

**SINTESIS GALAKTOOLIGOSAKARIDA SECARA ENZIMATIS
MENGUNAKAN ENZIM β -GALAKTOSIDASE
DARI *ASPERGILLUS ORYZAE***

**KARYA ILMIAH TERTULIS
(SKRIPSI)**

Diajukan Guna Memenuhi Salah Satu Syarat dalam
Menyelesaikan Pendidikan Program Strata Satu
Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember

Oleh :

Eka Ruri Ani

NIM. 971710101031

Dosen Pembimbing :

Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc.

Dr. Ir. Maryanto, M.Eng.

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER**

Juni, 2001

Asal : ...
Pembelian : ...
Terima : ...
No. Induk : 10236064

Klass
574.192
ANI
S

Diterima Oleh :

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER**

Sebagai Karya Ilmiah Tertulis (Skripsi)

Dipertahankan pada :

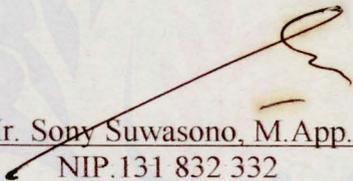
Hari : Kamis

Tanggal : 14 Juni 2001

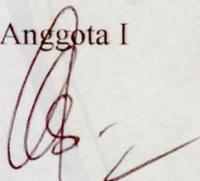
Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember

Tim Penguji

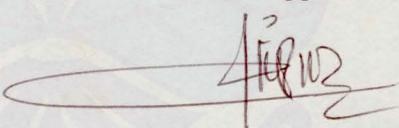
Ketua


Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc.
NIP. 131 832 332

Anggota I


Dr. Ir. Maryanto, M.Eng.
NIP. 131 276 660

Anggota II


Yuli Witono, S.TP. MP.
NIP. 132 206 028

Mengesahkan

Dekan Fakultas Teknologi Pertanian


Ir. Hj. Siti Hartanti, MS.
NIP. 130 350 763

MOTTO

*Apakah manusia itu mengira bahwa
mereka dibiarkan (saja) menyatakan : "Kami telah beriman",
sedang mereka tidak diuji lagi*

(Al-Ankabut : 2)

*.....jadikanlah sholat dan sabar sebagai penolongmu,
sesungguhnya Allah beserta orang-orang yang sabar*

(Al-Baqarah : 153)

Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan

(Alam Nasyrah : 6)

*.....ingatlah hanya dengan mengingat Allahlah
hati menjadi tenteram*

(Ar-Ra'd : 28)

*.....sesungguhnya orang yang paling mulia di sisi Allah,
ialah orang yang paling taqwa.....*

(Al-Hujurat : 13)

*Kutinggalkan untuk kamu dua perkara,
taklah kamu akan tersesat selama-lamanya,
selama kamu masih berpegang (teguh) kepada keduanya,
yaitu Kitabullah dan Sunnah Rasul-Nya*

(Hadits Nabi)

*Luruskan niatmu, Mantapkan hatimu, Satukan tekadmu
hanya karena, beserta, dan untuk
ridha Allah*

PERSEMBAHAN

*Alhamdulillah, hanya dengan ridha-Mulahi **Ya Allah**, akhirnya setitik ilmu dari tak, terhingga banyaknya ilmu-Mu dapat terwujud menjadi sebuah karya nyata, yang kupersembahkan untuk:*

***Dienul Islam** satu-satunya pengisi dan pemberi bekal
jasad, ruh dan akal^{ku} dalam perjalanan panjang tuk berjumpa dengan-Mu*

*Yang kusayangi dan kucintai, **Ibu dan Bapak**,
yang senantiasa menyayangiku, mendidik^{ku}, dan mendoak^{ku} dengan segenap kasih sayang
dan perhatiannya yang tercurahi semenjak aku kecil hingga dewasa*

*Yang kuhormati, **Pakdhe, Budhe, Paklik dan Bulik**,
yang telah memberikan dukungan baik, secara materi dan spiritual*

*Yang kurindukan keceriaan dan kebersamaannya,
Mbak Amik dan Mbak Wirin yang dengannya aku menjadi dewasa
dan mengerti hitam putihnya kehidupan*

*Yang kuharapkan adik-adik^{ku} yang manis,
Wulan, Andhi, Ayi, Eni, Rama, dan Nena, generasi penerus Islam^{ku},
kutunggu kiprahmu di jalan Allah, demi kebangkitan Islam*

***Almamater^{ku}** yang telah membuka cakrawala kerasnya hidup dan kehidupan*

***Bangsa dan negaraku**, dimana nantinya aku berkarya
dan mengaplikasikan ilmuku*

I also dedicate this final assignment for everyone who give me support and motivation to become a better person

1. Ibu Sukmawati, ST yang telah banyak memberiku kajian yang realistis tentang ilmu dan pengalaman menjadi seorang wanita, istri, dan ibu yang mukminah sejati (semoga amalnya mendapat ridha Allah dan salam jihad buat Dik Bebin, Ai', Shifa, dan Rizal) dan Ibu Maryanto yang telah membuka cakrawala fiqh Islam yang suka ditemani Dik Faruq dan Izzah.
2. Mas Eddy yang senantiasa membuatku berusaha untuk menjadi lebih baik dengan menyalakan ruh jihadku (sebuah kisah yang terpenggal di penghujung karyaku, thanks and forgive me for everything).
3. Sobat-sobat setiaku Erna (untuk kebersamaan selama berangkat-pulang kuliah, mengobati lara hati, travelling, and your support when I had the exam), Nurhayati (untuk hobby-nya yang suka memarahiku agar rajin belajar, nggak tidur/pulang melulu, and your existension in the nihgt before I had the final examination), Ima (untuk kesatuan tekad dalam memperjuangkan kebenaran, a great experience in Kosinusteta, it's never forgotten in my life!, and for your support in my exam preparation), you are my family in my study journey.
4. Partner penelitianku Frida and family thanks for being me your friend dengan segala kesabaran, komunikasi, transportasi, dan camilanmu (it's nice memory in Yogya and sorry about your literature).
5. Rekan-rekanku di Kosinusteta Ila, Wardha, Desi, Rudi (Ketum), Jakfar, Endri, Dadang, Nungki, Yuana (it's really hard effort), Novi, Mas Sholeh, dan adik-adikku (Komar, Erfan, Basofi, Vony, Atik, Mariah, Sutarsih, Vita, Fajri, Melik, Santi, Iin) semoga tetap istiqomah di jalan Allah.
6. Dian Anggraeni biro konsultan jihadku (semoga Allah senantiasa meridhaimu), Fazni yang suka tak kerjain, sorry ya ! (AD is not the only one best man!), Ito' dan Usriatin for being my moderator and notulen.
7. Assisten praktikum evaluasi Gizi dalam Pengolahan periode 2000-2001, Agus dan Pamuji thanks for being me as your partner (it's really experienced work).

8. Teman-teman senasib sekost-kostan, Nurul (semoga barokah Allah terlimpah untuk keluarga yang baru kau bentuk), Azif dan Dian yang suka ngegodain aku, adik-adik sekamarku (Dik Dewi yang super sibuk, Dik Ika dan Dik Ninik semoga betah di tempat baru), Dik Sri, Mbak Santi yang centil, Mak Ni yang care ama aku, dan semua kru Kalimantan IV/71.
9. The big family of Kalimantan II/5 as the first host for me in Jember (Mbak Anis, Mbak Vantin, Mbak Sri, Mbak Devi, Mbak Rina, Mbak Yus, Mbak Anita, Mbak Khoir, Mbak Dyah, Vetu, Yuli, dan Mbak I'ti) dan Mr. Sasmito family in Patrang for their kindness.
10. Mbak-mbak angkatanku, Mbak Umi for your files and kindness, Mbak Mari yang sudah memupuk kesabaranku, Mbak Eni, Mbak Yanti dan Mbak Fitri (sobatku di Patrang), Mbak Yunita untuk Rancob-nya.
11. Partner ber-KKN ria, Mbak Ida, Sis, Mas Dian, dan semua kru Gambangan, Maesan, Bondowoso, Kelompok 29 Gelombang I Juli - September, 2000.
12. Sobat-sobat sedaerah yang sama-sama menimba ilmu di Jember, Ari (FP), Hunainah (Poltek), Mbak Luluk (FKIP), Dian (FKG), Enik (FISIP), Aziz (FTP), Ananto dan Rara (FMIPA), Yunawan dan Agus (FH), Dyah (FKIP), dan Mbak Irma (FP), semoga Allah meridhai niat kita.
13. Sobat-sobat SMP dan SMU Kartini, Mbak I'in, Mbak Wagiyati, Mbak Islami, Handa, Hijroh, Said, Iwan, Guntur, Eko, Satya, Bagiyo, Tirto, Alimin, Deni, Rizal, Novi, Joe, Mbak Nining, Mbak Yuyun, Mbak Lisa, Anis, Malik, Yulis, Ilyas, Riza, Dik Etik, Dik Candra, Mbak Rita, dan Evi thanks masih mengingatku dan menjadi temanku.
14. Workshop "Kabira" Rental crew, Mas Agus, Beni, Andi, Aris, Dik Eko, Mas Joko, Mas Hariman, dan Mas Rohmad, yang telah banyak membantuku selama pengetikan skripsi, sekaligus teman ngrental yang funny.

Alhamdulillah
semoga Allah memudakan semua urusanku
dan memudahkan segala hal
Amin

DOSEN PEMBIMBING :

Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc.

(Dosen Pembimbing Utama)

Dr. Ir. Maryanto, M.Eng.

(Dosen Pembimbing Anggota I)

Yuli Witono, S.TP. MP.

(Dosen Pembimbing Anggota II)

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbil alamin, puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulisan Skripsi yang berjudul "Sintesis Galaktooligosakarida secara Enzimatis Menggunakan Enzim β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae*" ini dapat terselesaikan dengan baik.

Skripsi ini disusun berdasarkan penelitian yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember dan di Laboratorium Kimia Pangan, Pusat Studi Ilmu Pangan dan Gizi, Pusat Antar Universitas, Universitas Gajah Mada sejak Oktober 2000 sampai Pebruari 2001 yang diajukan sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan program sarjana strata satu (S-1) pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Penulisan Skripsi ini banyak mendapatkan bantuan dan fasilitas dari berbagai pihak. Untuk itu dengan terselesaikannya Skripsi ini penulis ingin menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada ibu, bapak, saudara-saudaraku yang telah memberikan doa, motivasi, dan kasih sayang, dan penulis juga mengucapkan terima kasih kepada :

1. Ir. Siti Hartanti, MS selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
2. Ir. Susijahadi, MS selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
3. Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc. selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah memberikan fasilitas dan pembimbingan selama penelitian dan penulisan skripsi
4. Dr. Ir. Maryanto, M.Eng. selaku Dosen Pembimbing Anggota I dan Yuli Witono, S.TP. MP. selaku Dosen Pembimbing Anggota II yang telah menyempurnakan penulisan skripsi.

Digital Repository Universitas Jember

5. Ir. Setyo Harri, MS. dan Ir. Muharyo selaku Dosen Wali yang sedikit banyak telah memberikan arahan selama studi.
6. Teknisi laboratorium Mbak Sari dan Mbak Ketut (EGP memories), Mas Mistar (thanks pH meternya), Mbak Wim, dan Mbak Widi.
7. The big family of TP 97, THP and TEP must be united.
8. Dan semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah berperan dalam penulisan Skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan Skripsi ini masih mempunyai banyak kekurangan dan jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu dengan segala kerendahan hati, penulis senantiasa mengharapkan saran dan petunjuk yang berguna bagi kesempurnaan penulisan Skripsi ini dan menambah wawasan penulis dalam menulis karya-karya selanjutnya. Semoga Skripsi ini dapat menambah wawasan dan bermanfaat bagi pembaca. Amin.

Jember, Juni 2001

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
MOTTO	iii
PERSEMBAHAN.....	iv
DOSEN PEMBIMBING	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
RINGKASAN	xv
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Permasalahan.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Pangan Fungsional	5
2.2 Probiotik, Prebiotik, dan Synbiotik	7
2.3 Oligosakarida Sebagai Pangan Fungsional.....	8
2.4 Sintesis Galaktooligosakarida Menggunakan Enzim	
β -Galaktosidase.....	12
2.4.1 Laktosa	12
2.4.2 Enzim β -Galaktosidase	12
2.4.3 Sintesis Galaktooligosakarida	13
2.5 Hipotesa	15

III. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

3.1	Bahan dan Alat Penelitian	16
3.1.1	Bahan.....	16
3.1.2	Alat	16
3.2	Waktu dan Tempat Penelitian.....	16
3.3	Metode Penelitian	17
3.3.1	Rancangan Percobaan	17
3.3.2	Pelaksanaan Penelitian	18
3.4	Pengamatan	21
3.4.1	Analisa galaktooligosakarida dengan HPLC.....	21
3.4.2	Purifikasi galaktooligosakarida dengan LPLC.....	21
3.4.3	Analisa struktur galaktooligosakarida dengan GC-MS...	21

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Sintesis Homo Galaktooligosakarida	22
4.1.1	Pengaruh Lama Inkubasi	22
4.1.2	Pengaruh Jenis Substrat	30
4.1.3	Pengaruh Konsentrasi Substrat	33
4.1.4	Pengaruh pH	38
4.2	Sintesis Hetero Galaktooligosakarida	39
4.3	Struktur Galaktooligosakarida	42

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1	Kesimpulan.....	45
5.2	Saran	46

DAFTAR PUSTAKA	47
-----------------------------	-----------

LAMPIRAN.....	49
----------------------	-----------

DAFTAR TABEL

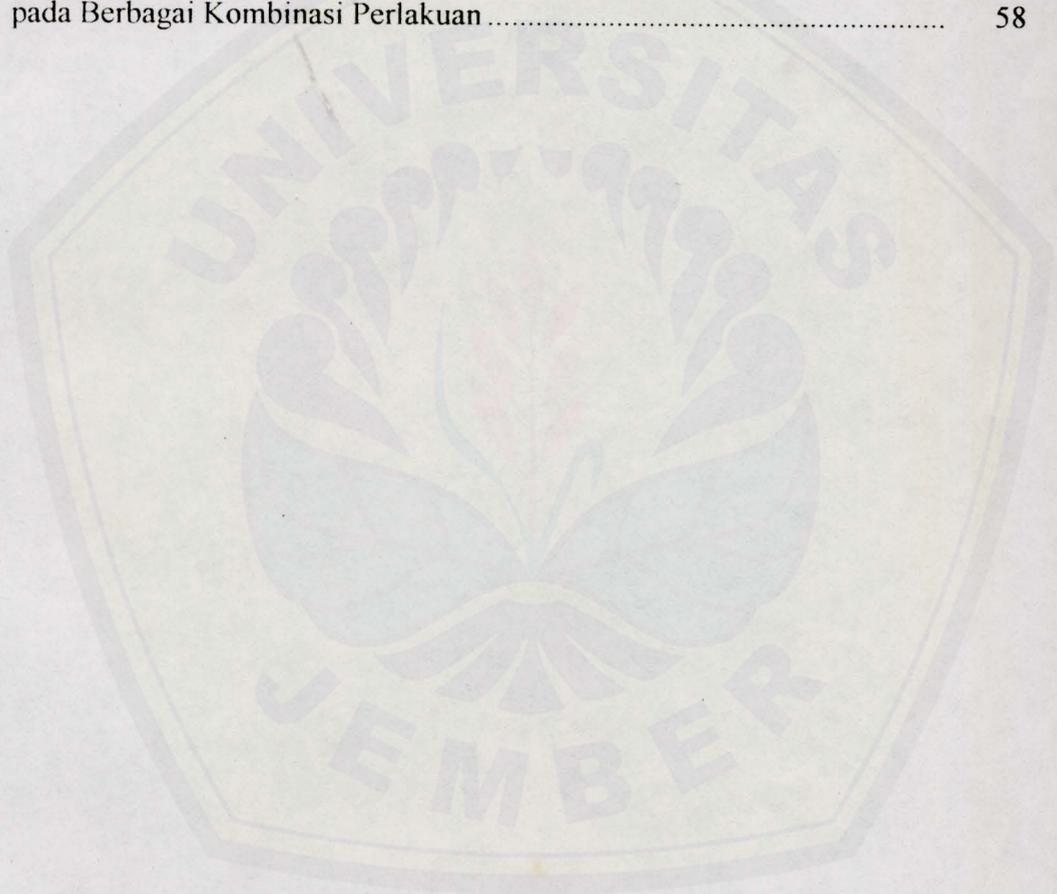
Tabel	Halaman
1. Dosis Maksimum Oligosakarida Tanpa Menimbulkan Diare.....	9
2. Oligosakarida, Disakarida, dan Polioliol yang Dapat Meningkatkan <i>Bifidobacterium</i> dan Bakteri Asam Laktat dalam Saluran Pencernaan	10
3. Beberapa Prebiotik Oligosakarida yang Diproduksi di Jepang Tahun 1995	14
4. Sintesis Homo-Galaktooligosakarida pada pH 6	23
5. Sintesis Homo-Galaktooligosakarida pada pH 7	24
6. Analisis Sidik Ragam Sintesis Disakarida dengan Substrat Galaktosa	33
7. Analisis Sidik Ragam Sintesis Disakarida dengan Substrat Laktosa.....	33
8. Analisis Sidik Ragam Sintesis Trisakarida dengan Substrat Galaktosa	34
9. Analisis Sidik Ragam Sintesis Trisakarida dengan Substrat Laktosa	34
10. Uji Beda Rata-Rata Sintesis Disakarida dengan Substrat Galaktosa pada Berbagai Konsentrasi Substrat.....	35
11. Uji Beda Rata-Rata Sintesis Disakarida dengan Substrat Laktosa pada Berbagai Konsentrasi Substrat dan Inkubasi 48 jam.....	35
12. Uji Beda Rata-Rata Sintesis Trisakarida dengan Substrat Galaktosa pada Berbagai Konsentrasi Substrat.....	35
13. Uji Beda Rata-Rata Sintesis Trisakarida dengan Substrat Laktosa pada Berbagai Konsentrasi Substrat.....	35
14. Sintesis Homo-Galaktooligosakarida pada pH 6 dan Inkubasi 48 jam.....	36
15. Sintesis Homo-Galaktooligosakarida pada pH 7 dan Inkubasi 48 jam.....	36
16. Sintesis Disakarida dengan Substrat Galaktosa 50% pada Berbagai pH dan Inkubasi 48 jam	38
17. Sintesis Disakarida dengan Substrat Laktosa 50% pada Berbagai pH dan Inkubasi 48 jam	38
18. Sintesis Trisakarida dengan Substrat Galaktosa 50% pada Berbagai pH dan Inkubasi 48 jam	38
19. Sintesis Trisakarida dengan Substrat Laktosa 50% pada Berbagai pH dan Inkubasi 48 jam	38
20. Sintesis Disakarida dari Beberapa Substrat Campuran.....	39
21. Sintesis Trisakarida dari Beberapa Substrat Campuran.....	40
22. Estimasi Struktur Homo-Galaktooligosakarida Hasil Sintesis dari Laktosa dan Galaktosa sebagai Substrat	43
23. Estimasi Struktur Hetero-Galaktooligosakarida Hasil Sintesis dari Beberapa Substrat Campuran.....	44

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Sintesis Homo-Galaktooligosakarida secara Enzimatis Menggunakan Enzim β -Galaktosidase	18
2. Sintesis Hetero-Galaktooligosakarida secara Enzimatis Menggunakan Enzim β -Galaktosidase	19
3. Purifikasi Galaktooligosakarida dengan Metode LPLC	20
4. Sintesis Disakarida dengan Substrat Galaktosa (20% - 50%) pada pH 6 yang Diinkubasi Pada 50°C selama 0 - 144 jam.....	25
5. Sintesis Disakarida dengan Substrat Laktosa (20% - 50%) pada pH 6 yang Diinkubasi Pada 50°C selama 0 - 144 jam.....	25
6. Sintesis Disakarida dengan Substrat Galaktosa (20% - 50%) pada pH 7 yang Diinkubasi Pada 50°C selama 0 - 144 jam.....	26
7. Sintesis Disakarida dengan Substrat Laktosa (20% - 50%) pada pH 7 yang Diinkubasi Pada 50°C selama 0 - 144 jam.....	27
8. Sintesis Trisakarida dengan Substrat Galaktosa (20% - 50%) pada pH 6 yang Diinkubasi Pada 50°C selama 0 - 144 jam.....	27
9. Sintesis Trisakarida dengan Substrat Laktosa (20% - 50%) pada pH 6 yang Diinkubasi Pada 50°C selama 0 - 144 jam.....	28
10. Sintesis Trisakarida dengan Substrat Galaktosa (20% - 50%) pada pH 7 yang Diinkubasi Pada 50°C selama 0 - 144 jam.....	29
11. Sintesis Trisakarida dengan Substrat Laktosa (20% - 50%) pada pH 7 yang Diinkubasi Pada 50°C selama 0 - 144 jam.....	29

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Data Pengamatan Sintesis Homo-Galaktooligosakarida.....	49
2. Data Pengamatan Sintesis Hetero-Galaktooligosakarida.....	53
3. Kurva Standar Sintesis Galaktooligosakarida.....	54
4. Data Plot Grafik Sintesis Homo-Galaktooligosakarida	55
5. Tabel Dua Arah Sintesis Homo-Galaktooligosakarida.....	57
6. Uji Beda Rata-Rata Sintesis Homo-Galaktooligosakarida pada Berbagai Kombinasi Perlakuan	58



Eka Ruri Ani, NIM 971710101031, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember, “**Sintesis Galaktooligosakarida secara Enzimatis Menggunakan Enzim β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae***”, ibimbing oleh Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dr. Ir. Maryanto, M.Eng selaku Dosen Pembimbing Anggota

RINGKASAN

Galaktooligosakarida merupakan salah satu pangan fungsional yang berfungsi sebagai faktor pertumbuhan bagi *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* yang dapat mempengaruhi kesetimbangan mikroflora dalam tubuh. Secara alami galaktooligosakarida terdapat dalam air susu ibu dan berkurang seiring dengan penambahan usia. Galaktooligosakarida dapat disintesis secara enzimatis menggunakan β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae*.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari pengaruh jenis substrat, konsentrasi substrat, pH, dan lama inkubasi terhadap reaksi sintesis galaktooligosakarida, serta struktur galaktooligosakarida yang terbentuk. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan 2 faktor, yaitu faktor konsentrasi substrat (A) sebesar 20 %, 30 %, 40%, 50% dan faktor pH (B) 6 dan 7.

