



**APLIKASI FLUIDIZED BED REACTOR
DENGAN β -GALAKTOSIDASE AMOBIL DARI *Escherichia coli*
UNTUK PRODUKSI SENYAWA PREBIOTIK
GALAKTO-OLIGOSAKARIDA**

**KARYA ILMIAH TERTULIS
(SKRIPSI)**



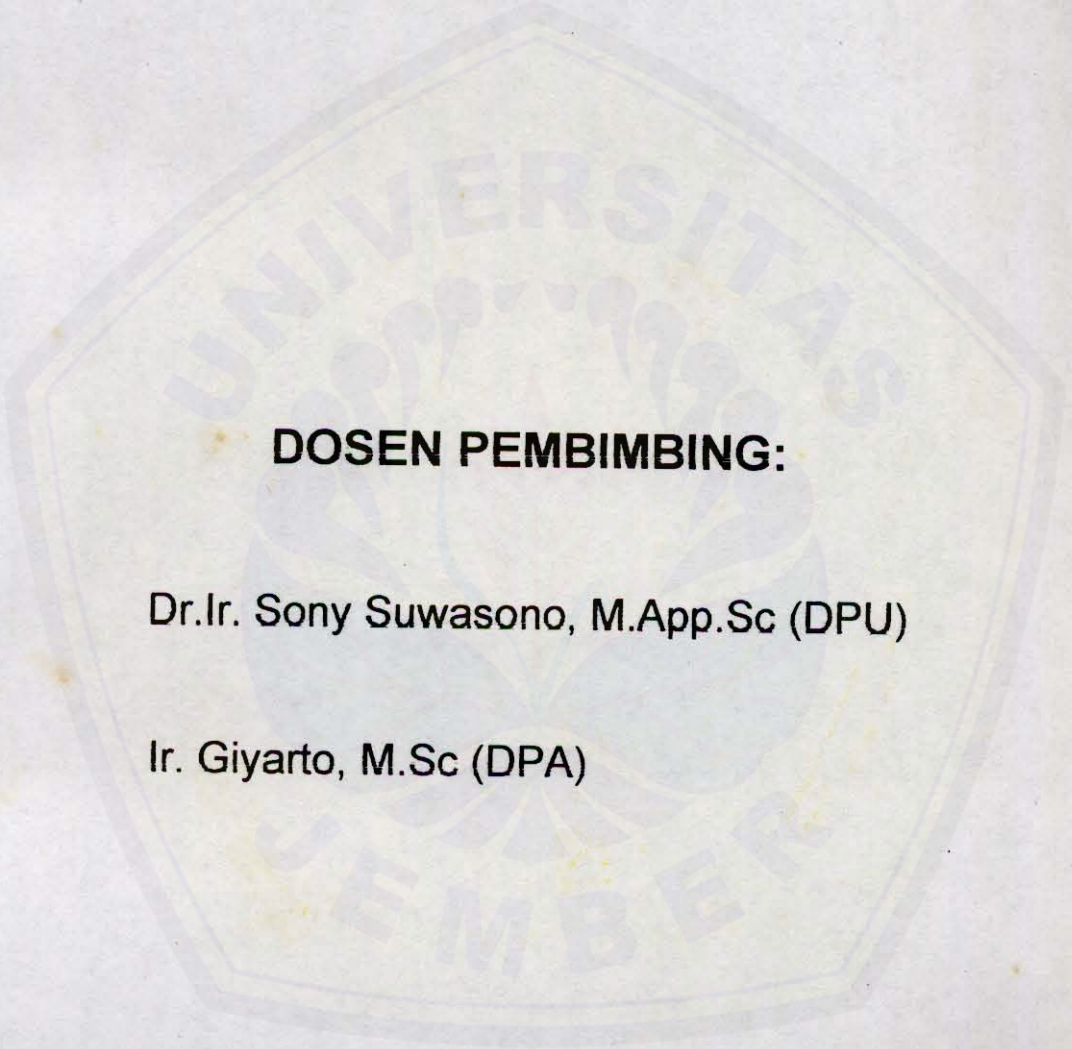
Diajukan Guna Memenuhi Salah Satu Syarat Untuk
Menyelesaikan Pendidikan Program Strata Satu
Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember

Oleh :

Asal: dan ...	Klass
Terima: 15 MAR 2004	Pembelian	576.119
No. Induk:		MAH
Pengantar: ...	SM	a

FATTA KHUDDIN MAHMUD
991710101057

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



DOSEN PEMBIMBING:

Dr.Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc (DPU)

Ir. Giyarto, M.Sc (DPA)

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

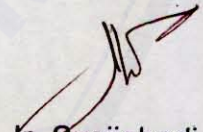
Ketua


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

Anggota I


Ir. Giyarto, M.Sc
NIP. 132 524 412

Anggota II


Ir. Susijahadi, MS
NIP. 130 287 109

Mengesahkan
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian



Ir. Siti Hartanti, MS
NIP. 130 350 763

MOTTO

إِنَّ اللَّهَ لَا يُغَيِّرُ مَا بِقَوْمٍ حَتَّىٰ يُغَيِّرُوا مَا بِأَنْفُسِهِمْ ﴿الرعد: ١١﴾

*Artinya: "Sesungguhnya Allah tidak akan merubah keadaan suatu kaum, sehingga mereka merubah keadaan yang ada pada diri mereka sendiri."
(Q.S: Ar-ra'ad, 13).*

Halaman Persembahan

Segala puji hanya kepada ALLAH SWT. yang selalu melimpahkan rahmat dan hidayahnya kepadaku walaupun aku sering lupa kepada-Nya. Sholawat serta salam turunkan kepada junjunganku Nabi Besar Muhammad SAW. atas suri tauladan dalam menjalani hidup.

Kupersembahkan Karyaku selama ini setelah melalui perjuangan dengan tetesan keringat dan air mata, tawa dan cinta yang tulus ini untuk:

Ayahanda Alm. Umar Hasan yang dengan penuh tanggung jawab membesarkan titipan-Nya, semoga segala budi kebaikanmu dibalas oleh-Nya.

Ibunda Marsili "she's the real god in the world" dengan segala daya dan do'anya yang tulus mengantarku menuju cahaya kehidupan yang lebih terang.

Saudara-saudaraku nun jauh disana (mas Amir, mbak Yeni dan Si kecil arman di Manado yang selalu hangat dengan rica-ricanya, mbak Nur, mas Lis dan isal, (pengalaman kalian sungguh berarti bagiku) dan adik Puji dan Andik di Padang) tapi kalian selalu terasa dekat denganku.

Pak Dhe, Bu Dhe dan Pak Le', Bu Le' serta keponakan-keponakanku trim's atas kepercayaannya.

Pergerakanku, terima kasih engkau telah memberiku kaca mata kehidupan

Sebuah gitar tua yang selalu menemaniku dalam suka dan duka.

Tidak pernah ada batas dari ilmu pengetahuan. Ilmu pengetahuan selamanya tidak mengenal titik, yang ada hanyalah koma. Trim's Alma-mater yang kubanggakan.

Spesial Thank's To:

- ❖ Keluarga Pak Sony Suwasono yang selalu membukakan pintu setiap saat, atas motivasi dan guyonannya
- ❖ Sahabatku Anwar (darimu aku belajar banyak hal) dan Ke' Johan (jangan mengalah terus) bersama kalian aku pernah "berteduh" dari hujan dan sengatan panasnya mentari Kota Jember
- ❖ Teman-temanku Penelitian: Arifin (*partnership*, ternyata Suroboyo nggak panas yo he he he, onde2 ne), dan U2 (Yoyok "Pe" n Yeni)
- ❖ Pak Pay yang dengan sabar menularkan dunia *cybernya*
- ❖ Mbak Sri (akademik) tanpa sampean mungkin aku tidak bisa ujian hari itu, makasih banget ya
- ❖ Gank Brantas, Echo, Mat Jhebol, Mbah Ma'ul, CNRT dan sahabat-sahabat di Komisariat TP
- ❖ Camat "Snider", Dewo "Ronggo Lawe", Nur Adhi "Glowoh", Embes, Afi selama bertahun-tahun bersama kalian aku berproses
- ❖ Adik-adikku '00 yang pinter-pinter, Luluk (tissuenya wangi n permennya manis dech), Windi (sepedaku bisa hilang lho), Reagen (motivasi nye) and Wiwid, kalian sabar menunggu aku ujian
- ❖ Teman-temanku waktu masih menjadi "artis" : Yedi, Ma'il, Kiki "imut", Dodik, Doni, Dewi, DegrunK kapan *Coffe Shop* ngeband lagi "nice to met you"
- ❖ Temanku di KOTEKA, Hari "Glomping", Zak "Ninik" n Ami'. atas kerjasamanya
- ❖ Bocah-bocah mblitar Farid, Aris "Gutawa", Wisnu "Mr. Black", Nita, Mursyid, Daris, Sarip, Kozin, Jati and lain-lainnya atas hiburannya
- ❖ Gank Al-Fath Komputer: Pak Kewok, Aris "coro", Feri, Arif "Gembol", Hadi "Ebes", Ilzam (transletnya), Hadi "bengkring", Jaelani, Pak "nduz", Mas Krisna, Teguh, Tajjudin "Ustadz", dan Mas Didok, bersama kalian aku bercanda tawa, adu suara dan kadang adu jothos
- ❖ Para Teknisi: Pak Mulya dan Bu Anik (UNAIR) dan Mbak Widhi (makasih atas masukannya), Mas Mistar n Mbak Wim, Mbak Ketut dan Mbak sari
- ❖ Teman-teman angkatan 99 semua.

KATA PENGANTAR

Puji syukur alhamdulillah penulis panjatkan kehadirat Allah S.W.T. yang telah memberikan rahmat dan ridlo-Nya sehingga dapat terselesaikannya Karya Ilmiah Tertulis dengan judul **“APLIKASI FLUIDIZED BED REACTOR DENGAN β -GALAKTOSIDASE AMOBIL DARI *Escherichia coli* UNTUK PRODUKSI SENYAWA PREBIOTIK GALAKTO-OLIGOSAKARIDA”**.

Karya Ilmiah Tertulis ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan Strata Satu pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

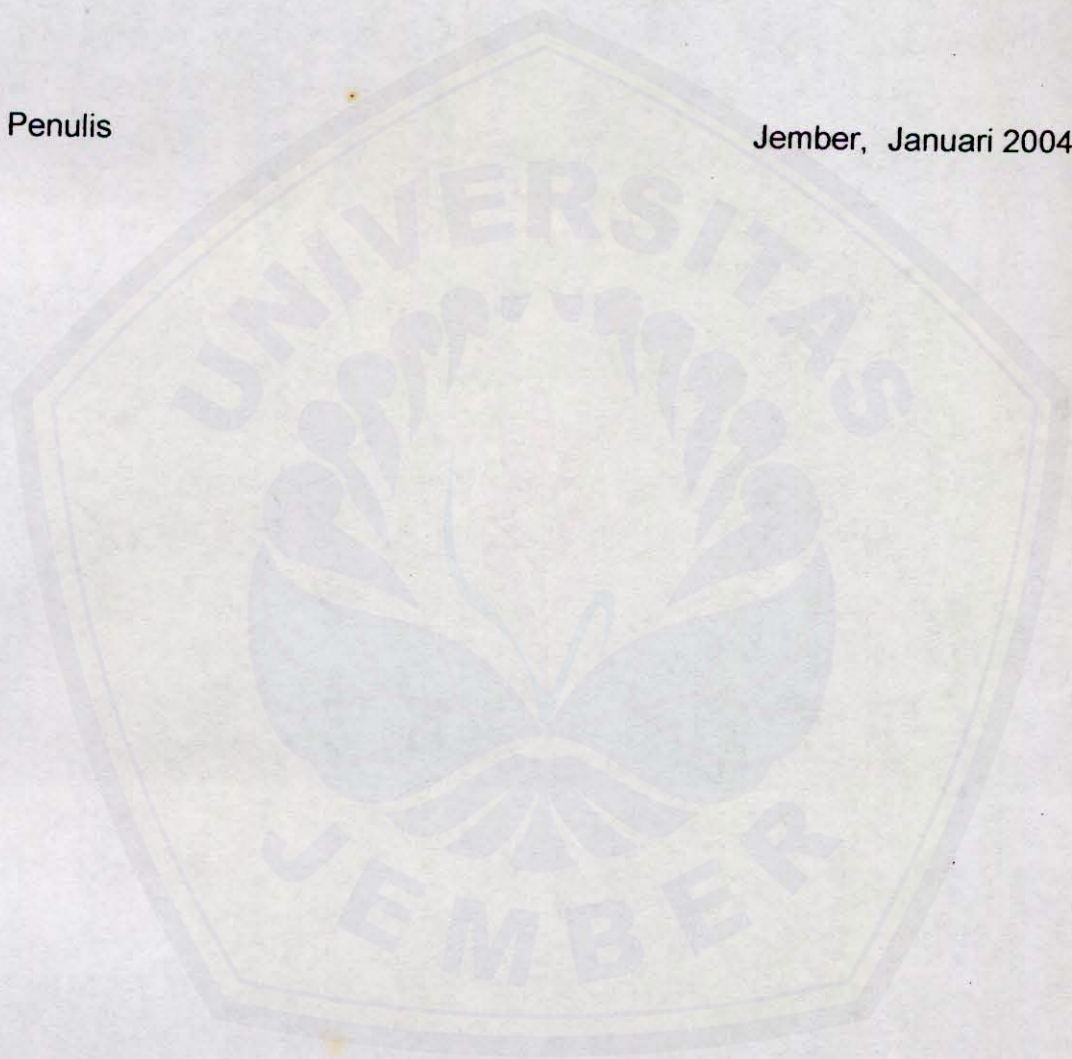
Dalam proses penulisan skripsi ini penulis banyak mendapat bantuan dan fasilitas dari berbagai pihak. Pada kesempatan yang baik ini, dengan penuh rasa hormat dan rendah hati penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ir.Hj.Siti Hartanti, MS., selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian
2. Ir. Susijahadi, MS., selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
3. Dr.Ir. Sony Suwasono, M.App,Sc., selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU)
4. Ir. Giyarto, M.Sc, selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA I)
5. Nita Kuswardhani, S.TP. M.Eng., selaku dosen wali yang telah membimbing penulis selama kuliah
6. Bapak dan Ibu dosen yang telah memberikan tambahan ilmu tak ternilai harganya
7. Segenap teknisi laboratorium, Mbak Widi, Pak Sarimin, Mbak Ketut, Mbak Sari, Mbak Wim, Mas Mistar, Mas Tasor, Mas Dian yang telah banyak membantu hingga terselesaikannya naskah skripsi ini
8. Segenap karyawan dan karyawan Fakultas Teknologi Pertanian yang telah membantu memperlancar studiku
9. Semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu penulisan Karya Tulis Ilmiah ini.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa penulisan skripsi ini masih banyak kekurangannya. Oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun demi kesempurnaan tulisan ini. semoga tulisan ini dapat bermanfaat kepada penulis khususnya dan masyarakat pada umumnya.

Penulis

Jember, Januari 2004



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
DOSEN PEMBIMBING	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
MOTTO	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
RINGKASAN	xv
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelian	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Makanan Fungsional	7
2.2 Oligosakarida	9
2.3 Galakto-oligosakarida (GalOS)	12
2.4 Probiotik dan Prebiotik	
2.4.1 Probiotik	14
2.4.2 Prebiotik	15
2.5 Sintesa Galakto-oligosakarida Secara Enzimatis	
2.5.1 Enzim β -Galaktosidase	20
2.5.2 Imobilisasi Enzim β -Galaktosidase dan Penggunaannya dalam Reaksi Sintesa	23
2.6 FBR (<i>Fluidized Bed Reactor</i>).....	27

2.7 Bakteri Asam Laktat	27
2.8 Hipotesa	31
III. METODOLOGI PENELITIAN	
3.1 Bahan dan Alat	
3.1.1 Bahan	32
3.1.2 Alat	32
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	32
3.3 Metode Penelitian	
3.3.1 Rancangan Percobaan	33
3.3.2 Pelaksanaan Penelitian	34
3.3.3 Urutan Kerja	
A. Tahap Pertama: Produksi Homo-GalOS	38
B. Tahap Kedua: Pengujian Homo-GalOS	39
3.4 Pengamatan	40
3.5 Prosedur Analisa	40
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Metode Imobilisasi	43
4.2 Sintesa Homo-Galaktooloisakarida	48
4.3 Pengujian Homo-GalOS pada <i>Lactobacillus sp</i>	54
V. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	58
5.2 Saran	58
DAFTAR PUSTAKA	59
LAMPIRAN	66

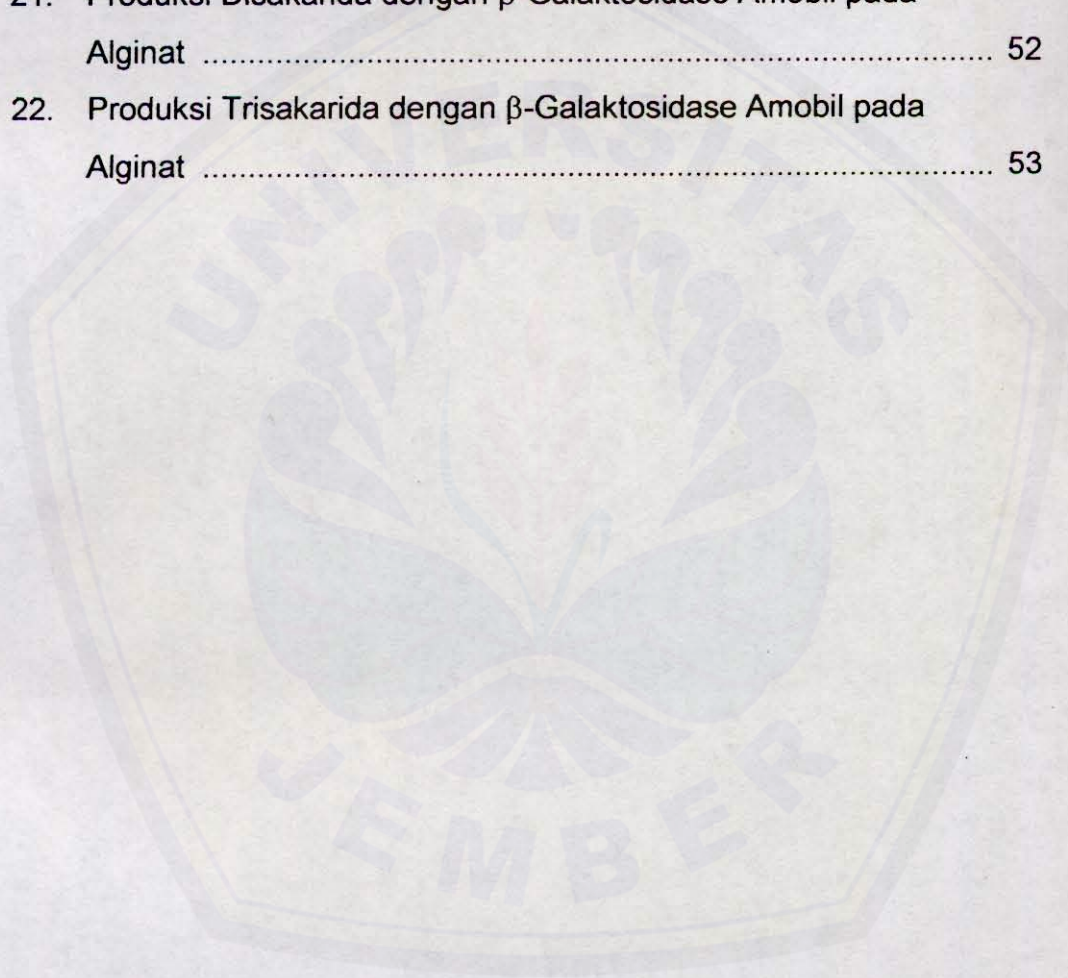
DAFTAR TABEL

Tabel	Teks	Halaman
1.	Dosis Maksimum Oligosakarida yang tidak Menimbulkan Diare .	10
2.	Oligosakarida, Disakarida dan Polioliol yang dapat Meningkatkan <i>Bifidobakteri</i> dan Bakteri Asam Laktat dalam Saluran Pencernaan	11
3.	Perkiraan Struktur Homo-GalOS yang Diproduksi Menggunakan Enzim β -Galaktosidase dalam Bentuk Bebas	14
4.	Produksi Prebiotik di Jepang tahun 1995	18
5.	Komposisi Kimia dan Karakteristik Prebiotik	19
6.	Aktivitas Enzim β -Galaktosidase Bebas dan Amobil	43
7.	Tingkat Aktivitas Enzim β -Galaktosidase Imobilisasi Setelah Beberapa Siklus	48
8.	Produksi GalOS (ppm) dengan β -Galaktosidase Teramobil pada Matriks Setelah Beberapa Siklus Reaksi Selama 144 Jam	53
9.	Pertumbuhan <i>Lactobacillus</i> dengan Penambahan Homo-GalOS	55

