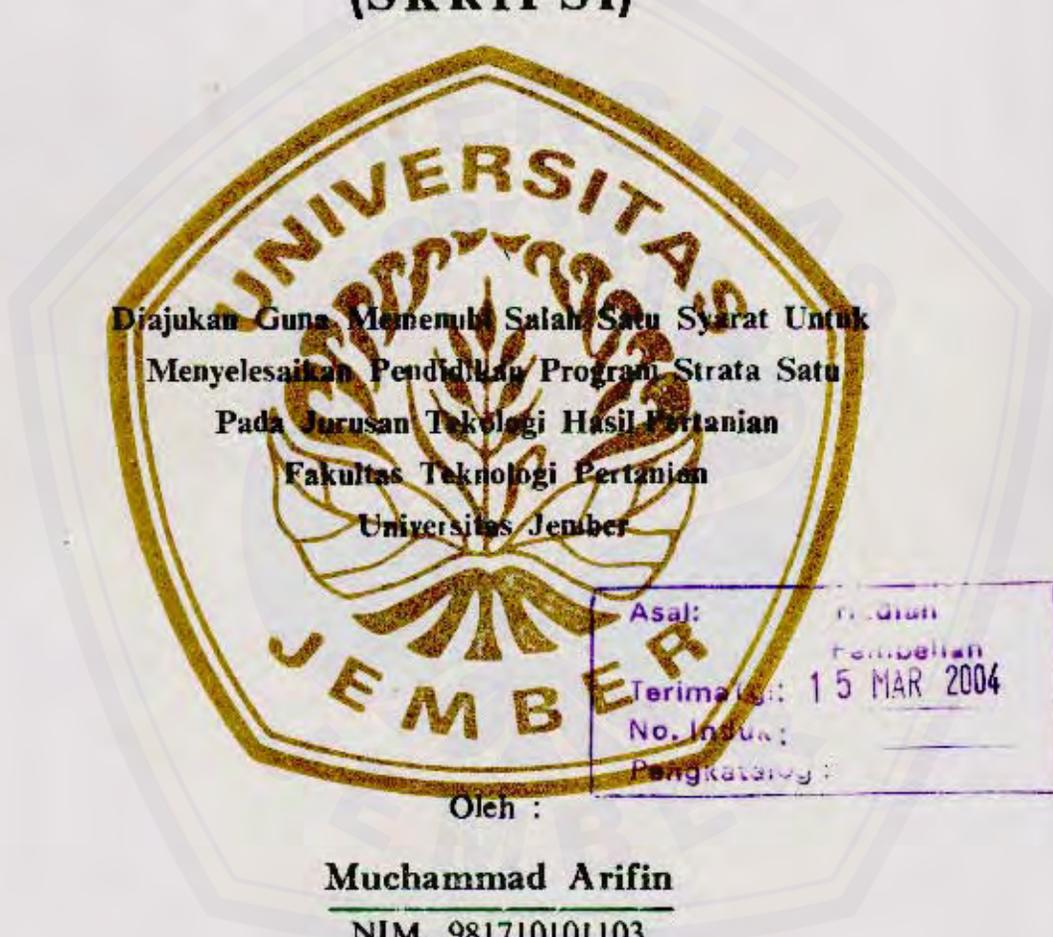




**APLIKASI *FLUIDIZED BED REACTOR* DENGAN  
 $\beta$ -GALAKTOSIDASE AMOBIL DARI *Aspergillus oryzae*  
UNTUK PRODUKSI SENYAWA PREBIOTIK  
GALAKTO-OLIGOSAKARIDA (GALOS)**

**KARYA ILMIAH TERTULIS  
(SKRIPSI)**



Dijukan Guna Memenuhi Salah Satu Syarat Untuk  
Menyelesaikan Pendidikan Program Strata Satu  
Pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian  
Fakultas Teknologi Pertanian  
Universitas Jember

Asal:	Studi Pembelian	Klass
Terima (g):	15 MAR 2004	612.629
No. Induk:		AK1
Pengkaterog:		a

Oleh :

**Muchammad Arifin**  
NIM. 981710101103

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2004**

LEMBAR PENGESAHAN

Diterima oleh :

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN UNIVERSITAS JEMBER

Sebagai Karya Ilmiah Tertulis (S K R I P S I)

---

Dipertahankan pada :

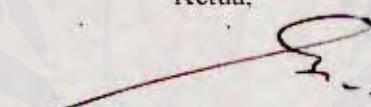
Hari : Kamis

Tanggal : 29 Januari 2004

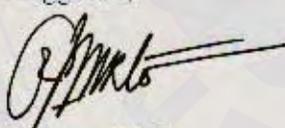
Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian  
Universitas Jember

Tim Penguji

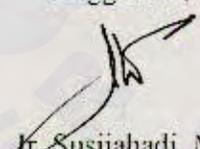
Ketua,

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

Anggota I,

  
Ir. Givarto, M.Sc.  
NIP. 132 052 412

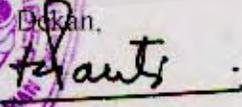
Anggota II,

  
Ir. Susijahadi, MS  
NIP. 130 287 109



Mengesahkan

Dekan,

  
Hartanti, MS  
NIP. 130 350 763

*MOTTO*

- ☉ *"Ilmu pengetahuan itu bagaikan barang yang hilang dari seorang mukmin, dimana saja dia menjumpainya maka dia berhak mengambilnya"*

*HR. Al-Turmudzi dan Ibnu Majah*

- ☉ *"Sesungguhnya dibalik kesulitan itu ada kemudahan, maka apabila kamu telah selesai (dari suatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap"*

*QS. Alam Nasryah : 6 – 8*

- ☉ *"Hakikat suatu kegagalan dan kesuksesan bukan terletak pada hasil akhir yang dicapai, namun lebih condong kepada proses untuk mencapainya"*

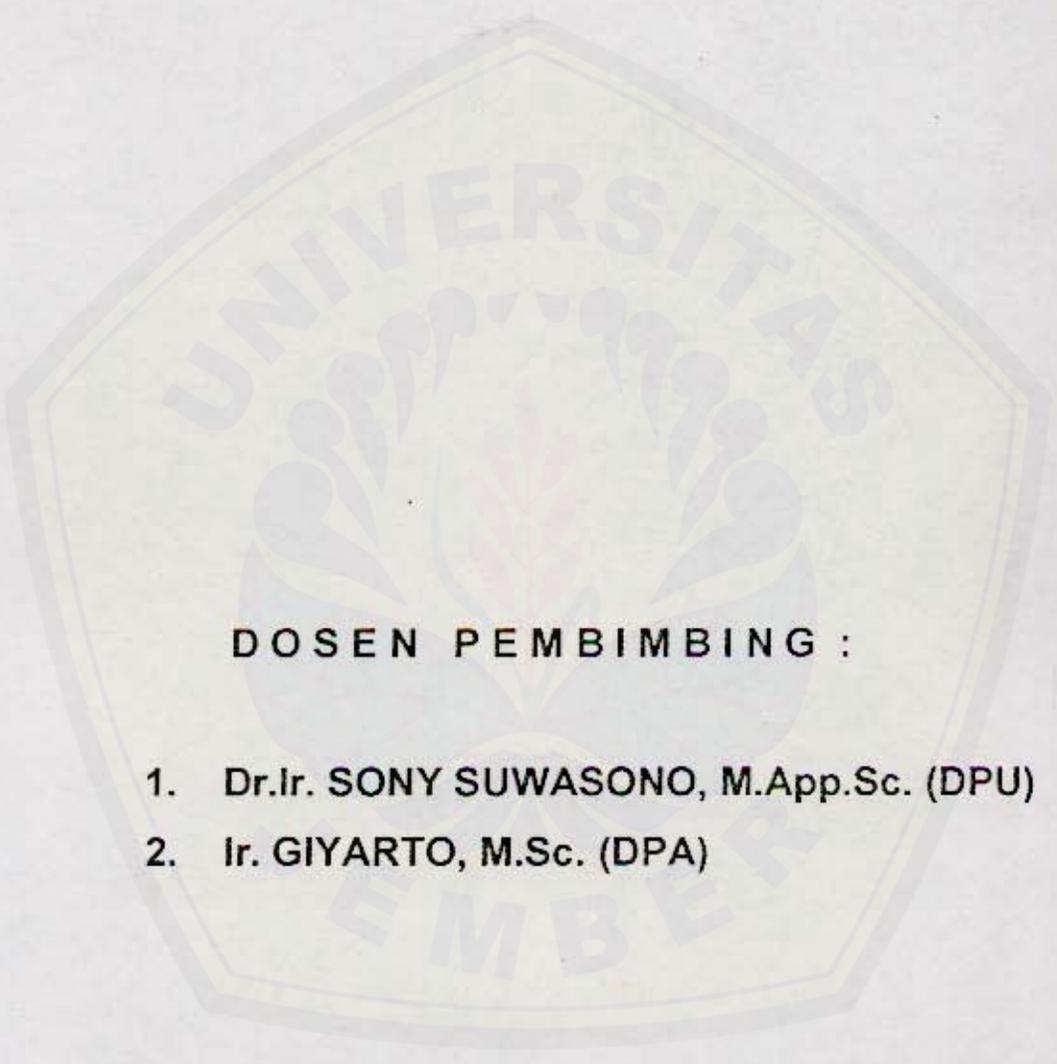
*Mine*

*Kupersembahkan karya ini untuk :*

- ♥ *Ayahanda (Almarhum) "Mochammad Adji" dan Ibunda "Siti Marfu'ah", Terima kasih untuk kasih sayang dan semua yang telah kau berikan, Semoga ALLAH swt memberikan rahmat dan hidayahNYA.*
- ♥ *Mas. Amin & Mbak Sri, Cak Bas & Mbak Yuni, mbak Qoni'ah (Ni'ul) & Mas Khamim dan adikku Lima thanks untuk dukungan dan doanya, Kudoakan agar keluarga kalian semua bahagia, sakinah, makmur, aman dan sentosa lahir dan bathin*
- ♥ *Keponakanku Nidom, Didin, Abdu dan Rodhi cepat dewasa dan capailah cita-citamu*
- ♥ *Saudaraku Pakde & Bude, Paklek dan Bulekku semua terima kasih atas do'anya, semoga ALLAH swt memberikan rahmat dan hidayahNYA*
- ♥ *Philovia Lukita S.D. dan keluargamu terima kasih atas semuanya*
- ♥ *Semua dosen, teknisi, staf dan karyawan Fakultas Teknologi Pertanian, khususnya Pak Boedi, Pak Sony, Pak Giyarto, Pak Susijahadi, Mbak Widi, Mbak Ketut, Mbak Wim Dan Mbak Sari serta ketua dan teknisi Laboratorium Dasar Bersama UNAIR Pak Mul, BU Tutik dan Bu Ani.*
- ♥ *Almamaterku*

## Spesial Thanks to :

- ☺ Pak Kost yang selalu siap menagih uang kost dan Anak kost'an H. Kholiq (Villa Munawir), Mas Imam Pangat, Mas Suhery, Mas Andrew "Kamso", Yuliman "Tole"Bum", Yudi "kotok", Novi, Dion and Mamat, Hendruo and istri, Budeng, Yoyong, Dolly, Brekelle, Zambroung dan yang lainnya. Semoga Hidup kalian diridhoi oleh ALLAH swt
- ☺ Mbak Her, Bulek Kampus, Bu Khor, Mak Tutik, Mak Lastri, Encak Neddan, Pak Pe dan penjual makanan tercinta, terima kasih telah menyediakan makanan dan minuman untuk kelangsungan hidupku
- ☺ Sengak & istri, Corong, Pelo, Njlantir, Broden, Bakco, Encek, Kiwuk and istri, Om Nos dan liane, Matur Kaso'on lek
- ☺ Fatta, Yoyok dan Yenny thanks banget udah mau nemani penelitianku baik di Jember dan Surabaya
- ☺ Temen-temenku FTP 98, khususnya THP 98



**DOSEN PEMBIMBING :**

1. **Dr.Ir. SONY SUWASONO, M.App.Sc. (DPU)**
2. **Ir. GIYARTO, M.Sc. (DPA)**

## KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa, akhirnya penulis dapat menyelesaikan Karya Ilmiah Tertulis dengan judul "**Aplikasi Fluidized Bed Reactor Dengan  $\beta$ -Galaktosidase Amobil Dari *Aspergillus oryzae* Untuk Produksi Senyawa Prebiotik Galakto-Oligosakarida (GalOS)**".

Skripsi ini disusun berdasarkan penelitian yang dilaksanakan di Laboratorium Pengendalian Mutu, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember dan di Laboratorium Dasar Bersama (LDB) Universitas Airlangga – Surabaya mulai bulan Februari 2003 sampai dengan bulan September 2003 yang diajukan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan program sarjana strata satu (S-1) pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian – Universitas Jember.

Penyusunan Karya Ilmiah Tertulis ini banyak mendapatkan bimbingan, bantuan dan dukungan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ibu Ir. Hj. Siti Hartanti, MS, selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
2. Bapak Ir. Susijahadi, MS., selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember dan Dosen Pembimbing Anggota II.
3. Bapak Dr.Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc., selaku Dosen Pembimbing Utama, yang telah memberikan bimbingan, pengarahan serta saran dalam penulisan Karya Ilmiah Tertulis ini.
4. Bapak Ir. Giyanto, M.Sc., selaku Dosen Pembimbing Anggota I, yang telah memberikan bimbingan, pengarahan serta saran dalam penulisan Karya Ilmiah tertulis ini.
5. Bapak Ir. Boedi Soesanto, MS., selaku Dosen Wali.
6. Teknisi Laboratorium di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian dan di Laboratorium Dasar Bersama UNAIR yang telah membantu selama penelitian.
7. Seluruh staf dan karyawan Fakultas Teknologi Pertanian yang telah banyak membantu penulis.

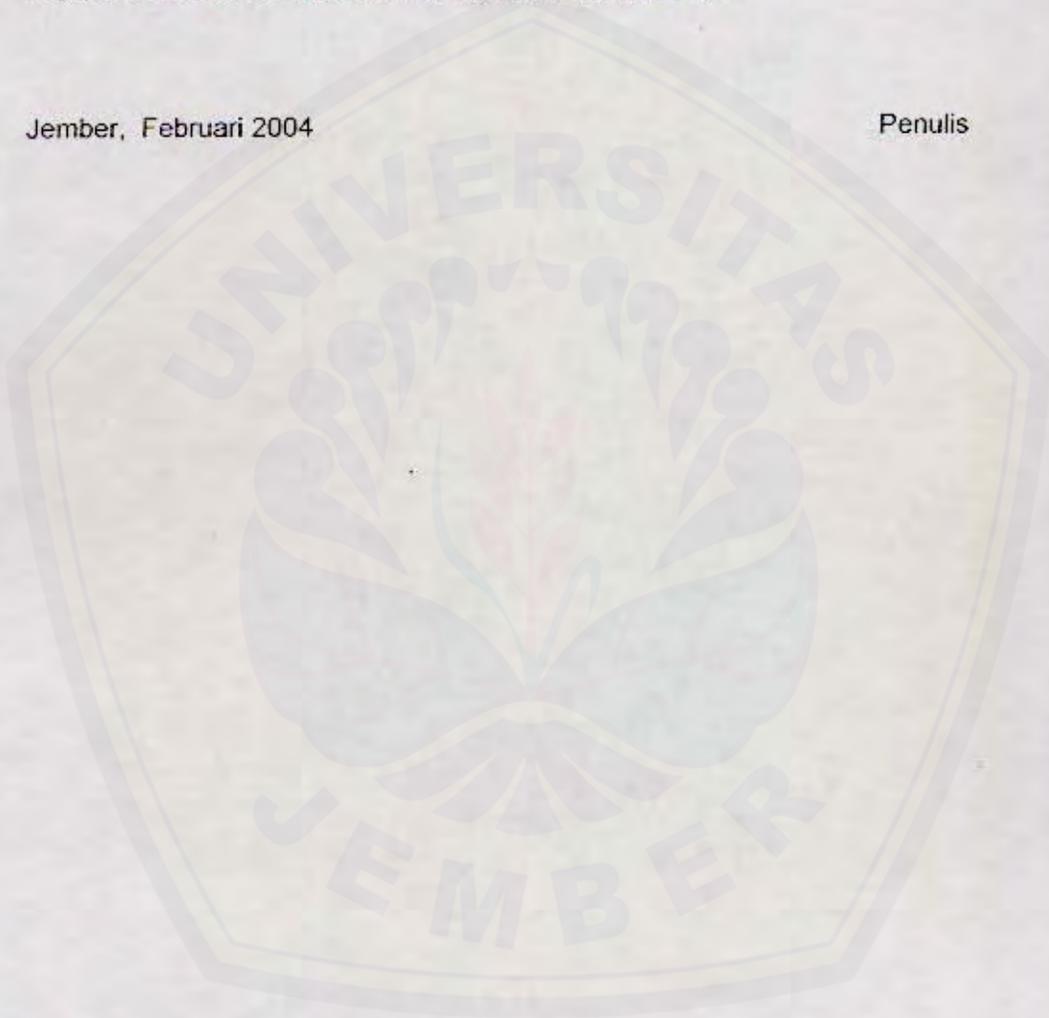
8. Dan semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah berperan dalam penyelesaian skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa Karya Ilmiah Tertulis ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga saran dan kritik membangun dari pembaca sangat penulis harapkan.

Akhirnya penulis berharap Karya Ilmiah Tertulis ini dapat bermanfaat bagi pembaca umumnya dan Almamater pada khususnya.

Jember, Februari 2004

Penulis



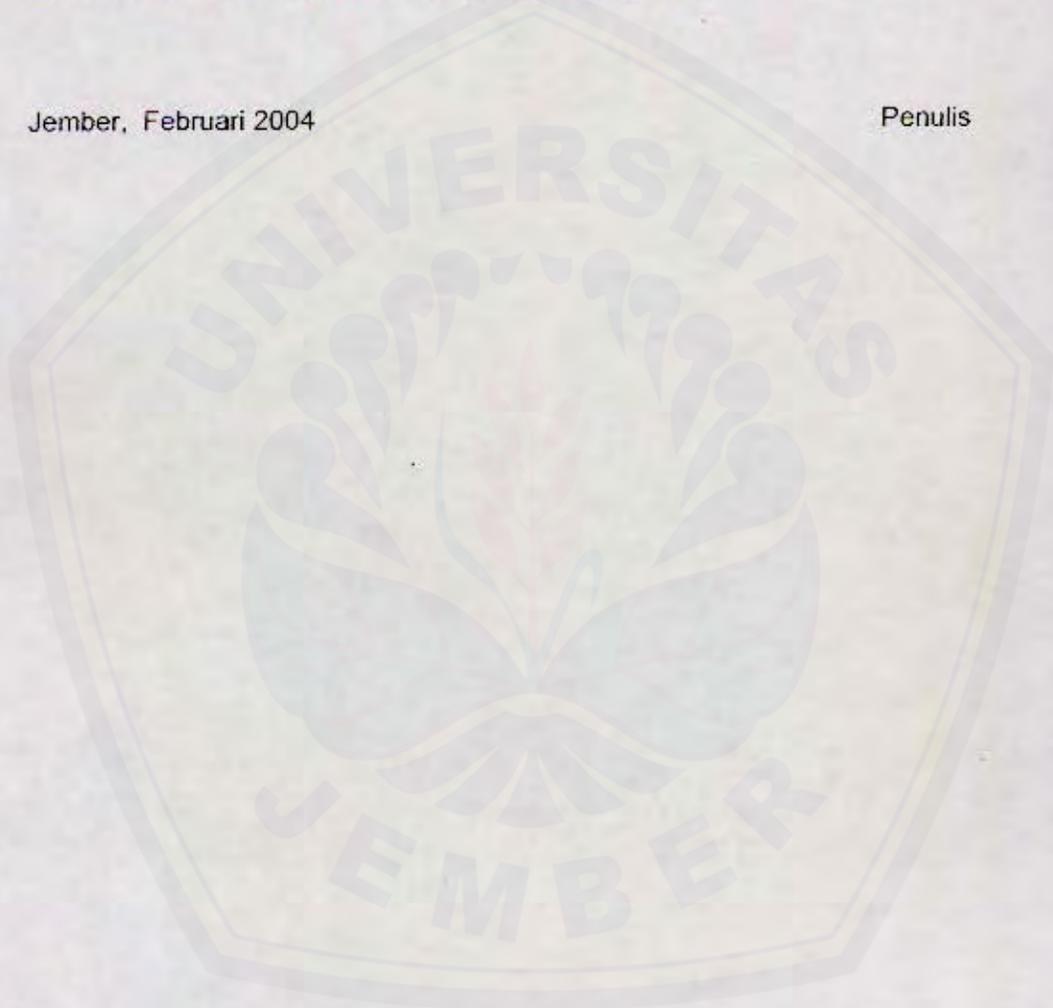
8. Dan semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah berperan dalam penyelesaian skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa Karya Ilmiah Tertulis ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga saran dan kritik membangun dari pembaca sangat penulis harapkan.

Akhirnya penulis berharap Karya Ilmiah Tertulis ini dapat bermanfaat bagi pembaca umumnya dan Almamater pada khususnya.

Jember, Februari 2004

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
PENGESAHAN .....	ii
MOTTO.....	iii
LEMBAR PERSEMBAHAN .....	iv
DOSEN PEMBIMBING .....	vi
KATA PENGANTAR .....	vii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xv
RINGKASAN.....	xvi
<b>I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	5
<b>II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Makanan Fungsional.....	6
2.2 Probiotik, Prebiotik dan Synbiotik .....	9
2.2.1 Probiotik.....	9
2.2.2 Prebiotik.....	13
2.2.3 Synbiotik.....	15
2.3 Oligosakarida dan Galakto-Oligosakarida .....	16
2.3.1 Oligosakarida .....	16
2.3.2 Galakto-Oligosakarida.....	19
2.4 Produksi Galakto-Oligosakarida Menggunakan Enzim	
$\beta$ -Galaktosidase .....	21
2.4.1 Substrat Yang Dibutuhkan .....	21
2.4.2 Enzim $\beta$ -Galaktosidase .....	22

2.4.3	Immobilisasi Enzim $\beta$ -Galaktosidase .....	23
2.4.3.1	DEAE-Cellulose .....	26
2.4.3.2	Natrium Alginat .....	27
2.4.3.3	Keramik ( <i>China Clay</i> ) .....	28
2.5	Produksi Galakto-Oligosakarida .....	29
2.6	<i>Fluidized Bed Reactor</i> .....	32
2.7	HPLC ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ) .....	33
2.8	Bakteri Asam Laktat .....	34
2.9	Hipotesa .....	39
<b>III METODE PENELITIAN</b>		
3.1	Bahan Alat Penelitian .....	40
3.1.1	Bahan Penelitian .....	40
3.1.2	Alat Penelitian .....	40
3.2	Waktu dan Tempat Penelitian .....	40
3.3	Metode Penelitian .....	41
3.3.1	Perancangan Percobaan .....	41
3.3.2	Pelaksanaan Penelitian .....	41
3.3.3	Urutan Kerja .....	48
3.4	Pengamatan .....	49
<b>IV PEMBAHASAN</b>		
4.1	Metode Immobilisasi .....	50
4.2	Sintesa Galakto-Oligosakarida (GalOS) dengan Enzim $\beta$ -Galaktosidase Amobil .....	55
4.2.1	Pengaruh Waktu Inkubasi .....	55
4.2.2	Pengaruh Metode Immobilisasi .....	61
4.3	Pengujian <i>In Vitro</i> Galakto-Oligosakarida (GalOS) pada <i>Lactobacillus</i> .....	65

<b>V KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1 Kesimpulan.....	69
5.2 Saran.....	69
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>70</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>76</b>



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Distribusi dan Komposisi Mikroflora Intestinal .....	10
2. Tipe-tipe Produk Probiotik dan Bakteri Probiotik yang Digunakan .....	11
3. Bakteri Probiotik dan Efek Perlindungannya.....	12
4. Oligosakarida, Disakarida dan Poliols yang dapat meningkatkan <i>Bifidobacteri</i> dan Bakteri Asam Laktat dalam Saluran Pencernaan ...	18
5. Dosis Maksimum Oligosakarida yang Tidak Menimbulkan Diare .....	18
6. Komposisi kimia dan Karakteristik Prebiotik .....	19
7. Perkiraan Struktur Homo-GalOS Yang Diproduksi Menggunakan Enzim $\beta$ -Galaktosidase dalam Bentuk Bebas .....	20
8. Beberapa Prebiotik Oligosakarida Yang Diproduksi di Jepang Tahun 1995 .....	29
9. Susunan Genus <i>Lactobacillus</i> .....	38
10. Aktivitas Enzim $\beta$ -Galaktosidase dari <i>Aspergillus oryzae</i> Amobil pada beberapa metode immobilisasi .....	51
11. Tingkat Aktivitas Enzim $\beta$ -Galaktosidase Setelah Beberapa Tahap ...	54
12. Produksi GalOS Dengan Menggunakan enzim $\beta$ -Galaktosidase Amobil pada Keramik ( <i>Cross Linking</i> ) Dalam beberapa Tahap .....	56
13. Produksi GalOS Dengan Menggunakan enzim $\beta$ -Galaktosidase Amobil pada DEAE-Cellulose ( <i>Adsorpsi anionik</i> ) Dalam beberapa Tahap .....	58
14. Produksi GalOS Dengan Menggunakan enzim $\beta$ -Galaktosidase Amobil pada Gel Natrium Alginat ( <i>Entrapment</i> ) Dalam beberapa Tahap .....	60
15. Indikator Pertumbuhan <i>Lactobacillus</i> Dalam Media MRS Broth Dengan Penambahan Galaktooligosakarida (GalOS) Pada Suhu 37°C.....	67