Perlakuan konsentrasi substrat dan pH berpengaruh sangat nyata terhadap galaktooligosakarida yang dihasilkan. Substrat laktosa menghasilkan rata-rata galaktooligosakarida yang lebih besar dibanding substrat galaktosa. Produksi galaktooligosakarida meningkat secara cepat pada 3 jam pertama dan konstan setelah 48 jam. Homo-galaktooligosakarida yang maksimal diperoleh pada konsentrasi 50 % pH 7 (A4B2) dengan substrat laktosa, yaitu 22093,2897 ppm (disakarida) dan 13163,3574 ppm (trisakarida). Hetero-galaktooligosakarida yang maksimal diperoleh pada substrat campuran galaktosa-maltosa, yaitu 40963,993 ppm (disakarida) dan 12012,635 ppm (trisakarida). Enzim β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* membentuk galaktooligosakarida dengan variasi ikatan β -1,2-, β -1,3-, β -1,4-, dan β -1,6-galaktosidik. Oleh karena itu enzim β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* termasuk dalam enzim non spesifik.

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kesadaran pentingnya nilai gizi dalam bahan pangan yang dikonsumsi sehari-hari ternyata tidak hanya terhenti pada terpenuhinya zat gizi yang dibutuhkan oleh tubuh. Kesadaran ini ternyata diiringi juga dengan kesadaran untuk mengonsumsi pangan yang dapat berperan dalam pencegahan dan penyembuhan penyakit. Implikasi dari kesadaran ini adalah semakin maraknya tuntutan konsumen terhadap produk pangan dalam bentuk segar (alami) yang diproduksi secara organik dan mengandung komponen yang bersifat fungsional (pangan fungsional).

Bahan pangan dalam bentuk segar (alami) yang diproduksi secara organik (tanpa menggunakan bahan-bahan kimia) ditengarai mampu mencegah timbulnya penyakit-penyakit yang bersifat karsinogenik (penyebab terjadinya kanker), mengingat bahan-bahan kimia (anorganik) dalam bahan pangan pada umumnya tidak dapat dicerna oleh tubuh, sehingga akan menyebabkan terjadinya pengendapan dalam tubuh dan mengakibatkan terjadinya penghambatan terhadap sistem peredaran darah dan metabolisme tubuh yang lain. Sedangkan komponen yang bersifat fungsional dalam bahan pangan ditengarai mempunyai fungsi yang lebih luas, yaitu selain dapat mencegah, juga dapat mempertahankan kesehatan tubuh, bahkan dapat mengobati penyakit-penyakit tertentu.

Jenis pangan yang mengandung komponen yang bersifat fungsional tersebut diistilahkan dengan pangan fungsional. Seperti yang ditulis oleh Hasier (1995), pangan fungsional adalah pangan yang mengandung komponen aktif secara fisiologis dan digunakan untuk pencegahan atau penyembuhan suatu penyakit atau untuk mencapai kesehatan tubuh yang optimal. Dengan kata lain, pangan fungsional adalah makanan/minuman yang mengandung komponen (zat gizi/non gizi) yang mempengaruhi satu atau sejumlah terbatas fungsi dalam tubuh, tetapi yang memberikan efek positif, sehingga dapat memenuhi kriteria fungsional atau menyetatkan.

Komponen aktif dalam bahan pangan yang menimbulkan adanya sifat fungsional telah mendapat perhatian yang cukup tinggi, hal ini terlihat dari banyaknya laporan penelitian tentang manfaat suatu komponen yang dijumpai dalam suatu bahan pangan, baik yang berasal dari pangan nabati maupun hewani (Goldberg, 1992). Salah satunya adalah susu asam (terfermentasi) yang mengandung jenis-jenis mikroba tertentu yang memberikan fungsi tertentu bagi tubuh, misalnya dapat memperlancar proses pencernaan, menghambat proses penuaan, dan mencegah timbulnya kanker usus besar. Manfaat kesehatan produk-produk fermentasi diperoleh akibat terbawanya bakteri-bakteri hidup ke dalam saluran-saluran pencernaan yang mampu memperbaiki komposisi mikroflora usus sehingga mengarah pada dominansi bakteri-bakteri yang menguntungkan kesehatan.

Bifidobacterium dan *Lactobacillus* merupakan bakteri-bakteri fermentasi yang keberadaannya di dalam saluran pencernaan mampu memberi sumbangan bagi kesempurnaan proses fisiologis tubuh dan manfaat-manfaat kesehatan lainnya. Tingkat keberadaan bakteri-bakteri ini berubah-ubah sesuai dengan keadaan kesehatan dan usia, sehingga untuk tetap dapat mempertahankan manfaat dan keberadaan bakteri-bakteri tersebut dilakukan upaya-upaya yang bertujuan untuk mempertahankan jumlah bakteri-bakteri tersebut dalam komposisi mikroflora usus. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mempertahankan dominansi bakteri-bakteri tersebut adalah dengan mengendalikan sumber-sumber gula yang bermanfaat bagi metabolismenya. Sumber karbon dan energi bakteri-bakteri di dalam usus besar berasal dari karbohidrat yang merupakan hasil dari sekresi tubuh atau dari karbohidrat yang tidak dapat dicerna dalam usus halus, salah satunya adalah oligosakarida.

Hasil-hasil penelitian menunjukkan bahwa konsumsi oligosakarida yang tidak dapat dicerna dapat meningkatkan jumlah *Bifidobacterium* di dalam saluran pencernaan, salah satunya adalah galaktooligosakarida. Oleh karena itu galaktooligosakarida sangat berpotensi untuk dimanfaatkan dalam pengembangan produk-produk pangan fungsional sebagai salah satu upaya dalam optimasi keseimbangan mikroflora dalam tubuh.

Sebagai tindak lanjut dari upaya tersebut, dilakukan suatu penelitian tentang bagaimana cara mensintesis galaktooligosakarida secara enzimatik dengan menggunakan enzim β -Galaktosidase yang berasal dari *Aspergillus oryzae*. Galaktooligosakarida yang hendak disintesis ada dua macam, yaitu homo-galaktooligosakarida dan hetero-galaktooligosakarida.

Untuk sintesis homo-galaktooligosakarida digunakan dua macam substrat, yaitu menggunakan substrat laktosa yang terlebih dahulu akan dipecah menjadi galaktosa dan glukosa (galaktosa yang terbentuk akan disintesis menjadi homo-galaktooligosakarida) dan menggunakan substrat galaktosa yang akan langsung disintesis menjadi homo-galaktooligosakarida. Sedangkan untuk sintesis hetero-galaktooligosakarida digunakan substrat galaktosa (sebagai donor) dan gula sederhana lainnya (sebagai akseptor) seperti : glukosa, maltosa, mannososa, dan sukrosa.

1.2 Permasalahan

Sintesis galaktooligosakarida secara enzimatik ini sangat dipengaruhi oleh jenis substrat, konsentrasi substrat, pH, dan lama inkubasi yang digunakan selama reaksi berlangsung. Hal ini sangat penting untuk diperhatikan, mengingat dalam suatu reaksi enzimatik aktivitas enzim sangat spesifik dan dipengaruhi oleh keempat hal tersebut.

Permasalahan dalam penelitian ini adalah penentuan lama inkubasi, jenis substrat, konsentrasi substrat, dan pH yang sesuai dengan enzim yang digunakan (β -Galaktosidase dari *Aspergillus oryzae*) sehingga reaksi dapat berjalan secara optimal untuk menghasilkan galaktooligosakarida dalam jumlah yang maksimal.

Selain itu juga akan diselidiki bagaimana struktur galaktooligosakarida yang dihasilkan dalam reaksi sintesis galaktooligosakarida secara enzimatik ini.

1.3 Tujuan Penelitian

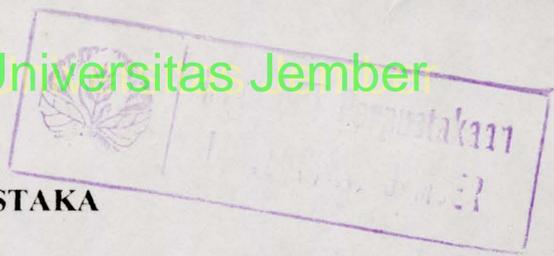
Dengan mengacu pada latar belakang dan permasalahan yang timbul, maka penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui pengaruh lama inkubasi, jenis substrat, konsentrasi substrat, dan pH terhadap reaksi sintesis galaktooligosakarida secara enzimatis menggunakan enzim β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae*.
2. Menentukan kombinasi perlakuan antara konsentrasi substrat dan pH dalam reaksi sintesis galaktooligosakarida secara enzimatis menggunakan enzim β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* yang mampu menghasilkan galaktooligosakarida dengan konsentrasi tertinggi.
3. Mengetahui struktur galaktooligosakarida yang dihasilkan dalam reaksi sintesis galaktooligosakarida secara enzimatis menggunakan enzim β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae*.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang :

1. Sintesis galaktooligosakarida secara enzimatis menggunakan enzim β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae*.
2. Pengaruh lama inkubasi, jenis substrat, konsentrasi substrat, dan pH terhadap reaksi sintesis galaktooligosakarida secara enzimatis menggunakan enzim β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae*.
3. Kombinasi perlakuan antara konsentrasi substrat dan pH dalam reaksi sintesis galaktooligosakarida secara enzimatis menggunakan enzim β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* yang mampu menghasilkan galaktooligosakarida dengan konsentrasi tertinggi.
4. Struktur galaktooligosakarida yang dihasilkan dalam reaksi sintesis galaktooligosakarida secara enzimatis menggunakan enzim β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae*.



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pangan Fungsional

Di negara maju terdapat kecenderungan konsumen dalam mengonsumsi suatu makanan tidak hanya menilai dari segi gizinya serta lezat tidaknya suatu produk, tetapi juga mempertimbangkan segi pengaruh makanan tersebut pada kesehatan tubuhnya (Tokoro, 1989; Goldberg, 1994). Oleh karena itu kini fungsi pangan tidak lagi dua, tetapi tiga macam. Setelah fungsinya sebagai pensuplai zat-zat gizi bagi tubuh dan pemuas mulut dengan cita rasanya, pangan dituntut juga berfungsi untuk menjaga kesehatan dan kebugaran tubuh (Hoogenkamp, 1994), atau menurunkan efek negatif dari suatu penyakit tertentu, dan bahkan kalau bisa juga dapat menyembuhkan. Dengan demikian, pangan tidak hanya harus bergizi dan dapat diterima (enak rasanya), tetapi juga bersifat fungsional.

Selanjutnya istilah pangan fungsional (*functional food*) digunakan secara luas untuk mengidentifikasi dan mendefinisikan makanan yang mempunyai kemampuan untuk mempengaruhi proses fisiologis, sehingga meningkatkan potensi kesehatan dari makanan tersebut (Head, 1995). Dalam ilmu kesehatan tradisional China, pangan fungsional mempunyai beberapa fungsi seperti memperbaiki status kesehatan, mencegah timbulnya penyakit dan mengobati penyakit, serta memudahkan rehabilitasi (Weng dan Chen, 1995).

Menurut Goldberg (1994) para ilmuwan Jepang menekankan pada tiga faktor yang harus dipenuhi oleh suatu produk agar dapat dikategorikan sebagai pangan fungsional, yaitu :

1. Produk harus merupakan produk pangan (bukan kapsul, tablet, atau serbuk) yang berasal dari bahan (ingredien) yang terdapat secara alami.
2. Produk dapat atau selayaknya dikonsumsi sebagai bagian dari pangan sehari-hari.
3. Produk mempunyai fungsi tertentu pada waktu dicerna dan memberikan peran tertentu dalam proses metabolisme tubuh, misalnya :

- a. Memperkuat mekanisme pertahanan tubuh.
- b. Mencegah timbulnya penyakit tertentu, seperti kardiovaskuler, kanker, pencernaan, osteoporosis, hipertensi, diabetes (*non-insulin diabetes mellitus*), kegemukan (obesitas), dan berbagai gangguan kesehatan akibat kekurangan zat gizi tertentu.
- c. Membantu mengembalikan kondisi tubuh setelah terserang penyakit.
- d. Menjaga kondisi fisik dan mental.
- e. Memperlambat proses penuaan.

Pasaran untuk pangan fungsional mengalami peningkatan dalam sepuluh tahun terakhir ini. Meskipun peraturan tentang pangan fungsional secara konkrit belum ada, namun produk tersebut dapat dipasarkan dengan baik. Di Amerika Serikat produk pangan yang diperkaya dengan serat telah dikembangkan, karena adanya laporan ilmiah tentang kemampuannya untuk menurunkan kadar kolesterol dalam darah. Di Eropa, industri susu sejak lama memasarkan produk yang mengandung kultur *Bifidobacterium*. Baru-baru ini pangan fungsional yang mengandung oligosakarida sebagai promotor pertumbuhan *Bifidobacterium* telah dipasarkan.

Ingredien yang paling penting dalam hubungannya dengan pemasaran adalah : serat makanan, oligosakarida, kalsium, zat besi, beta-karoten dan DHA. *Bikkle*, suatu produk dari Suntory, mengandung *Bifidobacterium* hidup, mineral dari whey sebagai sumber serat makanan, oligosakarida, kalsium, dan ekstrak teh. Di Indonesia terdapat produk minuman yang berupa serbuk dengan kandungan kalori rendah, berflavor jeruk, mengandung frukto-oligosakarida, serat dan promotor *Bifidobacterium*. Bahan-bahan (*ingredients*) yang mempunyai sifat fungsional dibagi menjadi 12 golongan, yaitu : serat makanan, oligosakarida, gula alkohol, peptida dan protein, glukosida, alkohol, isoprenoid, vitamin, kholin, bakteri asam laktat, mineral, dan asam lemak tidak jenuh jamak (Nienaber, 1996).

2.2 Probiotik, Prebiotik, dan Synbiotik

Probiotik merupakan sekumpulan mikroba yang secara alami ada dalam usus manusia, dan juga sering ditambahkan ke dalam bahan pangan dan memberi keuntungan kepada manusia, seperti bakteri asam laktat dan *Bifidobacterium*. Konsep probiotik sekarang dimantapkan di Eropa, dan banyak produk susu dan olahannya yang mengandung suplemen pangan yang berupa mikroorganisme ini memberikan keuntungan fisiologis terhadap konsumen setelah mengkonsumsinya, dengan cara membantu keseimbangan mikroba dalam saluran gastrointestinal (Broste, 1999).

Konsep yang lebih baru dan menguntungkan adalah prebiotik, yang didefinisikan sebagai bahan pangan yang tidak dapat dicerna tetapi bermanfaat dalam menstimulasi pertumbuhan dan aktivitas satu atau sejumlah terbatas bakteri dalam kolon secara selektif, serta dapat memperbaiki kesehatan tubuh (Broste, 1999). Prebiotik tidak bersifat toksik dan tidak mempunyai efek samping yang negatif. Prebiotik ini akan dihidrolisa oleh enzim yang dihasilkan oleh probiotik dan selanjutnya digunakan sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan probiotik. Oleh karena itu prebiotik juga sering disebut sebagai faktor pertumbuhan bagi probiotik. Beberapa prebiotik pada saat ini yang sedang disintesis secara enzimatis, seperti galaktooligosakarida, fruktooligosakarida, isomalto-oligosakarida, gentiooligosakarida, xilooligosakarida, laktulosa, dan laktosukrosa.

Broste (1999) menyatakan bahwa prebiotik mempunyai peluang pemanfaatan yang lebih luas daripada probiotik. Seperti yang baru-baru ini diluncurkan yaitu *Ligne Bifide* dari Vivis di Perancis, yang meliputi biskuit, sup, dan makanan siap saji yang mengandung *Actilight*. Probiotik yang juga diklaim dapat mendukung sistem kekebalan tubuh juga telah berhasil di Eropa. Produk yang paling penting adalah *LCI* yogurt yang telah diperkaya dari Nestle, yang diluncurkan di pasar Perancis dan sekarang tersedia di seluruh Eropa. Titik pengembangan *LCI* adalah identifikasi strain *Lacto* dengan efek probiotik yang luar biasa, yang diberi nama *LAI*. Nestle telah memimpin penelitian yang ekstensif terhadap produk tersebut dan merekomendasikan bahwa produk tersebut dapat dimakan sehari-hari sebagai bagian dari diet yang seimbang dan sehat.

Menurut Broste (1999) kombinasi probiotik dan prebiotik menghasilkan sinbiotik yang mengkombinasikan efek dari bakteri baru dan menstimulasi pertumbuhan bakteri sendiri. Ada potensi yang tinggi dalam penggabungan campuran yang seperti itu, dimana beberapa dari campuran tersebut dapat menunjukkan efek-efek nutrisi sinergistik yang kuat. Yogurt yang diperkaya dari perusahaan susu dan hasil olahannya Swiss Tonilait, adalah salah satu sinbiotik yang pertama. Ia terdiri dari 3 strain probiotik dan prebiotik bermerk *Raftiline* dari Orafiti.

Peluncuran yang lebih baru termasuk *Jour apres Jour*, sejenis susu skim UHT yang diperkaya vitamin, sedikit elemen dari mikronutrien dan serat terlarut yang bermerk *Actilight* dari Industri Meiji Beghin. *Actilight*, dibuat dari fruktooligosakarida yang dihasilkan dari daging sapi telah dikembangkan oleh Komite Pangan Ilmiah Komisi Eropa (*The European Commission's Scientific Committee on Food*). Perusahaan Jerman juga telah aktif dalam mengembangkan produk sinbiotik. Menurut John Young of Leather Lead Food, RA Bauer meluncurkan probiotik plus oligosakarida yang meliputi dua strains probiotik dan prebiotik *Raftilose* (Broste, 1999).

2.3 Oligosakarida Sebagai Pangan Fungsional

Oligosakarida terdiri dari 2 – 10 monosakarida yang tergabung dalam ikatan glikosidik, yang segera dapat dihidrolisa secara enzimatis untuk menghasilkan monosakarida (El Khadem, 1998; Pazur, 1994). Oligosakarida dapat juga diklasifikasikan menjadi homo-oligosakarida yang terdiri dari satu tipe monosakarida dan hetero-oligosakarida yang terdiri dari dua atau lebih tipe monosakarida penyusunnya (El Khadem, 1998).

Oligosakarida, selain tidak dapat dicerna oleh tubuh, diketahui merupakan senyawa antinutrisi yang menyebabkan penumpukan gas dalam perut (flatulensi). Oligosakarida, seperti raffinosa, stakiosa, dan verbaskosa, terdapat dalam bahan pangan nabati seperti kacang-kacangan dan umbi-umbian. Selama ini upaya pengolahan pangan ber kandungan oligosakarida selalu diarahkan pada pengurangan atau penghilangan sama sekali kandungan karbohidrat tersebut.

Hasil-hasil penelitian mutakhir yang berkaitan dengan metabolisme bakteri bermanfaat *Bifidobacterium* menunjukkan kemampuan bakteri ini memanfaatkan oligosakarida, sehingga pola penanganan konvensional bahan-bahan pangan dengan tujuan mengeliminasi kandungan oligosakarida perlu diubah. Kandungan oligosakarida dalam bahan pangan perlu dipertahankan pada tingkat yang cukup untuk memperbaiki atau mempertahankan perimbangan mikroflora usus, tetapi tidak terlalu tinggi demi mencegah diare atau flatulensi (Nuraida, 1996).

Menurut Nuraida (1996) batas konsumsi oligosakarida yang berpotensi digunakan sebagai substrat kultur *Bifidobacterium* ataupun sebagai penstimulan aktifitas *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* di dalam saluran pencernaan perlu mendapat perhatian. Hasil penelitian di Jepang yang menunjukkan dosis maksimum oligosakarida agar tidak menimbulkan diare dapat dijadikan pedoman sementara (Tabel 1).

Tabel 1. Dosis Maksimum Oligosakarida Tanpa Menimbulkan Diare

Sakarida	Dosis Maksimum (g/kg berat badan/hari)	
	Pria	Wanita
Neosugar	0.3	0.4
4'galaktosil-sukrosa	0.6	0.6
4'galaktooligosakarida	0.28	0.28
6'galaktosil-laktosa	0.3	0.3
Xilo-oligosakarida	0.12	0.12
Maltitol	0.3	0.3
Palatinit	0.3	0.3
Eritritol	0.66	0.8
Sorbitol	0.17	0.24

Bifidobacterium dan bakteri asam laktat merupakan probiotik yang mampu membatasi pertumbuhan dan aktivitas mikroba penyebab penyakit dalam usus. Mikroba ini mampu mengubah kolesterol menjadi bentuk yang kurang teradsorpsi. Selain itu bakteri ini mampu menghambat proses pembentukan

senyawa penyebab kanker atau toksik dalam usus. *Bifidobacterium* dapat memproduksi vitamin B kompleks (B1, B6, B12, dan asam folat) dan asam amino yang dibutuhkan oleh enzim metabolisme. Bakteri asam laktat dapat menghambat bakteri pemecah vitamin B1. *Bifidobacterium* dapat memproduksi asam laktat dan asam asetat yang dapat mengasamkan lambung dan membunuh bakteri berbahaya yang tidak tahan kondisi asam.

Untuk memperbanyak jumlah *Bifidobacterium* di dalam saluran pencernaan, sumber gula merupakan salah satu faktor yang dapat diatur. Disamping itu produksi asam laktat atau asam organik lain oleh bakteri asam laktat atau *Bifidobacterium* dalam saluran pencernaan tergantung pada ketersediaan karbohidrat yang tidak dapat diserap oleh tubuh. Hasil-hasil penelitian menunjukkan bahwa konsumsi oligosakarida yang tidak dapat dicerna, meningkatkan jumlah *Bifidobacterium* di dalam saluran pencernaan. Pada Tabel 2 disajikan jenis oligosakarida yang telah diketahui mampu meningkatkan jumlah *Bifidobacterium* dan bakteri asam laktat (Nuraida, 1996).

