

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Eksopolisakarida (EPS)

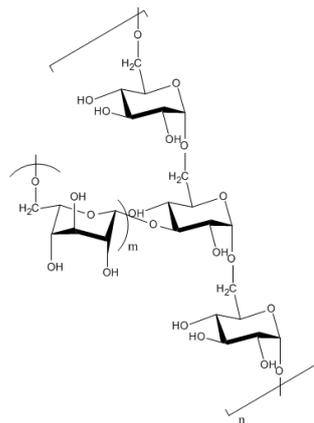
Eksopolisakarida (EPS) merupakan polimer dari gula pereduksi dengan berat molekul tinggi yang disekresikan oleh mikroorganisme ke lingkungan eksternalnya. Polimer ini merupakan salah satu polimer yang mampu disintesis oleh bakteri asam laktat. EPS umumnya terdiri dari monosakarida dan beberapa substituen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

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

Struktur eksopolisakarida sangat beragam, beberapa jenis eksopolisakarida antara lain :

1. Dekstran

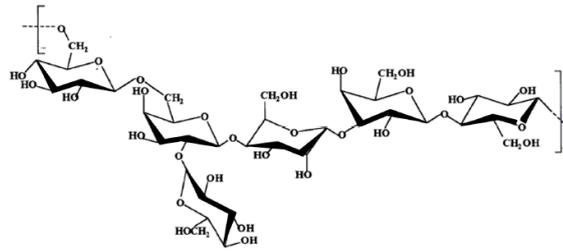
Dekstran merupakan polimer kompleks dari glukosa yang mengalami percabangan dengan membentuk ikatan α -1,6 dan α -1,3 glikosidik. Dekstran yang di biosintesis oleh bakteri asam laktat memiliki berat molekul yang besar antara 10-150 kDa. Dalam bidang kesehatan dekstran memiliki fungsi yang beragam seperti anti inflamasi, anti trombotik, anti koagulan, hingga memiliki peran yang penting sebagai intraarterial dan intravenous (Veronese and Caliceti, 2006).



Gambar 1. Struktur Dextran (Lapasin, 1999)

2. Kefiran

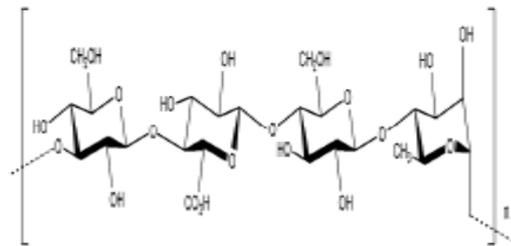
Kefiran merupakan kapsular polisakarida yang diproduksi oleh strain *Lactobacillus* pada pembuatan susu fermentasi kefir. Struktur polimer kefiran dibentuk dari monomer D-glukosa atau heteropolisakarida D-galaktosa yang mengalami percabangan pada dua unit rantai serta delapan unit rantai. Polimer ini menunjukkan aktivitas anti bakteri, anti jamur, dan anti kanker (Vu *et al.*, 2009).



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

3. Gellan

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

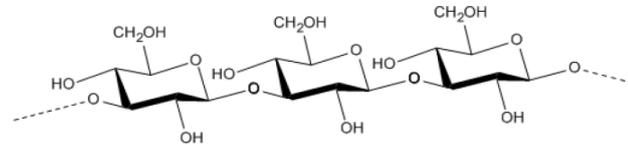


Gambar 3. Struktur Gellan (Lapasin, 1999)

4. Curdlan

Curdlan merupakan polimer linier yang terbentuk dari ikatan β -1,3 glikosidik dari D-glukosa. Polimer ini bersifat sangat larut dalam air. Curdlan dapat dihasilkan dari bakteri strain *Alcaligenes faecalis* dan juga *Agrobacterium*. Keunikan curdlan adalah sifat gelnya yang elastis ketika dipanaskan pada suhu di atas 55°C, sehingga sering digunakan untuk memperbaiki tekstur makanan dan dalam bidang

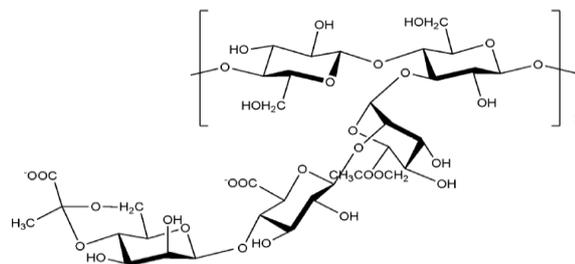
farmasi dijadikan sebagai polimer yang berfungsi sebagai eksipien *drug delivery* (Rehm, 2009; Gumadi *et al.*, 2005).