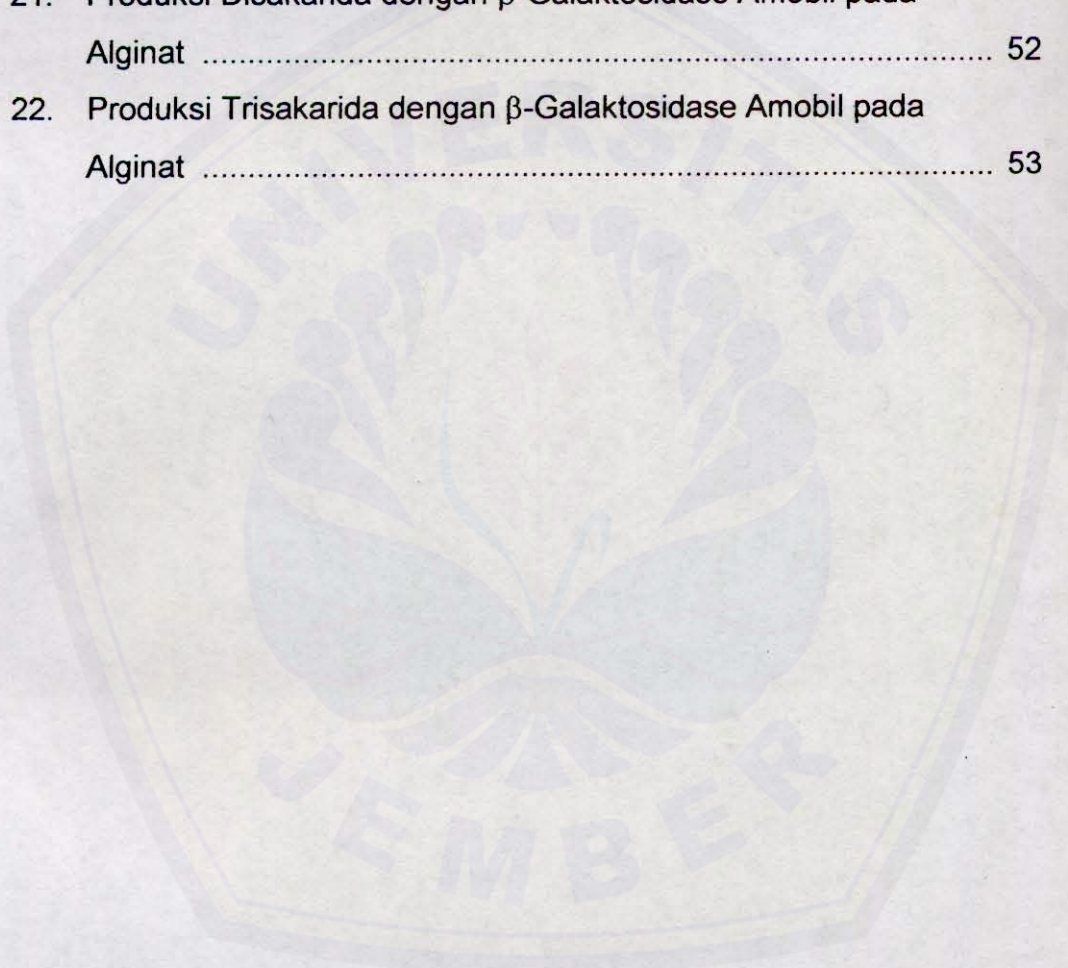
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Teks	Halaman
1.	Hidrolisa Laktosa	21
2.	Skema Reaksi Hidrolisa dan Sintesa	22
3.	Skema Reaksi Sintesa Secara Kinetika	23
4.	Metode Imobilisasi Enzim	24
5.	Metode Penyangga oleh NH ₂ -Enzim yang Terikat Glutaraldehyd	25
6.	Jalur Fermentasi Glukosa (A) Homofermentatif (Glikolisis, Jalur Emden Meyerhoff) : (B) Heterofermentatif (6-Fosfo-Glukonat / Fosfoketolase)	30
7.	Metabolisme Galaktosa pada Bakteri Asam Laktat (A) Jalur tagatose-6-Fosfat (B) Jalur Leloir	31
8.	Aplikasi FBR dalam Sintesa Homo-GalOS dari D+Galaktosa oleh Enzim β -Galaktosidase dari <i>Escherichia coli</i>	33
9.	Imobilisasi β -Galaktosidase dari <i>Escherichia coli</i> pada Keramik	34
10.	Imobilisasi β -Galaktosidase dari <i>Escherichia coli</i> pada DEAE-Cellulosa	35
11.	Imobilisasi β -Galaktosidase dari <i>Escherichia coli</i> pada Alginat ..	36
12.	Evaluasi Aktivitas Enzim	37
13.	Diagram Alir Produksi Homo-GalOS Secara Enzimatis Menggunakan Enzim β -Galaktosidase Amobil dari <i>Escherichia coli</i> ...	38
14.	Diagram Alir Pengujian Homo-GalOS Terhadap Beberapa Bakteri Asam Laktat	39
15.	Enzim Bebas dan Amobil	45
16.	Difusi Eksternal dan Internal Substrat pada Sistem Enzim Amobil	46
17.	Produksi Disakarida dengan β -Galaktosidase Amobil pada Keramik	49

18. Produksi Trisakarida dengan β -Galaktosidase Amobil pada Keramik	50
19. Produksi Disakarida dengan β -Galaktosidase Amobil pada DEAE-Cellulose	51
20. Produksi Trisakarida dengan β -Galaktosidase Amobil pada DEAE-Cellulose	51
21. Produksi Disakarida dengan β -Galaktosidase Amobil pada Alginat	52
22. Produksi Trisakarida dengan β -Galaktosidase Amobil pada Alginat	53



18. Produksi Trisakarida dengan β -Galaktosidase Amobil pada Keramik	50
19. Produksi Disakarida dengan β -Galaktosidase Amobil pada DEAE-Cellulose	51
20. Produksi Trisakarida dengan β -Galaktosidase Amobil pada DEAE-Cellulose	51
21. Produksi Disakarida dengan β -Galaktosidase Amobil pada Alginat	52
22. Produksi Trisakarida dengan β -Galaktosidase Amobil pada Alginat	53



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Teks	Halaman
1.	Kurva Standar p-nitrophenol dan Absorbansi.....	66
2.	Hasil Perhitungan Aktivitas Enzim β -Galaktosidase Bebas	67
3.	Hasil Perhitungan Aktivitas Enzim β -Galaktosidase Teramobil pada Keramik	67
4.	Hasil Perhitungan Aktivitas Enzim β -Galaktosidase Teramobil pada Alginat	68
5.	Hasil Perhitungan Aktivitas Enzim β -Galaktosidase Teramobil pada DEAE-Cellulose	68
6.	Hasil Perhitungan Total Aktivitas Enzim	69
7.	Hasil Perhitungan Total Aktivitas Enzim setelah Beberapa Siklus	69
8.	Data Pengamatan Produksi Galaktooligosakarida	70
9.	Hasil Pengamatan Pengujian GalOS dalam Media MRS-Broth pada Spesies <i>Lactobacillus sp.</i> Untuk Waktu Inkubasi 3 jam	73
10.	Hasil Pengamatan Pengujian GalOS dalam Media MRS-Broth pada Spesies <i>Lactobacillus sp.</i> Untuk Waktu Inkubasi 24 jam ...	74
11.	Cara Membuat Larutan Buffer Fosfat 0,01 M pH 7,0	75
12.	Cara Analisa GalOS Menggunakan HPLC Merk Perkin Elmer ...	75
13.	Contoh Perhitungan Jumlah Enzim yang Ditambahkan	76
14.	Pembuatan Kurva Standar Total Mikroba <i>Lactobacillus sp.</i>	76
15.	Kurva Standar Total Mikroba	77
16.	Kurva Standar Sintesa Galaktooligosakarida	79

Fatta Khuddin Mahmud (991710101057) Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember “**Aplikasi Fluidized Bed Reactor dengan β -Galaktosidase Amobil dari *Escherichia coli* Untuk Produksi Senyawa Prebiotik Galaktoligosakarida**”, dibimbing oleh Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc dan Ir. Giyarto, M.Sc.

RINGKASAN

Prebiotik merupakan karbohidrat yang tidak dapat dicerna dan bermanfaat untuk memacu pertumbuhan dan perkembangan bagi bakteri probiotik dalam usus besar dan menurunkan jumlah bakteri patogenik. Senyawa homo-GalOS dapat diproduksi dengan menggunakan enzim β -Galaktosidase dari *Escherichia coli* dalam keadaan amobil. Imobilisasi dapat dilakukan dengan prinsip dasar: ikatan kovalen (pengikat silang), absorpsi anionik, dan pemerangkapan dengan membran. Penggunaan bioreaktor tipe FBR dengan enzim berada pada fase diam memiliki keuntungan diantaranya: tingkat kerusakan karena faktor mekanik rendah, *reusebel*, pemurnian enzim lebih mudah, pengambilan produk lebih mudah.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh metode imobilisasi terhadap enzim β -Galaktosidase selama produksi homo-GalOS, dan mengetahui aktivitas enzim teramobil setelah beberapa siklus produksi; serta memastikan bahwa GalOS yang dihasilkan mampu berfungsi sebagai pemacu pertumbuhan bagi beberapa spesies *Lactobacillus sp.* Untuk produksi homo-GalOS, substrat yang digunakan yaitu galaktosa 40% (w/w), pH media 7, suhu 60°C dan waktu inkubasi selama 7 hari serta enzim diimobilisasi dengan tiga metode yaitu ikatan silang glutaraldehid pada keramik, perangkap dalam Na-alginat dan absorpsi anionik pada DEAE-Cellulose. Pengaruh penambahan homo-GalOS terhadap pertumbuhan dan perkembangan *Lactobacillus sp* dapat diketahui dari perubahan pH, kerapatan optik dan perhitungan total mikroba setelah diinkubasi 3 jam dan 24 jam. Hasil penelitian disajikan dalam bentuk grafik hasil produksi homo-GalOS dan tabel.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode imobilisasi berpengaruh terhadap aktivitas enzim. Enzim secara keseluruhan mengalami penurunan aktivitas sekitar 20%. Setelah proses produksi diperoleh nilai penurunan aktivitas enzim teramobil 20-30% pada siklus 1, 40-50% siklus 2 dan 70-80% pada siklus 3. Enzim yang diimobilisasi dengan ikatan silang pada keramik mampu memberikan konsentrasi GalOS yang lebih tinggi yaitu 265.840 ppm disakarida dan trisakarisa 61.593 ppm. Konsentrasi GalOS terendah dihasilkan oleh enzim yang terperangkap dalam natrium alginat yaitu 144.012 ppm disakarida dan 88.127 ppm trisakarisa. Bakteri *Lactobacillus achidophilus* menunjukkan pertumbuhan yang terbaik (nilai total mikroba terbesar) pada media MRS-Broth yang ditambahkan dengan *growth promotor* homo-GalOS.



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pangan merupakan salah satu kebutuhan dasar manusia yang penting. Semakin maju suatu bangsa, tuntutan dan perhatian terhadap kualitas pangan yang akan dikonsumsi semakin besar. Tujuan konsumsi pangan bukan lagi sekedar mengatasi rasa lapar, tetapi semakin kompleks. Konsumen semakin sadar bahwa pangan merupakan sumber utama pemenuhan kebutuhan zat-zat gizi dan non-gizi yang diperlukan oleh tubuh.

Manusia untuk memenuhi persediaan pangannya banyak mengambil dari tanaman dan hewan. Seiring dengan perkembangan zaman, adalah suatu hal yang menarik untuk berspekulasi terhadap bahan pangan sintetis dari hasil sintesa mikroorganisme yang sekarang dimungkinkan dibuat di laboratorium. Secara ekonomi dan ilmiah masalah ini adalah sangat mungkin untuk diwujudkan.

Pemanfaatan mikroorganisme dalam proses pengadaan pangan sudah lama berkembang beberapa tahun yang silam. Beberapa hasil telah dicapai dan dapat dilihat diberbagai bidang, misalnya dalam bidang medis (ditemukannya antibiotik), pertanian (jagung BT), industri (produksi alkohol, pembuatan tempe, *yoghurt*), dan beberapa bidang lainnya.

Para peneliti di dunia membuktikan pentingnya peranan mikroflora atau bakteri saluran pencernaan bagi kesehatan. Pada kenyataanya ekosistem mikroflora usus mempengaruhi munculnya penyakit degeneratif. Komposisi bakteri dalam tinja seseorang bisa menjadi indikator kondisi kesehatan seseorang. Di Jepang, uji mikrobiologis feses biayanya bisa 100 ribu yen (sekitar delapan juta rupiah). Karena itu upaya menjaga keseimbangan mikroflora usus menjadi signifikan diperlukan.

Manajemen mikroflora terutama pada usus dapat dilakukan dengan memberikan senyawa yang dapat memacu pertumbuhan mikroflora menguntungkan yang dalam hal ini bakteri asam laktat. Dengan

memberikan senyawa ini diharapkan usus dapat terus didominasi oleh mikroflora menguntungkan dan bakteri jahat menjadi kalah. Penerapan metode ini lebih dikenal dengan konsep prebiotik yang berarti memasukkan senyawa tertentu ke dalam bahan pangan, yang tidak dapat dicerna, tetapi bermanfaat dalam merangsang pertumbuhan atau aktifitas sejumlah bakteri menguntungkan (seperti *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) dalam usus besar dan menurunkan jumlah bakteri patogenik (seperti *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*) serta dapat memperbaiki kesehatan tubuh.

Usus secara alami telah mengandung mikroflora yang seimbang antara mikroflora yang menguntungkan dan merugikan, ketika bayi yang lahir terbukti terdeteksi banyak mengandung mikroflora yang menguntungkan. Perubahan terjadi ketika adanya konsumsi dari luar. Pada bayi yang mengkonsumsi susu formula, ekosistem flora usus akan didominasi oleh bakteri asam laktat dan bakteri jahat (patogen). Beberapa jenis bakteri patogen tersebut adalah *Escherichia coli*, *Clostridium* dan *Bacteroides*, yang sering menyebabkan diare dan sepsis.

Pada bayi yang mengkonsumsi ASI, komposisi mikroflora usus didominasi oleh *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus bifidus*, yang memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan. Efek positif tersebut antara lain proses pencernaan makanan menjadi lebih baik, gangguan pencernaan berkurang dan tercegahnya diare. Namun dengan bertambahnya usia, aktifitas dan gaya hidup komposisi mikroflora dapat bergeser.

Di negara-negara maju, yang memiliki pola hidup masyarakat modern yang supersibuk dan bergesernya pola makan, dapat membahayakan keseimbangan mikroflora usus. Penyebabnya adalah kebiasaan mengkonsumsi makanan cepat saji ala Barat (tinggi lemak dan protein, rendah serat) yang dapat meningkatkan populasi bakteri jahat dalam saluran pencernaan. Seharusnya dalam pola makan tersebut diimbangi dengan mengkonsumsi makanan/minuman fungsional yang dapat menyehatkan. Salah satunya adalah makan/minuman yang

memberikan senyawa ini diharapkan usus dapat terus didominasi oleh mikroflora menguntungkan dan bakteri jahat menjadi kalah. Penerapan metode ini lebih dikenal dengan konsep prebiotik yang berarti memasukkan senyawa tertentu ke dalam bahan pangan, yang tidak dapat dicerna, tetapi bermanfaat dalam merangsang pertumbuhan atau aktifitas sejumlah bakteri menguntungkan (seperti *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) dalam usus besar dan menurunkan jumlah bakteri patogenik (seperti *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*) serta dapat memperbaiki kesehatan tubuh.

Usus secara alami telah mengandung mikroflora yang seimbang antara mikroflora yang menguntungkan dan merugikan, ketika bayi yang lahir terbukti terdeteksi banyak mengandung mikroflora yang menguntungkan. Perubahan terjadi ketika adanya konsumsi dari luar. Pada bayi yang mengkonsumsi susu formula, ekosistem flora usus akan didominasi oleh bakteri asam laktat dan bakteri jahat (patogen). Beberapa jenis bakteri patogen tersebut adalah *Escherichia coli*, *Clostridium* dan *Bacteroides*, yang sering menyebabkan diare dan sepsis.

Pada bayi yang mengkonsumsi ASI, komposisi mikroflora usus didominasi oleh *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus bifidus*, yang memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan. Efek positif tersebut antara lain proses pencernaan makanan menjadi lebih baik, gangguan pencernaan berkurang dan tercegahnya diare. Namun dengan bertambahnya usia, aktifitas dan gaya hidup komposisi mikroflora dapat bergeser.

Di negara-negara maju, yang memiliki pola hidup masyarakat modern yang supersibuk dan bergesernya pola makan, dapat membahayakan keseimbangan mikroflora usus. Penyebabnya adalah kebiasaan mengkonsumsi makanan cepat saji ala Barat (tinggi lemak dan protein, rendah serat) yang dapat meningkatkan populasi bakteri jahat dalam saluran pencernaan. Seharusnya dalam pola makan tersebut diimbangi dengan mengkonsumsi makanan/minuman fungsional yang dapat menyehatkan. Salah satunya adalah makan/minuman yang

mengandung prebiotik untuk menjaga keseimbangan mikroflora usus. Hal ini menjadikan dasar pemikiran bagi para peneliti maupun produser makanan/minuman untuk mensintesa prebiotik, terutama dari kelompok oligosakarida.

Dengan pertambahan usia jelas orang tidak mungkin lagi mengkonsumsi ASI untuk dapat meningkatkan mikroflora menguntungkan dalam tubuhnya. Dari hasil penelitian ASI mengandung N-acetyl glucosamine yaitu suatu oligosakarida yang tidak dapat dicerna dan diabsorpsi, sehingga sampai ke usus dalam keadaan utuh, dan akhirnya dapat dipecah dan digunakan oleh mikroflora menguntungkan dalam usus semisal bakteri asam laktat seperti *Bifidobacteria* atau *Lactobacillus sp.* Dan senyawa sejenis yang juga mempunyai kemampuan, dapat ditemui pada sayuran (akar asparagus, bawang, tomat), buah-buahan (pisang), gandum, dan madu serta gula merah.

Sintesa GalOS (Galakto-oligosakarida) adalah salah satu hasil penemuan di bidang pangan. GalOS merupakan bahan pangan fungsional, salah satu jenis prebiotik baru. GalOS memiliki fungsi yang sangat potensial dalam saluran pencernaan manusia, terutama bagi mereka yang bersifat *lactose intolerance* akibat kurangnya *Bifidobacteria* atau *Lactobacillus* dalam usus

Memproduksi GalOS yang analog dengan GalOS ASI lebih efisien daripada mengekstraknya langsung dari ASI itu sendiri, karena ASI tidak akan dapat dibeli secara komersial dan juga akan sulit mengumpulkannya dari para ibu yang menyusui. Senyawa GalOS dapat disintesis baik secara kimia maupun enzimatik. Metode sintesa secara enzimatik terlihat sederhana dan hanya membutuhkan enzim β -galaktosidase, galaktosa, laktosa, gula aseptor, dan air untuk memulai reaksi. Enzim memegang peranan sangat penting dalam pembentukan produk akhir yang diinginkan.

Dalam penelitian sebelumnya telah dilakukan produksi prebiotik galaktooligosakarida (GalOS) secara enzimatik dengan menggunakan

enzim β -galaktosidase dalam bentuk bebas dari *Escherichia coli*. Faktor yang diobservasi dalam sintesa homo-GalOS adalah pengaruh pH dan konsentrasi substrat (galaktosa atau laktosa) terhadap konsentrasi GalOS yang dihasilkan. Dari penelitian tersebut diperoleh hasil bahwa konsentrasi substrat 40% (w/w) dan buffer pH 7.0 merupakan faktor yang mampu dimanfaatkan enzim secara maksimal dalam menghasilkan GalOS.

Berbagai pertimbangan dan pemikiran muncul dari fenomena-fenomena penelitian sebelumnya. Diantara fenomena yang muncul adalah mahalnnya harga enzim dalam bentuk kultur murni. Untuk mengisolasi enzim dalam bentuk kultur murni memerlukan biaya yang mahal dan ketelitian yang tinggi. Sesudah enzim dapat dipisahkanpun masih memerlukan cara penyimpanan bahkan perlakuan khusus yang memerlukan daya dan dana.

Teknik imobilisasi enzim merupakan salah satu cara untuk mengatasi masalah diatas. Dengan mengimobilisasi enzim, diharapkan enzim dapat dipakai kembali setelah proses. Pada umumnya dalam bentuk demikian, enzim menjadi tidak larut dalam air dengan beberapa tujuan dan alasan. Pertama bentuk enzim amobil akan memudahkan untuk memperoleh kembali enzim dari cairan media ataupun hasil fermentasinya, dan ini sangat penting dalam perhitungan ekonomi reaksi enzimatis. Kedua, enzim amobil bagi seorang ahli biokimia sangat berguna sebagai model sistem bagi enzim yang secara normal berhubungan dengan membran dalam sel hidup (Judoamodjojo *et al.*, 1992).

Suatu bioreaktor harus dapat memberikan kondisi optimum agar produksi bahan yang dikehendaki memperoleh hasil optimum. Pemilihan FBR (*fluidized bed reactor*) sebagai bioreaktor adalah memang yang paling tetap untuk enzim dalam keadaan amobil. Pertama, enzim teramobil dalam fase diam tidak mengalami kerusakan karena perlakuan misal pengadukan (*stirer tank*) seperti pada bioreaktor lain. Kedua, proses

tidak terjadi pada satu titik saja, karena dilengkapi dengan pompa untuk proses sirkulasi. Ketiga, proses pengambilan sampel lebih mudah dilakukan.

1.2 Perumusan Masalah

Suatu enzim yang terikat adalah enzim yang gerakannya dalam ruang dibatasi secara sempurna atau hanya dalam daerah yang sangat terbatas. Dengan menggunakan enzim amobil, substrat akan sulit untuk langsung bereaksi dengan sisi aktif dari enzim, karena sebagian dari sisi aktif enzim terlindungi atau tertutupi oleh matriks untuk imobilisasi enzim serta enzim menjadi tidak larut dalam air. Pengaruh penggunaan beberapa metode imobilisasi terhadap kemampuan enzim untuk sintesa homo-GalOS akan dapat dideteksi dari konsentrasi homo-GalOS yang terbentuk. Kemampuan enzim untuk digunakan secara berulang (*reuseable*) akan diamati selama penelitian.

Fokus dari penelitian ini adalah untuk mensintesa homo-GalOS dengan menggunakan enzim amobil dan peningkatan skala produksi dilakukan pada *fluidized bed reactor*. Enzim akan diimobilisasi dengan 3 metode yang berbeda yaitu ikatan silang (*cross linking*) menggunakan glutaraldehida pada keramik, adsorpsi anionik (*anionic adsorption*) pada DEAE-cellulose, dan perangkap (*entrapment*) dalam natrium alginat. Pengujian homo-GalOS yang dihasilkan dalam fungsinya sebagai *growth promotor* beberapa spesies *Lactobacillus sp* juga menjadi salah satu parameter yang diamati.

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan permasalahan yang timbul maka penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui pengaruh 3 metode imobilisasi yaitu ikatan silang menggunakan glutaraldehida pada keramik, adsorpsi anionik pada

DEAE selulosa dan perangkap dalam natrium alginat terhadap enzim β -Galaktosidase dari *Escherichia coli* selama sintesa homo-GalOS.