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hidrolisa Laktosa .....	21
2. Reaksi Enzim Dan Substrat .....	22
3. Metode Immobilisasi Enzim .....	24
4. Difusi Eksternal Dan Internal Substrat Pada Sistem Amobil .....	25
5. <i>Cation</i> dan <i>Anion Enchange</i> Yang Berikatan dengan <i>Caounterions</i>	27
6. Struktur Molekul Natrium Alginat.....	28
7. Skema Reaksi Hidrolisa Dan Sintesa .....	30
8. Skema Reaksi Sintesa Secara Kinetika.....	30
9. Estimasi Pembentukan Galaktooligosakarida Dalam Bentuk Diskaarida Dan Trisakarida.....	31
10. Jalur Fermentasi Glukosa (A) Homofermentatif (Glikolisis, Jalur Embden Meyerhoff) dan (B) Heterofermentatif (6-fosfoglukonat/fosfoketolase).....	36
11. Metabolisme Galaktosa Pada Bakteri Asam Laktat Melalui Jalur Tagatose-6-Phophat (A) dan Jalur Leloir (B) .....	37
12. Diagram Alir Immobilisasi Enzim $\beta$ -Galaktosidase dari <i>Aspergillus</i> <i>oryzae</i> Dengan Metode Ikatan Kovalen Pada Keramik .....	42
13. Diagram Alir Immobilisasi Enzim $\beta$ -Galaktosidase dari <i>Aspergillus</i> <i>oryzae</i> Dengan Metode <i>Adsorpsi anionik</i> Pada DEAE-cellulose..	43
14. Diagram Alir Immobilisasi Enzim $\beta$ -Galaktosidase dari <i>Aspergillus</i> <i>oryzae</i> Dengan Metode Pemerangkapan Dalam Gel Natrium Alginat.....	44
15. Evaluasi Aktivitas Enzim.....	45
16. Diagram Alir Pengujian Produk GalOS Terhadap Beberapa Bakteri Asam Laktat .....	47
17. Diagram Alir Produksi HomoGalaktooligosakarida Secara Enzimatis Dengan Menggunakan Enzim $\beta$ -Galaktosidase Amobil dari <i>Aspergillus oryzae</i> .....	48

18. Produksi Disakarida Menggunakan Enzim $\beta$ -Galaktosidase Amobil dari <i>Aspergillus oryzae</i> pada Keramik dalam Beberapa Tahap .....	57
19. Produksi Trisakarida Menggunakan Enzim $\beta$ -Galaktosidase Amobil dari <i>Aspergillus oryzae</i> pada Keramik dalam Beberapa Tahap .....	58
20. Produksi Disakarida Menggunakan Enzim $\beta$ -Galaktosidase Amobil dari <i>Aspergillus oryzae</i> pada DEAE-Cellulose dalam Beberapa Tahap .....	59
21. Produksi Trisakarida Menggunakan Enzim $\beta$ -Galaktosidase Amobil dari <i>Aspergillus oryzae</i> pada DEAE-Cellulose dalam Beberapa Tahap .....	59
22. Produksi Disakarida Menggunakan Enzim $\beta$ -Galaktosidase Amobil dari <i>Aspergillus oryzae</i> pada Gel Natrium Alginat dalam Beberapa Tahap .....	60
23. Produksi Trisakarida Menggunakan Enzim $\beta$ -Galaktosidase Amobil dari <i>Aspergillus oryzae</i> pada Gel Natrium Alginat dalam Beberapa Tahap .....	61
24. Pembentukan GalOS Disakarida Pada Beberapa Metode Immobilisasi (Tahap I).....	63
25. Pembentukan GalOS Disakarida Pada Beberapa Metode Immobilisasi (Tahap II).....	63
26. Pembentukan GalOS Disakarida Pada Beberapa Metode Immobilisasi (Tahap III).....	64
27. Pembentukan GalOS Trisakarida Pada Beberapa Metode Immobilisasi (Tahap I).....	64
28. Pembentukan GalOS Trisakarida Pada Beberapa Metode Immobilisasi (Tahap II).....	65
29. Pembentukan GalOS Trisakarida Pada Beberapa Metode Immobilisasi (Tahap III).....	65

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kurva Standart p-Nitrophenol.....	76
2. Data Pengamatan Aktivitas Enzim $\beta$ -Galaktosidase dari <i>Aspergillus oryzae</i> .....	77
3. Data Pengamatan Produksi Galakto-Oligosakarida.....	79
4. Kurva Standart Sintesa Galakto-Oligosakarida.....	84
5. Data Pengamatan Pengujian Galaktooligosakarida Pada <i>Lactobacillus sp.</i> .....	85
6. Kurva Standart Total Mikroba.....	88
7. Cara Membuat Larutan Buffer Phospat 0,01 M pH 7.....	90
8. Cara Analisa GalOS Menggunakan HPLC Merk Perkin Elmer.....	91

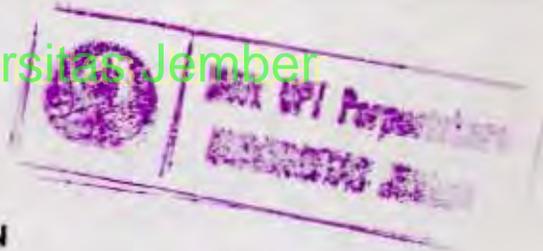
Muchammad Arifin (981710101103), Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Aplikasi *Fluidized Bed Reactor* Dengan  $\beta$ -Galaktosidase Amobil Dari *Aspergillus oryzae* Untuk Produksi Senyawa Prebiotik Galakto-Oligosakarida (GalOS), Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App. Sc, Selaku Dosen Pembimbing Utama, dan Ir. Giyanto, M.Sc. selaku Dosen Pembimbing Anggota.

## RINGKASAN

Prebiotik jenis Oligosakarida (GalOS) merupakan salah satu jenis pangan fungsional yang berfungsi sebagai stimulasi pertumbuhan dan perkembangan bakteri menguntungkan dari golongan *Bifidobacteria* maupun *Lactobacillus*. Sebagai bagian dari karbohidrat yang tidak tercerna, keberadaan GalOS mempengaruhi keseimbangan mikroflora dalam tubuh. Secara alami GalOS dapat diperoleh dari Air Susu Ibu (ASI) dan cenderung berkurang jumlahnya dalam tubuh dengan bertambahnya usia. GalOS dapat diproduksi secara enzimatik menggunakan enzim  $\beta$ -Galaktosidase amobil dari *Aspergillus oryzae*. Immobilisasi enzim  $\beta$ -galaktosidase dapat dilakukan dengan prinsip dasar pengikatan silang, absorpsi anionik dan pemerangkapan enzim dalam suatu penyangga. Keuntungan penggunaan metode ini dalam produksi bahan adalah enzim dapat dipakai untuk beberapa tahap produksi tanpa melalui tahap pemurnian yang rumit.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mempelajari pengaruh metode immobilisasi terhadap produktivitas sintesa Galakto-Oligosakarida dan untuk membuktikan bahwa GalOS dapat berfungsi sebagai *growth promotor* pada beberapa jenis *Lactobacillus*. Penelitian dilakukan dengan menggunakan substrat Galaktosa 40% (w/w), pH 7, suhu 50°C selama 144 jam. Metode immobilisasi dilakukan dengan mengikat silang enzim  $\beta$ -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* dengan glutaraldehid pada keramik, absorpsi anionik pada DEAE-Cellulose dan pemerangkapan pada gel natrium alginat. Pengamatan parameter penelitian yang dilakukan meliputi jumlah produk GalOS, perubahan pH dan perubahan total mikroba. Data penelitian disajikan dalam bentuk tabel dan grafik hasil produksi GalOS dan indikator pertumbuhan *Lactobacillus sp.*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode immobilisasi enzim  $\beta$ -Galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* berpengaruh terhadap produksi GalOS. Metode immobilisasi ikatan silang dengan Glutaraldehid pada keramik merupakan metode yang paling baik, dengan produktivitas disakarida sebesar 109.484 ppm (tahap 1), 79.100 ppm (tahap 2) dan 62.951 ppm (tahap 3) sedangkan produk trisakarida yang terbentuk sebesar 36.000 ppm (tahap 1), 29.755 ppm (tahap 2) dan 23.600 ppm (tahap 3). Metode immobilisasi berpengaruh terhadap aktivitas enzim dengan penurunan produktivitas sekitar 70–86%. Secara umum konsentrasi GalOS meningkat secara cepat pada 24 jam pertama inkubasi dan cenderung stabil sampai 144 jam. Pengujian pada *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum* dan *L. lactis* menunjukkan bahwa GalOS dapat berfungsi sebagai *growth promotor*, yang ditandai dengan perubahan indikator pertumbuhan, yaitu tingkat kekeruhan media, pH dan jumlah total mikroba.



## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Air Susu Ibu (ASI) sebagai makanan pokok bayi merupakan kombinasi nutrisi yang sempurna dimana di dalamnya terdapat lebih dari 130 jenis oligosakarida dengan kisaran konsentrasi antara 3000 sampai 6000 ppm. Di antara sejumlah oligosakarida tersebut, salah satunya adalah Galakto-Oligosakarida (GalOS) yang memiliki fungsi sebagai senyawa inhibitor dari perekatan bakteri patogen pada permukaan sel epitel. GalOS juga merupakan analog dari senyawa reseptor permukaan sel epitel yang berpartisipasi dalam sistem pertahanan non-imunologi bagi bayi yang mengkonsumsi ASI (Kunz dan Rudolf, 1996)

Bayi yang mengkonsumsi ASI, dimana ASI di dalamnya terkandung probiotik dan prebiotik akan memiliki mikroflora dalam usus yang seimbang, dengan dominasi oleh bakteri menguntungkan, oleh karena adanya *growth factor* berupa senyawa yaitu prebiotik. Setelah berhenti mengkonsumsi ASI, maka tidak ada lagi masukan probiotik dan prebiotik sehingga perlahan-lahan jumlah bakteri probiotik (*Bifidobacterium* dan *Lactobacillus*) akan menurun. Penurunan ini menyebabkan mikroekosistem yang ada dalam usus bayi tersebut akan didominasi oleh bakteri lain (Robertfroid, 2000). Kondisi ini hampir serupa dengan bayi yang mengkonsumsi susu formula (tanpa adanya kandungan probiotik dan prebiotik) dimana mikroekosistem dalam usus akan didominasi oleh bakteri *Coliform*, *Enterococci* dan *Bacteroides* (Collins, 1999).

Pemberian bahan tambahan prebiotik tentunya tidak lagi memberi manfaat seperti yang diharapkan. Untuk menciptakan kondisi mikroekosistem mikrobiota dalam usus yang tetap didominasi oleh bakteri probiotik maka perlu dipertimbangkan pemberian formula yang mengandung probiotik dan prebiotik kepada bayi yang telah berhenti mengkonsumsi ASI dan bayi yang non-menyusui, sehingga manfaat probiotik dan prebiotik yang menguntungkan kesehatan tetap dapat dipertahankan sampai masa anak.

Prebiotik merupakan bahan pangan yang tidak dapat dicerna dan diserap dalam saluran gastrointestinal atau pencernaan (*non digestible food*), yang memberikan manfaat dalam menstimulasi pertumbuhan bakteri probiotik dan memperbaiki kesehatan tubuh. Prebiotik pada umumnya adalah karbohidrat yang

biasanya dalam bentuk oligosakarida dan serat makanan (inulin). Adapun jenis dari prebiotik adalah FOS (Frukto-Oligosakarida), serat makanan (Inulin), GalOS (Galakto-Oligosakarida), laktulosa dan *lactitol*. Bahan-bahan tersebut paling sering dipakai sebagai prebiotik, di samping itu terdapat pula bahan lain yang memenuhi kriteria sebagai prebiotik, misalnya: xilosa, soya dan mannososa (Gibson, 1998)

Untuk mendapatkan prebiotik tidak sulit, karena prebiotik dapat diperoleh dari bahan pangan alami ataupun buatan yang saat ini terus dikembangkan. Sumber- sumber prebiotik yang telah diketahui adalah sebagai berikut:

1. Air Susu Ibu dalam bentuk *human milk oligosaccharide* yang hanya <5% dicerna di dalam usus (Gnoth, 2000),
2. Sayur dan buah yang mengandung FOS, misalnya: onion, asparagus, chicory (mengandung inulin), pisang, artichoke (Gibson, 1998),
3. Prebiotik buatan, yang umumnya disintesa dengan cara hidrolisis polisakarida alami dan sintesa secara enzimatik (Grizard dan Barthomuef, 1999).

Penambahan prebiotik dalam bahan pangan yang ditujukan untuk pemeliharaan kesehatan dan nilai jual produk pangan saat ini sudah banyak dilakukan oleh perusahaan makanan baik di dalam maupun di luar negeri. Misalnya perusahaan makanan Eropa, yaitu industri Meiji Beghin yang meluncurkan produk berbasis prebiotik bermerk *Actilight*. Selain itu perusahaan Jerman juga mengembangkan produk prebiotik jenis *Raftilose* yang di dalamnya juga terdapat dua strain probiotik.

Senyawa GalOS umumnya disintesa dengan menggunakan laktosa sebagai substrat, dimana hasil degradasi laktosa yang utama adalah glukosa dan galaktosa, selain itu sejumlah kecil GalOS dapat terbentuk melalui reaksi transferase. Senyawa ini, ketika dikonsumsi oleh manusia akan mampu memacu pertumbuhan *Bifidobacteria sp.* dalam usus besar dan dapat menekan kebusukan.

Penerapan GalOS ke dalam makanan merupakan hal yang menarik, sehingga usaha untuk memproduksi GalOS banyak mendapat perhatian dari berbagai kalangan. Produksi GalOS yang analog dengan GalOS ASI dapat dilakukan secara enzimatik dengan menggunakan enzim  $\beta$ -galaktosidase yang dapat diperoleh dari beberapa jenis mikroba, misalnya: *Aspergillus oryzae*,

*Bacillus circulans*, *Eschericia coli* dan *Thermus aquaticus* (Schomburg dan Salzmann, 1991). Pemakaian cara ini lebih menguntungkan daripada menggunakan cara ekstraksi dari bahan pangan alami. Misalnya GalOS yang diperoleh dari ASI sangat sulit karena ASI tidak dapat dibeli secara komersial dan juga akan sulit mengumpulkannya dari para ibu yang menyusui. Atas dasar itulah pemanfaatan enzim dalam produksi GalOS lebih mudah dengan kapasitas produksi yang dapat diatur.

Berdasarkan keadaan enzim yang digunakan dalam sintesa GalOS, maka produksi GalOS secara enzimatis dapat dilakukan dengan menggunakan dua cara, yaitu: penggunaan enzim bebas dan enzim amobil. Penggunaan enzim bebas berarti enzim dalam sintesa GalOS langsung bereaksi dengan substrat melalui sisi aktif enzim. Sedangkan penggunaan enzim amobil akan menyulitkan enzim untuk bereaksi langsung dengan substrat karena terhalang oleh matriks yang mengikatnya (Drauz dan Waldmann, 1995).

Pemakaian enzim amobil dalam sintesis GalOS memiliki keuntungan berupa kemampuan enzim untuk dipakai berulang-ulang (*reuseable*). Sedangkan pemakaian enzim bebas hanya dapat dilakukan hanya satu kali pemakaian karena enzim bercampur dengan substrat dan produk. Untuk melakukan pemisahan dibutuhkan biaya yang mahal, sehingga pemakaian enzim amobil lebih efisien dan hemat.

Enzim  $\beta$ -galaktosidase yang digunakan dalam sintesa GalOS dapat diimmobilisasi dengan tiga metode (Drauz dan Waldmann, 1995) yaitu:

1. Metode Ikatan Kovalen

Metode ikatan kovalen dapat dilakukan dengan cara pelekatan secara kimia pada rantai polimer, penggabungan pada jaringan polimerik tak larut atau ikatan silang dengan menggunakan senyawa kimia bifungsional seperti glutaraldehyda.

2. Metode Ikatan Non-Kovalen

Dalam metode ini enzim dapat diikat melalui ikatan logam, interaksi elektrostetik atau ikatan hidrogen. Metode ini sering menggunakan resin penukar ion (*ion exchanger*).

### 3. Metode Pemerangkapan secara Fisik

Pada metode ini enzim diperangkap ke dalam gel (*entrapment*), mikroenkapsulasi atau membran. Gel yang sering digunakan adalah natrium alginat.

Untuk mendapatkan Galakto-Oligosakarida, selama ini dilakukan dengan cara sintesis atau produksi secara enzimatik dengan menggunakan enzim bebas dari beberapa mikroba. Oleh karena itu dilakukan penelitian tentang produksi Galakto-Oligosakarida secara enzimatik dengan menggunakan enzim amobil dari *Aspergillus oryzae*.

Untuk mengetahui kelebihan dari masing-masing metode immobilisasi enzim, dalam produksi ini menggunakan ketiga metode, yaitu: metode ikatan kovalen pada keramik, metode adsorpsi anionik pada DEAE-Cellulosa dan metode pemerangkapan dalam gel natrium-alginat. Selain itu juga perlu diuji apakah Galakto-Oligosakarida yang dihasilkan dapat berfungsi sebagai *Growth promotor* pada *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* dan *Lactobacillus lactis*.

#### 1.2 Perumusan Masalah

Produksi Galakto-Oligosakarida secara enzimatik dengan menggunakan enzim  $\beta$ -galaktosidase amobil dari *Aspergillus oryzae* dipengaruhi metode yang digunakan, lama waktu inkubasi dan aktivitas enzim selama reaksi. Faktor-faktor tersebut perlu diperhatikan untuk mendapatkan efisiensi di dalam produksi Galakto-Oligosakarida.

#### 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan permasalahan yang timbul maka penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui pengaruh immobilisasi enzim terhadap sintesis Galakto-Oligosakarida.
2. Menentukan metode yang paling baik untuk produksi Galakto-Oligosakarida secara enzimatik dengan menggunakan enzim amobil  $\beta$ -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae*.

3. Mengetahui kemampuan aktivitas enzim  $\beta$ -galaktosidase amobil sebelum dan sesudah digunakan dalam proses produksi Galakto-Oligosakarida.
4. Menentukan waktu inkubasi yang optimum pada produksi Galakto-Oligosakarida secara enzimatis menggunakan enzim  $\beta$ -galaktosidase amobil dari *Aspergillus oryzae*.
5. Mengetahui bahwa Galakto-Oligosakarida yang dihasilkan dapat digunakan sebagai *growth promotor* pada *Lactobacillus sp.*

#### 1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang :

1. Produksi prebiotik Galakto-Oligosakarida secara enzimatis menggunakan enzim  $\beta$ -galaktosidase amobil dari *Aspergillus oryzae*.
2. Kemampuan aktivitas enzim  $\beta$ -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* dalam bentuk amobil pada produksi Galakto-Oligosakarida.
3. Metode yang paling baik dan optimal pada produksi Galakto-Oligosakarida secara enzimatis menggunakan enzim  $\beta$ -galaktosidase amobil dari *Aspergillus oryzae*.
4. Galakto-Oligosakarida (GalOS) dapat digunakan sebagai *growth promotor* pada beberapa jenis bakteri *Lactobacillus*.



## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Makanan Fungsional

Dewasa ini secara internasional terdapat peningkatan fokus pada potensi kesehatan pangan, terutama perhatian pada makanan atau minuman yang tidak hanya memberikan suplai nutrisi, tetapi lebih jauh lagi yaitu untuk menghilangkan suatu pengaruh terhadap fungsi atau proses fisiologi sistematis. Di Amerika Serikat, *Food and Drug Assosiation* (FDA) mendefinisikan makanan atau minuman sebagai produk yang terutama dikonsumsi karena rasanya, aromanya ataupun nilai gizinya. Akan tetapi pada sepuluh tahun terakhir ini muncul paradigma baru dalam ilmu pangan dan gizi, yaitu apa yang disebut sebagai *functional food* (Muchtadi dan Wijaya, 1996).

Istilah pangan fungsional merupakan nama yang paling dapat diterima semua pihak untuk segolongan makanan dan minuman yang mengandung bahan-bahan yang diperkirakan dapat meningkatkan status kesehatan dan mencegah timbulnya penyakit. Sebelumnya istilah *health food* untuk makanan sehat lebih menarik dan berarti bagi konsumen, tetapi hal ini tidak dapat digunakan lagi karena pada prinsipnya semua bahan pangan akan menyehatkan tubuh bila dikonsumsi secara baik dan benar (Arafah, 2003). Silalahi (2001) juga mengemukakan bahwa semua makanan adalah fungsional karena memberi rasa, aroma dan memiliki nilai gizi.

Istilah lain yang pernah diusulkan sebelumnya untuk pangan yang menyehatkan adalah *designer food*, *pharmafoods*, *vitafoods* dan *nutraceutical*, tetapi semua istilah ini kurang tepat karena bentuknya disamakan dengan *food supplement* yang merupakan suplemen zat gizi dan non-gizi yang berbentuk seperti obat (kapsul ataupun tablet). Sedangkan pangan fungsional bentuknya merupakan makanan atau minuman tetapi mengandung komponen aktif yang menyehatkan (Arafah, 2003).

Definisi pangan fungsional menurut Badan POM adalah pangan yang secara alamiah maupun telah melalui proses, mengandung satu atau lebih senyawa yang berdasarkan kajian-kajian ilmiah dianggap mempunyai fungsi-fungsi fisiologis tertentu yang bermanfaat bagi kesehatan. Bahan pangan fungsional dapat dikonsumsi sebagaimana layaknya makanan atau minuman, mempunyai karakteristik sensori berupa penampakan, warna, tekstur dan cita

rasa yang dapat diterima oleh konsumen. Selain itu, bahan tersebut tidak memberikan kontradiksi dan tidak menimbulkan efek samping pada jumlah penggunaan yang dianjurkan terhadap metabolisme zat gizi lainnya (Astawan, 2003).

Komponen aktif dalam bahan pangan yang memberikan efek fisiologis atau menimbulkan adanya sifat fungsional dikelompokkan menjadi dua bagian besar, yaitu komponen zat gizi dan non gizi. Komponen yang termasuk dalam golongan zat gizi antara lain: kalsium, asam folat, vitamin E dan iodium. Sedangkan komponen aktif non zat gizi diantaranya, yaitu: grup senyawa flavonoid, komponen sulfur, senyawa polifenol, senyawa terpenoid, senyawa isoflavon, serat makanan, mikroba dan komponen hasil metabolit lainnya, oligosakarida, hidrokoloid dan lain sebagainya (Mucthadi dan Wijaya, 1996).

Astawan (2003) menyebutkan bahwa keberadaan komponen aktif tersebut bisa terjadi secara alami, akibat penambahan atau karena proses pengolahan (akibat reaksi-reaksi kimia tertentu atau aktivitas mikroorganisme). Beberapa contoh komponen aktif yang terdapat secara alami dalam bahan pangan adalah:

1. nerodiol dan linalool pada teh hijau yang berperan untuk mencegah karies gigi dan mencegah kanker;
2. komponen sulfur pada bawang-bawangan yang berfungsi untuk mencegah agregasi platelet dan menurunkan kadar kolesterol,
3. kurkumin pada jaringan kunyit dan l-tumeron pada rimpang temulawak yang berkhasiat untuk pengobatan berbagai penyakit,
4. daidzein dan genestein pada tempe yang berperan untuk menurunkan kolesterol dan mencegah kanker,
5. serat makanan dari berbagai sayuran, buah, sereal dan kacang-kacangan yang berperan untuk pencegahan timbulnya penyakit yang berkaitan dengan proses pencernaan,
6. berbagai komponen volatil yang terdapat pada bunga melati (jasmin), chrysant dan chamomile yang aromanya sering digunakan sebagai aromaterapi.

Sedangkan komponen aktif yang sering ditambahkan ke dalam bahan makanan adalah:

- 1) vitamin A, E,  $\beta$ -karoten, flavonoid, selenium dan seng (zn) yang telah diketahui peranannya sebagai antioksidan untuk mengatasi serangan radikal bebas yang dapat memicu timbulnya penyakit kanker,
- 2) kalsium untuk menjaga kesehatan tulang dan gigi, mencegah osteoporosis (kerapuhan tulang) dan tekanan darah tinggi,
- 3) asam lemak omega-3 dari minyak ikan laut untuk menurunkan kolesterol dan meningkatkan kecerdasan otak, terutama pada bayi dan anak balita,
- 4) asam folat untuk mencegah anemia dan kerusakan syaraf;
- 5) zat besi (Fe) untuk mencegah anemia gizi,
- 6) iodium untuk mencegah gondok dan kretinisme (kekerdilan),
- 7) oligosakarida untuk membantu pertumbuhan mikroflora yang berada dalam usus (*Bifidobacteria*), misalnya GalOS (Galakto-Oligosakarida).

Selain karena secara alami terkandung dalam bahan pangan dan akibat penambahan, juga dapat diakibatkan oleh proses pengolahan, yaitu: zat-zat tertentu pada produk fermentasi susu (yoghurt, yakult, kefir), fermentasi kedelai dan lainnya.

Menurut Goldberg (1994), sejumlah ilmuwan Jepang mengkategorikan beberapa faktor yang harus dipenuhi oleh suatu produk pangan fungsional, yaitu:

1. produk harus merupakan produk pangan (bukan kapsul, tablet atau serbuk) yang berasal dari bahan secara alami,
2. produk tersebut harus dapat dikonsumsi sebagai bagian pangan sehari-hari,
3. produk harus mempunyai fungsi tertentu waktu masuk ke saluran pencernaan dan memberikan peran tertentu dalam proses metabolisme, misalnya:
  - a. meningkatkan sistem kekebalan tubuh,
  - b. dapat mencegah timbulnya penyakit tertentu, seperti: kanker kolon, jantung, hipertensi dan obesitas (kegemukan),
  - c. membantu mengembalikan kondisi tubuh setelah terserang penyakit tertentu,
  - d. mampu menjaga kondisi tubuh (baik secara fisik dan mental), dan
  - e. memperlambat proses penuaan.

Makanan atau minuman fungsional adalah makanan atau minuman yang dibuat berdasarkan pengetahuan tentang hubungan antara komponen makanan dan kesehatan yang diharapkan memberikan manfaat bagi kesehatan. Meskipun diharapkan memberikan manfaat bagi kesehatan, makanan fungsional tidak dianggap sebagai obat, melainkan dikategorikan tetap sebagai makanan. Karena itulah makanan fungsional harus memberikan fungsi-fungsi gizi dan sensori. Dengan demikian makanan fungsional pada dasarnya seharusnya memberikan fungsi-fungsi (1) gizi, (2) sensori dan (3) fisiologik.

