

Produksi β -Glukan dari Dua Galur *Agrobacterium* sp. pada Media Mengandung Kombinasi Molase dan Urasil

Beta Glucan Production from Two Strains of *Agrobacterium* sp in Medium Containing of Molases and Uracil Combine

KUSMIATI¹, SWASONO R.TAMAT², EDDY JUSUF², RIA ISTININGSIH³

¹Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI, Cibinong, Bogor 16911

²Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka, BATAN, Kawasan Puspptek, Serpong, Banten 15310

³Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Srengseng Sawah, Jakarta

Diterima: 30 Oktober 2006. Disetujui: 6 Maret 2007.

ABSTRACT

Production of β -glucan by *Agrobacterium* sp is influenced by the composition of nutrition in the fermentation media. Molases has been used successfully by others in the fermentation media of *S. cerevisiae* to increase the yield of β -glucan, and similarly, uracil has been used in the fermentation media of *Agrobacterium* sp to increase the yield of β -glucan. Investigations to increase the yield of β -glucan by two strains of *Agrobacterium* sp, i.e. A1.5 (reference) and B4.4 (local strain), have been carried out by addition of various combination of molases and uracil into fermentation media, i.e. 5%(v/v) molase-0,05%(b/v) uracil; 5% molase-0,025% uracil; 10% molase-0,05% uracil; and 10% molase-0,025% uracil. The β -1,3-glucan and β -1,2-glucan fractions were separated by extraction method. Beta-glucan concentration was determined as the glucose monomer using the phenol-sulphate spectrophotometric method at 490 nm. The protein content was determined by a modified Lowry-spectrophotometric method at 750 nm. The results showed that all combination of molases and uracil in the fermentation media of *Agrobacterium* sp A1.5 and B4.4 strains have increased both the dry-weight yield of β -glucan (crude) and the β -glucan content, with the highest was in a medium containing 10% molases-0,025% uracil combination. In the above medium, the A1.5 strain produced the highest β -glucan (7,5%) with the lowest protein content (8,4%) in the β -1,3-glucan fraction, while the β -glucan content in the β -1,2-glucan fraction were all lower than in the control media, while the protein content were all higher than in the control media. In the above media, the B4.4 strain produced the highest β -glucan, 7,2% in the β -1,3-glucan fraction, and 13,1% in β -1,2-glucan fraction, while the lowest protein content (8,4%) was in the β -1,3-glucan fraction. In conclusion, fermentation media of *Agrobacterium* sp A1.5 strain or B4.4 strain containing molase and uracil combination have increased both the dry-weight yield of total β -glucan (crude) and the β -glucan content, while reduced the protein content. There is no clear FTIR spectrum difference between supposedly β -1,2-glucan fraction and β -1,3-glucan fraction.

© 2007 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Key words: Beta glucan, *Agrobacterium* sp., Molases, Uracil.

PENDAHULUAN

Saat ini, perkembangan iptek di bidang farmasi dan mikrobiologi telah mencapai tingkat yang cukup tinggi. Hasil metabolisme dari bakteri banyak digunakan sebagai sumber penemuan obat, salah satunya yang sedang banyak diteliti yaitu bakteri tanah *Agrobacterium* sp (Anonim, 1999).

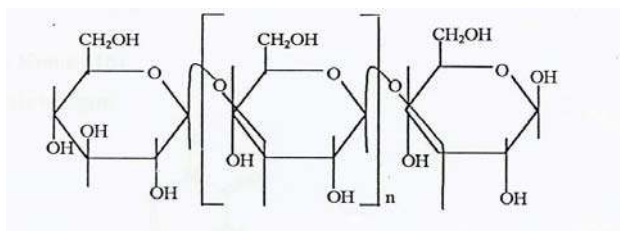
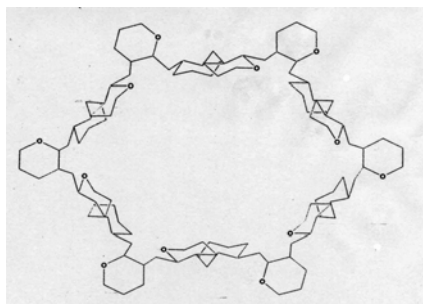
Agrobacterium sp merupakan jenis bakteri Gram negatif bersifat aerobik, dalam metabolismenya dapat menghasilkan senyawa polisakarida ekstraseluler yaitu β -glukan dengan ikatan β -1,3- dan β -1,2-glikosidik. Senyawa ini bermanfaat di bidang industri makanan maupun bidang kesehatan. Beta glukan memiliki bobot molekul tinggi tergolong senyawa homopolisakarida, yaitu polisakarida yang tersusun dari satu jenis gula (Anonim, 2005). Monomer β -glukan yakni D-glukosa (Buchanan *et al*, 1984,

Holt *et al*, 1994).

Struktur dinding sel *Agrobacterium* sp. pada dasarnya sama dengan bakteri Gram negatif lainnya terdiri dari senyawa peptidoglikan yang terdapat pada lapisan sebelah dalam dan jumlahnya sekitar 10 % dari bobot kering sel. Senyawa ini juga sebagai cadangan makanan bagi bakteri. Selain itu dinding sel juga terdiri dari lipopolisakarida (lapisan antara), dan lipoprotein (lapisan luar) (Pelczar & Chan, 1986). β -Glukan selain sebagai bahan tambahan makanan (penstabil makanan, penambah rasa, peningkat tekstur makanan), juga digunakan sebagai pengikat dalam makanan. Dalam dunia farmasi, jenis β -glukan yang banyak digunakan adalah β -1,2-glukan dan β -1,3-glukan. Perbedaan keduanya terletak pada ikatan antara monomer satu dengan monomer lainnya. Monomer pada β -1,2-glukan terikat pada C1 dan C2 monomer lainnya secara siklik, sedangkan monomer pada β -1,3-glukan terikat pada C1 dan C3 monomer lainnya dengan rantai lurus (Gambar 1) (Lippens & Bohin, 2005).