2. Mengetahui aktivitas enzim setelah proses sintesa pada setiap metode imobilisasi yang diterapkan.
3. Mengetahui bahwa homo-GalOS yang dihasilkan mampu berfungsi sebagai *growth promotor* bagi *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. lactis*, *L. plantarum*, dan *L. rhamnosus*.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi tentang :

1. Pengaruh metode imobilisasi terhadap enzim β -Galaktosidase dari *Escherichia coli* dalam sintesa homo-GalOS sebagai senyawa prebiotik.
2. Aktivitas enzim setelah proses sintesa pada setiap metode imobilisasi.
3. Kemampuan senyawa homo-GalOS yang dihasilkan dalam fungsinya sebagai *growth promotor*.



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Makanan Fungsional

Dasar pertimbangan konsumen di negara-negara maju dalam memilih bahan pangan, bukan hanya bertumpu pada kandungan zat gizi dan kelezatannya, tetapi juga pengaruhnya terhadap kesehatan tubuhnya (Goldberg, 1994). Saat ini pangan telah diandalkan sebagai pemeliharaan kesehatan dan kebugaran tubuh. Bahkan bila dimungkinkan, pangan harus dapat menyembuhkan atau menghilangkan efek negatif dari penyakit tertentu (Astawan, 2003).

Telah dipahami secara jelas bahwa semua makanan atau minuman (pangan) mempunyai fungsi yang berhubungan dengan rasa, aroma dan atau nutrien essensial, tetapi saat ini telah berkembang konsep pangan fungsional. Istilah pangan fungsional mula-mula diperkenalkan di Jepang pada pertengahan tahun 1980-an, dimana Departemen Kesehatan Jepang mengidentifikasi 12 komponen yang berperan untuk mencegah dan mengobati beberapa penyakit (Silalahi, 2001).

Selanjutnya istilah pangan fungsional digunakan secara luas untuk mengidentifikasi dan mendefinisikan makanan yang mempunyai kemampuan untuk mempengaruhi proses fisiologis, sehingga meningkatkan potensi kesehatan dari makanan atau minuman tersebut (Head, 1995). Makanan dikatakan mempunyai sifat fungsional bila mengandung komponen (zat gizi atau zat non gizi) yang mempengaruhi satu atau sejumlah terbatas fungsi dalam tubuh tetapi yang bersifat positif, sehingga dapat memenuhi kriteria fungsional atau menyehatkan (Muchtadi, 1996).

Komponen aktif dalam bahan pangan yang memberikan efek fisiologis atau menimbulkan adanya sifat fungsional telah mendapatkan perhatian yang cukup besar saat ini. Hal ini dapat dilihat dari banyaknya laporan tentang manfaat suatu komponen yang dijumpai dalam suatu bahan pangan, baik yang berasal dari pangan nabati maupun hewani

(Golberg, 1992; Bonio, 1994; Tomomatsu, 1994). Komponen aktif dalam bahan pangan dikelompokkan menjadi dua bagian besar yaitu komponen zat gizi dan non gizi. Komponen aktif yang termasuk dalam golongan zat gizi antara lain kalsium, asam folat, vitamin E, dan iodium. Sedangkan komponen aktif non 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. Telah banyak laporan hasil penelitian tentang aktifitas komponen aktif bagi kesehatan baik mengenai sifat kuratifnya (pengobatan) maupun sifat protektifnya (pencegahan) terhadap penyakit degeneratif (Muchtadi, 1996; Wijaya, 1996).

Menurut Goldberg (1994), sejumlah ilmuwan Jepang mengategorikan 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, misal :
 - a. Meningkatkan sistem kekebalan tubuh.
 - b. Dapat mencegah timbulnya penyakit tertentu , seperti : hipertensi, kanker kolon, jantung, dan obesitas (kegemukan).
 - c. Mampu menjaga kondisi tubuh.
 - d. Memperlambat proses penuaan.
 - e. Menjaga kondisi fisik dan mental.
 - f. Membantu mengembalikan kondisi tubuh setelah sakit.

Berbagai jenis pangan fungsional sudah beredar dipasaran, mulai jenis produk susu probiotik tradisional seperti *yoghurt*, *kefir* dan *coumiss*,

diikuti dengan pemunculan produk baru seperti *BioSeven*, *OH BA yoghurt*, *yakult*, *ophilus* dan *BA live*. Produk susu rendah lemak siap konsumsi yang mengandung serat larut. Selain itu juga telah beredar pangan tanpa lemak (mengandung *fat substitute*) yang diperkaya dengan mineral, produk non-kolesterol atau kadar kolesterol dan lemaknya telah diturunkan, seperti produk biskuit. Beberapa produk yang merupakan ekstrak dari sayuran dan buah-buahan seperti *junior 21*, dan *junior 18*, produk juice buah dan sayuran seperti *V-8*. Produk yang mengandung ekstrak serat yang bersifat larut yang berfungsi menurunkan kolesterol dan mencegah obesitas (Arafah, 2003; Sibuea, 2002).

2.2 Oligosakarida

Oligosakarida adalah molekul yang terdiri dari 2 - 10 monosakarida yang tergabung dalam ikatan glikosidik, yang segera dapat dihidrolisa secara enzimatis untuk menghasilkan monosakarida (El Khadem, 1988; Pazur, 1994). Contoh oligosakarida yang memiliki dua residu monosakarida adalah sukrosa, laktosa, maltosa, dan trehalosa, sedangkan yang memiliki tiga monosakarida adalah raffinosa, maltotriosa, dan mannotriosa.

Oligosakarida dapat juga menjadi homo-oligosakarida yang terdiri dari satu tipe monosakarida dan hetero-oligosakarida yang terdiri dari dua atau lebih tipe monosakarida penyusunnya (El Khadem, 1988).

Oligosakarida memiliki peranan penting dalam kegiatan biologis, baik sebagai molekul atau kompleks (glikoprotein dan glikolipida) (Dwek, 1996). Oligosakarida berperan dalam kesuburan (Lis dan Sharon, 1993), perlekatan sel-sel, ketahanan dan kekebalan, dan infeksi (Ofek dan Sharon, 1990; Zopf dan Roth, 1996).

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 diatas seperti *raffinosa*,

stakiosa dan *verbaskosa* terdapat pada kacang-kacangan dan umbi-umbian.

Disamping menyebabkan *flatulensi*, oligosakarida juga bermanfaat bagi metabolisme bakteri yang menguntungkan, sehingga pola pengolahan yang bertujuan untuk mengurangi kandungan oligosakarida perlu diubah. Disebabkan dalam jumlah yang cukup mampu menjaga kondisi perimbangan *bifidobakteri* dalam saluran pencernaan (Nuraida, 1996).

Hasil penelitian di Jepang menunjukkan bahwa dosis maksimum oligosakarida agar tidak menimbulkan diare dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. 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)

Untuk mempertahankan jumlah *bifidobakteri* dalam saluran pencernaan, diperlukan sumber nutrisi bagi bakteri untuk proses metabolismenya. Menurut Wasposito (2001), kelompok oligosakarida seperti : raffinosa, stakhiosa, galakto-oligosakarida, frukto-oligosakarida, inulin, serta beberapa jenis peptida dari protein tidak dapat dicerna dan mampu menstimulasi pertumbuhan *bifidobakteri* dan bakteri asam laktat. Sehingga keberadaannya dalam saluran pencernaan dapat mendominasi jumlahnya.

Hal senada juga dinyatakan oleh Silalahi (2001) bahwa dengan konsumsi 3 – 6 g oligosakarida per hari akan mengurangi metabolit toksis dan enzim-enzim merugikan sebanyak 44,6% dan 40,9% masing-masing selama 3 minggu. Pada **Tabel 2** berikut terdapat beberapa jenis oligosakarida yang mampu meningkatkan *bifidobakteri* dan bakteri asam laktat.

Tabel 2. 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)

Oligosakarida ini dapat diekstraksi dari air susu ibu, feses bayi, tanaman dan tumbuh-tumbuhan (Bucke, dan Rastall, 1990). Oligosakarida juga dapat dihasilkan dengan mendegradasi polisakarida sel mikroorganisme. Namun yang didapat sangat kecil. Teknik yang sedang populer saat ini adalah melalui sintesa oligosakarida secara enzimatis dengan menerapkan reaksi hidrolisa terbalik (*reversed hydrolysis*).

2.3 Galakto-oligosakarida (GalOS)

Galakto-oligosakarida (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, tetapi langsung masuk ke usus besar dan terfermentasi oleh *bifidobakteria* dan bakteri asam laktat (Nuraida, 1996).

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 *bifidobakteria* 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 *bifidobakteria* infekal. Produksi gas merupakan efek samping dari konsumsi oligosakarida, dan hasil penelitian Rastall (2000b) menunjukkan bahwa nilai rata-rata gas yang diproduksi oleh *bifidobakteria* selama 48 jam fermentasi dengan penambahan inulin dan FOS (17-18 ml) lebih besar daripada yang dihasilkan oleh GalOS dan IMOS (8-10 ml) (Rastall, 2001).

Senyawa galakto-oligosakarida umumnya disintesa dengan menggunakan laktosa sebagai substrat. Hasil degradasi laktosa yang utama adalah glukosa dan galaktosa, walaupun sejumlah kecil galakto-oligosakarida terbentuk melalui reaksi transferase. Ketika dikonsumsi oleh manusia, galakto-oligosakarida tersebut akan memacu pertumbuhan *bifidobacterium* ssp. dalam usus besar. Hal ini akan memperbaiki keadaan mikroba dalam usus dan menekan kebusukan.

Penerapan galakto-oligosakarida ke dalam makanan merupakan suatu hal yang menarik. Penelitian untuk memproduksi GalOS dengan menggunakan mikrobial β -galaktosidase semakin menarik pada dekade terakhir ini. Hidrolisa laktosa akan berlangsung pada konsentrasi laktosa

rendah, selanjutnya produksi oligosakarida dengan reaksi transglukosidasi akan berjalan juga dengan meningkatnya konsentrasi laktosa. Hidrolisa laktosa dan sintesis GalOS terjadi secara simultan yang membuat mekanisme reaksi sangat kompleks. Konversi laktosa menjadi GalOS akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi laktosa dalam media, karena galaktosil mempunyai peluang tinggi untuk melekat pada laktosa dan atau oligosakarida daripada ke air sebagai aseptor (Iwasaki *et al.*, 1996). Iwasaki *et al.*, (1996) juga mendapatkan bahwa konversi oligosakarida lebih dari 30% terjadi dengan menggunakan konsentrasi laktosa lebih dari 1, 11 mol/liter yang dikatalisa oleh β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* selama 5 jam. Penelitian dengan menggunakan galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* selama 48 jam dengan menggunakan laktosa 2,2 mol/liter mampu menghasilkan GalOS antara 19.000-20.000 ppm (Suwasono, *et al.*, 2001).

Masalah yang utama dengan enzim galaktosidase adalah rendahnya regioselektivitas, sehingga banyak ikatan galaktosidik yang terbentuk. Baru-baru ini, hasil dari penelitian kita menunjukkan bahwa enzim β -1,4-galaktosidase dari *Bacillus circulans* dapat digunakan untuk sintesa GalOS dengan ikatan spesifik β -1,4-galaktosidik. Sebaliknya enzim non-spesifik β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae* membentuk GalOS dengan ikatan bervariasi (Suwasono *et al.*, 2001) seperti ditunjukkan pada **Tabel. 3**.

Tabel. 3 Perkiraan Struktur Homo-GalOS yang Diproduksi Menggunakan Enzim β -Galaktosidase dalam Bentuk Bebas.

Asal enzim	Substrat	Disakarida	Trisakarida
<i>Aspergillus oryzae</i>	Laktosa	Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Gal	Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Gal $\beta(1 \rightarrow 3)$ Gal
		Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Glu	Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Glu
<i>Bacillus circulans</i>	Laktosa	Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Gal	Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Gal
		Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Glu	Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Glu
<i>Aspergillus oryzae</i>	Galaktosa	Gal $\beta(1 \rightarrow 3)$ Gal	Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Gal $\beta(1 \rightarrow 3)$ Gal
		Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Gal	Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Gal $\beta(1 \rightarrow 6)$ Gal
		Gal $\beta(1 \rightarrow 6)$ Gal	
<i>Bacillus circulans</i>	Galaktosa	Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Gal	Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ Gal
		Gal $\beta(1 \rightarrow 6)$ Gal	

Sumber : Suwasono *et al.*, (2001).

2.4 Probiotik dan Prebiotik

2.4.1 Probiotik

Konsep tentang probiotik muncul pada akhir abad ke-20 atas kerja keras Metchnikoff di Institut Pasteur – Paris. Konsep tersebut diterima oleh para ilmuwan dan konsumen sebagai bahan tambahan pangan. Di beberapa negara probiotik pada masa itu dicoba ditambahkan pada susu sapi perahan tradisional (Fuller, 1997).

Probiotik merupakan sekumpulan mikroba yang secara alami ada dalam usus manusia, dan juga sering ditambahkan ke dalam bahan pangan dan memberi keuntungan kepada manusia, seperti bakteri asam laktat dan *Bifidobacterium* (Macfarlane dan Cummings, 1999). Hal serupa juga dinyatakan oleh Gibson and Robertfoid (1995) definisi probiotik sebagai pangan/suplemen pangan yang berisi mikroba hidup yang memberi efek yang menguntungkan (kesehatan) saluran pencernaan.

Beberapa bakteri dan khamir yang termasuk ke dalam kelompok probiotik adalah *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *Lactobacillus lactis*, *L. actobacillus rhamnosa*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaris*, *L. gasseri*, *L. casei*, *Streptococcus thermophilus*, *saccharomyces cerevisiae* dan *S. boulardii* (MacFarlane dan

Cumming, 1999). Bakteri probiotik yang sudah melalui uji klinis, diantaranya adalah *Lactobacillus casei subsp. Casei* Shirota strain yang terdapat dalam *yakult*, *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus acidophilus* (Wasposito, 2001).

Bakteri yang termasuk probiotik tersebut mampu membatasi pertumbuhan dan aktifitas mikroba penyebab penyakit di dalam usus. Mikroba ini mampu merubah kolesterol menjadi bentuk yang kurang mudah teradsorpsi. Selain itu bakteri ini mampu menghambat proses pembentukan senyawa penyebab kanker atau toksik dalam usus. *Bifidobacterium* dapat memproduksi vitamin B kompleks (B1, B6 dan B12, asam folat) dan asam amino yang dibutuhkan oleh enzim metabolisme. Bakteri asam laktat dapat menghambat bakteri pemecah vitamin B1. *Bifidobacteria* dapat memproduksi asam laktat dan asam asetat yang mengasamkan lambung dan membunuh bakteri berbahaya yang tidak tahan kondisi asam (Prangdimurti, 2003)

Menurut Broste (1999) dari dasar probiotik tersebut muncul suatu konsep baru yang lebih menguntungkan yaitu prebiotik. Prebiotik merupakan bahan tambahan pangan yang tidak dapat dicerna dan bermanfaat dalam menstimulasi pertumbuhan dan aktivitas satu atau sejumlah terbatas bakteri 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 *bifidobakteri* yang terdapat dalam usus besar berupa oligosakarida dari hasil produksi berbagai macam substrat.

2.4.2 Prebiotik

Prebiotik merupakan produk alami yang berasal dari zat pati tanaman. Kendati di Indonesia tergolong baru, sebenarnya prebiotik sudah lama ditemukan. Yang pertama kali mengembangkannya adalah Hidaka, peneliti Jepang, pada tahun 1983. Prebiotik bisa dijumpai dalam berbagai tanaman seperti pisang, asparagus, bawang putih, bawang

Broste (1999) menyatakan bahwa peluang pengembangan prebiotik lebih menjanjikan dari pada probiotik. Hal ini ditandai dengan diluncurkannya produk berbasis prebiotik bermerk *Actilight* oleh perusahaan makanan Eropa yaitu industri Meiji Beghin, dimana dalam produknya terkandung fruktooligosakarida. Selain itu perusahaan Jerman juga mengembangkan produk sinbiotik yang meliputi 2 strain probiotik dan prebiotik *Raftilose*. Sedangkan dari Vivis di Prancis mengeluarkan produk berlabel *Ligne Bifide* yang merupakan biskuit, sup dan makanan siap saji yang mengandung *Actilight*. Namun di lain pihak, industri makanan terkemuka Nestle tetap mengedepankan probiotik sebagai produk yang mampu meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan dikategorikan telah berhasil di pasar Eropa. Keberhasilan tersebut diketahui dari produk yoghurt LC1 yang diperkaya, berawal dari titik tersebut dikembangkan produk LA1 yang mengandung 2 strain *Lactobacillus*. Sehingga kemudian pihak Nestle merekomendasikan bahwa produk tersebut dapat dikonsumsi sehari-hari sebagai bagian dari diet yang sehat.

Setelah pemunculan konsep probiotik dan prebiotik, kini dari keduanya dapat dikombinasikan dengan istilah synbiotik. Kombinasi tersebut berupa beberapa strain mikroba hidup yang ditambahkan substrat spesifik (prebiotik) untuk pertumbuhan. Produk synbiotik sendiri sudah diluncurkan oleh perusahaan Jerman R.A Bauer (Broste, 1999).

Beberapa prebiotik pada saat ini sedang disintesis secara enzimatis, seperti galakto-oligosakarida, frukto-oligosakarida, isomalto-oligosakarida, gento-oligosakarida, xilo-oligosakarida, laktulosa, laktosukrosa. Kombinasi dari probiotik dan prebiotik adalah sinbiotik yang menghasilkan adanya bakteri baru dan merangsang pertumbuhan bakteri itu sendiri. Prebiotik tidak bersifat toksik dan tidak mempunyai efek samping yang negatif. Prebiotik dan selanjutnya digunakan sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan probiotik.

Fruktooligosakarida (FOS) dapat ditemukan secara alamiah pada bawang putih, pisang, asparagus, madu, gandum, tomat dan kacang

bombay, tomat, sereal (gandum dan biji-bijian), susu sapi, yogurt, dan madu (Kurniasih, 2001).

Senyawa ini sering ditambahkan ke dalam bahan pangan, tidak dapat dicerna, dan bermanfaat dalam merangsang pertumbuhan atau aktivitas sejumlah bakteri (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) di dalam usus besar dan menurunkan jumlah bakteri patogenik (*E. coli*, *Clostridium perfringens*) serta dapat memperbaiki kesehatan tubuh. Prebiotik juga sering disebut sebagai faktor pertumbuhan bagi probiotik (Gibson and Robertfoid, 1995).

Suatu bahan tambahan makanan dapat diklasifikasikan sebagai prebiotik jika :

1. tidak terhidrolisa atau teradsorpsi pada jalur pencernaan makanan.
2. diproduksi dari substrat tertentu yang dapat menstimulasi pertumbuhan satu atau sejumlah terbatas bakteri dalam saluran pencernaan.
3. dapat menekan jumlah bakteri patogen dan meningkatkan jumlah bakteri menguntungkan.

Prebiotik ini dapat berupa karbohidrat kompleks ataupun beberapa peptida dari protein sehingga didalam saluran pencernaan tidak terserap atau tidak tercerna. Dalam bentuk fruktooligosakarida (FOS), prebiotik ini dapat ditemukan misalnya pada bawang, pisang, dan asparagus (Fuller, 1997).

Prebiotik sebagai bahan suplemen yang terbentuk dari mikroorganisme yang menguntungkan, bisa menghasilkan kembali bakteri yang bermanfaat lainnya. Prebiotik-prebiotik tersebut mengkonversi atau mengubah kolesterol menjadi sebuah bentuk yang memiliki tingkat penyerapan yang rendah, karena prebiotik-prebiotik tersebut bisa menghambat penyerapan kolesterol dalam jalur intestinal, dengan cara menurunkan tingkat serum kolesterol. Dalam hal ini muncul indikasi bahwa prebiotik bisa mengurangi atau menghambat timbulnya racun dan senyawa-senyawa penyebab penyakit yang ada di dalam jalur intestinal (Cichoke, 2000).

Broste (1999) menyatakan bahwa peluang pengembangan prebiotik lebih menjanjikan dari pada probiotik. Hal ini ditandai dengan diluncurkannya produk berbasis prebiotik bermerk *Actilight* oleh perusahaan makanan Eropa yaitu industri Meiji Beghin, dimana dalam produknya terkandung fruktooligosakarida. Selain itu perusahaan Jerman juga mengembangkan produk sinbiotik yang meliputi 2 strain probiotik dan prebiotik *Raftilose*. Sedangkan dari Vivis di Prancis mengeluarkan produk berlabel *Ligne Bifide* yang merupakan biskuit, sup dan makanan siap saji yang mengandung *Actilight*. Namun di lain pihak, industri makanan terkemuka Nestle tetap mengedepankan probiotik sebagai produk yang mampu meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan dikategorikan telah berhasil di pasar Eropa. Keberhasilan tersebut diketahui dari produk yoghurt LC1 yang diperkaya, berawal dari titik tersebut dikembangkan produk LA1 yang mengandung 2 strain *Lactobacillus*. Sehingga kemudian pihak Nestle merekomendasikan bahwa produk tersebut dapat dikonsumsi sehari-hari sebagai bagian dari diet yang sehat.

Setelah pemunculan konsep probiotik dan prebiotik, kini dari keduanya dapat dikombinasikan dengan istilah synbiotik. Kombinasi tersebut berupa beberapa strain mikroba hidup yang ditambahkan substrat spesifik (prebiotik) untuk pertumbuhan. Produk synbiotik sendiri sudah diluncurkan oleh perusahaan Jerman R.A Bauer (Broste, 1999).

Beberapa prebiotik pada saat ini sedang disintesis secara enzimatik, seperti galakto-oligosakarida, frukto-oligosakarida, isomalto-oligosakarida, gento-oligosakarida, xilo-oligosakarida, laktulosa, laktosukrosa. Kombinasi dari probiotik dan prebiotik adalah sinbiotik yang menghasilkan adanya bakteri baru dan merangsang pertumbuhan bakteri itu sendiri. Prebiotik tidak bersifat toksik dan tidak mempunyai efek samping yang negatif. Prebiotik dan selanjutnya digunakan sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan probiotik.