## 2.2 Probiotik, Prebiotik dan Synbiotik

### 2.2.1 Probiotik

Probiotik merupakan sekumpulan mikroba yang memberikan efek positif bagi kesehatan yang secara alami terdapat pada saluran pencernaan manusia, atau merupakan bahan pangan tambahan berupa bakteri hidup yang menguntungkan dan keberadaannya tergantung pada kondisi manusia (Macfarlane dan Cummings, 1999).

Konsep probiotik dari sebuah teori autointoksikasi yang dikemukakan oleh seorang ilmuwan Rusia penerima Nobel Biologi tahun 1908, yaitu Elie Metchnikoff. Menurutnya, secara perlahan pembusukan (putrefikasi) oleh bakteri dalam usus besar menghasilkan senyawa-senyawa beracun yang memasuki peredaran darah, yang disebut sebagai proses "autointoksikasi". Proses inilah yang menyebabkan penuaan dan beberapa penyakit degeneratif. Dia meyakini bahwa tingginya usia hidup warga suku-suku pegunungan di Bulgaria merupakan hasil dari konsumsi produk susu fermentasi. Bakteri yang ikut dikonsumsi bersama produk tersebut dan mampu tinggal di usus berpengaruh positif terhadap mikroflora di kolon dengan cara menurunkan efek toksik dari mikroorganisme yang merugikan di kolon (Prangdimurti, 2003)

Tidak semua bakteri yang hidup dalam saluran pencernaan manusia (Tabel 1) dapat disebut dengan probiotik, tetapi hanya beberapa macam saja, yaitu bakteri yang memenuhi kriteria sebagai berikut:

1. berasal dari manusia (*Human origin*) dan dalam kondisi hidup,
2. stabil terhadap asam maupun cairan empedu,
3. dapat menempel pada sel intestin manusia,
4. dapat berkolonisasi di saluran pencernaan manusia,

5. memproduksi senyawa antimikroba,
6. dapat melawan bakteri patogenik dan kariogenik,
7. teruji secara klinis aman dikonsumsi, dan
8. tetap hidup selama pengolahan dan penyimpanan.

Tabel 1. Distribusi dan Komposisi Mikroflora Intestinal (Lichtenstein dan Goldin, 1998)

Daerah	Komposisi	Jumlah total/mL material
Lambung	<i>Streptococcus</i>	$10^1 - 10^2$
	<i>Lactobacillus</i>	
Usus halus	<i>Streptococcus</i>	$10^2 - 10^4$
	<i>Lactobacillus</i>	
Usus buntu	<i>Bacteroides</i>	$10^6 - 10^8$
	<i>Clostridium</i>	
	<i>Streptococcus</i>	
	<i>Lactobacillus</i>	
Usus besar	<i>Bacteroides</i>	$10^{11.5} - 10^{12}$
	<i>Clostridium</i>	
	<i>Eubacterium</i>	
	<i>Peptococcus</i>	
	<i>Bifidobacterium</i>	
	<i>Streptococcus</i>	
	<i>Fusobacterium</i>	

\* Hanya mikroorganisme yang dominan di tiap bagian saluran pencernaan

Beberapa bakteri dari golongan *Bifidobacteria* yang termasuk dalam kelompok probiotik adalah *Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis* dan *B. thermophilum* (Macfarlane dan Cummings, 1999). Ditambahkan oleh Collin dan Gibson (1999), bakteri lain yang juga termasuk dalam probiotik selain dari jenis *Bifidobacterium* adalah kelompok *Lactobacillus* dan gram-positive cocci. Bakteri probiotik yang termasuk dalam kelompok *Lactobacillus* adalah *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus*, *L. brevis*, *L. reuter*, *L. celobiosus*, *L. curvatus*, *L. fermentum* dan *L. plantarum*. Sedangkan yang termasuk dalam kelompok gram-positif cocci

adalah *Lactococcus lactis subsp. Cremoris*, *Streptococcus salvarius subsp. Thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *S. diacetylactis* dan *S. intermedius*.

Keberadaan dari probiotik pada saluran pencernaan mempunyai peranan yang sangat penting, diantaranya adalah membentuk vitamin B termasuk biotin, niacin, asam folik dan pyridoxin. Bakteri probiotik juga mampu menjaga pH tetap rendah dengan membentuk asam laktat dan asam asetat, sehingga kondisi ini kurang menguntungkan bagi bakteri (non-probiotik) yang tidak tahan terhadap pH rendah. Selain itu, juga menghasilkan enzim laktase yang bermanfaat untuk mencerna gula susu (laktosa) (Cichoce, 2000 dan Kumiasih, 2001).

Upaya-upaya yang dapat dilakukan untuk mempertahankan dominasi bakteri-bakteri bermanfaat antara lain adalah dengan mengendalikan sumber-sumber gula yang bermanfaat bagi metabolisme bakteri-bakteri tersebut atau secara langsung memberi masukan bakteri hidup (Nuraida, 1996). Saat ini terus dikembangkan penelitian yang menggunakan mikroorganisme yang diisolasi dari usus manusia untuk digunakan dalam pembuatan probiotik. Bentuk produk probiotik bervariasi tidak lagi hanya dalam bentuk makanan atau minuman, tetapi juga tablet atau kapsul. Pada Tabel 2 berikut ini disajikan berbagai macam tipe produk probiotik dan bakteri probiotik yang umum digunakan.

**Tabel 2.** Tipe-tipe Produk Probiotik dan Bakteri Probiotik yang Digunakan

Produk Probiotik	Bakteri
Produk susu fermentasi (yoghurt, buttermilk, susu acidofilus dll)	<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. casei</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Leucoccus mesenteroides</i> , <i>Bifidobacterium spp.</i>
Pangan yang disuplementasi (susu pasteurisasi, minuman)	<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>Bifidobacterium spp.</i> ,
Pharmaceuticals (tablet, kapsul, granula)	<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium spp.</i>
Produk <i>health food</i> (cairan, kapsul, bubuk)	<i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>Lactobacillus spp.</i>

Sumber: Prangdimurti (2003)

Beberapa probiotik dan efek perlindungannya disajikan pada Tabel 3 berikut ini:

**Tabel 3.** Bakteri Probiotik dan Efek Perindungannya

Bakteri	Efek klinis yang telah dilaporkan
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA 1 ( <i>Lactobacillus johnsonii</i> )	Dapat menempel pada sel intestinal manusia, menyeimbangkan mikroflora, memperkuat imunitas
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFB 1748	Menurunkan aktivitas enzim fekal, menurunkan mutagenisitas di fekal, mencegah diare karena Radioterapi, memperbaiki konstipasi.
<i>Lactobacillus GG</i> (ATCC 53013)	Mencegah diare karena antibiotik, rotavirus, diare akut, melawan bakteri karsinogenik, memperkuat imunitas intestinal, memperkuat barier saluran pencernaan.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	Menurunkan aktivitas enzim fekal, aktivitas laktase tinggi, pengobatan intoleransi laktosa dan produksi bakteriosin.
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Melindungi gangguan intestinal, menyeimbangkan bakteri intestinal, menurunkan aktivitas enzim fekal, memperkuat imunitas intestinal
<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Tidak ada efek diare rotavirus, tidak ada efek pada enzim fekal, memperkuat imunitas.
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Pengobatan diare karena virus, menyeimbangkan mikroflora intestinal.
<i>Lactobacillus gasseri</i> (ADH)	Reduksi enzim fekal.
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Mengkolonisasi saluran intestinal.

Sumber: (Salminen *et al*, 1998)

Penambahan probiotik dan prebiotik pada menu makanan mereka, dapat meningkatkan gas dalam usus, kram perut dan pembengkakan. Hal ini menjadi sebuah indikasi bahwa bakteri tersebut sedang melakukan proses fermentasi dan merubah usus menjadi tempat yang sangat berasam, sehingga bakteri-bakteri merugikan akan mengalami penurunan populasi. Pada saat bersamaan tubuh akan mengadakan penyesuaian dan efek-efek samping yang ditimbulkan akan hilang. Sisi positifnya bahwa gas dan pembengkakan tersebut mejadi pertanda nyata bahwa probiotik dan prebiotik sedangkan bekerja (Cichoke, 2000).

### 2.2.2 Prebiotik

Prebiotik merupakan produk alami yang berasal dari zat pati tanaman. Yang pertama kali mengembangkannya adalah Hidaka, peneliti Jepang, pada 1983. Menurut Broste (1999) konsep prebiotik muncul dari dasar probiotik, yang merupakan bahan tambahan pangan yang tidak dapat dicerna dan bermanfaat dalam menstimulasi pertumbuhan dan aktivitas satu atau sejumlah terbatas bakteri (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) dalam kolon (usus besar) secara selektif. Hal serupa juga dikemukakan oleh Gibson dan Robertfoid (1994) bahwa prebiotik merupakan generasi baru yang berfungsi sebagai bahan stimulan bagi *Bifidobacterium* yang terdapat dalam usus besar berupa oligosakarida dari hasil produksi berbagai macam substrat.

Suatu bahan tambahan makanan dapat diklasifikasikan sebagai prebiotik jika:

1. tidak terhidrolisa atau terserap pada jalur pencernaan makanan tanpa mengalami perubahan struktur dan tidak diekskresikan dalam tinja (Grizard dan Bartheimeuf, 1999),
2. diproduksi dari substrat tertentu yang dapat menstimulasi pertumbuhan satu atau sejumlah terbatas bakteri dalam saluran pencernaan,
3. dapat menekan jumlah bakteri patogen (*E. coli*, *Clostridium perfringens*) dan meningkatkan jumlah bakteri menguntungkan (Fuller, 1997).

Prebiotik yang didefinisikan sebagai makanan yang tidak dapat dicerna dan diserap dapat diperoleh dari

1. ASI dalam bentuk *human milk oligosaccharide* yang hanya <5% dicerna di dalam usus (Gnoth, 2000),
2. sayur buah dan produk alami lainnya, misalnya: onion, asparagus, chicory (mengandung inulin), pisang, artichoke, bawang puith dan bombay, susu sapi, madu, serealial (gandum dan biji-bijian) (Gibson, 1998 dan Kumiasih, 2001),
3. prebiotik buatan, yang umumnya disintesa dengan cara hidrolisis polisakarida alami dan sintesa secara enzimatik (Gizard dan Barthomeuf, 1999).

Prebiotik yang sering dipakai atau ditambahkan dalam bahan makanan adalah FOS (Frukto-Oligosakarida), GalOS (Galakto-Oligosakarida), lactulose, lactitol, serat makanan (inulin), yang kesemua jenis prebiotik tersebut merupakan oligosakarida (Collin, 1999 dan Macfarlane, 1999). Selain itu terdapat pula bahan lain yang memenuhi kriteria sebagai prebiotik, misalnya: xylose, soya, mannose dan beberapa peptida dari protein (Fuller, 1997 dan Gibson 1998).

Untuk memperoleh oligosakarida yang akan dipakai sebagai bahan prebiotik dapat dilakukan melalui cara sebagai berikut ini:

1. ekstraksi langsung polisakarida alami dari tumbuhan,
2. hidrolisis polisakarida alami,
3. sintesis enzimatik dengan menggunakan hydrolases dan atau glycosyl transferases, dimana kedua enzim tersebut akan mengkatalisis reaksi transglikosilasi sehingga terbentuk oligosakarida sintesis dari mono- dan disakarida (Grizard dan Barthomeuf, 1999). Beberapa prebiotik pada saat ini sedang disintesa secara enzimatik, seperti Galakto-Oligosakarida, Frukto-Oligosakarida, Isomalto-Oligosakarida, Gentio-Oligosakarida, Xilo-Oligosakarida, laktulosa dan laktosukrosa.

Selain untuk menumbuhkan probiotik atau bakteri bermanfaat dalam usus, prebiotik juga berguna untuk membunuh kuman-kuman yang tak perlu, memiliki penangkal penetralisir efek samping dari antibiotik, dan mencegah infeksi, sehingga sangat membantu fungsi pencernaan (Kumiasih, 2001). Prebiotik dalam usus terutama dalam usus besar yang difermentasi oleh bakteri probiotik akan menghasilkan *Short Chain Fatty Acid* (SCFA) dalam bentuk asetat, propionat, butyrat, L-lactate, karbondioksida dan hidrogen. SCFA tersebut

oleh tubuh dapat dipakai sebagai sumber energi, efek stimulasi selektif terhadap pertumbuhan bakteri probiotik terutama *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* akan memberikan efek yang menguntungkan bagi kesehatan, antara lain:

1. memperbaiki keluhan malabsorpsi laktosa,
2. meningkatkan ketahanan alami terhadap infeksi di usus oleh kuman patogen, *Clostridium perfringens*, *Escherchia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* (Grizard dan Barthomeuf, 1999),
3. supresi kanker
4. memperbaiki metabolisme lipida dan mengurangi kadar kolesterol dalam darah,
5. memperbaiki pencernaan (Fuller 1991),
6. stimulasi imunitas gastrointestinal (Macfarlane dan Cummings, 1999).

Broste (1999) menyatakan bahwa peluang pengembangan prebiotik lebih menjanjikan daripada probiotik. Hal ini ditandai dengan diluncurkannya produk berbasis prebiotik bermerk *Actilight* oleh perusahaan makanan Eropa, yaitu industri Meiji Beghin, dimana di dalam produknya terkandung fruktooligosakarida. Sedangkan dari Vivis di Prancis mengeluarkan produk berlabel *Ligne bifide* yang merupakan biskuit, sup dan makanan siap saji yang mengandung *Actilight*.

### 2.2.3 Synbiotik

Setelah pemunculan konsep probiotik dan prebiotik, kini dari keduanya dapat dikombinasikan dengan istilah *synbiotik*, Kombinasi tersebut berupa mikroba hidup yang ditambahkan substrat spesifik untuk pertumbuhan. Dari kombinasi tersebut dihasilkan adanya bakteri baru dan merangsang pertumbuhan bakteri itu sendiri. Prebiotik ini akan dihidrolisa oleh enzim yang dihasilkan oleh probiotik dan selanjutnya digunakan sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhannya.

Pemakaian *synbiotik* untuk mengatur mikroflora yang berada di dalam saluran pencernaan merupakan cara yang lebih baik daripada pemakaian prebiotik atau probiotik saja. *Synbiotik* dapat berupa campuran antara FOS dengan *Bifidobacterium* atau laktitol dengan *Lactobacillus*. Keuntungan dari kombinasi ini adalah meningkatkan daya tahan hidup bakteri probiotik oleh karena adanya substrat yang spesifik telah tersedia untuk fermentasi sehingga tubuh mendapat manfaat yang lebih sempurna (Collins dan Gibson, 1999).

Synbiotik pertama berupa yoghurt telah diproduksi oleh Swiss Tonilait, sebuah perusahaan di Swiss, yang terdiri dari campuran tiga strain probiotik dan prebiotik *Raffinose*. Di Prancis diluncurkan produk yoghurt LC1 yang berisi bakteri asam laktat (Suwasono *et al*, 2001).

## 2.3 Oligosakarida dan Galaktooligosakarida

### 2.3.1 Oligosakarida

Karbohidrat berasal dari pengertian atom karbon yang terhidrasi dengan rumus  $(CH_2O)_n$ . Karbohidrat tersusun sebagai polihidroksi keton atau polihidroksi aldehida atau zat yang jika dihidrolisa akan menghasilkan salah satu dari senyawa tersebut. Karbohidrat dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu: kelompok monosakarida, oligosakarida dan polisakarida (Girindra, 1993).

Oligosakarida terdiri dari 2 – 10 monosakarida yang tergabung dalam ikatan glikosidik yang segera dapat dihidrolisa secara enzimatik untuk menghasilkan monosakarida (Pazur, 1994; El Khadem, 1998). Klasifikasi oligosakarida dibagi menjadi dua, yaitu: Homo-Oligosakarida yang terdiri dari satu jenis monosakarida dan Hetero-Oligosakarida yang terdiri dari dua atau lebih monosakarida. Contoh oligosakarida yang memiliki dua residu monosakarida adalah sukrosa, laktosa, maltosa dan trehalosa, sedangkan yang memiliki tiga monosakarida adalah raffinosa, maltotriosa dan mannotriosa.

Oligosakarida memiliki peranan yang penting dalam kegiatan biologis, baik sebagai molekul bebas atau kompleks (glikoprotein dan glikolipida) (Dwek, 1996). Oligosakarida berperan dalam kesuburan (Lis dan Sharon, 1990; Zopf dan Roth, 1996).

Disakarida terbentuk dengan menggabungkan dua molekul monosakarida. Disakarida yang paling banyak dalam makanan adalah sukrosa, laktosa dan maltosa. Laktosa hanya terdapat dalam susu atau diproduksi dari susu, karenanya biasa disebut gula susu. Laktosa terdiri dari D-galaktosa dan D-glukosa yang berikatan melalui ikatan  $\beta$  (1,4)-glikosida. Laktosa bersifat tidak larut, lambat tercerna dan tidak cepat berpindah dari usus, sehingga bakteri-bakteri tertentu pembentuk asam organik lebih efisien dalam mengkonsumsinya (Stefferd, 1959).

Galaktosa merupakan jenis heksosa yang sangat penting dalam ilmu pangan, karena dia merupakan satu diantara dua molekul yang membentuk gula susu. Galaktosa diproduksi dalam yoghurt dengan adanya aktivitas bakteri dalam proses fermentasi (Bennion, 1980).

Senyawa ini dapat diekstrak dari ASI, feses bayi dan beberapa jenis tanaman (Bucke dan Rastall, 1990). Oligosakarida juga dapat dihasilkan dengan mendegradasi polisakarida sel mikroorganisme, namun jumlah oligosakarida yang didapat sangat kecil. Teknik yang sedang populer saat ini adalah melalui sintesa oligosakarida secara enzimatik dengan menerapkan reaksi hidrolisa terbalik (*reversed hydrolisis*).

Dalam bentuk yang belum terhidrolisa, oligosakarida tidak dapat dicerna oleh tubuh. Selain itu oligosakarida merupakan senyawa antinutrisi yang menyebabkan *flatulensi* atau penumpukan gas dalam perut. Sebagai contoh, oligosakarida yang disebut di atas seperti *raffinosa*, *stakiosa* dan *verbaskosa* terdapat pada kacang-kacangan dan umbi-umbian (Nuraida, 1996). Wasposito (2001) menambahkan bahwa oligosakarida lainnya, misalnya GalOS, FOS, inulin serta beberapa jenis peptida dari protein juga mempunyai fungsi yang sama, yaitu untuk menstimulasi pertumbuhan *bifidobakteri* dan bakteri asam laktat. Oligosakarida juga dapat menurunkan kadar kolesterol dalam serum dan tekanan darah. Penurunan kadar kolesterol diduga karena perubahan mikroflora usus, misalnya adanya dominasi bakteri *Lactobacillus* dapat mencegah absorpsi kolesterol dalam usus.

Oligosakarida yang masuk dalam saluran pencernaan akan difermentasi oleh bakteri probiotik membentuk asam organik (terutama asam asetat dan asam laktat dengan perbandingan 3:2). Dengan terbentuknya zat-zat asam ini dan senyawa antibakteri maka pertumbuhan bakteri patogen seperti *Salmonella* dan *E. coli* akan dihambat. *Bifidin*, suatu antibiotik yang dihasilkan oleh *Bifidobacterium bifidum* sangat efektif melawan *Shigella dysenteria*, *Salmonella typhosa*, *Staphylococcus aureus*, *E.coli* dan bakteri lainnya (Silalahi, 2001).

Silalahi (2001) menyatakan bahwa dengan konsumsi 3 – 6 gram oligosakarida per hari akan mengurangi metabolit toksis dan enzim-enzim merugikan sebanyak 44,6% dan 40,9% masing-masing selama tiga minggu. Pada Tabel 4 berikut terdapat beberapa jenis oligosakarida yang mampu meningkatkan *bifidobakteri* dan bakteri asam laktat.

**Tabel 4.** Oligosakarida, Disakarida, dan Poliol yang Dapat Meningkatkan *Bifidobakteri* dan Bakteri Asam Laktat dalam Saluran Pencernaan

Jenis Gula	Bakteri yang meningkat
Frukto-Oligosakarida	<i>Bifidobakteri</i>
Transgalaktosil Oligosakarida	<i>Bifidobakteri</i>
4'Galaktosil Laktosa	<i>Bifidobakteri</i>
Isomalto-Oligosakarida	<i>Bifidobakteri</i>
Galakto-Oligosakarida (Oligomat 50)	<i>Bifidobakteri</i>
Galaktosil-Oligosakarida	<i>Bifidobakteri</i>
Oligosakarida kedelai	<i>Bifidobakteri</i> , sebagian <i>Lactobacillus</i>
Xilo-Oligosakarida	<i>Bifidobakteri</i>
Palatinose	<i>Bifidobakteri</i>
Silitol	Bakteri asam laktat
Laktulosa	<i>Bifidobakteri</i> , bakteri asam laktat
Inulofruktosakarida	<i>Bifidobakteri</i>

Sumber: Nuraida (1996)

Hasil penelitian di Jepang menunjukkan bahwa dosis maksimum oligosakarida agar tidak menimbulkan diare dapat dilihat pada Tabel 5.

**Tabel 5.** Dosis Maksimum Oligosakarida yang Tidak Menimbulkan Diare

Jenis Sakarida	Dosis maksimum (g/kg berat badan/hari)	
	Pria	Wanita
Neosugar	0.3	0.4
4'Galaktosil-Sukrosa	0.6	0.6
4'Galakto-Oligosakarida	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

Sumber: Nuraida (1996)

### 2.3.2 Galakto-Oligosakrida

Galakto-Oligosakrida (GalOS) merupakan polimer dari 2 – 10 galaktosa yang tergabung oleh ikatan glikosidik. Senyawa ini merupakan pangan fungsional karena tidak dapat dicerna (*Non-Digestible Oligosaccharide/NDOs*) oleh organ-organ pencernaan, tetap langsung masuk ke usus besar dan terfermentasi oleh *Bifidobacterium* dan bakteri asam laktat (Nuraida, 1996).

Akan tetapi tidak semua oligosakarida (*Non-Digestible Oligosaccharides*) bersifat prebiotik, dan diantara NDO yang ada inulin, FOS dan GalOS merupakan prebiotik yang kuat (Macfarlane dan Cummings, 1999). Menurut mereka, FOS memiliki energi setara 6 kJ/g, dan konsumsi FOS 15 g/hari mampu meningkatkan jumlah *bifidobacteria* 10 kali lipat dan selanjutnya menurunkan *Clostridia* dan *Enterobacteria*. Sementara konsumsi GalOS 2,5 g; 5 g; atau 10 g oleh manusia juga mampu meningkatkan ekskresi bifidobacteria infekal.

Produksi gas merupakan efek samping dari konsumsi oligosakarida, dan penelitian Rastall (2000) menunjukkan bahwa nilai rata-rata gas yang diproduksi oleh *Bifidobacteria* selama 48 jam fermentasi dengan penambahan inulin dan FOS (17-18 ml) lebih besar daripada yang dihasilkan oleh GalOS dan IMOS (8-10 ml). Setiap prebiotik memiliki komposisi kimia yang berbeda (Tabel 6).

**Tabel 6.** Komposisi Kimia dan Karakteristik Prebiotik

Oligosakarida	Komposisi Kimia
Frukto-Oligosakarida (FOS)	95% Oligosakarida $\beta(2-1)$ Fructan; 60% Glukosa, Fruktosa <sub>(n)</sub> , 40% Fruktosa <sub>(n)</sub> dp 2-8, rata-rata 4-5
Inulin	> 99% Oligosakarida $\beta(2-1)$ Fructan; rata-rata dp 10-12
Galakto-Oligosakarida (GalOS)	Oligogalaktosa (85%), Glukosa, Galaktosa, dan Laktosa
Oligosakarida kedelai	Stakiosa (Fruktosa, Galaktosa, Glukosa) dan Raffinosa (Fruktosa, Galaktosa, Glukosa), dp 3-4
Xilo-Oligosakarida	$\beta(1-4)$ xilosa, kemurnian 70%, dp 2-4
Isomalto-Oligosakarida	Campuran oligomer Glukosa ikatan $\alpha(1-6)$ (Isomaltosa, Panosa, Isomaltotriosa)
Laktulosa	Galaktosa dan disakarida yang mengandung fruktosa

Sumber : Rastall (2000)

Hidrolisa laktosa dan sintesa GalOS terjadi secara simultan yang membuat mekanisme reaksi sangat kompleks. Konversi laktosa menjadi GalOS akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi laktosa dalam media, karena grup  $\beta$ -galaktosil mempunyai peluang tinggi untuk melekat kepada laktosa dan atau oligosakarida daripada ke air sebagai aseptor. Selain itu konversi oligosakarida lebih dari 30% terjadi dengan menggunakan konsentrasi laktosa lebih dari 1,11 mol/liter yang dikatalisa oleh  $\beta$ -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* selama 5 jam (Iwasaki et al., 1996). Penelitian dengan menggunakan enzim yang sama dengan waktu inkubasi selama 48 jam pada konsentrasi laktosa 2,2 mol/liter mampu menghasilkan GalOS antara 19.000 – 20.000 ppm (Suwasono et al., 2001).

Masalah yang ditimbulkan dengan penggunaan enzim  $\beta$ -galaktosidase adalah rendahnya regioselektivitas, sehingga banyak ikatan galaktosidik yang terbentuk. Baru - baru ini, penelitian menunjukkan bahwa enzim  $\beta$  (1,4)-galaktosidase dari *Bacillus circulans* dapat digunakan untuk sintesis GalOS dengan ikatan spesifik  $\beta$ (1,4)-galaktosidik. Sebaliknya enzim non-spesifik  $\beta$ -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* membentuk GalOS dengan ikatan yang bervariasi (Suwasono et al., 2001) seperti ditunjukkan pada Tabel 7.