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

5. Xanthan

Xanthan merupakan heteropolimer anionik yang disusun oleh glukosa dengan rantai samping trisakarida dari α -D-manosa yang memiliki gugus asetil. Xanthan diproduksi oleh strain *Xanthomonas* dengan berat molekul yang sangat besar (Rehm, 2009). Sifat yang ditunjukkan xanthan adalah pseudoplastik dan pengemulsi yang stabil, sehingga kegunaannya sangat luas dibidang industri makanan, kosmetik, maupun farmasi (Sutherland, 1998).

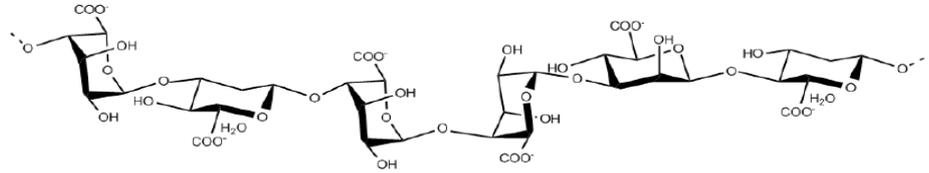


Gambar 5. Struktur Xanthan (Sutherland, 2001)

6. Alginat

Alginat merupakan homopolimer linier dari kopolimer D-manuronat yang membentuk ikatan β -1,4-glikosidik dan epimer α -L-glukoronat. Alginat banyak ditemukan pada tumbuh-tumbuhan terutama rumput laut. Dalam bidang farmasi alginat digunakan untuk eksipien (*gavicsan*, *bisodol* dan *asilone*) dan dapat

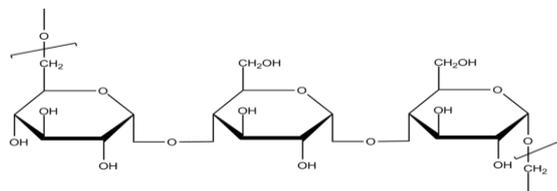
membentuk gel yang stabil. Sediaan bahan obat yang banyak beredar di pasaran adalah kalsium alginat (Raymond, 2009).



Gambar 6. Struktur Alginat (Ertesvag, 1998)

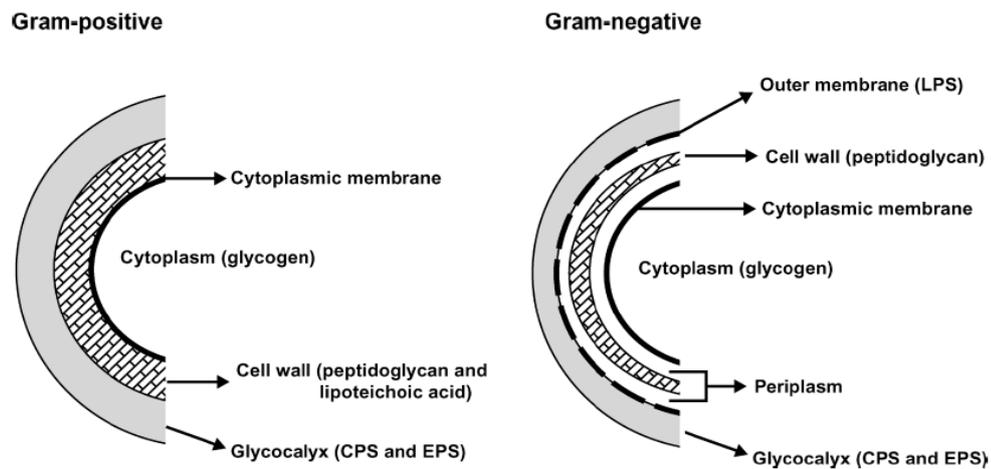
7. Pullulan

Pullulan merupakan polimer yang tersusun atas unit maltotriosa. Ikatan yang terdapat pada unit maltotriosa adalah α -1,4-glikosidik, sedangkan unit-unit maltotriosa dihubungkan dengan ikatan α -1,6-glikosidik. Penggunaan pullulan yang paling dikenal adalah pada produk-produk yang berhubungan dengan penyegar dan pembersih mulut (Raymond, 2009).