Fruktooligosakarida (FOS) dapat ditemukan secara alamiah pada bawang putih, pisang, asparagus, madu, gandum, tomat dan kacang

kedele. Pada saat ini FOS sering ditambahkan pada susu bubuk atau susu formula bayi (Silalahi, 2001). Polimer fruktosa ini tidak dapat dicerna, dan berfungsi seperti serat. FOS dapat dipecah oleh enzim yang dihasilkan *Bifidobacteria* dan *Lactobacilli* sebagai sumber nutrisi guna menghasilkan asam laktat dan asetat yang mampu membunuh bakteri berbahaya dalam usus (Cichoke, 2000). Jumlah produksi prebiotik massal sekarang ini sedang dilakukan di Jepang (Tabel. 4).

Tabel. 4 Produksi Prebiotik di Jepang tahun 1995.

Oligosakarida	Produksi
Laktosa	20.000
Galaktooligosakarida (GalOS)	15.000
Fruktooligosakarida (FOS)	12.000
Isomaltooligosakarida (IMOS)	11.000
Palatinosa	5.000
Oligosakarida kedele	2.000
Laktosukrosa	1.600
Gentooligosakarida	400
Xilooligosakarida (XOS)	300

Sumber : Rastall, (2001).

Tidak semua oligosakarida (Non-Digestible) bersifat prebiotik, dan diantara NOD yang ada inulin, fruktooligosakarida (FOS) dan galaktooligosakarida (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 *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 24 jam fermentasi dengan penambahan inulin dan FOS (17-18) lebih besar daripada yang dihasilkan

oleh GalOS dan IMOS (8-10 ml). Jelas bahwa variasi oligosakarida yang sedemikian banyak, beberapa diantaranya mampu bersifat prebiotik dan masing-masing memiliki komposisi yang berbeda (Tabel 5).

Tabel. 5 Komposisi Kimia dan Karakteristik Prebiotik

Oligosakarida	Komposisi Kimia
Fruktoolisakarida (FOS)	95% oligosakarida $\beta(2-1)$ fructan; 60% glukosa; fruktosa (n), 40% fruktosa (n) dp 2-8, rata-rata 4-5
Inulin	>99% oligosakarida $\beta(2-1)$ fructan; rata-rata dp 10 - 12
Galaktooligosakarida (GalOS)	Oligosakarida (85%), glukosa, galaktosa, dan laktosa
Oligosakarida kedele	Stakiosa (fruktosa, galaktosa, glukosa) dan rafinosa (fruktosa, galaktosa, glukosa), dp 3 -4
Xilooligosakarida	$\beta(1-4)$ xilosa; kemurnian 70%, dp 2-4
Isomaltooligosakarida	Campuran oligomer glukosa ikatan α (1-6)(isomaltosa, panosa, isomalto-triosa)
Laktosa	Galatosa dan disakarida yang mengandung fruktosa

Sumber : Rastall, (2001).

Sinbiotik pertama berupa *yoghurt* telah diproduksi oleh Swiss Tonilait, sebuah perusahaan di Swiss, yang terdiri dari campuran tiga strainprobiotik dan prebiotik raftilose. Di Prancis, Nestle telah meluncurkan produk yoghurt LC1 yang berisi bakteri asam laktat. Masyarakat yang menambahkan sinbiotik ke dalam makanannya akan merasa adanya peningkatan gas dalam lambung dan sedikit kejang usus. Sesungguhnya ini adalah tanda bahwa asam, dan menghilangkan bakteri berbahaya. Sesaat kemudian setelah tubuh menyesuaikan diri, efek negatip akan hilang. Baik probiotik dan prebiotik menawarkan cara aman, alami, dan efektif dalam memelihara fungsi kerja saluran pencernaan.

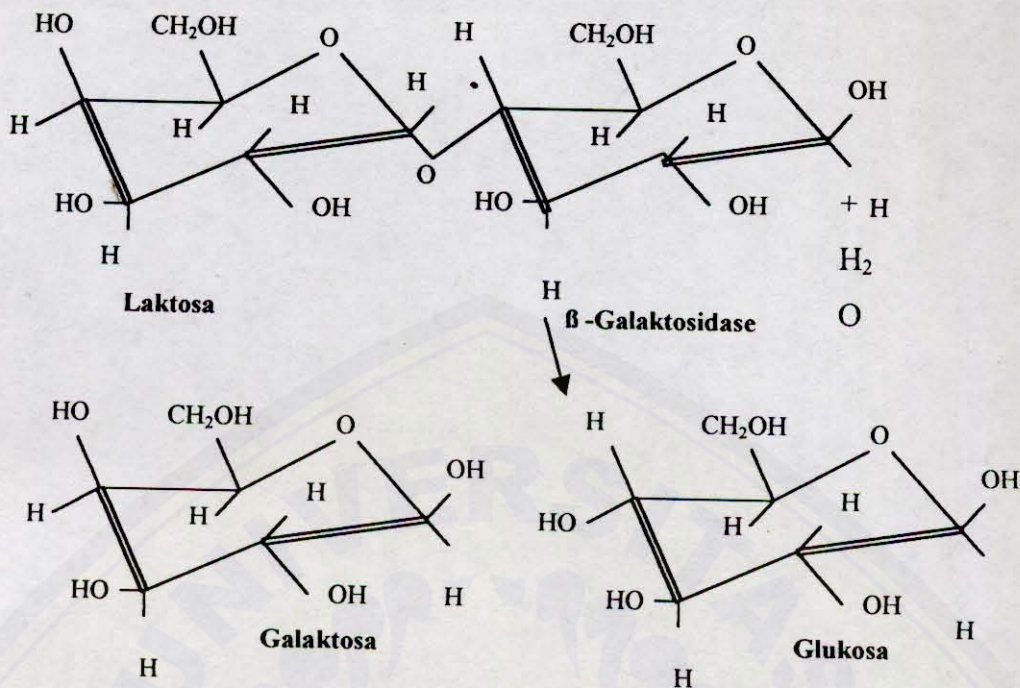
2.5 Sintesa Oligosakarida Secara Enzimatik

2.5.1 Enzim β -Galaktosidase

Enzim dikatakan sebagai suatu kelompok protein yang berperan sangat penting dalam aktivitas biologi. Enzim berfungsi sebagai katalisator dalam sel dan sifatnya sangat khas. Dalam jumlah yang sangat kecil, enzim dapat mengatur reaksi tertentu sehingga dalam keadaan normal tidak terjadi penyimpangan-penyimpangan hasil akhir reaksinya. Enzim ini akan kehilangan aktivitasnya akibat panas, asam atau basa kuat, pelarut organik, atau apa saja yang bisa menyebabkan denaturasi protein. Enzim dikatakan mempunyai sifat sangat khas, karena hanya bekerja pada substrat tertentu dan bentuk reaksi tertentu (Girindra, 1993).

Laktase atau biasa disebut β -galaktosidase merupakan enzim yang penting karena dapat mengubah laktosa yang sukar larut dengan tingkat kemanisan rendah menjadi gula yang mudah larut, tidak mudah mengkristal dan rasanya lebih manis karena terhidrolisa menjadi glukosa dan galaktosa (**Gambar 1**). Enzim ini terdapat pada buah-buahan seperti : peach, apel, bakteri (*E. coli*), jamur (*Aspergillus oryzae*) dan pada binatang terutama saluran pencernaannya. Selain itu dalam fungsinya sebagai enzim hidrolase, β -galaktosidase mampu menguraikan 2 macam substrat, yaitu laktosa dan *o*-nitrofenil- β -galaktosida (ONPG) yang menghasilkan *khromogen-o-nitrofenol* (Winarno, 1986).

Menurut Winarno (1986), enzim β -galaktosidase dalam prosesnya membutuhkan laktosa sebagai substrat. Dalam penggunaannya, enzim yang diperoleh dari tanaman jarang digunakan, yang lebih sering digunakan dari bakteri *Esherichia coli* dan *Aspergillus niger*. Enzim β -galaktosidase yang berasal dari jamur biasanya digunakan pada suhu tinggi dan pH rendah.



Gambar 1. Hidrolisa Laktosa (Roberts, *et al*, 1995)

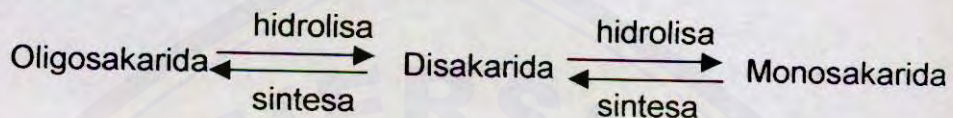
Agar aktivitas enzim meningkat maka suhu reaksi yang digunakan adalah 40°C – 50°C. Pada suhu ini enzim pada konsentrasi gula tinggi akan tetap stabil dan tidak terjadi denaturasi (Nakano, *et al*, 1995).

Menurut Winarno (1986) bahwa aktivitas laktase dapat diketahui dengan substrat laktosa untuk menentukan jumlah glukosa dan galaktosa yang terbentuk. Menurut Page (1997), sintesa dari enzim-enzim kunci yang memanfaatkan laktosa tidak aktif apabila laktosa tidak ada. Dengan adanya laktosa sintesis enzim-enzim ini diaktifkan. Pada keadaan ini konsentrasi seluler dari beta-Galaktosidase meningkat dengan cepat. Hal ini karena enzim beta-Galaktosidase merupakan enzim induktif yang tergantung ada tidaknya induser yaitu laktosa (Toha, 2001).

Penggunaan enzim sebagai katalis untuk sintesa komponen organik telah dikembangkan beberapa tahun ini. Aplikasi teknik ini telah digunakan untuk sintesa oligosakarida menggunakan glikosiltransferase (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).

Reaksi sintesa ekuilibrium hanya membutuhkan sebuah enzim dan monosakarida. Enzim akan mengkatalisa ikatan langsung dari unit-unit monosakarida untuk membentuk oligosakarida. Reaksi ini dikenal sebagai glikosilasi langsung (*direct glycosylation*) atau hidrolisa terbalik (*reverse hydrolysis*) seperti terlihat pada **Gambar 2**.

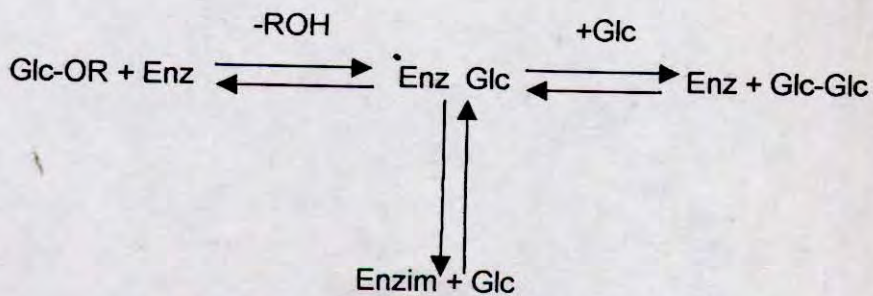


Gambar 2. Skema Reaksi Hidrolisa dan Sintesa

Konsentrasi monosakarida yang tinggi dapat memacu reaksi sintesa oligosakarida. Sintesa oligosakarida mudah dicapai dengan menurunkan aktivitas air melalui peningkatan konsentrasi monosakarida (Rastal *et al.*, 1991, Rastall *et al.*, 1992b; Suwasono and Rastall, 1996). Suhu reaksi yang digunakan adalah 50-60°C, dan enzim akan tetap stabil karena konsentrasi gula yang tinggi mampu menjaga kestabilan enzim terhadap denaturasi (Nakano *et al.*, 1995).

Sintesa hetero-oligosakarida akan berjalan jika tersedia satu substrat sebagai donor dan gula sebagai aseptor, dan sintesa ini akan dipacu dengan rasio donor : aseptor 15% : 85% (Rastall *et al.*, 1991). Pembentukan hetero-mannooligosakarida telah dilakukan dengan enzim α -mannosidase pada rasio donor 50% aseptor 50% dengan total gula 70% (g/g) (Suwasono dan Rastall, 1998). Pembentukan hetero-oligosakarida dapat terjadi secara bersama-sama dengan pembentukan homo-oligosakarida (Rastall, *et al.*, 1991; Rastall *et al.*, 1992a; Suwasono dan Rastall, 1998).

Reaksi sintesa secara kinetik sering disebut juga reaksi transglikosidasi dimana substrat donor dihidrolisa, dan produk antara yang terbentuk segera bereaksi dengan aseptor guna menghasilkan oligosakarida (Ichikawa *et al.*, 1992) seperti terlihat pada **Gambar 3**.



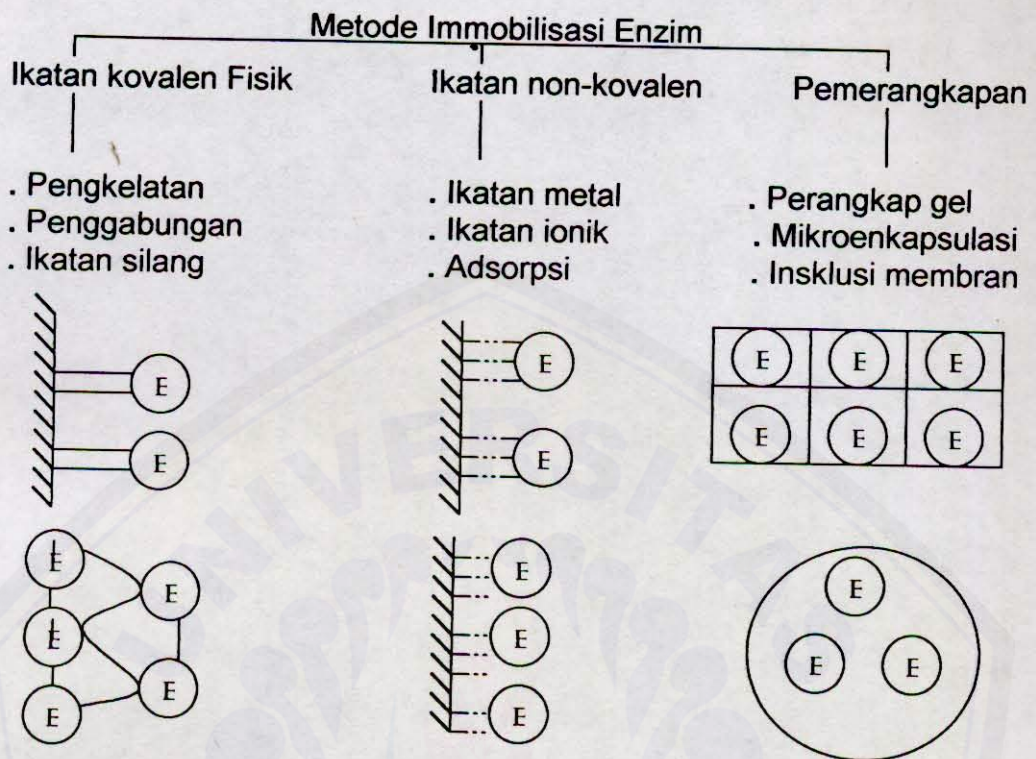
Gambar 3. Skema Reaksi Sintesa secara Kinetika
 Glc-OR = glikosil donor, Glc = glikosil aceptor,
 Glc-Glc = disakarida, Enz = enzim, (Ichikawa *et al.*, 1992).

Sebagian besar enzim yang digunakan dalam reaksi sintesa menunjukkan selektivitas yang rendah, sehingga produk sintesa yang dihasilkan sering memiliki ikatan glikosidik yang beragam (Thiem, 1995). Dimana satu ikatan glikosidik yang dominan adalah (1→6) glikosidik yang bersama-sama tercampur dengan produk tersebut yang memiliki ikatan (1→2)-, (1→3)-, (1→4)-glikosidik.

2.5.2 Imobilisasi Enzim dan Penggunaannya dalam Reaksi Sintesa

Suatu enzim yang teramobil adalah yang gerakannya dalam ruang dibatasi secara sempurna atau hanya dalam daerah yang sangat terbatas. Pada umumnya dalam keadaan demikian, enzim dibentuk menjadi tidak larut dalam air dengan beberapa tujuan atau alasan. Telah banyak teknik dilaporkan tentang cara imobilisasi enzim ataupun protein lain. Dalam dasawarsa terakhir ini bahan-bahan tersebut dianggap sebagai enzim tidak larut dalam air, enzim terikat matriks, dan enzim terperangkap dalam gel. Untuk mencakup semua istilah tersebut direkomendasikan istilah enzim teramobil (*immobilized enzyme*) untuk selanjutnya digunakan istilah enzim teramobilisasi (Judoamidjojo, *et al.*, 1992).

Enzim β-galaktosidase dapat diimobilisasi dengan beberapa metode (**Gambar 4**). Metode ini sering didasarkan pada jenis ikatan yang terbentuk antara enzim dengan bahan pembawa (*carrier*) yang digunakan seperti ditunjukkan pada gambar dibawah ini (Drauz dan Waldman, 1995).

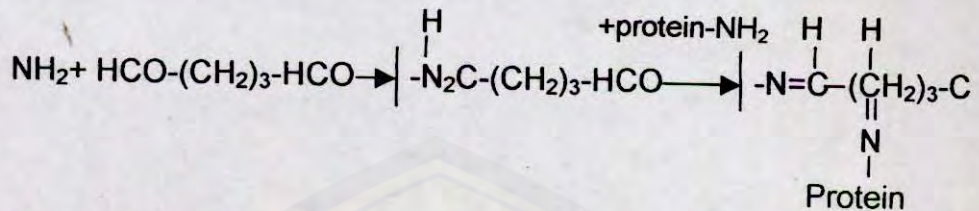


Gambar 4. Metode Imobilisasi Enzim

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, misalnya keramik (*china clay*).

Bentuk enzim yang terikat silang adalah enzim yang terikat secara kovalen satu dengan lainnya oleh pengikat silang seperti glutaraldehid (pada keramik) atau bidiazobenzidin-2,2'asam disulfonat. Enzim terikat silang telah dibuat menurut tiga cara yang berbeda: (1) mengikat silang enzim dengan glutaraldehid untuk membentuk agregat yang tak larut, umpamanya, papain oleh Yansen dan Olson (1969), (2) Adsorpsi enzim pada suatu permukaan disusul dengan ikatan silang; umpamanya tripsin terikat silang diadsorpsi pada permukaan partikel silika koloidal, oleh Haynes dan Walsh (1969) dan (3) Impregnasi suatu material porus

dengan enzim disusul dengan ikatan silang enzim dalam pori-pori; umpamanya papain dalam membran koloidon seperti yang dibuat oleh Goldman dan kawan-kawan, (1968) (Judoamidjojo, *et al.*, 1992).



Gambar 5. Metode penyangga oleh $-\text{NH}_2$ enzim yang terikat silang Glutaraldehid. Sumber : Wang *et al.*, (1979).

Pada ikatan non-kovalen, enzim dapat diikat pada berbagai jenis bahan melalui pengkelatan dengan logam (ikatan logam), interaksi elektrostatik (ikatan ionik), atau ikatan hidrogen (adsorpsi), misal pada DEAE-selulosa.

DEAE-Cellulose (*Diethylaminoethyl cellulose*) merupakan penukar ion pada selulosa. Penukar ion adalah metode kromatografi yang digunakan paling umum dalam proses purifikasi protein. Dengan penukar ion, proses dapat ditingkatkan (*scale-up*), digunakan dengan mudah dan murah dibandingkan dengan metode purifikasi lainnya. Penukar ion protein melibatkan pengikat antara muatan protein dengan muatan dari matriks padat. DEAE-Cellulose merupakan penukar anion yang bermuatan positif, sehingga dapat berikatan dengan protein/enzim yang berikatan negatif. (Anonim, 2001).

Pada metode pemerangkapan secara fisik, enzim diperangkap ke dalam bahan gel (*entrapment*), mikroenkapsulasi, atau membran.

Enzim dapat terperangkap dalam gel matriks berikatan silang dengan membentuk gel dalam larutan encer yang mengandung satu atau lebih macam enzim. Matriks terbanyak digunakan adalah poliakrilamida, dibuat dari akrilamida dan diikatsilangkan dengan N,N-metilen bis (akrilamida). Pati dan silastik (karet silikon) berbentuk gel juga telah digunakan. (Judoamidjojo, *et al.*, 1992).

Bersumber dari *Macrocystics pyrifera* (Kelp), alginat merupakan ikatan rantai lurus, bersifat hidrofilik, koloidal dan terdiri dari ikatan anhidro β -D-mannuronic acid residu dengan ikatan 1 \rightarrow 4. Dengan garam natrium (Na-alginat) membentuk kekentalan yang tinggi (*high viscosity*). Kekentalan 2% larutan Na-alginat sekitar 14.000 cps (*centripoise*). (Anonim, 2001).

Enzim α -mannosidase diimobilisasi pada Sepharose-4B yang diaktivasi oleh cyanogen bromida (Sepherd and Montgomery, 1976). Enzim β -galactosidase asal *Bacillus circulans* telah diimobilisasi pada Duolite ES-762, Dowek MWA-1, dan alumina cara adsorpsi dan diikat silang dengan glutaraldehyde (Nakanishi *et al.*, 1983). Invertase dan amiloglukosidase dapat diperangkap dalam membran polyvinyl alcohol (Uhlich *et al.*, 1996). Beberapa bahan seperti supports cellulose PEI, dan χ -alumina, serta chitosan telah digunakan untuk immbobilisasi β -glukosidase (Martino *et al.*, 1996). Reaksi grup tiol dari enzim dengan tiosulfonate yang terikat pada agarose dapat diterapkan untuk imobilisasi β -galaktosidase dari *Escherichia coli*.

Hampir semua metode imobilisasi enzim telah digunakan untuk reaksi hidrolisa. Hanya sedikit enzim amobil yang digunakan untuk reaksi sintesa oligosakarida. Berger *et al.* (1995a) berhasil mengikat silang enzim β -galaktosidase dari *Thermus aquaticus* dengan glutaraldehyde dan bovine serum albumin dalam agarose untuk sintesa galakto-oligosakarida dengan laktosa sebagai substrat, dan trisakarida dan tetrasakarida yang didapat sekitar 30% dan 3% (Berger *et al.*, 1995b) Ajisaka *et al.* (1989) menemukan spektra galakto-oligosakarida yang berbeda dengan menggunakan β -galaktosidase dari *Escherichia coli* dan *Aspergillus oryzae* yang diimobilisasi pada Eupergit-C. Ajisaka dan Fujimoto (1989) menemukan bahwa raffinosa adalah produk tunggal yang dihasilkan oleh β -galatosidase dari *M.vinacea* yang diimobilisasi pada Eupergit-C, sementara dua isomer (rafinosa dan planteosa) dihasilkan

dengan menggunakan enzim bebas. Produk oligosakarida dengan ikatan yang berbeda dihasilkan ketika α -1,2-mannosidase diimmobilisasi dengan metode yang berbeda (Suwasono dan Rastall, 1998).