**Tabel 7.** Perkiraan Struktur Homo-GalOS yang Diproduksi Menggunakan Enzim  $\beta$ -Galaktosidase dalam Bentuk Bebas

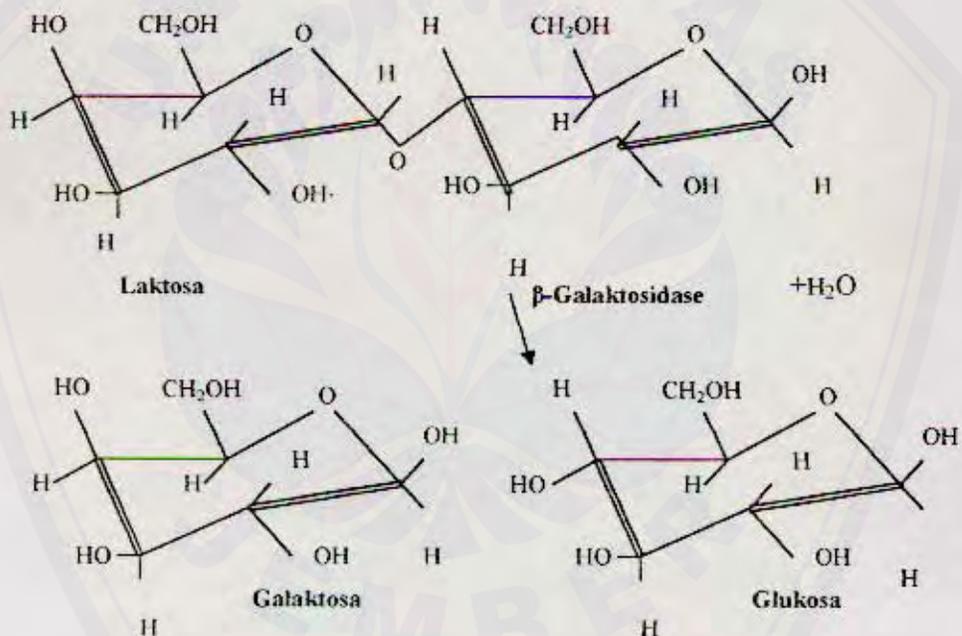
Asal Enzim	Substrat	Disakarida	Trisakarida
<i>Aspergillus oryzae</i>	Laktosa	Gal $\beta$ (1→4)gal	Gal $\beta$ (1→4)gal $\beta$ (1→3)gal
		Gal $\beta$ (1→4)glu	Gal $\beta$ (1→4)gal $\beta$ (1→4)glu
<i>Bacillus circulans</i>	Laktosa	Gal $\beta$ (1→4)gal	Gal $\beta$ (1→4)gal $\beta$ (1→4)gal
		Gal $\beta$ (1→4)glu	Gal $\beta$ (1→4)gal $\beta$ (1→4)glu
<i>Aspergillus oryzae</i>	Galaktosa	Gal $\beta$ (1→3)gal	Gal $\beta$ (1→4)gal $\beta$ (1→4)gal
		Gal $\beta$ (1→4)glu	Gal $\beta$ (1→4)gal $\beta$ (1→4)glu
		Gal $\beta$ (1→6)gal	
<i>Bacillus circulans</i>	Galaktosa	Gal $\beta$ (1→4)gal	Gal $\beta$ (1→4)gal $\beta$ (1→4)gal
		Gal $\beta$ (1→6)gal	

Sumber: Suwasono et al. (2001)

## 2.4 Produksi Galakto-Oligosakarida Menggunakan Enzim $\beta$ -Galaktosidase

### 2.4.1 Substrat yang Dibutuhkan

Galaktosa merupakan gula sederhana atau monosakarida yang dapat dipakai sebagai substrat dalam reaksi enzimatik menggunakan enzim  $\beta$ -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae*. Pemakaian substrat galaktosa didasari dari keinginan untuk memproduksi senyawa Galakto-Oligosakarida dan hidrolisa laktosa dalam produksi Galakto-Oligosakarida menjadi dua, yaitu glukosa dan galaktosa (Rastall, 1999). Ditambahkan oleh Kristanti (1998) bahwa laktosa tidak terhidrolisa oleh panas dan hanya terhidrolisa oleh enzim  $\beta$ -galaktosidase. Selain itu laktosa mempunyai sifat tidak mudah tercerna (Fieser dan Mary, 1962). Sedangkan proses hidrolisa laktosa dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hidrolisa Laktosa (Roberts, dkk, 1995)

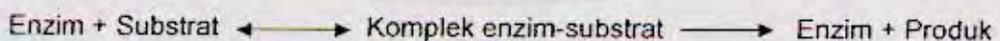
#### 2.4.2 Enzim $\beta$ -Galaktosidase

Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai biokatalisator yang dihasilkan oleh sel. Secara umum enzim dapat dihasilkan oleh beberapa macam bakteri, jamur, sel tanaman dan hewan. Sebagai biokatalisator, enzim mampu mempercepat reaksi tetapi tidak ikut beraksi (Winamo, 1986).

Enzim adalah alat molekuler yang luar biasa, yang menentukan corak perubahan kimia dalam sel. Sifat enzim yang paling mencolok adalah daya katalik dan sifat spesifitas. Dengan bobot molekul 1500 sampai lebih dari satu juta, enzim mampu meningkatkan kecepatan reaksi minimal sejuta kali (Styrer, 1996). Sedangkan sifat spesifitas enzim adalah sifat enzim yang hanya bereaksi dengan suatu bahan atau kelompok bahan tertentu. Tetapi beberapa enzim lain bersifat hampir absolut spesifik untuk satu substrat saja (Jodoamidjojo, 1999). Di dalam mengkatalisa suatu reaksi, enzim tidak mengalami perubahan dan jarang sekali terjadi reaksi sampingan yang menghasilkan hasil sampingan yang tidak berguna.

Penggunaan enzim sebagai katalis untuk sintesa komponen organik telah dikembangkan beberapa tahun ini. Aplikasi teknik ini telah digunakan untuk sintesa oligosakarida menggunakan glikotransferase (E.C.2.4) atau glikosidase (E.C.3.2). Sintesa oligosakarida dapat dilakukan dengan metode reaksi kesetimbangan (ekuilibrium) dan reaksi kinetika (Monsan dan Paul, 1995).

Pada reaksi enzimatik, enzim bekerja menaikkan kecepatan reaksi dengan menurunkan energi aktivasi. Energi aktivasi merupakan energi yang dibutuhkan untuk mencapai konfigurasi aktif. Sesuai dengan mekanisme reaksi enzimatik, bahwa sebelum terbentuk produk selalu dibentuk terlebih dahulu senyawa kompleks antara enzim dengan substrat atau sering disebut dengan kompleks enzim-substrat. Secara umum reaksi antara substrat dengan enzim dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Reaksi Enzim dan Substrat oleh Page (1997)

Laktase ( $\beta$ -galaktosidase, E.C.3.2.1.23) merupakan enzim yang digunakan untuk memecah laktosa yang terkandung dalam air susu. Enzim ini dapat memutus ikatan  $\beta$ -galaktosidic antara dua molekul monosakarida yang membentuk laktosa, yaitu galaktosa dan glukosa (Eskin, 1990). Terputusnya ikatan tersebut merubah sifat laktosa menjadi gula yang mudah larut, tidak mudah mengkristal dan rasanya lebih manis.

Selain sebagai enzim hidrolase,  $\beta$ -galaktosidase mampu menguraikan dua macam substrat, yaitu laktosa dan *o*-nitrofenil- $\beta$ -galaktosida (ONPG) yang menghasilkan *khromogen-o*-nitrofenol. Enzim ini dapat diperoleh dari buah-buahan (peach, apel), bakteri (*E.coli*), jamur (*Aspergillus oryzae*) dan pada binatang terutama pada saluran pencernaannya. Dalam penggunaannya, enzim yang diperoleh dari tanaman jarang digunakan, yang lebih sering dari bakteri *E.coli* dan jamur *Aspergillus niger*. Enzim  $\beta$ -galaktosidase yang berasal dari jamur biasanya digunakan pada suhu tinggi dan pH rendah (Winarno, 1986).

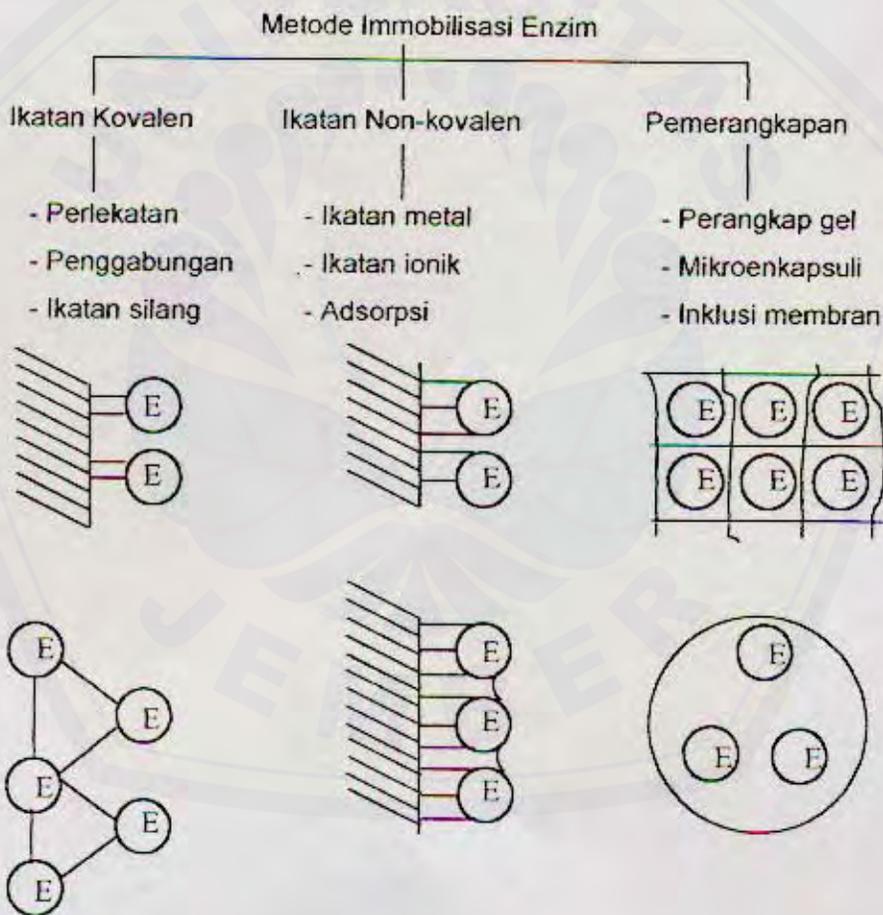
#### 2.4.3 Immobilisasi Enzim $\beta$ -Galaktosidase

Enzim  $\beta$ -galaktosidase dapat diimmobilisasi dengan beberapa metode, yaitu metode ikatan kovalen, ikatan non-kovalen dan pemerangkapan. Metode ini sering didasarkan pada jenis ikatan yang terbentuk antara enzim dengan bahan pembawa (*carrier*) yang digunakan seperti ditunjukkan pada Gambar 3 (Drauz dan Waldman, 1995).

Pada ikatan kovalen dengan ikatan kimia yang kuat, enzim dapat diikat kepada bahan spesifik yang tidak larut air, dapat dilekatkan secara kimia pada rantai polimer atau dapat digabungkan pada jaringan polimerik tak larut. Enzim dapat juga diikat dengan ikatan silang menggunakan senyawa kimia bifungsional.

Pada ikatan non-kovalen, enzim dapat diikat pada berbagai jenis bahan melalui pengkelatan dengan logam (ikatan logam), interaksi elektrostatis (ikatan ionik) atau ikatan hidrogen (adsorpsi). Sedangkan pada pemerangkapan secara fisik, enzim diperangkap ke dalam gel (*entrapment*), mikroenkapsuli atau membran.

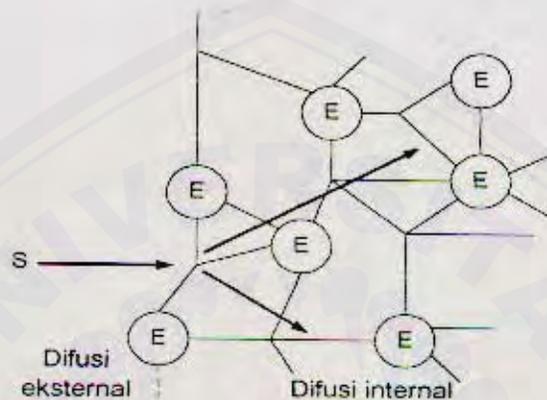
Immobilisasi enzim dengan metode pemerangkapan fisik, yaitu enzim diperangkap dalam suatu polimer, gel, mikro kapsul atau dengan alat seperti membran (*membrane inclusion*). Pada metode ini tidak terjadi ikatan kimia, sehingga enzim masih mempunyai kemampuan untuk bereaksi dengan substrat dalam bentuk terlarut dan bebas bergerak dalam batasan perangkap karena tidak terjadi modifikasi molekul enzim (Drauz dan Waldmann, 1995). Judoamidjojo (1990) menambahkan bahwa matriks pemerangkap dapat menggunakan poliakrilamida yang dibuat dari akrilamida yang diikat silang oleh senyawa N,N-metilen bis. Selain itu juga digunakan pati dan silikat (karet silikon) yang berbentuk gel.



Gambar 3. Metode Immobilisasi Enzim

Bila suatu enzim terimobilisasi dalam suatu membran, substrat akan berdifusi dalam dua tahap (Gambar 4), yaitu:

1. substrat terdifusi secara molekuler dan konsektif dengan larutan yang terdapat pada permukaan luar membran,
2. substrat akan terdifusi ke dalam membran untuk bereaksi dengan sisi katalik.



Gambar 4. Difusi eksternal dan internal substrat pada sistem amobil (Engasser dan Hovarth, 1976)

Enzim  $\beta$ -galaktosidase asal *Bacillus circulans* telah diimmobilisasi pada Duolite ES-762, Dowek MWA-1 dan alumina cara adsorpsi dan diikat silang dengan glutaraldehide (Nakanishi et al., 1983). Invertase dan amiloglukosidase dapat diperangkap dalam membran *polyvinyl alcohol* (Uhlich et al., 1996). Beberapa bahan seperti *supports* selulosa PEI,  $\alpha$ -alumina,  $\gamma$ -alumina dan chitosan telah digunakan untuk immobolisasi  $\beta$ -glukosidase (Martino et al., 1996). Reaksi grup tiol enzim dengan  $\beta$ -galaktosidase dari *Escherichia coli*. Penurunan aktivitas enzim juga terjadi pada enzim  $\alpha$ -mannosidase yang diimmobilisasi pada keramik, DE-52 dan alginat. Dari ketiga metode tersebut menghasilkan *yield* sebesar 71,6% ; 74,4% dan 77,7%. Kehilangan aktivitas enzim tertinggi terdapat pada metode ikatan silang dengan glutaraldehyda, diikuti oleh DE-52 dan alginat (Suwasono dan Rastall, 1998).

Hampir semua metode immobilisasi enzim telah digunakan untuk reaksi hidrolisa. Hanya sedikit enzim amobil yang digunakan untuk reaksi sintesa oligosakarida. Berger et al. (1995) berhasil mengikat silang  $\beta$ -galaktosidase dari *Thermus aquaticus* dengan glutaraldehid dan bovine serum albumin dalam agarose untuk sintesa Galakto-Oligosakarida dengan laktosa sebagai substrat, trisakarida dan tetrasakarida yang didapat sekitar 30% dan 3%. Ajisaka dan Fujimoto (1989) menemukan bahwa bahwa *Raffinosa* adalah produk tunggal yang dihasilkan oleh  $\alpha$ -galaktosidase dari *M.vinacea* yang diimmobilisasi pada Eupergit-C, sementara dua isomer (*raffinosa* dan *planteosa*) dihasilkan dengan menggunakan enzim bebas. Produk oligosakarida dengan ikatan yang berbeda dihasilkan ketika  $\alpha$ -1,2-mannosidase diimmobilisasi dengan metode yang berbeda (Suwasono dan Rastall, 2000).

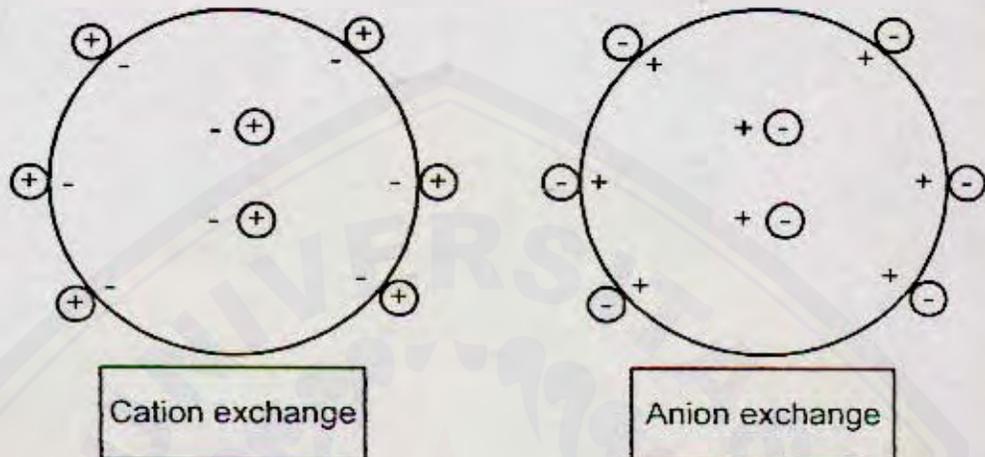
Secara teoritis, enzim akan menunjukkan sifat katalitiknya dengan baik pada bentuknya yang alami. Konformasi molekul enzim dalam larutan ditentukan oleh jaringan dari ikatan hidrogen, elektrostatik dan interaksi hidrofobik. Kombinasi interaksi tadi dalam kerangka hidrasi yang sesuai menjamin enzim alami. Rusaknya kerangka diakibatkan immobilisasi dan senyawa kimia bifungsional (glutaraldehid) pada enzim, sehingga enzim kehilangan sifat katalitiknya dan spesifitasnya (El-Sayed and Laszlo, 1994).

#### 2.4.3.1 DEAE Cellulose

DEAE-Cellulose (Diethylaminoethyl Cellulose) merupakan senyawa penukar lemah yang terdiri dari matriks yang tidak larut (Cellulosa) yang tergabung secara kovalen. DEAE-Cellulose tersusun dari amina tersier, dimana pada pH netral akan bermuatan positif. Oleh karena itu senyawa ini disebut dengan *anion exchanger*. Berbeda dengan CM-Cellulose yang tersusun dari gugus  $-\text{CH}_2\text{OH}$  pada karbohidrat yang telah dikonversi menjadi  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{COOH}$  dan akan membentuk muatan negatif pada pH netral (Anonim, 2003a).

DEAE-Cellulose akan berikatan dengan protein enzim yang memiliki muatan negatif melalui interaksi muatan yang berlawanan (Murray et al., 1997). Sebelum digunakan baik CM-Cellulose dan DEAE-Cellulose berada dalam keadaan tidak bermuatan karena berikatan dengan senyawa yang disebut dengan *counterions*, dimana untuk CM-Cellulose biasanya digunakan  $\text{Na}^+$  dan

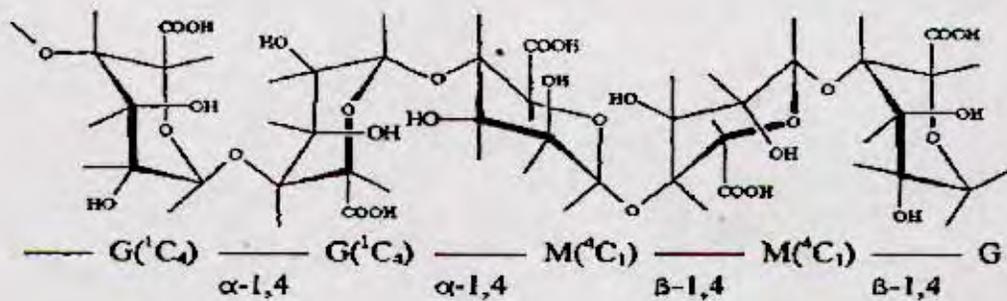
untuk DEAE-Cellulose adalah  $\text{Cl}^-$  (Gambar 5). Pada pH netral kedua *counterions* akan lepas sehingga keduanya akan memiliki muatan (Anonim, 2003a).



Gambar 5. *Cation* dan *anion exchange* yang berikatan dengan *counterions*

#### 2.4.3.2 Natrium Alginat

Natrium alginat (*Sodium acid* atau *Alginic acid*) adalah koloid polisakarida yang bersifat hidrofilik yang terjadi secara alami, diperoleh dari beberapa jenis rumput laut coklat (*Phaeophyceae*). Natrium alginat  $(\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_6)_n$  merupakan copolimer linier yang terdiri dari residu  $\beta$ -1,4-D-asam manuronik dan  $\alpha$ -1,4-L-asam glukuronik. Adapun struktur molekul natrium alginat dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Struktur molekul Natrium alginat oleh Philips, Wedlock dan Williams (1990) dalam Anonim (1997)

Secara teori natrium alginat mempunyai berat molekul untuk setiap unit sebesar 176,13 dan kenyataannya sebesar 200 serta untuk makromolekul sebesar 10.000 - 600.000. Dalam keadaan kering mempunyai kandungan 20 - 23%  $CO_2$  dan 91 - 104,5% asam alginat. Berdasarkan fungsinya senyawa ini dapat digunakan sebagai stabiliser, pembentuk gel, *thickener* dan *emulsifier*. Natrium alginat tidak dapat larut pada air dan senyawa organik, namun akan pecah secara perlahan-lahan dalam larutan sodium karbonat, sodium hidroksida dan trisodium phospat (Anonim, 1997).

#### 2.4.3.3 Keramik (*China Clay*)

*Clay* adalah material yang tersusun dari mineral kaolin yang terbentuk dari granit yang berubah melalui proses metamorfosis hydrothermal. Secara kimia adalah hydrous aluminium silica yang tercampuri kalium, sodium, kapur, Mg dan Fe dalam jumlah kecil. Bahan ini digunakan untuk bahan porselin, keramik dan barang tembikar lainnya karena mempunyai struktur yang baik dan akan berwarna putih ketika dibakar.

Porselin dibentuk dari kaolin dan *feldspar* dengan menggunakan suhu yang sangat tinggi. Porselin bersifat keras, putih, permanen, tidak berlubang dan tidak bersuara ketika proses pembentukan. *Feldspar* mempunyai komposisi kimia silica, aluminium, sodium, potassium dan besi/kalsium/barium/gabungan ketiga elemen ini. *Feldspar* adalah sejenis logam yang transparan dalam keadaan murni tetapi kebanyakan ditemukan dalam keadaan buram dalam berbagai warna.

Sedangkan keramik dibuat dari mineral non-logam yang dikeraskan dengan proses suhu tinggi. Keramik bersifat tahan terhadap panas, bahan kimia dan bukan penghantar listrik dan panas. Keramik tradisional dibuat dari tanah liat dan material alami dan keramik modern dibuat dari bahan karbit-silika, aluminium dan atau bahan sintetik lainnya (Anonim, 2003b).

## 2.5 Produksi Galakto-Oligosakarida

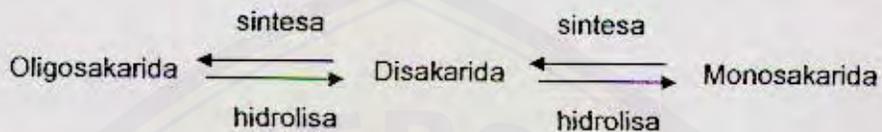
Usaha untuk memproduksi oligosakarida diawali oleh adanya ide untuk mensuplai sumber karbon terfermentasi bagi *Bifidobacterium* dan bakteri asam laktat dalam saluran pencernaan. Industri yang sedang berkembang di Jepang mengawali untuk memproduksi oligosakarida sebagai pangan fungsional dengan menggunakan enzim sebagai katalisator, yaitu *glikosil transferase* (E.C. 2.4) atau *glikosidase* (E.C.3.2) yang dilakukan dengan menggunakan reaksi kesetimbangan (*ekuilibrium*) dan reaksi kinetika. Adapun jenis dan jumlah prebiotik yang diproduksi waktu itu ditunjukkan pada Tabel 8 (Rastall, 2000).

Tabel 8. Beberapa Prebiotik Oligosakarida yang Diproduksi di Jepang Tahun 1995.

Oligosakarida	Produksi (ton)
Laktulosa	20.000
Galakto-Oligosakarida	15.000
Frukto-Oligosakarida	12.000
Isomalto-Oligosakarida	11.000
Palatinose	5.000
Oligosakarida kedelai	2.000
Laktosukrosa	1.600
Gentio-Oligosakarida	400
Xilo-Oligosakarida	300

Sumber : Rastall (2000)

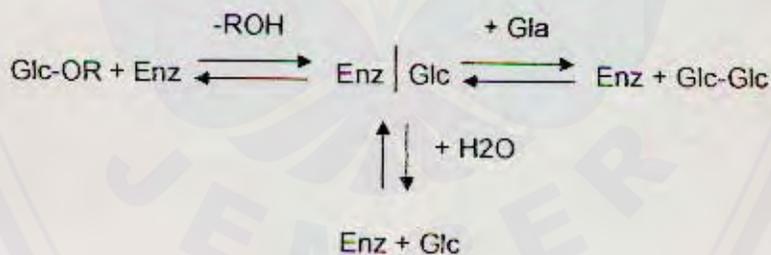
Pada reaksi kesetimbangan ini hanya membutuhkan sebuah enzim dan monosakarida. Mekanismenya, enzim akan mengkatalisa ikatan langsung dari unit-unit monosakarida untuk membentuk oligosakarida. Reaksi ini dikenal dengan glikosilasi langsung (*direct glycosylation*) atau hidrolisa terbalik (*reverse hydrolysis*) (Monsan dan Paul, 1995). Reaksi tersebut dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Skema Reaksi Hidrolisa dan Sintesa

Sedangkan reaksi kinetika yang dikenal dengan transglikosidasi adalah hidrolisa substrat donor untuk menghasilkan produk antara dan dilanjutkan dengan reaksi antara aseptor dan produk antara yang terbentuk untuk menghasilkan oligosakarida (Monsan dan Paul, 1995).

Secara skematis reaksi kinetika (Ichikawa, 1992) dapat dilihat pada Gambar 8.