Tabel 2. Oligosakarida, Disakarida dan Poliol yang Dapat Meningkatkan *Bifidobacterium* dan Bakteri Asam Laktat dalam Saluran Pencernaan.

Jenis gula	Bakteri yang meningkat
Fruktooligosakarida	<i>Bifidobacterium</i>
Transgalaktosil oligosakarida	<i>Bifidobacterium</i>
4'-galaktosil laktosa	<i>Bifidobacterium</i>
Isomaltooligosakarida	<i>Bifidobacterium</i>
Galaktooligosakarida (Oligomat 50)	<i>Bifidobacterium</i>
Galaktosil oligosakarida	<i>Bifidobacterium</i>
Oligosakarida kedelai	<i>Bifidobacterium</i> , sebagian <i>Lactobacillus</i>
Xilooligosakarida	<i>Bifidobacterium</i>
Palatinose	<i>Bifidobacterium</i>
Silitol	Bakteri asam laktat
Laktulosa	<i>Bifidobacterium</i> , bakteri asam laktat
Inulofruktosakarida	<i>Bifidobacterium</i>

Untuk menentukan jenis gula yang sesuai dalam meningkatkan jumlah *Bifidobacterium* di saluran pencernaan bukan hal yang mudah. Menurut Nuraida (1996) penentuan jenis gula ini harus memperhatikan hal-hal sebagai berikut :

1. Senyawa yang digunakan harus tidak dapat diserap oleh tubuh atau diserap secara perlahan-lahan.
2. Sakarida-sakarida non-pereduksi umumnya tidak dapat dimetabolisme oleh bakteri asam laktat.
3. *Bifidobacterium* dapat menggunakan disakarida dan trisakarida yang berisi galaktosa tanpa perlu adaptasi terlebih dahulu.
4. Oligosakarida umumnya dapat digunakan oleh *Bifidobacterium*.
5. Inulin dapat digunakan oleh *Bifidobacterium*, tetapi memerlukan adaptasi.
6. Produksi asam merupakan sifat yang diinginkan sebagai hasil metabolisme substrat yang digunakan.
7. Kombinasi substrat mungkin dapat diterapkan untuk merangsang pertumbuhan *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus*.

Galaktooligosakarida merupakan oligosakarida yang diklasifikasikan sebagai makanan fungsional. Senyawa galaktooligosakarida sering juga disebut oligosakarida yang tidak dapat dicerna (*non-digestible oligosaccharides*) dan tidak dapat diserap dalam usus halus manusia, sehingga langsung masuk ke dalam usus besar. Dalam usus besar galaktooligosakarida segera difermentasi oleh mikroba yang ada, sehingga akan terjadi peningkatan jumlah mikroba yang menguntungkan (*Bifidobacterium* sp.) dan mampu menekan jumlah mikroba yang berbahaya. Galaktooligosakarida adalah faktor pertumbuhan yang efisien untuk *Bifidobacterium* dan juga mempunyai efek positif dalam peningkatan jumlah *Lactobacillus* (Nuraida, 1996).

Pada dasarnya lebih dari 130 galaktooligosakarida telah dapat diidentifikasi terdapat dalam air susu ibu (ASI) dengan konsentrasi sebesar 3000 - 6000 ppm. Galaktooligosakarida dalam ASI mempunyai fungsi yang sangat penting, yaitu sebagai senyawa penghambat dari perekatan bakteri pada permukaan sel epitel yang merupakan langkah awal terjadinya proses infeksi. Galaktooligosakarida juga analog dengan senyawa reseptor permukaan sel epitel

yang berperan dalam sistem pertahanan non imunologi dari bayi yang mengkonsumsi ASI (Kunz dan Rudolf, 1996). Oleh karena itu bayi yang mengkonsumsi ASI mempunyai sistem kekebalan dan pertahanan tubuh yang lebih baik daripada bayi yang tidak mengkonsumsi ASI.

2.4 Sintesis Galaktooligosakarida Menggunakan β -galaktosidase

2.4.1 Laktosa

Laktosa atau gula susu hanya terdapat pada air susu makhluk menyusui. Kadarnya 4% pada sapi segar dan sekitar 6-7% pada air susu ibu (ASI). Laktosa terdiri dari 4-o (β -D-galaktopiranol) D-glukopiranososa. Laktosa bersifat tidak dapat dicerna sebelum dihidrolisis dengan laktase menjadi glukosa dan galaktosa, karena pada dasarnya laktosa adalah gula yang sukar larut, tetapi jika sudah dihidrolisis oleh laktase akan terurai menjadi galaktosa dan glukosa yang sifatnya mudah larut dan tidak mudah mengkristal (Winarno, 1980).

Pada kondisi normal bayi yang sedang disusui mempunyai kadar laktase yang tinggi. Setelah disapih kadar laktase menurun sehingga tidak dapat mencerna laktosa dalam jumlah banyak. Laktosa yang tidak dapat dicerna mempunyai daya osmotik yang tinggi, sehingga dapat menyerap cairan tubuh ke usus kecil dan merangsang gerakan peristaltik dinding usus menjadi lebih cepat. Gerakan ini mendorong laktosa secara cepat menuju usus besar sehingga menyebabkan terjadinya fermentasi laktosa oleh bakteri yang menghasilkan asam organik dan gas. Asam dan gas ini menyebabkan terjadinya sakit perut, mulas, kejang perut, pengeluaran gas, dan mencret. Hal ini disebut dengan *lactose intolerance*. Di Afrika, Cina, Asia Tenggara 70-90% dari penduduk dewasa mengidap *lactose intolerance*, sedangkan di Amerika dan Eropa hanya 5-10% (Winarno, 1980).

2.4.2 Enzim β -galaktosidase

Menurut Winarno (1980), laktase adalah enzim yang dapat menghidrolisa gula susu laktosa. Laktase juga disebut β -galaktosidase (EC 3.2.1.2.3). Enzim ini terdapat dalam tanaman (peach dan apel), bakteri (*Escherichia coli*), jamur (*Aspergillus oryzae*), dan binatang (terutama pada saluran pencernaannya).

Laktase dapat menguraikan 2 macam substrat, yaitu laktosa dan o-nitrofenil- β -galaktosida (ONPG) yang dapat menghasilkan khromogen-o-nitrofenol. Laktase pada usus jejunum (berhubungan dengan pencernaan susu pada waktu masih bayi) semakin berkurang jika makhluk menjadi dewasa.

Susu laktase terdiri dari :

- a) *Lyosomal enzyme* yang bersifat aktif terhadap ONPG dan tidak menghidrolisis laktosa
- b) β -galaktosidase adalah enzim yang membutuhkan laktosa sebagai substrat (Winarno, 2000)

Laktase dari tanaman jarang digunakan, yang lebih sering dari *Escherichia coli* dan *Aspergillus niger*. Laktase dari jamur biasanya dapat digunakan untuk suhu tinggi dan pH rendah, sedangkan yang berasal dari ragi mempunyai "heat labile" aktif pada pH tinggi. Di Amerika enzim-enzim yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae* atau *Aspergillus niger* dianggap aman dan boleh digunakan untuk makanan karena senyawa tersebut termasuk dalam golongan GRAS (*Generally Recognized As Safe*).

2.4.3 Sintesis Galaktooligosakarida

Rastall (2000 b) menyatakan bahwa ide untuk mensuply sumber carbon terfermentasi secara selektif yang secara positif dapat mempengaruhi keseimbangan koloni mikroflora muncul pertama kali di Jepang, dimana ada suatu industri yang sedang berkembang membuat oligosakarida sebagai pangan fungsional. Dasar ilmiah dari efek tersebut adalah tetap hidup setelah diuji dengan lebih teliti. Industri di Jepang telah tumbuh di sekitar kemampuan untuk memproduksi secara lebih luas dengan metode bioteknologi serangkaian prebiotik oligosakarida seperti yang tercantum pada Tabel 3. Molekul-molekul dalam tabel tersebut dipersiapkan dengan suatu metode enzimatik dan dianggap sebagai generasi pertama dari oligosakarida yang bermanfaat terhadap kesehatan.

Tabel 3. Beberapa prebiotik oligosakarida yang diproduksi di Jepang tahun 1995

Oligosakarida	Produksi (ton)
Laktulose	20.000
Galaktooligosakarida	15.000
Fruktooligosakarida	12.000
Isomaltooligosakarida	11.000
Palatinose	5.000
Oligosakarida kedelai	2.000
Laktosukrosa	1.600
Gentiooligosakarida	400
Xilooligosakarida	300

Monsan dan Paul (1995) menyatakan bahwa penggunaan enzim sebagai katalisator dalam sintesis komponen organik telah dikembangkan beberapa tahun ini. Penerapan teknik ini telah digunakan dalam sintesis oligosakarida dengan menggunakan glikosiltransferase (E.C. 2.4) atau glikosidase (E.C. 3.2). Sintesis oligosakarida dapat dilakukan dengan metode reaksi kesetimbangan (ekuilibrium) dan reaksi kinetika.

Reaksi sintesis ekuilibrium hanya membutuhkan sebuah enzim dan monosakarida. Enzim akan mengkatalisis ikatan langsung dari unit-unit monosakarida untuk membentuk oligosakarida. Reaksi ini dikenal sebagai glikosilasi langsung (*direct glycosylation*) atau hidrolisa terbalik (*reverse hydrolysis*). Sedangkan reaksi sintesis kinetika dikenal sebagai transglikosidasi, yaitu hidrolisis substrat donor untuk menghasilkan produk antara dan dilanjutkan dengan reaksi antara aseptor dan produk antara yang terbentuk untuk menghasilkan oligosakarida (Monsan dan Paul, 1995).

Menurut Rastall (2000 a) penerapan glikosiltransferase yang paling menarik adalah yang memanfaatkan sukrosa sebagai donor glikosil. Beberapa prebiotik dapat dibuat dengan cara ini. Selain itu pendekatan yang lebih mudah dan berpotensi adalah penggunaan glikosidase. Glikosidase secara normal adalah enzim hidrolitik, tetapi di bawah kondisi yang terkendali dia dapat diinduksi untuk

mensintesis ikatan glikosidik. Sebagai contoh yaitu sintesis galaktooligosakarida dari laktosa menggunakan β -galaktosidase. Hidrolisis laktosa akan berlangsung pada konsentrasi laktosa rendah, selanjutnya produksi oligosakarida dengan reaksi transgalaktosida akan berjalan juga dengan meningkatnya konsentrasi laktosa dalam media, karena kelompok β -galaktosil mempunyai peluang tinggi untuk melekat kepada laktosa dan/atau oligosakarida daripada ke air sebagai aseptor (Iwasaki dkk., 1996).

Reaksi sintesis oligosakarida dapat ditingkatkan pada konsentrasi monosakarida yang tinggi dan dapat dicapai dengan menurunkan aktivitas air (Suwasono and Rastall, 1996). Suhu reaksi yang dapat digunakan adalah 50 - 60°C. Pada suhu ini enzim akan tetap stabil karena konsentrasi gula yang tinggi mampu mencegah terjadinya denaturasi enzim oleh panas (Nakano dkk., 1995).

Konversi oligosakarida lebih dari 30 % terjadi dengan menggunakan konsentrasi laktosa lebih dari 1,11 mol/liter yang dikatalisis oleh β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* selama 5 jam. Pada konsentrasi laktosa yang tinggi β -galaktosidase akan mengkatalisis reaksi pemindahan yang akan membentuk tri dan tetrasakarida dari laktosa. Pendekatan ini digunakan secara komersial di Jepang dan Nederlands. Industri sekarang ini mempraktekkan penggunaan β -galaktosidase yang berasal dari sejenis jamur, karena tersedia dalam jumlah yang banyak dengan harga yang rendah (Iwasaki dkk., 1996).

2.5 Hipotesa

Berdasarkan uraian yang telah dijelaskan di atas dapat dibuat suatu hipotesa bahwa :

1. Lama inkubasi, jenis substrat, konsentrasi substrat, dan pH berpengaruh terhadap sintesis galaktooligosakarida dengan enzim β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae*.
2. Interaksi dari perlakuan konsentrasi substrat dan pH berpengaruh terhadap sintesis galaktooligosakarida dengan enzim β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae*.

III. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

3.1 Bahan dan Alat

3.1.1 Bahan

Bahan dasar yang digunakan adalah galaktosa (Sigma Ultra G-5160), β -laktosa (Sigma L-3750), glukosa (Sigma Ultra G-7528), mannanosa (Sigma Ultra M-9171), maltosa (Sigma M-9171), sukrosa (Sigma S-7903), dan enzim β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* (Sigma G-5160). Sedangkan bahan kimia yang digunakan adalah *aquadest*, *bidest*, asam asetat 0,1 M, NaOH 0,01 M, buffer Na-asetat 0,01 M, *BioGel P-60* (Bio-Rad), *acetonitrile* HPLC grade 2,5 mL (E-merck). Semua bahan dipesan dari CV. Kristalindo Biolab.

3.1.2 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah pipet mikro, pipet volum, tabung eppendorf, labu ukur, *beaker glass*, kertas aluminium, botol semprot, pH meter, oven, *refrigerator*, *freeze dryer*, *refractive index detector (RID)*, *high pressure liquid chromatography (HPLC)*, *low pressure liquid chromatography (LPLC)*, *gas chromatography-mass spectra (GC-MS)*.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Oktober 2000 sampai bulan Pebruari 2001 di Laboratorium Mikrobiologi Pangan, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember dan di Laboratorium Kimia Pangan, Pusat Studi Ilmu Pangan dan Gizi, Pusat Antar Universitas, Universitas Gajah Mada.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial. Adapun faktor yang diteliti adalah konsentrasi substrat (faktor A) yang terdiri dari 4 taraf dan pH (faktor B) yang terdiri dari 2 taraf dengan 2 kali ulangan.

Faktor A : konsentrasi substrat Faktor B : pH

A1 : 20 %

B1 : 6

A2 : 30 %

B2 : 7

A3 : 40%

A4 : 50%

Kombinasi perlakuan dari masing-masing pola sebagai berikut :

A1B1

A2B1

A3B1

A4B1

A1B2

A2B2

A3B2

A4B2

Model matematis RAL faktorial dengan 2 faktor yaitu (Gasperz, 1994) :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

$$i = 1, \dots, a$$

$$j = 1, \dots, b$$

$$k = 1, \dots, r$$

dimana :

Y_{ij} : nilai pengamatan pada satuan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij (taraf ke-i dari faktor A dan taraf ke-j dari faktor B)

μ : nilai tengah populasi (rata-rata sesungguhnya)

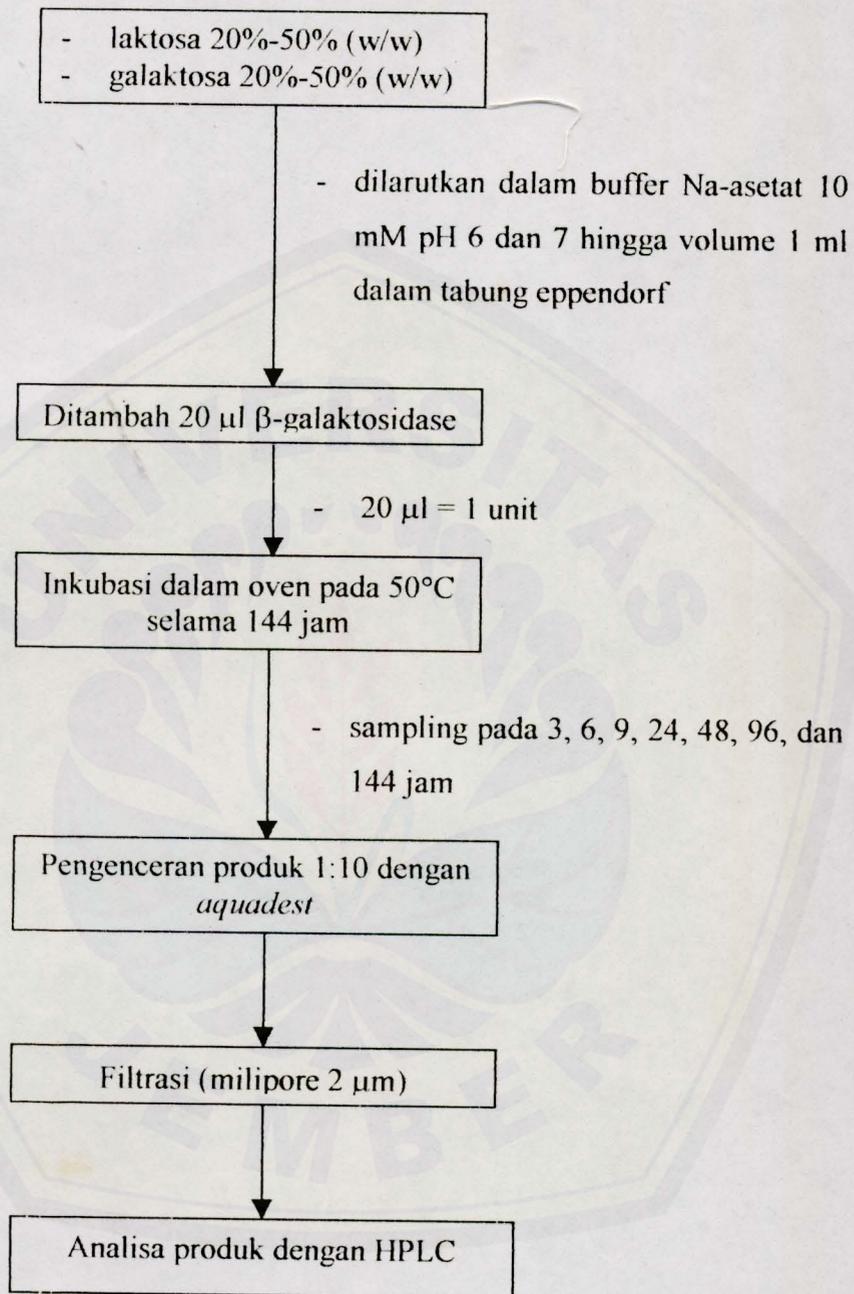
α_i : pengaruh aditif taraf ke-i dari faktor A

β_j : pengaruh aditif taraf ke-j dari faktor B

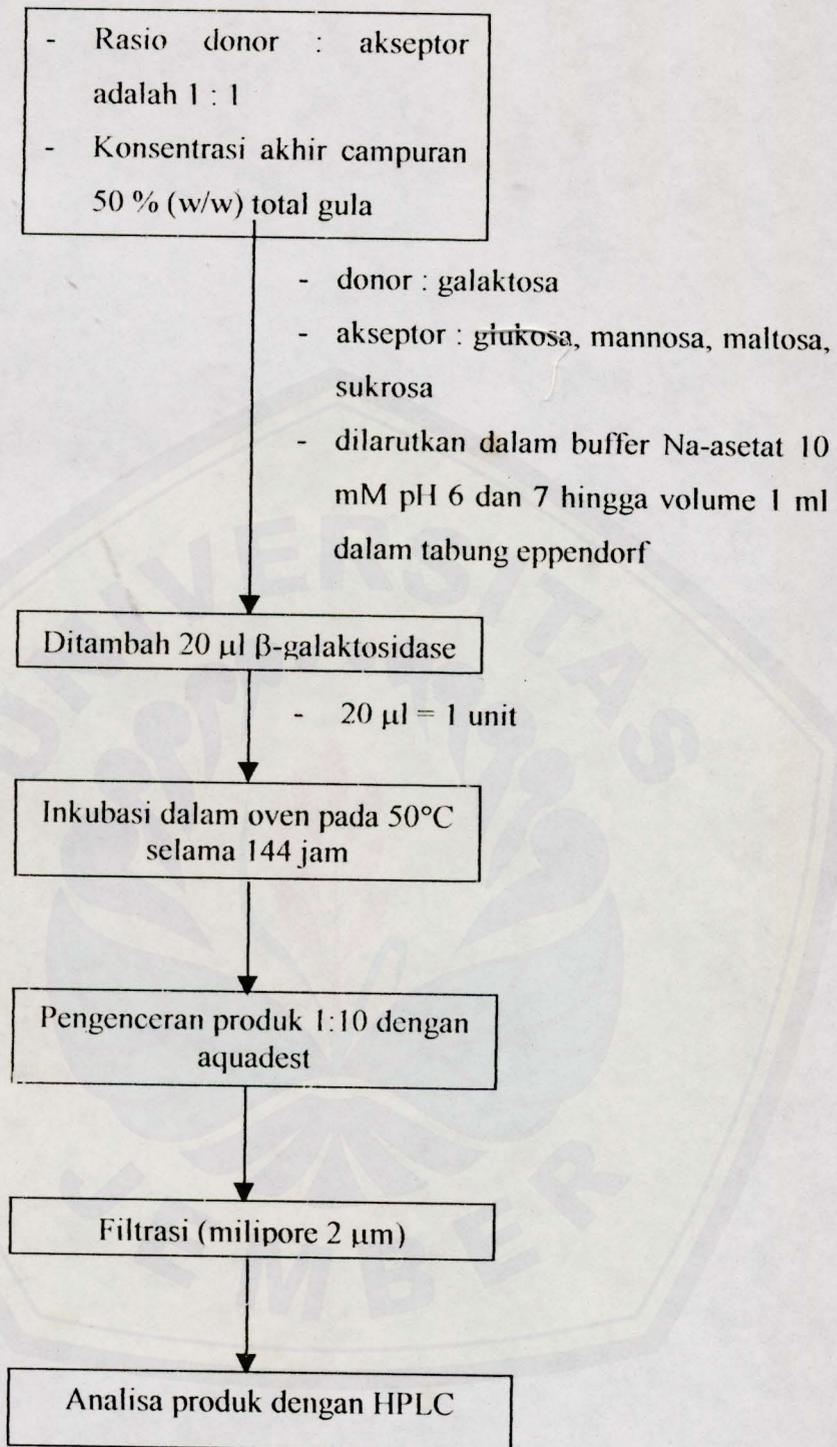
$(\alpha\beta)_{ij}$: pengaruh interaksi taraf ke-i faktor A dan taraf ke-j dari faktor B

Jika pengaruh perlakuan berbeda nyata, maka pengujian dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan taraf 5%.