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

2.6 FBR (Fluidized Bed Reactor)

FBR merupakan bioreaktor yang terdiri dari 2 kombinasi yaitu fase diam (enzim teramobil dalam matriks) dan kolom reaksi. Substrat dengan kekentalan tertentu akan terus mengalir melewati fase diam dengan kecepatan yang berbeda untuk setiap matriks dan enzim teramobil. Kecepatan alir tidak boleh terlalu tinggi karena akan menyebabkan kerusakan matriks dan enzim.

Sistem ini cocok untuk sel-sel yang teramobil atau sel-sel yang dipasangkan dengan partikel-partikel solid (mikrokariot dan bahan-bahan iner) dan juga untuk reaksi isotermik. Substrat dengan viskositas tertentu, matriks dan juga kolom akan mengurangi panas yang terjadi sehingga bisa mengurangi kerusakan enzim (Anonim, 1992).

2.7 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 aerotolerant, 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*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *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 amonium. Sebagian besar membutuhkan sederet vitamin (laktoflavin, 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 relatif 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, *et al*, 1987).

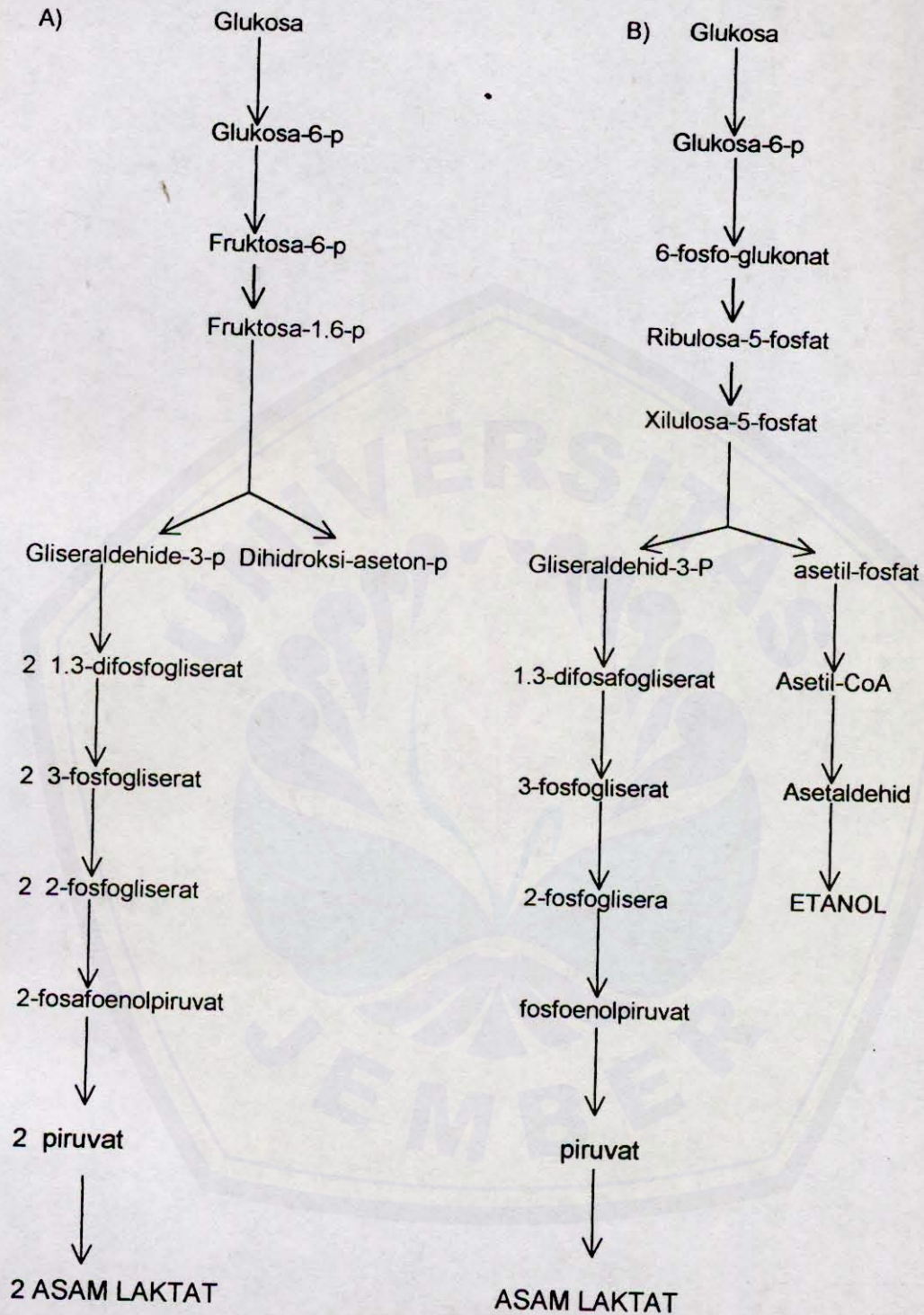
Karakter penting yang digunakan dalam klasifikasi kelompok bakteri asam laktat adalah cara memfermentasi glukosa di bawah kondisi normal yaitu konsentrasi glukosa yang tidak dibatasi dan faktor-faktor pertumbuhan (asam amino, vitamin dan prekursor asam nukleat) dan

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 CO₂ (Axelsson, 1998).

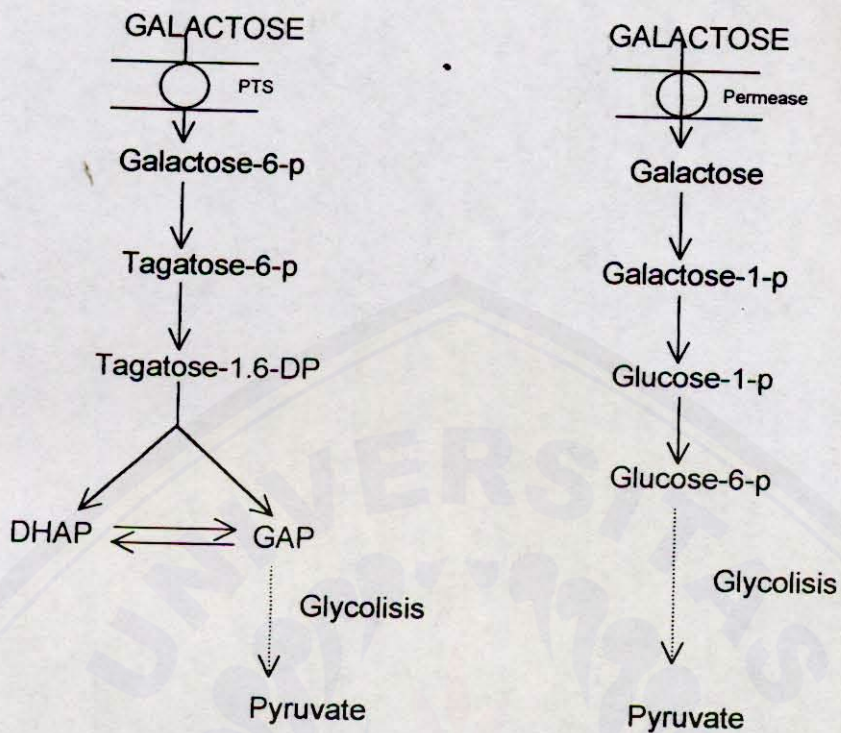
Bakteri asam laktat digunakan sebagai probiotik untuk mengatasi gangguan usus seperti intoleransi laktosa, radang lambung akut dan patogen lainnya, efek merugikan dari radioterapi, konstipasi, radang usus besar dan alergi makanan (Axelsson, 1998). Beberapa spesies bakteri probiotik, di antaranya *Bifidobacteria ssp.*, *Lactobacillus acidophilus*, *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 (*homolactic fermentation* /*homofermentatif*). Jalur 6-fosfoglukonat/fosfoketolase menghasilkan etanol, asetat, CO₂ dan asam laktat (*heterolactic fermentation* /*heterofermentatif*) seperti terlihat pada **Gambar 6**.

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 7**). Sedang disakarida akan dihidrolisa terlebih dahulu menjadi monosakarida, baru kemudian memasuki jalur metabolisme (Axelsson, 1998).



Gambar 6. Jalur Fermentasi glukosa (A) Homofermentatif (Glikolisis, Jalur Embden Meyerhoff); (B) Heterofermentatif (6-fosfo-glukonat /fosfoketolase), Sumber; Axelsson (1998).



Gambar 7. Metabolisme Galaktosa pada Bakteri Asam Laktat (A) Jalur tagatose-6-fosfat (B) Jalur Leloir.

2.8 Hipotesa

1. Imobilisasi enzim β -Galaktosidase berpengaruh terhadap proses sintesa GalOS.
2. Aktivitas enzim β -Galaktosidase yang mengalami imobilisasi tidak berubah setelah proses sintesa GalOS.
3. Metode imobilisasi enzim dengan keramik menunjukkan aktivitas yang paling bagus.



III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Bahan dan Alat

3.1.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Natrium alginat, DEAE-Cellulosa, Butiran keramik, D+Galaktosa (E-Merck 4061), enzim β -Galaktosidase E.C.3.2.1.23 (Sigma G-5635; 1,4 mg solid; 769 unit/mg solid; 864 unit/mg protein) dari *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus* FNCC, *Lactobacillus bulgaricus* FCNN 0053, *Lactobacillus casei* FCNN 0090, *Lactobacillus plantarum* FCNN 123, *Lactobacillus rhamnosus* FCNN 52, *Lactobacillus lactis* FCNN 3024, sedangkan bahan kimia yang digunakan adalah: Aquadest dan bidest, larutan buffer fosfat pH 7.0, Larutan CaCl_2 , Na_2HPO_4 0,01M, NaH_2PO_4 0,01M, *p*-NP- β -galactopyranoside, acetonitrile HPLC grade (Riedel De Haen-34851), MRS-Broth (De Man Rogosa Und Sharpe-Difco).

3.1.2 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: gelas ukur, pipet mikro dan pipet gelas, *beaker glass*, *ependorf*, FBR, inkubator, stirer, spektrofotometer, pH-meter, tabung reaksi, spatula, timbangan analitik, rak tabung, labu ukur, penangas air, termometer, *freezer*, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) merk Perkin Elmer dan kolom HPLC Spherisorb-NH₂ (15 cm x 5 mm), RID (*Refractive Index Detector*), injektor 50 μl , tissue, gunting.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

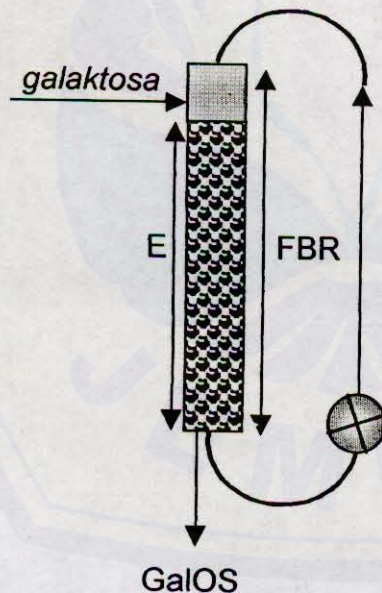
Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pengendalian Mutu Divisi Mikrobiologi, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember, dan Laboratorium Dasar Bersama (LDB) bagian *microanalytical-instruments*, Universitas Airlangga-Surabaya, mulai bulan Maret 2003 sampai dengan Agustus 2003.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Rancangan Percobaan

Untuk setiap *Fluidized Bed Reactor* (FBR) yang sudah mengandung enzim, 40% (w/w) larutan galaktosa sebanyak 5 – 10 ml disirkulasi untuk produksi homo-GalOS. Reaksi dikondisikan pada suhu 60°C dengan kecepatan aliran reaksi sintesa yang terukur berbeda-beda yaitu antara 0.3 sampai 3 ml/menit. Pengambilan sampel dilakukan dengan periode waktu 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 120, dan 144 jam untuk masing-masing metode. Sampel diwadahi dengan tabung *eppendorf* dan kemudian dianalisa dengan HPLC.

Hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel data dan grafik jumlah produksi galaktooligosakarida.



Keterangan: E = enzim yang terimobilisasi pada matriks

Gambar 8. Aplikasi FBR (*Fluidized Bed Reactor*) dalam Sintesa Homo-GalOS dari D+Galaktosa oleh enzim β -Galaktosidase dari *Escherichia coli*.

3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

1. Pembuatan Larutan Buffer

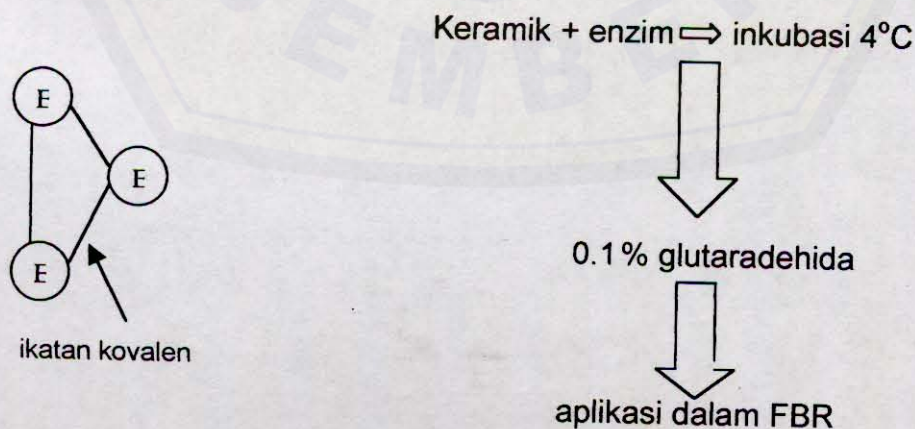
Untuk pembuatan larutan buffer digunakan yaitu: Na_2HPO_4 0,01M, NaH_2PO_4 0,01M. Larutan buffer dibuat dengan mencampurkan secara perlahan sampai mencapai pH 7.0. (Sudarmadji, 1998)

2. Imobilisasi β -Galaktosidase dari *Escherichia coli*.

Imobilisasi enzim β -Galaktosidase dilakukan dengan menggunakan 3 metode yang berbeda berdasarkan matriksnya, yaitu: a) ikatan kovalen pada keramik; b) adsorpsi anionik pada DEAE-Cellulose; dan c) perangkap dalam alginat.

a. Imobilisasi pada Keramik

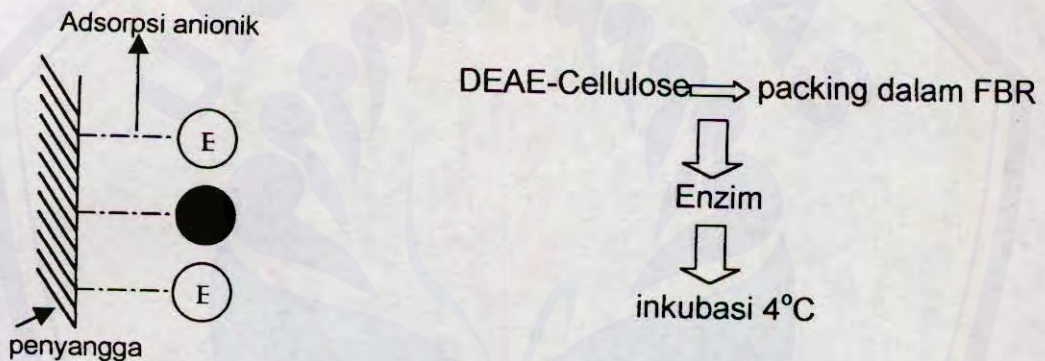
Keramik dibersihkan dengan perendaman dalam air mendidih selama 60 menit. Selanjutnya sebanyak 6 gram keramik dicampur dengan 1.5 mili enzim (200 U/ml). Molekul enzim amobil dikenakan ikatan silang dengan 10 ml 0.1% (v/v) glutaraldehide dalam 10 buffer Natrium asetat pH 7.0 selama 1 menit. Semua larutan 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 100mm) kemudian ditimbang. Inkubasi pada suhu 4°C untuk menunggu proses produksi selanjutnya. Diagram alir proses imobilisasi dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Imobilisasi β -Galaktosidase dari *E. Coli* pada Keramik.

b. Imobilisasi pada DEAE-Cellulose

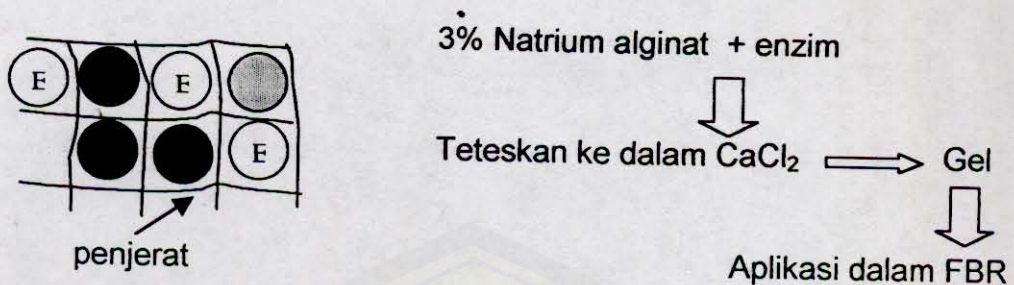
Sebanyak 2 gram DEAE-Cellulose direndam dalam larutan buffer fosfat sampai terendam semua dan dibiarkan mengembang. Kemudian DEAE-Cellulose yang sudah mengembang tersebut dimasukkan ke dalam FBR (10 mm x 100 mm) dan selanjutnya dicuci dengan larutan 10 mM buffer natrium asetat pH 7.0. Larutan enzim (1.5 ml ; 200 U/ml) dialirkan ke dalam FBR dan diinkubasi pada suhu 4°C untuk mendapatkan kecukupan adsorpsi dan proses produksi selanjutnya. Kolom FBR selanjutnya dapat dicuci dengan larutan buffer yang sama dan ditimbang. Diagram alir proses imobilisasi dapat dilihat pada **Gambar 10**.



Gambar 10. Imobilisasi β -Galaktosidase dari *E. Coli* pada DEAE-Cellulosa

c. Imobilisasi pada Natrium Alginat

Sebanyak 2 ml dari 3% (w/v) atau 0.3 g natrium alginat dicampur dengan 1.5 ml enzim (200 U/ml), dan diaduk dengan stirer sampai homogen. Campuran diteteskan melalui injektor kecil ke dalam larutan 2% CaCl_2 selama selesai (terbentuk bola alginat). Butiran natrium alginat dicuci dengan buffer 10 mM natrium asetat pH 7.0. Akhirnya enzim amobil dapat dimasukkan ke dalam kolom FBR (10mm x 100mm) lalu ditimbang. Inkubasi pada suhu 4°C diperlukan jika proses produksi harus ditunda karena pertimbangan pengambilan sampel. Diagram alir proses dapat dilihat pada **Gambar 11**.



Gambar 11. Immobilisasi β -Galaktosidase dari *E. Coli* pada Alginat

3. Sintesa Homo-GalOS dengan Enzim Amobil

Untuk setiap *Fluidized Bed Reactor* yang sudah mengandung enzim, 40% (w/w) larutan galaktosa sebanyak 5 – 10 ml disirkulasi untuk produksi homo-GalOS. Reaksi dilakukan pada suhu 60°C dengan kecepatan aliran reaksi sintesa yang terukur berbeda-beda yaitu antara 0.3 sampai 3 ml/menit.

4. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan periode waktu 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 120, dan 144 jam untuk masing-masing metode. Sampel diwadahi dengan tabung *ependorf* secukupnya.