Alamat Korespondensi:

Jl. Raya Bogor Km. 46, Cibinong 16911
Telp.: +62-21-8754587 Fax. +62-21-8754588
Email : kusmiati02@yahoo.com



Gambar 1. Rumus bangun β -1,2-glukan (atas) dan β -1,3-glukan (bawah).

Beta glukosa telah mendapat rekomendasi aman dari *Food and Drug Administration (FDA)* untuk dikonsumsi manusia. Berbagai penelitian mengungkapkan bahwa β -glukan yang dikonsumsi dapat memberikan efek pengobatan antara lain sebagai antioksidan, antikolesterol, perlindungan terhadap radiasi, antipenuaan dan juga sebagai antitumor (Spicer *et al.*, 2005; Lee, 2005).

Beta glukosa merupakan suatu homopolisakarida yang dapat disintesis oleh jamur, alga, khamir maupun bakteri. Senyawa ini dapat diekstraksi dan dipisahkan dari hasil fermentasi biakan murni bakteri *Agrobacterium sp.* (Hisamatsu *et al.*, 1977; Breedveld *et al.*, 1990). Optimalisasi produksi β -glukan dapat dilakukan dengan berbagai cara antara lain melalui peningkatan kemampuan galur potensial secara mutagenesis (genetik). Selain itu juga melalui modifikasi media fermentasi dengan mengkombinasikan bahan media yang digunakan (Stone & Clark, 1992).

Peningkatan pembentukan β -glukan diharapkan dapat dilakukan melalui kombinasi senyawa dalam media fermentasi, antara lain molase dan urasil. Molase yang mengandung nutrisi cukup tinggi untuk kebutuhan bakteri, telah dijadikan bahan alternatif untuk pengganti glukosa sebagai sumber karbon dalam media fermentasi *Agrobacterium sp.* (Paturau, 1969). Penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa kadar molase 8% dalam media fermentasi dapat meningkatkan produksi β -glukan (Isnaini, 2005). Sedangkan urasil merupakan sumber nitrogen yang berguna bagi pertumbuhan sel bakteri karena urasil berfungsi sebagai prekursor pembentukan senyawa UDP-glukosa sebagai aktivator pembentukan senyawa β -glukan (Salmah, 2006).

Pada penelitian ini dilakukan usaha peningkatan produksi β -1,3-glukan dan β -1,2-glukan menggunakan media fermentasi yang mengandung kombinasi molase sebagai sumber karbon dan urasil sebagai sumber nitrogen pada beberapa perbandingan konsentrasi, untuk pertumbuhan dua galur *Agrobacterium sp.*, yaitu galur A1.5 (referensi) dan B4.4 (mutan lokal). Kandungan β -1,3-glukan dan β -1,2-glukan dalam produk ditentukan sebagai kadar glukosa melalui hidrolisis dengan metode phenol-sulfat spektrofotometri cahaya tampak.

BAHAN DAN METODE

Mikroba *Agrobacterium sp.* yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Agrobacterium radiobacter* galur A1.5 dan *Agrobacterium sp.* galur B4.4 koleksi Puslit Bioteknologi-LIPI. Tetes tebu atau molase yang digunakan berasal dari PT. Jawa Manis Rafinasi, Cilegon, Banten.

Penentuan kadar glukosa dalam molase

Penentuan kadar glukosa dalam molase dilakukan menggunakan metode fenol sulfat (Chapline, 1986). Analisis ini dilakukan untuk menghitung jumlah molase yang harus ditambahkan pada media perlakuan. Kandungan glukosa dalam molase harus memenuhi kebutuhan untuk pertumbuhan bakteri yang optimum.

Preparasi Media.

Regenerasi *Agrobacterium sp.* dalam media PY terdiri dari pepton 1%, ekstrak ragi 0,5%, NaCl 0,5% dan bakto agar 1,5%. Produksi glukosa dilakukan dalam media fermentasi yaitu media PY dengan perlakuan penambahan kombinasi molase dan urasil. Perlakuan sebagai berikut: a) M1 : media PY tanpa penambahan molase maupun urasil, sebagai kontrol; b) M2 : media PY cair + 5%molase + 0,05%urasil; c) M3: media PY cair + 5%molase + 0,025%urasil; d) M4: media PY cair + 10%molase + 0,05%urasil; dan e) M5: media PY cair + 10%molase + 0,025%urasil.

Pemeriksaan morfologi *Agrobacterium sp.*

Pemeriksaan morfologi *Agrobacterium sp.* melalui pewarnaan Gram dan dilakukan pengamatan morfologi sel di bawah mikroskop. Hal ini untuk memastikan kemurnian isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian. Secara morfologi sel bakteri harus sesuai dengan biakan induk yang ada pada koleksi kultur.

Produksi β -glukan pada media fermentasi.

Agrobacterium sp. yang telah diregenerasi, diinokulasikan sebanyak 1 ose ke dalam 10 ml media PY cair, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam dengan kecepatan agitasi 150 rpm. Sejumlah 1 ml biakan *Agrobacterium sp.* dalam media pertumbuhan tersebut di atas diinokulasikan ke dalam 50 ml media fermentasi secara aseptis. Fermentasi dilakukan dalam pengocok-inkubator dengan kecepatan agitasi 150 rpm pada suhu kamar selama enam hari. Pembentukan β -glukan dilakukan, baik dalam media fermentasi kontrol maupun media fermentasi yang mengandung kombinasi molase dan urasil, dengan masing-masing perlakuan 3 kali pengulangan.

