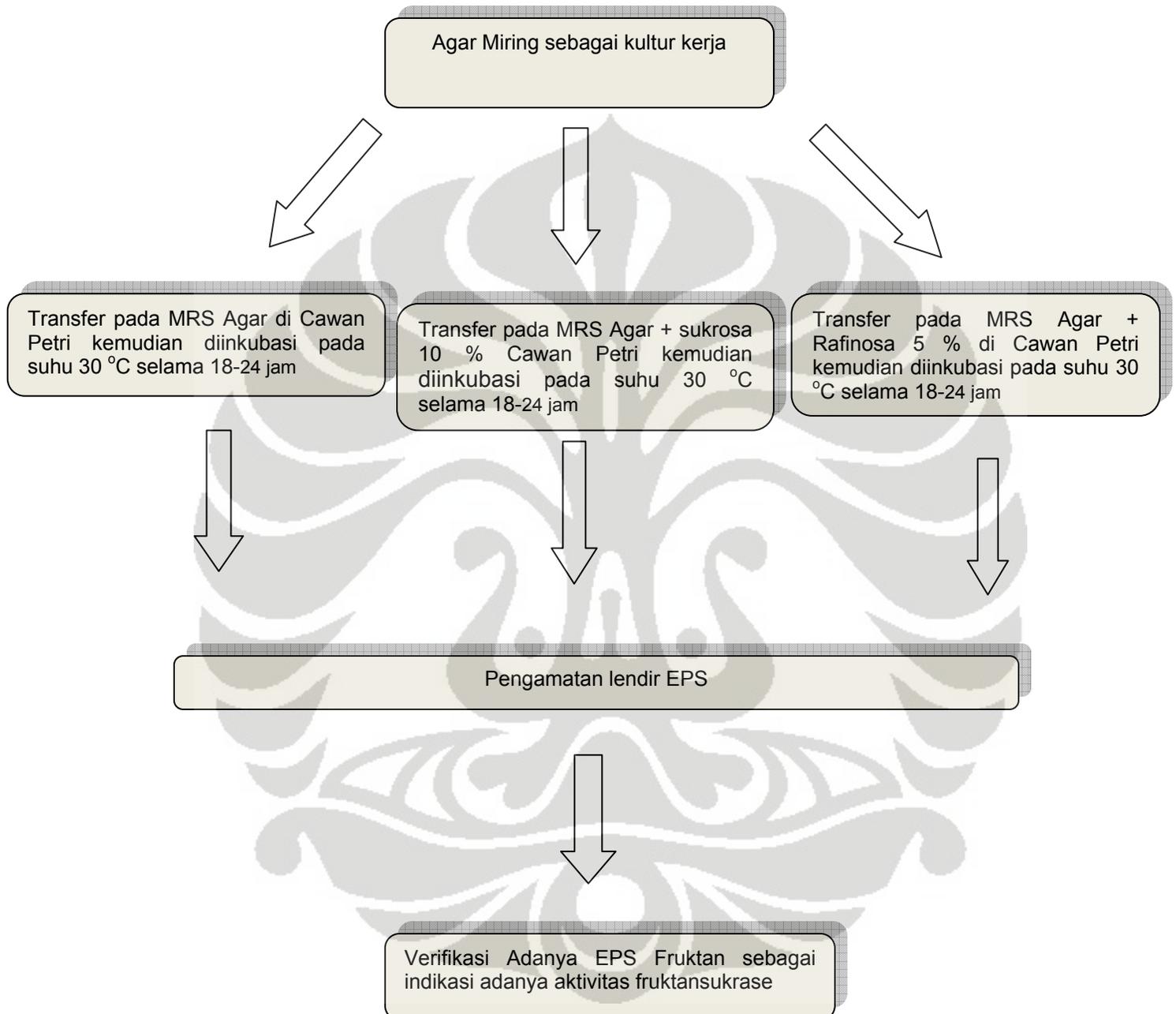
No	Nama Reagen	Cara Pembuatan
1	Natrium hidroksida 1 N	Sebanyak 4 gram natrium hidroksida dilarutkan dalam aquades hingga tepat 100 ml
2	Asam klorida 1 N	Sebanyak 8,33 ml larutan asam klorida pekat 12 N ditambahkan aquades hingga tepat 100 ml



Lampiran 3

Skema alur kerja pada penelitian



Uji Pengamatan Visual

Verifikasi Uji Pada Rafinosa