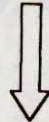
5. Analisa Kuantitatif Produk GalOS dengan HPLC

Sebelum dianalisa, sampel terlebih dahulu diencerkan dengan aquabidest (50%) 50:50. Kemudian diinjeksikan ke HPLC sebanyak 30 μ l, analisa satu sampel selesai setelah RID tidak mendeteksi adanya komponen gula. Hal tersebut diketahui jika monitor yang terhubung ke RID menunjukkan garis lurus (*base line*)

6. Evaluasi Aktivitas Enzim

Sejumlah 0.1-0.5 gram enzim yang teramobil (untuk setiap metode imobilisasi diusahakan mempunyai berat yang sama atau hampir sama) dimasukkan dalam tabung dan diinkubasi dalam 100 mM buffer asetat pH 7.0 yang mengandung *p*-NP- β -galactopyranoside sebagai substrat. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 10 menit, Jumlah *p*-nitrophenyl yang dibebaskan dapat dilihat dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm. (**Gambar 12.**)

Enzim amobil + *p*-NP-Galactopyranoside



Inkubasi 37°C ; 10 menit



Cek *p*-nitrophenyl pada 420 nm

Gambar 12. Evaluasi Aktivitas Enzim

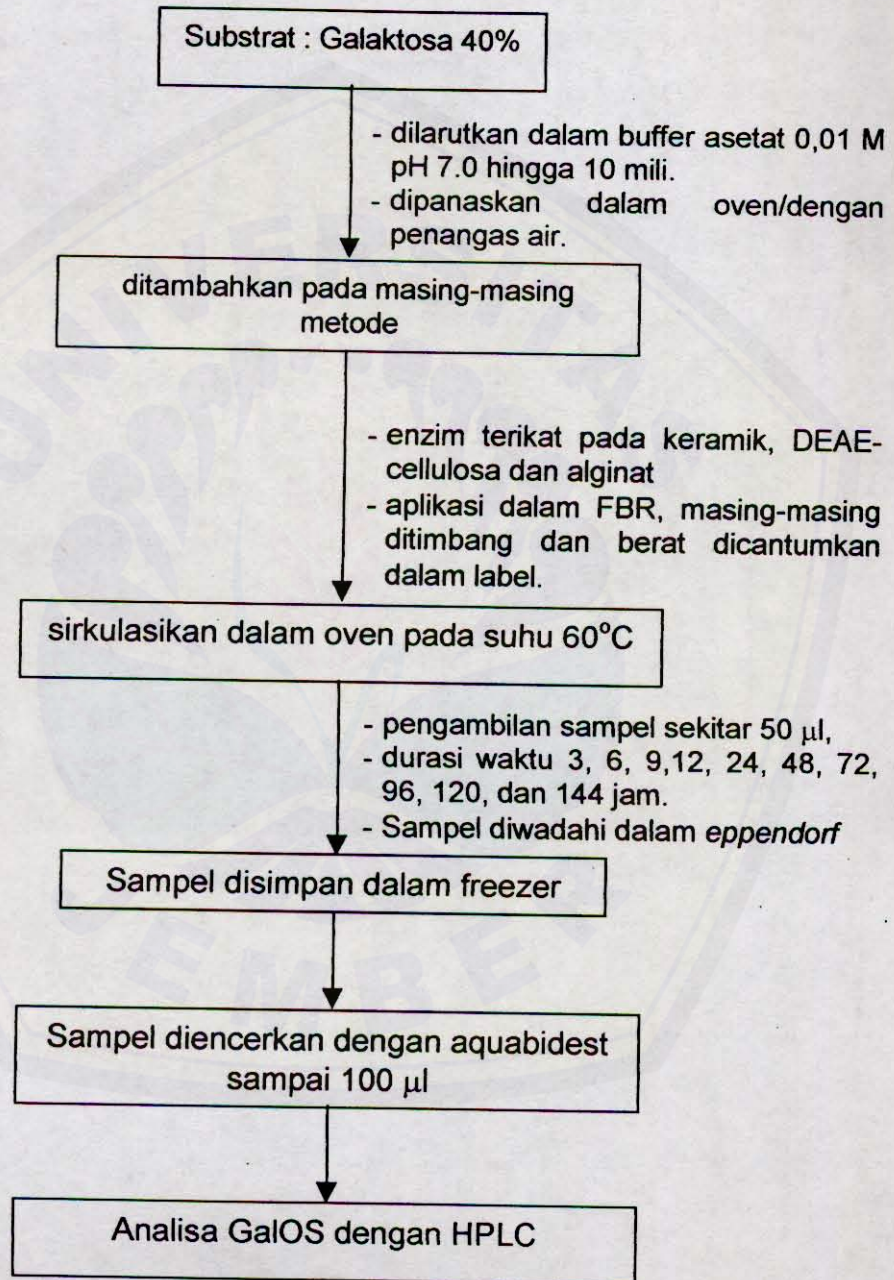
7. Pengujian Homo-GalOS

GalOS yang dihasilkan dari penelitian akan diujikan pada beberapa spesies *Lactobacillus sp.* Media (MRS-Broth 5 ml dalam 1 tabung *ependorf*) mengandung homo-GalOS (45 μ l) diinokulasi dengan biakan 75 μ l dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Parameter pengujian adalah indikator pertumbuhan dari *Lactobacillus sp* yang meliputi : kerapatan optik, pH dan total mikroba. Diagram alir pengujian selengkapnya dapat dilihat pada **Gambar 14.**

3.3.3 Urutan Kerja

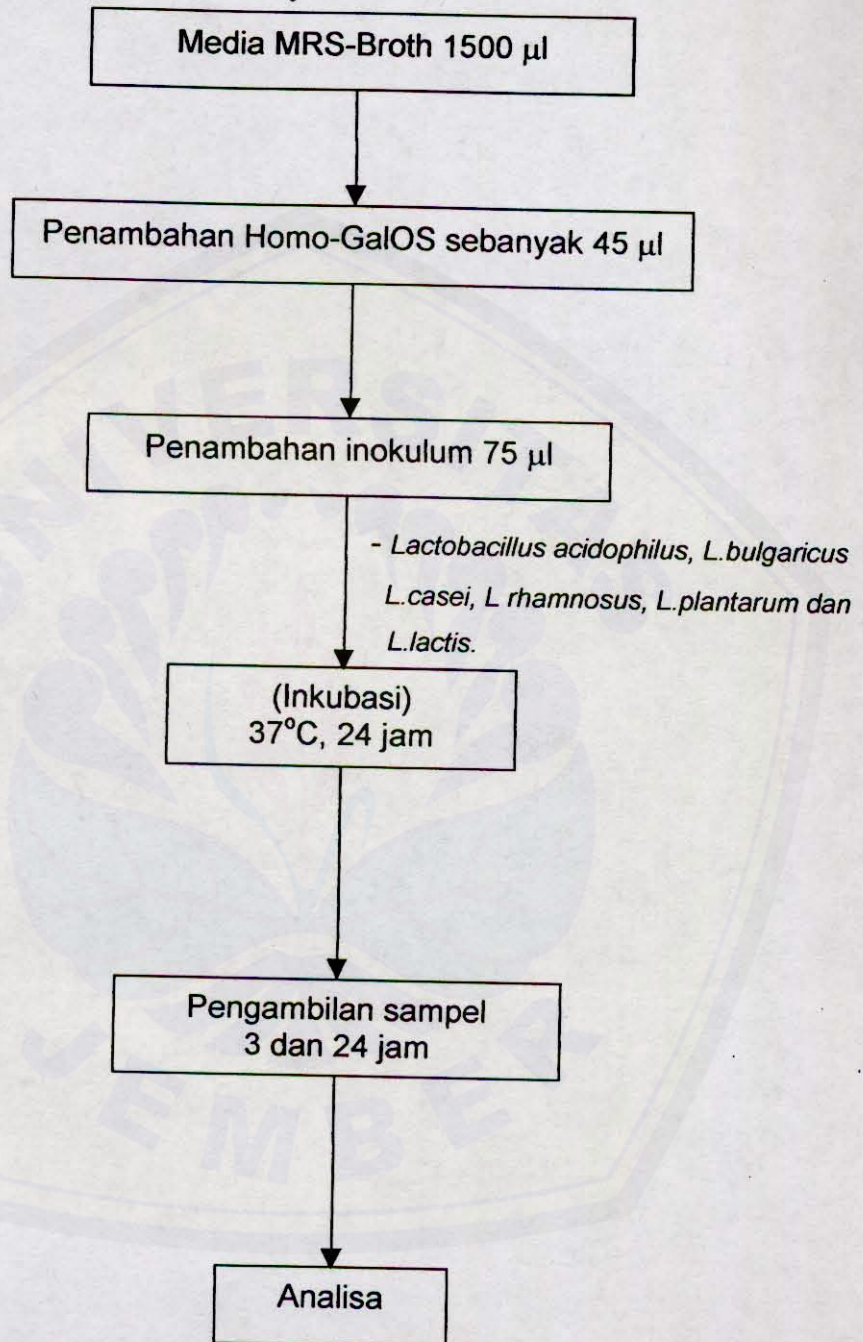
A. Tahap Pertama : Produksi Homo-GalOS

Adapun tahapan pelaksanaan penelitian dapat digambarkan sebagai berikut:



Gambar 13. Diagram Alir Produksi Homo-GalOS Secara Enzimatis Menggunakan Enzim β -Galaktosidase Amobil dari *Escherichia Coli*.

B. Tahap Kedua : Pengujian Homo-GalOS



Gambar 14. Diagram Alir Pengujian Homo-GalOS Terhadap Beberapa Bakteri Asam Laktat.

3.4 Pengamatan

Pengamatan yang dilaksanakan terhadap hasil produksi ini adalah analisa galaktooligosakarida dengan HPLC kemudian mengkonversikan dalam jumlah ppm dari kurva standart.

Analisa produk berupa galaktooligosakarida dengan HPLC menggunakan kolom HPLC Spherisorb-NH₂ (15 cm x 5 mm). Eluen yang digunakan acetonitrile : air dengan rasio 80 : 20 (v/v). Laju (*flow*) pada kolom dengan RID (*Refractive Index Detector*) untuk mendeteksi gula dalam galaktooligosakarida.

Untuk pengamatan terhadap sampel hasil pengujian dari spesies *Lactobacillus sp* dilakukan dengan : pH meter dan spektrofotometer.

3.5 Prosedur Analisa

Tahap-tahap analisa galaktooligosakarida dengan menggunakan HPLC sebagai berikut:

1. Persiapan alat

- a. Membuat eluen untuk analisa (*acetonitrile* 80%).
- b. Mengecek komponen-komponen alat: pompa, selang eluen, lubang injeksi harus dalam keadaan baik.
- c. Menyalakan rangkaian alat untuk analisa: HPLC, RID, monitor.
- d. Mencuci kolom menggunakan metanol 50% (v/v) dengan laju (*flow*) rendah yaitu sekitar 0,5 ml/menit.
- e. Eluen dilewatkan melalui kolom dengan laju rendah (0,5 ml/menit).
- f. Setelah monitor menunjukkan garis lurus (*baseline*) maka sampel siap untuk diinjeksikan.

2. Pembuatan kurva standar

Kurva standar dapat dibuat sebagai berikut:

- a. Membuat larutan gula standart: glukosa, maltosa dan maltotriosa masing-masing 12500, 6250, 3125, 1500 ppm .

- b. Menginjeksikan ke HPLC sebanyak 30 mikro mili dengan laju yang sama dengan sampel (1,5 ml/menit).
- c. Menetapkan kisaran waktu munculnya *peak* pada monitor untuk mono, di dan trisakarida.
- d. Membuat kurva standar dengan memplotkan konsentrasi gula standart dengan area yang tercetak pada monitor.

3. Pengujian sampel

Adapun tahap-tahap pengujian sampel adalah sebagai berikut:

- a. Sampel sebanyak 50 μ l diencerkan dengan menambahkan aquabidest sampai volume 100 μ l.
- b. Setelah tercampur merata, dan sampel diinjeksikan ke HPLC sebanyak 30 μ l .
- c. Setelah tampilan monitor menunjukkan garis lurus (*base line*) maka analisa sampel dianggap selesai dan dilanjutkan sampel berikutnya.

4. Perhitungan total mikroba (metode kerapatan optik)

Metode ini menggunakan alat bantu spektrofotometer. Dasar tekniknya adalah banyaknya cahaya yang diabsorpsi (*OD=optical density*) sebanding dengan kerapatan (banyaknya) sel bakteri dalam suspensi biakan.

Nilai OD tidak langsung menunjukkan jumlah mikroba, tapi menunjukkan jumlah cahaya yang disebarkan oleh populasi sel tersebut. Untuk menentukan jumlah sel mikroba, maka nilai OD harus disetarakan terlebih dahulu dengan jumlah mikroba (CFU= *Colony Forming Units/ml*) dengan menggunakan *Haemocytometer*. Untuk itu perlu dilakukan berbagai pengenceran sampel yang digunakan dalam OD. Setelah diperoleh nilai OD dari berbagai pengenceran tadi selanjutnya dibuat suatu kurva standar dengan sumbu x sebagai jumlah sel hidup dan sumbu y sebagai sel OD-nya. Dari kurva standar tersebut dapat digunakan untuk menentukan jumlah sel hidup suatu suspensi biakan (Anonim, 2001).

5. Derajat keasaman (pH)

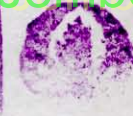
Analisa pH dilakukan dengan menggunakan alat pH-meter, adapun langkah-langkah yang dilakukan sebagai berikut :

- a. Kalibrasi pH meter dengan menggunakan buffer pH 4, 7 dan 11.
- b. Menuangkan sampel dari 1 tabung *ependorf* ke dalam tabung film.
- c. Mengukur pH sampel.

6. Pengukuran Optical Density (OD)/Absorbansi (Metode Kaplan, 2000).

Pengukuran absorbansi sampel dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer dengan langkah – langkah sebagai berikut:

- a. Mengencerkan sampel 1500 μ l dengan 3 ml aquades kemudian digojok agar homogen.
- b. Kalibrasi spektrofotometer dengan menggunakan aquades sebanyak 3 ml sebagai blanko pada panjang gelombang 620 nm.
- c. Mengukur absorbansi sampel pada panjang gelombang 620 nm.



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan pembahasan, maka dapat ditarik beberapa kesimpulan bahwa:

1. Enzim β -Galaktosidase asal *Escherichia coli* yang diimmobilisasi dengan: a) ikatan silang dengan glutaraldehida pada keramik, b) ikatan elektrostatis pada DEAE-Cellulose, dan c) pemerangkapan dalam gel alginat, mampu mempertahankan aktivitas enzim yang cukup tinggi yaitu 70-80%. Konsentrasi homo-GalOS tertinggi diperoleh dari sintesa enzim yang diimmobilisasi dengan keramik yaitu 265.480 ppm disakarida dan 61.593 ppm trisakarida, sedangkan konsentrasi homo-GalOS terendah dihasilkan oleh enzim yang diimmobilisasi dengan gel alginat yaitu 144.012 ppm disakarida dan 88.127 ppm trisakarida.
2. Aktivitas enzim β -galaktosidase amobil menurun berkisar antara 20 - 30% pada siklus 1 dan 40 - 50% pada siklus 2, serta 70 - 80% pada siklus
3. Homo-GalOS yang dihasilkan oleh enzim yang diimmobilisasi mampu berfungsi sebagai *growth promotor* bagi beberapa spesies *Lactobacillus*. Bakteri *Lactobacillus acidophilus* adalah spesies *Lactobacillus* yang menunjukkan pertumbuhan paling baik (jumlah total mikroba tertinggi) dengan adanya penambahan homo-GalOS.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai perpanjangan waktu inkubasi pada proses produksi homo-GalOS untuk enzim dalam keadaan amobil.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajisaka, K. and Fujimoto, H. 1989. **Regioselective Synthesis of Trisaccharides by use of a Reversible Hydrolysis of α - and β -galactosidase**. Carb. Research. 185, 139-146.
- Anonim. 1992. **Diktat Kuliah Teknologi Fermentasi**. Jember: Fakultas Teknologi Pertanian. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian.
- . 2001. **Biochemicals and Reagents for Life Science and Research**. Sigma, St. Louis. USA.
- . 2001. **Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Pengolahan I**. Jember: Fakultas Teknologi Pertanian.
- Arafah, E. 2003. **Pangan Fungsional dan Oligosakarida: Pangan Fungsional dalam Perspektif Filsafat Ilmu**. www. Hayati-ipb.com/users/rudycct.
- Astawan, M. 2003. **Pangan Fungsional untuk Kesehatan yang Optimal**. http://www.kompas.com/kompas_cetak/ilpeng 22 maret 2003. Jakarta: Kompas Cyber Media.
- Axelsson, L. 1988. **Lactic Acid Bacteria: Clasification and Physiology**. dalam Seppo Salminen (Ed) "*Lactic Acid Bacteria*" Microbiology and Functional "New York : Marcel Dekker.
- Berger. J.I., Lee, B.H., and Lacriox, C. 1995a. **Imobilisation of β -galactosidase from *Thermus aquaticus* YT-1 for Oligosaccharides Synthesis**. Biotechnology technique, 9, 601-606. dalam Sony Suwasono, et al "*Sintesa Galaktooligosakarida secara Enzimatik dengan β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae**".
- . 1995b. **Oligosaccharides Synthesis by Free and Immobilised β -galactosidase from *Thermus aquaticus* YT-1**. Biotechnology Letter, 17, 675-678. dalam Sony Suwasono, et al "*Sintesa Galakto-oligosakarida secara Enzimatik dengan β -galaktosidase dari *Aspergillus oryzae**".
- Bonio, M. 1994. **Magic ingredients**. Food techn., 48(10) : 37. dalam Arafah. "*Pangan Fungsional dalam Perspektif Filsafat Ilmu*".
- 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. Edward, R.A., Fleet, G.H., dan Wotton, M. 1987. **Ilmu Pangan**. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.
- Chikoke, A., 2000, **Prebiotics Balance Digestion and Improve Overall Health**, Nutrition Science News, 26: 2-4. dalam Sony Suwasono, *et al*. "*Sintesa Galakto-oligosakarida secara Enzimatik dengan β -galaktosidase dari Aspergillus oryzae*".
- Daniel, I.C. Wang., Charles L. Cooney, Arnold L. Demain, Peter Dunhil, Arthur E. Humphery dan Malcolm D. Lilly (1979) **Fermentation and Enzyme Technology**, dalam Judoamidjojo *et al*, "Teknologi Fermentasi".
- Drauz, K. and Waldman, H. 1995. **Enzyme Catalysis in Organik Synthesis**, VCH Publishers, Inc., Weinheim, pp.73-38.
- Dwek, R.A. 1996. **Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars**. Chemical Review, 96, 683-720. dalam Sony Suwasono, *et al* "*Sintesa Galakto-oligosakarida secara Enzimatik dengan β -galaktosidase dari Aspergillus oryzae*".
- El khadem, H.S. 1988. **Carbohydrate Chemistry, Monosaccharides and their Oligomers**. San diego: Academic press. dalam Sony Suwasono, *et al* "*Sintesa Galaktooligosakarida secara Enzimatik dengan β -galaktosidase dari Aspergillus oryzae*".
- El sayed, H. and Laszlo, E. 1994. **Condensation of Glucose by the Reverse Hydrolysis Reaction of Glucoamylase**. Effect of Organic solvents and Immobilisation forms. Acta Alimentaria, 23, 359-375.
- Engasser, J.M., and Hovarth. C. 1976. **Diffusional and Kinetic Effects with Imobilized Enzymes**. Appl. Biochem. Boieng. 11. 172-220. dalam Mangunwidjaja D. dan Ani Suryani : "*Teknologi Bioproses*".
- Fardiaz, S. 1992. **Mikrobiologi pangan I**. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Frezier WC and Westhoff, DC. 1988. **Food Microbiology**. Edisi Keempat. Singapore: Mc Graw Hill Book. Co.
- Fuller R. 1991. **Probiotics in Human Medicine: Gut**. dalam Sudarmo *et al*. "Kontribusi Prebiotik pada Formula untuk Pemeliharaan

- Ekosistem Mikrobiota Normal pada Usus". Surabaya: Laboratorium ?SMF kesehatan Anak RS. Dr.Soetomo/ FK Unair.
- Gibson, G.R. dan Robertfroid, M. 1995.. J. Nur **Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota-introducing the Concepts of Prebiotics**. 125.1401-1412.
- Girindra. A. 1993. **Biokimia I**. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Goldberg, I (Ed). 1999. **Functional Foods: Designer food, Pharmafood, nutraceutical**. Maryland USA. An Aspen Publication.
- Hartono, 1. D. 2003. **Produksi Prebiotik Galaktooligosakarida Oleh Enzym β -Galaktosidase dari *Escherichia Coli***. Jember. Universitas Jember.
- Head, R.J. 1995. **Approaches to Definition and Substantiation : First International Conferences on East-West Perspective on Functional Food**. Singapore. dalam Arafah."Pangan Fungsional Dalam Perspektif Filsafat Ilmu".
- Ichikawa, Y., Look, G.C. den Wang, C.H., 1992. **Enzym-Catalyzed Oligosaccharide Synthesis**. Analytical Biochem, 202; 215-238.
- Iwasaki, K, Nakajima., den Nakano, S. 1996. **Galacto-oligosaccharide Production from Lactose by an Enzymic Batch Reaction Using β -Galaktoside**. Process Biochemistry, 31 (1): 69-76. dalam Sony Suwasono, et al "*sintesa galakto-oligosakarida secara enzimatik dengan β -Galaktosidase dari *Aspergillus oryzae**".
- Judoamidjojo, R.V., Abdul, A.D. den Endang, G.S. 1992. **Teknologi Fermentasi**. Rajawali Press. Jakarta.
- Kurniasih, D., 2001, **Prebiotik Atasi Masalah Diare**. Tabloid Nakita, P.T. Gramedia. Jakarta. dalam Sony Suwasono, et al "*Sintesa Galakto-oligosakarida secara Enzimatik dengan β -Galaktosidase dari *Aspergillus oryzae**".
- Kaplan, H dan Hutkin, R.W 2000. **Fermentation of Fructo-oligosaccharides Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria**. Dalam Applied and Enviromental Microbiology. (Juni, 2000). P.2682-2684. American Society of Microbiology.
- Lis, H. dan Sharon, N. 1993. **Protein Glycosilation. Structural and Functional Aspects**, European J. Biochemistry, 218, 1-27.

- Macfalane and Cumming. 1999. **Biomedical Journal**. "Prebiotics; and Probiotic : Can Regulating the Activities of Intestinal Bacteria Benefit Health?". <http://www.bmj.com/cgi/content/full>. Cambridge: Medical Research Council Dunn Nutrition Centre.
- Mangunwidjaja, D dan Ani, S. 1994. **Teknologi Bioproses**. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Martino, A, Durante, M., Pifferi, P.G., Spagna, G., and Bianchi, G. 1996. Immobilisation of β -Glucosidase from A Commercial Preparation. Part 1. A Comparative Study of Natural Supports. *Process Biochemistry*, 31, 281-285. dalam Sony Suwasono, et al "Sntesa Galakto-oligosakarida secra Enzimatik degan β -Galaktosidase dari *Aspergillus oryzae*".
- Monsan P. dan Paul, F. 1995. Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides by Glucoarnylase in Reverse, *Biotechnology Letters* 13, 501-504 dalam Imam Dwi Hartono. "Produksi Prebiotik Galaktooligoskarida oleh enzim β -Galaktosidase dari *Escherichia coli*". Jember. Universitas Jember.
- Monsan, P. 1982. **Cinetique Enzymatique Heterogene** dalam G. Durrant et P. Monsan. *Les Enzymes Production et Utilisation Industrielles*. Gaulhiver. dalam Mangunwidjaja D. dan Ani Suryani "Teknologi Bioproses".
- Muchtadi, d. 1996. **Makanan Fungsional: Pengendalian dan Perancangan**. Kursus Singkat Makanan Fungsional. Yogyakarta: PAPTl.8-9 Juni 1996.
- 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-glucoamylase and α -glucosidase. *Biosci. Biotech. Nioche.*, 59, 1732 - 1736. dalam Sony Suwasono, et al "Produksi Prebiotik Galaktooligosakarida oleh Enzim β -Galaktosidase dari *Escherichia coli*". Jember. Universitas Jember.
- Nakanishi, K., Matsuno, R., Torri, K., Yamamoto, K., and Kamikubo, T. 1983. Properties of Immobilised β -Galaktosidase from *Bacillus Circulans*. *Enzyme Microbial Technology*, 5, 115-120. dalam Sony Suwasono, et al. "Produksi Prebiotik Galaktooligosakarida oleh Enzim β -Galaktosidase dari *Escherichia coli*". Jember. Universitas Jember.

