



**MUTASI ACAK DENGAN ACRIDINE ORANGE
TERHADAP BAKTERI *Agrobacterium sp.*
YANG POTENSIAL MEMPRODUKSI β - (1,3)-GLUKAN**

LIA NATHALIA SETIAWAN



**PROGRAM STUDI BIOKIMIA
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

2003



Kupersembahkan untukmu :

*Almarhumah mama tercinta
Papa tersayang
Henry dan Angky*



"Karya terindah yang dapat kupersembahkan"

Hak Cipta: Pribadi/Instansi, Undang-Undang
1. Dilindungi sebagai hak cipta yang berlaku bagi setiap pencipta dan pengeksploitasi sumber:
a. Pengalihan hanya akan terjadi jika perundang-undangan, perjanjian, keputusan hakim, atau tindakan administratif
b. Tidak ada hak ekonomi bagi pencipta yang telah meninggal dunia
2. Dilindungi sepenuhnya dan merupakan bagian dari identitas sebagai hak cipta milik IPB University

RINGKASAN

LIA NATHALIA SETIAWAN. Mutasi acak dengan acridine orange terhadap bakteri *Agrobacterium sp.* yang potensial memproduksi β - (1,3)-glukan. An acridine orange random mutation to the *Agrobacterium sp.* producing β - (1,3)-glukan potential, dibimbing oleh Norman R. Azwar dan Kusmiati .

Mutagenesis terhadap bakteri dapat digunakan untuk meningkatkan aktivitas bakteri dalam menghasilkan suatu produk. Dalam teknik mutagenesis banyak digunakan senyawa kimia yang umumnya bersifat toksik, contohnya adalah acridine orange. Penggunaan acridine orange sebagai mutagen dalam dosis yang tinggi dapat menyebabkan kematian suatu populasi bakteri namun dalam kondisi terkontrol dapat menghasilkan mutan yang berproduktifitas tinggi.

Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk mendapatkan isolat mutan bakteri *Agrobacterium sp.* yang potensial untuk menghasilkan β - (1,3)-glukan yang lebih tinggi dari tipe liarnya. Besarnya kadar β - (1,3)-glukan yang dihasilkan oleh mutan dibandingkan terhadap β - (1,3)-glukan yang dihasilkan oleh tipe liar dengan menggunakan analisis kimia. Senyawa yang dibandingkan adalah konsentrasi glukosa, dan sebagai data pendukung dilakukan analisis terhadap kandungan xilosa, asam glukoronat dan protein.

Bakteri *Agrobacterium sp.* Bro-121 yang digunakan adalah bakteri yang diisolasi dari tumor tanaman brokoli dari alam dalam medium sintetik hingga didapatkan isolat yang murni. Sedangkan sebagai pembanding digunakan bakteri *Agrobacterium radiobacter* IFO 12665 A1.5 yang merupakan bakteri unggul dan komersil memproduksi β - (1,3)-glukan. Mutan *Agrobacterium sp.* yang dihasilkan memiliki morfologi yang berbeda dan mampu memproduksi β -(1,3)-glukan lebih tinggi dari tipe liarnya. Analisis kadar glukosa dilakukan terhadap β -(1,3)-glukan dan fraksi hasil purifikasi dengan kolom DEAE *sepharose* dan kolom *sephadex*.

**MUTASI ACAK DENGAN ACRIDINE ORANGE
TERHADAP BAKTERI *Agrobacterium sp*
YANG POTENSIAL MEMPRODUKSI β - (1,3)-GLUKAN**

LIA NATHALIA SETIAWAN

Skripsi

Diajukan Untuk Melengkapi Syarat

Pendidikan S1 Biokimia.

Pada Jurusan Kimia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Institut Pertanian Bogor

**PROGRAM STUDI BIOKIMIA
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

2003



Judul

: Mutasi acak dengan acridine orange terhadap bakteri *Agrobacterium sp.* yang potensial memproduksi β - (1,3)- glukukan

Nama Mahasiswa

: Lia Natahalia Setiawan

NRP

: G08499029

Menyetujui

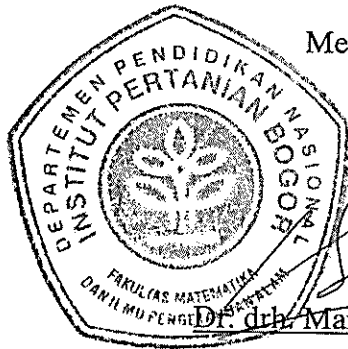
Prof. Dr. H. Norman R. Azwar

Pembimbing I

Dra. Kusmiati, MSi

Pembimbing II

Mengetahui:



Dr. drh. Mansjur Hawab, MS
Ketua Program Studi Biokimia

Halaman 1 dari 1
1. Diambil sebagai bagian dari koleksi arsip IPB
2. Diperoleh dengan persetujuan dari pengelola arsip IPB University

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di kota Serang pada tanggal 24 Agustus 1980 sebagai anak kedua dari empat orang bersaudara, anak dari pasangan A. Budy Setiawan dan Liauw Etju. Tahun 1996 penulis lulus dari SLTP Mardi Yuana Serang. Penulis melanjutkan studi ke SMU Mardi Yuana Serang pada tahun 1996 dan lulus tahun 1999. Pada tahun yang sama penulis lulus seleksi masuk IPB melalui jalur Undangan Seleksi Masuk IPB.

Sejak tahun 1996 penulis aktif dalam kegiatan pramuka, keagamaan dan aktif pada organisasi Rekat (Remaja Katholik). Semasa SMU 1996/1999, penulis aktif pada kegiatan dewan perwakilan sekolah dan kepengurusan OSIS. Hingga saat ini, penulis masih tercatat sebagai anggota Kemaki (Keluarga Mahasiswa Katolik IPB). Pada tahun 2002, penulis melakukan praktik lapang di Laboratorium Biopolimer bidang Biologi Molekuler Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong.

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala karunia, kekuatan dan perlindungan-Nya sehingga karya ilmiah ini dapat selesai. Penelitian yang dilakukan mengambil tema biopolimer bakteri dengan judul Mutasi Acak dengan Acridine Orange terhadap Bakteri *Agrobacterium sp.* yang potensial memproduksi β -(1,3)-glukan yang dilakukan di Laboratorium Biopolimer Bidang Biologi Molekuler Puslit Bioteknologi LIPI Cibinong sejak bulan Februari hingga Juli 2003.

Penelitian ini didanai oleh Proyek Penelitian Bioteknologi-LIPI, DIP tahun 2002/2003. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang telah banyak membantu penyelesaian karya ilmiah ini, yaitu Bpk Prof. Dr. H. Norman R. Azwar selaku pembimbing utama dan kepada Ibu Dra Kusmiati, MSi yang telah memberi kepercayaan, menyediakan waktu dan bantuan moril selama melakukan penelitian ini. Kepada Bpk Dr. Sukma Nuswantara, MPhil dan Ibu Dr. Titik K. Prana yang telah banyak memberikan saran dan bimbingan. Kepada teman-teman seperjuangan di Biokimia (Devy, Agus, Yenni, Rina, Dilla, Nopen, dll), teman-teman di Laboratorium Biopolimer (Hakim, Oman, Erik, Ulfa, Kiki) dan teman-teman di R-52. Penulis juga mengucapkan banyak terima kasih kepada Yang-yang, Aling, Santi, Wawan, Tan En, Cinthya. Ungkapan terima kasih terbesar diberikan kepada papa, koko, Angky, ema dan almarhumah mama atas segala doa, kasih sayang dan dukungan moril yang diberikan.

Semoga karya ilmiah ini dapat bermanfaat.

Bogor, Agustus 2003

Lia Nathalia



DAFTAR ISI

DAFTAR GAMBAR	iv
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR LAMPIRAN	iv
PENDAHULUAN	1
TINJAUAN PUSTAKA	
Mutasi	1
<i>Agrobacterium sp</i>	1
β -(1,3)-glukan	2
Acridine orange	2
Mutagenesis <i>Agrobacterium sp</i>	2
BAHAN DAN METODE	
Alat dan Bahan	3
Metode Penelitian	3
HASIL DAN PEMBAHASAN	
Morfologi bakteri <i>Agrobacterium sp</i>	4
Mutagenesis <i>Agrobacterium sp</i>	5
Ekstraksi β -(1,3)-glukan	5
Analisis kimia	6
Purifikasi β -(1,3)-glukan	6
KESIMPULAN DAN SARAN	
Kesimpulan	7
Saran	7
DAFTAR PUSTAKA	8
LAMPIRAN	9

DAFTAR GAMBAR

1. Struktur linear β -(1,3)-glukan	2
2. Struktur Acridine Orange	2
3. Bentuk morfologi sel bakteri <i>Agrobacterium Sp</i>	4
4. Gambar grafik hubungan konsentrasi acridine orange dan jumlah sel <i>Agrobacterium Bro 121</i>	5
5. Gambar grafik hubungan konsentrasi acridine orange dan jumlah sel <i>Agrobacterium A1.5</i>	5
6. Gambar perbedaan koloni bakteri <i>Agrobacterium Sp</i> liar dan mutan	5