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

Polisakarida disekresikan ke permukaan sel atau dilepaskan ke lingkungannya bersamaan dengan senyawa lipoprotein gabungan keduanya dikenal sebagai glikokaliks (Ruas-Madiedo and Reyes-Gavila'n, 2005). EPS sebenarnya melekat pada permukaan sel tetapi terjadi akumulasi yang berlebihan sehingga polimer ini dapat diperoleh pada media cair pertumbuhan mikroba. Gambaran letak EPS pada permukaan sel bakteri gram positif dan negatif dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Letak senyawa glikokaliks yang merupakan gabungan antara lipoprotein (CPS) dan eksopolisakarida (EPS) pada bakteri gram positif (kiri) dan bakteri gram negatif (kanan) (Ruas-Madiedo and Reyes-Gavila'n, 2005)

B. Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus* termasuk golongan organisme *food-grade* yang memiliki status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) dan diketahui memproduksi sejumlah jenis molekul ekstraseluler polisakarida (EPS) yang berkontribusi untuk tekstur pada makanan fermentasi. EPS dibagi dua golongan yaitu homopolisakarida dan heteropolisakarida. EPS dari bakteri ini memungkinkan pengembangan generasi baru dari *food-grade* polisakarida. Bakteri asam laktat juga sering berkontribusi positif pada rasa, bau, atau preservasi dari produk akhir (van Hijum *et al.*, 2002; de Vuyst *et al.*, 2001). Beberapa jenis bakteri asam laktat penghasil EPS yang telah diteliti oleh beberapa peneliti kurun waktu 10 tahun terakhir dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Bakteri Asam Laktat yang Diteliti Mampu Menghasilkan EPS

Strain Bakteri	Karakteristik EPS	Referensi
a) <i>Bacillus megaterium</i>	a) Glc, Man, Gal, Glc-a	Kwon <i>et al.</i> , 2002
b) <i>Stapylococcus saprophyticus</i>	b) Glc, Gal	
c) <i>Mirococcus luteus</i>	c) Glc, Gal, Rib	
d) <i>Agrobacterium vitis</i>	d) Glc, Gal, Xyl	
a) <i>Lactobacillus</i> MR-1	a) 100% glukosa	Savadogo <i>et al.</i> , 2004
b) <i>Lactobacillus</i> MR-3	b) 99,18% galaktosa, 0,80% glukosa	
c) <i>Lactobacillus</i> MR-17	c) 32,56% manosa, 36,42% ramnosa, 30,41% fruktosa	
a) <i>L. Casei</i> CRL87	a) Glc, Gal, Rha (2:1:4)	Mozzi <i>et al.</i> , 2006
b) <i>L. Paracasei</i> CRL72	b) Glc, Gal, GlcN, GalN (1:1,5:1:1,5)	
c) <i>L. Rhamnosus</i> CRL627	c) Glc, Gal, Rha (3:1:1)	
a) <i>L. reuteri</i> MBI-C42	a) Glc, Fruc (1:0,8)	Semnojov <i>et al.</i> , 2008
b) <i>L. reutei</i> MBI-C43	b) Glc, Fruc (1:2,1)	
c) <i>L. panis</i> MBI-V35	c) Glc, Fruc (1:2,9)	
<i>Salipiger mucococcus</i> A3	Heteropolysaccharide: 19,70% Glucose, 34,00% Mannose, 32,90% Galactose, 13,40% Fructose. BM 250 kDa	Llamas <i>et al.</i> , 2010

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

selama masa inkubasi 18 jam masing-masing 255 mg/L, 224 mg/L, dan 174 mg/L (Yuksekdag and Salim, 2008). Xu *et al.* (2010) menggunakan media modifikasi yang dinamakan *Chemically Defined Medium* (CDM) yang mengandung 50 g/L sukrosa dan beberapa mineral menghasilkan EPS sebesar 238,23 mg/L selama fermentasi 48 jam menggunakan isolat *L. paracasei*. Beberapa kondisi fermentasi untuk menghasilkan EPS disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Kondisi Fermentasi untuk Menghasilkan EPS