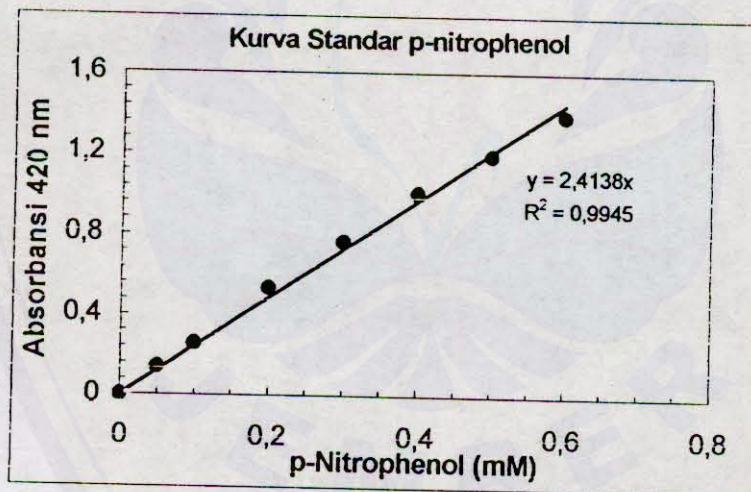
- Nuraida, L. 1996. **Pelatihan Makanan Fungsional "Bifidobacteria dan Oligosakarida dalm Minuman dan Makanan Fungsional"**. Yogyakarta: PAU Pangan dan Gizi UGM.
- Ofek, I. dan Sharon, N. 1990. **Adhesive as Lactins: Specify and Role in Infection Current Topics in Microbiology and Immunology**, 151,91 – 113. dalam Sony Suwasono, *et al* "*Sintesa Galakto-oligosakarida secara Enzimatik dengan β -Galaktosidase dari Aspergillus oryzae*".
- Page, D.S. 1997. **Prinsip-Prinsip Biokimia Edisi Kedua**. Erlangga. Jakarta.
- Pazur, J.H., 1994. **Neutral Polisaccharides in Carbohydrate Analysis. A Practical Approach**. 2nd ed. M.F. Chaplin, and J.F. Kennedy. Oxford Univ., Press., pp. 73-124.
- Prangdimurti, E. 2003. **Prebiotik dan Efek Perlindungannya Terhadap Kanker Kolon**. dalam *Makalah Falsafah Sains*. IPB: http://rudycr.tripod.com/sem/endang_prangdimurti.
- Rastall, R.A., Adlard, M.W., Bucke, C. 1991. **Synthesis of Hetero-oligosaccharides by Glucoamylase in Reverse**. *Biotechnology Letters*, 13, 501-504.
- Rastall, R.A., Pikett, S.F., Adlard, M.W., dan Bucke, C. 1992a. **Synthesis of Hetero-oligosaccharides by Reversal of A Fungal β -Glucanase**. *Biotechnology Letters*, 14, 373-378.
- Rastall, R.A., Rees N.H., wait, R., Adlard, M.W., dan Bucke, C. 1992b. **α -Mannosidase-catalized Synthesis of A Novel Manno-,lyxo-, and Heteromanno-oligosaccharides: A Comparison of Kinetically and Thermodynamically Mediated Approaches**. *Enzyme Microbial Technology*. 14, 53-57. By Reversal of A Fungal β -Glucanase. *Biotechnology Letters*. 14, 53-57.
- 2001. **Second Generation Prebiotics**. Division of Food Microbial Science. Reading. (<http://www.fst.rdg.ac.uk/prebiotics.htm>). dalam Sony Suwasono, *et al*. "*Produksi Prebiotik Galakto-oligosakaridaoleh Enzim β -Galaktosidase dari Escherichia coli*". Jember. Universitas Jember.
- Salminen, S. Deighton, M.A. Benno, Y. and Gorbach, S.L. 1998. **Lactics Acid Bacteria in Health and Desiase**. dalam Sepo Salminen and Wright, A. (Ed). *Lactics Acids Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. New York: Marcel Dekker.

- Schlegel, H.G. 1994. **Mikrobiologi Umum**. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Sherphed, V. and Montgomery, R. 1976. **α -D-Mannosidase. Preparation and Properties of Free and Insolubilised Enzyme**. *Biocimica et Biophysica Acta*, 429, 884-894.
- Sibeuea, P. 2002. **Probiotik: Hidup Sehat Bersama Bakteri !**. http://www.kompas.com/kompas_cetak/iptek. Jakarta: Kompas Cyber Media.
- Silalahi, J. 2001. **Manfaat dan Khasiat Probiotik Untuk Mencegah Penyakit**. http://www.kompas.com/kompas_cetak/iptek. Jakarta: Kompas Cyber Media.
- Sudarmadji, S. 1995. **Analisa Bahan Makanan dan Pertanian**. Yogyakarta. Liberty.
- Suwasono, S. dan Rastall, R.A. 1996. **A Highly Regioselective Synthesis of Mannobiose and Mannotriose by reverse hydrolysis Using Specific 1,2- α -Mannosidase from *Aspergillus Phoenicis***. *Biotechnology Letters*, 18, 851-856.
- 1998a. **Enzymatic Synthesis of Heteromanno-oligosaccharides Using α -1,2-Mannosidases: A Comparative Study of Linkage-specific and Non-linkage-specific Enzymes**. *Journal of Chemical Tecnology and Biotechnology*, 73 (1), pp. 37-42.
- 1998b. **Synthesis of Oligosaccharides Using immobilised α -1,2-Mannosidase *Aspergillus Phoenicis* : Immobilisation Dependent Modulation of Product Spectrum**. *Biotechnology Letters*, 20, pp. 15-18.
- Suwasono, S, T. Utami, R. Indrati, ER. Ani 2001. **Sintesa Galakto-oligosakarida secara Enzimatik dengan β -Galaktosidase dari *Aspergillus Oryzae***. dalam B. Widianarko (ed). *Mikrobiologi dan Bioteknologi Pangan Himpunan Makalah Seminar National Teknologi Pangan*. Semarang: PAPTl.
- Thiem, J. 1995. **Application of Enzymes in synthetic Carbohydrate Chemistry**. *FEMS Microbiology Reviews*, 16, 193-211. dalam Sony Suwasono, et al "*Sintesa Galakto-oligosakarida secara Enzimatik dengan β -Galaktosidase dari *Aspergillus oryzae**".
- Toha, A.H.A. 2001. **Biokimia: Metabolisme Molekul**. Alfabeta. Bandung.

- Tomomatsu, H. 1994. **Health Effects of Oligosaccharides**. Food Techn., 48 (10):61. dalam Arafah. *"Pangan Fungsional dalam Perpective Filsafat Ilmu"*.
- Uhlich, T.,Ulbricht,M., and Tomaschewski, G. 1996. **Immobilisation of Enzymes in Photochemically Crossed-linked Polyvinyl Alcohol**. Enzyme Microbial Technology, 19, 124-131. dalam Sony Suwasono, et al *"Sintesa Galakto-oligosakarida secara Enzimatik dengan β -Galaktosidase dari Aspergillus oryzae"*.
- Waspodo, I.S. 2001. **Efek Probiotik, Prebiotik dan Synbiotik bagi Kesehatan**. <http://kompas.com./iptek> 30 April 2001. Jakarta: Kompas Cyber Media.
- Wijaya, C.H. 1996. **Komponen Bioaktif: Kursus Singkat Makanan Fungsional**. Yogyakarta, 8-9 Juli 1996.
- Winarno, F.G. 1986. **Enzim Pangan**. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Zopf, D. dan Roth, F. 1996. **Oligosaccharides: Anti-invective Agents**. The Lancef,374, 1017-1021. dalam Sony Suwasono, et al *"Sintesa Galakto-oligosakarida secara Enzimatik dengan β -Galaktosidase dari Aspergillus oryzae"*.

Lampiran 1. Kurva Standart p-nitrophenol dan Absorbansi.

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



Lampiran 2. Hasil Perhitungan Aktivitas Enzim β -Galaktosidase Bebas.

Aktivitas enzim β -galaktosidase bentuk bebas *Escherichia coli*

14 mg enzim (1,4 mg x 769 U/mg) = 1076,6 Unit

dilakukan dengan 5 ml buffer ----- diencerkan 100x

diambil 100 μ l enzim + 900 μ l p-NP-galaktopiranosid ----- inkubasi 37°C 10 menit

Dilution = 1/1000 Aktivitas = abs 420 : 2.4138* Dilution : Waktu

Substrat	Abs-420 nm	p-NP (mM)	p-NP (μ mol)	Aktivitas per 100 μ l E	Aktivitas per ml E	Aktivitas akhir per ml	Aktivitas 5 ml
p-NP-B-Gal	0.5200	0.2154	0.2154	0.02154	0.21543	215.42796	1077.13978
p-NP-B-Gal	0.0370	0.0153	0.0153	0.00153	0.01533	15.32853	76.64264
o-NP-B-Gal	0.2920	0.1210	0.1210	0.01210	0.12097	120.97108	604.85541

Lampiran 3. Hasil Perhitungan Aktivitas Enzim β -Galaktosidase Teramobil pada Keramik.

Aktivitas enzim β -galaktosidase bentuk amobil

0.01 - 0.05 gram enzim dalam keramik

diambil 0,01 gram enzim keramik + 1000 μ l p-NP-galaktopiranosid ----- inkubasi 37°C 10 menit

Dilution = Aktivitas = abs 420:2.4138* Dilution : Waktu

Substrat	Abs-420 nm	p-NP (mM)	p-NP (μ mol)	Aktivitas Enzim	Sampel Keramik (gr)	Aktivitas per gr	Berat Keramik t	Aktivitas Total
p-NP- β -Gal	0.4500	0.1864	0.1864	0.3729	0.0107	35.0100	4.5	157.5448
	0.4250	0.1761	0.1761	0.3521	0.0103	34.1554	4.5	153.6992
Siklus 1	0.3350	0.1388	0.1388	0.2776	0.0127	21.8560	4.5	98.3518
	0.3190	0.1322	0.1322	0.2643	0.0121	21.8405	4.5	98.2822
Siklus 2	0.2155	0.0893	0.0893	0.1786	0.0122	14.6358	4.5	65.8611
	0.2140	0.0887	0.0887	0.1773	0.0123	14.4510	4.5	65.0295
Siklus 3	0.1155	0.0478	0.0478	0.0957	0.0122	7.8442	4.5	35.2991
	0.1140	0.0472	0.0472	0.0945	0.0123	7.6982	4.5	34.6419

Lampiran 4. Hasil Perhitungan Aktivitas Enzim β -Galaktosidase Teramobil pada Alginat.
0.01 - 0.05 gram enzim dalam Alginat

diambil 0.01 gram enzim alginat + 1000 μ l p-NP-galaktopiranosid ----- inkubasi 37°C 10 menit
Dilution =

Aktivitas = abs 420 : 2.4138 * Dilution : Waktu

Substrat	Abs-420 nm	p-NP (mM)	p-NP (μ mol)	Aktivitas Enzim	Sampel Alginat (gr)	Aktivitas per gr	Berat Alginat t	Aktivitas Total
p-NP-B-Gal	0.6650	0.2755	0.2755	0.5510	0.0151	364.900	4.5	1.642.048
	0.6400	0.2651	0.2651	0.5303	0.014	378.774	4.5	1.704.485
Siklus 1	0.4800	0.1989	0.1989	0.3977	0.0176	225.973	4.5	1.016.880
	0.5080	0.2105	0.2105	0.4209	0.0175	240.522	4.5	1.082.348
Siklus 2	0.3325	0.1377	0.1377	0.2755	0.0167	164.970	4.5	742.363
	0.3200	0.1326	0.1326	0.2651	0.0165	160.692	4.5	723.115
Siklus 3	0.1680	0.0696	0.0696	0.1392	0.0170	81.882	4.5	368.470
	0.1710	0.0708	0.0708	0.1417	0.0172	82.375	4.5	370.688

Lampiran 5. Hasil Perhitungan Aktivitas Enzim β -Galaktosidase Teramobil pada DEAE-Cellulose.
0.01 - 0.05 gram enzim dalam DEAE-Cell

diambil 0.01 gram enzim keramik + 1000 μ l p-NP-galaktopiranosid ----- inkubasi 37°C 10 menit
Dilution =

Aktivitas = abs 420 : 2.4138 * Dilution : Waktu

Substrat	Abs-420 nm	p-NP (mM)	p-NP (μ mol)	Aktivitas Enzim	Sampel DEAE-Cell (gr)	Aktivitas per gr	Berat DEAE t	Aktivitas Total
p-NP-B-Gal	0.4500	0.1864	0.1864	0.3729	0.0098	38.0465	4.5	171.2094
	0.4500	0.1864	0.1864	0.3729	0.0096	38.8392	4.5	174.7763
Siklus 1	0.3360	0.1392	0.1392	0.2784	0.0101	27.5643	4.5	124.0392
	0.3401	0.1409	0.1409	0.2818	0.0097	29.0512	4.5	130.7303
Siklus 2	0.2270	0.0940	0.0940	0.1881	0.0096	19.5922	4.5	88.1649
	0.2310	0.0957	0.0957	0.1914	0.0098	19.5306	4.5	87.8875
Siklus 3	0.1125	0.0466	0.0466	0.0932	0.0098	9.5116	4.5	42.8024
	0.1130	0.0468	0.0468	0.0936	0.0097	9.6524	4.5	43.4358

Lampiran 6. Hasil Perhitungan Total Aktivitas Enzim.

Matriks	Enzim Asli (Units)	Berat Matriks Sampel (g)	Aktivitas (Units/g)	Berat Matriks total		Total Aktivitas (Units)	Hasil (%)
				(1 + II)/2			
Tanpa	2.154.280	0.0000	0.0000			215.4280	100.000
Keramik	215.4280	0.0107	35.0100	4.5000		157.5450	73.1312
	215.4280	0.0103	34.1554	4.5000		153.6993	71.3460
DEAE	215.4280	0.0098	38.0465	4.5000		171.2093	79.4740
	215.4280	0.0096	38.8392	4.5000		174.7764	81.1298
Alginat	215.4280	0.0151	36.4900	4.5000		164.2050	76.2227
	215.4280	0.0140	37.8774	4.5000		170.4483	79.1208

Lampiran 7. Hasil Perhitungan Total Aktivitas Enzim Teramobil setelah Beberapa Siklus.

Matriks	Siklus	Aktivitas per gr (Units) I	Aktivitas per gr (Units) II	Aktivitas rata (I + II)/2	Berat Matriks gram	Total Aktivitas (Units) I	Total Aktivitas (Units) II	Total Aktivitas rata-rata	% Yield
Keramik	0	35.0100	34.1554	34.5827	4.5000	157.5450	153.5450	155.6222	100%
	1	21.8560	21.8405	21.8483	4.5000	98.3520	98.2823	98.3171	63,1768%
	2	14.6358	14.4510	14.5434	4.5000	65.8611	65.0295	65.4453	42,0540%
	3	7.8442	7.6982	7.7712	4.5000	35.2989	34.6419	34.9704	22,4713%
DEAE-Cell	0	38.0465	38.8392	38.4429	4.5000	171.2093	174.7764	172.9928	100%
	1	27.5643	29.0512	28.3078	4.5000	124.0394	130.7304	127.3849	73,6354%
	2	19.5922	19.5306	19.5614	4.5000	88.1649	87.8877	88.0263	50,8844%
	3	9.5116	9.6524	9.5820	4.5000	42.8022	43.4358	43.1190	24,9253%
Alginat	0	36.4900	37.8774	37.1837	4.5000	164.2050	170.4483	167.3267	100%
	1	22.5973	24.0522	23.3248	4.5000	101.6879	108.2349	104.9614	62,7284%
	2	16.4970	16.0692	16.2831	4.5000	74.2365	72.3114	73.2740	43,7910%
	3	8.1882	8.2375	8.2129	4.5000	36.8469	37.0688	36.9578	22,0872%

Lampiran 8. Data Pengamatan Produksi Galakto-oligosakarida

1. Metode Imobilisasi Pada Keramik

❖ Siklus I

Inkubasi (Jam)	Area		Konsentrasi (ppm)	
	GalOS ₂	GalOS ₃	GalOS ₂	GalOS ₃
3	79.564	7.695	11.557	1.619
6	189.269	13.586	27.491	2.859
9	239.459	14.908	34.781	3.137
12	219.410	18.818	31.869	3.960
24	226.003	51.324	32.827	10.801
48	232.169	69.989	33.723	14.729
72	320.697	77.553	46.581	16.321
96	472.098	80.644	68.572	16.972
120	666.930	107.378	96.872	22.598
144	742.393	119.135	107.833	25.072

❖ Siklus II

Inkubasi (Jam)	Area		Konsentrasi (ppm)	
	GalOS ₂	GalOS ₃	GalOS ₂	GalOS ₃
3	60.724	5.854	8.820	1.232
6	126.179	8.765	18.328	1.845
9	159.639	9.618	23.188	2.024
12	162.526	12.978	23.607	2.731
24	196.524	35.396	28.545	7.449
48	201.886	48.268	29.324	10.158
72	278.867	53.485	40.506	11.256
96	377.678	64.515	54.858	13.577
120	533.544	85.902	77.497	18.078
144	593.514	95.308	86.266	20.058

❖ Siklus III

Inkubasi (Jam)	Area		Konsentrasi (ppm)	
	GalOS ₂	GalOS ₃	GalOS ₂	GalOS ₃
3	79.564	7.695	11.557	1.619
6	189.269	13.586	27.491	2.859
9	239.459	14.908	34.781	3.137
12	219.410	18.818	31.869	3.960
24	226.003	51.324	32.827	10.801
48	232.169	69.989	33.723	14.729
72	320.697	77.553	46.581	16.321
96	472.098	80.644	68.572	16.972
120	666.930	107.378	96.872	22.598
144	742.393	119.135	107.833	25.072

2. Metode Imobilisasi

❖ Siklus I

Inkubasi				
(Jam)	GalOS ₂	GalOS ₃	GalOS ₂	GalOS ₃
3	71.477			
6	169.095			
9	204.267			
12	217.937	18.078		
24	225.563	51.324		
48	259.425	69.989		
72	307.348	77.553	44.642	
96	345.060	80.644	50.120	28.921
120	407.084	107.378	59.129	35.522
144	432.174	119.135	62.773	37.933

❖ Siklus II

Inkubasi (Jam)	Area		Konsentrasi (ppm)	
	GalOS ₂	GalOS ₃	GalOS ₂	GalOS ₃
3	58.633	19.078	8.516	4.015
6	112.730	24.064	16.374	5.064
9	171.896	26.158	24.968	5.505
12	184.783	41.785	26.840	8.794
24	208.240	60.747	30.247	12.784
48	231.186	75.934	33.580	15.980
72	260.566	91.120	37.847	19.176
96	319.770	113.900	46.447	23.971
120	328.221	127.927	47.674	26.923
144	382.549	154.281	55.565	32.469

❖ Siklus III

Inkubasi (Jam)	Area		Konsentrasi (ppm)	
	GalOS ₂	GalOS ₃	GalOS ₂	GalOS ₃
3	54.773	15.280	7.956	3.216
6	90.184	16.313	13.099	3.433
9	107.800	19.078	15.658	4.015
12	149.249	28.617	21.685	6.023
24	166.988	42.926	24.255	9.034
48	220.118	71.776	31.723	15.105
72	247.677	93.308	46.972	19.637
96	285.076	116.635	35.975	24.546
120	298.227	117.448	43.318	24.717
144	299.939	141.233	43.566	19.723

2. Metode Imobilisasi Pada DEAE-Cellulose

❖ Siklus I

Inkubasi (Jam)	Area		Konsentrasi (ppm)	
	GalOS ₂	GalOS ₃	GalOS ₂	GalOS ₃
3	71.477	7.695	10.382	4.798
6	169.095	13.586	24.561	6.829
9	204.267	14.908	29.670	7.219
12	217.937	18.818	31.655	12.886
24	225.563	51.324	32.763	16.108
48	259.425	69.989	37.682	17.113
72	307.348	77.553	44.642	22.247
96	345.060	80.644	50.120	28.921
120	407.084	107.378	59.129	35.522
144	432.174	119.135	62.773	37.933

❖ Siklus II

Inkubasi (Jam)	Area		Konsentrasi (ppm)	
	GalOS ₂	GalOS ₃	GalOS ₂	GalOS ₃
3	58.633	19.078	8.516	4.015
6	112.730	24.064	16.374	5.064
9	171.896	26.158	24.968	5.505
12	184.783	41.785	26.840	8.794
24	208.240	60.747	30.247	12.784
48	231.186	75.934	33.580	15.980
72	260.566	91.120	37.847	19.176
96	319.770	113.900	46.447	23.971
120	328.221	127.927	47.674	26.923
144	382.549	154.281	55.565	32.469

❖ Siklus III

Inkubasi (Jam)	Area		Konsentrasi (ppm)	
	GalOS ₂	GalOS ₃	GalOS ₂	GalOS ₃
3	54.773	15.280	7.956	3.216
6	90.184	16.313	13.099	3.433
9	107.800	19.078	15.658	4.015
12	149.249	28.617	21.685	6.023
24	166.988	42.926	24.255	9.034
48	220.118	71.776	31.723	15.105
72	247.677	93.308	46.972	19.637
96	285.076	116.635	35.975	24.546
120	298.227	117.448	43.318	24.717
144	299.939	141.233	43.566	19.723

3. Metode Imobilisasi Pada Natrium Alginat

❖ Siklus I

Inkubasi (Jam)	Area		Konsentrasi (ppm)	
	GalOS ₂	GalOS ₃	GalOS ₂	GalOS ₃
3	24.737	11.252	3.593	2,368
6	30.401	13.407	4.416	2,822
9	45.927	16.088	6.671	3,386
12	62.563	27.002	9.100	5,683
24	105.671	44.480	15.349	9,361
48	249.200	99.251	36.196	20,888
72	262.951	112.014	38.194	23,574
96	340.587	124.216	49.470	26,142
120	345.358	166.323	50.163	35,003
144	394.305	184.639	57.273	38,858

❖ Siklus II

Inkubasi (Jam)	Area		Konsentrasi (ppm)	
	GalOS ₂	GalOS ₃	GalOS ₂	GalOS ₃
3	24.737	11.252	3.593	2.368
6	30.401	13.407	4.416	2.822
9	45.927	16.088	6.671	3.386
12	62.563	27.002	9.100	5.683
24	105.671	44.480	15.349	9.361
48	249.200	99.251	36.196	20.888
72	262.951	112.014	38.194	23.574
96	340.587	124.216	49.470	26.142
120	345.358	166.323	50.163	35.003
144	394.305	184.639	57.273	38.858