DAFTAR TABEL

1. Tabel bobot kering sel bakteri <i>Agobacterium sp</i>	5
2. Tabel bobot β - (1,3)- glukon hasil ekstraksi	6
3. Tabel kadar senyawa kimia dalam β - (1,3)- glukon	6
4. Tabel kadar glukosa hasil purifikasi DEAE <i>sepharose</i>	6
5. Tabel kadar glukosa hasil purifikasi <i>sephadex</i>	7

DAFTAR LAMPIRAN

1. Diagram alir penelitian	10
2. Bobot β - (1,3)- glukon hasil ekstraksi skala kecil	11
3. Tabel konsentrasi standar glukosa	12
4. Kurva standar glukosa	13
5. Tabel konsentrasi standar xilosa	14
6. Kurva standar xilosa	15
7. Tabel konsentrasi standar asam glukuronat	16
8. Kurva standar asam glukuronat	17
9. Tabel konsentrasi standar protein	18
10. Kurva standar protein	19
11. Komposisi medium	20



PENDAHULUAN

Persaingan pasar diberbagai sektor industri sangat ketat pada era globalisasi sekarang ini. Produsen berusaha untuk memenuhi kebutuhan konsumen terhadap suatu produk dengan kualitas tinggi namun dengan harga yang cukup terjangkau. Biaya produksi yang tinggi dalam proses penyediaan bahan baku industri sangat mempengaruhi harga produk yang ditawarkan. Tingginya biaya disebabkan bahan baku yang digunakan di industri banyak yang masih diimpor, salah satu contohnya adalah kebutuhan akan polisakarida di industri makanan dan minuman yang merupakan polisakarida alami. Polisakarida alami ini disintesis dari tanaman, hewan, dan mikroba.

Sebagai alternatif untuk menekan biaya produksi adalah dengan cara memanfaatkan sumber hayati yang ada. Berbagai riset dan penelitian terus dilakukan oleh para peneliti untuk memanfaatkan kekayaan alam dalam negeri, mengingat Indonesia adalah negara yang sangat kaya akan keragaman hayati.

Polisakarida merupakan polimer yang terdapat di alam dalam bentuk kompleks dan mudah ditemukan pada berbagai sumber. Peranan mikroba dalam mengubah senyawa kompleks polisakarida menjadi lebih sederhana dan menjadi lebih bermanfaat untuk kepentingan industri mulai banyak dipelajari. Siklus hidup mikroba yang singkat dan karakteristiknya yang khas merupakan sisi penting yang dapat ditelaah untuk memproduksi polisakarida dari mikroba dalam waktu cepat.

β -(1,3)-glukan merupakan suatu senyawa polimer sakarida yang banyak diteliti dan dikembangkan untuk berbagai tujuan industri seperti pada industri makanan, farmasi maupun kosmetik. Polisakarida ini dihasilkan oleh bakteri *Rhizobium* dan *Agrobacterium*. Polisakarida pada bakteri *Agrobacterium* bersifat ekstraseluler yang dieksresikan dari dalam sel ke media pertumbuhan. *Agrobacterium* merupakan bakteri yang mampu membentuk tumor pada akar tanaman sehingga membuat tanaman menjadi rusak.

Penelitian yang dilakukan oleh Bernal (2002) menunjukkan bahwa mutasi acak yang dilakukan menggunakan senyawa acridine orange terhadap bakteri dapat meningkatkan aktivitas bakteri tersebut. Bertitik tolak pada laporan penelitian tersebut maka dilakukan penelitian mengenai mutasi acak dengan acridine orange terhadap bakteri *Agrobacterium sp.* yang potensial

memproduksi β - (1,3)- glukan Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan kemampuan bakteri *Agrobacterium sp* yang berpotensi memproduksi β - (1,3)- glukan lebih tinggi dari tipe liarnya. Manfaat penelitian ini adalah untuk mendapatkan mutan bakteri *Agrobacterium sp* yang berpotensi menghasilkan β - (1,3)- glukan lebih tinggi dari tipe liarnya.

TINJAUAN PUSTAKA

Mutasi

Mutasi adalah perubahan yang terjadi pada bahan genetik yang menyebabkan perubahan ekspresi genetik. Perubahan dapat terjadi pada tingkat pasangan basa, tingkat satu ruas DNA, atau bahkan pada tingkat kromosom. Perubahan pada DNA akan menyebabkan terjadinya perubahan kodon-kodon mRNA selanjutnya menyebabkan perubahan asam amino tertentu pada protein yang dibentuknya. Perubahan protein atau enzim akan menyebabkan perubahan metabolisme serta fenotip organisme. Besar kecil jumlah asam amino yang berubah akan menentukan besar kecilnya perubahan fenotip pada organisme tersebut (Jusuf 1993).

Mutasi dapat terjadi secara spontan maupun akibat rangsangan. Organisme baru hasil mutasi disebut **mutan** dan genotip sebelum proses mutasi disebut genotip **liar**, sedang proses terjadinya mutasi disebut **mutagenesis**. Mutasi spontan berhubungan secara alami dengan proses replikasi dan mutasi akibat rangsangan disebabkan adanya rangsangan dari luar yang bersifat alami maupun buatan. Rangsangan buatan dapat disebabkan oleh adanya penambahan bahan kimia, perubahan secara fisik dan yang perubahan yang bersifat biologis. Rangsangan oleh bahan kimia seperti oleh etilmetil sulfonat, acridine orange, nitrosoguanin, dan hidroksilamin. Rangsangan fisik seperti oleh sinar X, sedang rangsangan biologis terjadi oleh adanya elemen loncat.

Agrobacterium sp.

Agrobacterium sp. merupakan bakteri yang menyebabkan terjadinya bisul mahkota pada tumbuhan. Bakteri ini memiliki plasmid Ti (tumor-inducing) sehingga mampu memasuki sel tanaman lewat luka dan mampu mentransformasi sel tanaman menjadi sel tumor.

Agrobacterium sp. merupakan bakteri Gram negatif bersifat nonspora yang berbentuk batang



dan berukuran (0.6-1.0) μm hingga (1.5-3.0) μm , dapat berupa sel tunggal dan berpasangan, motil dengan flagela peritrichous 1-6, bersifat aerob dengan tipe metabolisme respirasi dengan oksigen sebagai akseptor ekstra terminal. Kebanyakan dapat tumbuh pada kondisi kekurangan oksigen dalam jaringan tanaman. Suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri ini adalah 25-28 $^{\circ}\text{C}$. (Kandler 1986)

Bakteri ini umumnya ditemukan di sekitar permukaan akar tanaman. Bakteri ini dapat menyerang tanaman monokotil seperti brokoli, sawi maupun kubis dan tanaman dikotil seperti apel dan pear.

β -(1,3)-glukan

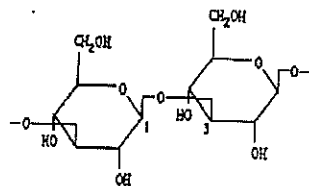
β -(1,3)-glukan merupakan kelompok karbohidrat yang ada pada permukaan sel bakteri, berupa polisakarida dengan monomer glukosa. β -(1,3)-glukan memiliki struktur linear dan diantara monomer yang satu dengan lainnya dihubungkan dengan ikatan glikosida jenis β . Ikatan ini terjadi pada karbon nomor satu dan karbon nomor tiga hingga membentuk struktur kompleks polimer tersier intramolekul dan intermolekul. Polimer ini memiliki rantai utama berikatan β .

β -(1,3)-glukan adalah molekul polisakarida unik yang ditemukan dalam jumlah sangat kecil pada bakteri, jumlahnya beragam pada mikroba berbeda, jamur dan tumbuhan tingkat tinggi. (Cheeseman 1995)

β -(1,3)-glukan dihasilkan oleh bakteri *Agrobacterium* dan *Rhizobium* yang bersifat nonpatogenik dan nontoksigenik melalui proses fermentasi. Molekul mengandung residu glukosa dengan ikatan β -(1,3) glikosida yang dikeluarkan oleh bakteri dari dalam selnya yang disebut eksopolisakarida sel. Sifat ini memudahkan untuk mengekstraksi β -(1,3)-glukan sehingga diperoleh senyawa murni. β -(1,3)-glukan merupakan senyawa yang tidak larut air, alkohol dan pelarut organik lainnya namun larut dalam pelarut alkali seperti NaOH dengan pH 12 atau lebih. Assay terhadap β -(1,3)-glukan dapat dilakukan bila berada dalam pH netral (6.0-7.5). β -(1,3)-glukan dikenal dengan nama **Curdlan**. (Yotsuzuka 1998)

Curdlan dapat membentuk gel (*gel forming*) pada saat dilarutkan dengan H_2O panas. Gel ini bersifat stabil pada kisaran pH 3.0 – 9.5 dan tahan pada proses pendinginan. Pemanasan yang berlebih (> 100 $^{\circ}\text{C}$) dapat merusak konformasi gel ini. (Sutherland 1990)

Struktur β -(1,3)-glukan dapat dilihat pada Gambar 1 berikut ini :

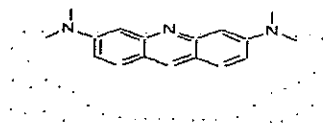


Gambar 1. Struktur Linear β -(1,3)-glukan (Cheeseman 1995)

Acridine Orange

Acridine orange merupakan salah satu pereaksi kimia yang telah banyak digunakan dalam teknik mutagenesis. Pereaksi ini dapat menyebabkan mutasi yang bersifat dapat merubah kerangka gen (*Frameshift mutation*). Perubahan ini terjadi pada satu atau lebih pasangan basa pada sekuen polinukleotida gen. (Dale 1989)

Ukuran molekul acridine orange yang tepat seperti ukuran mononukleotida yaitu sebesar 3.4 \AA memudahkan dalam proses pengkelatan (Crueger 1984) antara basa purin dan pirimidin pada DNA normal. Pengkelatan oleh acridine orange dapat mempengaruhi struktur heliks ganda DNA karena dapat menyebabkan terjadinya delesi dan adesi basa. (Klug 1991). Struktur acridine orange dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur acridine orange (Milekovskaya 2000)

Mutagenesis *Agrobacterium sp.*

Mutagenesis terhadap *Agrobacterium sp.* menggunakan acridine orange untuk meningkatkan potensinya dalam memproduksi β -(1,3)-glukan dibandingkan dengan tipe liar. Pereaksi yang diberikan dengan berbagai konsentrasi tertentu bertujuan untuk mendapatkan mutan dengan tipe yang sangat bervariasi dan mampu memproduksi β -(1,3)-glukan yang tinggi.