Glc-OR = glikosil donor ; Gla = glikosil aseptor; Glc = glikosil  
 Glc-Glc = disakarida ; Enz = enzim

Gambar 8. Skema Reaksi Sintesa Secara Kinetika

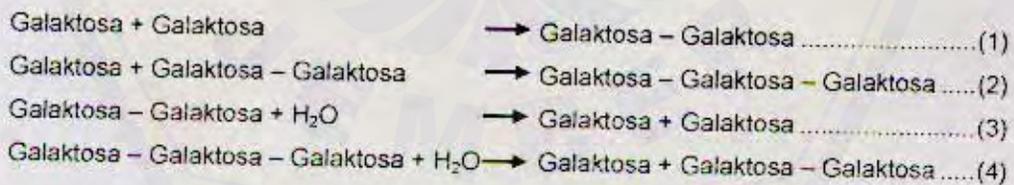
Reaksi sintesa enzimatik yang dilakukan oleh enzim  $\beta$ -galaktosidase menghasilkan sejumlah variabel penting dan beberapa tipe oligosakarida selama masa hidrolisis laktosa. Semua ini tergantung pada banyak faktor, namun beberapa faktor yang penting adalah sebagai berikut (Larsson *et al.*, 1972) :

1. sumber enzim,
2. sifat dan konsentrasi substrat
3. tipe pemrosesan enzim,
4. garam, temperatur, pH dan
5. tingkat konversi laktosa

Secara umum produksi oligosakarida dapat meningkat pada konsentrasi monosakarida yang tinggi dan dapat dicapai dengan menurunkan aktivitas air (Suwasono dan Rastall, 1996). Agar aktivitas enzim meningkat maka suhu reaksi yang digunakan adalah  $40^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C}$ . Pada suhu ini enzim pada konsentrasi gula tinggi akan tetap stabil dan tidak terjadi denaturasi (Nakano *et al.*, 1995).

Giec, dkk (1981) melaporkan bahwa penggunaan  $\beta$ -galaktosidase dari jamur bisa mengarah pada pembentukan sejumlah besar oligosakarida yang berbeda. Prenosil (1984) dengan menggunakan  $\beta$ -galaktosidase dari sumber yeast dan jamur yang bervariasi telah menemukan bahwa enzim yang berasal dari *Aspergillus oryzae* menghasilkan konsentrasi oligosakarida paling tinggi.

Ada beberapa kemungkinan yang bisa terjadi dari reaksi sintesa Galakto-Oligosakarida (GalOS) menggunakan substrat galaktosa, seperti yang terlihat pada Gambar 9.



**Gambar 9.** Estimasi Pembentukan Galakto-Oligosakarida Bentuk Disakarida Dan Trisakarida

## 2.6 Fluidized Bed Reactor (FBR)

*Fluidized Bed reactor* (FBR) merupakan kombinasi dua macam alat, yaitu *packed bed* dan *stirred tank* yang digunakan untuk reaksi yang bersifat kontinyu. Sistem ini cocok untuk sel-sel yang teramobil atau sel-sel yang dipasangkan dengan partikel-partikel solid (mikrokarier atau bahan-bahan *inert*). Penggunaan mikrokarier cocok untuk perkembangan dan metabolisme sel-sel mamalia yang bersifat mengambang (*dependen-anchorage*), sedangkan bahan-bahan inert cocok untuk proses *fluidized bed anaerobik* dengan kecepatan tinggi (Anonim, 1992). FBR sangat penting dalam perancangan peralatan untuk analisa kimia karena dengan penyebaran atau perpindahan panas dan massa yang sempurna. Sehubungan dengan hal tersebut, FBR cocok digunakan untuk reaksi eksotermik karena tidak terjadi pemanasan setempat (Patrik, 1997).

Menurut Werther dan Hartge (2003), keuntungan dari penggunaan FBR adalah sebagai berikut:

1. memudahkan reaksi antara senyawa berbentuk gas dan padat,
2. tidak terjadi pemanasan setempat pada reaksi eksotermal tinggi,
3. perpindahan panas dari udara ke partikel dan dari ruang untuk partikel ke dinding yang sempurna, dan
4. pengontrolan atau penanganan padatan yang mudah.

Sedangkan kerugian pemakaian FBR adalah:

1. terjadi erosi pada bagian dalam FBR dan kerusakan akibat gesekan partikel katalisator,
2. waktu distribusi yang lama untuk senyawa gas yang membentuk gelembung dan padatan dalam pencampuran, dan
3. sulit untuk melakukan perubahan skala FBR, karena perbedaan skala dapat menyebabkan perubahan hasil reaksi.

Aplikasi pemakaian FBR dalam suatu proses membutuhkan satu atau lebih pompa untuk mensirkulasi substrat dan partikel yang digunakan harus bersifat tahan terhadap gesekan serta tidak mengelompok. Hasil reaksi dapat diperoleh setiap saat tanpa harus memisahkan katalisator. Partikel yang digunakan sebaiknya berukuran 20 – 100  $\mu$  dengan distribusi yang sangat sempit dan berbentuk seperti bola (Page, 1987).

## 2.7 HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

HPLC adalah suatu alat yang digunakan untuk analisa yang didasari oleh aplikasi dari teori dan peralatan *Liquid Chromatography* (LC) yang dikembangkan untuk *Gas Chromatography* (GC). HPLC dapat bekerja atas dasar kromatografi yang sangat luas, yaitu adsorpsi, partisi, penukar ion, saringan molekul dan afinitas. Pemisahan komponen sampel terjadi dalam kolom karena adanya interaksi antara komponen sampel dengan fase diam dan fase Bergeraknya. Komponen yang terpisah dideteksi setelah keluar dari kolom melalui alat detektor dan hasilnya berupa puncak-puncak (*peak*) pada kertas pencatat (Sudamadji, 1996).

Kolom terbuat dari baja tahan karat (*Steinlessteel*) (Cr – Ni – Mo steel) dengan diameter luar 6,35 mm ( $\frac{1}{4}$  inc), diameter dalam 4,6 mm dan panjang sampai 25 cm. Selain itu juga digunakan kaca, tabung baja berlapis kaca, polyethene dan plastik kaku lainnya. Produk yang dihasilkan oleh industri saat ini pada umumnya memiliki ukuran sebagai berikut:

1. panjang: 10; 12,5; 15 cm
2. diameter internal: 3; 4,6; 9; mm
3. ukuran partikel: 10; 5; 4; 3  $\mu$ m

Adapun bagian-bagian dari kolom adalah sebagai berikut (Lindsay, 1992):

1. distributor: untuk mendistribusikan atau menyebarkan sampel ke dalam kolom,
2. *gauze* atau *frit*: penyekat antara distributor dengan *ferrule* yang terletak pada bagian atas dan pangkal kolom,
3. *fitting*: penyambung yang terdapat pada kedua ujung , memiliki dua jenis: ZDV (*Zero Dead Volume*) yang jarang digunakan karena pada daerah sambungan menyebabkan hilangnya efisiensi dan LDV (*Low Dead Volume*),
4. *Ferrule*: untuk mempertemukan *frit* dengan kolom.

Bentuk partikel isi kolom dapat dibedakan menjadi tiga kelompok, yaitu:

1. pendukung berpori kecil (*microporous*), pori-pori saling berhubungan dalam partikel antara 5 – 10  $\mu$ m (diameternya),
2. pori di permukaan (*pellicular*), partikel berpori dilapiskan pada inti padat tak berpori, seperti butir kaca sehingga ukurannya sekitar 40 $\mu$ m (diameternya),

3. fase berikatan (*bonded phase*), beberapa jenis absorben, misalnya silika atau aluminium dapat diperoleh sebagai *microporopous* atau *pellicular* dalam berbagai ukuran partikel.

Kolom dikemas dengan pelapisan yang ditentukan oleh fluoro karbon, karbon, aluminium dan senyawa polimerik. Sebagian besar kolom dikemas dengan menggunakan mikropartikel silika yang berbentuk seperti bola (*spherical*) atau tak beraturan dengan diameter 3, 5, 10  $\mu$ . Pada silika mengandung gugus silanol (Si – OH), yang telah dimodifikasi secara kimiawi, terdapat pada permukaan silika. Penambahan asam akan menghasilkan gugus silanol reaktif, pemindahan logam kontaminan dan perbaikan pori-pori material. Gugus polar pada permukaan silika dapat diubah dengan gugus fungsional lainnya, seperti:

1. non polar : C – 18, phenyl, C – 8,
2. polar : -NH<sub>2</sub>, -CN,
3. ion : asam sulfonik, amonium kuartener.

Ikatan amina (-NH<sub>2</sub>) digunakan untuk pemisahan karbohidrat dan juga sebagai penukar ion lemah (Lindsay, 1992).

### 2.8 Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri Gram-positif yang dikelompokkan berdasarkan kesamaan karakteristik morfologi, metabolisme dan fisiologi. Deskripsi secara umum bakteri yang termasuk kelompok ini adalah Gram-positif, tidak berspora, berbentuk bulat atau batang, anaerob tapi aerotoleran, toleran terhadap asam, memetabolisme karbohidrat secara fermentatif, yang memproduksi asam laktat sebagai produk akhir yang utama selama fermentasi karbohidrat. *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* dan *Streptococcus* termasuk ke dalam kelompok ini. Dalam taksonomi yang diperbarui, bakteri asam laktat terdiri dari : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Camobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatela*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Laktosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* dan *Weisella*. Beberapa penulis memasukkan *Bifidobacterium spp* ke dalam bakteri asam laktat karena kesamaan ekologi dan fungsi (Axelsson, 1988).

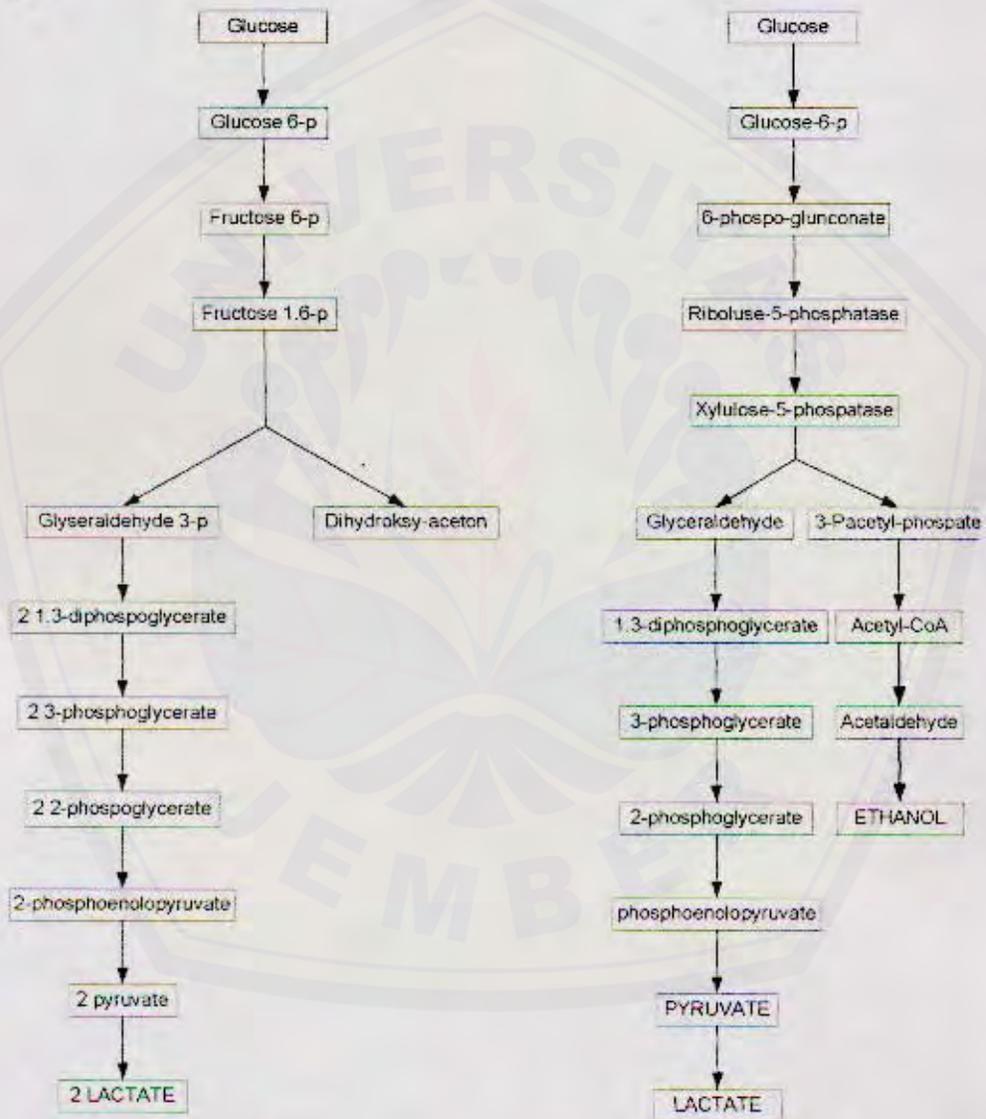
Ciri khas bakteri asam laktat adalah kebutuhannya akan zat-zat suplemen. Tidak ada satupun anggotanya dapat hidup pada media mineral murni dengan glukosa dan ammonium. Sebagian besar membutuhkan sederet vitamin (lactoflavin, tiamina, asam pantotenat, asam nikotinat, asam folat, biotin) dan asam-asam amino, senyawa purin dan pirimidin. Dengan demikian bakteri ini dibiakkan terutama pada media kompleks yang mengandung ekstrak ragi, sari tomat, air dadih bahkan darah dalam jumlah relative besar (Schlegel, 1994).

Bakteri asam laktat memiliki dua ekologi sebagai habitatnya : di selaput membran manusia dan binatang dan produk susu. Beberapa spesies bakteri asam laktat digunakan secara komersial untuk produk susu fermentasi dan produk daging dan makanan lainnya. Yang termasuk produk ini yoghurt, buttermilk, salami, salami tipe sosis dan pikle (Salminen, 1998). Karakteristik penting bakteri ini digunakan dalam produk pangan karena kemampuannya memfermentasi gula menjadi asam laktat (Frazier dan Westhoff, 1988). Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang tahan asam (asidofil), dapat tumbuh baik pada pH yang rendah yaitu 3.0 – 6.0 (Buckle, dkk, 1987).

Karakter penting yang digunakan dalam klasifikasi kelompok bakteri asam laktat adalah cara fermentasi glukosa di bawah kondisi normal yaitu konsentrasi glukosa yang tidak dibatasi dan faktor-faktor pertumbuhan (asam amino, vitamin dan prekursor asam nukleat) dan persediaan oksigen yang terbatas. Pada kondisi ini bakteri asam laktat dapat dibagi ke dalam dua kelompok : homofermentatif, mengkonversi hampir seluruh glukosa menjadi asam laktat dan heterofermentatif, memfermentasi glukosa menjadi asam laktat, etanol/asam asetat dan CO<sub>2</sub> (Axelsson, 1998).

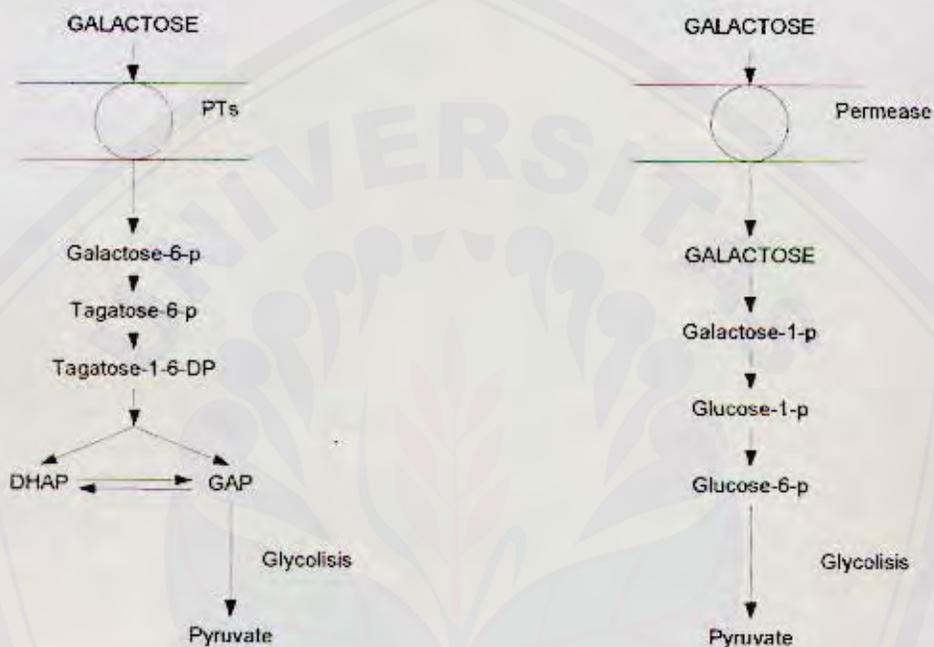
Bakteri asam laktat digunakan sebagai probiotik untuk mengatasi gangguan usus seperti intoleran laktosa, radang lambung akut dan pathogen lainnya, efek merugikan dari radioterapi, konstipasi, radang usus besar dan alergi makanan (Axelsson, 1998). Beberapa spesies bakteri probiotik, diantaranya *Bifidobacteria ssp.*, *Lactobacillus acidophillus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus termophilus*, *Streptococcus lactis* dan *Saccharomyces boulardii*. Hanya saja komposisi bakteri probiotik ini berbeda menurut usia. *Bifidobacteria* misalnya lebih dominan pada anak-anak, sedang *Lactobacillus* lebih dominan pada orang dewasa.

Metabolisme pokok dari bakteri asam laktat adalah kemampuannya untuk memfermentasi karbohidrat. Jalur fermentasi gula bakteri asam laktat dapat dibedakan menjadi dua. Jalur glikolisis (Embden – Meyerhoff Pathway) menghasilkan asam laktat (*homolactifermantasi/homofementatif*). Jalur 6-fosfoglukonat/fosfoketolase menghasilkan etanol, asetat, CO<sub>2</sub> dan asam laktat (*heterolatic fermentasi/heterofementatif*) seperti pada Gambar 10.



Gambar 10. Jalur Fermentasi glukosa (A) Homofermentatif (Glikolisis, Jalur Embden Meyerhoff); (B) Heterofermentatif (6-fosfoglukonat/fosfoketolase)

Monosakarida selain glukosa, seperti manosa, galaktosa dan fruktosa yang difermentasi oleh bakteri asam laktat masuk jalur metabolisme pada glukosa-6-fosfat atau fruktosa-6-fosfat setelah isomerisasi dan atau fosforilasi. Galaktosa-6-fosfat dapat menggunakan jalur tagatose-6-fosfat atau jalur Leloir (Gambar 11). Sedang disakarida akan dihidrolisa terlebih dahulu menjadi monosakarida, baru kemudian memasuki jalur metabolisme (Axelsson, 1998)



Gambar 11. Metabolisme Galaktosa pada Bakteri Asam Laktat (A) Jalur tagatose-6-p-fosfat (B) Jalur Leloir

Beberapa genus anggota bakteri asam laktat banyak digunakan dalam produk pangan, termasuk sebagai probiotik karena kemampuannya untuk memfermentasi gula menjadi asam laktat. Spesies-spesies dari kelompok *Lactobacillus* yang paling banyak digunakan.

Menurut Frazier dan Westhoff (1988), genus *Lactobacillus* berupa batang, biasanya panjang atau ramping, *microaerophilic* (beberapa anaerob), katalase negatif dan gram positif dan memfermentasi gula menjadi asam laktat sebagai hasil utamanya. Berdasarkan hasil metabolismenya bakteri ini dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu :

## 1. homofermentatif

- a. homofermentatif dengan temperatur optimal adalah *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus termophilus* dan *Lactobacillus delbrueckii*.
- b. Homofermentatif yang hidup baik pada temperatur tinggi adalah *Lactobacillus fermentum*.
- c. Homofermentatif yang memiliki temperatur optimal rendah adalah *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus leichmanii*.

Bakteri homofermentatif ini dapat tumbuh pada suhu 37°C atau lebih (Fardiaz, 1992)

## 2. Heterofermentatif

Yang termasuk heterofermentatif adalah *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pastorianus*, *Lactobacillus hilgardii* dan *Lactobacillus trichodes*.

Dasar fisiologis pengelompokan adalah ada atau tidak adanya enzim kunci metabolisme gula homofermentatif dan heterofermentatif, fruktosa-1.6-difosfat aldolase dan fosfoketolase (Kandler, 1983,1984; Kandler dan Weiss, 1986) seperti tertera pada Tabel 9.

 Tabel 9. Susunan Genus *Lactobacillus*

Karakter	Kelompok 1	Kelompok II	Kelompok III
	Homofermentatif	Heterofermentatif	Heterofermentatif
	Obligat	Fakultatif	Obligat
Fermentasi	-	+	+
Pentosa	-	-	+
CO <sub>2</sub> dari	-	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>
Glukosa	+	+	-
CO <sub>2</sub> dari	-	+ <sup>b</sup>	+
Glukonat	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>
FDP aldolase	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. buchneri</i>
Fosfoketolase	<i>L. helveticus</i> <i>L. salivarius</i>	<i>L. plantarum</i> <i>L. sake</i>	<i>L. fermentum</i> <i>L. reuteri</i>

<sup>a</sup>Saat difermentasi

<sup>b</sup>induksi oleh pentosa

Sumber : Kandler dan Weiss (1986) dalam Salminen (1998).

Beberapa spesies *Lactobacillus* yang memiliki manfaat menguntungkan bagi kesehatan dan banyak digunakan dalam produk pangan :

- a. *Lactobacillus acidophilus*, hidup dalam usus kecil dan memproduksi enzim yang memecah gula susu menjadi asam laktat. Bakteri ini dapat mati karena makanan rendah gizi, stres dan antibiotik. Karena dapat mencegah penyakit akibat bakteri, *L. acidophilus* digunakan dalam terapi, termasuk mengganti bakteri usus yang rusak oleh spektrum antibiotik, membantu pencernaan, menekan bakteri penyebab penyakit, mengurangi infeksi kandung kemih, memperbaiki penyerapan laktosa pada penderita intoleransi laktosa, membantu produksi vitamin B dan vitamin K.
- b. *L. bulgaricus* (*L. delbruckii subspecies bulgaricus*), biasanya digunakan dalam pembuatan yoghurt dan susu fermentasi. Bakteri ini memproduksi asam laktat dalam perut.
- c. *L. plantarum*, digunakan untuk perawatan Sindrom Iritasi Usus.
- d. *L. casei strain shirota*, digunakan secara komersial oleh perusahaan Jepang dalam bentuk susu fermentasi (yakult), dapat memperbaiki saluran pencernaan.
- e. *L. rhamnosus*, memiliki aktivitas antimikrobal untuk melawan *Candida* dan patogen lainnya, dapat memperbaiki saluran pencernaan.

## 2.9 Hipotesa

Berdasarkan uraian diatas, hipotesa yang dapat diambil sebagai berikut:

1. Immobilisasi enzim dengan metode yang berbeda berpengaruh terhadap aktivitas enzim  $\beta$ -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae*.
2. Immobilisasi enzim dengan metode yang berbeda berpengaruh terhadap produktivitas Galakto-Oligosakarida hasil sintesa oleh  $\beta$ -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae*.
3. Galakto-Oligosakarida berpengaruh pada beberapa jenis *Lactobacillus*.



### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Bahan Alat Penelitian

##### 3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan antara lain: D+Galaktosa (E-Merck,4061.0100), D+Glukosa (Sigma G-8270), D+Maltosa (Sigma M-5885) Maltotriosa (Fluka 63430) enzim  $\beta$ -galaktosidase (EC.3.2.1.23) dari *Aspergillus oryzae* (Sigma G-5160), Glutaraldehida 0.1%, Keramik, DEAE-Cellulosa (Sigma D-6418), Natrium Alginat (Sigma A-2033),  $\text{CaCl}_2$  2%,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan p-NP- $\beta$ -Galactopyranoside (Sigma N-1252). Sedangkan bahan kimia lainnya yang digunakan adalah Aquadest, Aquabidestilata,  $\text{NaH}_2\text{O}_4$  0,01M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,01M, Acetonitril HPLC grade (Riedel De Haen-34851), Metanol dan MRS Broth (Oxoid CM-359), bakteri *Lactobacillus achidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* dan *Lactobacillus lactis*.

##### 3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : Beaker glass; Pipet tetes, mikropipet, pH meter, Gelas ukur, Labu ukur, pompa peristaltik, *Fluidized Bed Reactor* (1,0 cm x 10 cm, bed volume : 10 mL) (Sigma C-5419-1EA), Penangas air; Termometer, Kuvet, *ependorf*, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) Perkin Elmer; RID (*Refractive Index Detector*), Injector 5  $\mu\text{l}$  dan kolom Waters Spherisorb-NH<sub>2</sub> (4,6 mm x 15,0 cm) (PSS-832313).

#### 3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Februari 2003 sampai dengan bulan September 2003 di Laboratorium Pengendalian Mutu Divisi Mikrobiologi, jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember dan Laboratorium Dasar Bersama Universitas Airtangga-Surabaya.

### 3.3 Metode Penelitian

#### 3.3.1 Rancangan Percobaan

Produksi homo-GalOS dilakukan dengan menggunakan enzim  $\beta$ -Galaktosidase amobil dari *Aspergillus oryzae* dan substrat D-Galaktosa dengan konsentrasi 40% (w/w) yang dilarutkan dalam larutan buffer fosfat pH 7. Kemudian diinkubasi selama 144 jam dengan pengambilan sampel pada 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 120, dan 144. Produk GalOS yang dihasilkan selanjutnya diujikan pada bakteri *Lactobacillus achidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* dan *Lactobacillus lactis* sebagai *growth promotor* pada suhu 37°C selama 24 jam.

Hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel data, grafik jumlah produksi GalOS serta hasil pengujian produk GalOS pada *Lactobacillus*.

#### 3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam beberapa tahap meliputi: persiapan bahan baku, pembuatan larutan buffer fosfat, immobilisasi enzim, pengukuran aktivitas enzim, produksi Galakto-Oligosakarida, pengambilan sampel dan analisa sampel.

##### 1. Persiapan Bahan Baku

Pada tahap ini dilakukan penimbangan substrat yaitu D-Galaktosa sebagai bahan untuk produksi galaktooligoskarida dengan konsentrasi 40% (w/w) atau 4 gram diencerkan dengan buffer fosfat 6 gram pH 7.