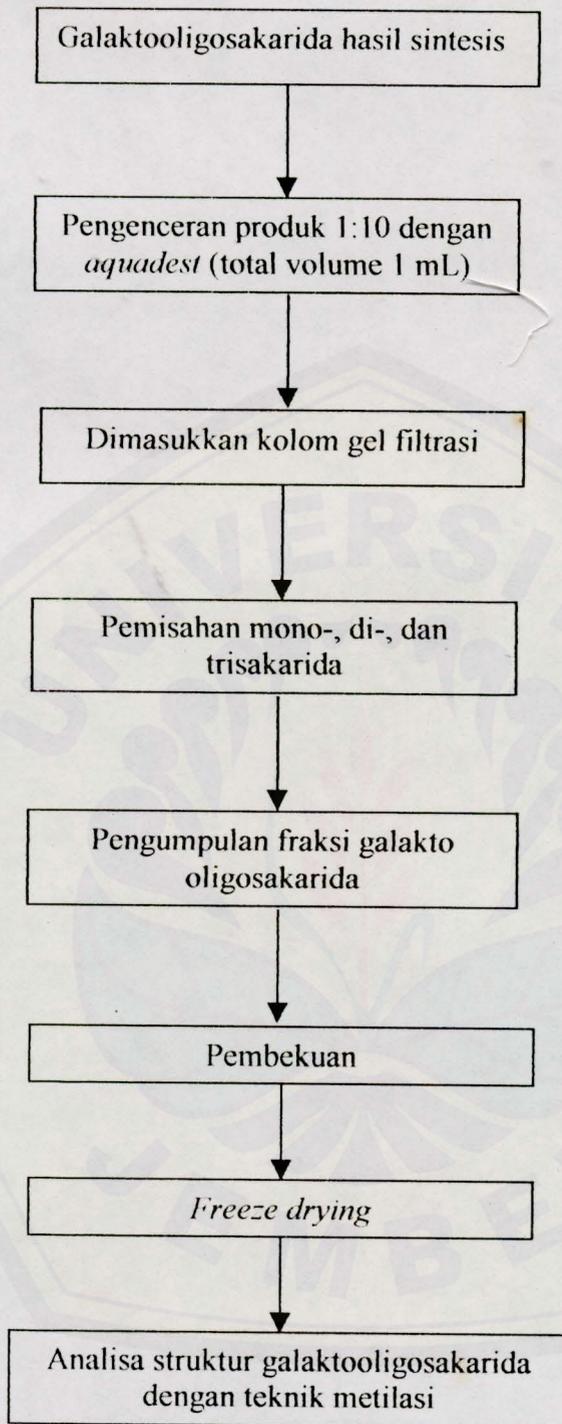
3.3.2 Pelaksanaan Penelitian



Gambar 1. Sintesis Homo-Galaktooligosakarida secara Enzimatis Menggunakan Enzim β-galaktosidase dari *Aspergillus oryzae*



Gambar 2. Sintesis Hetero-Galaktooligosakarida secara Enzimatis Menggunakan Enzim β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae*



Gambar 3. Purifikasi Galaktooligosakarida dengan Metode LPLC

3.4 Pengamatan

Pengamatan yang dilakukan terhadap hasil reaksi sintesis ini adalah sebagai berikut :

1. Analisa galaktooligosakarida dengan HPLC
2. Purifikasi galaktooligosakarida dengan LPLC
3. Analisa struktur galaktooligosakarida dengan GC-MS

3.4.1 Analisa Galaktooligosakarida dengan HPLC

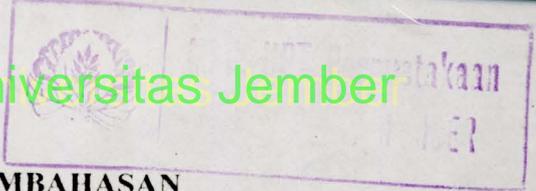
Produksi galaktooligosakarida dihitung dengan HPLC menggunakan kolom Aminex-HPX 87 H (300 mm x 7,8 mm) dengan eluen air (v/v) pada suhu 50°C. Kolom tersebut diberi aliran pada kecepatan 0,5 ml/menit dan karbohidrat dideteksi oleh RID (*Refractive Index Detector*) .

3.4.2 Purifikasi Galaktooligosakarida dengan LPLC

Sebagai langkah awal untuk menganalisa struktur, galaktooligosakarida harus dipurifikasi (memisahkan monosakarida, disakarida, dan trisakarida) dengan metode kromatografi gel dalam sebuah kolom (2,5 x 120 cm) yang berisi *BioGel* P-60 yang diberi aliran dengan air bebas ion dan gas (*bidest*) pada kecepatan 0,5 ml/menit. Seluruh karbohidrat akan dideteksi dengan RID, lalu fraksi-fraksi monosakarida, disakarida, dan trisakarida dikumpulkan dan dikeringkan dengan *freeze dryer*.

3.4.3 Analisa Struktur Galaktooligosakarida dengan GC-MS

Struktur dari produk kering di atas dianalisa melalui teknik metilasi, hidrolisis, reduksi, dan asetilasi. Senyawa akhir alditol asetat metilasi parsial (AAMP) dianalisa dengan metode kromatografi gas yang dilengkapi *flame ionisation detector* menggunakan kolom kapiler HP-5 (50 m x 0,32 mm) bersuhu 100-250°C. Mass spektra direkam dengan detektor massa yang selektif yang dikalibrasi dari 33 hingga 400 amu dengan kecepatan scan 1,9 scans per detik. Arus ionisasi tumbukan elektron diatur pada 50 mA.



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa galaktooligosakarida dapat disintesis secara enzimatis menggunakan β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae*. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Giec, dkk (1981) bahwa β -galaktosidase dari jamur bisa mengarah pada pembentukan sejumlah besar oligosakarida yang berbeda. Prenosil (1984) dengan menggunakan β -galaktosidase dari sumber yeast dan jamur yang bervariasi telah menemukan bahwa enzim yang berasal dari *Aspergillus oryzae* menghasilkan konsentrasi oligosakarida yang paling tinggi.

Sintesis enzimatis ini menghasilkan homo-galaktooligosakarida dan hetero-oligosakarida dalam bentuk disakarida dan trisakarida. Konsentrasi galaktooligosakarida yang dihasilkan pada jenis substrat, konsentrasi substrat, pH, dan lama inkubasi yang berbeda memberikan hasil yang berbeda sangat nyata. Hal ini dapat dilihat pada tabel analisis sidik ragam sintesis disakarida dan trisakarida dengan substrat galaktosa dan laktosa (Tabel 6 - 9).

4.1 Sintesis Homo Galaktooligosakarida

4.1.1 Pengaruh Lama Inkubasi

Semakin lama suatu reaksi enzimatis berlangsung maka semakin banyak substrat yang dapat diubah menjadi produk, hingga pada kondisi kesetimbangan dimana konsentrasi produk tidak akan meningkat lagi (stabil). Pada kondisi ini kecepatan reaksi sama dengan nol atau mendekati nol, dengan kata lain reaksi enzimatis yang sedang berjalan sudah mencapai kondisi optimalnya (proses penguraian substrat dan pembentukan produk sudah mencapai kondisi optimalnya).

Data sintesis homo-galaktooligosakarida menggunakan substrat galaktosa dan laktosa selama inkubasi 144 jam pada berbagai jenis substrat, konsentrasi substrat, dan pH secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 4 dan 5.

Berdasarkan Tabel 4 dan 5 dapat diketahui bahwa konsentrasi homo-galaktooligosakarida tertinggi sebesar 22093,2897 ppm (disakarida) dan 13163,3574 ppm (trisakarida) dicapai pada lama inkubasi 144 jam menggunakan substrat laktosa dengan konsentrasi 50% dan pH 7.

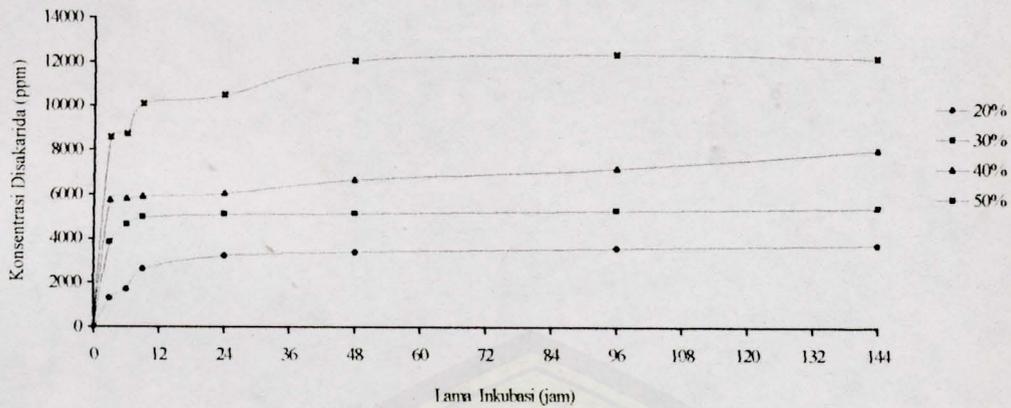
Tabel 4. Sintesis Homo-Galaktooligosakarida pada pH 6

Konsentrasi Substrat (%)	Inkubasi (jam)	Galaktosa		Laktosa	
		Disakarida (ppm)	Trisakarida (ppm)	Disakarida (ppm)	Trisakarida (ppm)
20	3	1317,512	6618,231	1337,971	6265,794
	6	1718,494	6630,866	1387,889	6324,910
	9	2625,205	6659,296	2013,912	6467,509
	24	3235,679	6682,310	2517,185	6821,300
	48	3390,344	6735,560	3064,648	6817,238
	96	3576,923	6753,610	3353,519	6904,783
	144	3760,229	6812,726	3497,545	6960,289
30	3	3838,789	6815,433	4098,200	7060,018
	6	4648,936	6869,585	4301,146	7154,332
	9	4959,083	6960,289	5142,390	7291,968
	24	5103,110	6948,105	5540,098	7694,495
	48	5145,663	7017,599	7590,016	7795,578
	96	5292,962	7049,188	7680,851	8001,805
	144	5432,897	7100,181	7857,610	8184,567
40	3	5747,954	6873,646	8803,601	8295,578
	6	5817,512	7106,949	8824,877	8373,195
	9	5913,257	7141,245	10565,466	8386,282
	24	6035,188	7192,238	10606,383	8629,964
	48	6661,211	7233,755	10739,771	8700,361
	96	7197,218	7233,303	11094,926	8807,762
	144	8045,827	7181,859	13301,946	8810,469
50	3	8588,380	7162,004	16564,648	8851,534
	6	8702,946	7170,126	18008,183	9309,567
	9	10082,651	7225,181	19396,072	9615,975
	24	10478,723	7302,347	18924,714	10763,538
	48	12062,193	7343,863	19376,432	11309,116
	96	12378,069	7439,531	18116,203	11498,195
	144	12220,131	7671,029	20797,872	11499,097

Tabel 5. Sintesis Homo-Galaktooligosakarida pada pH 7

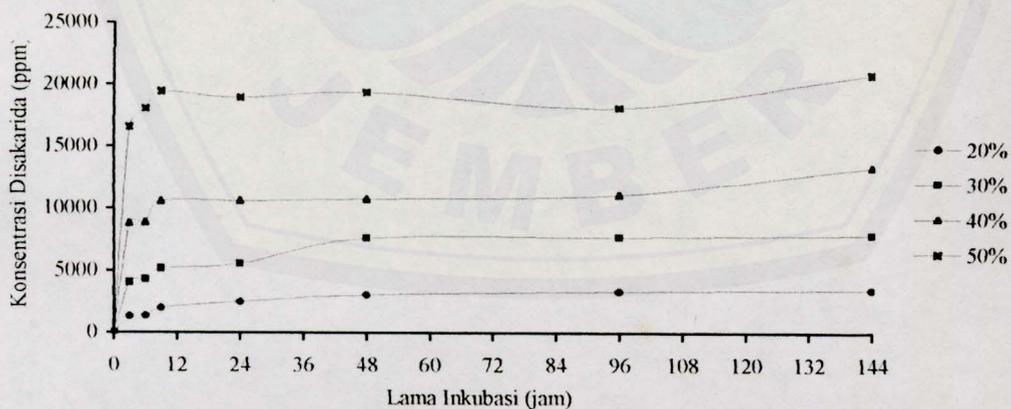
Konsentrasi Substrat (%)	Inkubasi (jam)	Galaktosa		Laktosa	
		Disakarida (ppm)	Trisakarida (ppm)	Disakarida (ppm)	Trisakarida (ppm)
20	3	1325,696	6575,361	1329,787	5899,368
	6	1387,070	6696,300	1441,080	6045,578
	9	1575,286	6818,141	1657,119	6169,675
	24	1894,435	6859,206	2283,142	6314,531
	48	2086,743	6901,625	3362,520	6386,282
	96	2270,867	6930,957	3384,615	6708,484
	144	2474,632	6941,336	3607,201	6816,787
30	3	2209,493	6958,935	3707,038	6827,617
	6	2414,075	6982,401	3971,358	6885,830
	9	2549,100	6995,939	4230,769	6944,946
	24	2660,393	7054,152	4341,244	7038,357
	48	2743,044	7136,733	4382,979	7111,011
	96	2992,635	7134,928	4648,118	7133,123
	144	3037,643	7201,715	5054,010	7103,339
40	3	3486,907	7247,744	5231,588	7394,404
	6	3729,951	7327,617	5416,530	7537,455
	9	3926,350	7434,567	5571,195	7597,022
	24	4385,434	7481,949	7516,367	8163,809
	48	4468,903	7496,841	8603,110	8965,704
	96	4756,956	7654,332	10743,044	9333,032
	144	4809,329	8000,451	11054,010	7353,339
50	3	5010,638	8254,061	11470,540	9774,819
	6	5216,858	8281,137	14097,381	9959,838
	9	5375,614	8708,032	18004,910	10514,440
	24	5851,064	8818,141	18481,178	11505,415
	48	5986,907	8789,711	19693,944	11555,054
	96	6407,529	9378,610	22381,342	11667,419
	144	6520,458	9314,079	22093,290	13163,357

Disakarida dan trisakarida yang dihasilkan dalam reaksi sintesis enzimatis ini mengalami peningkatan secara cepat pada awal reaksi dan konstan setelah mencapai kondisi kesetimbangan. Kecenderungan reaksi semacam ini dapat dilihat pada Gambar 1 – 8.



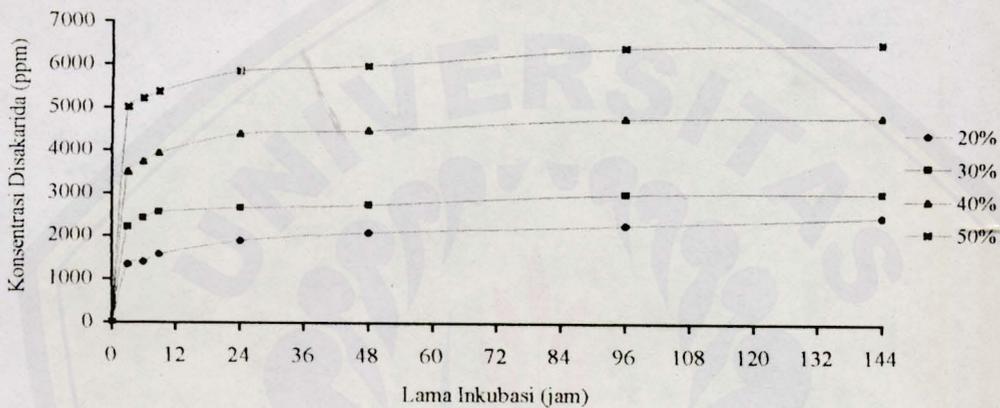
Gambar 4. Sintesis Disakarida dengan Substrat Galaktosa (20% - 50%) pada pH 6 yang Diinkubasi pada 50°C Selama 0 – 144 jam

Pada Gambar 4 dapat diketahui bahwa sintesis disakarida pada berbagai konsentrasi galaktosa meningkat secara cepat pada 3 jam pertama dan mencapai kondisi setimbang setelah 48 jam. Konsentrasi maksimum dihasilkan pada inkubasi 144 jam untuk konsentrasi galaktosa 20% - 40%, sedangkan untuk konsentrasi galaktosa 50% dihasilkan pada inkubasi 96 jam dan menurun pada inkubasi 144 jam. Penurunan ini terjadi karena enzim telah terdenaturasi oleh panas sehingga aktivitasnya menurun dan produk yang dihasilkan juga menurun.



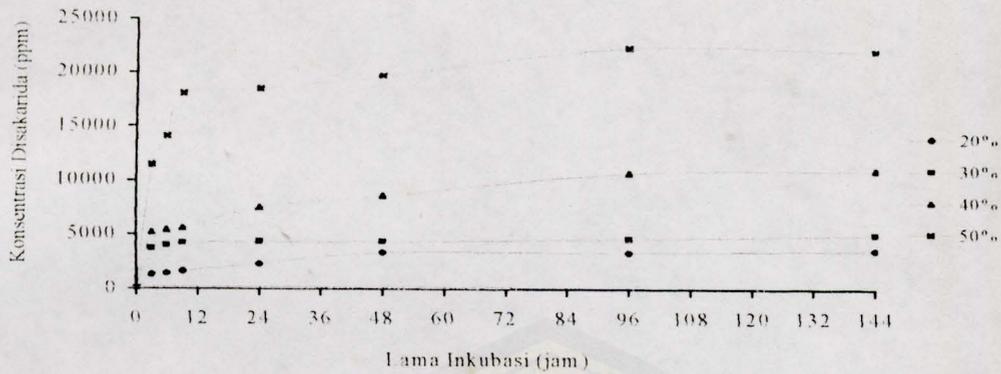
Gambar 5. Sintesis Disakarida dengan Substrat Laktosa (20% - 50%) pada pH 6 yang Diinkubasi pada 50°C selama 0 – 144 jam

Pada Gambar 5 dapat diketahui bahwa konsentrasi disakarida pada berbagai konsentrasi laktosa meningkat secara cepat pada 3 jam pertama dan mencapai kondisi setimbang setelah 48 jam. Konsentrasi maksimum dihasilkan pada inkubasi 144 jam untuk berbagai konsentrasi laktosa. Berdasarkan Tabel 4 dan 5 dapat dilihat bahwa sintesis disakarida menggunakan substrat laktosa menghasilkan disakarida yang lebih besar daripada substrat galaktosa pada kondisi yang sama, bahkan mendekati 2 kali lipat untuk konsentrasi laktosa 50%.



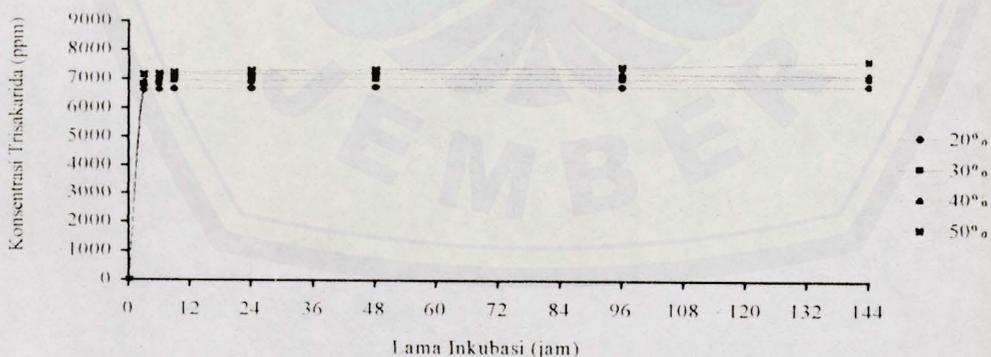
Gambar 6. Sintesis Disakarida dengan Substrat Galaktosa (20% - 50%) pada pH 7 yang Diinkubasi pada 50°C selama 0 – 144 jam

Pada Gambar 6 dapat diketahui bahwa sintesis disakarida pada berbagai konsentrasi galaktosa meningkat secara cepat pada 3 jam pertama menghasilkan disakarida dan mencapai kondisi setimbang setelah 48 jam. Konsentrasi maksimum dihasilkan pada inkubasi 144 jam untuk berbagai konsentrasi galaktosa. Berdasarkan Tabel 4 dan 5 dapat dilihat bahwa secara umum sintesis disakarida dengan substrat galaktosa pada pH 7 lebih kecil daripada pH 6.



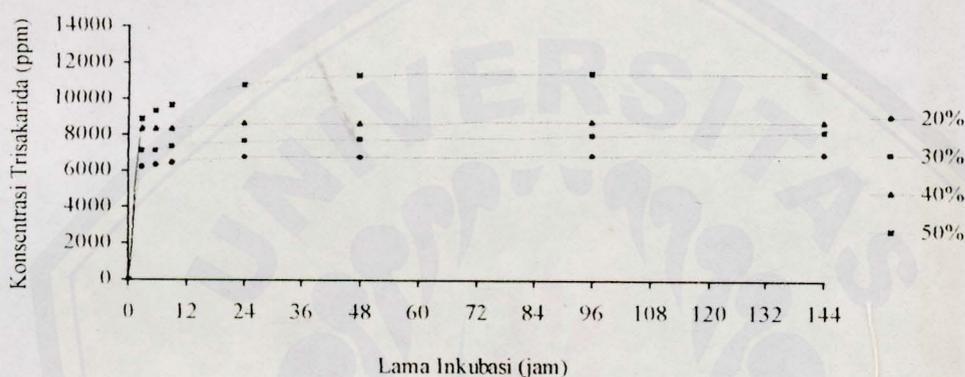
Gambar 7. Sintesis Disakarida dengan Substrat Laktosa (20% - 50%) pada pH 7 yang Diinkubasi pada 50°C selama 0 – 144 jam

Pada Gambar 7 dapat diketahui bahwa sintesis disakarida pada berbagai konsentrasi laktosa meningkat secara cepat pada 3 jam pertama dan mencapai kondisi setimbang setelah 48 jam. Konsentrasi maksimum dihasilkan pada inkubasi 144 jam untuk berbagai konsentrasi laktosa. Berdasarkan Tabel 4 dan 5 dapat dilihat bahwa secara umum sintesis disakarida dengan substrat laktosa sedikit lebih besar pada pH 6 daripada yang dihasilkan pada pH 7.