Strain Bakteri	Karakter Fermentasi	Produk EPS	Referensi
a) <i>Lactobacillus</i> MR-1	Konsentrasi glukosa	a) 219 mg/L	Savadogo <i>et al.</i> , 2004
b) <i>Lactobacillus</i> MR-3	20 g/L dan laktosa	b) 322 mg/L	
c) <i>Lactobacillus</i> MR-17	75 g/L, pH tidak diketahui, waktu inkubasi 24 jam	c) 357 mg/L	
a) <i>L. casei</i> CRL87	Konsentrasi sukrosa	a) 6,0 g/L	Mozzi <i>et al.</i> , 2006
b) <i>L. paracasei</i> CRL72	120 g/L, pH tidak diketahui, waktu inkubasi 72 jam	b) 5,4 g/L	
c) <i>L. rhamnosus</i> CRL627		c) 8,6 g/L	
<i>Pedococcus parvulus</i> 2.6	Konsentrasi glukosa 75 g/L, pH 5,20, waktu inkubasi 120 jam	1,08 g/L	Velasco <i>et al.</i> , 2006
a) <i>L. delbrueckii</i> B3	Konsentrasi glukosa	a) 255 mg/L	Yuksekdag and Salim, 2008
b) <i>L. bulgaris</i> G12	30 g/L, pH tidak diketahui, waktu inkubasi 18 jam	b) 224 mg/L	
c) <i>Streptococcus thermophilus</i> W22		c) 174 mg/L	
<i>L. paracasei</i>	Media CDM dengan kandungan sukrosa 50 g/L dan mineral, pH 6,70, waktu inkubasi 48 jam	238,23 mg/L	Xu <i>et al.</i> , 2010

Sumber karbon yang digunakan pada penelitian tersebut merupakan gula-gula komersial. Sumber gula yang melimpah sebenarnya terdapat pada polimer

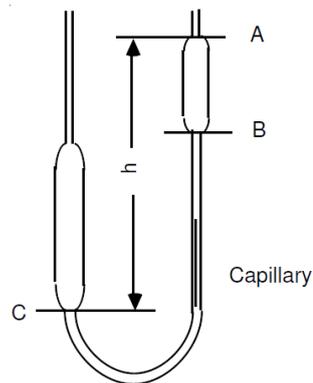
lignoselulosa yang banyak terdapat pada limbah pertanian. Satria dkk. (2010) melakukan degradasi lignoselulosa dari jerami padi menggunakan isolat *Actinomyces* AcP-1 dan AcP-7 dan berhasil memperoleh kandungan gula pereduksi total sebesar masing-masing dengan kisaran 20,65-27,51 g/L dan 20,98-22,80 g/L dengan fermentasi fase padat. Sementara penelitian lanjutan (belum dipublikasikan) menggunakan fermentasi cair dengan kandungan substrat jerami padi sebesar 30% mampu menghasilkan gula pereduksi total pada kisaran 50,55-67,45 g/L. Sumber gula ini berpotensi untuk digunakan sebagai sumber media yang dapat menghasilkan EPS menggunakan isolat-isolat bakteri asam laktat isolat lokal yang sedang dikerjakan.

C. Viskositas

Viskositas adalah ukuran kekentalan fluida yang menyatakan besar-kecilnya gesekan di dalam fluida. Semakin besar viskositas fluida, maka semakin sulit suatu benda bergerak di dalam fluida tersebut. Di dalam zat cair, viskositas dihasilkan oleh gaya kohesi antara molekul zat cair. Sedangkan dalam gas, viskositas timbul sebagai akibat tumbukan antara molekul gas. Dalam suatu fluida ideal (fluida tidak kental) tidak ada viskositas (kekentalan) yang menghambat lapisan-lapisan fluida ketika lapisan-lapisan tersebut menggeser satu di atas lainnya. Untuk fluida yang sangat kental seperti madu, diperlukan gaya yang lebih besar, sedangkan untuk fluida yang kurang kental (viskositasnya kecil), seperti air, diperlukan gaya yang lebih kecil.

Tingkat kekentalan suatu fluida juga bergantung pada suhu. Semakin tinggi suhu zat cair, semakin kurang kental zat cair tersebut. Sebaliknya, semakin tinggi suhu

suatu zat gas, semakin kental zat gas tersebut. Tingkat kekentalan fluida dinyatakan dengan koefisien viskositas. Jika fluida makin kental maka gaya tarik yang dibutuhkan juga makin besar. Dalam hal ini, gaya tarik berbanding lurus dengan koefisien kekentalan.



Gambar 9. Viskometer Ostwald (Moechtar, 1990).