❖ Siklus III

Inkubasi (Jam)	Area		Konsentrasi (ppm)	
	GalOS ₂	GalOS ₃	GalOS ₂	GalOS ₃
3	16.584	4.612	2.409	971
6	20.730	6.862	3.011	1.444
9	25.912	8.793	3.764	1.851
12	32.390	9.237	4.705	1.944
24	64.780	20.355	9.409	4.284
48	119.650	46.825	17.366	9.854
72	174.340	58.965	25.323	12.409
96	207.625	76.655	30.158	16.132
120	217.365	88.248	31.572	18.572
144	277.108	104.073	40.250	21.902

Lampiran 9 . Hasil Pengamatan Pengujian GalOS dalam Media MRS-Broth pada spesies *Lactobacillus* sp. Untuk Waktu Inkubasi 3 jam.
Keramik - *E.coli*

Jenis Mikroba	Pertumbuhan			pH		Waktu Inkubasi 3 jam		OD (absorbansi)		Total mikroba		Rata-rata
	1	2	rata-rata	1	2	1	2	1	2	1	2	
<i>L.acidophilus</i>	++	+++	++	5.73	5.55	5.64	0.135	0.098	0.117	8.35E+07	5.20E+07	6.77E+07
<i>L.bulgaricus</i>	++	+++	++	5.62	5.64	5.63	0.143	0.104	0.124	3.17E+08	2.21E+08	2.69E+08
<i>L.casei</i>	++	++	++	5.96	5.97	5.97	0.070	0.071	0.071	1.45E+07	1.48E+07	1.46E+07
<i>L.plantarum</i>	+	+	+	5.54	5.65	5.60	0.135	0.474	0.305	2.50E+07	9.18E+07	5.84E+07
<i>L.rhannosus</i>	++	++	++	5.94	5.89	5.92	0.076	0.660	0.368	1.50E+07	1.58E+07	8.66E+07
<i>L.lactis</i>	++	++	++	5.73	5.68	5.71	0.106	0.639	0.373	1.86E+07	1.20E+07	6.93E+07

DEAE-E.Coli

Jenis Mikroba	Pertumbuhan			pH		Waktu Inkubasi 3 jam		OD (absorbansi)		Total mikroba		rata-rata
	1	2	rata-rata	1	2	1	2	1	2	1	2	
<i>L.acidophilus</i>	+	+	+	5.43	5.42	5.43	0.122	0.106	0.114	7.24E+07	5.88E+07	6.56E+07
<i>L.bulgaricus</i>	+++	+++	+++	5.42	5.60	5.51	0.144	0.144	0.144	3.20E+08	3.20E+08	3.20E+08
<i>L.casei</i>	++	++	++	5.79	5.75	5.77	0.070	0.068	0.069	1.45E+07	1.40E+07	1.40E+07
<i>L.plantarum</i>	+	++	++	5.43	5.43	5.43	0.148	0.141	0.145	2.75E+07	2.62E+07	2.68E+07
<i>L.rhannosus</i>	+	++	+	5.82	5.76	5.79	0.067	0.073	0.070	1.28E+07	1.42E+07	1.35E+07
<i>L.lactis</i>	+	+	+	5.49	5.43	5.46	0.105	0.110	0.108	1.84E+07	1.94E+07	1.89E+07

Algalat-E.coli

Jenis Mikroba	Pertumbuhan			pH		Waktu Inkubasi 3 jam		OD (absorbansi)		Total mikroba		Rata-rata
	1	2	rata-rata	1	2	1	2	1	2	1	2	
<i>L.acidophilus</i>	++++	++++	++++	5.45	5.49	5.47	0.132	0.131	0.132	8.09E+07	8.01E+07	8.05E+07
<i>L.bulgaricus</i>	++++	++++	++++	5.46	5.42	5.44	0.188	0.165	0.177	4.29E+08	3.72E+08	4.00E+08
<i>L.casei</i>	++++	+++	+++	5.79	5.79	5.79	0.075	0.070	0.073	1.59E+07	1.45E+07	1.52E+07
<i>L.plantarum</i>	++	++++	+++	5.51	5.46	5.49	0.137	0.152	0.145	2.54E+07	2.83E+07	2.68E+07
<i>L.rhannosus</i>	+++	++++	++++	5.78	5.85	5.82	0.066	0.071	0.069	1.25E+07	1.37E+07	1.31E+07
<i>L.lactis</i>	+	+	+	5.51	5.49	5.50	0.111	0.114	0.113	1.96E+07	2.01E+07	1.98E+07

Lampiran 10. Hasil Pengamatan Pengujian GalOS dalam Media MRS-Broth pada spesies *Lactobacillus* sp. Untuk Waktu Inkubasi 24 jam.

Keramik -E. coli

Jenis Mikroba	Pertumbuhan		pH		Waktu Inkubasi 24 jam		OD (absorbansi)		Total mikroba		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
	rata-rata		rata-rata		rata-rata		rata-rata		rata-rata		
<i>L. acidophilus</i>	++++	+++	4.65	4.73	4.69	0.489	0.478	0.484	3.85E+08	3.76E+08	3.80E+08
<i>L. bulgaricus</i>	++++	++++	4.89	4.94	4.92	0.338	0.331	0.335	1.18E+09	1.15E+09	1.16E+09
<i>L. casei</i>	++++	+++	5.89	5.90	5.90	0.075	0.075	0.075	8.79E+07	8.59E+07	8.69E+07
<i>L. plantarum</i>	+++	++++	4.94	4.66	4.80	0.479	0.505	0.492	1.31E+07	1.31E+07	1.31E+07
<i>L. rhamnosus</i>	+	++	5.86	5.80	5.83	0.072	0.077	0.075	1.14E+08	1.20E+08	1.17E+08
<i>L. lactis</i>	++	++	4.93	4.94	4.94	0.286	0.292	0.289	5.28E+07	5.40E+07	5.43E+07

DEAE-E. coli

Jenis Mikroba	Pertumbuhan		pH		Waktu Inkubasi 24 jam		OD (absorbansi)		Total mikroba		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
	rata-rata		rata-rata		rata-rata		rata-rata		rata-rata		
<i>L. acidophilus</i>	++++	++++	4.63	4.68	4.66	0.458	0.425	0.442	3.59E+08	3.30E+08	3.45E+08
<i>L. bulgaricus</i>	++++	++++	4.89	4.84	4.87	0.324	0.315	0.320	7.66E+08	7.44E+08	7.55E+08
<i>L. casei</i>	++++	+++	5.74	5.76	5.75	0.078	0.075	0.077	1.67E+07	1.59E+07	1.63E+07
<i>L. plantarum</i>	++	++++	4.61	4.58	4.60	0.504	0.503	0.504	9.77E+07	9.75E+07	9.76E+07
<i>L. rhamnosus</i>	+++	++++	5.82	5.77	5.80	0.082	0.078	0.080	1.64E+07	1.55E+07	1.59E+07
<i>L. lactis</i>	+	+	4.81	4.74	4.78	0.340	0.323	0.332	6.31E+07	5.99E+07	6.15E+07

Alignat-E. coli

Jenis Mikroba	Pertumbuhan		pH		Waktu Inkubasi 24 jam		OD (absorbansi)		Total mikroba		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
	rata-rata		rata-rata		rata-rata		rata-rata		rata-rata		
<i>L. acidophilus</i>	++++	++++	4.56	4.61	4.59	0.609	0.507	0.558	4.87E+08	4.00E+08	4.44E+08
<i>L. bulgaricus</i>	++++	++++	4.61	4.61	4.61	0.434	0.451	0.443	1.04E+09	1.08E+09	1.06E+09
<i>L. casei</i>	++++	+++	5.73	5.78	5.76	0.075	0.077	0.076	1.59E+07	1.64E+07	1.61E+07
<i>L. plantarum</i>	++	++++	4.57	4.57	4.57	0.547	0.530	0.539	1.06E+08	1.03E+08	1.05E+08
<i>L. rhamnosus</i>	+++	++++	5.82	5.72	5.77	0.073	0.080	0.077	1.42E+07	1.59E+07	1.51E+07
<i>L. lactis</i>	+	+	4.82	4.91	4.87	0.328	0.339	0.334	6.08E+07	6.29E+07	6.19E+07

Keterangan:

- OD 0.000-0.599 + Kurang
- OD 0.600-1.099 ++ sedang
- OD 1.100-1.500 +++ baik
- OD > 1.500 ++++ sangat baik

Lampiran 11. Cara Membuat Larutan Buffer Phospat 0,01 M pH 7, 8.

Spesifikasi larutan yang tersedia :

- larutan $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 0,2 M (16,4 g dalam 1000 ml)
- larutan NaH_2PO_4 0,2 M (27,8 g dalam 1000 ml)
- larutan Na_2HPO_4 0,2 M (52,65 g dalam 1000 ml)

Untuk membuat larutan tersebut menjadi 0,01M maka :

- $\frac{0,01 \text{ M}}{0,2 \text{ M}} \times 16,4 \text{ gr NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 = 0,82 \text{ g (dalam 1000 ml)}$.
- $\frac{0,01 \text{ M}}{0,2 \text{ M}} \times 27,8 \text{ gr NaH}_2\text{PO}_4 = 1,39 \text{ g (dalam 1000 ml)}$.
- $\frac{0,01 \text{ M}}{0,2 \text{ M}} \times 52,65 \text{ gr Na}_2\text{HPO}_4 = 2,63 \text{ g (dalam 1000 ml)}$.

Prosedur pembuatan larutan buffer phospat pH 7 sebagai berikut :

- Mencampurkan larutan NaH_2PO_4 dengan larutan Na_2HPO_4 sedikit-sedikit. Volume larutan NaH_2PO_4 lebih banyak.
- Langkah berikutnya sama dengan prosedur diatas.

Lampiran 12. 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 untuk mengatur laju (*flow*) aliran eluen.
3. Cek aliran selang A (eluen = acetonitrile : air ; 80/20) dan selang B (aquabidest) dan pompa pastikan tidak tersumbat dan berfungsi dengan baik. Kemudian untuk selang A laju buat 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 monitor telah menunjukkan garis lurus (*baseline*) maka sampel siap diinjeksikan.
6. Tekan tombol F5 (stop) sebelum menginjeksikan sampel ke-2, dan tombol F8 untuk menjalankan kembali.
7. Buka tabung injeksi 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, biarkan *print out* selesai kemudian tekan F8 dan injeksi 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 (A) dan aquabidest (B), 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 μ l.
6. Selalu periksa tekanan pompa, jika mendekati batas maksimal (berarti kolom lewat jenuh), hentikan injeksi, cuci kolom dengan pelarut (metanol:air) hingga tekanan normal kembali.

Lampiran 13. Contoh Perhitungan Jumlah Unit Enzim yang Ditambahkan Enzim β -galaktosidase mempunyai spesifikasi sebagai berikut :

1,4 mg solid

769 U/mg solid

864 U/mg protein

$$\mu 769 \text{ U/mg solid} \times 1,4 \text{ mg solid} = 1076,6 \text{ U}$$

dilarutkan dalam 1ml (1000 μ l) = 1076,6 U / 1000 μ l = 1,076 U/ μ l

Jika setiap tabung eppendorf ditambahkan 30 μ l, maka :

$$30\mu\text{l} \times 1,076 \text{ U}/\mu\text{l} = 30 \text{ Unit.}$$

Lampiran 14. Pembuatan Kurva Standar Total Mikroba *Lactobacillus sp.*

1. Pemiakan masing-masing spesies *Lactobacillus sp.* Kedalam 5 ml media MRS-Broth.
2. Inkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam.
3. Masing-masing tabung pembiakan diambil dan dilakukan pengenceran. Pengenceran dilakukan ulangan (8x pengenceran) agar tidak terlalu pekat.
4. Masing-masing pengenceran diukur absorbansinya pada panjang gelombang 620 nm.
5. menghitung jumlah mikroba dengan menggunakan *Haemocytometer*.

Contoh Perhitungan:

Jika 1. 5 kotak = 78 mikroba

2. 5 kotak = 74 mikroba

maka jumlah mikroba untuk 10 kotak adalah 152 mikroba.

$$\text{Luas 10 kotak} = 0,04 \text{ mm}^2 \times 10 \text{ kotak} = 0,4 \text{ mm}^2$$

$$\text{Volume 10 kotak} = 0,4 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,04 \text{ mm}^3$$

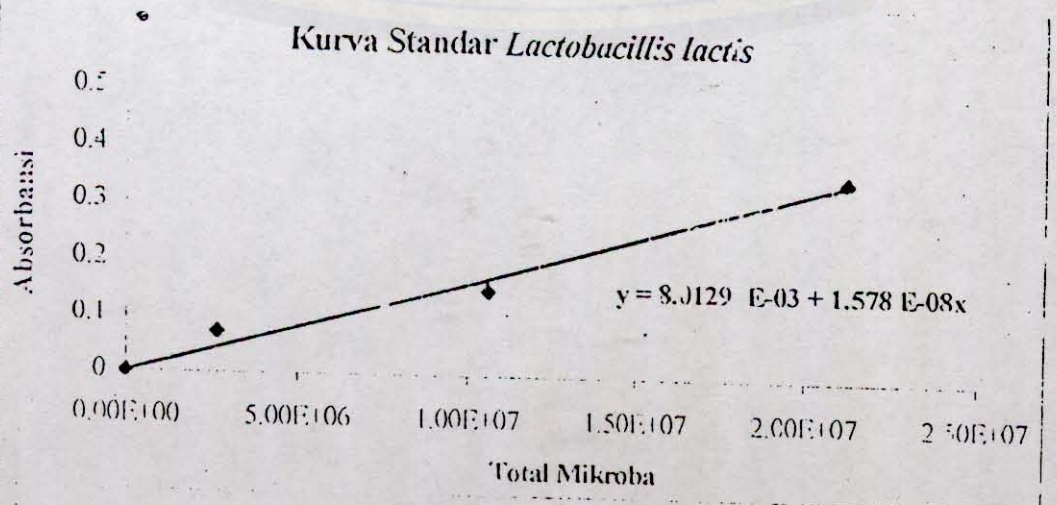
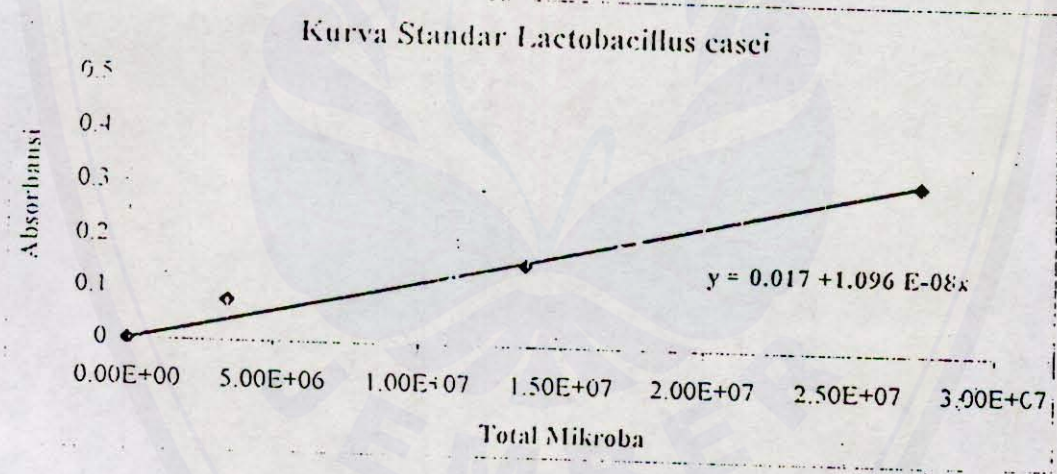
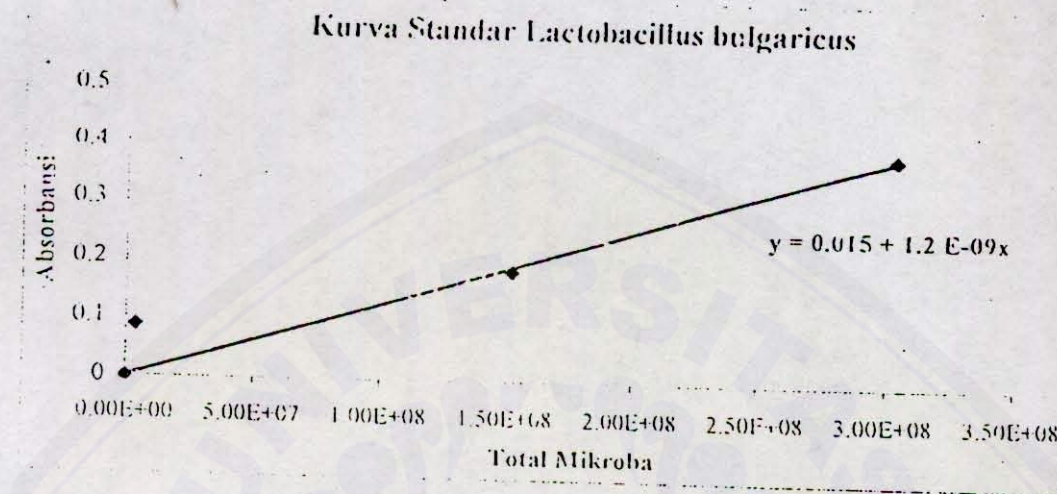
$$\text{Total mikroba} = 152 \text{ mikroba} : 0,04 \text{ mm}^3$$

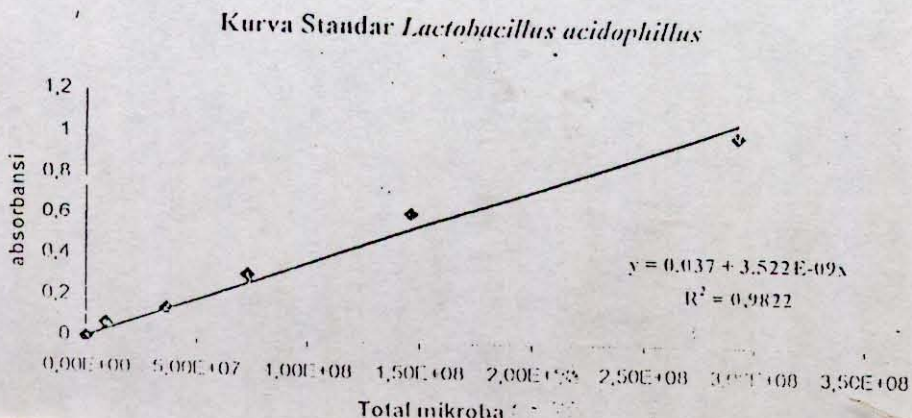
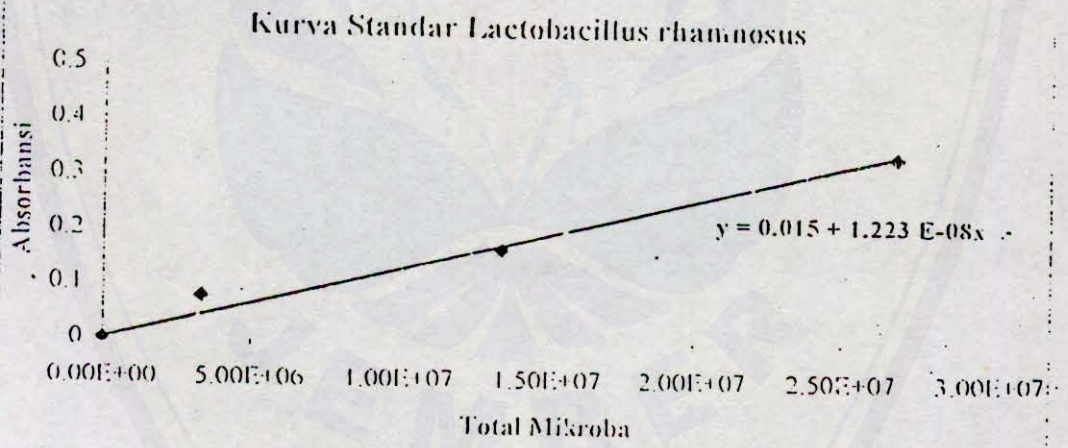
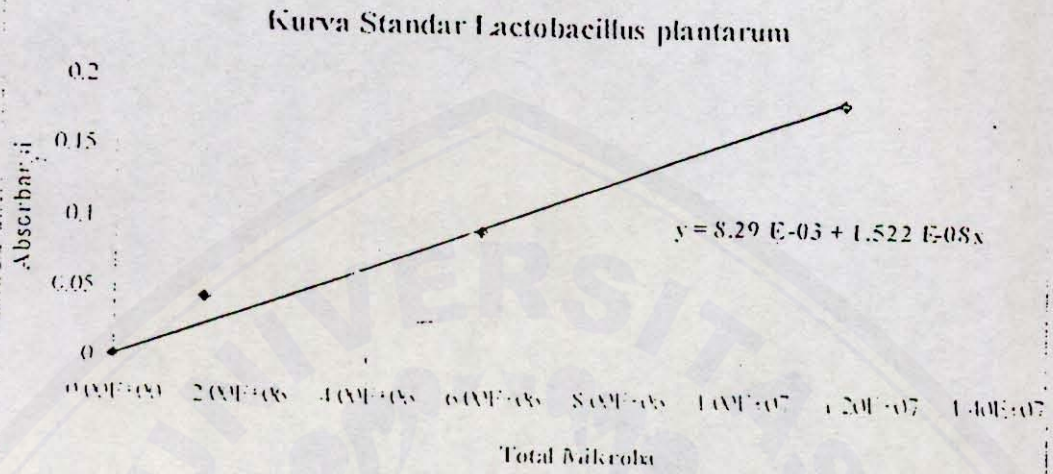
$$= 3800 \text{ mikroba} / \text{mm}^3$$

$$= 3,8 \cdot 10^6 / \text{cm}^3$$

6. Pengukuran absorbansi dan perhitungan total mikroba pada masing-masing pengenceran diplotkan dalam kurva standar.

Lampiran 15. Kurva Standar Total Mikroba





Lampiran 16. Kurva Standar Galaktooligosakarida