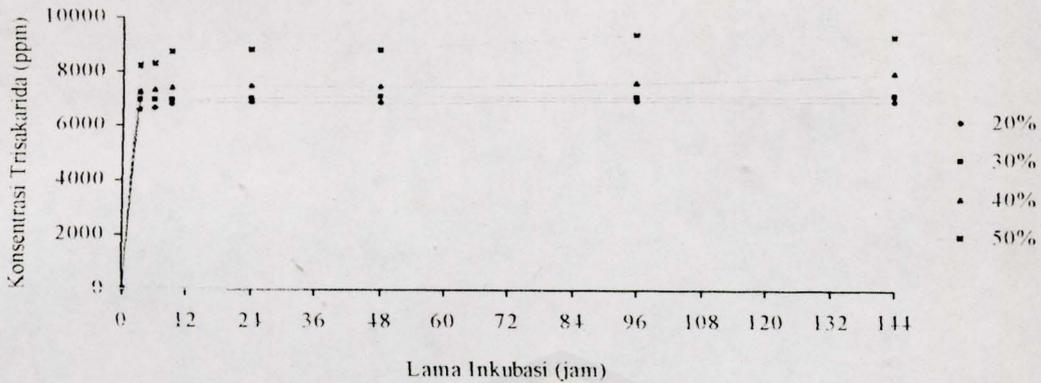
Gambar 8. Sintesis Trisakarida dengan Substrat Galaktosa (20% - 50%) pada pH 6 yang Diinkubasi pada 50°C selama 0 – 144 jam

Pada Gambar 8 dapat diketahui bahwa sintesis trisakarida pada berbagai konsentrasi galaktosa meningkat secara cepat pada 3 jam pertama dan mencapai kondisi setimbang setelah 48 jam. Konsentrasi maksimum dihasilkan pada inkubasi 144 jam untuk berbagai konsentrasi galaktosa. Berdasarkan Tabel 4 dan 5 dapat dilihat bahwa konsentrasi trisakarida yang dihasilkan mempunyai perbedaan yang tidak terlalu tinggi pada masing-masing konsentrasi galaktosa yang digunakan.



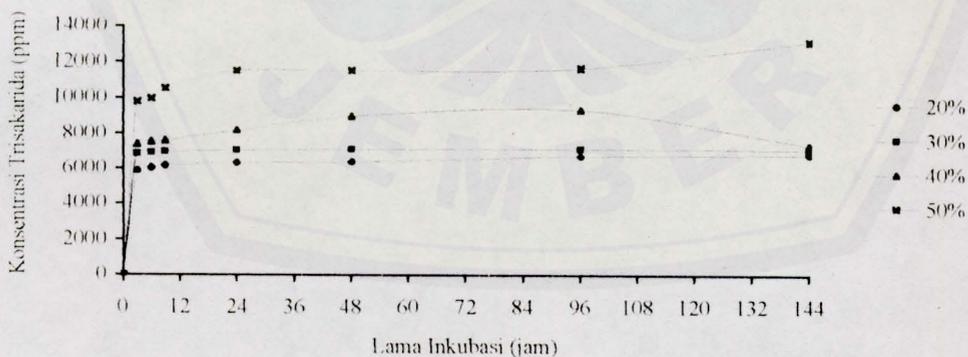
Gambar 9. Sintesis Trisakarida dengan Substrat Laktosa (20% - 50%) pada pH 6 yang Diinkubasi pada 50°C selama 0 – 144 jam

Pada Gambar 9 dapat diketahui bahwa sintesis trisakarida pada berbagai konsentrasi laktosa meningkat secara cepat pada 3 jam pertama dan mencapai kondisi setimbang setelah 48 jam. Konsentrasi maksimum dihasilkan pada inkubasi 144 jam untuk berbagai konsentrasi laktosa. Berdasarkan Tabel 4 dan 5 dapat dilihat bahwa konsentrasi trisakarida maksimum yang dihasilkan dengan substrat laktosa hampir 2 kali lipat lebih banyak daripada yang dihasilkan dengan substrat galaktosa pada kondisi yang sama.



Gambar 10. Sintesis Trisakarida dengan Substrat Galaktosa (20% - 40%) pada pH 7 yang Diinkubasi pada 50°C selama 0 – 144 jam

Pada Gambar 10 dapat diketahui bahwa sintesis trisakarida pada berbagai konsentrasi galaktosa meningkat secara cepat pada 3 jam pertama dan mencapai kondisi setimbang setelah 48 jam. Konsentrasi maksimum dihasilkan pada inkubasi 144 jam untuk konsentrasi galaktosa 20% - 40%, sedangkan untuk konsentrasi galaktosa 50% dihasilkan konsentrasi trisakarida maksimum pada inkubasi 96 jam dan menurun pada inkubasi 144 jam. Hal ini dimungkinkan terjadi karena enzim telah terdenaturasi oleh panas sehingga aktivitasnya berkurang.



Gambar 11. Sintesis Trisakarida dengan Substrat Laktosa (20% - 50%) pada pH 7 yang Diinkubasi pada 50°C selama 0 – 144 jam

Pada Gambar 11 dapat diketahui bahwa sintesis trisakarida pada berbagai konsentrasi laktosa meningkat secara cepat pada 3 jam pertama dan mencapai kondisi setimbang setelah 48 jam. Konsentrasi maksimum dihasilkan pada inkubasi 144 jam untuk konsentrasi 20%, 30%, dan 50%, sedangkan untuk konsentrasi laktosa 40 % dihasilkan pada inkubasi 96 jam dan menurun pada inkubasi 144 jam. Hal ini dimungkinkan terjadi karena enzim telah terdenaturasi oleh panas sehingga aktivitasnya berkurang.

4.1.2 Pengaruh Jenis Substrat

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sintesis homo-galaktooligosakarida menggunakan substrat laktosa menghasilkan disakarida dan trisakarida dengan konsentrasi yang lebih tinggi daripada yang menggunakan substrat galaktosa. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 4 dan 5.

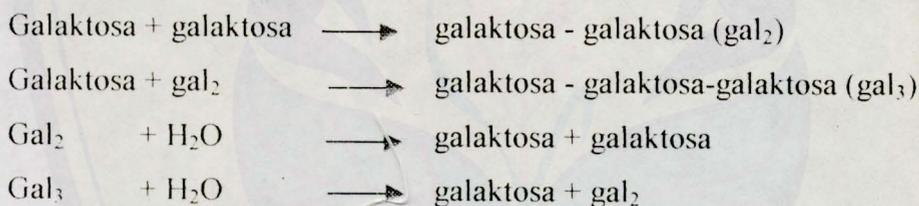
Berdasarkan Tabel 4 dapat diketahui bahwa pada inkubasi 48 jam dengan konsentrasi substrat 50% dihasilkan disakarida sebesar 19376,432 ppm (substrat laktosa) dan 12062,193 ppm (substrat galaktosa), sedangkan trisakarida yang dihasilkan sebesar 11309,116 ppm (substrat laktosa) dan 7343,863 (substrat galaktosa) ppm. Pada Tabel 5 juga dapat diketahui bahwa pada inkubasi 48 jam dengan konsentrasi substrat 50% dihasilkan disakarida sebesar 19693,944 ppm (substrat laktosa) dan 5986,907 ppm (substrat galaktosa), sedangkan trisakarida yang dihasilkan sebesar 11555,054 ppm (substrat laktosa) dan 8789,711 (substrat galaktosa) ppm.

Dari data tersebut dapat diketahui dengan jelas bahwa substrat laktosa menghasilkan disakarida dan trisakarida yang lebih tinggi daripada galaktosa pada kondisi reaksi yang sama. Hal ini terjadi karena laktosa adalah substrat yang lebih sesuai untuk enzim β -galaktosidase daripada galaktosa, sehingga dimungkinkan laktosa dapat terurai secara sempurna dan dapat disintesis lanjut secara sempurna pula menghasilkan produk yang lebih banyak. Seperti yang dinyatakan oleh Winarno (1980) bahwa β -galaktosidase memerlukan laktosa sebagai substrat.

Dengan kata lain dapat dikatakan bahwa spesifitas enzim β -galaktosidase terhadap laktosa lebih tinggi dibanding spesifitas enzim β -galaktosidase terhadap galaktosa, karena pada dasarnya suatu enzim bersifat spesifik terhadap suatu substrat dalam mengkatalisis suatu reaksi. Hal ini diperjelas oleh Page (1997) yang menyatakan bahwa enzim sebagai katalis menunjukkan tingkat spesifitas yang tinggi terhadap substrat, yaitu bentuk molekul substrat harus mempunyai orientasi yang sesuai dengan gugus-gugus aktif dari enzim.

Selain itu rendahnya galaktooligosakarida yang dihasilkan pada reaksi enzimatik yang menggunakan substrat galaktosa terjadi karena substrat yang berupa monosakarida (galaktosa) mampu meningkatkan kecepatan reaksi sintesis untuk membentuk disakarida dan trisakarida, dimana disakarida yang terbentuk dapat berfungsi sebagai donor untuk membentuk trisakarida. Seiring dengan itu aktivitas air dalam substrat yang cukup tinggi menyebabkan produk yang telah terbentuk mengalami proses hidrolisis untuk memecah kembali produk tersebut.

Estimasi reaksi yang mungkin terjadi pada sintesis galaktooligosakarida dengan substrat galaktosa adalah :

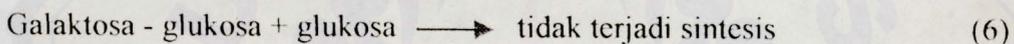
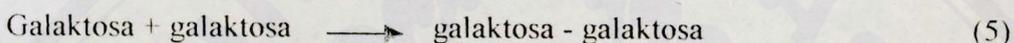
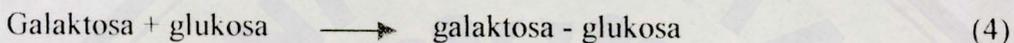
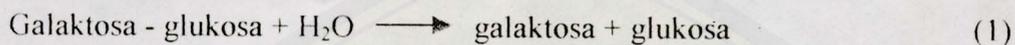


Estimasi tersebut menunjukkan bahwa reaksi sintesis disakarida dan trisakarida dengan substrat galaktosa terjadi pada awal reaksi. Disakarida (gal_2) yang terbentuk dapat berfungsi sebagai donor untuk membentuk trisakarida (gal_3). Reaksi hidrolisis tetap terjadi untuk memecah gal_2 dan gal_3 yang terbentuk.

Sedangkan pada reaksi enzimatik yang menggunakan substrat laktosa, sintesis galaktooligosakarida terjadi pada saat aktivitas air sudah berkurang bahkan habis, karena aktivitas air yang ada telah digunakan terlebih dahulu untuk melakukan reaksi hidrolisis laktosa menjadi galaktosa dan glukosa yang terjadi pada awal reaksi. Selanjutnya terjadi reaksi hidrolisis terbalik untuk mensintesis galaktooligosakarida dari galaktosa yang dihasilkan pada reaksi hidrolisis.

Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Zarate dan Lopez (1989) mengenai sebuah penelitian yang berhubungan dengan maltosa, laktosa, sukrosa, dan enzim dari *Aspergillus oryzae* dapat membuktikan bahwa pemecahan laktosa menjadi beberapa monosakarida diikuti dengan pembentukan beberapa oligosakarida. Monsan dan Paul (1995) juga menambahkan bahwa pada konsentrasi monosakarida yang sangat tinggi, enzim-enzim glikosidase berbalik arah untuk mengkatalisis reaksi kondensasi.

Estimasi reaksi yang mungkin terjadi pada sintesis galaktooligosakarida dengan substrat laktosa adalah :



Dengan konsentrasi laktosa tidak lebih dari 50% masih ada aktivitas air yang mampu mendukung terjadinya reaksi hidrolisis oleh enzim untuk memecah laktosa menjadi galaktosa dan glukosa (1). Selanjutnya reaksi sintesis akan berlangsung dengan galaktosa berfungsi sebagai donor dan galaktosa - glukosa sebagai aseptor sehingga terbentuk disakarida (2) dan trisakarida (3). Sedangkan glukosa hasil hidrolisis akan bertindak sebagai aseptor dengan menerima kembali galaktosa menjadi galaktosa - glukosa (4). Reaksi sintesis yang melibatkan glukosa sebagai donor dengan sisi hidroksil bebas (C-1) tidak mungkin terjadi pada kondisi reaksi yang sama (5).

Produk yang terbentuk pada reaksi sintesis ini tidak mengalami reaksi hidrolisis lagi, mengingat aktivitas air yang ada sangat rendah bahkan mungkin sudah habis, karena sudah digunakan untuk reaksi hidrolisis pada awal reaksi enzimatik. Sehingga galaktooligosakarida yang dihasilkan lebih tinggi pada reaksi yang menggunakan substrat laktosa daripada galaktosa.

4.1.3 Pengaruh Konsentrasi Substrat

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam sintesis disakarida dan trisakarida dengan substrat galaktosa dan laktosa (Tabel 6 - 9) dapat diketahui bahwa perlakuan konsentrasi substrat, pH, dan interaksi keduanya menunjukkan hasil yang berbeda sangat nyata pada sintesis disakarida dan trisakarida dengan menggunakan substrat galaktosa dan laktosa.

Tabel 6. Analisis Sidik Ragam Sintesis Disakarida dengan Substrat Galaktosa

Sumber Keragaman	db	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F hitung	F tabel	
					5%	1%
Perlakuan	7	141490409.6199	20212915.6600	2965.5777 **	3.50	6.19
Faktor A	3	91139224.1552	30379741.3851	4457.2236 **	4.07	7.59
Faktor B	1	39797305.9903	39797305.9903	5838.9401 **	5.32	11.26
Interaksi AB	3	10553879.4744	3517959.8248	516.1444 **	4.07	7.59
Galat	8	54526.7537	6815.8442			
Total	15	283035345.9935	93914738.7044			

Keterangan : ** : berbeda sangat nyata

* : berbeda nyata

ns : berbeda tidak nyata

Tabel 7. Analisis Sidik Ragam Sintesis Disakarida dengan Substrat Laktosa

Sumber Keragaman	db	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F hitung	F tabel	
					5%	1%
Perlakuan	7	760926491.1292	108703784.4470	33056.8226**	3.50	6.19
Faktor A	3	529135526.7854	176378508.9285	53636.7074**	4.07	7.59
Faktor B	1	3324206.3767	3324206.3767	1010.8912**	5.32	11.26
Interaksi AB	3	228466757.9672	76155585.9891	23158.9149**	4.07	7.59
Galat	8	26307.1344	3288.3918			
Total	15	1521879289.3929	364565374.1330			

Keterangan : ** : berbeda sangat nyata

* : berbeda nyata

ns : berbeda tidak nyata

Tabel 8. Analisis Sidik Ragam Sintesis Trisakarida dengan Substrat Galaktosa

Sumber Keragaman	db	Jumlah	Kuadrat	F hitung	F tabel	
		Kuadrat	Tengah		5%	1%
Perlakuan	7	9397689.3387	1342527.0484	690.0988 **	3.50	6.19
Faktor A	3	6001131.4179	2000377.1393	1028.2532 **	4.07	7.59
Faktor B	1	1811429.4479	1811429.4479	931.1285 **	5.32	11.26
Interaksi AB	3	1585128.4729	528376.1576	271.6010 **	4.07	7.59
Galat	8	15563.3035	1945.4129			
Total	15	18810941.9808	5684655.2062			

Keterangan : ** : berbeda sangat nyata

* : berbeda nyata

ns : berbeda tidak nyata

Tabel 9. Analisis Sidik Ragam Sintesis Trisakarida dengan Substrat Laktosa

Sumber Keragaman	db	Jumlah	Kuadrat	F hitung	F tabel	
		Kuadrat	Tengah		5%	1%
Perlakuan	7	77919368.2622	11131338.3232	6391.9199 **	3.50	6.19
Faktor A	3	71836733.9327	23945577.9776	13750.2079 **	4.07	7.59
Faktor B	1	258877.0330	258877.0330	148.6543 **	5.32	11.26
Interaksi B	3	5823757.2965	1941252.4322	1114.7204 **	4.07	7.59
Galat	8	13931.7620	1741.4702			
Total	15	155852668.2863	37278787.2361			

Keterangan : ** : berbeda sangat nyata

* : berbeda nyata

ns : berbeda tidak nyata

Pengaruh konsentrasi substrat terhadap galaktooligosakarida yang dihasilkan dapat diketahui melalui uji beda rata-rata terhadap disakarida dan trisakarida yang dihasilkan pada kedua jenis substrat yang digunakan. Hasil uji beda rata-rata tersebut dapat dilihat pada Tabel 10 - 13.

Tabel 10. Uji Beda Rata-Rata Sintesis Disakarida dengan Substrat Galaktosa pada Berbagai Konsentrasi Substrat dan Inkubasi 144 jam

Perlakuan	Rata-Rata	Rangking	Notasi
A4	9370.2946	1	a
A3	6427.5778	2	b
A2	4235.2701	3	c
A1	3117.4304	4	d

Keterangan : notasi yang tidak sama menunjukkan perlakuan berbeda nyata

Tabel 11. Uji Beda Rata-Rata Sintesis Disakarida dengan Substrat Laktosa pada Berbagai Konsentrasi Substrat dan Inkubasi 144 jam

Perlakuan	Rata-Rata	Rangking	Notasi
A4	21445.5810	1	a
A3	12177.9869	2	b
A2	6455.8102	3	c
A1	3552.3732	4	d

Keterangan : notasi yang tidak sama menunjukkan perlakuan berbeda nyata

Tabel 12. Uji Beda Rata-Rata Sintesis Trisakarida dengan Substrat Galaktosa pada Berbagai Konsentrasi Substrat dan Inkubasi 144 jam

Perlakuan	Rata-Rata	Rangking	Notasi
A4	8492.5542	1	a
A3	7591.1553	2	b
A2	7150.9477	3	c
A1	6877.0307	4	d

Keterangan : notasi yang tidak sama menunjukkan perlakuan berbeda nyata

Tabel 13. Uji Beda Rata-Rata Sintesis Trisakarida dengan Substrat Laktosa pada Berbagai Konsentrasi Substrat dan Inkubasi 144 jam

Perlakuan	Rata-Rata	Rangking	Notasi
A4	12331.2274	1	a
A3	8081.9043	2	b
A2	7643.9531	3	c
A1	6888.5379	4	d

Keterangan : notasi yang tidak sama menunjukkan perlakuan berbeda nyata

Berdasarkan hasil uji beda beda rata-rata pada Tabel 10 - 13 dapat diketahui bahwa antara A1, A2, A3, dan A4 (konsentrasi substrat 20 %, 30 %, 40 %, dan 50 %) menunjukkan hasil yang berbeda nyata. Hal ini dapat diartikan bahwa perbedaan konsentrasi substrat pada tiap-tiap kombinasi perlakuan memberikan pengaruh yang nyata terhadap galaktooligosakarida yang dihasilkan.

Rata-rata konsentrasi galaktooligosakarida terendah dihasilkan pada perlakuan A1 (konsentrasi substrat 20 %), kemudian semakin meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi substrat yang digunakan, sehingga rata-rata konsentrasi galaktooligosakarida tertinggi dihasilkan pada perlakuan A4 (konsentrasi substrat 50 %). Hal ini juga dapat dilihat secara jelas pada Tabel 14 dan 15 berikut ini.

Tabel 14. Sintesis Homo-Galaktooligosakarida pada pH 6 dan Inkubasi 48 jam

Konsentrasi Substrat	Galaktosa		Laktosa	
	Disakarida	Trisakarida	Disakarida	Trisakarida
20%	3390,344	6735,560	3064,648	6817,238
30%	5145,663	7017,599	7590,016	7795,578
40%	6661,211	7233,755	10739,771	8700,361
50%	12062,193	7343,863	19376,432	11309,116

Tabel 15. Sintesis Homo-Galaktooligosakarida pada pH 7 dan Inkubasi 48 jam

Konsentrasi Substrat	Galaktosa		Laktosa	
	Disakarida	Trisakarida	Disakarida	Trisakarida
20%	2086,743	6901,625	3362,520	6386,282
30%	2743,044	7136,733	4382,979	7111,011
40%	4468,903	7496,841	8603,110	8965,705
50%	5986,907	8789,711	19693,944	11555,054

Berdasarkan Tabel 14 dan 15 dapat diketahui bahwa dalam reaksi sintesis ini terjadi peningkatan konsentrasi galaktooligosakarida seiring dengan peningkatan konsentrasi substrat, dengan kata lain semakin tinggi konsentrasi substrat yang digunakan maka semakin tinggi pula konsentrasi galaktooligosakarida yang dihasilkan. Hasil penelitian ini sesuai dengan teori yang dinyatakan oleh Zarate dan Lopez (1989) bahwa galaktooligosakarida yang dihasilkan akan besar jika konsentrasi awal laktosa yang digunakan lebih tinggi.

Hal ini diperkuat oleh Matsumoto, dkk (1989) yang menyatakan bahwa konversi laktosa menjadi oligosakarida meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi laktosa awal. Rastall (1996) semakin mempertegas hal ini dengan menyatakan bahwa pada konsentrasi laktosa yang tinggi, enzim ini (β -galaktosidase) akan mengkatalisis reaksi pemindahan yang akan membentuk trisakarida dan tetrasakarida dari laktosa. Hanya saja dalam penelitian ini galaktooligosakarida yang dihasilkan terbatas pada disakarida dan trisakarida, tidak sampai pada tetrasakarida. Hal ini dimungkinkan terjadi karena konsentrasi laktosa atau aktivitas enzim yang digunakan kurang tinggi, sehingga produk yang dihasilkan menjadi terbatas.