##### 2. Pembuatan Larutan Buffer Fosfat

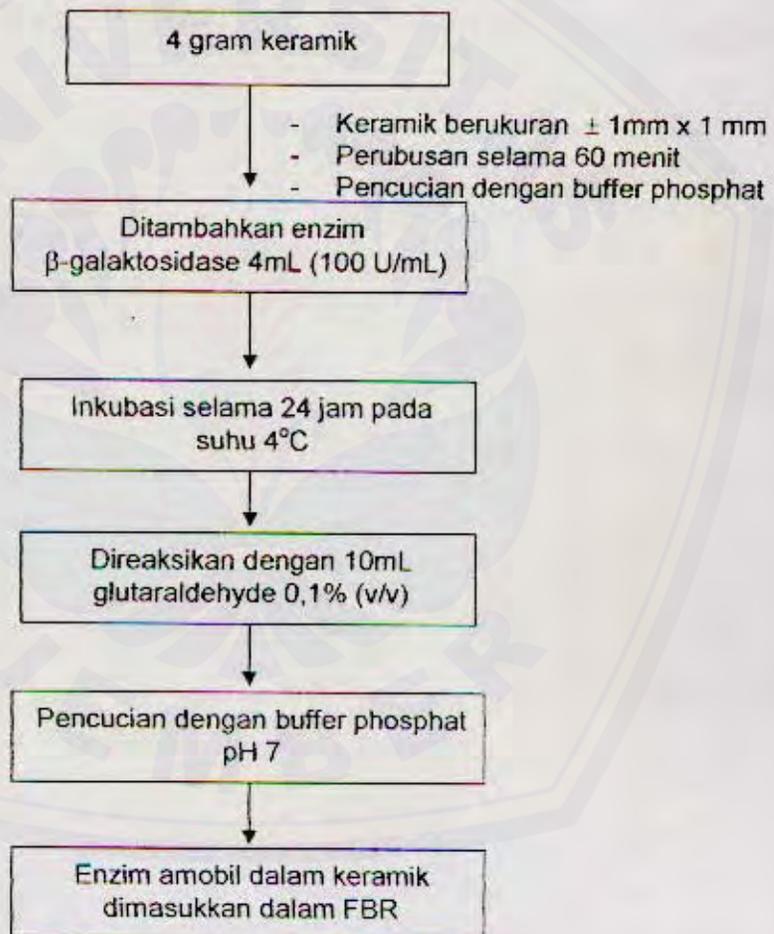
Larutan buffer fosfat dibuat dengan menggunakan campuran dua macam larutan, yaitu:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,01M dan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,01M yang dicampur secara perlahan-lahan sampai mencapai pH 7 (Sudarmadji, 1998)

##### 3. Immobilisasi Enzim

Immobilisasi enzim  $\beta$ -Galactosidase dilakukan dengan menggunakan tiga metode yang berbeda berdasarkan matriksnya, yaitu : a) ikatan kovalen pada keramik; b) adsorpsi anionik pada DEAE-Cellulose; dan c) pemerangkapan dalam bentuk gel alginat.

a. Immobilisasi Pada Keramik (Gambar 12)

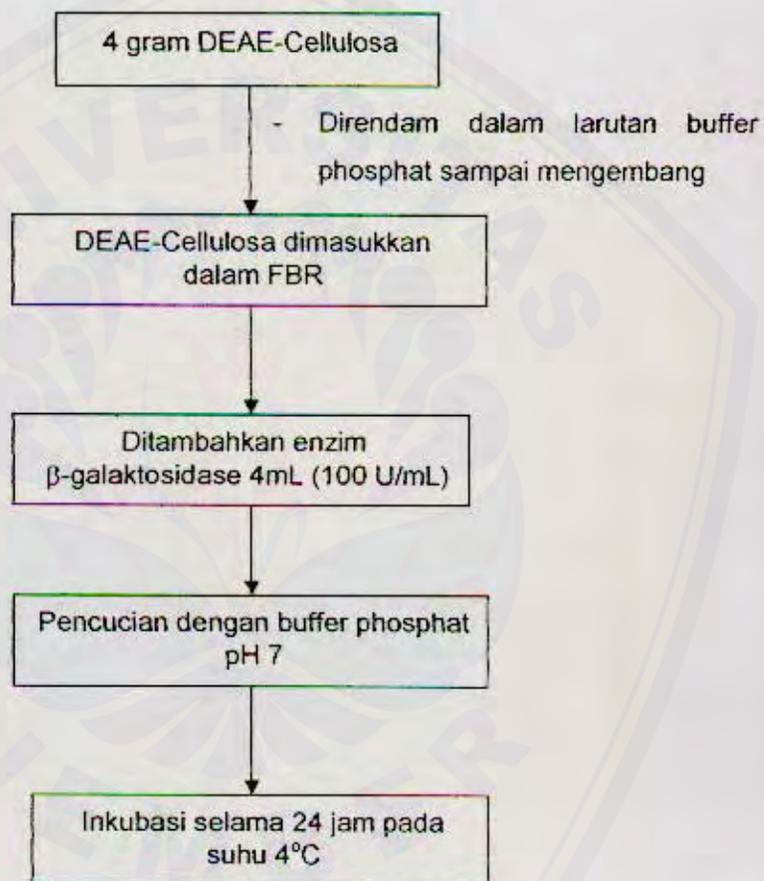
Keramik (dengan ukuran seperti gula pasir) dibersihkan dengan perendaman dalam air mendidih selama 60 menit, kemudian dicuci dengan larutan buffer fosfat. Selanjutnya sebanyak 4 g keramik dicampur dengan 4 ml enzim (100 U/ml) dan diinkubasi pada suhu 4° C selama 24 jam. Molekul enzim amobil dikenakan ikatan silang dengan 10 ml 0,1 % (v/v) glutaraldehyde dalam 0,01M buffer fosfat pH 7 selama 1 menit. Semua larutan lalu ditiriskan, dan enzim amobil dalam keramik dicuci dengan buffer yang sama. Enzim amobil dapat dimasukkan ke dalam *Fluidized Bed Reactor* (FBR) (10 mm x 100 mm).



Gambar 12. Diagram Alir Immobilisasi Enzim β-Galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* dengan Metode Ikatan Kovalen pada Keramik

## b. Immobilisasi Pada DEAE-Cellulose (Gambar 13)

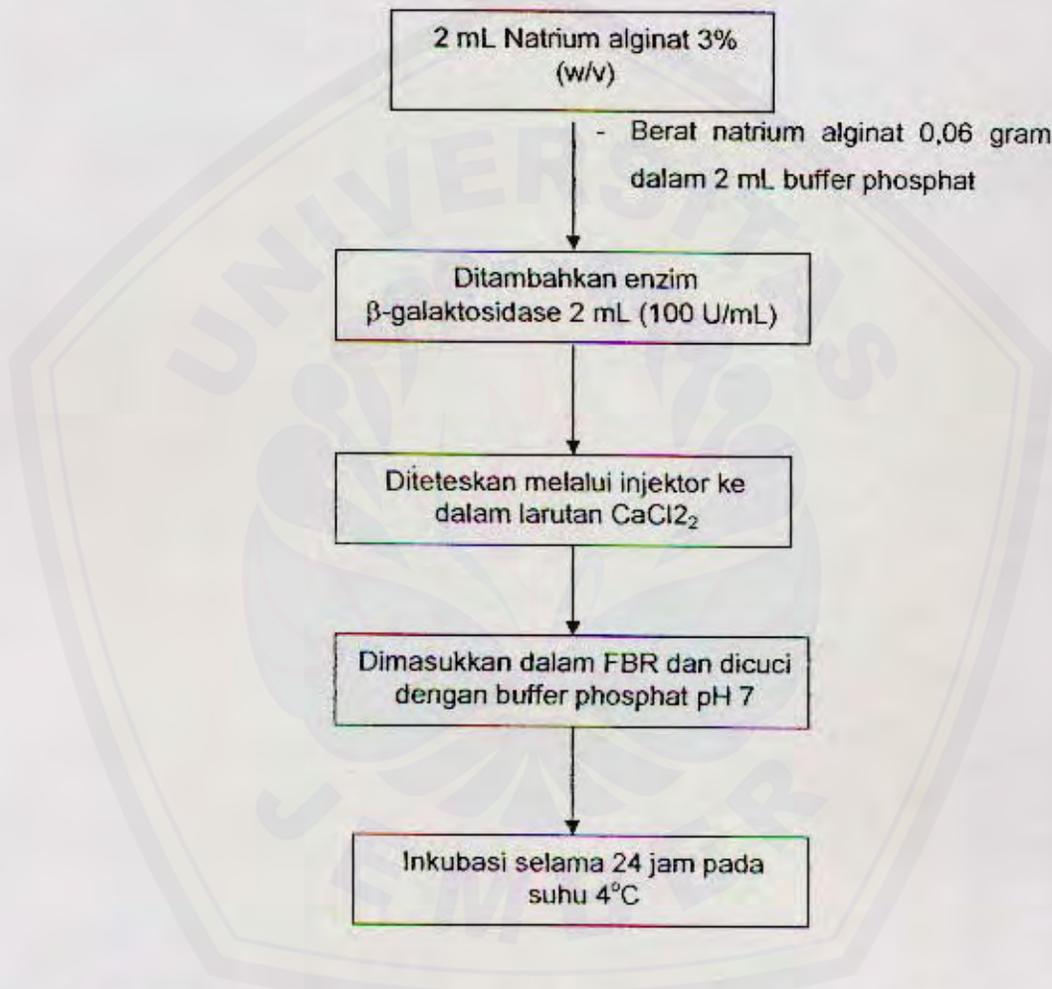
Sebanyak 4 g DEAE-Cellulose yang sudah berkembang (direndam dalam larutan buffer phosohat) dimasukkan ke dalam FBR (10 mm x 100 mm) dan selanjutnya dicuci dengan larutan 0,01M buffer phospat pH 7. Larutan enzim (4 ml; 100 U/ml) dimasukkan ke dalam FBR dan dibiarkan selama 12 jam pada suhu 4 ° C untuk mendapatkan kecukupan adsorpsi. Kolom FBR selanjutnya dapat dicuci dengan larutan buffer yang sama.



Gambar 13. Diagram Alir Immobilisasi Enzim  $\beta$ -Galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* dengan Metode Adsorpsi Anionic pada DEAE-Celulosa

c. Immobilisasi Pada Natrium-alginat (Gambar 14)

Sebanyak 2 ml dari 3 % (w/v) natrium alginat dicampur dengan 2 ml enzim (100 U/ml), dan diaduk selama 15 menit. Campuran diteteskan melalui injektor kecil ke dalam larutan 2 %  $\text{CaCl}_2$  selama 15 menit. Butiran natrium alginat dicuci dengan buffer 0,01M fosfat pH 7. Akhirnya enzim amobil dapat dimasukkan ke dalam kolom FBR (10 mm x 100 mm).



Gambar 14. Diagram Alir Immobilisasi Enzim β-Galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* dengan Metode Pemerangkapan dalam Gel Natrium Alginat

4. Pengukuran Aktivitas Enzim dengan Metode Spektrofotometri (Sudarmadji, 1996)

Sejumlah 0,01 – 0,05 g keramik, DEAE-Cellulose dan natrium alginat yang telah berisi enzim diinkubasi dalam 1mL buffer fosfat pH 7 yang mengandung p-NP- $\beta$ -galactopyranoside sebagai substrat. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 10 menit, kemudian dihentikan dengan penambahan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sebanyak 3mL. Jumlah p-nitrophenyl yang dibebaskan dapat dilihat dengan spektrophotometer pada panjang gelombang 420 nm.

Enzim Amobil + p-NP- $\beta$ -Galactopyranoside

↓  
Inkubasi 37°C, 10 menit

↓  
+ 3 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

↓  
Absorbansi pada 420 nm

Gambar 15. Evaluasi Aktivitas Enzim

5. Produksi Galakto-Oligosakarida

Produksi Galakto-Oligosakarida dilakukan dengan memasukkan substrat D-galaktosa 40% (w/w) sebanyak 10 mL ke dalam FBR yang berisi enzim dan disirkulasikan dengan menggunakan pompa peristaltik. Reaksi dilakukan pada suhu sekitar 50°C dengan kecepatan aliran reaksi 0,4 mL/menit.

6. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan pada satu tahap dengan lama inkubasi yang telah ditentukan, yaitu: 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 120, dan 144. Jumlah sampel yang diambil sebanyak 10 sampel untuk masing-masing metode dengan volume 50  $\mu$ L.

## 7. Analisa Sampel dengan HPLC (Sudarmadji, 1996)

Produk GalOS dideteksi dengan HPLC yang dilengkapi *Refractive Index Detector* menggunakan kolom Spherisorb S-3 NH<sub>2</sub> (25 cm x 4 mm) dengan eluen acetonitrile (80% v/v dalam air) pada 30° C dan kecepatan 1.5 ml/menit.

Tahap-tahap analisa galaktooligosakarida dengan menggunakan HPLC sebagai berikut:

### 1. Persiapan Alat

- Membuat eluen untuk analisa acetonitril 80%(v/v).
- Memeriksa komponen-komponen alat: pompa, eluen, lubang injeksi dan dipastikan dalam keadaan baik.
- Menyalakan rangkaian alat untuk analisa : HPLC, RID dan monitor
- Mencuci kolom menggunakan metanol 50% (v/v) dengan laju (*flow*) 0,5 mL/menit.
- Setelah bersih, eluen diganti dengan Acetonitrile
- Eluen dilewatkan melalui kolom dengan laju 0,5 mL/menit.
- Setelah monitor menunjukkan garis lurus (*baseline*) maka sampel siap untuk diinjeksikan.

### 2. Pembuatan Kurva Standar

- Membuat larutan gula standar: glukosa, maltosa dan maltotriosa masing-masing 50000 ppm (sebagai larutan stok).
- Membuat larutan gula standar: glukosa, maltosa dan maltotriosa dengan konsentrasi 25000, 12500, 6250 dan 3125 ppm dari larutan stok.
- Menginjeksikan larutan gula standar ke HPLC sebanyak 30µL dengan laju yang sama dengan sampel (1,5 mL/menit).
- Menetapkan kisaran waktu munculnya *peak* pada monitor untuk mono-, di- dan trisakarida.
- Membuat kurva standar dengan memplotkan konsentrasi gula standar dengan area yang tercetak pada monitor.

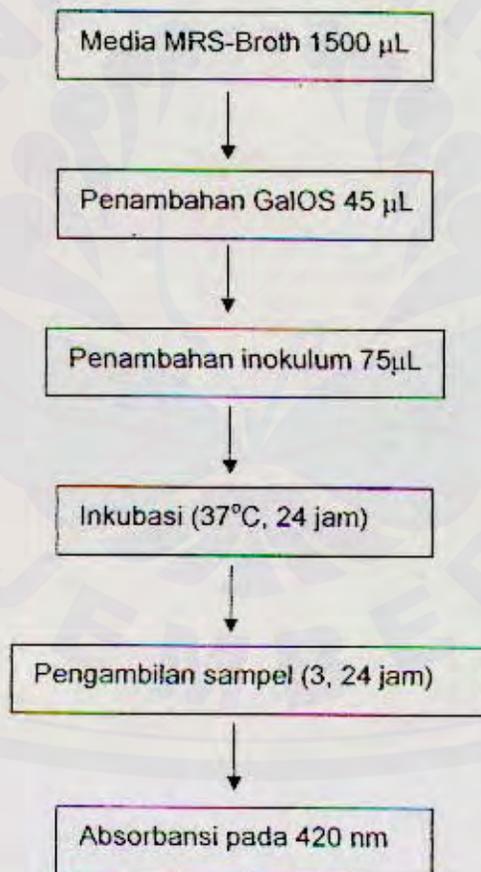
### 3. Pengujian Sampel

- Sampel sebanyak 50µL diencerkan dengan menambahkan aquabidest sampai volume 100µL.
- Setelah tercampur merata, sampel diinjeksikan ke HPLC sebanyak 30µL

- Setelah tampilan monitor menunjukkan garis lurus (*baseline*) maka analisa sampel dianggap selesai dan dilanjutkan dengan sampel berikutnya.

#### 8. Pengujian *In Vitro* Produk GalOS pada *Lactobacillus*

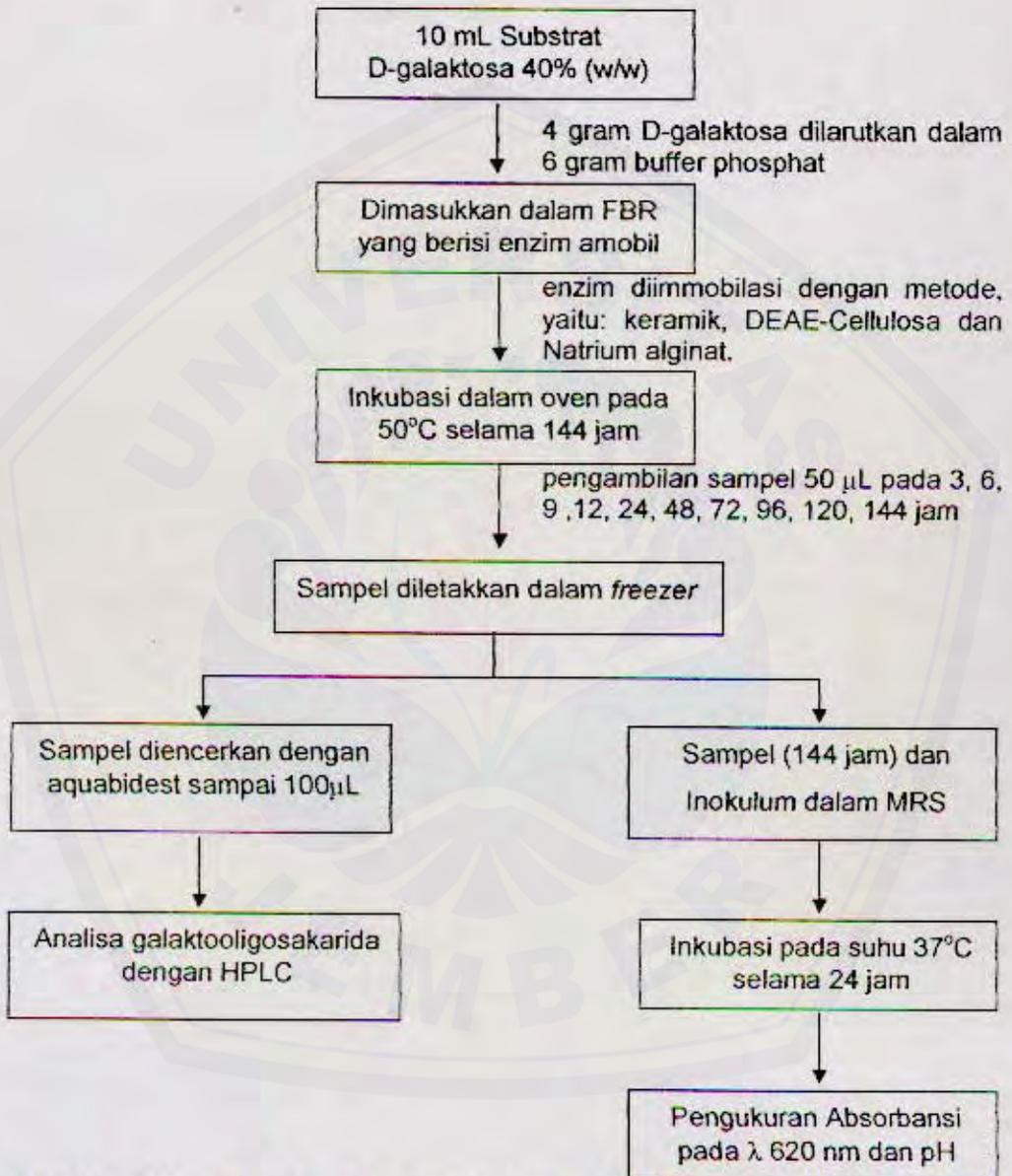
Produk GalOS yang dihasilkan diuji kemampuannya sebagai prebiotik (*growth factor*) dengan menggunakan bakteri *Lactobacillus achidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* dan *Lactobacillus lactis*. Sebanyak 45  $\mu\text{L}$  produk GalOS ditambah 1500  $\mu\text{L}$  media MRS Broth dan ditambah 75  $\mu\text{L}$  inokulum diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengambilan sampel dilakukan setiap 3 dan 24 jam. Pengujian ini dilakukan pada produk GalOS dari masing-masing metode immobilisasi.



Gambar 16. Diagram Alir Pengujian Produk GalOS Terhadap Beberapa Bakteri Asam Laktat

### 3.3.3 Urutan Kerja

Adapun tahap pelaksanaan penelitian dibagi menjadi 3 tahap, yaitu produksi GalOS, Analisa HPLC dan pengujian Produk GalOS pada bakteri *Lactobacillus*.



Gambar 17. Diagram Alir Produksi Homo-Galakto-Oligosakarida secara Enzimatis dengan Menggunakan Enzim  $\beta$ -Galaktosidase Amobil dari *Aspergillus oryzae*.

### 3.4 Pengamatan

Pengamatan yang dilakukan terhadap hasil produksi ini adalah analisa Galakto-Oligosakarida dengan HPLC kemudian mengkonversikan dalam jumlah ppm dari kurva standard dan pengujian produk sebagai *growth promotor* pada beberapa jenis *Lactobacillus*.

Analisa produk berupa Galakto-Oligosakarida dengan HPLC menggunakan kolom Waters Spherisorb-NH<sub>2</sub> (4,6mm x 15,0 cm). Eluen yang digunakan acetinitril : aquabidest dengan 80 : 20 (v/v). Laju (*flow*) pada kolom 1,5 mL/menit dengan RID untuk mendeteksi komponen gula dalam Galakoto-Oligosakarida.

Sedangkan pengujian produk sebagai *growth promotor* pada bakteri *Lactobacillus achidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* dan *Lactobacillus lactis* dilakukan dengan menentukan perubahan pH dengan pH-meter dan pengukuran absorbansi pada  $\lambda$  620 nm dengan spektrofotometer.



## V KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan mengenai "Aplikasi *Fluidized Bed Reactor* dengan  $\beta$ -Galaktosidase Amobil dari *Aspergillus oryzae* untuk Produksi Senyawa Prebiotik Galakto-Oligosakarida (GalOS)", maka dapat diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. penggunaan metode immobilisasi enzim  $\beta$ -Galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* menyebabkan penurunan aktivitas sekitar 14 -30% dan penurunan produktivitas sebesar 14 – 32%,
2. metode immobilisasi yang paling baik dalam sintesa GalOS dengan enzim  $\beta$ -Galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* adalah metode ikatan silang (*Cross Linking*) dengan glutaraldehyde pada keramik dengan aktivitas (Unit) 62,9565 (tahap I), 44,0675 (tahap II) dan 32,8147 (tahap III),
3. reaksi sintesa Galakto-Oligosakarida dengan menggunakan enzim  $\beta$ -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* amobil berjalan cepat pada 24 jam pertama dan selanjutnya secara perlahan sampai pada 144 jam. Namun masih belum diketahui waktu optimum dalam sintesa ini,
4. Galakto-Oligosakarida dapat berfungsi sebagai *growth promotor* pada bakteri *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum* dan *L. lactis*, yang ditandai dengan pertumbuhan yang cepat. Namun kurang berperan pada pertumbuhan pada *L. bulgaricus*, *L. casei* dan *L. rhamnosus*.

### 5.2 Saran

Dari hasil kesimpulan terdapat beberapa saran yang perlu disampaikan diantaranya adalah:

1. perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan waktu inkubasi yang optimal dalam produksi Galakto-Oligosakarida dengan menggunakan enzim  $\beta$ -galaktosidase amobil dari *Aspergillus oryzae*
2. perlu dilakukan penelitian untuk menentukan batas kemampuan enzim amobil yang dapat dipakai dalam beberapa siklus.

## Daftar Pustaka

- Ajisaka, K. dan Fujimoto, H., 1989, **Regioselective Synthesis of Trisaccharides by Use of a Reversal Hydrolysis Activity of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Galactosidase**, *Carb. Research*, 185, 139 – 146.
- Anonim, 1992, **Diktat Kuliah Teknologi Fermentasi**. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Jember.
- \_\_\_\_\_, 1997, **Alginic acid**, JECFA.  
(<http://www.fao.org/docrep/W6355E/w6355e04.htm#TopOfPage>)
- \_\_\_\_\_, 2003a, **Ion-exchange Chromatography**.  
([http://www.instruck1.cit.cornell.edu/courses/biobm330/protlab/ion\\_exchange.html](http://www.instruck1.cit.cornell.edu/courses/biobm330/protlab/ion_exchange.html))
- \_\_\_\_\_, 2003b, **China Clay**, Encyclopedia, Columbia.  
(<http://www.encyclopedia.com>)
- Arafah, E., 2003, **Pangan Fungsional dan Oligosakarida: Pangan Fungsional Dalam Perspektif Filsafah Ilmu**. (<http://www.Hayati-ipb.com/users/rudyct>.)
- Astawan, M., 2003, **Pangan Fungsional Untuk Kesehatan yang Optimal**, IPB, Bandung. (<http://www.kompas.com/kompas-cetak/ilpeng>).
- Axelsson, L., 1988, **Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology**, Matforaks, Norwegian Food Research Institute, As, Norway.
- Benion, M., 1980, **The Science of Food**, John Wiley & Sons, U.S.A.
- Berger, J.L., Lee, B.H. dan Lacroix, C., 1995, **Oligosaccharide Synthesis by Free and Immobilised  $\beta$ -galactoside from *Thermus aquaticus* YT-1**, *Biotechnology Letters*, 17, 1077 – 1080.
- Broste, P., 1999, **Food Engineering International**, Denmark (broste @ Broste.com).
- Bucke, C. dan Rastall, R.A., 1990, **Synthesising Sugars by Enzymes in Reverse**, *Chemistry in Britain*, 26, 675 – 678.
- Buckle, K.A., 1987, **Ilmu Pangan**, Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.
- Cichoke, A., 2000, **Probiotics Balance Digestion and Improve Overall Health**, *Nutrition Science News*, 26., 2-4.
- Collins dan Gibson, G.R., 1999, **Prebiotic, Probiotic, and Synbiotic: Approaches for Modulating The Microbial Ecology or The Gut**, *Am. J. Clin. Nutrition*, 69 (5): 1052S-1057S.