Variasi komposisi medium dilakukan dengan memperhitungkan pH medium. pH yang digunakan adalah pH 7. Peningkatan nilai pH seiring dengan perubahan komposisi medium dapat membunuh bakteri. (Drazic 1970)

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Alat yang dipakai adalah neraca analitik *Mettler AB 204 Toledo*, laminar air flow, autolaf tipe vertikal model *TA-360*, shaker *K 5250 Basic*, inkubator *Yamato Scientific CD LTD*, sentrifus *Biofuge 28RS*, sentrifus *Biofuge 13*, spektrofotometer UV Vis *Shimadzu UV 160*, Fraction Collector *Pharmacia LKB*. Redi Frac, ose, mikropipet 5000 μL , 1000 μL , 200 μL , tusuk gigi steril, peralatan gelas, vortek, kolom DEAE *Sepharose*, dan kolom PD-10 (*G-25 Sephadex*).

Bahan yang digunakan adalah biakan murni *Agrobacterium radiobacter* IFO 12665 A1.5, bakteri referensi yang diperoleh dari Jepang dan biakan lokal Bro 121 hasil isolasi dari tumor tanaman brokoli di Lembang-Bandung, medium selektif *Agrobacterium sp.*, medium LB (Luria Bertani), medium LA, larutan Tm Buffer, larutan Acridine orange, HCl 5 N, larutan folin C, H₂SO₄ pekat, etanol absolut, fenol 5 %, NaOH 1 N, asam glukoronat, BSA (Bovine Serum Albumin), KCl 0.5 M, D-xilosa, D-glukosa, kertas karbon, dan akuades steril.

Metode

Peremajaan isolat *Agrobacterium sp*

Isolat *Agrobacterium sp* A1.5 dan Bro-121 yang segar dikultur dalam medium padat LA hingga didapatkan satu koloni murni terpisah. Koloni murni tersebut dikultur dalam 3mL medium LB selama 18 – 24 jam dalam kondisi goyangan 150 rpm (putaran per menit) pada suhu ruang. Kultur tersebut kemudian diinokulasikan kembali ke 20 mL medium LB sebanyak 1% dan dikubasi dalam kondisi goyangan 100 rpm selama 24 jam. Kultur sel bakteri segar selanjutnya digunakan untuk mutagenesis.

Mutagenesis

Suspensi bakteri murni kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 g selama 5 menit dengan suhu 4^o C. Pelet yang dihasilkan kemudian diresuspensikan menggunakan larutan Tm buffer dan ditambah dengan larutan acridine orange hingga total volume 20 mL dengan variasi konsentrasi final larutan dari 50, 100, dan 150 $\mu\text{g/mL}$. Suspensi biakan ini didiamkan selama 30 menit dalam kondisi tanpa goyangan.

Suspensi lalu disentrifugasi dengan kecepatan 5000 g selama 5 menit dengan suhu 4^o C dan pelet

yang terbentuk diresuspensi menggunakan medium LB kemudian di *recovery* selnya selama 2 jam dalam media LB di dalam inkubator 30^o C pada keadaan gelap menggunakan kertas karbon. Suspensi sel ini kemudian dilakukan pengenceran seri menggunakan akuades hingga 10⁷. (Gerhaldt 1994) Pengenceran ke 10⁵, 10⁶, dan 10⁷ dipipet 200 μL ke cawan petri berisi media LA padat. Biakan kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator 30^o C dan dilakukan perhitungan koloni mutan yang tumbuh. (Hadioetomo 1993)

Biakan mutan yang tumbuh kemudian di seleksi dan dipindahkan ke dalam cawan petri berisi media LA padat menggunakan tusuk gigi steril. Setelah koloni tumbuh kemudian dipindahkan kedalam tabung reaksi berisi media LA miring. (Gerhaldt 1994) Pemindahan mutan dilakukan duplo untuk digunakan sebagai stok kultur dan untuk dievaluasi produksi β -(1,3)-glukan. Pemilihan koloni mutan didasarkan kepada bentuk koloni yang unik dan berbeda satu dengan lainnya. Sebanyak 1 ose masing-masing mutan dipindah ke dalam 5 mL medium PY. Seluruh biakan di shaker dengan putaran 150 rpm pada suhu ruang selama 2 hari. Koloni yang tumbuh siap untuk diekstraksi dan dianalisis.

Metode ekstraksi

Sebanyak 5 ml suspensi bakteri dalam medium PY dipindah ke dalam 100 mL medium fermentasi dan dilakukan inkubasi dalam shaker selama 5 hari dengan kecepatan 150 rpm. Suspensi biakan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 g selama 30 menit dengan suhu 25^oC. Pelet sel ditambah dengan 25 mL HCl 5N kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 g selama 30 menit. Pelet ditambah NaOH 1N dan disentrifugasi kembali. Pelet yang terbentuk dikeringkan pada suhu < 50^oC dan ditimbang sebagai bobot kering sel. Supernatan ditambah HCl 5N hingga volume tertentu sehingga tercapai pH 7 dan dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 g selama 30 menit. Pelet yang terendapkan merupakan bobot β -(1,3)-glukan dan dipisahkan dari supernatannya. Pelet dicuci dengan 15 mL H₂O dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 5.000 g selama 25 menit. Supernatan dipisahkan dan pelet dimurnikan dengan etanol 25 mL lalu disentrifugasi 5.000 g selama 15 menit. Pelet yang terbentuk dikeringkan pada suhu ruang dan ditimbang bobotnya sebagai bobot β -(1,3)-glukan. Perhitungan bobot adalah selisih antara bobot tabung kosong dan bobot tabung berisi pelet. (Harada 1965)

Analisis Kimia

Analisis kimia yang dilakukan adalah analisis kadar heksosa, pentosa, asam glukoronat dan protein. Analisis kadar heksosa menggunakan standar D-glukosa dan analisis pentosa menggunakan D-xilosa. Analisis kadar protein menggunakan standar BSA (Bovine Serum Albumin) dan kadar asam glukoronat menggunakan standar asam α -glukoronat. Sampel yang dianalisis adalah pelet β -(1,3)-glukan. Pelet ini diresuspensi menggunakan 1 ml akuades steril.

Analisis kadar glukosa dilakukan dengan membuat deret standar glukosa dari larutan standar glukosa 1000 ppm yaitu berturut-turut 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 200, dan 300 ppm. Dipipet sebanyak 0.1 ml sampel diencerkan dengan 0.9 ml akuades steril dan 1 ml deret standar glukosa dengan konsentrasi beragam. Standar dan sampel kemudian ditambah dengan 0.5 ml fenol 5% dan divortex agar homogen kemudian ditambah dengan 2.5 ml H_2SO_4 pekat dan didiamkan 10 menit lalu divortex, selanjutnya larutan dididihkan selama 15 menit dan didinginkan. Analisis glukosa dilakukan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 490 nm. Analisis kadar xilosa dan asam glukoronat dilakukan dengan metode yang sama pada panjang gelombang 480 nm. (Breedveld 1990)

Analisis kadar protein dilakukan terhadap pelet β -(1,3)-glukan dan pelet sel kering menggunakan metode Lowry. Sampel sebanyak 0.2 ml diencerkan dengan 0.8 ml akuades steril. Dibuat deret standar BSA dengan konsentrasi berturut-turut 0, 40, 60, 80, 120, 160, dan 200 ppm dari larutan standar BSA 1000 ppm. Larutan sampel dan standar masing-masing dipipet 0.5 ml lalu ditambah dengan 0.5 ml NaOH 1 N. Larutan dididihkan 20 menit kemudian ditambah dengan 2.5 ml larutan D, divortex dan didiamkan selama 10 menit. Setelah dingin ditambah dengan 0.5 ml folin C. Larutan didiamkan 30 menit dan siap dianalisis menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm. (Lowry 1954)

Purifikasi β -(1,3)-glukan

β -(1,3)-glukan yang telah dianalisis kemudian dipurifikasi. Sebanyak 100 μ L sampel dalam bentuk larutan dimasukkan dalam kolom yang berisi gel DEAE Sepharose. Kolom tersebut lalu dialiri dengan akuades sebanyak 3mL. Air yang dikeluarkan dipisahkan ke dalam fraksi-fraksi tertentu sebagai fraksi air. Setelah fraksi air ditampung, kolom lalu dielusi dengan larutan KCl

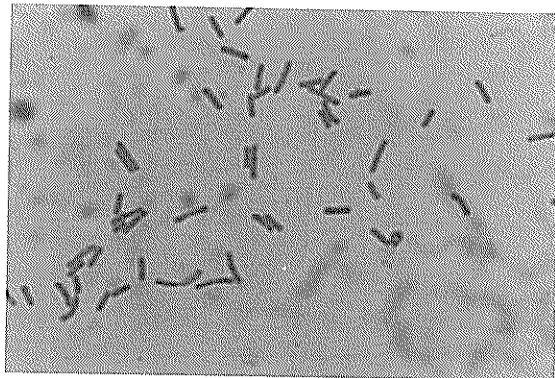
0.5M. Larutan yang keluar merupakan gradien KCl yang lalu ditampung sebagai fraksi KCl.