Ekstraksi β -1,3-glukan dan β -1,2-glukan dari media fermentasi (Hisamatsu *et al.*, 1977; Breedveld *et al.*, 1990).

Kultur sel bakteri dalam media fermentasi dengan berbagai perlakuan yang telah berumur 6 hari disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 20°C selama 20 menit. Endapan (I) yang terbentuk mengandung β -1,3-glukan, sedangkan supernatan (I) dipisahkan untuk mendapatkan β -1,2-glukan.

Endapan (I) dilarutkan dengan 20 ml asam hidroklorida 5 N, disentrifus kembali pada 10.000 rpm dan suhu 20°C selama 20 menit. Supernatan dibuang, dan endapan yang diperoleh dilarutkan kembali dengan 20 ml natrium hidroksida 1 N, dan disentrifus pada 10.000 rpm dan suhu 20°C selama 20 menit. Endapan yang terbentuk dibuang dan supernatan yang diperoleh dinetralisasi dengan

penambahan asam hidroklorida 5 N sehingga mencapai pH netral (sekitar pH 7), kemudian disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm dan suhu 20°C selama 20 menit. Endapan yang diperoleh dicuci dengan 20 ml air, dan disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 20°C. Setelah dilakukan pencucian dengan air, endapan dicuci dengan 10 ml etanol absolut kemudian disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm dan suhu 20°C selama 10 menit. Endapan yang diperoleh dikeringkan di oven pada suhu \pm 50°C dan ditimbang hingga bobot tetap sebagai berat kering (mg) -1,3-glukan (*crude*) (Hisamatsu *et al*, 1977).

Supernatan (I) yang telah dipisahkan pada awal sentrifus, kemudian ditambah etanol sebanyak 2 kali volume larutan dan disentrifus pada kecepatan 6.000 rpm dan suhu 20 °C selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh dievaporasi hingga \pm 1 ml. Hasil evaporasi kemudian ditambah etanol sebanyak 4 kali volume larutan dan didiamkan semalam. Selanjutnya supernatan disentrifus pada kecepatan 6.000 rpm dan suhu 20°C selama 20 menit. Endapan yang terbentuk kemudian dikeringkan di oven pada suhu \pm 50°C dan ditimbang hingga bobot tetap sebagai berat kering (mg) -1,2-glukan (*crude*) (Breedveld *et al*, 1990).

Penetapan kadar β -glukan ekivalen glukosa (Metode Fenol sulfat).

Pembuatan larutan uji.

Masing-masing zat uji -1,3-glukan (*crude*) dan -1,2-glukan (*crude*) dari hasil ekstraksi dan telah dikeringkan, ditimbang, kemudian dilarutkan homogen masing-masing dalam 300 l larutan natrium hidroksida 1 N dan 300 l air. Sejumlah volume tertentu larutan uji tersebut akan digunakan untuk analisis kadar -glukan ekivalen glukosa dan analisis kadar protein.

Pembuatan kurva kalibrasi glukosa.

Dibuat larutan baku glukosa 10 bpj, 20 bpj, 30 bpj, 40 bpj, 50 bpj, 60 bpj, 70 bpj, 80 bpj, 100 bpj. Masing-masing 0,5 ml larutan baku tersebut ditambah 0,5 ml fenol 5% dan 2,5 ml asam sulfat 5N dalam tabung reaksi, dikocok homogen, didiamkan 10 menit, kemudian dipanaskan selama 15 menit pada suhu 100⁰ C. Serapan masing-masing konsentrasi larutan baku glukosa diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 490 nm. Larutan blanko adalah 0,5 ml akuades dicampur dengan 0,5 ml fenol 5% dan 2,5 ml asam sulfat 5N (Chapline, 1986; Nielsen, 1994; Halme *et al*, 1993).

Penetapan kadar β -glukan ekivalen glukosa.

Masing-masing larutan uji dipipet sejumlah volume tertentu, kemudian diencerkan dengan air hingga volume 1 ml, kemudian diberi perlakuan yang sama seperti larutan baku glukosa. Sebagai blanko digunakan akuades (Chapline, 1986).

Hasil pengukuran serapan larutan uji diinterpolasi ke persamaan garis regresi larutan baku glukosa untuk memperoleh kadar β -glukan ekivalen glukosa dalam larutan uji yang diukur. Dengan memperhitungkan faktor pengenceran pada setiap larutan uji dan berat zat uji -1,3-glukan (*crude*) atau -1,2-glukan (*crude*) yang digunakan, maka kadar (%) β -glukan ekivalen glukosa dalam larutan uji -1,3-glukan (*crude*) dan larutan uji -1,2-glukan (*crude*) dapat dihitung.

Penetapan kadar protein (Metode Lowry).

Pembuatan kurva kalibrasi protein.

Dibuat larutan baku BSA sebesar 100 bpj, 140 bpj, 180 bpj, 220 bpj, 260 bpj, 300 bpj, 340 bpj. Masing-masing 1 ml larutan tersebut ditambah 0,5 ml natrium hidroksida 1 N, kemudian dipanaskan selama 20 menit pada suhu 100°C, didinginkan. Ditambah 2,5 ml larutan D dikocok hingga homogen, ditambah 0,5 ml folin C ke dalam masing-masing tabung, dikocok hingga homogen, kemudian didiamkan selama 30 menit. Serapan masing-masing konsentrasi larutan baku BSA diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm (Halme *et al*, 1993; Copeland, 1988).

Dipipet masing-masing sejumlah volume tertentu larutan uji, diencerkan dengan air sehingga volumenya 1 ml. Selanjutnya diberi perlakuan seperti larutan standar BSA. Sebagai blanko digunakan akuades.