- Conroy, P.J., 1997, **Fluidized Bed Reactor**.  
(<http://www.rpi.edu/dept/chem.-eng/Biotech-Environ/IMMOB/Fluidized-bed.htm>)
- Drauz, K. dan Waldmann, H., 1995, **Enzyme catalysis in organic synthesis**. VCH Publishers, Inc., Weinheim, pp. 73 – 38.
- Dwek, R.A., 1996, **Glycobiology: Toward Understanding The Function of Sugars**, Chemical Review, 96, 683 – 720.
- El Khadem, H.S., 1988, **Carbohydrate Chemistry, Monosaccharides and Their Oligomers**, Academic Press, San Diego. pp 1 – 253.
- El-Sayed, H. dan Laszlo, E., 1994, **Condensation of Glucose by The Reversed hydrolysis Reaction of Glucoamylase (Effect of Organic Solvents and Immobilisation Forms)**, Acta alimentaria, 23, 359 – 375.
- Engasser, J.M. dan Hovarth, C., 1976, **Diffusional and Kinetic Effects With Immobilized Enzymes**, *Appl. Biochem. Bioeng.* 11: 127 – 220.
- Eskin, M.N.A, 1990, **Biochemistry of Foods**, Academic Press, Inc., California.
- Fardiaz, S., 1992, **Mikrobiologi Pangan I**, PT. Gramedia, Jakarta.
- Fieser, L.F. dan Fieser, M., 1962, **Advanced Organic Chemistry**, Reinhold Publishing Corp, New York.
- Frazier, W.C. dan Westhoff, D.C., 1988, **Food Microbiology**, Edisi Keempat, McGraw Hill Book Co., Singapore.
- Fuller, R., 1997, **Probiotic 2 : Application and Practical Aspects**, Chapman & Hall, London.
- Gibson, G.R. dan Robertfoid, M.B., 1994, **Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota : Introducing the Concept of Prebiotics**. *J. Nutr.*, 125, 1401-12.
- Gibson, G.R., 1998, **Dietary Modulation of The Human Gut Microflora Using Prebiotics**, *Br.J. Nutrition*, 80 (4): S209-12.
- Giec, A., L., Grucala dan E., wasowics, 1981, **Formation of Oligosaccharides During Lactose Hydrolisis with  $\beta$ -Galactosidase in Cheese-Whey Permeates**, *Acta Alim, Polinoca*, 7, 3 – 4:199 – 208.
- Gnoth, M.J, Kunz C., Kinne-Saffran, E., Rudloff, S., 2000, **Human Milk Oligosaccharieds: Are Minimally Digested In Vitro?**, *J. Nutrition*, 130 (12) : 3014-3020
- Girindra, A., 1993, **Biokimia I**, PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Goldberg, I., 1994, **Functional Food**, Chapman & Hall, New York.

- Grizard, D. dan Barthelemy, C., 1999, **Non Digestible Oligosaccharides Used as Prebiotic Agents: Mode of Production and Beneficial Effects on Animal and Human Health**, *Reprod Nutrition Dev.*, 39 (5-6): 563-88.
- Ichikawa, Y., Look, G.C. dan Wong, C.H., 1992, **Enzyme-catalyzed Oligosaccharides Synthesis**, *Analytical Biochem.* 202, 215-238.
- Iwasaki, K., Nakajima, M. dan Nakano, S., 1996, **Galacto-oligosaccharides Production from Lactose by an Enzymic Batch Reaction Using  $\beta$ -Galactosidase**, *Process Biochemistry*. 31 (1): 69 – 76.
- Judoamidjojo, R.M., 1990, **Teknologi Fermentasi**, Rajawali Press, Jakarta.
- Kandler, O., 1983, **Carbohydrate Metabolism in Lactic Acid Bacteria**. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49:209 – 224.
- \_\_\_\_\_, 1984, **Current Taxonomy of Lactobacilli**, *Dev. Ind. Microbiol.*, 54:3053 – 3056.
- Kandler, O. dan Weiss, N., 1986, **Regular, Non Sporing Gram Positive Rods**, dalam *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2 (P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt, eds.), Baltimore: Williams and Wilkins, pp. 1208 – 1234.
- Kristanti, I., 1998, **Laporan Penelitian : Bila Tidak Tahan Minum Susu**. Institute fuer Lebensmittelverfahrenstechnik, Bundesforschungs fuer Ernaehrung (Federal Research for Nutrition). (<http://www.Yahoo.com/lactose.htm>).
- Kunz, C. dan Rudoff, S., 1996, **Strukturelle und Funktionelle Aspekte von Oligosacchariden in Fraumilch**, *Z. Ernahrungswiss* 35:22 – 31.
- Kumiasih, D., 2001, **Prebiotik Atasi Masalah Diare**, Tabloid Nakita, PT. Gramedia, Jakarta.
- Larsson, P.O., Hedbys, L., Svensson, S., dan Mosbach, K., 1972, **Disaccharide Synthesis With Immobilized  $\beta$ -Galactosidase**, Academic Press, New York.
- Lichtenstein, A.H. dan Goldin, B.R., 1998, **Lactic Bacteria and Intestinal Drug and Cholesterol Metabolism**, *In* Salminen, S. and Wright, A(eds), *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, Edisi Kedua, M. Dekker, Inc. New York-Basel.
- Lindsay, S., 1992, **High Performance Liquid Chromatography**, Edisi Kedua, John Wiley & Sons Ltd, England.
- Lis, H. dan Sharon, N., 1993, **Protein Glycosylation (structural and Functional Aspects)**, *European J. Biochemistry*, 218, 1 – 27.

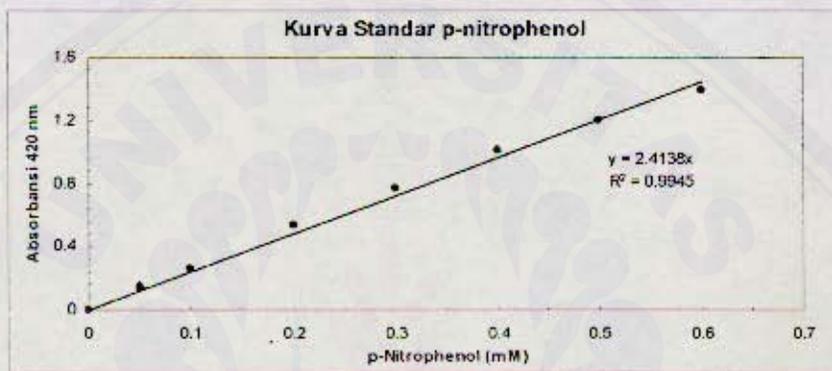
- Macfarlane dan Cummings., 1999, **Probiotics and Prebiotics : can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health ?**, *Biomedical Journal* : (<http://www.bmj.com>).
- Mangunwidjaja, D. dan Suryani, A., 1994, **Teknologi Bioproses**, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Martino, A., Durante, M., Pifferi, P.G., Spagna, G. dan Bianchi, G., 1996, **Immobilisation of  $\beta$ -glucosidase from a Commercial Preparation. Part 1. A Comparative Study of Natural Supports**. *Process Biochemistry*, 31, 281 – 285.
- Monsan, P., 1982, **Kinetik Enzymatike Heterogene**, didalam G. Durand et. P. Monsan, *Les Enzymes Production et Utilisation Industrielles*, Gauthier.
- Monsan, P. dan Paul, F., 1995, **Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides by Glucoamylase in Reverse**, *Biotechnology Letters*. 13, 501-504
- Muchtadi, D. Dan Wijaya, C.H., 1996, **Kursus Singkat "Makanan Fungsional dan Keamanan Pangan"**, PAU Pangan dan Gizi UGM, Yogyakarta.
- Murray, R. *et al.*, 1997, **Biokimia Harper**, Edisi 24, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Nakanishi, K., Matsuno, R., Torri, K., Yamamoto, K., dan Kamikubo, T., 1983, **Properties of Immobilised  $\beta$ -Galactosidase from *Bacillus Circulans***. *Enzyme Microbial Technology*, 5, 115 – 120.
- Nakano, H. Hamayasu, K. Fujita, K. Hara, K. Ohi, M. Yashizumi, H. dan Kitahata, S., 1995, **Synthesis of 2-Deoxy Glucooligosaccharides through Condensation of 2-Deoxy-D-glucose by Glucoamylase and  $\alpha$ -Glucosidase**, *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 1732-1736
- Nuraida, L., 1996, **Kursus Singkat "Makanan Fungsional dan Keamanan Pangan"**, PAU Pangan dan Gizi-UGM, Yogyakarta.
- Page, J.F.Le., 1987, **Applied Heterogenous Catalysis-Design, Manufacture, Use of Solid Catalysts**, Gulf Publishing Co.  
(<http://www.e-catalysts.com/Supportsearch/Tutorials/Fluidized-bed.htm>)
- Page, D.S., 1997, **Prinsip-Prinsip Biokimia**, edisi kedua, Erlangga, Jakarta.
- Pazur J.H., 1994, **Neutral Polysaccharides**, In *Carbohydrate Analysis, A Practical Approach*, 2<sup>nd</sup> edition, M.F. Chaplin and J.F. Kennedy, Oxford University Press, pp. 73-124.
- Prangdimurti, E., 2003, **Probiotik dan Efek Perlindungannya Terhadap Kanker Kolon**. (<http://www.rudycr.tripod.com/Sem/endang-prangdimurti>).

- Prenosil, J.E., *et al.*, 1984, **Enzymatic Whey Hydrosis in the Pilot Lactohyd**, *Biotechnology*: 441 – 444.
- Rastall, R.A., Aclard, M.W. dan Bucke, C., 1992, **Enzymatic synthesis of Oligosaccharides**, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 10, 253-281.
- Rastall, R.A., 1999, **Introduction to Enzyme Technology Hand Out**, Inggris
- \_\_\_\_\_, 2000, **Second Generation Prebiotics**, Division of Food Microbial Science. Reading. (<http://www.fst.rdg.ac.uk/prebiotics.htm>)
- Roberts, *et al.*, 1995, **Introduction to Biocatalysis Using Enzymes and Microorganism**, Cambridge University, USA.
- Robertfroid, M.B., 2000, **Prebiotics and Probiotics: Are They Functional Foods?**, *Am. J. Clin. Nutritional*, 2000 Jun; 71(6 Suppl): 1682S-7S.
- Salminen, S., Deighton, M.A., Benno, Y., dan Gorbach, S.L., 1998, **Lactic Acid Bacteria in Health and Disease**. In Salminen, S. and Wright, A(eds), *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, Edisi Kedua, Marcel Dekker, Inc. New York-Basel.
- Schomburg, D. dan Salzmann, M., 1991, **Enzyme Handbook 4 (Class 3: Hydrolases)**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Schlegel, H.G., 1994, **Mikrobiologi Umum**, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Silalahi, J., 2001, **Manfaat dan Khasiat Probiotik untuk Mencegah Penyakit**, *Harian Kompas* (edisi 2 September 2001), Jakarta.
- Steffenud, A., 1959, **Food, The Yearbook of Agriculture**, The U.S Government Printing Office, Washington D.C.
- Stryer, L., 1996, **Biokimia**, Vol. 1, Edisi 4, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Sudarmadji, S., 1996, **Teknologi Analisa Biokimiawi**, Liberty, Yogyakarta.
- \_\_\_\_\_, 1998, **Analisis Bahan Makanan Dan Pertanian**, Liberty, Yogyakarta.
- Suwasono, S. dan Rastall, R.A., 1996, **A Highly Regioselective Synthesis of Mannobiose and Mannotriose by Reverse Hydrolysis Using Specific 1,2- $\alpha$ -Mannosidase from *Aspergillus phoenics***, *Biotechnology Letters*, 18, 851-856.

- \_\_\_\_\_. 1998, **Synthesis of Oligosaccharides Using Immobilised  $\alpha$ -Mannosidase from *Aspergillus phoenicis*: Immobilisation-Dependent Modulation of Product Spectrum**. *Biotechnology Letters*, 20, pp. 15 – 18.
- \_\_\_\_\_. 2000, **Synthesis of Mannno-Oligosaccharides Using *Aspergillus phoenicis*  $\alpha$ -1,2-mannosidase Immobilised Onto Different Support Materials**, In: U. Suwahyono (Ed). *Mikrobiologi, Ensim dan Bioteknologi*. Prosiding Seminar Nasional Industri Ensim dab Bioteknologi II, 199 – 208.
- Suwasono, S. Utami, T. Indrati, R. dan Ani, E.R. 2001, **Sintesa Galaktooligosakarida secara Enzimatik dengan  $\beta$ -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae***, In: B Widianarko (Ed)., *Mikrobiologi dan Bioteknologi Pangan*, Himpunan Makalah Seminar Nasional Teknologi Pangan, 112-128.
- Thenawijaya, M., 1997, **Dasar-dasar Biokimia**, Jilid I, Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Uhlich, T., Ulbicht, M. dan Tomaschewski, G., 196, **Immobilisation of Enzymes in Photochemically Cross-linked Polyvinyl Alcohol**. *Enzyme microbial technology*, 19, 124 – 131.
- Waspodo, I.S., 2001, **"Efek Probiotik, Prebiotik dan Synbiotik bagi Kesehatan"**, *Harian Kompas* (edisi 30 September 2001), Jakarta.
- Werther, J. dan Hartge, E.U., 2003, **Modelling of Fluidized Bed Reactor**, *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, Vol.1: P1. (<http://www.bepress.com/ijcre/vol1/P1>)
- Winamo, F.G., 1986, **Enzim Pangan**, Pusat Pengembangan Teknologi Pangan-Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Zopf, D. dan Roth, S., 1996, **Oligosaccharide: Anti-Infective Agents**. *The Lancet*, 347, 1017 – 1021.

Lampiran 1. Kurva Standart P-Nitrophenol

p-nitrophenol (mM)	Abs-420 nm
0	0
0.05	0.1400
0.1	0.2560
0.2	0.5330
0.3	0.7640
0.4	1.0080
0.5	1.1940
0.6	1.3900



0,01 gr enzim dalam gel alginat diambil 0,01 gr enzim gel alginat + 1000 ul p-NP-galaktoside -> inkubasi 37oC 10 menit Dilution = 10  
Aktivitas = abs420:2.4136\*Dilution:waktu

Substrat	Abs 420 nm	p-NP (mM)	p-NP (umol)	Aktivitas Enzim (Unit)	Matriks gr	Aktivitas (Unit/gr)	Matriks gr	Aktivitas total
p-NP-B-Gal	0.2990	0.1207	0.1207	0.2414	0.01080	22.3529	4	89.4116
	0.3050	0.1231	0.1231	0.2453	0.01096	22.4686	4	89.8743
1 - cycle	0.2330	0.0941	0.0941	0.1881	0.01098	17.1333	4	68.5330
	0.2270	0.0916	0.0916	0.1833	0.01097	16.7073	4	66.8291
2 - cycle	0.1660	0.0670	0.0670	0.1340	0.01050	12.7645	4	51.0582
	0.1620	0.0654	0.0654	0.1308	0.01039	12.5888	4	50.3554
3 - cycle	0.1150	0.0464	0.0464	0.0929	0.01098	8.4563	4	33.8253
	0.1110	0.0448	0.0448	0.0896	0.01097	8.1696	4	32.6786

Matriks	Ulangan	Berat matriks (gr)	Aktivitas (Unit/gr)	Aktivitas rata (Unit/gr)	Berat Matriks gr	Total aktivitas (Unit)	Total Aktivitas rata-rata (Unit)	Yield (%)	Yield (%)
Enzim Bebas	1	0.0000	0.0000	0.0000	4.0000	109.8683	109.8683	100.00	100
Keramik	2	0.0000	0.0000	0.0000	4.0000	78.8030	78.8648	71.72	71.59917 *
	1	0.0117	19.7007	19.6662	4.0000	78.5266	71.47	71.47	
DEAE	2	0.0113	19.8316	23.8719	4.0000	95.5467	95.4875	86.96	86.91091
	1	0.0111	23.8867	23.8571	4.0000	95.4283	86.86	86.86	
Alginat	2	0.0116	23.8571	22.4107	4.0000	89.4116	89.8430	81.38	81.59133
	1	0.0108	22.3529	22.4107	4.0000	89.8743	81.80	81.80	

Matriks	Siklus	Aktivitas per gr (Units) I	Aktivitas per gr (Units) II	Aktivitas rata I + II/2	Berat Matriks gr	Total aktivitas (Unit) I	Total aktivitas (Units) II	Total Aktivitas rata-rata	Yield (%)	Penurunan (%)
Keramik	0	19.7007	19.6316	19.6662	4.0000	78.8030	78.5266	78.6648	100.00	0.00
	1	16.0037	15.4745	15.7391	4.0000	64.0149	61.8980	62.9565	80.03	19.97
	2	10.9326	11.1110	11.0219	4.0000	43.7311	44.4438	44.0875	56.04	43.96
DEAE	3	6.0740	8.3334	8.2037	4.0000	32.2958	33.3336	32.8147	41.71	58.29
	0	23.8867	23.6571	23.8719	4.0000	95.5467	95.4283	95.4875	100.00	0.00
	1	19.4208	18.8167	19.1188	4.0000	77.6833	75.2670	76.4751	80.09	19.91
Alginat	2	13.6488	13.4080	13.5289	4.0000	54.5993	53.6322	54.1158	56.67	43.33
	3	10.1880	10.3087	10.2483	4.0000	40.7519	41.2347	40.9933	42.93	57.07
	0	22.3529	22.4686	22.4107	4.0000	89.4116	89.8743	89.6430	100.00	0.00
Alginat	1	17.1333	16.7073	16.9203	4.0000	68.5330	66.8291	67.6811	75.50	24.50
	2	12.7645	12.5888	12.6767	4.0000	51.0582	50.3554	50.7068	56.57	43.43
	3	8.4563	8.1696	8.3130	4.0000	33.8253	32.6786	33.2519	37.09	62.91

Lampiran 2. Data Pengamatan Aktivitas Enzim  $\beta$ -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae*

Aktivitas enzim  $\beta$ -galaktosidase *Aspergillus oryzae* bentuk bebas

0,0123 gr enzim (12,3 mg x 9,6 U/mg) = 118,06 Unit

dilakukan dengan 4,5 ml buffer --> diencerkan 100 x

diambil 100 ul enzim + 900 ul p-NP-galaktoside --> inkubasi 37oC 10 menit

Dilution = 1/100		Aktivitas = abs420:2.4138'Dilution:waktu		Aktivitas akhir per ml Aktivitas 4.0 ml	
Substrat	Abs-420 nm	p-NP (mM)	p-NP (umol)	Aktivitas per 100 ul E	Aktivitas per ml E
p-NP-B-Gal	0.6630	0.2747	0.2747	0.0275	0.2747
p-NP-a-Gal	0.0330	0.0137	0.0137	0.0014	0.0137

Aktivitas enzim  $\beta$ -galaktosidase bentuk amobil

0,01-0,02 gr enzim dalam keramik

diambil 0,01-0,02 gr enzim keramik + 1000 ul p-NP-galaktoside --> inkubasi 37oC 10 menit

Dilution = 10 Aktivitas = abs420:2.4138'Dilution:waktu (5)

Substrat	Abs 420 nm	p-NP (mM)	p-NP (umol)	Aktivitas Enzim (Unit)	Matriks gr	Aktivitas (Unit/gr)	Matriks gr	Aktivitas total
p-NP-B-Gal	0.2770	0.1148	0.1148	0.2295	0.0117	19.7007	4	78.8030
	0.2750	0.1110	0.1110	0.2220	0.0113	19.6316	4	78.5266
1 - cycle	0.2220	0.0896	0.0896	0.1792	0.0112	16.0037	4	64.0149
	0.2160	0.0872	0.0872	0.1744	0.0113	15.4745	4	61.8980
2 - cycle	0.1610	0.0650	0.0650	0.1300	0.0119	10.9328	4	43.7311
	0.1650	0.0666	0.0666	0.1332	0.0120	11.1110	4	44.4438
3 - cycle	0.1020	0.0412	0.0412	0.0824	0.0102	8.0740	4	32.2958
	0.1060	0.0428	0.0428	0.0856	0.0103	8.3334	4	33.3336

0,01 gr enzim dalam DEAE-Cellulose

diambil 0,01 gr enzim DEAE-Cell+ 1000 ul p-NP-galaktoside --> inkubasi 37oC 10 menit

Dilution = 10 Aktivitas = abs420:2.4138'Dilution:waktu (5)

Substrat	Abs 420 nm	p-NP (mM)	p-NP (umol)	Aktivitas Enzim (Unit)	Matriks gr	Aktivitas (Unit/gr)	Matriks gr	Aktivitas total
p-NP-B-Gal	0.3200	0.1326	0.1326	0.2651	0.0110	23.8867	4	95.5467
	0.3340	0.1384	0.1384	0.2767	0.0160	23.8571	4	95.4263
1 - cycle	0.2440	0.1011	0.1011	0.2022	0.01041	19.4208	4	77.6833
	0.2380	0.0986	0.0986	0.1972	0.01048	18.8167	4	75.2670
2 - cycle	0.1710	0.0708	0.0708	0.1417	0.01038	13.6498	4	54.5993
	0.1670	0.0692	0.0692	0.1364	0.01032	13.4080	4	53.6322
3 - cycle	0.1280	0.0530	0.0530	0.1061	0.01041	10.1880	4	40.7519
	0.1330	0.0551	0.0551	0.1102	0.01069	10.3087	4	41.2347

## Lampiran 3. Data Pengamatan Produksi Galakto-Oligosakarida

## 1. Metode Immobilisasi Keramik

## ▪ Tahap I

Inkubasi	Area		Konsentrasi (ppm)	
	GalOS <sub>2</sub>	GalOS <sub>3</sub>	GalOS <sub>2</sub>	GalOS <sub>3</sub>
3	48.154	17.665	6.994	3.718
6	69.204	29.642	10.052	6.238
9	106.451	41.938	15.462	8.826
12	159.885	53.572	23.223	11.274
24	239.537	66.266	34.793	13.946
48	307.099	91.336	44.606	19.222
72	391.459	100.416	56.860	21.133
96	531.585	125.834	77.213	26.482
120	681.579	157.588	99.000	33.165
144	753.758	171.062	109.484	36.000

## ▪ Tahap II

Inkubasi	Area		Konsentrasi (ppm)	
	GalOS <sub>2</sub>	GalOS <sub>3</sub>	GalOS <sub>2</sub>	GalOS <sub>3</sub>
3	37.221	12.056	5.406	2.537
6	54.489	20.043	7.915	4.218
9	82.810	29.914	12.028	6.295
12	110.578	39.886	16.061	8.394
24	170.119	49.121	24.710	10.338
48	246.711	60.175	35.835	12.664
72	310.166	75.219	45.052	15.830
96	401.888	91.730	58.374	19.305
120	509.364	112.968	73.985	23.774
144	544.576	141.387	79.100	29.755

- Tahap III

Inkubasi	Area		Konsentrasi (ppm)	
	GalOS <sub>2</sub>	GalOS <sub>3</sub>	GalOS <sub>2</sub>	GalOS <sub>3</sub>
3	20.280	8.942	2.946	1.882
6	39.321	13.878	5.711	2.921
9	66.283	21191	9.628	4.460
12	100.593	33617	14.611	7.075
24	152.877	43.086	22.205	9.068
48	218.396	53.193	31.722	11.195
72	268.960	63.934	39.067	13.455
96	334.937	78.736	48.650	16.570
120	392.746	98.667	57.046	20.765
144	433.399	112.139	62.951	23.600

## 2. Metode Natrium Alginat

- Tahap I

Inkubasi	Area		Konsentrasi (ppm)	
	GalOS <sub>2</sub>	GalOS <sub>3</sub>	GalOS <sub>2</sub>	GalOS <sub>3</sub>
3	45.095	4.791	6.550	1.008
6	75.159	19.583	10.917	4.121
9	93.944	27.972	13.645	5.887
12	117.431	39.816	17.057	8.379
24	177.951	57.596	25.847	12.121
48	262.021	72.565	38.059	15.271
72	327.574	91.522	47.580	19.261
96	398.359	106.152	57.862	22.340
120	554.961	118.788	80.608	24.999
144	600.730	148.486	87.256	31.249

▪ Tahap II

Inkubasi	Area		Konsentrasi (ppm)	
	GalOS <sub>2</sub>	GalOS <sub>3</sub>	GalOS <sub>2</sub>	GalOS <sub>3</sub>
3	23.143	3.832	3.362	806
6	38.572	9.120	5.603	1.919
9	64.287	17.865	9.338	3.760
12	107.145	28.251	15.563	5.945
24	153.064	40.359	22.233	8.494
48	191.331	57.655	27.791	12.134
72	237.445	72.069	34.489	15.167
96	300.601	84.087	43.662	17.696
120	362.383	94.240	52.636	19.833
144	503.126	118.538	73.079	24.947

▪ Tahap III

Inkubasi	Area		Konsentrasi (ppm)	
	GalOS <sub>2</sub>	GalOS <sub>3</sub>	GalOS <sub>2</sub>	GalOS <sub>3</sub>
3	14.922	3.215	2.167	677
6	21.318	5.184	3.096	1.091
9	30.454	13.935	4.423	2.933
12	43.507	21.439	6.319	4.512
24	62.151	31.528	9.027	6.635
48	88.787	42.037	12.896	8.847
72	126.839	56.807	18.423	11.955
96	249.446	77.812	36.232	16.376
120	306.775	86.351	44.559	18.173
144	362.383	101.590	52.636	21.380

## 3. Metode DEAE-Cellulosa

## ▪ Tahap I

Inkubasi	Area		Konsentrasi (ppm)	
	GalOS <sub>2</sub>	GalOS <sub>3</sub>	GalOS <sub>2</sub>	GalOS <sub>3</sub>
3	58.928	12.710	8.559	2.675
6	121.701	27.217	17.677	5.728
9	181.466	47.499	26.358	9.996
12	232.806	52.049	33.815	10.954
24	248.405	69.393	36.081	14.604
48	327.574	88.399	47.580	18.604
72	474.540	100.671	68.927	21.186
96	600.730	125.318	87.256	26.373
120	606.002	175.269	88.022	36.886
144	655.711	183.710	95.242	38.662