Viskositas terbagi tiga jenis yaitu viskositas spesifik (η_{sp}), kinematik, dan intrinsik (η). Viskositas spesifik dihitung berdasarkan perbandingan antara kecepatan aliran suatu larutan dengan pelarutnya. Viskositas kinematik diperoleh dengan mempertimbangkan densitas larutan. Viskositas spesifik dan kinematik dipengaruhi oleh konsentrasi larutan. Viskositas intrinsik dihitung dari perbandingan antara viskositas spesifik dengan konsentrasi larutan (η_{sp}/C) di ekstrapolasi sehingga nilai konsentrasi larutan mendekati nol. Dengan demikian nilai kelarutan tidak berpengaruh terhadap viskositas intrinsik (Hwang *et al.*, 1997).

Viskositas dari larutan polimer bergantung pada konsentrasi dan ukuran (berat molekul) dari polimer terlarut. Untuk menghitung viskositas suatu larutan kita harus mengetahui tentang berat molekul larutan polimer tersebut. Teknik pengukuran viskositas ini sangat terkenal karena merupakan eksperimen yang

sederhana. Salah satu alat untuk mengukur viskositas suatu larutan dapat digunakan viskometer sederhana, dengan menghitung waktu alir dan densitas larutan (Parthasarathi, 2011).

D. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan salah satu metode kimia dan fisikokimia. KCKT termasuk metode analisis terbaru yaitu suatu teknik kromatografi dengan fasa gerak cairan dan padat. Banyak kelebihan metode ini jika dibandingkan dengan metode lainnya (Snyder and Kirkland, 1979; Johnson and Stevenson, 1978).

Kelebihan-kelebihan dari KCKT yaitu:

1. Cepat

Waktu analisis umumnya kurang dari 1 jam. Banyak analisis yang dapat diselesaikan sekitar 15-30 menit. Untuk analisis yang tidak rumit, waktu analisis kurang dari 5 menit bisa dicapai.

2. Resolusi

Berbeda dengan kromatografi gas, kromatografi cair mempunyai dua fase dimana interaksi selektif dapat terjadi. Pada kromatografi gas, gas yang mengalir sedikit berinteraksi dengan zat padat, pemisahan terutama dicapai hanya dengan fase diam. Kemampuan zat padat berinteraksi secara selektif dengan fase diam dan fase gerak pada KCKT memberikan parameter tambahan untuk mencapai pemisahan yang diinginkan.

3. Sensitivitas detektor

Detektor absorpsi UV yang biasa digunakan dalam KCKT dapat mendeteksi kadar dalam jumlah nanogram (10^{-9} g) dari bermacam-macam zat. Detektor-detektor Fluoresensi dan Elektrokimia dapat mendeteksi jumlah sampai pikogram (10^{-12} g). Detektor-detektor seperti Spektrofotometer Massa, Indeks Refraksi, Radiometri, dapat juga digunakan dalam KCKT.

4. Kolom yang dapat digunakan kembali

Berbeda dengan kolom kromatografi klasik, kolom KCKT dapat digunakan kembali. Banyak analisis yang bisa dilakukan dengan kolom yang sama sebelum dari jenis sampel yang diinjeksi, kebersihan dari solven yang digunakan.

5. Ideal untuk zat bermolekul besar dan berionik

Zat-zat yang tidak bisa dianalisis dengan kromatografi gas karena volatilitas rendah, biasanya diderivatisasi untuk menganalisis spesies ionik. KCKT dengan tipe eksklusi dan penukar ion ideal sekali untuk analisis zat-zat tersebut.

6. Sampel dapat diperoleh kembali

Umumnya detektor yang digunakan dalam KCKT tidak menyebabkan *destruktif* (kerusakan) pada komponen sampel yang diperiksa, oleh karena itu komponen sampel tersebut dapat dengan mudah dikumpulkan setelah melewati detektor. Solvennya dapat dihilangkan dengan diuapkan, kecuali untuk kromatografi penukar ion memerlukan prosedur khusus.

Berdasarkan polaritas relatif fasa gerak dan fasa diamnya, KCKT dibagi menjadi dua, yaitu fasa normal yang umumnya digunakan untuk identifikasi senyawa nonpolar sehingga fasa gerak yang digunakan kurang polar dibandingkan fasa diam dan fasa terbalik yang umumnya digunakan untuk identifikasi senyawa polar, menggunakan fasa gerak lebih polar dibandingkan fasa diam (Gritter dkk, 1991). Prinsip pemisahan senyawa menggunakan KCKT adalah perbedaan distribusi komponen diantara fasa diam dan fasa gerak. Semakin lama terdistribusi dalam fasa diam maka semakin lama waktu retensinya (Clark, 2007).