Kadar glukosa yang ada di dalam fraksi air dan fraksi KCl lalu dianalisis kadarnya dengan menggunakan metode fenol sulfat. Fraksi dengan kadar glukosa tertinggi lalu dikumpulkan dan dilakukan proses *desalting*. Proses ini dilakukan dengan memasukkan 2.5 mL larutan sampel ke dalam kolom PD-10 (G-25 Sephadex) dan didiamkan hingga larutan sampel menyerap ke dalam permukaan gel. Kolom tersebut dielusi dengan akuades sebanyak 3,5 mL dan setiap tetesan yang keluar ditampung ke dalam tabung-tabung sebanyak 10 tetes air. Kadar glukosa pada sampel lalu dianalisis menggunakan metode fenol sulfat. (Breedveld 1990)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi bakteri *Agrobacterium sp.*

Karakterisasi awal terhadap bakteri *Agrobacterium sp.* dilakukan dengan menggunakan metode pewarnaan Gram. Bakteri yang telah diwarnai kemudian diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10 X 100 kali. Pada gambar 3 diperlihatkan morfologi bakteri *Agrobacterium sp.* hasil pewarnaan Gram.



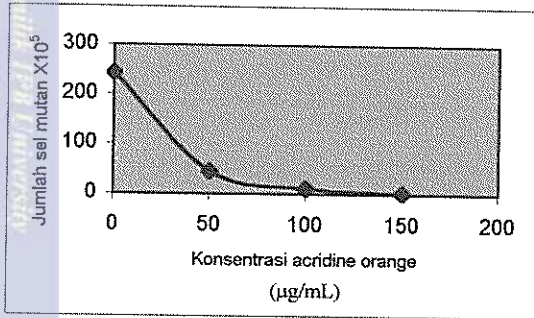
Gambar 3. Bentuk morfologi sel bakteri *Agrobacterium sp.* hasil pewarnaan Gram pada perbesaran 10 X 100 kali dibawah mikroskop.

Bakteri Gram negatif akan berwarna merah sedang bakteri Gram positif akan berwarna ungu. *Agrobacterium sp.* merupakan bakteri Gram negatif sehingga dapat menyerap warna merah. Hal ini disebabkan karena bakteri Gram negatif memiliki peptidoglikan yang lebih tipis pada dinding selnya sehingga warna ungu akan tercuci

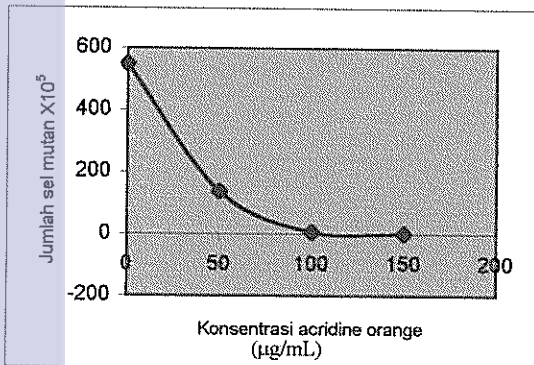
oleh alkohol dan yang terserap adalah warna merah.

Mutagenesis *Agrobacterium sp.*

Mutagenesis dilakukan menggunakan pereaksi acridine orange dengan berbagai konsentrasi mulai 0 hingga 150 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Grafik hubungan antara jumlah sel bakteri yang hidup dengan konsentrasi acridine orange diperlihatkan pada Gambar 4 dan Gambar 5. Semakin besar konsentrasi acridine orange yang diberikan maka jumlah sel yang hidup semakin berkurang.

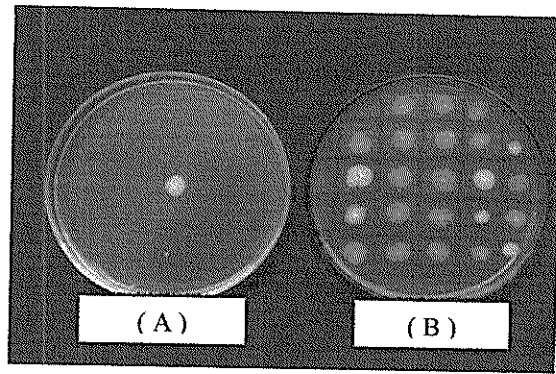


Gambar 4. Grafik hubungan konsentrasi acridine orange ($\mu\text{g} / \text{mL}$) dan jumlah sel mutan *Agrobacterium* Bro 121.



Gambar 5. Grafik hubungan konsentrasi acridine orange ($\mu\text{g} / \text{mL}$) dan jumlah sel mutan *Agrobacterium* A1.5.

Mutagenesis yang dilakukan terhadap bakteri *Agrobacterium sp.* dengan perlakuan variasi konsentrasi menghasilkan mutan-mutan dengan bentuk koloni yang bervariasi. Seleksi koloni mutan dilakukan dengan membandingkan koloni mutan dengan koloni tipe liarnya. Gambar 6 memperlihatkan perbedaan morfologi bakteri mutan dan liar.



Gambar 6. Perbedaan bentuk koloni bakteri *Agrobacterium sp.* (A) tipe liar dan (B) mutan

Perolehan isolat mutan dari bakteri *Agrobacterium sp.* referensi A1.5 sebanyak 69.590, diseleksi menjadi 21 koloni dan bakteri lokal Bro 121 sebanyak 3.055, diseleksi menjadi 19 koloni, seleksi dilakukan berdasarkan perbedaan morfologi dan dievaluasi produksi β -(1,3)-glukan dalam skala kecil. Bobot β -(1,3)-glukan hasil ekstraksi terhadap 19 isolat A1.5 dan 21 isolat Bro 121 mutan tersebut tercantum pada lampiran 2.

Tahap selanjutnya seleksi mutan berpotensi menghasilkan β -(1,3)-glukan dengan menggunakan metode ekstraksi hingga didapatkan mutan dengan bobot β -(1,3)-glukan tertinggi.

Ekstraksi β -(1,3)-glukan

Ekstraksi β -(1,3)-glukan mutan yang menghasilkan bobot yang berbeda dibandingkan dengan tipe liar. Perhitungan bobot sel kering bakteri dilakukan dengan menghitung selisih tabung sentrifus berisi sel kering dan tabung kosongnya. Tabel 1 menunjukkan besarnya bobot sel kering bakteri setelah diinkubasi selama 5 hari.

Tabel 1. Bobot kering sel bakteri *Agrobacterium sp.* hasil ekstraksi

No.	Isolat	Jenis isolat	Bobot sel kering (g/L)
1.	B1	Liar Bro 121	0.0205
2.	B4.4	Mutan Bro 121	0.0181
3.	C1	Liar A1.5	0.0302
4.	C4.12	Mutan A1.5	0.0141

Isolat B1 merupakan isolat bakteri Bro 121 tipe liar dan isolat C1 merupakan bakteri A1.5 tipe liar referensi. Sedangkan isolat B4.4 merupakan bakteri mutan Bro 121 dan C4.12 adalah bakteri

mutan A1.5 referensi. Bobot sel kering mutan lebih kecil dari bobot sel kering tipe liar. Hal ini menunjukkan bahwa pereaksi acridine orange mempengaruhi pertumbuhan bakteri *Agrobacterium sp.*

Hasil ekstraksi β -(1,3)-glukan mutan lebih tinggi dari bobot β -(1,3)-glukan tipe liar. Pada tabel 2 dipaparkan bobot β -(1,3)-glukan yang diperoleh dari ekstraksi bakteri *Agrobacterium sp.* dalam 100 mL medium fermentasi.

Tabel 2. Bobot β -(1,3)-glukan hasil ekstraksi dari bakteri *Agrobacterium sp.*

No	Isolat	Jenis isolat	Bobot β -(1,3)-glukan (g/L)
1.	B1	Liar	0.0340
2.	B4.4	Mutan	0.0510
3.	C1	Liar	0.3870
4.	C4.12	Mutan	0.5750

Mutan terpilih merupakan mutan unggul karena mampu tumbuh pada konsentrasi acridine orange tertinggi dari yang diujikan (150 μ g/mL) dan menghasilkan kadar β -(1,3)-glukan tertinggi.

Bobot β -(1,3)-glukan mutan B4.4 meningkat sebesar 50 % dibandingkan tipe liarnya. Sedangkan bobot β -(1,3)-glukan bakteri mutan C4.12 mengalami peningkatan sebesar 48.58 % dibandingkan tipe liarnya. Mutan yang terseleksi mampu menghasilkan β -(1,3)-glukan lebih tinggi dari tipe liarnya dengan bobot kering sel yang jauh lebih rendah.

Analisis kimia

Analisis kimia dilakukan terhadap besarnya kandungan glukosa, xilosa, asam glukoronat dan protein yang terdapat pada sampel β -(1,3)-glukan. Pada tabel 3. dipaparkan besarnya kadar senyawa yang terdapat pada sampel.

Kadar glukosa pada mutan B4.4 mengalami peningkatan sebesar 4 kali lipat dibandingkan tipe liarnya B1. Sedang pada bakteri mutan C4.12 mengalami peningkatan sebesar 99.8 kali lipat. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan β -(1,3)-glukan oleh bakteri lokal lebih kecil dibandingkan dengan peningkatan oleh bakteri referensi A1.5. Namun demikian diketahui juga bahwa masih banyak senyawa lain yang berkaitan dengan produksi β -(1,3)-glukan yaitu senyawa xilosa, asam glukoronat dan protein.

Tabel 3. Kadar senyawa kimia dalam β -(1,3)-glukan hasil analisis dengan spektrofotometer

Isolat	Glukosa (mg/L) per 100 mL medium	Xilosa (mg/L) per 100 mL medium	Asam glukoronat (mg/L) per 100 mL medium	Protein (mg/L) per 100 mL medium
B1	0.1260	0.0832	0.0063	1.5600
B4.4	0.5044	0.1664	0.0106	2.9562
C1	0.0010	0.0046	0.0306	4.5586
C4.12	0.0998	0.0854	0.2368	0.4938

Purifikasi β -(1,3)-glukan

Purifikasi sampel β -(1,3)-glukan yang dilakukan pada kolom DEAE sepharose ditampung sebagai fraksi-fraksi. Sampel akan dilalukan ke dalam kolom berisi matrix *Sepharose* Prinsip kerja pemurnian sampel berdasarkan pertukaran anion, atau sampel akan diikat oleh gugus amina (NH₂-) pada matrix kemudian dilakukan elusi dengan gradien KCl maka senyawa yang terikat dalam matrix akan lepas melewati kolom sebagai fraksi-fraksi sesuai dengan kekuatan ikatannya.

Pengukuran kadar glukosa dalam tiap fraksi menggunakan metode yang sama. Tabel 4 menunjukkan besarnya kadar glukosa yang dianalisis setelah purifikasi. Pengukuran glukosa setelah purifikasi dengan sepharose dimaksudkan untuk mengetahui fraksi yang mengandung glukosa paling tinggi untuk selanjutnya dipurifikasi ke dalam kolom *sephadex*.

Tabel 4. Kadar glukosa hasil purifikasi dengan kolom DEAE Sepharose

Isolat	Fraksi ke	Glukosa (mg/L)
B1	33	1.0023
B4.4	29	0.0475
C1	28	0.2388
C4.12	19	0.0134

Fraksi dengan kadar glukosa tertinggi dipurifikasi kembali dengan menggunakan kolom PD-10 Sephadex yaitu pemisahan berdasarkan pada perbedaan bobot molekul. Hasil analisis glukosa fraksi diperlihatkan pada tabel 5.

Kadar glukosa setelah dipurifikasi menggunakan kolom PD-10 *Sephadex* pada bakteri B1 mengalami penurunan sebesar 0.0039 kali lipat sedang pada bakteri mutan B4.4 mengalami

mutan A1.5 referensi. Bobot sel kering mutan lebih kecil dari bobot sel kering tipe liar. Hal ini menunjukkan bahwa pereaksi acridine orange mempengaruhi pertumbuhan bakteri *Agrobacterium sp.*

Hasil ekstraksi β -(1,3)-glukan mutan lebih tinggi dari bobot β -(1,3)-glukan tipe liar. Pada tabel 2 dipaparkan bobot β -(1,3)-glukan yang diperoleh dari ekstraksi bakteri *Agrobacterium sp.* dalam 100 mL medium fermentasi.

Tabel 2. Bobot β -(1,3)-glukan hasil ekstraksi dari bakteri *Agrobacterium sp.*

No	Isolat	Jenis isolat	Bobot β -(1,3)-glukan (g/L)
1.	B1	Liar	0.0340
2.	B4.4	Mutan	0.0510
3.	C1	Liar	0.3870
4.	C4.12	Mutan	0.5750

Mutan terpilih merupakan mutan unggul karena mampu tumbuh pada konsentrasi acridine orange tertinggi dari yang diujikan (150 μ g/mL) dan menghasilkan kadar β -(1,3)-glukan tertinggi.

Bobot β -(1,3)-glukan mutan B4.4 meningkat sebesar 50 % dibandingkan tipe liarnya. Sedangkan bobot β -(1,3)-glukan bakteri mutan C4.12 mengalami peningkatan sebesar 48.58 % dibandingkan tipe liarnya. Mutan yang terseleksi mampu menghasilkan β -(1,3)-glukan lebih tinggi dari tipe liarnya dengan bobot kering sel yang jauh lebih rendah.

Analisis kimia

Analisis kimia dilakukan terhadap besarnya kandungan glukosa, xilosa, asam glukoronat dan protein yang terdapat pada sampel β -(1,3)-glukan. Pada tabel 3. dipaparkan besarnya kadar senyawa yang terdapat pada sampel.

Kadar glukosa pada mutan B4.4 mengalami peningkatan sebesar 4 kali lipat dibandingkan tipe liarnya B1. Sedang pada bakteri mutan C4.12 mengalami peningkatan sebesar 99.8 kali lipat. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan β -(1,3)-glukan oleh bakteri lokal lebih kecil dibandingkan dengan peningkatan oleh bakteri referensi A1.5. Namun demikian diketahui juga bahwa masih banyak senyawa lain yang berkaitan dengan produksi β -(1,3)-glukan yaitu senyawa xilosa, asam glukoronat dan protein.

Tabel 3. Kadar senyawa kimia dalam β -(1,3)-glukan hasil analisis dengan spektrofotometer

Isolat	Glukosa (mg/L) per 100 mL medium	Xilosa (mg/L) per 100 mL medium	Asam glukoronat (mg/L) per 100 mL medium	Protein (mg/L) per 100 mL medium
B1	0.1260	0.0832	0.0063	1.5600
B4.4	0.5044	0.1664	0.0106	2.9562
C1	0.0010	0.0046	0.0306	4.5586
C4.12	0.0998	0.0854	0.2368	0.4938

Purifikasi β -(1,3)-glukan

Purifikasi sampel β -(1,3)-glukan yang dilakukan pada kolom DEAE sepharose ditampung sebagai fraksi-fraksi. Sampel akan dilakukan ke dalam kolom berisi matrix *Sepharose* Prinsip kerja pemurnian sampel berdasarkan pertukaran anion, atau sampel akan diikat oleh gugus amina (NH₂-) pada matrix kemudian dilakukan elusi dengan gradien KCl maka senyawa yang terikat dalam matrix akan lepas melewati kolom sebagai fraksi-fraksi sesuai dengan kekuatan ikatannya.

Pengukuran kadar glukosa dalam tiap fraksi menggunakan metode yang sama. Tabel 4 menunjukkan besarnya kadar glukosa yang dianalisis setelah purifikasi. Pengukuran glukosa setelah purifikasi dengan sepharose dimaksudkan untuk mengetahui fraksi yang mengandung glukosa paling tinggi untuk selanjutnya dipurifikasi ke dalam kolom *sephadex*.

Tabel 4. Kadar glukosa hasil purifikasi dengan kolom DEAE Sepharose

Isolat	Fraksi ke	Glukosa (mg/L)
B1	33	1.0023
B4.4	29	0.0475
C1	28	0.2388
C4.12	19	0.0134

Fraksi dengan kadar glukosa tertinggi dipurifikasi kembali dengan menggunakan kolom PD-10 *Sephadex* yaitu pemisahan berdasarkan pada perbedaan bobot molekul. Hasil analisis glukosa fraksi diperlihatkan pada tabel 5.

Kadar glukosa setelah dipurifikasi menggunakan kolom PD-10 *Sephadex* pada bakteri B1 mengalami penurunan sebesar 0.0039 kali lipat sedang pada bakteri mutan B4.4 mengalami

penurunan 0.2910 kali lipat dibandingkan sebelum purifikasi. Pada bakteri C1 mengalami peningkatan sebesar 29 kali lipat dan pada C4.12 mengalami penurunan sebesar 0.0010 kali lipat dibandingkan sebelum purifikasi.

Tabel 5. Kadar glukosa hasil purifikasi dengan kolom PD-10 *Sephadex*

Isolat	Frakasi Ke	Glukosa (mg/L)
B1	8	0.0868
B4.4	17	0.2134
C1	4	0.0290
C4.12	9	0.0960

Sephadex merupakan kolom yang digunakan untuk proses *desalting* yaitu proses yang digunakan untuk memisahkan senyawa yang memiliki ukuran yang berbeda. Kolom memiliki matrix dengan lubang porisitas yang berbeda. Pada penelitian ini digunakan kolom PD-10 yang merupakan kolom yang memiliki pori yang khas untuk memisahkan molekul dengan bobot molekul (BM) antara 1000-5000 dan matrix kolom ini memiliki ukuran partikel sebesar 85-260 μ m. Molekul polisakarida yang lebih besar dari ukuran pori matrix tidak dapat masuk ke dalam matrik sehingga akan dengan mudah melewati matrix dan keluar sebagai fraksi dengan BM yang tinggi yang diikuti dengan molekul polisakarida yang lebih kecil BM-nya.

Hasil *desalting* dengan *sephadex* diperoleh kadar glukosa yang lebih rendah dibandingkan dengan kadar glukosa tanpa pemurnian β -(1,3)-glukan (crude). Hal ini menunjukkan bahwa pada analisis awal terhadap β -(1,3)-glukan, masih terdapat senyawa-senyawa lain sebagai pengotor yang mempengaruhi hasil pengukuran konsentrasi glukosa. Kemungkinan pada β -(1,3)-glukan berikatan antarmolekul dengan senyawa lain seperti sakarida lainnya. Pada proses hidrolisis menggunakan H_2SO_4 tidak semua senyawa tersebut dapat dengan mudah lepas sehingga glukosa yang terhitung lebih tinggi dari nilai sebenarnya. Oleh karena itu dilakukan pengukuran terhadap kadar xilosa, asam glukoronat dan protein sebagai data pendukung.

Konsentrasi glukosa pada isolat B4.4 mengalami penurunan paling tinggi yaitu sebesar 29.10 %. Hal ini menunjukkan bahwa pada pengukuran awal, konsentrasi glukosa yang terukur masih dipengaruhi oleh senyawa lainnya yang terikat kuat. Glukosa yang terukur masih berikatan

dengan senyawa lainnya, dibuktikan dengan perhitungan kadar xilosa awal isolat ini sebesar 0.1664 g/L. Konsentrasi xilosa isolat ini lebih tinggi dari pada konsentrasi xilosa isolat lainnya. Isolat C1 mengalami peningkatan konsentrasi glukosa sebesar 29 kali lipat, konsentrasi xilosa awal isolat ini paling rendah. Banyaknya xilosa yang terdapat pada β -(1,3)-glukan mempengaruhi besarnya konsentrasi glukosa setelah dipurifikasi.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Hasil penelitian mutagenesis yang dilakukan menggunakan pereaksi acridine orange terhadap bakteri *Agrobacterium sp.* dapat menghasilkan mutan dengan kemampuan memproduksi β -(1,3)-glukan yang lebih tinggi dibandingkan dengan tipe liarnya yaitu isolat B4.4 dan isolat C4.12.

Pemurnian yang dilakukan menggunakan kolom *Sephadex* menghasilkan glukosa yang lebih rendah dari konsentrasi awal. Besarnya konsentrasi xilosa sangat mempengaruhi glukosa yang terukur pada β -(1,3)-glukan. Semakin besar konsentrasi xilosa pada sampel maka tingkat kemurnian glukosa semakin rendah demikian pula sebaliknya.

Saran

Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan dengan menggunakan pereaksi lain yang bersifat mutagen guna menghasilkan mutan yang lebih bervariasi dan lebih unggul dalam menghasilkan β -(1,3)-glukan. Selain itu perlu dilakukan pengujian terhadap kestabilan produksi β -(1,3)-glukan yang dihasilkan oleh mutan.

DAFTAR PUSTAKA

- Bernal G, Illanes A, Ciampi L. 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus sp.* with antibiotic activity against plant pathogenic agent. *J Bacteriology* 5: 1-2.
- Breedveld MW, Karen JM. 1994. Cyclic β -glucan of member of family *Rhizobiaceae*. *Microbiological Rev* 58:145-148.
- Crueger W, Crueger A. 1984. Biotechnology : A Text Book of Industrial Microbiology. Sinauer Associates, inc. USA.
- Cheeseman I.W, R Malcom BJ. 1995. Microscopy of Curdlan Structure. Molecular Biology Research. Texas.
- Dale JW. 1989. Molecular Genetic of bacteria. A. Waley Interscience Pub. UK.
- Drazic M, Vladimir D. 1970. Mutagenic action of N-Methyl-N-Nitrosoguanidine on *Gaffkya tibisci* at alkaline pH. *J Bacteriology* 104: 585-587
- Gerhaldt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR. 1994. Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology. USA.
- Grimm K. 1978. Comparison of spontaneous, UV-induced, and nitrosoguanidine-induced mutability to drug resistance in mycobacteria. *J Bacteriology* 135: 748- 753.
- Hadioetomo RS.. 1993. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek. Gramedia. Jakarta.
- Harada. 1965. In Hisamatsu. M. *et al* .1977. Change in ability of *Agrobacterium* to produce water soluble and water insoluble β -glucan. *J of General Microbiology* 103:375-379
- Jusuf M. 1993. Genetika I. IPB. Bogor.
- Kandler O, Weiss N. 1986. Regular, Nonsporing Gram - Positive Rods. In Sneath PHA *et al*, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2. Williams & Wilkins Co. Baltimore.
- Klug WS, Cummings MR. 1991. Concepts of genetics. Macmillan Publishing Company. USA.
- Krerg NR, Jhon GH. 1984. Bergey's manual of determinative bacteriology. William & Witkin. USA.
- Lowry OH, Nira JRA, Lewis F, Rose JR. 1954. Protein measurement with the folin phenol reagen. *J Biol Chem* 193: 265-273.
- Milekovskaya E, William D. 2000. Visualization of phospholipid domain in *Escherichia coli* by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-Nonyl acridine orange. *J Bacteriology* 182: 1-8.
- Petczar MJ, Chan ECS. 1993. Mikrobiologi jilid I. UI press. Jakarta.
- Sutherland IW. 1990. Biotechnology of microbial exopolysacarides. Cambridge University Press. Australia.
- Wu TK, Griffin JH. 2002. Conversion of a plant oxidosqualene- Cycloartenol Synthase o an Oxidoqualene-Lanosterol Cyclase by Random Mutagenesis. *Biochemistry Rev* 41: 8238-9844.
- Yotsuzuko F. 1998. Properties and application of curdlan. *J Food Science* 63: 1-4.

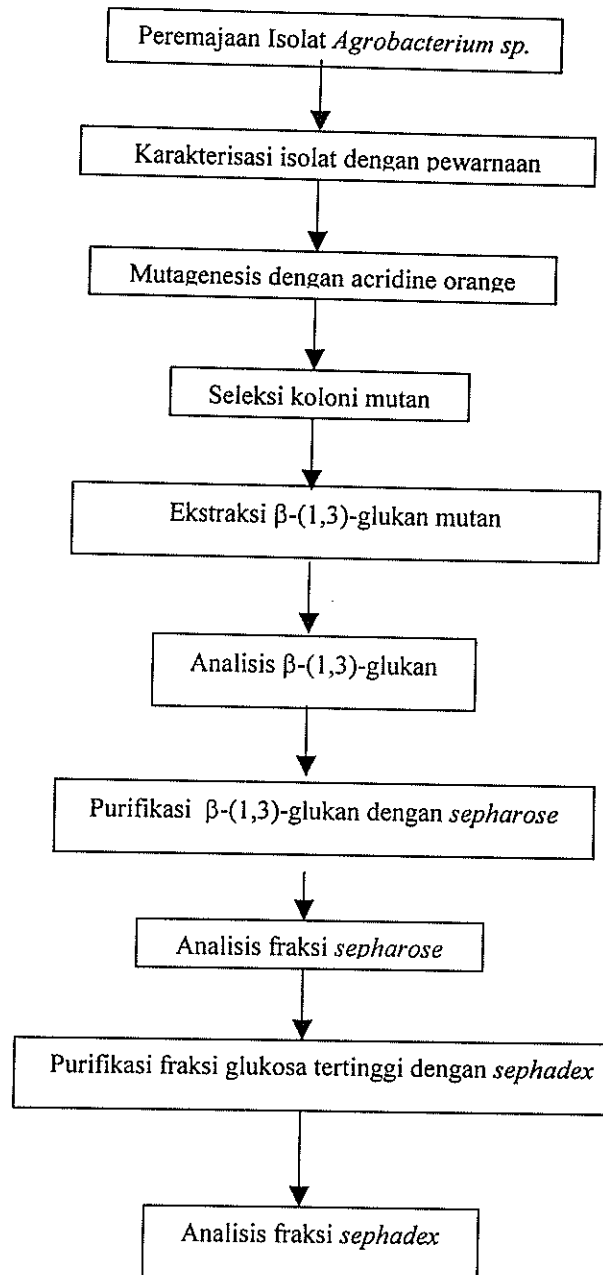


Lampiran

Hal Cipta (Hak Cipta) Unsur-unsur yang
1. Dianggap sebagai salah satu unsur yang merupakan unsur dan merupakan unsur
a. Berwujud (bentuk fisik) atau tidak berwujud (wujud), misalnya, tulisan karya ilmiah, penemuan ilmiah, penemuan karya atau tulisan atau masalah
b. Berwujud atau tidak berwujud (wujud) yang wajar (IPB University)
2. Dianggap sebagai unsur dan merupakan unsur yang ada sebagai karya tulis (dianggap sebagai unsur yang ada) IPB University

Lampiran 1

Diagram alir penelitian



Lampiran 2. Tabel bobot β -(1,3)-glukan hasil ekstraksi skala kecil

Bobot β -(1,3)-glukan mutan A1.5 hasil ekstraksi skala kecil (g/3mL)

No	Kode	Bobot β -(1,3)-glukan (g/3mL)
1.	C1	0.0005
2.	C4.1	0.0003
3.	C4.2	0.0004
4.	C4.3	0.0003
5.	C4.4	0.0003
6.	C4.5	0.0004
7.	C4.6	0.0002
8.	C4.7	0.0002
9.	C4.8	0.0002
10.	C4.12	0.0006
11.	C4.13	0.0002
12.	C4.14	0.0002
13.	C4.15	0.0006
14.	C4.16	0.0004
15.	C4.17	0.0005
16.	C4.18	0.0005
17.	C4.19	0.0002
18.	C4.20	0.0004
19.	C4.21	0.0004
20.	C4.22	0.0004
21.	C4.12	0.0004

Bobot β -(1,3)-glukan mutan Bro121 hasil ekstraksi skala kecil (g/3mL)

No	Kode	Bobot β -(1,3)-glukan (g/3mL)
1.	B1	0.0007
2.	B2.3	0.0005
3.	B2.4	0.0005
4.	B2.5	0.0003
5.	B2.1	0.0003
6.	B2.3	0.0003
7.	B2.4	0.0007
8.	B3.7	0.0006
9.	B3.9	0.0007
10.	B4.1	0.0006
11.	B4.2	0.0003
12.	B4.4	0.0049
13.	B4.6	0.0003
14.	B4.7	0.0001
15.	B4.8	0.0009
16.	B4.9	0.0007
17.	B4.10	0.0005
18.	B4.11	0.0004
19.	B4.12	0.0005

Lampiran 3. Tabel absorbansi standar glukosa

Absorbansi larutan standar glukosa $\lambda = 490 \text{ nm}$

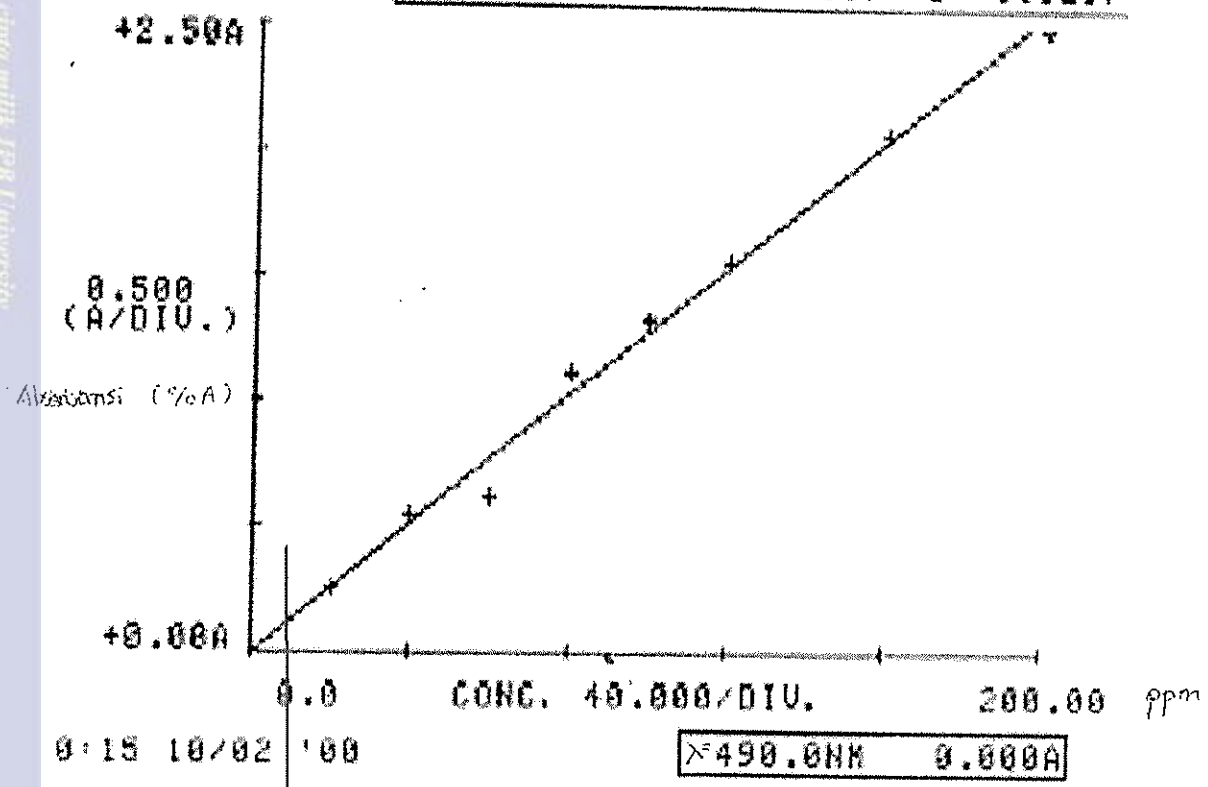
No.	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi (% A)
1.	0	0.0000
2.	20	0.2630
3.	40	0.5500
4.	60	0.6100
5.	80	1.1210
6.	100	1.3260
7.	120	1.5540
8.	160	2.0780

Lampiran 4. Kurva standar glukosa

Persamaan garis : $Y = a + bX$

$$\text{Absorbansi} = 0.1207 + 77.007 [\text{Konsentrasi}]$$

WORKING CURVE $C = K \times \text{ABS} + B$ $K = 77.007$ $B = 0.1207$



Kurva hubungan konsentrasi (ppm) dan absorbansi (% A) standar glukosa

Lampiran 5. Tabel absorbansi standar xilosa

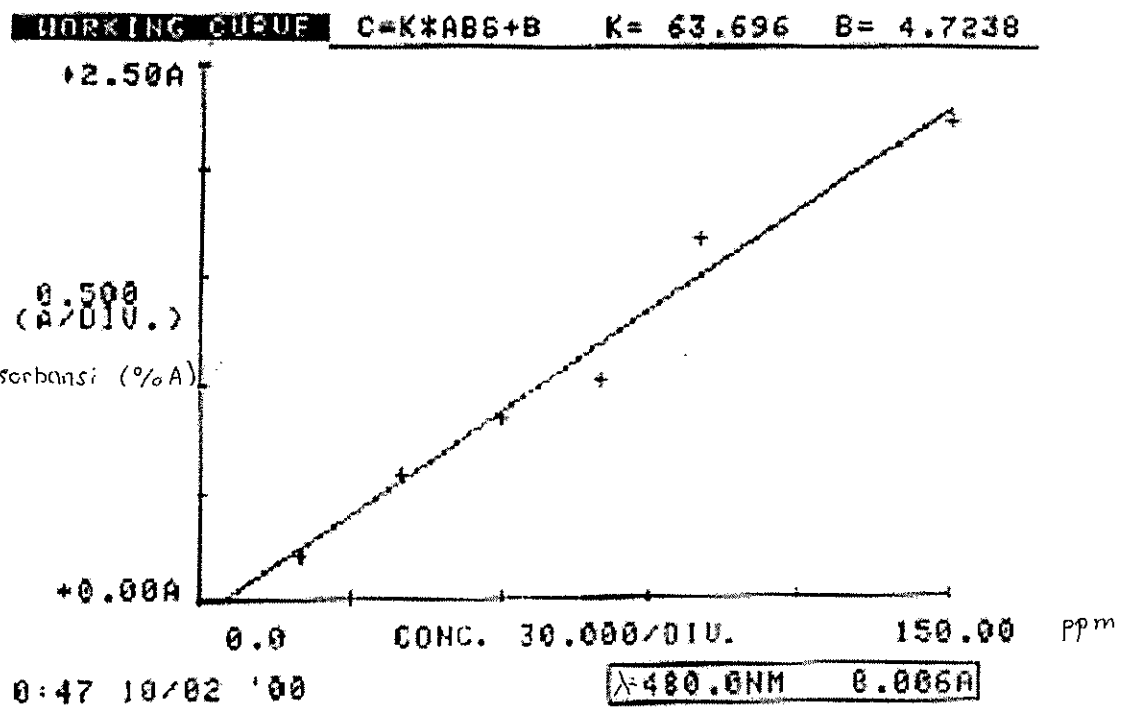
Absorbansi larutan standar xilosa $\lambda = 480 \text{ nm}$

No.	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi (% A)
1.	0	0.0000
2.	20	0.1990
3.	40	0.5860
4.	60	0.8460
5.	80	1.0140
6.	100	1.6750
7.	150	2.2260

Lampiran 6. Kurva standar xilosa

Persamaan garis : $Y = a + bX$

$$\text{Absorbansi} = 4.7238 + 63.696 [\text{Konsentrasi}]$$



Kurva hubungan konsentrasi (ppm) dan absorbansi (% A) standar xilosa

Halaman ini merupakan lampiran yang menunjukkan hasil analisis data yang telah dilakukan. Untuk lebih jelasnya, silakan lihat pada bab-bab sebelumnya. Hal ini merupakan bagian dari laporan praktikum yang harus diserahkan kepada dosen pembimbing. Hal ini merupakan bagian dari laporan praktikum yang harus diserahkan kepada dosen pembimbing.

Lampiran 7. Tabel absorbansi asam glukoronat

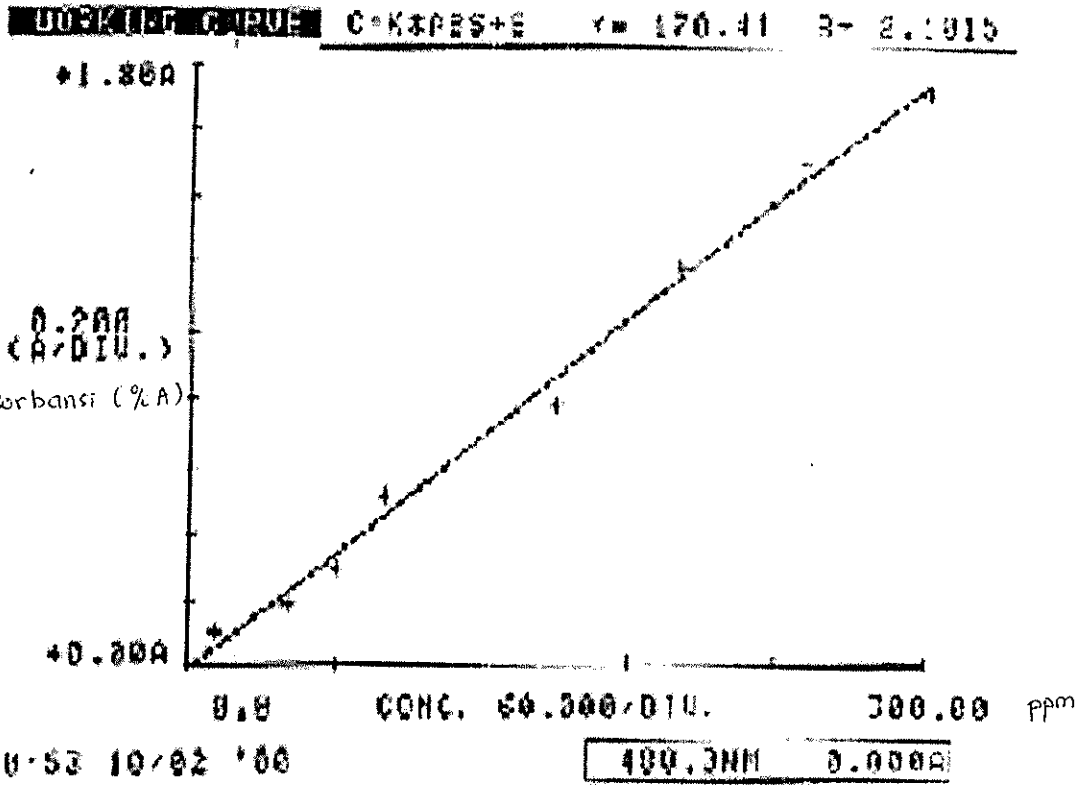
Absorbansi larutan standar asam glukoronat $\lambda = 480 \text{ nm}$

No.	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi (% A)
1.	0	0.0000
2.	20	0.1010
3.	40	0.1840
4.	60	0.2560
5.	80	0.5140
6.	150	0.7810
7.	200	1.1910
8.	250	1.4970
9.	300	1.7220

Lampiran 8. Kurva standar asam glukoronat

Persamaan garis : $Y = a + bX$

Absorbansi = 2.1015 + 170.41 [Konsentrasi]



Kurva hubungan konsentrasi (ppm) dan absorbansi (% A) standar asam glukoronat

Lampiran 9. Tabel absorbansi protein

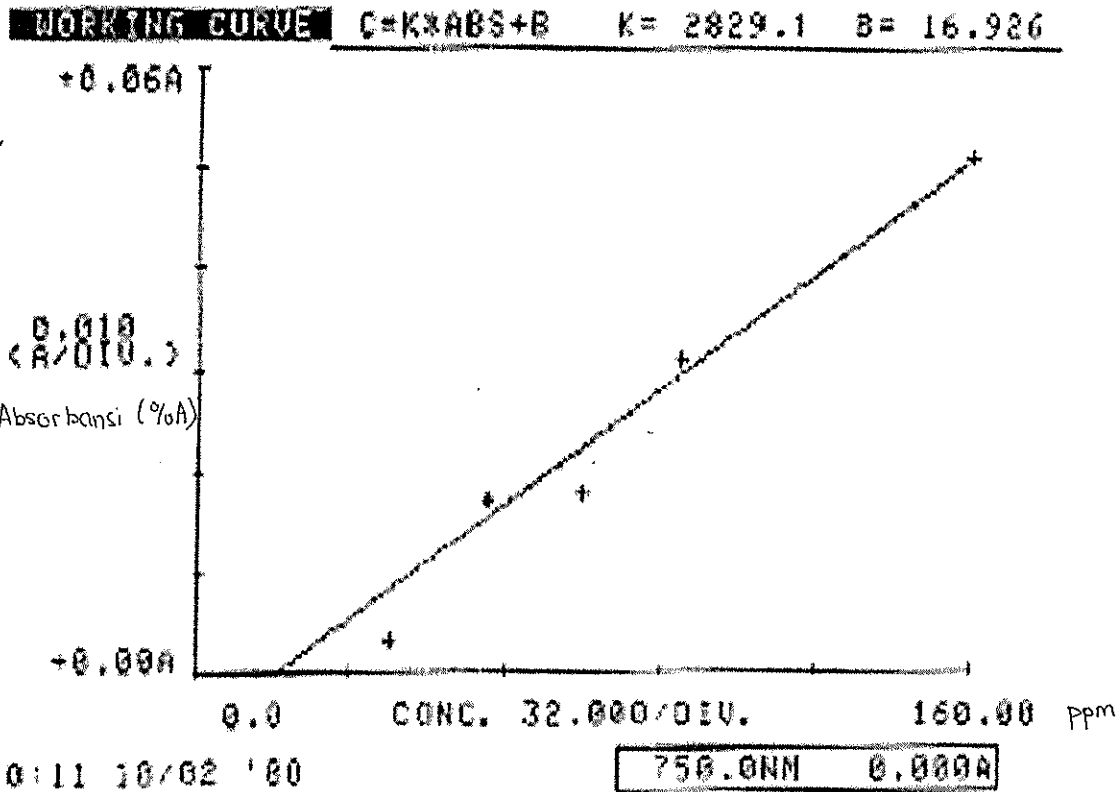
Absorbansi larutan standar protein $\lambda = 750 \text{ nm}$

No.	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi (% A)
1.	0	0.0000
2.	40	0.0030
3.	60	0.0170
4.	80	0.0180
5.	120	0.0310
6.	160	0.0510
7.	200	0.1440

Lampiran 10. Kurva standar protein

Persamaan garis : $Y = a + bX$

$$\text{Absorbansi} = - 16.926 + 2829.1 [\text{Konsentrasi}]$$



Kurva hubungan konsentrasi (ppm) dan absorbansi (% A) standar protein

Lampiran 11. Komposisi medium

Media LB

Bacto tripton 1 %	2.0 g
Yeast Ekstrak 0.5 %	1.0 g
NaCl 1 %	2.0 g
H ₂ O steril	200 mL

Media LA

Bacto tripton 1 %	2.0 g
Yeast Ekstrak 0.5 %	1.0 g
NaCl 1 %	2.0 g
Bacto agar	3.0 g
H ₂ O steril	200 mL

Tm buffer

Tris	6.0 g
Maleic acid	5.8 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g
Fe SO ₄ .7 H ₂ O	0.25 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
Co(Na ₃) ₂	5.0 mg
H ₂ O steril	1.000 mL

Acridine orange

Acridine orange	0.01 g
H ₂ O steril	10 mL

Medium selektif *Agrobacterium*

Glukosa	4.0 g
$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	150 mg
$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	100 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2 \text{O}$	50 mg
Yeast ekstrak	0.1 g
CaCO_3	0.5 g
Solution A	0.1 mL
Solution B	0.1 mL
$\text{H}_2 \text{O}$	100 mL

Solution A

NaCl	1.0 mg
CaCl_2	1.0 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2 \text{O}$	1.0 mg
$\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2 \text{O}$	1.0 mg
H_2O steril	100 mL

Solution B

$\text{ZnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1.0 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	5.0 mg
Natrium molibdat	2.0 mg
$\text{H}_3 \text{BO}_3$	1.0 mg
Tiamin	20 μg
Biotin	2.0 μg
H_2O steril	100 mL



Larutan A

Na ₂ CO ₃	5.0 g
H ₂ O steril	100 mL

Larutan B

CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.0 g
H ₂ O steril	100 mL

Larutan C

Sodium potassium tartrat	2.0 g
H ₂ O steril	100 mL

Larutan D

(50.0 mL) Larutan A + (1.0 mL) larutan B + (1.0 mL) larutan C

Strandar Glukosa

Glukosa	0.0250 g
H ₂ O steril	25.0 mL
Konsentrasi :	1000 ppm

Standar Xilosa

D-Xilosa	0.0100 g
H ₂ O steril	10.0 mL
Konsentrasi :	1000 ppm

Standar Asam Glukoronat

Glucuronic Acid	0.0100 g
H ₂ O steril	10.0 mL
Konsentrasi :	1000 ppm

Standar Protein

BSA (Bovine serum albumin)	0.0100 g
H ₂ O steril	10.0 mL
Konsentrasi :	1000 ppm