Selain itu juga dapat dimungkinkan bahwa pada konsentrasi substrat yang rendah, aktivitas air yang ada dalam substrat sangat tinggi, sehingga memacu terjadinya reaksi hidrolisis dan menghambat terjadinya reaksi sintesis, karena terjadi kompetisi antara reaksi hidrolisis dan sintesis, dimana pada aktivitas air yang tinggi terdapat kecenderungan yang cukup besar untuk terjadinya reaksi hidrolisis. Hal ini sesuai dengan teori yang dinyatakan oleh Loveless (1987) bahwa aktivitas enzim dapat terjadi jika molekul air keberadaannya lebih banyak dari absorpsi monomolekuler. Peningkatan kadar air bebas digunakan untuk melancarkan reaksi enzimatik dan umumnya hanya terjadi pada aktivitas air yang sesuai atau di atas aktivitas air untuk absorpsi air.

Oleh karena itu konsentrasi substrat yang tinggi dan dengan disertai suhu yang cukup tinggi (50°C) dapat meningkatkan daya larut substrat dan menurunkan aktivitas air. Hal ini sesuai dengan yang dinyatakan oleh Larsson, dkk (1972) bahwa kombinasi antara konsentrasi substrat yang tinggi dan temperatur yang tinggi dapat meningkatkan kelarutan substrat dan menurunkan aktivitas air. Loveless (1987) menambahkan bahwa semakin tinggi suhu reaksi, aktivitas enzim akan meningkat pula. Kedua hal tersebut dapat meningkatkan terjadinya reaksi sintesis dan menghambat terjadinya reaksi hidrolisis serta dapat menghasilkan galaktooligosakarida dengan konsentrasi yang lebih tinggi.

4.1.4 Pengaruh pH

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam sintesis disakarida dan trisakarida dengan substrat galaktosa dan laktosa (Tabel 6 - 9) dapat diketahui bahwa pH memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata pada sintesis disakarida dan trisakarida dengan menggunakan substrat galaktosa dan laktosa. Secara jelas pengaruh pH terhadap galaktooligosakarida yang dihasilkan pada reaksi sintesis ini dapat dilihat pada Tabel 16 -19.

Tabel 16. Sintesis Disakarida dengan Substrat Galaktosa 50% pada berbagai pH dan Inkubasi 48 jam

pH	Konsentrasi Disakarida (ppm)
6	12062,193
7	5986,907

Tabel 17. Sintesis Disakarida dengan Substrat Laktosa 50% pada Berbagai pH dan Inkubasi 48 jam

pH	Konsentrasi Disakarida (ppm)
6	19376,432
7	19693,944

Tabel 18. Sintesis Trisakarida dengan Substrat Galaktosa 50% pada Berbagai pH dan Inkubasi 48 jam

pH	Konsentrasi Trisakarida (ppm)
6	7343,863
7	8789,711

Tabel 19. Sintesis Trisakarida dengan Substrat Laktosa 50% pada Berbagai pH dan Inkubasi 48 jam

pH	Konsentrasi Disakarida (ppm)
6	11309,116
7	11555,054

Berdasarkan Tabel 16 - 19 dapat diketahui bahwa perbedaan pH memberikan pengaruh yang nyata terhadap galaktooligosakarida yang dihasilkan pada reaksi sintesis ini. Galaktooligosakarida yang dihasilkan lebih tinggi pada pH 7 daripada pH 6, kecuali pada Tabel 16 berlaku sebaliknya, yaitu galaktooligosakarida yang dihasilkan pada pH 6 lebih tinggi daripada pH 7.

Menurut Winarno (1986) aktivitas dan stabilitas enzim sangat dipengaruhi oleh lingkungan yang berupa pH, suhu, kadar air dan aktivitas air. Sehingga penentuan pH reaksi yang tepat juga sangat menentukan dalam reaksi enzimatik untuk menghasilkan suatu produk yang optimal. Menurut Shahib (1992) kebanyakan enzim bekerja pada pH tertentu (optimal), sedangkan jika di atas atau di bawah pH tersebut aktivitasnya akan menurun. Sehingga dimungkinkan pH 7 adalah pH yang lebih mendekati optimal daripada pH 6 untuk enzim β -galaktosidase dalam mengkatalisis reaksi sintesis galaktooligosakarida, sehingga pada pH 7 dihasilkan produk yang lebih tinggi daripada pH 6.

Hal ini diperkuat oleh Donald (1996) yang menyatakan bahwa enzim β -galaktosidase dapat dilarutkan dalam sodium fosfat pH 7,5. Berdasarkan literatur tersebut dapat dimungkinkan pada pH 7,5 aktivitas enzim mendekati optimal, sehingga dihasilkan produk yang lebih tinggi. Oleh karena itu dalam penelitian ini dihasilkan galaktooligosakarida yang lebih tinggi pada pH 7 daripada pH 6, mengingat pH 7 lebih mendekati pH 7,5 daripada pH 6.

4.2 Sintesis Hetero-Galaktooligosakarida

Sintesis hetero-galaktooligosakarida dilakukan dengan menggunakan substrat campuran yang terdiri dari donor dan aseptor. Sebagai donor adalah galaktosa dan sebagai aseptor ada 4 macam gula, yaitu glukosa, mannos, maltosa, dan sukrosa. Hal ini sesuai dengan yang dinyatakan oleh Rastall dkk. (1991) bahwa sintesis hetero-galaktooligosakarida akan berjalan jika tersedia satu substrat sebagai donor dan gula yang lain sebagai aseptor. Konsentrasi total substrat campuran 50 % (gr/ml) yang diinkubasi selama 144 jam, dengan asumsi pada inkubasi tersebut akan dihasilkan galaktooligosakarida yang maksimal.

Tabel 20. Sintesis Disakarida dari Beberapa Substrat Campuran

Donor	Aseptor	Produk	Konsentrasi (ppm)
Galaktosa	Glukosa	Galaktosil-Glukosa	14702,128
Galaktosa	Mannosa	Galaktosil-Mannosa	16734,861
Galaktosa	Maltosa	Galaktosil-Maltosa	40963,993
Galaktosa	Sukrosa	Galaktosil-Sukrosa	18903,437

Tabel 21. Sintesis Trisakarida dari Beberapa Substrat Campuran

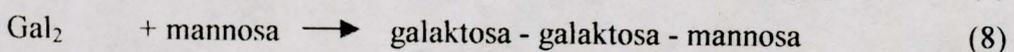
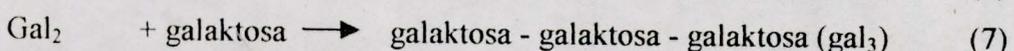
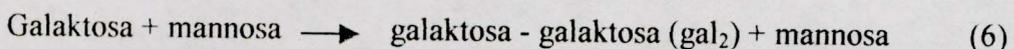
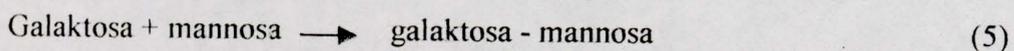
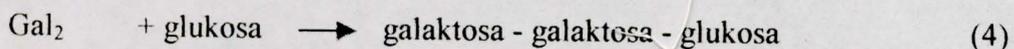
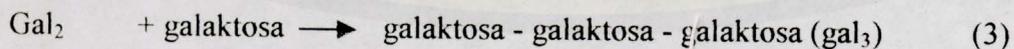
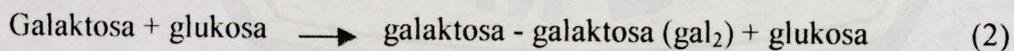
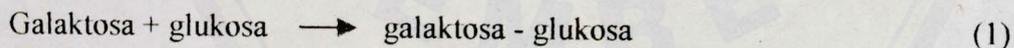
Donor	Aseptor	Produk	Konsentrasi (ppm)
Galaktosa	Glukosa	Galaktosil-Glukosa	6110,108
Galaktosa	Mannosa	Galaktosil-Mannosa	6385,379
Galaktosa	Maltosa	Galaktosil-Maltosa	12012,635
Galaktosa	Sukrosa	Galaktosil-Sukrosa	9398,917

Hasil penelitian (dapat dilihat pada Tabel 20 dan 21) menunjukkan bahwa hetero-galaktooligosakarida dapat disintesis menggunakan substrat campuran seperti yang telah disebutkan di atas, dimana konsentrasi disakarida yang dihasilkan berkisar pada 14702,128 – 40963,993 ppm dan konsentrasi trisakarida yang dihasilkan berkisar pada 6110,108 – 12012,635 ppm.

Dari data tersebut dapat diketahui bahwa konsentrasi disakarida yang dihasilkan lebih besar 2 hingga 3 kali lipat dibanding konsentrasi trisakarida yang dihasilkan. Data ini identik dengan data yang diperoleh pada sintesis homo-galaktooligosakarida, dimana disakarida yang dihasilkan juga lebih banyak daripada trisakarida yang dihasilkan.

Disakarida dan trisakarida yang dihasilkan tidak hanya terbentuk dari ikatan antara donor dan aseptor, tetapi dapat dimungkinkan bahwa disakarida dan trisakarida yang terbentuk merupakan ikatan antara donor dengan donor atau aseptor disakarida (maltosa dan sukrosa) yang tidak dapat dihidrolisis oleh β -galaktosidase karena tidak mengandung galaktosa.

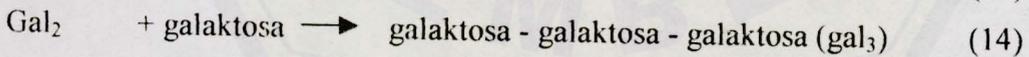
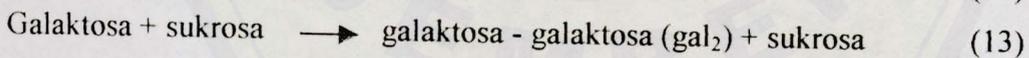
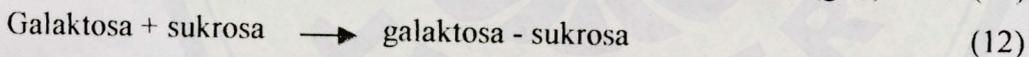
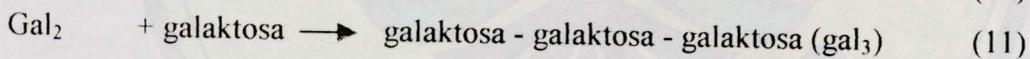
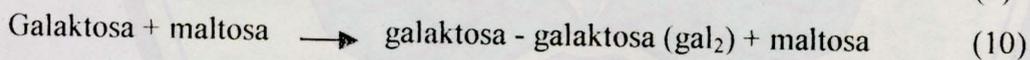
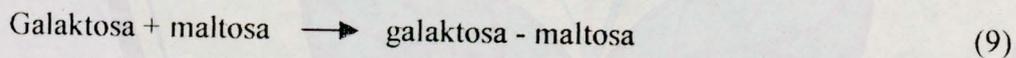
Estimasi reaksi dalam sintesis hetero-galaktooligosakarida dengan aseptor glukosa dan mannososa adalah :



Untuk reaksi sintesis yang menggunakan substrat campuran galaktosa dengan glukosa dan substrat campuran galaktosa dengan mannososa hasil yang diperoleh sesuai dengan yang diharapkan, yaitu disakarida yang dihasilkan lebih besar daripada trisakarida. Dengan menggunakan glukosa dan mannososa sebagai aseptor diharapkan terjadi reaksi yang lebih mengarah pada pembentukan disakarida, karena kedua jenis gula tersebut merupakan monosakarida yang diharapkan dalam reaksi sintesis ini galaktosa akan berikatan dengan glukosa dan mannososa untuk membentuk disakarida (1 dan 5).

Hal ini sesuai dengan yang dinyatakan oleh Zarate dan Leiva (1989) bahwa pembentukan oligosakarida dapat terjadi melalui reaksi transgalaktosidasi dengan aseptor hidroksil berupa gula. Jika gula yang bertindak sebagai aseptor adalah monosakarida, maka hasil yang diperoleh adalah disakarida. Tetapi disakarida yang terbentuk dapat juga terjadi akibat ikatan antara galaktosa sebagai donor (2 dan 6). Trisakarida juga dapat terbentuk pada reaksi sintesis galaktooligosakarida dengan aseptor monosakarida karena terjadinya ikatan antara donor dengan disakarida yang dihasilkan (3 dan 7) atau antara aseptor dengan disakarida yang dihasilkan (4 dan 8).

Estimasi reaksi dalam sintesis hetero-galaktooligosakarida dengan aseptor maltosa dan sukrosa adalah :



Sedangkan untuk reaksi sintesis yang menggunakan substrat campuran galaktosa dengan maltosa dan substrat campuran galaktosa dengan sukrosa hasil yang diperoleh tidak sesuai dengan yang diharapkan, yaitu trisakarida yang dihasilkan lebih kecil daripada disakarida. Seharusnya menurut Zarate dan Leiva (1989) jika aseptornya adalah disakarida, maka hasil yang akan diperoleh adalah trisakarida (9 dan 12). Berdasarkan teori tersebut seharusnya trisakarida yang

dihasilkan dalam reaksi sintesis ini lebih banyak daripada disakarida, karena yang bertindak sebagai aseptor adalah maltosa dan sukrosa yang merupakan disakarida dan disakarida yang dihasilkan juga dapat berikatan dengan galaktosa sebagai donor (11 dan 14). Sedangkan disakarida dapat terbentuk melalui ikatan antara galaktosa dengan galaktosa (10 dan 13)

Penyimpangan ini dimungkinkan terjadi karena konsentrasi substrat terbatas/kurang memenuhi untuk membentuk trisakarida lebih lanjut, sehingga dimungkinkan substrat telah habis sebelum trisakarida yang dihasilkan mencapai konsentrasi maksimum. Atau dapat juga dimungkinkan karena spesifitas β -galaktosidase sangat lemah terhadap kedua campuran substrat tersebut, sehingga kurang mampu untuk mengkatalisis reaksi sintesis trisakarida. Akibatnya maltosa dan sukrosa yang terikat oleh galaktosa sangat sedikit dibanding maltosa dan sukrosa yang tidak terikat dengan galaktosa (maltosa dan sukrosa bebas). Jadi dimungkinkan tingginya disakarida tersebut terjadi karena tingginya sisa maltosa dan sukrosa yang tidak terikat dengan galaktosa dalam reaksi sintesis ini. Hal ini dapat dilihat pada reaksi 10 dan 13.

Dari keempat substrat campuran yang digunakan didapatkan disakarida dan trisakarida dengan konsentrasi tertinggi pada substrat campuran antara galaktosa (donor) dan maltosa (aseptor), yaitu sebesar 40963,993 ppm untuk disakarida dan 12012,635 ppm untuk trisakarida.

4.3 Struktur Galaktooligosakarida

Struktur galaktooligosakarida dianalisa dengan menggunakan GC-MS (Gas Chromatography - Mass Spectra) melalui teknik metilasi, hidrolisa, reduksi, dan asetilasi. Sebelum dilakukan analisa galaktooligosakarida yang dihasilkan dalam reaksi sintesis ini harus dipurifikasi (dilakukan pemisahan antara monosakarida, disakarida, dan trisakarida yang masih tercampur dalam larutan) dengan menggunakan metode kromatografi gel. Hasil pemisahan yang berupa fraksi-fraksi monosakarida, disakarida, dan trisakarida dibekukan dan dikeringkan dengan menggunakan *freeze dryer*.

Analisa struktur diawali dengan metilasi yang bertujuan untuk menghilangkan gugus OH (hidroksil), yang dilakukan dengan melarutkan disakarida dan trisakarida yang sudah kering dalam larutan dimethylsulfoxide (DMSO) dan iodomethane untuk menghasilkan disakarida metilasi parsial (DMP) dan trisakarida metilasi parsial (TMP), sehingga semua hidrogen dari grup hidroksil bebas digantikan oleh metil (CH_3^+).

Kemudian analisa struktur dilanjutkan dengan hidrolisa komponen DMP dan TMP menggunakan asam trifluoroasetat suhu 100°C . Hidrolisa kedua komponen tersebut menghasilkan monosakarida metilasi parsial (MMP). Selanjutnya dilakukan proses reduksi, yaitu MMP hasil hidrolisa tersebut direduksi dengan menggunakan NaBH_4 untuk memblokir gugus hidrogen agar tidak bersifat oksidatif (tidak menjadi gugus OH kembali). Akibat reduksi ini terbentuk komponen alditol metilasi parsial (AMP) dan hidrogen pada posisi ikatan yang terputus mengalami asetilasi. Asetilasi dilakukan dengan menggunakan anhidrid asetat sehingga terbentuk alditol asetat metilasi parsial (AAMP). Turunan dari disakarida dan trisakarida diidentifikasi dengan penerapan senyawa AAMP dalam gas kromatografi - mass spektrofotometri.

Estimasi hasil analisa struktur homo-galaktooligosakarida dan hetero-galaktooligosakarida dapat dilihat secara rinci pada Tabel 22 dan 23.

Tabel 22. Estimasi Struktur Homo-Galaktooligosakarida Hasil Sintesis dari Laktosa dan Galaktosa Sebagai Substrat

Jenis Substrat	Struktur Disakarida	Struktur Trisakarida
Galaktosa	Gal $\beta(1 \rightarrow 3)$ Gal	Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Gal $\beta(1 \rightarrow 3)$ Gal
	Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Gal	Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Gal $\beta(1 \rightarrow 6)$ Gal
	Gal $\beta(1 \rightarrow 6)$ Gal	
Laktosa	Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Gal	Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Gal $\beta(1 \rightarrow 3)$ Gal
	Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Glu	Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Glu

Pada Tabel 22 untuk fraksi disakarida dengan struktur Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Gal tersusun atas spektra 1,5-di-o-asetil-2,3,4,6-tetra-o-metilgalasitol yang merupakan galaktosa terminal non pereduksi dan 1,4,5-di-o-asetil-2,3,6-tri-o-metilgalasitol dan termasuk dalam ikatan galaktosidik 1,4. Dengan susunan spektra seperti itu, dapat dikatakan bahwa struktur dari disakarida tersebut adalah Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Gal.

Berdasarkan Tabel 22 dapat diketahui bahwa galaktooligosakarida yang dihasilkan mempunyai struktur ikatan yang bervariasi. Hal ini sesuai dengan yang dinyatakan oleh Thiem (1995) bahwa sebagian besar enzim yang digunakan dalam reaksi sintesis menunjukkan selektivitas yang rendah, sehingga produk yang dihasilkan pada umumnya mempunyai ikatan glikosidik yang beragam.

Tabel 23. Estimasi Struktur Hetero-Galaktooligosakarida Hasil Sintesis dari Beberapa Substrat Campuran

Substrat		Produk	Jenis Ikatan	Area Relatif (%)	Rasio Produk (%)
Aseptor	Donor				
Galaktosa	Glukosa	Galaktosil-glukosa			
		2,3,4,6 - Me ₄ Gal	t - gal	75	Gal β (1 \rightarrow 6) Glu = 100
		2,3,4 - Me ₃ Glu	6 - glu	25	
Galaktosa	Mannosa	Galaktosil-mannosa			
		2,3,4,6 - Me ₄ Gal	t - gal	18,05	Gal β (1 \rightarrow 4) Man = 50,26
		2,3,6 - Me ₄ Man	4 - man	41,19	Gal β (1 \rightarrow 6) Man = 49,73
		2,3,4 - Me ₄ Man	6 - man	40,76	
Galaktosa	Maltosa	Galaktosil-maltosa			
		2,3,4,6 - Me ₄ Gal	t - gal	41,87	Gal β (1 \rightarrow 6) Glu α (1 \rightarrow 4) Glu = 100
		2,3,6 - Me ₄ Glu	4 - glu	41,51	
2,3,4 - Me ₄ Glu	6 - glu	16,62			
Galaktosa	Sukrosa	Galaktosil-sukrosa			
		2,3,4,6 - Me ₄ Gal	t - gal		Gal β (1 \rightarrow 6) Glu α (1 \rightarrow 2) Fru = 100
		2,3,4 - Me ₄ Glu	6 - glu		
3,4,6 - Me ₄ Fru	2 - fru				

Berdasarkan Tabel 23 dapat diketahui bahwa sebagian besar hetero-galaktooligosakarida yang dihasilkan pada sintesis ini membentuk ikatan β -1,6-galaktosidik. Hal ini sesuai dengan yang dinyatakan oleh Ichikawa dkk. (1992) bahwa β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* seperti kebanyakan enzim glikosidase lainnya cenderung selektif untuk grup hidroksil primer dari aseptor (C-6) dan membentuk ikatan 1,6-antara donor dan aseptor.