Hasil pengukuran serapan diinterpolasi ke persamaan garis regresi larutan baku BSA untuk memperoleh kadar protein dalam larutan uji yang diukur. Dengan memperhitungkan faktor pengenceran pada setiap larutan uji dan bobot kering β -glukan, maka diperoleh kadar (%) protein pada larutan uji -1,3-glukan dan -1,2-glukan (*crude*).

Identifikasi gugus fungsi β -glukan.

Gugus fungsi pada molekul β -glukan diidentifikasi menggunakan *Fourier Transform Infra Red* Spektrofotometer. Sejumlah 1-3 mg serbuk kering β -glukan hasil ekstraksi dari kultur *Agrobacterium* sp dianalisis pada lempeng KBr.

Analisis Data.

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh antara perlakuan media fermentasi dengan hasil berat kering, kadar β -glukan ekivalen glukosa dan kadar protein dalam β -1,3-glukan (*crude*) dan β -1,2-glukan (*crude*), maka data dianalisis menggunakan perangkat lunak SPSS. Data awal diuji kenormalan distribusi dan homogenitas variannya, kemudian dianalisis menggunakan metode Anova satu arah dengan nilai signifikansi $\alpha = 0,01$. Jika terdapat perbedaan hasil antara perlakuan ($\alpha > 0,01$; Fhitung > Ftabel), maka dilanjutkan dengan uji Tukey dan Bonferroni untuk menunjukkan perbedaan antar perlakuan (Hussaini *et al*, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi Agrobacterium sp.

Isolat *Agrobacterium* sp. yang diperoleh diremajakan dalam media PY padat, sehingga diperoleh isolat yang segar. Melalui pemeriksaan morfologi, koloni *Agrobacterium* sp berwarna putih kekuningan tumbuh pada daerah goresan miring dalam media PY padat. Pada pemeriksaan mikroskopik melalui pewarnaan Gram, *Agrobacterium* sp. akan kehilangan kompleks ungu kristal saat dibilas dengan alkohol. Penambahan safranin menyebabkan sel terlihat berwarna merah muda (Pelczar & Chan, 1986).

Penentuan kadar Glukosa dalam Molase.

Kadar glukosa dalam molase dengan pengenceran 5000x memberikan serapan sebesar 0,514 adalah 159,95 bpj pada panjang gelombang 490 nm. Selanjutnya dengan mengacu kadar glukosa yang biasa dipakai dalam media fermentasi (2%) maka digunakan sejumlah tertentu volume molase hingga ekivalen dengan 2,5% glukosa dan 5% glukosa.

Tabel 1. Berat kering dan kadar β-glukan ekivalen glukosa dalam β-1,3-glukan (*crude*) dari *Agrobacterium* sp. A1.5 dan B4.4

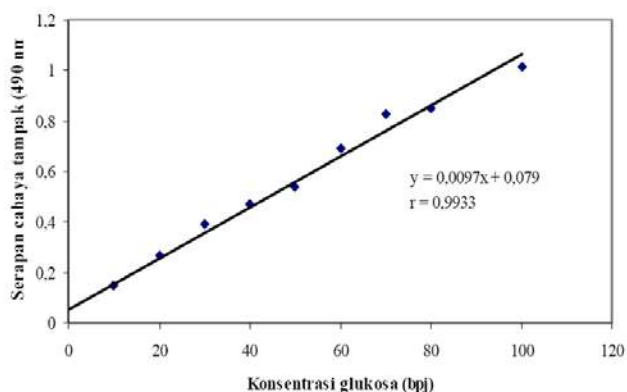
No	Perlakuan Media Fermentasi	A 1.5 ¹⁾		B 4.4 ¹⁾	
		Berat kering (mg)	Kadar Glukosa (%)	Berat kering (mg)	Kadar Glukosa (%)
1	Molase 0%; Urasil 0% (M1)	1,67 ^e	2,3 ^e	2,0 ^d	2,49 ^c
2	Molase 5%; Urasil 0,05% (M2)	2,67 ^d	3,29 ^d	3,0 ^d	3,01 ^b
3	Molase 5%; Urasil 0,025% (M3)	3,67 ^c	3,99 ^c	4,33 ^c	4,07 ^b
4	Molase 10%; Urasil 0,05% (M4)	4,67 ^b	4,79 ^b	5,67 ^b	6,89 ^a
5	Molase 10%; Urasil 0,025% (M5)	6,0 ^a	7,5 ^a	7,0 ^a	7,21 ^a

^{*)} Hasil rata-rata 2 ulangan

^{**)} Angka-angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata



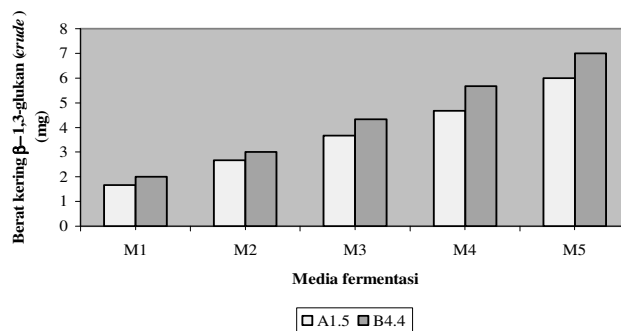
Gambar 2. Bentuk morfologi sel *Agrobacterium* sp. dengan pewarnaan Gram pembesaran 1000x.



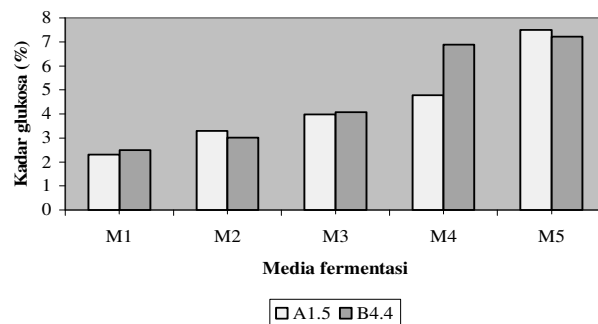
Gambar 3. Kurva kalibrasi glukosa menggunakan metode Fenol-sulfat Spektrofotometri cahaya tampak pada 490 nm.