## ▪ Tahap II

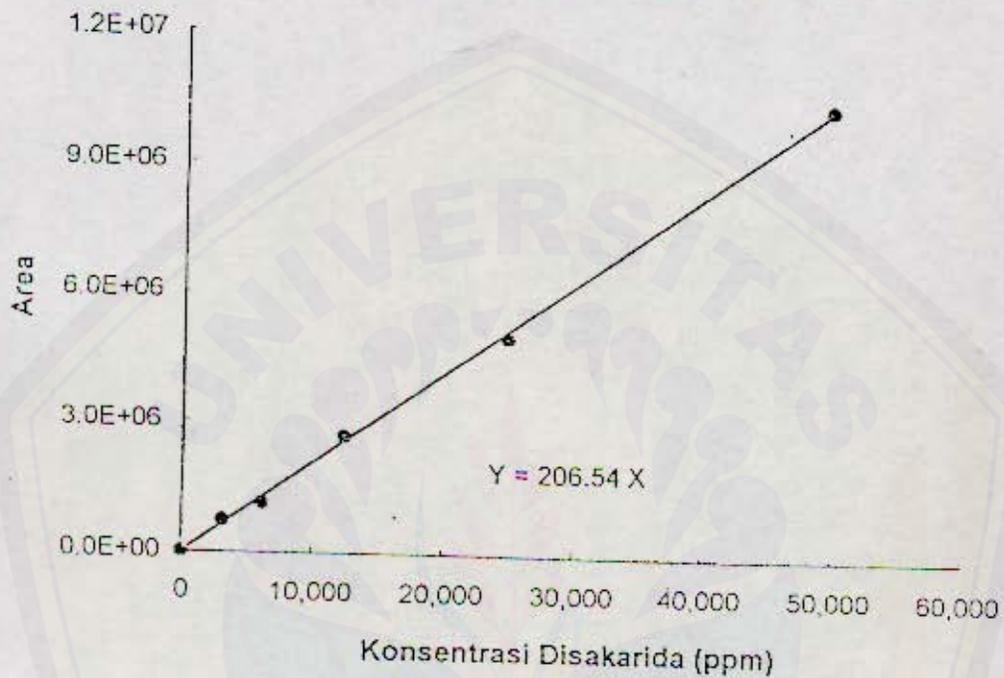
Inkubasi	Area		Konsentrasi (ppm)	
	GalOS <sub>2</sub>	GalOS <sub>3</sub>	GalOS <sub>2</sub>	GalOS <sub>3</sub>
3	31.818	7.664	4.622	1.613
6	43.587	16.808	6.331	3.537
9	61.133	24.935	8.880	5.248
12	76.253	36.940	11.076	7.774
24	152.289	48.288	22.120	10.162
48	225.470	57.933	32.750	12.192
72	313.199	73.426	45.492	15.453
96	471.602	82.994	68.500	17.466
120	554.961	109.491	80.608	23.043
144	583.686	136.863	84.781	28.803

## ▪ Tahap III

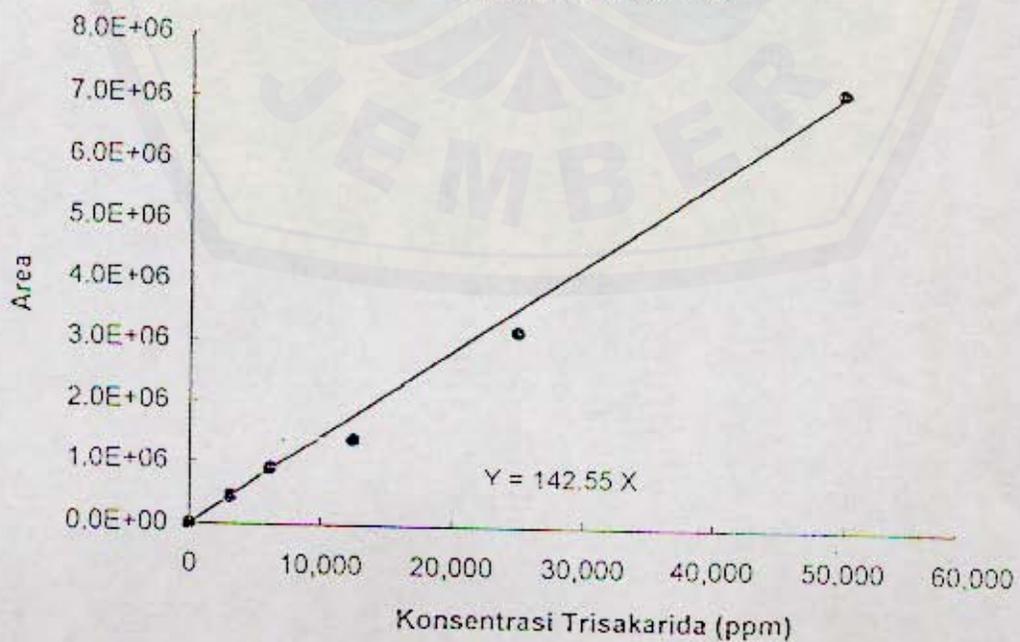
Inkubasi	Area		Konsentrasi (ppm)	
	GalOS <sub>2</sub>	GalOS <sub>3</sub>	GalOS <sub>2</sub>	GalOS <sub>3</sub>
3	26.727	5.347	3.882	1.125
6	33.997	11.451	4.938	2.410
9	48.662	17.753	7.068	3.736
12	61.002	25.005	8.861	5.262
24	127.759	31.854	18.557	6.704
48	198.069	42.472	28.770	8.938
72	213.556	56.902	31.019	11.975
96	263.540	65.405	38.279	13.765
120	303.755	80.448	44.121	16.930
144	398.359	107.984	57.862	22.725

## Lampiran 4. Kurva Standar Sintesa Galaktooligosakarida

Kurva Standar Disakarida



Kurva Standar Trisakarida



Lampiran 5. Data Pengamatan Pengujian Galakto-Oligosakarida pada *Lactobacillus sp.*

Keramik	Jenis Mikroba	waktu inkubasi 3 jam										
		pertumbuhan		pH		rata-rata		OD (absorbansi)		total mikroba		
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
	<i>L. acidophilus</i>	++	+++	5.26	5.3	5.28	0.135	0.131	0.133	8.35E+07	8.01E+07	8.18E+07
	<i>L. bulgaricus</i>	++	++	5.36	5.29	5.33	0.163	0.166	0.165	3.67E+08	3.74E+08	3.71E+08
	<i>L. casei</i>	+	+	5.69	5.66	5.68	0.065	0.067	0.066	1.31E+07	1.37E+07	1.34E+07
	<i>L. plantarum</i>	++	++	5.32	5.29	5.31	0.151	0.133	0.142	2.81E+07	2.46E+07	2.64E+07
	<i>L. rhamnosus</i>	++	++	5.60	5.66	5.63	0.067	0.066	0.067	1.28E+07	1.25E+07	1.26E+07
	<i>L. lactis</i>	++	++	5.28	5.28	5.28	0.109	0.110	0.110	1.92E+07	1.94E+07	1.93E+07

DEAE-Cellulosa	Jenis Mikroba	waktu inkubasi 3 jam										
		pertumbuhan		pH		rata-rata		OD (absorbansi)		total mikroba		
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
	<i>L. acidophilus</i>	+++	+++	5.25	5.29	5.27	0.135	0.137	0.136	8.35E+07	8.52E+07	8.43E+07
	<i>L. bulgaricus</i>	+	++	5.28	5.29	5.29	0.150	0.185	0.168	3.35E+08	4.21E+08	3.78E+08
	<i>L. casei</i>	+	++	5.71	5.72	5.72	0.067	0.069	0.068	1.37E+07	1.42E+07	1.40E+07
	<i>L. plantarum</i>	+	++	5.33	5.29	5.31	0.147	0.158	0.153	2.73E+07	2.95E+07	2.84E+07
	<i>L. rhamnosus</i>	+	++	5.65	5.68	5.67	0.065	0.065	0.065	1.23E+07	1.23E+07	1.23E+07
	<i>L. lactis</i>	+	+	5.34	5.33	5.34	0.103	0.099	0.101	1.80E+07	1.73E+07	1.77E+07

**Natrium Alginat**

Jenis Mikroba	waktu inkubasi 3 jam									
	pertumbuhan		pH		OD (absorbansi)		total mikroba			
	1	2	1	2	1	2	1	2		
<i>L. acidophilus</i>	++++	++++	5.27	5.21	0.132	0.14	0.136	8.09E+07	8.77E+07	8.43E+07
<i>L. bulgaricus</i>	++++	+++	5.15	5.16	0.173	0.207	0.190	3.92E+08	4.76E+08	4.34E+08
<i>L. casei</i>	+++	+++	5.64	5.67	0.069	0.068	0.069	1.42E+07	1.40E+07	1.41E+07
<i>L. plantarum</i>	++	++++	5.30	5.27	0.141	0.131	0.136	2.62E+07	2.42E+07	2.52E+07
<i>L. rhamnosus</i>	+++	++++	5.66	5.63	0.068	0.069	0.069	1.30E+07	1.32E+07	1.31E+07
<i>L. lactis</i>	+	+	5.31	5.34	0.119	0.108	0.114	2.11E+07	1.90E+07	2.00E+07

**Keramik**

Jenis Mikroba	waktu inkubasi 24 jam									
	pertumbuhan		pH		OD (absorbansi)		total mikroba			
	1	2	1	2	1	2	1	2		
<i>L. acidophilus</i>	+++	+++	4.43	4.35	0.393	0.408	0.401	3.03E+08	3.16E+08	3.10E+08
<i>L. bulgaricus</i>	+++	+++	4.63	4.57	0.275	0.296	0.286	6.45E+08	6.97E+08	6.71E+08
<i>L. casei</i>	+++	+++	5.59	5.63	0.070	0.069	0.070	1.45E+07	1.42E+07	1.44E+07
<i>L. plantarum</i>	+++	+++	4.43	4.41	0.463	0.459	0.461	8.96E+07	8.88E+07	8.92E+07
<i>L. rhamnosus</i>	+	++	5.63	5.58	0.066	0.085	0.076	1.25E+07	1.72E+07	1.48E+07
<i>L. lactis</i>	++	++	4.69	4.50	0.240	0.261	0.251	4.41E+07	4.81E+07	4.61E+07

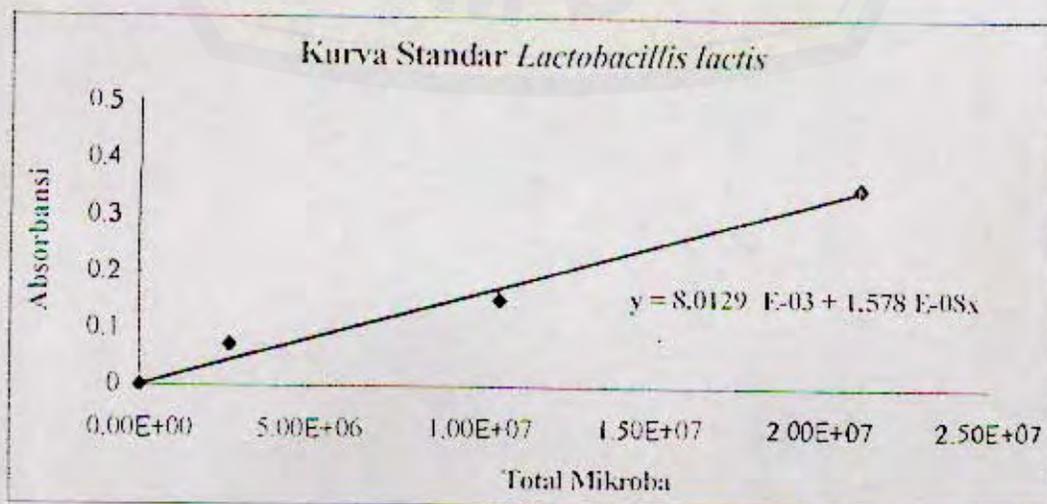
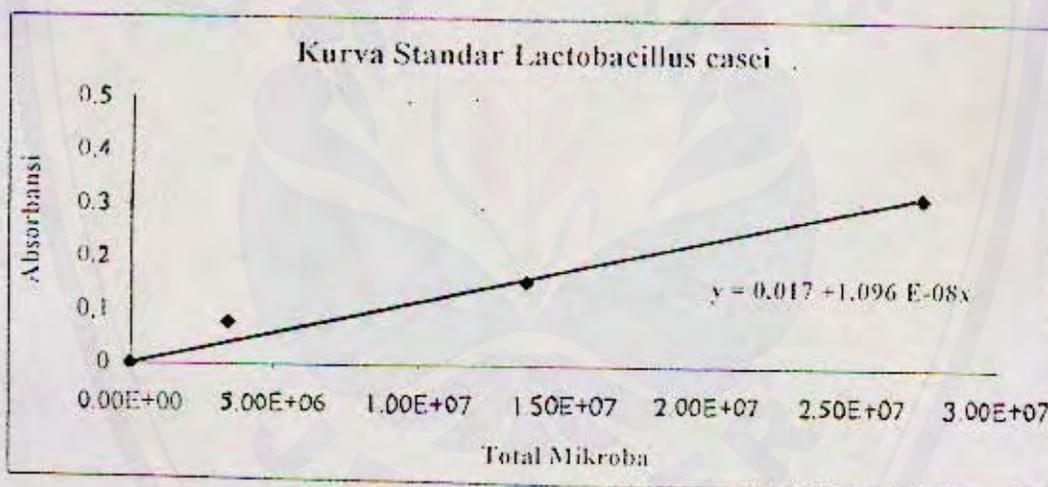
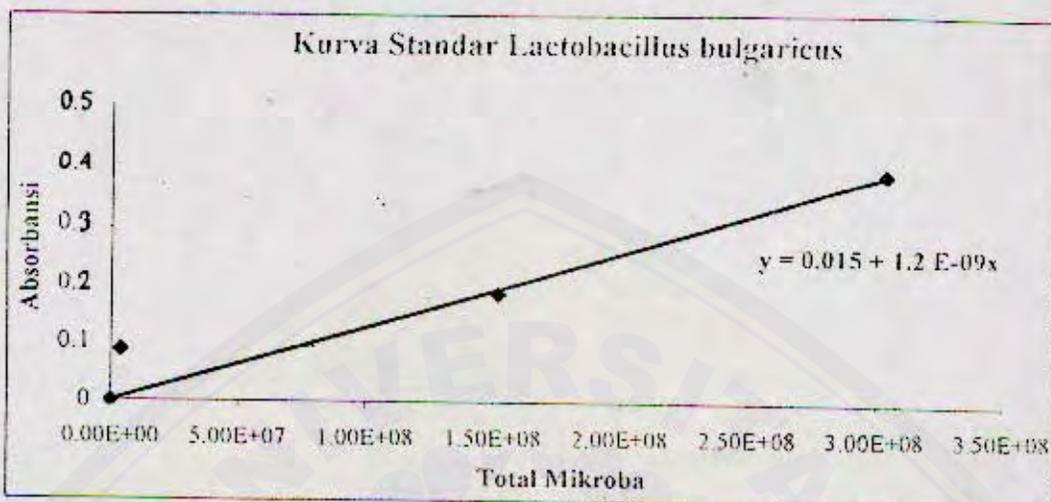
**DEAE-Cellulosa**

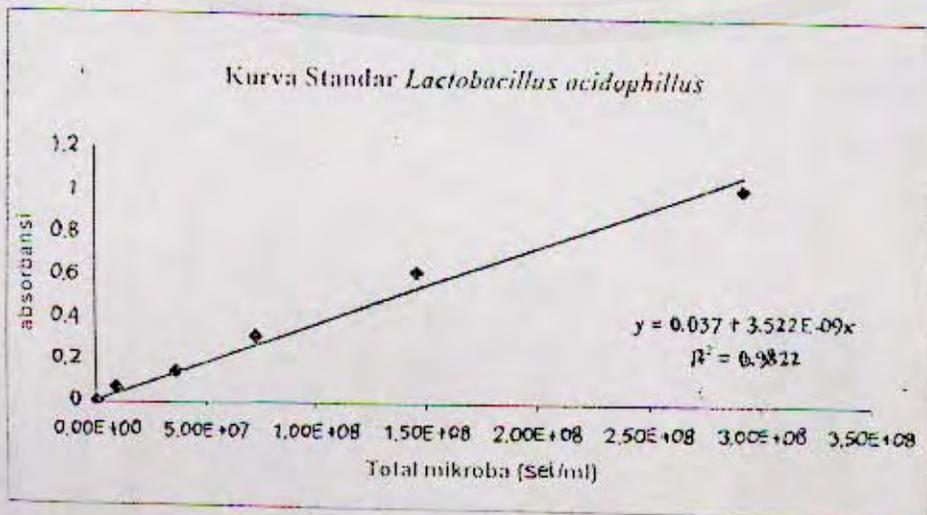
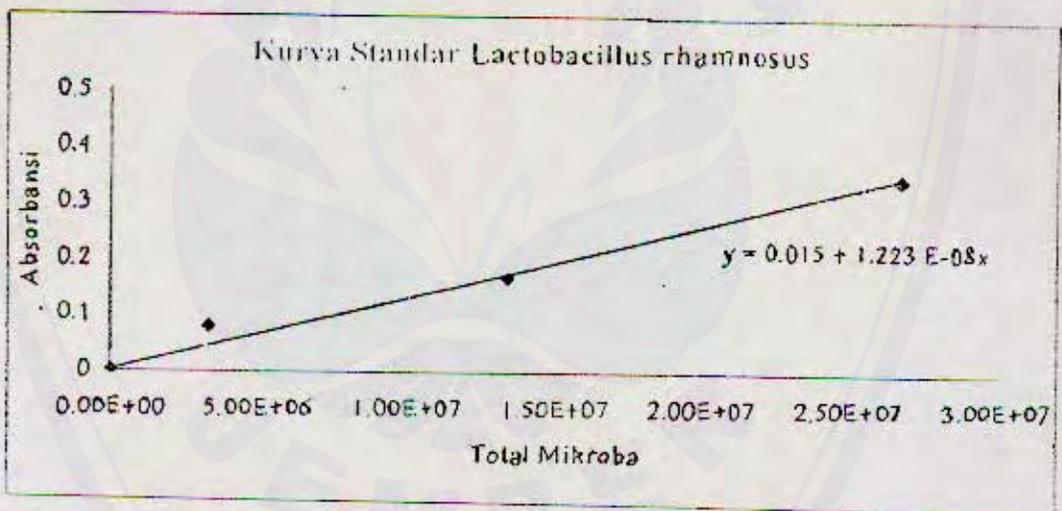
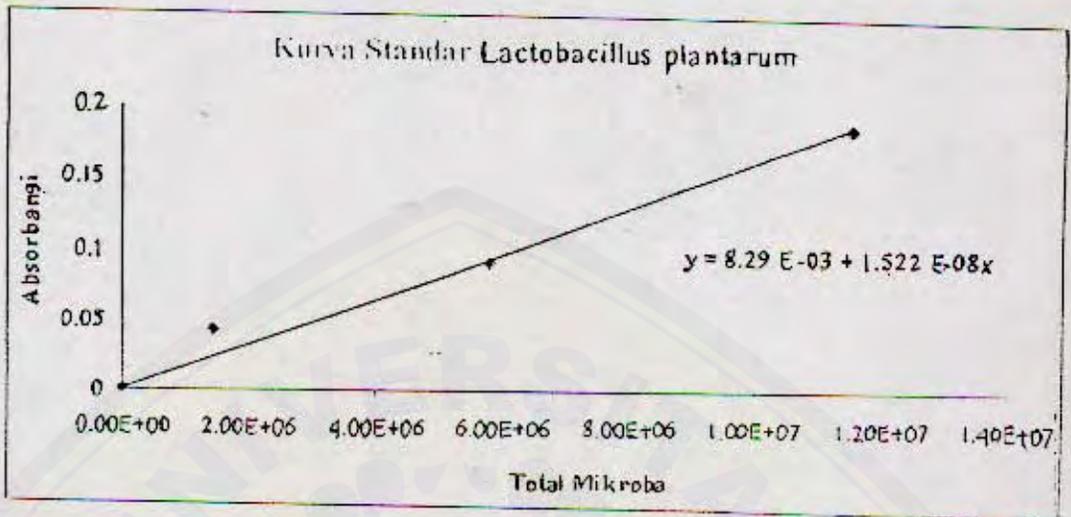
Jenis Mikroba	waktu inkubasi 24 jam											
	pertumbuhan		pH		rata-rata		OD (absorbansi)		total mikroba			
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2		
<i>L. acidophilus</i>	++++	++++	4.42	4.42	4.42	4.42	0.448	0.427	0.438	3.50E+08	3.32E+08	3.41E+08
<i>L. bulgaricus</i>	++++	+++	4.61	4.61	4.61	4.61	0.320	0.325	0.323	7.56E+08	7.69E+08	7.62E+08
<i>L. casei</i>	+++	+++	5.67	5.69	5.68	5.68	0.080	0.076	0.078	1.72E+07	1.61E+07	1.67E+07
<i>L. plantarum</i>	++	++++	4.39	4.42	4.41	4.41	0.494	0.502	0.498	9.57E+07	9.73E+07	9.65E+07
<i>L. rhamnosus</i>	+++	++++	5.68	5.67	5.68	5.68	0.081	0.079	0.080	1.62E+07	1.57E+07	1.59E+07
<i>L. lactis</i>	+	+	4.69	4.65	4.67	4.67	0.342	0.327	0.335	6.35E+07	6.06E+07	6.20E+07

**Natrium alginat**

Jenis Mikroba	waktu inkubasi 24 jam											
	pertumbuhan		pH		rata-rata		OD (absorbansi)		total mikroba			
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2		
<i>L. acidophilus</i>	++++	++++	4.33	4.34	4.34	4.34	0.38	0.525	0.453	2.92E+08	4.16E+08	3.54E+08
<i>L. bulgaricus</i>	++++	+++	4.53	4.48	4.51	4.51	0.301	0.384	0.343	7.09E+08	9.15E+08	8.12E+08
<i>L. casei</i>	++	+++	5.62	5.67	5.65	5.65	0.129	0.069	0.099	3.07E+07	1.42E+07	2.24E+07
<i>L. plantarum</i>	+++	++++	4.35	4.32	4.34	4.34	0.442	0.486	0.464	8.55E+07	9.42E+07	8.98E+07
<i>L. rhamnosus</i>	+++	++++	5.67	5.67	5.67	5.67	0.073	0.099	0.086	1.42E+07	2.06E+07	1.74E+07
<i>L. lactis</i>	+	+	4.53	4.61	4.57	4.57	0.294	0.294	0.294	5.43E+07	5.43E+07	5.43E+07

Lampiran 6. Kurva Standar Total Mikroba





**Lampiran 7. Cara Membuat larutan Buffer Phosphat 0,01 M pH 7.**

Spesifikasi larutan yang tersedia :

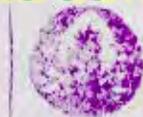
- Larutan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2 M (27,8 g dalam 1000 mL)
- Larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M (52,65 g dalam 1000 mL)

Untuk membuat larutan tersebut menjadi 0,01 M, maka:

- $\frac{0,01M}{0,2M} \times 27,8 \text{ g NaH}_2\text{PO}_4 = 1,39 \text{ g}$  (dalam 1000mL)
- $\frac{0,01M}{0,2M} \times 52,65 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 = 2,63 \text{ g}$  (dalam 1000mL)

Prosedur pembuatan larutan buffer sebagai berikut:

- Mencampurkan larutan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dengan larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  sedikit-sedikit. Volume larutan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  lebih banyak.
- Waktu mencampurkan harus tetap diaduk agar dapat terdistribusi merata (dapat menggunakan stirrer).
- Indikator pH meter yang telah dikalibrasi tetap tercelup campuran larutan agar perubahan pH dapat terdeteksi.
- Tera pH sampai angka yang diinginkan.

**Lampiran 8. Cara Analisa GalOS Menggunakan HPLC Merk Perkin Elmer**

Prosedur analisa GalOS menggunakan HPLC sebagai berikut:

1. Tekan tombol ON/OFF pada alat, muncul tampilan menu pada alat
2. Tekan tombol F2 (pada pompa) untuk mengatur laju (*flow*) aliran eluen
3. Cek aliran selang A dan B (Eluen = acetonitrile : air ; 80/20) dan pastikan pompa tidak tersumbat dan berfungsi dengan baik, kemudian untuk selang A laju sampai 100% secara bergantian, kondisi selang tidak tersumbat jika dari kedua selang tersebut keluar teratur
4. Jalankan HPLC dengan laju eluen rendah (0,2 mL/menit atau 0,5 mL/menit) kemudian secara bertahap dinaikkan sampai mempunyai laju yang sama dengan larutan standar
5. Jika pada monitor terlihat garis lurus (*baseline*) maka sampel siap untuk diinjeksikan
6. Tekan tombol F5 (*stop*) pada pompa sebelum menginjeksikan sampel ke-2, dan tombol F8 untuk menjalankan kembali
7. Buka tabung ineksi kemudian injeksikan sampel dalam keadaan alat berjalan dan segera tutup kembali
8. Setelah beberapa menit tunggu *peak* berupa puncak pada monitor muncul, setelah itu biarkan sampai *baseline* kembali
9. Setelah *baseline* tekan tombol F5 pada pompa, biarkan *print out* selesai kemudian tekan F8 dan injeksikan sampel berikutnya.

Hal-hal teknis yang perlu diperhatikan sebagai berikut:

1. Cek rangkaian alat sudah terangkai semua, mulai HPLC, Kolom, RID dan monitor komputer
2. Cek isi eluen, usahakan cukup untuk analisa sampel
3. Sesuaikan sampel dengan jenis kolom maupun eluen yang digunakan
4. Kendorkan dahulu pompa untuk mengetahui berfungsi dengan baik atau tidak, setelah itu kencangkan kembali
5. Volume sampel yang diinjeksikan minimal 20  $\mu$ L

6. Selalu periksa tekanan pompa, jika mendekati batas maksimal (berarti kolom lewat jenuh), hentikan injeksi, cuci kolom dengan pelarut (metanol : aquabidest) hingga tekanan normal kembali