Hasil keseluruhan analisis struktur galaktooligosakarida menunjukkan bahwa enzim β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* mempunyai kemampuan untuk membentuk ikatan β -galaktosidik yang bervariasi, yaitu ikatan β -1,2-, β -1,3-, β -1,4-, dan β -1,6-galaktosidik. Karena mempunyai kemampuan untuk membentuk ikatan yang bervariasi, maka enzim β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* termasuk dalam jenis enzim non spesifik.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

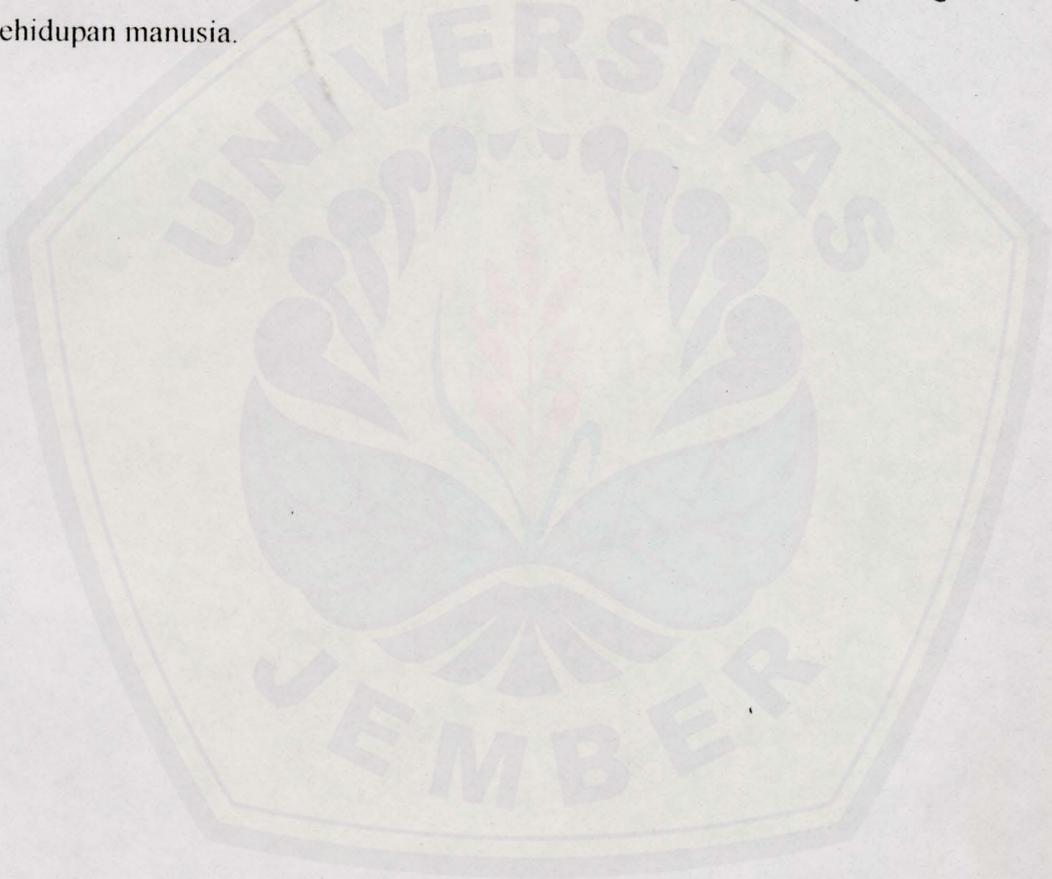
5.1 Kesimpulan

Berdasarkan analisis data dan pembahasan pada hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Galaktooligosakarida (homo dan hetero) dapat disintesis secara enzimatis menggunakan β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* pada suhu 50°C dengan inkubasi 144 jam menghasilkan disakarida dan trisakarida.
2. Jenis substrat, konsentrasi substrat, pH, dan lama inkubasi berpengaruh nyata terhadap konsentrasi disakarida dan trisakarida yang dihasilkan.
 - a. Semakin tinggi konsentrasi substrat sampai konsentrasi 50% semakin tinggi pula konsentrasi galaktooligosakarida yang dihasilkan.
 - b. Konsentrasi galaktooligosakarida yang dihasilkan lebih tinggi pada penggunaan laktosa sebagai substrat daripada galaktosa sebagai substrat.
 - c. Konsentrasi galaktooligosakarida yang dihasilkan lebih tinggi pH 7 daripada pH 6.
 - d. Konsentrasi galaktooligosakarida yang dihasilkan meningkat dan konstan pada lama inkubasi setelah 48 jam.
3. Pada sintesis homo galaktooligosakarida dihasilkan disakarida dan trisakarida tertinggi pada kombinasi perlakuan A4B2 (konsentrasi 50 % pH 7) dengan substrat laktosa, yaitu sebesar 22093,2897 ppm untuk disakarida dan sebesar 13163,3574 ppm untuk trisakarida. Pada sintesis hetero galaktooligosakarida dihasilkan disakarida tertinggi sebesar 40963,993 ppm dan trisakarida tertinggi sebesar 12012,635 ppm, dimana keduanya didapatkan pada reaksi yang menggunakan substrat campuran galaktosa-maltosa.
4. Enzim β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* mempunyai kemampuan membentuk galaktooligosakarida yang mempunyai struktur ikatan yang bervariasi, yaitu β -1,2-galaktosidik, β -1,3-galaktosidik, β -1,4-galaktosidik, dan β -1,6-galaktosidik, sehingga termasuk dalam jenis enzim non spesifik.

5.2 Saran

Untuk mendapatkan konsentrasi galaktooligosakarida yang tinggi sebaiknya digunakan konsentrasi 50% dengan substrat laktosa pada pH 7. Dan untuk efisiensi waktu reaksi sintesis dapat dihentikan setelah reaksi berjalan 48 jam, karena setelah 48 jam reaksi sudah mencapai titik ekuilibrium. Selain itu perlu dilakukan juga penelitian lebih lanjut tentang kesamaan fungsi dari galaktooligosakarida yang disintesis pada penelitian ini dengan galaktooligosakarida yang secara alami terdapat dalam air susu ibu yang kegunaannya sudah dapat dipastikan mampu menjadi faktor pertumbuhan bagi *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* yang mempunyai peranan penting dalam kehidupan manusia.



DAFTAR PUSTAKA

- Broste, P., 1999, **Food Engineering International**, Denmark (broste @ broste.com)
- El Khadem, H.S., 1988, **Carbohydrate Chemistry, Monosaccharides and Their Oligomers**, Academic Press, San Diego, pp. 1 – 253
- Gaspersz, V., 1994, **Metode Perancangan Percobaan**, Armico, Jakarta
- Giec, A., L. Gruchala, and E. Wasowicz, 1981, Formation of Oligosaccharides During Lactose Hydrolysis with β -Galactosidase in Cheese-Whey Permeates, **Acta Alim, Polonica** 7, 3-4 : 199 – 208
- Goldberg, I., 1994, **Functional Foods**, Chapman & Hall, New York
- Hasler, C.M., 1995, **Functional Foods : The Western Perspective**, First International Conference on East-West Perspective on Functional Foods, Singapore
- Head, R.J., 1995, **Approaches to Definition and Substantiation**, First International Conference on East-West Perspective on Functional Foods, Singapore
- Hoogenkamp, H.W., 1994, **Lifestyle and Food : Mega changes for Mega Markets**, **Food Technology**, 48(10) : 32
- Iwasaki, K., Nakajima, M., dan Nakao, S., 1996, Galacto-oligosaccharides Production from Lactose by an Enzymic Batch Reaction Using β -Galactosidase, **Process Biochemistry**, 31 (1) : 69 – 76
- Larsson, P.O., Hedbys, L., Svensson, S., Mosbach, K., 1972, **Disaccharide Synthesis with Immobilized β -Galactosidase**, Academic Press, NY
- Loveless, A.R., 1987, **Prinsip-Prinsip Biologi Tumbuhan untuk Daerah Tropik I**, Terjemahan Kuswata Kartawinata, S. Danimiharjo, dan U. Soetisna dari **Principles of Plant Biology for The Tropics**, Gramedia, Jakarta
- Matsumoto, K., Kobayashi, Y., Tamura, N., Watanabe, T., dan Kan, T., 1989, **Production of Oligosaccharides with β -Galactosidase**, **Denpun Kagaku**, 36, 123 - 30
- Monsan, P., dan Paul, F., 1995, Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides by Glucoamylase in Reverse, **Biotechnology Letters**, 13, 501 – 504
- Nakano, H., Hamayasu, K., Fujita, K., Hara, K., Ohi, M., Yashizumi, H., dan Kitahata, S., 1995, Synthesis of 2-Deoxy Glucoligosaccharides through Condensation of 2-Deoxy-D-glucose by Glucoamylase and α -Glucosidase, **Biosci., Biotech., Biochem.**, 59, 1732 - 1736

- Nienaber, U., 1996, **Regulation and Industrial Prospect of Functional Foods, Seminar Senyawa Radikal dan Sistem Pangan: Reaksi Biomolekuler, Dampak terhadap Kesehatan dan Pengolahan**, CFNS, Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Page, S.D., 1997, **Prinsip-Prinsip Biokimia, Edisi Kedua**, Erlangga, Jakarta
- Pazur, J.H., 1994, **Neutral Polysaccharides, In Carbohydrate Analysis, A Practical Approach, 2nd edition**, M.F. Chaplin and J.F. Kennedy, Oxford University Press, pp. 73 – 124
- Prenosil, J.E., E. Staker, T. Hediger, and J.R. Bourne, 1984, Enzymatic Whey Hydrolysis in the Pilot Plant Lactohyd, **Biotechnology 2** : 441 – 444
- Rastall, R.A., Aclard, M.W., dan Bucke, C., 1991, Synthesis of Oligosaccharides by Glucoamylase in Reverse, **Biotechnology Letters**, 13, 501 – 504
- Rastall, R.A., 2000 a, **Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides**, Division of Food Microbial Science, Chitekniece, Reading (<http://www.fst.rdg.ac.uk/people/arastall/synthesis.htm>)
- _____, 2000 b, **Second Generation Prebiotics**, Division of Food Microbial Science, Reading (<http://www.fst.rdg.ac.uk/people/arastall/prebiotics.htm>)
- Shahib, M.N., 1992, **Pemahaman Seluk Beluk Biokomia dan Penerapan Enzim**, PT. Citara Aditya Bakti, Bandung
- Suwasono, S., dan Rastall, R.A., 1996, A Highly Regioselective Synthesis of Mannobiose and Mannotriose by Reverse Hydrolysis Using Specific 1,2 - α - Mannosidase from *Aspergillus phoenicis*, **Biotechnology Letters**, 18, 851 - 856
- Thiem, J., 1995, **Applications of Enzymes in Synthetic Carbohydrate Chemistry**, FEMS, Microbiology Reviews, 16, 193 - 211
- Weng, W., and J. Chen, 1995, **The Eastern Perspective on Foods Based on Traditional Medicine**, First International Conference on East-West Perspective on Functional Foods, Singapore
- Winarno, F.G., 1980, **Enzim Pangan**, Pusat Pengembangan Teknologi Pangan, Institut Pertanian Bogor
- _____, 1986, **Kimia Pangan dan Gizi**, Gramedia, Jakarta
- Zarate, S., M.H., Lopez-leiva, 1989, **Oligosaccharides Formation During Enzymatic Lactose Hydrolysis : A Literature Review**, Department of Food Engineering, University of Lund, Sweden

Data Sintesis Disakarida dan Trisakarida dengan Substrat Galaktosa pH 6

Gula (%)	Inkubasi (jam)	YIELD (%)			Konsentrasi (ppm)		
		Area 1	Area 2	rata-rata	1	2	rata-rata
20	0	0	0	0	0	0	0
	3 (a)	800	810	805	1309.3290	1325.6956	1317.5123
	(b)	7.326	7.340	7.333	6611.9134	6624.5487	6618.2310
	6	1.000	1.100	1.050	1636.6612	1800.3273	1718.4943
		7.344	7.350	7.347	6628.1588	6633.5740	6630.8664
	9	1.608	1.600	1.604	2631.7512	2618.6579	2625.2046
		7.377	7.380	7.379	6657.9422	6660.6498	6659.2960
	24	1.954	2.000	1.977	3198.0360	3273.3224	3235.6792
		7.408	7.400	7.404	6685.9206	6678.7004	6682.3105
	48	2.043	2.100	2.072	3343.6989	3436.9885	3390.3437
		7.446	7.480	7.463	6720.2166	6750.9025	6735.5596
	96	2.171	2.200	2.186	3553.1915	3600.6547	3576.9231
		7.456	7.510	7.483	6729.2419	6777.9783	6753.6101
	144	2.250	2.345	2.298	3682.4877	3837.9705	3760.2291
	7.499	7.598	7.549	6768.0505	6857.4007	6812.7256	
30	3	2.316	2.375	2.346	3790.5074	3887.0704	3838.7889
		7.514	7.589	7.552	6781.5884	6849.2780	6815.4332
	6	2.931	2.750	2.841	4797.0540	4500.8183	4648.9362
		7.523	7.700	7.612	6789.7112	6949.4585	6869.5848
	9	3.110	2.950	3.030	5090.0164	4828.1506	4959.0835
		7.573	7.851	7.712	6834.8375	7085.7401	6960.2888
	24	3.136	3.100	3.118	5132.5696	5073.6498	5103.1097
		7.597	7.800	7.699	6856.4982	7039.7112	6948.1047
	48	3.138	3.150	3.144	5135.8429	5155.4828	5145.6628
		7.660	7.891	7.776	6913.3574	7121.8412	7017.5993
	96	3.218	3.250	3.234	5266.7758	5319.1489	5292.9624
		7.721	7.900	7.811	6968.4116	7129.9639	7049.1877
	144	3.339	3.300	3.320	5464.8118	5400.9820	5432.8969
		7.824	7.910	7.867	7061.3718	7138.9892	7100.1805
40	3	3.524	3.500	3.512	5767.5941	5728.3142	5747.9542
		7.607	7.625	7.616	6865.5235	6881.7690	6873.6462
	6	3.531	3.578	3.555	5779.0507	5855.9738	5817.5123
		7.849	7.900	7.875	7083.9350	7129.9639	7106.9495
	9	3.605	3.621	3.613	5900.1637	5926.3502	5913.2570
		7.934	7.891	7.913	7160.6498	7121.8412	7141.2455
	24	3.675	3.700	3.688	6014.7300	6055.6465	6035.1882
		7.926	8.012	7.969	7153.4296	7231.0469	7192.2383
	48	4.186	3.954	4.070	6851.0638	6471.3584	6661.2111
		7.927	8.103	8.015	7154.3321	7313.1769	7233.7545
	96	4.420	4.375	4.398	7234.0426	7160.3928	7197.2177
		7.951	8.078	8.015	7175.9928	7290.6137	7233.3032
	144	4.907	4.925	4.916	8031.0966	8060.5565	8045.8265
		7.940	7.975	7.958	7166.0650	7197.6534	7181.8592
50	3	5.295	5.200	5.248	8666.1211	8510.6383	8588.3797
		7.972	7.899	7.936	7194.9458	7129.0614	7162.0036
	6	5.323	5.312	5.318	8711.9476	8693.9444	8702.9460
		7.989	7.900	7.945	7210.2888	7129.9639	7170.1264
	9	6.401	5.920	6.161	10476.2684	9689.0344	10082.6514
		8.011	8.000	8.006	7230.1444	7220.2166	7225.1805
	24	6.407	6.398	6.403	10486.0884	10471.3584	10478.7234
		8.067	8.115	8.091	7280.6859	7324.0072	7302.3466
	48	7.368	7.372	7.370	12058.9198	12065.4664	12062.1931
		8.124	8.150	8.137	7332.1300	7355.5957	7343.8628
	96	7.600	7.526	7.563	12438.6252	12317.5123	12378.0687
		8.232	8.254	8.243	7429.6029	7449.4585	7439.5307
	144	7.400	7.533	7.467	12111.2930	12328.9689	12220.1309
		8.542	8.457	8.500	7709.3863	7632.6715	7671.0289

Keterangan : a : disakarida, b : trisakarida

Konversi nilai yield (%) ke konsentrasi (ppm) berdasarkan kurva standar (lampiran 3)

Data Sintesis Disakarida dan Trisakarida dengan Substrat Galaktosa pH 7

Gula (%)	Inkubasi (jam)	YIELD (%)			Konsentrasi (ppm)				
		Area 1	Area 2	rata-rata	1	2	rata-rata		
20	0	0	0	0	0	0	0		
	3	(a)	800	820	810	1309.3290	1342.0622	1325.6956	
		(b)	7,271	7,300	7,286	6562.2744	6588.4477	6575.3610	
	6		845	850	848	1382.9787	1391.1620	1387.0704	
			7,429	7,410	7,420	6704.8736	6687.7256	6696.2996	
	9		1,000	925	963	1636.6612	1513.9116	1575.2864	
			7,593	7,690	7,555	6737.9753	6859.2958	6838.2098	
	48		1,300	1,250	1,275	2127.6596	2045.8265	2086.7430	
			7,603	7,691	7,647	6861.9134	6941.3357	6901.6245	
	96		1,400	1,375	1,388	2291.3257	2250.4092	2270.8674	
			7,649	7,710	7,680	6903.4296	6958.4838	6930.9567	
	144		1,500	1,524	1,512	2454.9918	2494.2717	2474.6318	
			7,682	7,700	7,691	6933.2130	6949.4585	6941.3357	
	30	3		1,300	1,400	1,350	2127.6596	2291.3257	2209.4926
				7,721	7,700	7,711	6968.4116	6949.4585	6958.9350
		6		1,450	1,500	1,475	2373.1588	2454.9918	2414.0753
			7,723	7,750	7,737	6970.2166	6994.5848	6982.4007	
9			1,585	1,530	1,558	2594.1080	2504.0917	2549.0998	
			7,723	7,780	7,752	6970.2166	7021.6606	6995.9386	
24			1,620	1,631	1,626	2651.3912	2669.3944	2660.3928	
			7,832	7,800	7,816	7068.5921	7039.7112	7054.1516	
48			1,650	1,702	1,676	2700.4910	2785.5974	2743.0442	
			7,870	7,945	7,908	7102.8881	7170.5776	7136.7329	
96			1,825	1,832	1,829	2986.9067	2998.3633	2992.6350	
			7,886	7,925	7,906	7117.3285	7152.5271	7134.9278	
144			1,890	1,822	1,856	3093.2897	2981.9967	3037.6432	
			7,965	7,994	7,980	7188.6282	7214.8014	7201.7148	
40		3		2,161	2,100	2,131	3536.8249	3436.9885	3486.9067
				8,066	7,995	8,031	7279.7834	7215.7040	7247.7437
	6		2,300	2,258	2,279	3764.3208	3695.5810	3729.9509	
			8,138	8,100	8,119	7344.7653	7310.4693	7327.6173	
	9		2,400	2,398	2,399	3927.9869	3924.7136	3926.3502	
			8,277	8,198	8,238	7470.2166	7398.9170	7434.5668	
	24		2,705	2,654	2,680	4427.1686	4343.6989	4385.4337	
			8,304	8,276	8,290	7494.5848	7469.3141	7481.9495	
	48		2,763	2,698	2,731	4522.0949	4415.7119	4468.9034	
			8,313	8,300	8,307	7502.7076	7490.9747	7496.8412	
	96		2,934	2,879	2,907	4801.9640	4711.9476	4756.9558	
			8,531	8,431	8,481	7699.4585	7609.2058	7654.3321	
	144		2,977	2,900	2,939	4872.3404	4746.3175	4809.3290	
			8,914	8,815	8,865	8045.1264	7955.7762	8000.4513	
	50	3		3,000	3,123	3,062	4909.9836	5111.2930	5010.6383
				9,191	9,100	9,146	8295.1264	8212.9964	8254.0614
6			3,200	3,175	3,188	5237.3159	5196.3993	5216.8576	
			9,197	9,154	9,176	8300.5415	8261.7329	8281.1372	
9			3,300	3,269	3,285	5400.9820	5350.2455	5375.6137	
			9,647	9,650	9,649	8706.6787	8709.3863	8708.0325	
24			3,550	3,600	3,575	5810.1473	5891.9804	5851.0638	
			9,766	9,775	9,771	8814.0794	8822.2022	8818.1408	
48			3,616	3,700	3,658	5918.1669	6055.6465	5986.9067	
			9,778	9,700	9,739	8824.9097	8754.5126	8789.7112	
96			3,930	3,900	3,915	6432.0786	6382.9787	6407.5286	
			10,530	10,253	10,392	9503.6101	9253.6101	9378.6101	
144			4,000	3,968	3,984	6546.6448	6494.2717	6520.4583	
			10,340	10,300	10,320	9332.1300	9296.0289	9314.0794	

Keterangan : a : disakarida, b: trisakarida

Konversi nilai yield (%) ke konsentrasi (ppm) berdasarkan kurva standar (lampiran 3)

Data Sintesis Disakarida dan Trisakarida dengan Substrat Laktosa pH 6

Gula (%)	Inkubasi (jam)	YIELD (%)			Konsentrasi (ppm)			
		Area 1	Area 2	rata-rata	1	2	rata-rata	
20	0	0	0	0	0	0	0	
	3	(a)	810	825	818	1325.6956	1350.2455	1337.9705
		(b)	6.910	6.975	6.943	6236.4621	6295.1264	6265.7942
	6		850	846	848	1391.1620	1384.6154	1387.8887
			7.016	7.000	7.008	6332.1300	6317.6895	6324.9097
	9		1.261	1.200	1.231	2063.8298	1963.9935	2013.9116
			7.154	7.178	7.166	6456.6787	6478.3394	6467.5090
	24		1.577	1.499	1.538	2581.0147	2453.3552	2517.1849
			7.548	7.568	7.558	6812.2744	6830.3249	6821.2996
	48		1.848	1.897	1.873	3024.5499	3104.7463	3064.6481
			7.557	7.550	7.554	6820.3971	6814.0794	6817.2383
	96		2.098	2.000	2.049	3433.7152	3273.3224	3353.5188
			7.620	7.681	7.651	6877.2563	6932.3105	6904.7834
	144		2.174	2.100	2.137	3558.1015	3436.9885	3497.5450
		7.726	7.698	7.712	6972.9242	6947.6534	6960.2888	
30	3		2.509	2.499	2.504	4106.3830	4090.0164	4098.1997
			7.835	7.810	7.823	7071.2996	7048.7365	7060.0181
	6		2.655	2.601	2.628	4345.3355	4256.9558	4301.1457
			7.903	7.951	7.927	7132.6715	7175.9928	7154.3321
	9		3.184	3.100	3.142	5211.1293	5073.6498	5142.3895
			8.059	8.100	8.080	7273.4657	7310.4693	7291.9675
	24		3.370	3.400	3.385	5515.5483	5564.6481	5540.0982
			8.576	8.475	8.526	7740.0722	7648.9170	7694.4946
	48		4.674	4.601	4.638	7649.7545	7530.2782	7590.0164
			8.650	8.625	8.638	7806.8592	7784.2960	7795.5776
	96		4.686	4.700	4.693	7669.3944	7692.3077	7680.8511
			8.841	8.891	8.866	7979.2419	8024.3682	8001.8051
	144		4.834	4.768	4.801	7911.6203	7803.6007	7857.6105
			9.080	9.057	9.069	8194.9458	8174.1877	8184.5668
40	3		5.358	5.400	5.379	8769.2308	8837.9705	8803.6007
			9.168	9.215	9.192	8274.3682	8316.7870	8295.5776
	6		5.372	5.412	5.392	8792.1440	8857.6105	8824.8773
			9.270	9.285	9.278	8366.4260	8379.9639	8373.1949
	9		6.433	6.478	6.456	10528.6416	10602.2913	10565.4664
			9.295	9.289	9.292	8388.9892	8383.5740	8386.2816
	24		6.486	6.475	6.481	10615.3846	10597.3813	10606.3830
			9.555	9.569	9.562	8623.6462	8636.2816	8629.9639
	48		6.549	6.575	6.562	10718.4943	10761.0475	10739.7709
			9.642	9.638	9.640	8702.1661	8698.5560	8700.3610
	96		6.769	6.789	6.779	11078.5597	11111.2930	11094.9264
			9.718	9.800	9.759	8770.7581	8844.7653	8807.7617
	144		8.120	8.135	8.128	13289.6890	13314.2390	13301.9640
			9.718	9.806	9.762	8770.7581	8850.1805	8810.4693
50	3		10.144	10.098	10.121	16602.2913	16527.0049	16564.6481
			9.826	9.789	9.808	8868.2310	8834.8375	8851.5343
	6		11.018	10.988	11.003	18032.7332	17983.6334	18008.1833
			10.331	10.299	10.315	9324.0072	9295.1264	9309.5668
	9		11.853	11.849	11.851	19399.3453	19392.7987	19396.0720
			10.659	10.650	10.655	9620.0361	9611.9134	9615.9747
	24		11.600	11.526	11.563	18985.2700	18864.1571	18924.7136
			11.956	11.896	11.926	10790.6137	10736.4621	10763.5379
	48		11.853	11.825	11.839	19399.3453	19353.5188	19376.4321
			12.561	12.500	12.531	11336.6426	11281.5884	11309.1155
	96		11.018	11.120	11.069	18032.7332	18199.6727	18116.2029
			12.781	12.699	12.740	11535.1986	11461.1913	11498.1949
	144		12.700	12.715	12.708	20785.5974	20810.1473	20797.8723
			12.783	12.699	12.741	11537.0036	11461.1913	11499.0975