Komposisi kimia molase sangat bervariasi karena dipengaruhi oleh berbagai faktor, yaitu: varietas dan kematangan tebu, kondisi iklim dan tanah serta kondisi proses dalam pabrik gula. Molase tersusun dari bahan-bahan organik, anorganik dan air. Sekitar 52% dari molase merupakan total gula (sukrosa, glukosa dan fruktosa),

sekitar 10% atau lebih adalah garam anorganik, 10-20% air dan selebihnya adalah bahan organik non gula (Paturau, 1969).



Gambar 4. Berat kering β-1,3-glukan (*crude*) produk *Agrobacterium* sp galur A1.5 dan B4.4 dalam 50 ml media fermentasi.



Gambar 5. Kadar β-1,3 glukosa (ekivalen glukosa) produk *Agrobacterium* sp galur A1.5 dan B4.4 dalam 50 ml media fermentasi.

Kurva kalibrasi larutan baku glukosa

Pembacaan serapan larutan baku glukosa 10 bpj, 20 bpj, 30 bpj, 40 bpj, 50 bpj, 60 bpj, 70 bpj, 80 bpj, 100 bpj pada panjang gelombang 490 nm menghasilkan kurva kalibrasi dengan persamaan garis regresi $y = 0,0097x + 0,079$ (Gambar 3). Nilai koefisien korelasi 0,9933 menunjukkan bahwa ada hubungan linier yang baik antara konsentrasi glukosa dengan serapan pada cahaya tampak.

Berat Kering dan Kadar β-glukan ekivalen glukosa dalam β-glukan (*crude*) dari *Agrobacterium* sp. galur A1.5 dan B4.4

Kadar β-glukan ditetapkan sebagai ekivalen glukosa dengan metode fenol sulfat dengan spektrofotometri cahaya tampak. Glukosa bila bereaksi dengan fenol sulfat membentuk senyawa berwarna kuning jingga yang memiliki gugus kromofor dan menunjukkan serapan maksimum pada $\lambda = 490$ nm, sehingga dapat ditetapkan dengan metode spektrofotometri cahaya tampak.

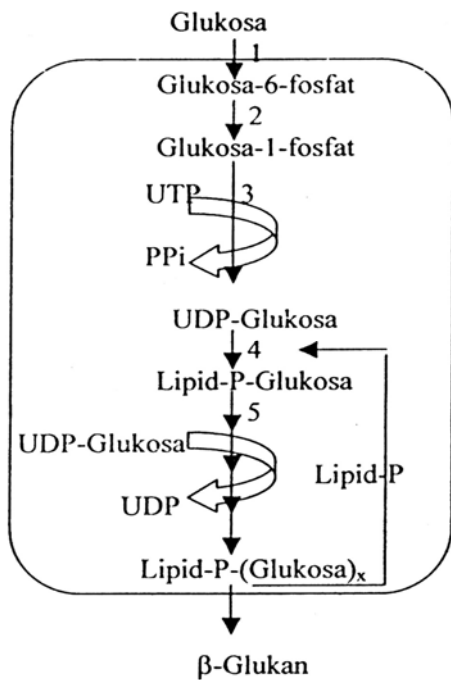
Berat kering dan β-1,3-glukan (*crude*) hasil kedua galur *Agrobacterium* sp A1.5 dan B4.4 dapat dilihat pada Tabel 1. Gambar 4 dan 5 menunjukkan bahwa media fermentasi yang mengandung berbagai kombinasi molase-urasil dapat meningkatkan berat kering β-1,3-glukan (*crude*) maupun kadar β-glukan (ekivalen glukosa) dari kedua *Agrobacterium* sp.

Hasil berat kering maupun kadar β-glukan (ekivalen glukosa) yang tertinggi dihasilkan dalam media fermentasi yang mengandung kombinasi molase 10%-urasil 0,025%. Analisis data dengan Anova satu arah program SPSS

memastikan bahwa ada perbedaan yang nyata ($\alpha = 0,01$) pengaruh berbagai kombinasi media fermentasi terhadap berat kering dan kadar β -glukan dalam β -1,3-glukan (*crude*).

Lee (2005) menyatakan bahwa konsentrasi urasil sebagai sumber nitrogen dalam media fermentasi untuk produksi β -glukan dari *Agrobacterium* sp, perlu diperhatikan. Dalam media mengandung kadar nitrogen yang rendah, akan dihasilkan -glukan bersamaan dengan produksi biomassa.

Urasil sebagai sumber nitrogen berguna bagi peningkatan produksi -glukan, mungkin karena urasil berfungsi sebagai prekursor pembentukan senyawa UDP-glukosa, dan selanjutnya UDP-glukosa merupakan aktivator pembentukan senyawa -glukan (Atlas, 1989; Wirahadikusumah, 1989). Mekanisme terbentuknya -glukan pada *Agrobacterium* sp. dapat dilihat pada Gambar 6 di bawah ini:



Gambar 6. Jalur sintesis -glukan (Atlas, 1989)

Tabel 2. Berat kering dan kadar β -glukan ekuivalen glukosa dalam β -1,2-glukan (*crude*) dari *Agrobacterium* sp. A1.5 dan B4.4.

No	Perlakuan Media Fermentasi	A 1.5 ¹⁾		B 4.4 ¹⁾	
		Berat kering (mg)	Kadar Glukosa (%)	Berat kering (mg)	Kadar Glukosa (%)
1	Molase 0%; Urasil 0% (M1)	6,33 ^c	12,0 ^d	6,0 ^c	7,39 ^b
2	Molase 5%; Urasil 0,05% (M2)	12,67 ^b	13,45 ^{bc}	8,67 ^{bc}	10,56 ^{ab}
3	Molase 5%; Urasil 0,025% (M3)	15,33 ^b	12,96 ^{cd}	12,33 ^b	10,75 ^{ab}
4	Molase 10%; Urasil 0,05% (M4)	19,33 ^a	14,29 ^b	21,67 ^a	12,62 ^a
5	Molase 10%; Urasil 0,025% (M5)	22,33 ^a	15,5 ^a	28,0 ^a	13,12 ^a

¹⁾ Hasil rata-rata 2 ulangan

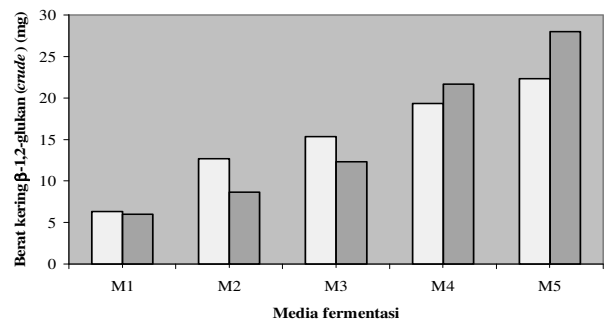
²⁾ Angka-angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata

Berat kering dan kadar β -1,2 glukan (ekivalen glukosa) hasil dari *Agrobacterium* sp. Galur A1.5 dan B4.4 dapat dilihat pada Tabel 2, gambar 7 dan 8 yang menunjukkan bahwa media fermentasi yang mengandung kombinasi molase-urasil dapat meningkatkan hasil berat kering dan kadar β -1,2-glukan (ekivalen glukosa) dari kedua galur *Agrobacterium* sp.

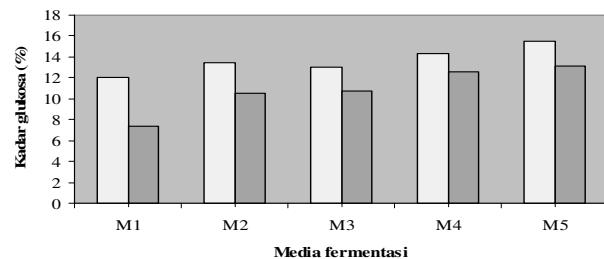
Berat kering dan kadar β -glukan (ekivalen glukosa) dalam β -1,2-glukan (*crude*) tertinggi dihasilkan oleh kedua galur dalam media fermentasi yang mengandung kombinasi molase 10%-urasil 0,025%. Uji Anova satu arah program SPSS menunjukkan bahwa ada perbedaan yang nyata ($\alpha = 0,01$) pengaruh berbagai kombinasi media fermentasi terhadap berat kering dan kadar β -1,2-glukan (ekivalen glukosa).

Kadar β -glukan (ekivalen glukosa) tertinggi dihasilkan dalam media fermentasi dengan kombinasi molase 10%-urasil 0,025%, bisa terjadi karena kadar glukosa dalam media tersebut paling tinggi dibanding media fermentasi yang lainnya.

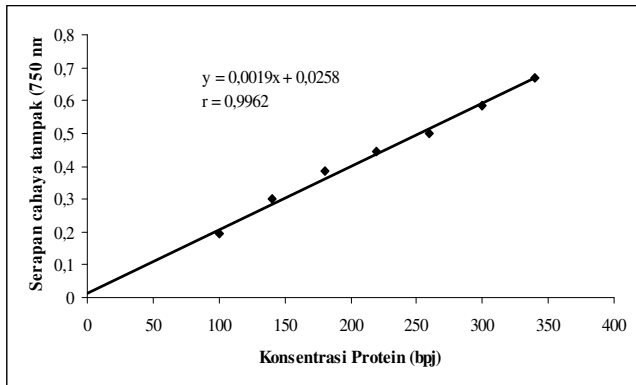
Sebagaimana diketahui *Agrobacterium* sp membutuhkan sumber karbon dalam jumlah besar di dalam media fermentasinya sebagai sumber energi untuk pembentukan struktur dan fungsi sel dan sebagai komponen utama dinding sel (Paturau, 1969). Jika sumber karbon terpenuhi secara optimum maka pembentukan dinding selnya pun dapat lebih baik dan β -glukan yang disintesis dalam dinding selnya pun lebih baik pula. Sedangkan sumber nitrogen dibutuhkan oleh *Agrobacterium* sp. galur A1.5 dan B4.4 dalam konsentrasi yang rendah, sesuai dengan penelitian Lee (2005) dan Breeveld (1990) yang menyatakan bahwa *Agrobacterium* sp. dapat menghasilkan β -glukan pada konsentrasi sumber nitrogen yang rendah.



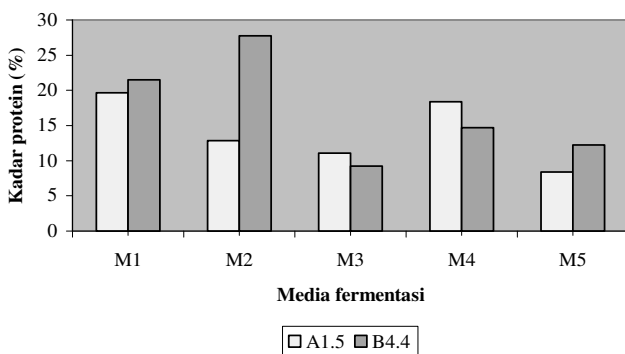
Gambar 7. Berat kering -1,2-glukan (*crude*) dari *Agrobacterium* sp galur A1.5 dan B4.4.



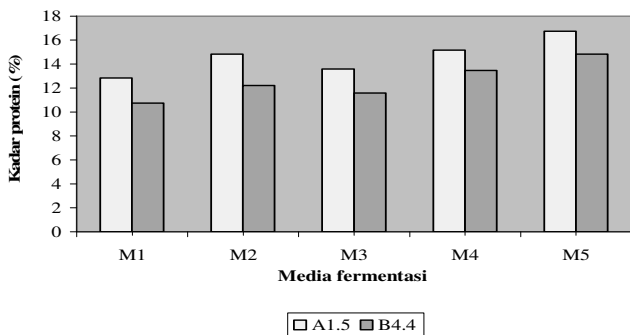
Gambar 8. Kadar -1,2 glukan (ekivalen glukosa) dari *Agrobacterium* sp galur A1.5 dan B4.4



Gambar 9. Kurva kalibrasi BSA menggunakan metode Lowry-spektrofotometri pada 750 nm



Gambar 10. Hasil kadar protein dalam -1,3-glukan (crude) *Agrobacterium* A1.5 dan B4.4



Gambar 11. Kadar protein dalam -1,2-glukan (crude) dari *Agrobacterium* A1.5 dan B4.4

Tabel 3. Analisis gugus fungsi β -1,3-glukan menggunakan FTIR

Baku Pemandang	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)		Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Gugus Fungsi
	A 1.5	B 4.4		
3560,35	3284,55	3082,04	3750-3000	Alkohol dan Hidroksil (OH)
2893,02	2879,52	2975,96	3000-2700	CH alkana
1097,42	1147,57	1132,14	1260-1050	-C-O-C- (Eter)

Tabel 4. Analisis gugus fungsi β -1,2-glukan menggunakan FTIR

Baku Pemandang	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)		Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Gugus Fungsi
	A 1.5	B 4.4		
3301,91	3191,97	3394,48	3750-3000	Alkohol dan Hidroksil (OH)
2889,17	2840,95	2948,96	3000-2700	CH alkana
1078,13	1120,56	1070,42	1260-1050	-C-O-C- (Eter)

Kurva kalibrasi protein

Protein dengan reaksi Lowry membentuk senyawa berwarna biru. Hasil pengukuran deret standar BSA memperoleh kurva kalibrasi dengan persamaan garis regresi $y = 0,0019x + 0,0258$ (Gambar 9). Nilai koefisien korelasi 0,9962 menunjukkan bahwa ada hubungan linier yang baik antara konsentrasi larutan baku BSA dengan serapan cahaya tampak pada $\lambda = 750$ nm.

*Analisis kadar protein dalam larutan uji β -1,3-glukan (crude) dari *Agrobacterium* sp. Galur A1.5 dan B4.4*

Kadar protein pada produk β -glukan (crude) sering diharapkan serendah mungkin bila akan digunakan di bidang farmasi dan kesehatan, namun kadar protein yang agak tinggi masih dapat ditolerir bila akan digunakan dalam makanan. Dari kelima perlakuan kombinasi molase-urasil dalam media fermentasi dapat ditunjukkan bahwa galur A1.5 menghasilkan kadar protein terendah (8,4%) dalam media fermentasi yang mengandung molase 10%-urasil 0,025%, sedangkan galur B4.4 menghasilkan kadar protein terendah (9,27%) dalam media fermentasi molase 5%-urasil 0,025%. (Gambar 10).

*Analisis kadar protein dalam larutan uji β -1,2-glukan (crude) dari *Agrobacterium* sp. Galur A1.5 dan B4.4*

Dari kelima perlakuan kombinasi molase-urasil dalam media fermentasi galur A1.5 dapat ditunjukkan bahwa perlakuan makin meningkat-kkan kadar protein dalam β -1,2-glukan (crude), sedangkan kontrol sendiri menghasilkan kadar protein terendah (12,83%), dan demikian pula galur B4.4 menghasilkan kadar protein terendah (10,76%) dalam media kontrol (Gambar 11).

Identifikasi Senyawa β -glukan dengan Fourier Transform Infra Red Spectrofotometri (FTIR)

Pengamatan gugus fungsi senyawa baku pembanding β -1,3-glukan dan β -1,2-glukan (Takeda Jepang); serta sampel β -glukan (1,3 dan 1,2) yang diperoleh dari hasil ekstraksi *Agrobacterium* sp. A1.5 dan B4.4, dilakukan pada spektrum serapan infra merah dengan *Fourier Transform Infra Red Spectrofotometri* (FTIR).

Pada Tabel 3 dan 4, menunjukkan bahwa semua hasil β -glukan mempunyai spektrum infra merah yang sangat mirip bila dibandingkan dengan baku pembanding β -1,3-glukan maupun β -1,2-glukan. Spektrum infra merah senyawa-senyawa tersebut ditandai dengan adanya puncak serapan pada bilangan gelombang 3750-3000cm⁻¹ (gugus -OH atau alkohol), 3000-2700 cm⁻¹ (gugus -CH-), dan 1260-1050 cm⁻¹ (gugus -C-O-C-).

Hasil analisis statistik menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata antara perlakuan, serta ada peningkatan nyata rata-rata berat kering dan kadar β -glukan ekuivalen glukosa pada β -1,3-glukan(*crude*) dan β -1,2-glukan(*crude*), yang dihasilkan oleh tiap perlakuan media fermentasi dengan nilai signifikansi $\alpha < 0,01$. Data kadar protein tidak dapat memenuhi uji kenormalan distribusi dan homogenitas varian sehingga tidak dilakukan analisis selanjutnya.

KESIMPULAN

Penambahan kombinasi (molase 10%, urasil 0,025%) ke dalam media fermentasi *Agrobacterium* sp galur A1.5 dan B4.4 dapat meningkatkan berat kering β -1,3-glukan (*crude*) maupun β -1,2-glukan (*crude*), serta meningkatkan kadar β -1,3-glukan (ekivalen glukosa) sebesar 7,5% (galur A1-5) dan 7,2% (galur B4.4) dan kadar β -1,2-glukan (ekivalen glukosa) meningkat sebesar 15,5% (galur A1-5) dan 13,1% (galur B4.4).

Kadar protein terendah (8,4%) dalam β -1,3-glukan (*crude*) dihasilkan oleh *Agrobacterium* sp galur A1.5 dalam media fermentasi mengandung molase 10%-urasil 0,025% serta sebesar 12,8% dalam β -1,2-glukan (*crude*) dengan media kontrol.

Agrobacterium sp galur B4.4 menghasilkan kadar protein terendah (9,3%) dalam β -1,3-glukan (*crude*) dengan perlakuan media molase 5%-urasil 0,025%; dan sebesar 10,8% dalam β -1,2-glukan (*crude*) dengan media kontrol.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh proyek DIPA 2005 Puslit Bioteknologi-LIPI untuk Bapak E. Jusuf. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Makoto Hisamatsu, Ph.D. Fac.Bioresources, Mie University, Jepang, yang telah memberikan isolat referensi *Agrobacterium* A1-5 dan senyawa - Glukan standar. Rasa terima kasih disampaikan juga kepada Bapak Dr. S. Nuswantara untuk saran-saran yang diberikan selama menemani penelitian -Glukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 1999. Curdlan FNP 52 Add 7. <http://www.fao.org/docrep/3860e/x3860Eoo.html>.
- Anonim. 2005. History of Beta-1,3/1,6-Glucan Research. <http://www.Betaglucan.Org/history.htm>.
- Atlas, Ronald. M. 1989. Microbiology: fundamental and application 2nd Edition. New York: Macmillan publishing Company. hal. 153-55.
- Breedveld MW, Zevenhuizen LPTM, Zeheder AJB. 1990. Excessive Excretion of cyclic β -1,2-glucan by *Rhizobium trifolii* TA-1. Applied and Environmental Microbiology. hal. 2080-6.
- Buchanan E. R., Gibbons N.E., Cowan S. T., Holt G. John, Linstun J., Murray E. G. R. 1984. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. Baltimore: Williams and Wilkin Company. hal. 261-6.
- Chapline, MF. 1986. Monosaccharides. dalam Chapline MF, Kennedy JF (Eds). Carbohydrate Analysis a Practical Approach. 2nd Ed. Oxford. Oxford University Press.
- Copeland Robert A. 1988. Methods for protein analysis. Wilmington : The Dupont Pharmaceutical Company. hal. 39-53.
- Halme. J. David, Peck Hazel. 1993. Analytical Biochemistry 2nd ed. New York: John Wiley and Sons. Inc. hal. 338-41, 408-11.
- Hisamatsu M, Ott I, Amemura A, Harada T. 1977. Change in Ability of *Agrobacterium* to Produce water-soluble and water-insoluble β -glucan. hal. 375-9.
- Holt G. John, Krieg R.Noel, Sneath A. H. Peter, Staley T. James, Williams T. Stanley. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkin Company; hal. 74-5, 130-31, 104.
- Hussaini Usman, R Purnomo S Akbar. 1995. Pengantar statistika. Jakarta: Bumi aksara. hal. 119-24, 287-92.
- Isnaini Nita. 2005. Produksi serta penetapan kadar β -glukan dari tiga galur *Saccharomyces cerevisiae* dalam media mengandung molase Jakarta: Skripsi Fakultas Farmasi Universitas Pancasila. hal 48.
- Lee Jung-heon, Lee I. Young. 2005. Optimization of uracil addition for curdlan (β -1,3-glucan) production by *Agrobacterium* sp.<http://www.infomag.ru:8082/dbase/JO41E/01116-168.txt>.
- Lee, Y. 2005. Korea research institute of bioscience and biotechnology. <http://www.WilleyVch.de/books/biopoly/pdf-vos/bpol15006-135-144pdf>.
- Lippens, Guy and Jean-Pierre Bohin. 2005. Structural diversity of the osmoregulated periplasmic glucans of gram-negative bacteria by a combined genetics and nuclear magnetic resonance approach. <http://oueba.univ.lille1.fr/egc3.htm>.
- Nielsen S. Suzanne. 1994. Introduction to the chemical analysis of food. London: Jones and Bartlett Publisher. hal. 137-64.
- Paturau M. J. 1969. By products of the cane sugar industry, an introduction utilization. London: Elsevier Publ. Com, Amsterdam. hal 33-53.
- Pelczar, Jr M.J. Chan E.C.S. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi. Jilid 1. Diterjemahkan oleh Hadioetomo. R. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia. hal. 106-118, 148-155.
- Salmah Muhamad. 2006. Pengaruh Penambahan Urasil Dalam Media Fermentasi Terhadap Produksi -glukan dari *Agrobacterium radiobacter* A1.5 dan *Agrobacterium* sp Bro 1.2.1 mutan. Jakarta: Skripsi Fakultas Farmasi Universitas Pancasila. hal 26-28
- Spicer EJ. Goldenthal EI, Ikada T. A 2005. toxicological assesment of Curdlan. <http://www.betaxanthin.com/toxicologi-research.html>.
- Stone, B.A, Clark AE.1992. Fungal, yeast and lichen (1,3)- glucans. Chemistry and biology of (1,3)- glucans. Australia: La trobe University Press. hal. 283-365.
- Wirahadikusumah M. 1989. Biokimia protein, enzim dan asam Nukleat. Bandung: Institut Teknologi Bandung. hal. 75-82.