Keterangan : a : disakarida, b : trisakarida

Konversi nilai yield (%) ke konsentrasi (ppm) berdasarkan kurva standar (lampiran 3)

Data Sintesis Disakarida dan Trisakarida dengan Substrat Laktosa pH 7

Gula (%)	Inkubasi (jam)	YIELD (%)			Konsentrasi (ppm)			
		Area 1	Area 2	rata-rata	1	2	rata-rata	
20	0	0	0	0	0	0	0	
	3	(a)	810	815	813	1325.6956	1333.8789	1329.7872
		(b)	6,573	6,500	6,537	5932.3105	5866.4260	5899.3682
	6		886	875	881	1450.0818	1432.0786	1441.0802
			6,696	6,701	6,699	6043.3213	6047.8339	6045.5776
	9		1,000	1,025	1,013	1636.6612	1677.5777	1657.1195
			6,862	6,810	6,836	6193.1408	6146.2094	6169.6751
	24		1,390	1,400	1,395	2274.9591	2291.3257	2283.1424
			6,992	7,001	6,997	6310.4693	6318.5921	6314.5307
	48		2,004	2,105	2,055	3279.8691	3445.1718	3362.5205
			7,050	7,102	7,076	6362.8159	6409.7473	6386.2816
	96		2,036	2,100	2,068	3332.2422	3436.9885	3384.6154
			7,414	7,452	7,433	6691.3357	6725.6318	6708.4838
	144		2,157	2,251	2,204	3530.2782	3684.1244	3607.2013
		7,581	7,525	7,553	6842.0578	6791.5162	6816.7870	
30	3		2,279	2,251	2,265	3729.9509	3684.1244	3707.0376
			7,582	7,548	7,565	6842.9603	6812.2744	6827.6173
	6		2,453	2,400	2,427	4014.7300	3927.9869	3971.3584
			7,624	7,635	7,630	6880.8664	6890.7942	6885.8303
	9		2,572	2,598	2,585	4209.4926	4252.0458	4230.7692
			7,698	7,692	7,695	6947.6534	6942.2383	6944.9458
	24		2,639	2,666	2,653	4319.1489	4363.3388	4341.2439
			7,796	7,801	7,799	7036.1011	7040.6137	7038.3574
	48		2,650	2,706	2,678	4337.1522	4428.8052	4382.9787
			7,800	7,958	7,879	7039.7112	7182.3105	7111.0108
	96		2,969	2,711	2,840	4859.2471	4436.9885	4648.1178
			7,882	7,925	7,904	7113.7184	7152.5271	7133.1227
	144		3,077	3,099	3,088	5036.0065	5072.0131	5054.0098
			7,816	7,925	7,871	7054.1516	7152.5271	7103.3394
40	3		3,238	3,155	3,197	5299.5090	5163.6661	5231.5876
			8,172	8,214	8,193	7375.4513	7413.3574	7394.4043
	6		3,321	3,298	3,310	5435.3519	5397.7087	5416.5303
			8,347	8,356	8,352	7533.3935	7541.5162	7537.4549
	9		3,449	3,359	3,404	5644.8445	5497.5450	5571.1948
			8,410	8,425	8,418	7590.2527	7603.7906	7597.0217
	24		4,598	4,587	4,593	7525.3682	7507.3650	7516.3666
			9,091	9,000	9,046	8204.8736	8122.7437	8163.8087
	48		5,292	5,221	5,257	8661.2111	8545.0082	8603.1097
			9,993	9,875	9,934	9018.9531	8912.4549	8965.7040
	96		6,592	6,536	6,564	10788.8707	10697.2177	10743.0442
			10,426	10,256	10,341	9409.7473	9256.3177	9333.0325
	144		6,757	6,751	6,754	11058.9198	11049.0998	11054.0098
			8,172	8,123	8,148	7375.4513	7331.2274	7353.3394
50	3		7,019	6,998	7,009	11487.7250	11453.3552	11470.5401
			10,872	10,789	10,831	9812.2744	9737.3646	9774.8195
	6		8,629	8,598	8,614	14122.7496	14072.0131	14097.3813
			11,075	10,996	11,036	9995.4874	9924.1877	9959.8375
	9		11,000	11,002	11,001	18003.2733	18006.5466	18004.9100
			11,641	11,659	11,650	10506.3177	10522.5632	10514.4404
	24		11,286	11,298	11,292	18471.3584	18490.9984	18481.1784
			12,733	12,763	12,748	11491.8773	11518.9531	11505.4152
	48		12,078	11,988	12,033	19767.5941	19620.2946	19693.9444
			12,808	12,798	12,803	11559.5668	11550.5415	11555.0542
	96		13,670	13,680	13,675	22373.1588	22389.5254	22381.3421
			12,922	12,933	12,928	11662.4549	11672.3827	11667.4188
	144		13,500	13,498	13,499	22094.9264	22091.6530	22093.2897
			14,572	14,598	14,585	13151.6245	13175.0903	13163.3574

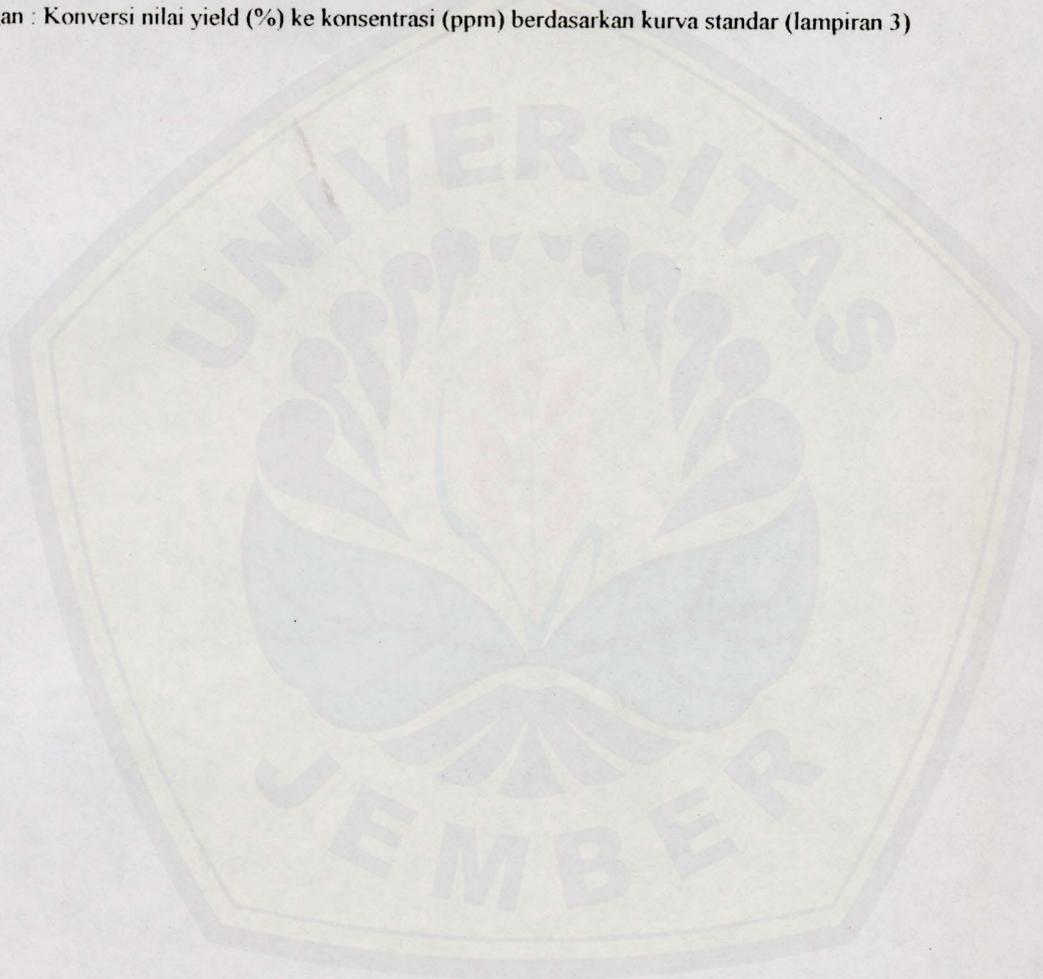
Keterangan : a : disakarida, b: trisakarida

Konversi nilai yield (%) ke konsentrasi (ppm) berdasarkan kurva standar (lampiran 3)

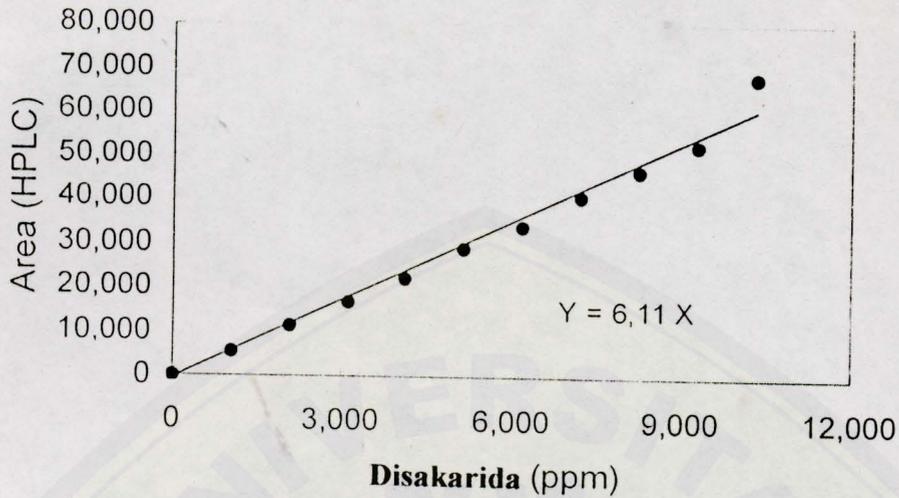
Lampiran 2. Data Pengamatan Sintesis Hetero Galaktooligosakarida

Donor	Acceptor	Area		Konsentrasi (ppm)	
		Disakarida	Trisakarida	Disakarida	Trisakarida
Galaktosa	Glukosa	8,983	6,770	14702.128	6110.108
Galaktosa	Mannosa	10,225	7,075	16734.861	6385.379
Galaktosa	Maltosa	25,029	13,310	40963.993	12012.635
Galaktosa	Sukrosa	11,550	10,414	18903.437	9398.917

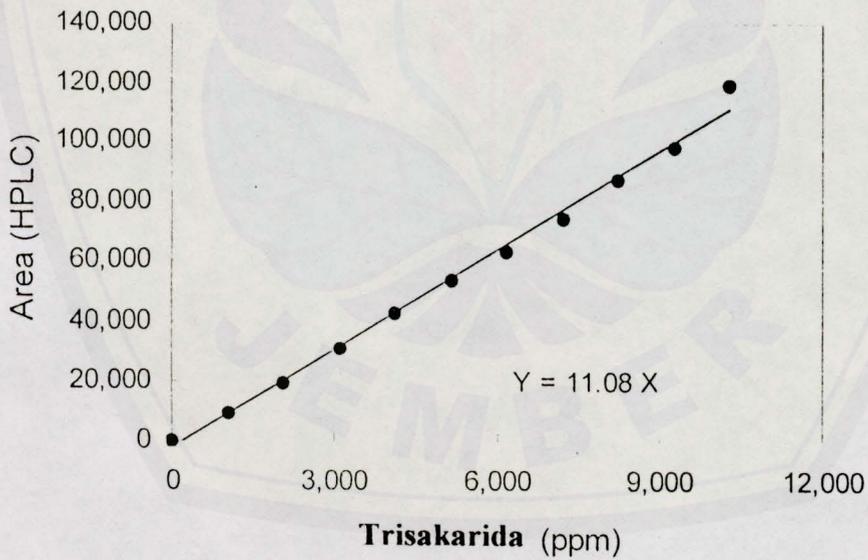
Keterangan : Konversi nilai yield (%) ke konsentrasi (ppm) berdasarkan kurva standar (lampiran 3)



Lampiran 3. Kurva Standar Sintesis Homo-Galaktooligosakarida



Kurva Standar Sintesis Disakarida (Laktosa)



Kurva Standar Sintesis Trisakarida (Raffinosa)

Sintesis Disakarida dengan Substrat Galaktosa pH 6

Lama Inkubasi	20 % (ppm)	30 % (ppm)	40 % (ppm)	50 % (ppm)
0	0.000	0.000	0.000	0.000
3	1317.512	3838.789	5747.954	8588.380
6	1718.494	4648.936	5817.512	8702.946
9	2625.205	4959.083	5913.257	10082.651
24	3235.679	5103.110	6035.188	10478.723
48	3390.344	5145.663	6661.211	12062.193
96	3576.923	5292.962	7197.218	12378.069
144	3760.229	5432.897	8045.827	12220.131

Sintesis Disakarida dengan Substrat Laktosa pH 6

Lama Inkubasi	20 % (ppm)	30 % (ppm)	40 % (ppm)	50 % (ppm)
0	0.000	0.000	0.000	0.000
3	1337.971	4098.200	8803.601	16564.648
6	1387.889	4301.146	8824.877	18008.183
9	2013.912	5142.390	10565.466	19396.072
24	2517.185	5540.098	10606.383	18924.714
48	3064.648	7590.016	10739.771	19376.432
96	3353.519	7680.851	11094.926	18116.203
144	3497.545	7857.610	13301.946	20797.872

Sintesis Disakarida dengan Substrat Galaktosa pH 7

Lama Inkubasi	20 % (ppm)	30 % (ppm)	40 % (ppm)	50 % (ppm)
0	0.000	0.000	0.000	0.000
3	1325.696	2209.493	3486.907	5010.638
6	1387.070	2414.075	3729.951	5216.858
9	1575.286	2549.100	3926.350	5375.614
24	1894.435	2660.393	4385.434	5851.064
48	2086.743	2743.044	4468.903	5986.907
96	2270.867	2992.635	4756.956	6407.529
144	2474.632	3037.643	4809.329	6520.458

Sintesis Disakarida dengan Substrat Laktosa pH 7

Lama Inkubasi	20 % (ppm)	30 % (ppm)	40 % (ppm)	50 % (ppm)
0	0.000	0.000	0.000	0.000
3	1329.787	3707.038	5231.588	11470.540
6	1441.080	3971.358	5416.530	14097.381
9	1657.119	4230.769	5571.195	18004.910
24	2283.142	4341.244	7516.367	18481.178
48	3362.520	4382.979	8603.110	19693.944
96	3384.615	4648.118	10743.044	22381.342
144	3607.201	5054.010	11054.010	22093.290

Sintesis Trisakarida dengan Substrat Galaktosa pH 6

Lama Inkubasi	20 % (ppm)	30 % (ppm)	40 % (ppm)	50 % (ppm)
0	0.000	0.000	0.000	0.000
3	6618.231	6815.433	6873.646	7162.004
6	6630.866	6869.585	7106.949	7170.126
9	6659.296	6960.289	7141.245	7225.181
24	6682.310	6948.105	7192.238	7302.347
48	6735.560	7017.599	7233.755	7343.863
96	6753.610	7049.188	7233.303	7439.531
144	6812.726	7100.181	7181.859	7671.029

Sintesis Trisakarida dengan Substrat Laktosa pH 6

Lama Inkubasi	20 % (ppm)	30 % (ppm)	40 % (ppm)	50 % (ppm)
0	0.000	0.000	0.000	0.000
3	6265.794	7060.018	8295.578	8851.534
6	6324.910	7154.332	8373.195	9309.567
9	6467.509	7291.968	8386.282	9615.975
24	6821.300	7694.495	8629.964	10763.538
48	6817.238	7795.578	8700.361	11309.116
96	6904.783	8001.805	8807.762	11498.195
144	6960.289	8184.567	8810.469	11499.097

Sintesis Trisakarida dengan Substrat Galaktosa pH 7

Lama Inkubasi	20 % (ppm)	30 % (ppm)	40 % (ppm)	50 % (ppm)
0	0.000	0.000	0.000	0.000
3	6575.361	6958.935	7247.744	8254.061
6	6696.300	6982.401	7327.617	8281.137
9	6818.141	6995.939	7434.567	8708.032
24	6859.206	7054.152	7481.949	8818.141
48	6901.625	7136.733	7496.841	8789.711
96	6930.957	7134.928	7654.332	9378.610
144	6941.336	7201.715	8000.451	9314.079

Sintesis Trisakarida dengan Substrat Laktosa pH 7

Lama Inkubasi	20 % (ppm)	30 % (ppm)	40 % (ppm)	50 % (ppm)
0	0.000	0.000	0.000	0.000
3	5899.368	6827.617	7394.404	9774.819
6	6045.578	6885.830	7537.455	9959.838
9	6169.675	6944.946	7597.022	10514.440
24	6314.531	7038.357	8163.809	11505.415
48	6386.282	7111.011	8965.704	11555.054
96	6708.484	7133.123	9333.032	11667.419
144	6816.787	7103.339	7353.339	13163.357

Lampiran 5. Tabel Dua Arah Sintesis Homo Galaktooligosakarida

Tabel Dua Arah Sintesis Disakarida dengan Substrat Galaktosa

Perlakuan	B1	B2	Jumlah	Rata-Rata
A1	7520.4582	4949.2635	12469.7217	3117.4304
A2	10865.7938	6075.2864	16941.0802	4235.2701
A3	16091.6531	9618.6582	25710.3113	6427.5778
A4	24440.2619	13040.9165	37481.1784	9370.2946
Jumlah	58918.1670	33684.1246	92602.2916	
Rata-rata	7364.7709	4210.5156		5787.6432

Tabel Dua Arah Sintesis Trisakarida dengan Substrat Galaktosa

Perlakuan	B1	B2	Jumlah	Rata-Rata
A1	13625.4512	13882.6715	27508.1227	6877.0307
A2	14200.3610	14403.4296	28603.7906	7150.9477
A3	14363.7184	16000.9026	30364.6210	7591.1553
A4	15342.0578	18628.1589	33970.2167	8492.5542
Jumlah	57531.5884	62915.1626	120446.7510	
Rata-rata	7191.4486	7864.3953		7527.9219

Tabel Dua Arah Sintesis Disakarida dengan Substrat Laktosa

Perlakuan	B1	B2	Jumlah	Rata-Rata
A1	6995.0900	7214.4026	14209.4926	3552.3732
A2	15715.2210	10108.0196	25823.2406	6455.8102
A3	26603.9280	22108.0196	48711.9476	12177.9869
A4	41595.7447	44186.5794	85782.3241	21445.5810
Jumlah	90909.9837	83617.0212	174527.0049	
Rata-rata	11363.7480	10452.1277		10907.9378

Tabel Dua Arah Sintesis Trisakarida dengan Substrat Laktosa

Perlakuan	B1	B2	Jumlah	Rata-Rata
A1	13920.5776	13633.5740	27554.1516	6888.5379
A2	16369.1335	14206.6787	30575.8122	7643.9531
A3	17620.9386	14706.6787	32327.6173	8081.9043
A4	22998.1949	26326.7148	49324.9097	12331.2274
Jumlah	70908.8446	68873.6462	139782.4908	
Rata-rata	8863.6056	8609.2058		8736.4057

Lampiran 6. Uji Beda Rata-Rata Sintesis Homo Galaktooligosakarida pada Berbagai Kombinasi Perlakuan

Uji Beda Rata-Rata Sintesis Disakarida dengan Substrat Galaktosa

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
A1B1	3760.2291	f
A2B1	5432.8969	d
A3B1	8045.8266	b
A4B1	12220.1310	a
A1B2	2474.6318	h
A2B2	3037.6432	g
A3B2	4809.3291	e
A4B2	6520.4583	c

Uji Beda Rata-Rata Sintesis Disakarida dengan Substrat Laktosa

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
A1B1	3497.5450	g
A2B1	7857.6105	e
A3B1	13301.9640	c
A4B1	20797.8724	b
A1B2	3607.2013	g
A2B2	5054.0098	f
A3B2	11054.0098	d
A4B2	22093.2897	a

Uji Beda Rata-Rata Sintesis Disakarida dengan Substrat Galaktosa

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
A1B1	6812.7256	h
A2B1	7100.1805	def
A3B1	7181.8592	de
A4B1	7671.0289	c
A1B2	6941.3358	g
A2B2	7201.7148	d
A3B2	8000.4513	b
A4B2	9314.0795	a

Uji Beda Rata-Rata Sintesis Trisakarida dengan Substrat Galaktosa

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
A1B1	6960.2888	g
A2B1	8184.5668	d
A3B1	8810.4693	c
A4B1	11499.0975	b
A1B2	6816.7870	h
A2B2	7103.3394	f
A3B2	7353.3394	e
A4B2	13163.3574	a

Keterangan : notasi yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata