



UNIVERSITAS INDONESIA

**SINTESIS FRUKTO-OLIGOSAKARIDA (FOS) DARI
SUKROSA DENGAN MENGGUNAKAN *Penicillium notatum***

SKRIPSI

RIFAN

0706263372

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

DEPARTEMEN KIMIA

DEPOK

JULI 2011



UNIVERSITAS INDONESIA

**SINTESIS FRUKTO-OLIGOSAKARIDA (FOS) DARI
SUKROSA DENGAN MENGGUNAKAN *Penicillium notatum***

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana

RIFAN

0706263372

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM


DEPARTEMEN KIMIA


DEPOK

JULI 2011

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar



Nama : Rifan
NPM : 0706263372
Tanda Tangan : 
Tanggal : 8 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Rifan
NPM : 0706263372
Program Studi : Kimia S1 Reguler
Judul Skripsi : Sintesis Frukto-Oligosakarida (FOS) dari Sukrosa
dengan Menggunakan *Penicillium notatum*

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

Pembimbing 1 : Dr. Endang Saepudin



Pembimbing 2 : Dra. Siswati Setiasih, Apt., M.Si.



Penguji : Dra. Susilowati Hs, M.Sc



: Dra. Sri Handayani, M.Biomed



: Dr. Herry Cahyana



Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 8 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya ungkapkan kepada Tridharma, karena telah membantu saya sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dalam rangka memenuhi salah satu persyaratan untuk mencapai gelar Sarjana Sains Jurusan Kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Saya sadar bahwa tanpa bantuan dari berbagai pihak, maka saya tidak akan dapat menyelesaikan masa perkuliahan sampai pada akhirnya penyusunan skripsi ini. Bersama ini saya ingin menyampaikan terima kasih kepada:

- 1) Dr. Endang Saepudin dan Dra. Siswati Setiasih, selaku pembimbing penelitian ini, yang telah memberikan berbagai arahan selama saya menjalani penelitian ini sehingga saya menyelesaikannya.
- 2) Dr. Ridla Bakri, selaku ketua Departemen Kimia FMIPA UI, yang telah memberikan saya kesempatan untuk menjalani penelitian
- 3) Laboratorium Mikrobiologi IPBCC, yang telah menyediakan *Penicillium notatum* sehingga dapat saya gunakan selama penelitian
- 4) Kakak sekaligus senior saya di Departemen Kimia FMIPA UI, Riki, yang telah meluangkan waktu, tenaga, serta dengan sabar dan tulus membantu saya dalam menjalani penelitian. Tanpa adanya bantuan dari kakak, sepertinya akan menjadi sulit bagi saya untuk menyelesaikan penelitian ini.
- 5) Kedua orang tua saya, Papi dan Mami, serta Oma yang telah memberikan dukungan secara penuh selama saya menjalani perkuliahan sampai penyusunan skripsi. Semua pengorbanan kalian akan saya balas di kemudian hari.
- 6) Bapak Wibowo, selaku dosen Mikrobiologi Lingkungan Departemen Biologi FMIPA UI, yang telah membantu saya selama perkuliahan dan juga memberi saran-saran dalam menjalani penelitian
- 7) Pa Hedi, Mba Ema, Mba Tri, Mba Ina, dan Mba Cucu, yang telah menyediakan peralatan dan bahan-bahan yang saya butuhkan selama penelitian.
- 8) Teman-teman penelitian: Johannes, Ika N, Awaliatul, Annisa, Stevanus, Dante, Arif, Ka Desi, Rafi, Evi, Zetry, Masayu, Mega, Prita, Etno, Sherly,

Fitri, Iki, Tyas, dan nama-nama lainnya yang tidak bisa disebutkan. Kalian semua telah menemani dan mendukung saya selama menjalani perkuliahan serta penelitian

- 9) Teman-teman dekat saya: Rohman, Syamsul, Reka, Mita, Savitri, Ikor, Sisil, dan banyak nama lain yang tidak dapat saya sebutkan. Kalian telah menemani dan membantu saya menjalani perkuliahan di Departemen Kimia FMIPA UI. Sungguh saat-saat yang menyenangkan dan semoga akan selalu seperti itu.
- 10) Ka Rasyid dan seluruh pihak Laboratorium Afiliasi Kimia FMIPA UI, yang telah membantu saya dalam penggunaan alat-alat selama penelitian
- 11) Pa Amin dan Pa Tris, yang juga turut membantu dan mendukung saya selama menjalani penelitian
- 12) Pihak-pihak lain yang tidak bisa disebutkan satu-per-satu, baik senior, junior, serta sivitas akademi UI dan orang-orang lain yang terlibat. Terima kasih karena telah membantu saya di Departemen Kimia sampai penyusunan skripsi ini.

Pada akhirnya, saya berharap agar seluruh pihak yang telah membantu saya akan diberikan balasan yang sesuai dengan jasa-jasanya. Semoga skripsi yang saya buat ini akan berguna bagi perkembangan ilmu pengetahuan

Depok, 8 Juli 2011

Penulis

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rifan
NPM : 0706263372
Program Studi : S1 Kimia
Departemen : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

“Sintesis Fruktu-Oligosakarida (FOS) dari Sukrosa dengan Menggunakan *Penicillium notatum*”

berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 8 Juli 2011

Yang menyatakan



(Rifan)

ABSTRAK

Nama : Rifan

Program Studi : Kimia

Judul : Sintesis Frukto-Oligosakarida (FOS) dari Sukrosa dengan
Menggunakan *Penicillium notatum*

Frukto-oligosakarida (FOS) merupakan senyawa karbohidrat rantai sedang yang dikenal sebagai prebiotik sehingga dapat memberikan efek positif terhadap kesehatan. FOS dapat diperoleh dari isolasi beberapa jenis tanaman ataupun melalui sintesis. *Penicillium notatum* merupakan mikroorganisme jenis kapang yang diketahui memiliki kemampuan untuk mensintesis senyawa Frukto-oligosakarida (FOS). Produksi FOS dalam penelitian ini dilakukan melalui fermentasi cair yang menggunakan sukrosa 20% (w/v) sebagai substratnya. *Shaker-incubator* digunakan selama fermentasi untuk menjaga kondisi pada 30°C dan 110 rpm. Variasi waktu fermentasi dan pengambilan data, antara lain: 7 hari (tiap 24 jam) dan 3 hari (12 jam). Kurva pertumbuhan *Penicillium notatum* dalam media fermentasi diperoleh berdasarkan pengukuran berat kering miselium yang terbentuk selama fermentasi dan diperoleh berat konstan setelah waktu 72 jam. Filtrat hasil pemisahan endapan kemudian dianalisis kandungan sukrosa, glukosa, fruktosa serta FOS yang terbentuk dengan menggunakan HPLC (shim-pack 101C). Jumlah FOS paling besar ditemukan pada periode fermentasi 120 jam (berdasarkan terdapatnya puncak intensitas pada waktu retensi 3,7 menit atau kurang). Berdasarkan analisis sukrosa, glukosa, dan fruktosa diketahui bahwa selama fermentasi berlangsung jumlah ketiganya akan mengalami perubahan. Hal ini sesuai dengan jalur biosintesis yang diperkirakan, yaitu sukrosa akan mengalami hidrolisis menghasilkan glukosa dan fruktosa. Kemudian fruktosa dan sebagian dari glukosa akan digunakan untuk membentuk FOS.

Kata kunci: *Penicillium notatum*, FOS, sukrosa, fruktosa, fermentasi, HPLC

xii+28 hlm.; gbr; lampiran

Daftar Pustaka: 18 (1962-2010)

ABSTRACT

Name : Rifan

Study Program: Chemistry

Title : Fructo-Oligosaccharide Synthesis from Sucrose using *Penicillium notatum*

Penicillium notatum is a mold that known to have the ability to synthesize Fructo-oligosaccharide (FOS). This compound is a group of oligosaccharide and acts as a prebiotic, which is beneficial for health. Liquid-phase fermentation was done in this research, using sucrose 20% (w/v) as a substrate in producing FOS. Shaker-incubator was also used during this fermentation to maintain a constant condition of 30°C and 110 rpm. Variation of fermentation time and data acquiring are given as: 7 days (24 hours) and 3 days (12 hours). Growth curve of *Penicillium notatum* in the fermentation media was acquired by measuring dry weight of the suspension occurred during each fermentation. The constant weight was happened to be from the third day. Filtrate of the fermentation was analyzed using HPLC (shim-pack 101C) for sucrose, glucose, fructose, and FOS contain. The most optimal FOS occurred at the fermentation time of 96 and 120 hours, based on the peak area in retention time of 3,7 minutes or less. From the analysis, it was known that composition of sucrose, glucose, fructose, and FOS were changing during the fermentation. This proved that sucrose was hydrolyzed into fructose and glucose, then fructose was used in order to produce FOS.

Keywords: *Penicillium notatum*, FOS, sucrose, fructose, fermentation, HPLC

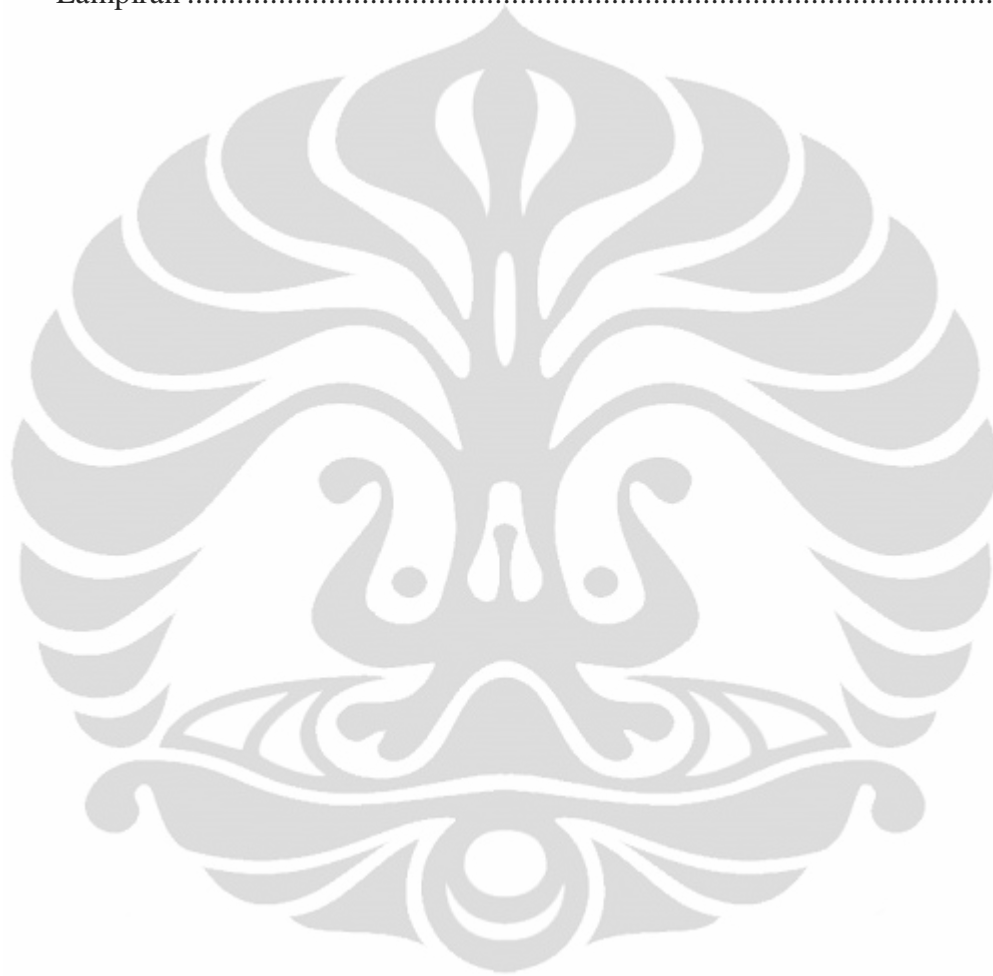
xii+28 pages

references: 18 (1962-2010)

DAFTAR ISI

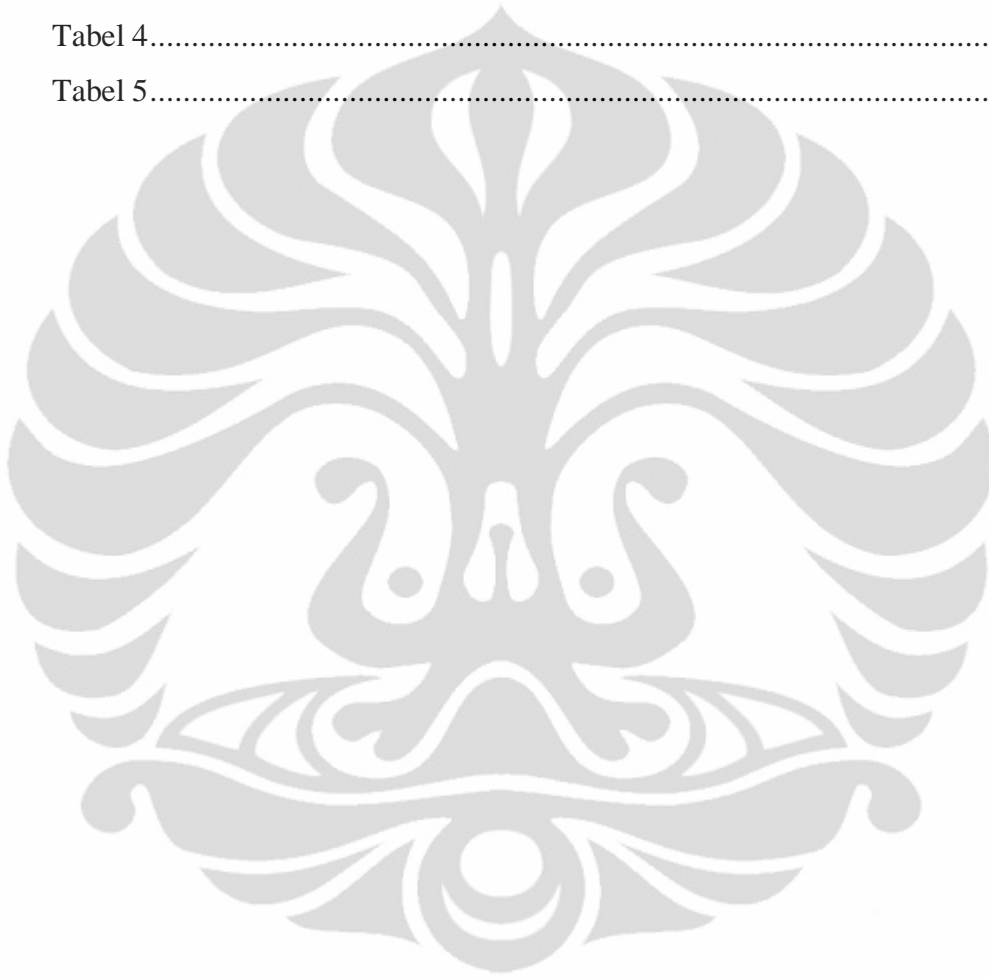
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Permasalahan	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Frukto-oligosakarida.....	5
2.2 Bifidobakteri	7
2.3 β -fruktofuranosidase.....	8
2.4 Transfruktosilasi.....	9
2.5 Fermentasi.....	10
2.6 <i>Penicillium notatum</i>	11
2.7 Sintesis FOS	13
3. METODE PENELITIAN.....	15
3.1 Alat&Bahan	15
3.2 Prosedur Kerja.....	15
3.2.1 Kultur Mikroorganisme	15
3.2.2 Pembuatan FOS	16
3.2.3 Analisis	16
3.3 Bagan Kerja.....	18
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	19

4.1 Penentuan Kurva Pertumbuhan.....	19
4.2 Penentuan Kurva Standar Fruktosa, Sukrosa, dan Glukosa.....	20
4.3 Penentuan Produksi FOS	22
5. KESIMPULAN DAN SARAN	27
Daftar Pustaka	29
Lampiran	31



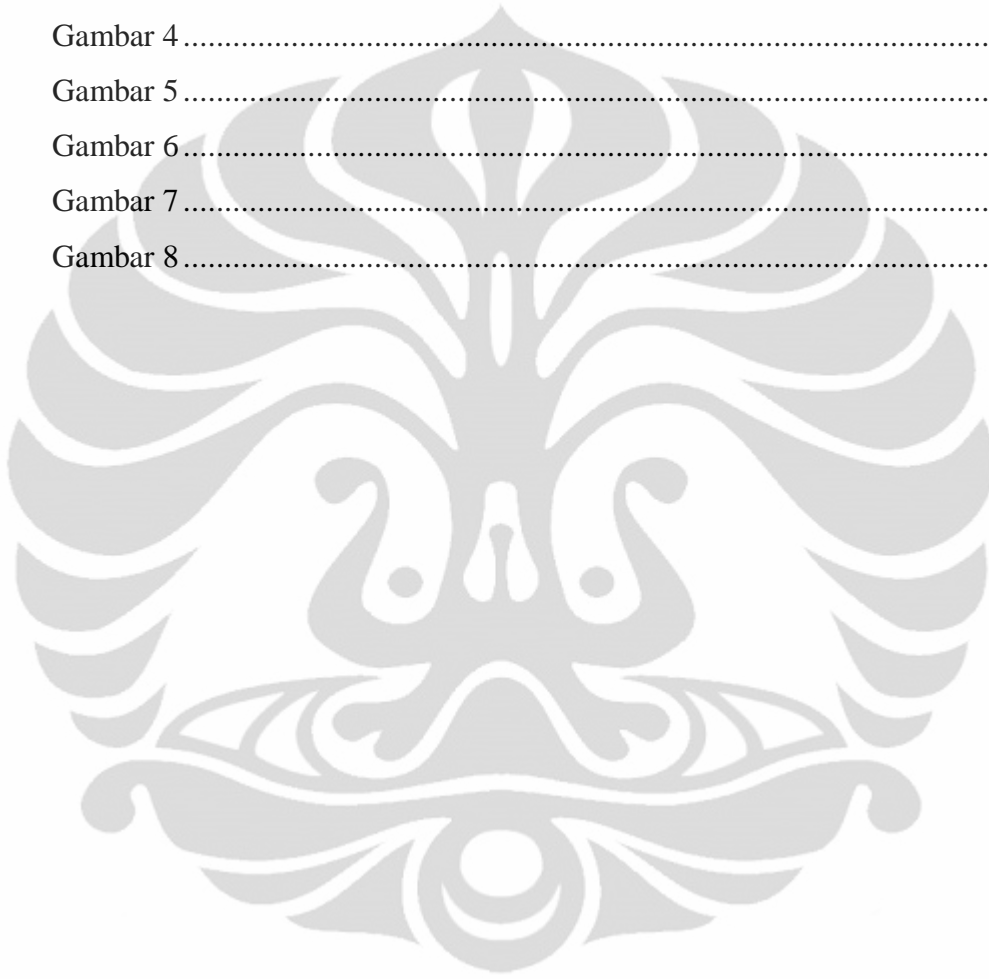
DAFTAR TABEL

Tabel 1.....	5
Tabel 2.....	6
Tabel 3.....	8
Tabel 4.....	9
Tabel 5.....	12



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	7
Gambar 2	10
Gambar 3	12
Gambar 4	20
Gambar 5	23
Gambar 6	23
Gambar 7	25
Gambar 8	26



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Perkembangan kehidupan menuntut kita untuk mencari solusi dalam kesehatan. Berbagai macam obat dan vaksin ditemukan untuk menangkal berbagai penyakit yang timbul. Penggunaan obat-obatan merupakan salah satu cara untuk mengatasi penyakit. Namun, makanan yang dikonsumsi juga memegang peranan dalam menjaga kesehatan. Selanjutnya adalah mencari bahan konsumsi yang memiliki nilai nutrisi tinggi ataupun yang memiliki efek fungsional, terutama terhadap tubuh. Hal ini disebabkan karena mengonsumsi makanan seperti ini (tindakan *preventive*) cenderung memiliki efek negatif yang rendah dibandingkan mengonsumsi obat (tindakan *curative*). Makanan fungsional dapat berupa: mikronutrien organik dan inorganik, vitamin, antioksidan, serat, beberapa jenis protein (seperti laktoferin), peptida bioaktif, dan asam lemak tak jenuh. Sebagai contoh adalah makanan berserat tinggi yang sekarang sudah bisa diproduksi oleh industri dan bisa dikonsumsi oleh masyarakat. Makanan ini memiliki keuntungan karena mengandung kadar serat tinggi yang dapat membantu proses pencernaan dalam usus sehingga secara langsung maupun tak langsung, makanan berserat tinggi yang diproduksi komersial dapat membantu menjaga kesehatan manusia. Dalam pasar global, makanan fungsional menjadi barang yang dicari dan memiliki nilai sampai puluhan milyar dollar dan angka ini akan meningkat sebanyak 7,5% setiap periodenya (Sangeetha et al., 2005).

Sebelum tahun 1990, pemerintah Jepang membentuk komite untuk mempelajari makanan fungsional atau makanan yang difortifikasi (diperkaya nutrisi). Hal ini kemudian juga dipelajari oleh negara-negara di Amerika, yaitu makanan yang memiliki efek prebiotik. Perkembangan selanjutnya, makanan fungsional terfokuskan pada bagian pencernaan, terutama usus. Di dalam usus manusia, terdapat 3 jenis mikroba: merugikan, netral, dan menguntungkan. Saat jumlah mikroba (bakteri) merugikan dalam usus meningkat, maka hal ini akan

membahayakan tubuh manusia karena dapat menyebabkan efek akut (seperti gastroenteritis) atau kronis (seperti inflamasi saluran pencernaan). Makanan fungsional dikembangkan untuk mencegah terjadinya hal ini. FOS (frukto-oligosakarida) merupakan salah satu makanan fungsional karena diketahui dapat berperan sebagai prebiotik. Selain dicerna oleh berbagai enzim yang ada, dalam tubuh kita juga terdapat beberapa jenis bakteri yang dapat membantu memproses makanan yang kita konsumsi. Yang dimaksud dengan prebiotik adalah suatu senyawa/bahan yang tidak dapat dicerna oleh tubuh namun dapat menjadi nutrisi bagi bakteri menguntungkan yang ada dalam tubuh sehingga dapat menstimulasi pertumbuhan atau aktifitas mereka. Saat bakteri menguntungkan dalam tubuh mendapatkan cukup nutrisi, maka hal ini akan dapat memberikan keuntungan pada tubuh inangnya (dalam hal ini, tubuh manusia). Keuntungannya antara lain: meningkatkan toleransi terhadap laktosa karena meningkatkan selektifitas β -galaktosidase, mencegah gastroenteritis yang dihasilkan oleh bakteri patogen dalam usus karena hasil fermentasi prebiotik adalah asam laktat yang dapat menurunkan pH usus (kondisi yang tidak disenangi oleh bakteri patogen), mengurangi senyawa toksin (bahkan zat karsinogen) karena memperbaiki sistem pencernaan, mengurangi kadar kolesterol, membantu sintesis vitamin oleh bifidobakteri, mencegah sindrom alergi makanan, meningkatkan sistem imun (resistensi terhadap infeksi), meningkatkan penyerapan mineral (kalsium dan magnesium) karena penurunan pH, menurunkan tekanan darah pada penderita hipertensi, meningkatkan metabolisme pada penderita diabetes (Kaufhold et al., 2000; Yamashita et al., 1984; Spiegel et al., 1994; Hartemink, 1997). Contoh dari bakteri menguntungkan yang ada dalam tubuh adalah bifidobakteri dan lactobacilli. Berdasarkan FAO Technical Meeting on Prebiotics (2007), suatu substrat dapat digolongkan sebagai prebiotik jika memenuhi persyaratan berikut:

- ✓ Bukan merupakan organisme atau obat
- ✓ Dapat dikarakterisasi secara kimia
- ✓ Memberi keuntungan pada kesehatan yang dapat terukur (bukan dari konsentrasi dalam darah)

- ✓ Dapat meningkatkan aktifitas atau perkembangan mikroba dalam inang (melalui mekanisme fermentasi, bloking reseptor, atau lainnya).

Makanan berserat tinggi merupakan kandidat dari prebiotik, dan oligosakarida yang tidak dapat dicerna seperti FOS memiliki potensi yang lebih baik karena metabolismenya yang selektif dan dapat diaplikasikan secara luas. Telah ditemukan bahwa konsumsi FOS dapat menstimulasi bifidobakteri dalam usus, baik secara laboratorium maupun uji coba manusia (McCartney et al., 1998). Hal ini disebabkan karena karbohidrat jenis tersebut hanya dapat difermentasi oleh bifidobakteri karena mikroorganisme ini dapat memecah ikatan pada fruktooligosakarida dengan enzim β -fruktofuranosidase. Karena memiliki sifat yang manis, maka FOS dapat digunakan sebagai pengganti sukrosa dalam makanan. Sekalipun digunakan sebagai pemanis, FOS tidak memengaruhi jumlah gula darah sehingga aman dikonsumsi oleh penderita diabetes. Fruktooligosakarida juga dapat dimanfaatkan sebagai pengganti lemak dalam makanan rendah lemak.

Selain FOS, GOS (galakto-oligosakarida) juga dapat berperan sebagai prebiotik potensial. Senyawa oligosakarida lainnya yang telah ditemukan antara lain: xilo-oligosakarida yang diperoleh dari hemiselulosa (seperti dari kulit gandum yang tidak terpakai) atau chito-oligosakarida yang dibuat dari hidrolisis enzimatis kitin kulit udang atau kepiting. Konsumsi prebiotik sebanyak 5-8 g/hari sudah dapat memberikan efek positif pada tubuh orang dewasa (ISAPP, 2009). Namun, konsumsi prebiotik secara berlebih juga dapat menimbulkan efek samping yaitu terbentuknya gas hasil fermentasi oleh mikroflora (yang dapat mengganggu sistem pencernaan). Nilai konsumsi sampai 20gr/hari merupakan batasan maksimal untuk usia dewasa (Gibson, 2007).

Senyawa fruktooligosakarida dapat ditemukan dalam beberapa jenis tanaman seperti bawang putih, Jerusalem artichoke, tomat, madu, pisang, dan lain sebagainya. Karena berasal dari tanaman, maka senyawa ini tidak bisa diperoleh dalam jumlah besar dan jumlahnya juga tidak menentu (tergantung dari kondisi tanam). Berdasarkan hal tersebut dan keuntungan yang dimilikinya, maka usaha untuk sintesis senyawa FOS dalam skala industri mulai dikembangkan. Salah satu aspek yang diperhitungkan adalah segi ekonomis dalam sintesisnya karena

senyawa ini belum bisa dibuat secara kimiawi. Sampai saat ini, FOS masih disintesis dengan bantuan enzim dari mikroorganisme tertentu (seperti *Penicillium expansum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Rhodotolura sp*, dan lain sebagainya). Penggunaan organisme tertentu untuk membentuk suatu produk disebut sebagai bioteknologi. FOS yang dibuat secara bioteknologi dapat berupa rantai lurus ataupun rantai cabang dengan derajat polimerisasi unit fruktosil antara 1-5. Enzim spesifik dari mikroorganisme tersebut yang dimanfaatkan untuk mengubah sukrosa menjadi oligosakarida saat konsentrasi substratnya tinggi adalah β -fruktofuranosidase (EC.3.2.1.26) dan fruktosiltransferase (EC.2.4.1.9).

1.2 Permasalahan

Berbagai mikroorganisme telah dipelajari dalam aplikasinya untuk menghasilkan senyawa FOS. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, jenis *Aspergillus* merupakan mikroorganisme yang dapat menghasilkan FOS dalam jumlah yang cukup besar (Sangeetha et al., 2005). Namun tidak menutup kemungkinan bahwa terdapat mikroorganisme lain atau metode dan kondisi lain yang dapat menghasilkan FOS dari sukrosa dengan lebih baik; secara kualitatif, kuantitatif, maupun segi ekonomi.

1.3 Tujuan penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan waktu pertumbuhan/fermentasi yang optimum dari *Penicillium notatum* dalam menghasilkan FOS dengan menggunakan sukrosa 20% (w/v) sebagai substratnya.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Frukto-oligosakarida

Frukto-oligosakarida (FOS) merupakan senyawa golongan karbohidrat dengan rantai sedang (oligo-sakarida) dan memiliki derajat kemanisan 30-50% dari gula umumnya. FOS merupakan jenis gula kompleks yang dapat diperoleh dari tanaman dan diketahui memiliki efek positif saat dikonsumsi manusia karena FOS tidak bisa dicerna oleh enzim dalam tubuh manusia (memiliki ketahanan yang tinggi terhadap hidrolisis asam ataupun enzimatis dalam pencernaan manusia). Berikut merupakan informasi kandungan FOS dalam beberapa jenis tanaman.

Tabel 1. Kandungan FOS dalam beberapa jenis tanaman

product	GF ₂ ^a	GF ₃ ^b	GF ₄ ^c
fruits			
apple juice	83	92	73
applesauce	98	99	93
banana, stage 1	125	129	97
banana chips	104	102	93
grapes, seedless	84	100	interference
Concord grape juice, jar	108	116	102
tomato juice	110	105	96
tomato paste	119	114	80
vegetables			
artichoke hearts, liquid	91	108	97
asparagus spears	79	85	116
asparagus liquid	87	82	118
garlic powder	76	75	70
onions, whole	95	96	85
pumpkin	113	92	84
squash	108	97	90
sweet potatoes	103	101	92
yams	interference	85	87
sugars, etc.			
brown sugar, dark	119	107	88
honey	108	107	109
molasses, blackstrap	108	84	114
miscellaneous			
infant formula	81	83	94
Garlic Plus FOS, tablets	98	97	106
Carliphants	102	93	97
rye flour	70	90	83
Sportalyte	112	109	97

^a 1-Kestose. ^b Nystose. ^c 1^F-β-Fructofuranosylnystose.

Sumber: Hogarath et al., (2000)

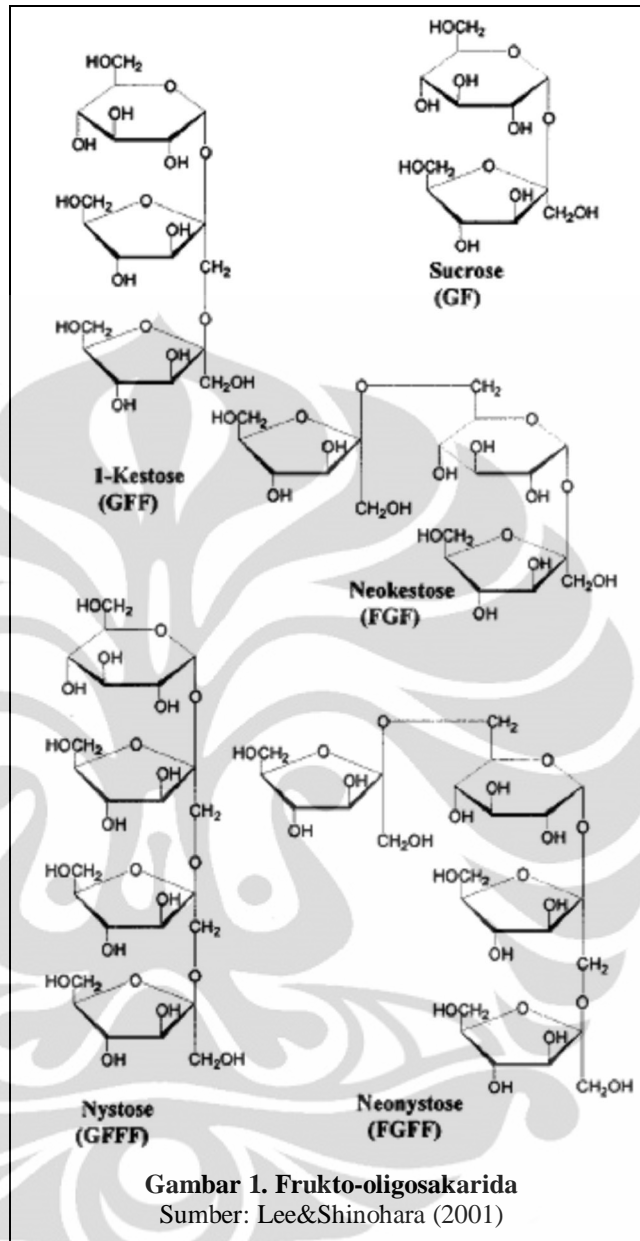
Pada usus terdapat bakteri-bakteri yang membantu tubuh dalam pencernaan (contohnya bifidobakteri). FOS kemudian akan dikonsumsi (difermentasi) oleh bakteri “baik” ini sehingga dapat dikatakan bahwa senyawa ini memiliki sifat sebagai prebiotik (nutrisi untuk bakteri menguntungkan dalam tubuh). Saat bakteri “baik” ini mendapatkan nutrisi yang cukup, maka selain membantu pencernaan, bakteri tersebut akan membantu meningkatkan sistem imun tubuh, absorpsi kalsium, dan menekan jumlah bakteri merugikan (patogen) dalam tubuh dengan cara menurunkan pH usus. Perlakuan FOS, sebagai prebiotik, dalam sistem pencernaan manusia nampak dalam tabel berikut.

Tabel 2. Perlakuan FOS dalam sistem pencernaan

Bagian	Perlakuan
Mulut	Tidak ada hidrolisis
Lambung	Tidak ada hidrolisis maupun absorpsi
Usus halus	Tidak ada hidrolisis enzimatis maupun absorpsi
Kolon/ usus besar	Fermentasi oleh bifidobakteri dan/atau laktobasilli

Sumber: Kolida et al. (2002)

FOS dapat disintesis dari transfruktosilasi sukrosa atau degradasi inulin menggunakan enzim pada beberapa jenis mikroorganisme. Yang termasuk dalam golongan FOS antara lain: 1-kestose (GF2; Fru_f β₂->1Fru_f β₂->1α Glc), nystose (GF3; Fru_f β₂->1Fru_f β₂->1 Fru_f β₂->1 α Glc), fructofuranosyl nystose (GF4), bifurcose (GF3), inulobiose (F2), inulotriose (F3), inulotetraose (F4), neo-kestose (Fru_f β₂->6α Glc1->2 β Fru_f). Sintesis frukto-oligosakarida dapat menghasilkan senyawa dengan ikatan glikosidik β (1→2) atau β (1→6). FOS dapat bertahan selama 5 tahun pada temperatur kulkas (MSDS FOS).



2.2 Bifidobakteri

Merupakan genus dari bakteri gram-positif, non-mobil, tidak membentuk spora, berbentuk batang, memiliki persentase guanin dan sitosin yang tinggi, dan umumnya bakteri anaerobik yang berada pada saluran usus atau vagina. Bakteri ini pernah dimasukkan ke dalam genus *Bacillus*, *Bacteroides*, *Nocardila*, *Lactobacillus*, dan *Corynebacterium*. Namun pada 1974, Bifidobakteri dipisahkan dalam 1 genus baru. Bifidobakteri dapat tumbuh optimal pada suhu 37-41^oC dan pH 5,7-6. Bifidobakteri dapat membantu pencernaan pada usus besar, mencegah

alergi ringan, dan mencegah perkembangan tumor. Beberapa Bifidobakteri dapat berperan sebagai probiotik (bakteri yang dianggap memberikan keuntungan kesehatan pada organisme inangnya, seperti: regulasi homeostasis pada usus, inhibisi patogen, biokonversi, dan lain sebagainya). Bifidobakteri merupakan mikroorganisme sakarolitik dan mampu menghasilkan asam laktat dan asam asetat tanpa CO₂. Jenis bakteri ini dapat menggunakan sukrosa, glukosa, galaktosa, dan laktosa sebagai sumber karbonnya. Hasil fermentasi yang dapat dimanfaatkan antara lain: D-galakosamin, D-glukosamin, amilosa, amilopektin. Enzim kunci yang terdapat dalam bifidobakteri adalah fruktosa-6-fosfat fruktoketolase.

Tabel 3. Klasifikasi Bifidobakteria

Kingdom	Bacteria
Filum	Actinobacteria
Kelas	Actinobacteria
Sub-kelas	Actinobacteridae
Ordo	Bifidobacteriales
Familia	Bifidobacteriaceae
Genus	<i>Bifidobacterium</i>

Sumber: en.wikipedia.org/wiki/Bifidobacterium

2.3 β -fruktofuranosidase

Memiliki nama resmi EC 3.2.1.26 dan nama lainnya adalah invertase atau saccharase. Berdasarkan penamaan Enzyme Commission, maka EC 3.2.1.26 memberikan reaksi hidrolisis pada ikatan non-reduksi terminal β -D-fruktofuranosida dan juga dapat mengkatalisis reaksi fruktotransferase. β -fruktofuranosidase merupakan enzim yang berperan dalam pembentukan FOS oleh beberapa mikroorganisme, seperti: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Bacillus subtilis*, dan lain sebagainya. Beberapa substrat yang diketahui dapat menghasilkan FOS menggunakan enzim ini antara lain: sukrosa, raffinosa, inulin. Invertase dapat bekerja optimal pada pH 6-8 (Kurakake et al., 1996 dan

Poonawalla et al., 1965). Pada tahun 2009, Mussatto et al. menyatakan bahwa β -fruktofuranosidase memiliki 2 jenis reaksi: transfruktosilasi dan hidrolisis sukrosa.

2.4 Transfruktosilasi

Merupakan reaksi pembentukan fruktooligosakarida melalui transfer gugus fruktosil. Substrat yang digunakan umumnya adalah sukrosa, sedangkan enzim yang digunakan antara lain: β -fruktofuranosidase (EC 3.2.1.26) atau fruktosiltransferase (EC 2.4.1.9). Sukrosa terdiri dari glukosa dan fruktosa. Hal inilah yang dimanfaatkan sebagai penyusun frukto-oligosakarida karena FOS terdiri dari fruktosa dan glukosa yang membentuk oligomer (jumlah rantai sedang). Reaksi transfruktosilasi dengan menggunakan mikroorganisme biasanya akan berkompetisi dengan hidrolisis, tergantung pada kondisi pH maupun media fermentasi yang digunakan. Hal seperti ini akan dapat menurunkan produk FOS yang diinginkan. Oleh karena itu, maka kondisi reaksi harus diperhitungkan.

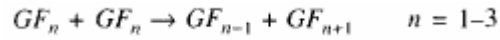
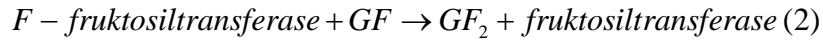
Tabel 4. Beberapa mikroorganisme, enzim, dan kondisi optimal untuk menghasilkan FOS

Microorganism	Enzyme	Optimal conditions	Y_{FOS}^*
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	Levansucrase (E.C. 2.4.1.10) – Free enzyme	40 °C – pH 5.5 – 18 hours – 200 rpm – sucrose 60%	Y_{FOS} : 50%
<i>Bacillus macerans</i>	Fructosyltransferase (E.C. 2.4.1.9) – Free enzyme	50 °C – pH 7.0 – 100 hours – sucrose 50%	Y_{FOS} : 43%
<i>Klyveromyces marcianus</i>	Inulinase – Immobilized enzyme	50 °C – pH 6.0 – 4 hours – sucrose 45%	Y_{FOS} : 10%
<i>Penicillium citrinum</i>	Neo-fructosyltransferase – Free mycelia	50 °C – 40 hours – 100 rpm – sucrose 70%	Y_{FOS} : 57%
<i>Penicillium citrinum</i>	Neo-fructosyltransferase – Mycelia and co-immobilized enzyme	50 °C – pH 6.0 – 48 hours – 100 rpm – sucrose 60%	Y_{FOS} : 18%
<i>Aspergillus sp.</i>	β -fructofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) – Free enzyme	40 °C – pH 5.5 – 6 hours – sucrose 61.5%	Y_{FOS} : 61%
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Fructosyltransferase (E.C. 2.1.4.9.) – Free enzyme	40 °C – pH 5.5 – 25 hours – 500 rpm – sucrose 40%	Y_{FOS} : 91%
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Fructosyltransferase (E.C. 2.1.4.9.) – Free enzyme	55 °C – pH 5.5 – 24 hours – sucrose 80%	Y_{FOS} : 56%
<i>Aspergillus oryzae</i>	Fructosyltransferase (E.C. 2.1.4.9.) – Free enzyme	55 °C – pH 5.5 – 12 hours – sucrose 55%	Y_{FOS} : 54%
<i>Aspergillus niger</i>	β -fructofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) – Free enzyme	40-65 °C – pH 6.0-8.5 – sucrose 40-70%	Y_{FOS} : 60%
<i>Aspergillus japonicus</i>	β -fructofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) – Immobilized mycelia	55 °C – pH 5.5 – 4 hours – sucrose 65%	Y_{FOS} : 61%
<i>Aspergillus japonicus</i>	β -fructofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) – Free enzyme	37 °C – pH 5.5 – 8.5 hours – 200 rpm – sucrose 30%	Y_{FOS} : 93%

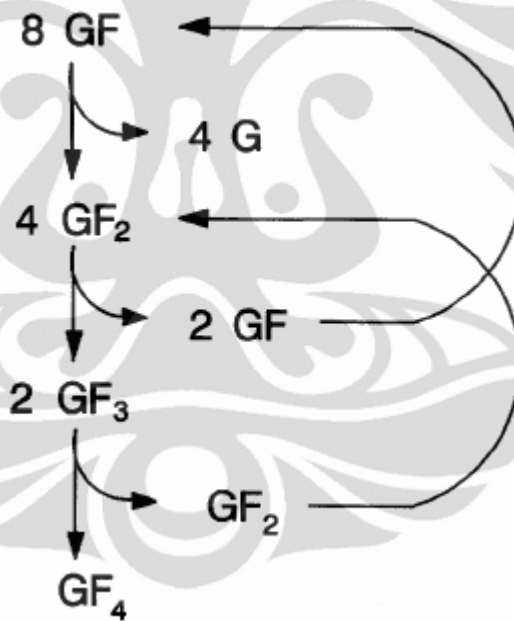
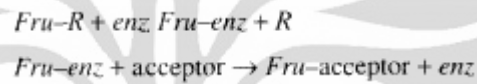
* Yield of FOS (Y_{FOS}) is defined as the ratio between final concentration of FOS ($g.L^{-1}$) divided by start concentration of sucrose ($g.L^{-1}$) ($\times 100$).

Sumber: <http://www.scielo.br/img/revistas/cta/v30n1/a2tab1.gif>

Pada 1989, Jung *et al.*, merumuskan mekanisme reaksi fruktosiltransferase *Aspergillus pollulans* sebagai berikut.



Berdasarkan mekanisme ini, maka satu molekul sukrosa bertindak sebagai donor dan molekul sukrosa lainnya sebagai akseptor dalam pembuatan FOS. Secara garis besar, fruktosiltransferase dari mikroba akan mengkatalisis reaksi dengan langkah sebagai berikut (F=fruktosa, enz= fruktosiltransferase, R= karbonil aldosa):



Gambar 2. Jaringan mekanisme reaksi sintesis frukto-oligosakarida dari sukrosa yang dikatalisis oleh fruktosiltransferase. G=glukosa, GF= sukrosa, GF₂= 1-kestosa, GF₃= nystosa, GF₄= 1^F-fruktosilnystosa.

Sumber: Yun (1996)

2.5 Fermentasi

Fermentasi berasal dari kata *ferment* yang artinya mendidih karena awalnya didefinisikan sebagai anggur yang mendidih; mengacu pada pembentukan energi dari oksidasi senyawa organik (seperti karbohidrat), dan

menggunakan akseptor elektron endogen (yang biasanya berupa senyawa organik juga). Louis Pasteur mendefinisikan fermentasi sebagai proses penguraian gula pada buah anggur menjadi gelembung CO₂ oleh khamir. Seperti metabolisme, fermentasi dapat berupa anabolisme dan katabolisme. Jika pernapasan merupakan oksidasi yang membutuhkan oksigen, maka fermentasi terjadi pada kondisi anaerobik (tidak terdapat oksigen). Proses fermentasi biasanya terjadi pada mikroorganisme (seperti khamir atau jamur). Pada zaman dahulu, fermentasi hanyalah proses yang melibatkan mikroorganisme khamir tertentu untuk membuat roti, etanol pada minuman anggur, atau perubahan aseton menjadi butanol. Dalam kehidupan sekarang, fermentasi merupakan suatu teknik bioteknologi yang diaplikasikan untuk membuat suatu produk, yang melibatkan kultur mikroba skala besar (umumnya mikroba anaerob). Hal ini akan menimbulkan kesulitan saat penggunaan mikroba aerob obligat atau anaerob fakultatif. Mikroba aerob obligat membutuhkan oksigen untuk pertumbuhannya sedangkan anaerob fakultatif masih dapat tumbuh dalam kondisi tanpa oksigen namun laju pertumbuhannya lambat. Ini dapat menimbulkan masalah dalam produksi skala industri karena akan memperpanjang waktu produksi dan kelimpahan produk yang dihasilkan juga akan rendah. Sebagai solusinya, aerasi ataupun mengusahakan kondisi wadah yang teragitasi. Secara umum, fermentor terdiri atas: sekat yang dapat mengatur aliran fluida maupun gas, pengontrol anti-foaming, pengontrol pH, pengatur temperatur.

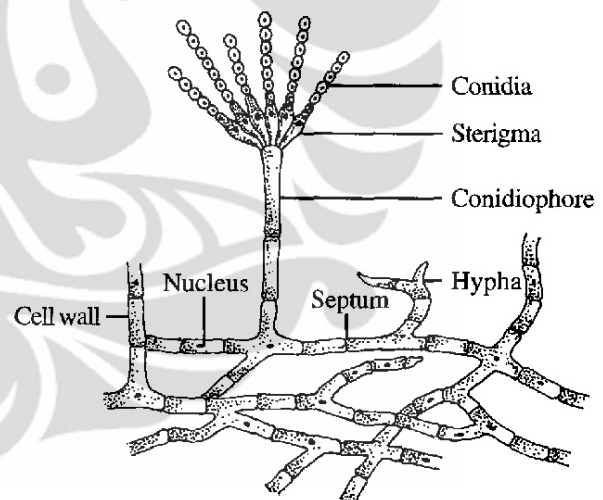
2.6 Penicillium notatum

Kingdom fungi dapat dibagi menjadi 3, yaitu: bakteri, khamir (*yeast*), dan kapang (*mold*). Berdasarkan ukuran selnya, bakteri merupakan jenis terkecil dan kapang merupakan jenis terbesar. Jika membandingkan waktu reproduksi, maka bakteri akan dapat bertambah jumlahnya paling cepat, sedangkan kapang terjadi sebaliknya. *Penicillium* (latin: *penicillius*=paintbrush) merupakan jenis kapang yang dikenal karena memiliki kemampuan untuk menghasilkan penicillin (molekul antibiotik yang dapat membunuh atau menghentikan perkembangan bakteri tertentu dalam tubuh). Reproduksi seksual pada *Penicillium* akan

menghasilkan ascospora, yang merupakan penggabungan dari arkegonium dan anteridium (asci dapat mengandung 8 uniseluler askospora), dan lebih menyukai tempat beriklim dingin atau sedang serta memiliki jumlah materi organik yang cukup. *Penicillium notatum* sendiri merupakan kapang jenis ascomycota anaerob fakultatif yang sekarang disebut sebagai *Penicillium chrysogenum*. Jenis ini merupakan penghasil β -laktam, suatu antibiotik. Metabolit sekunder yang juga dihasilkannya antara lain: roquefortin C, meleagrins, chrysogin, xanthocillin, asam sekalonik, sorrentanon, sorbicillin, PR-toksin. Seperti pada *Penicillium* lain, *P. notatum* melakukan reproduksi dengan membentuk spora (konidia) yang berwarna biru sampai biru kehijauan dari konidiospora, dan kemudian akan dibawa oleh udara. Spora yang dihasilkan ini dapat menyebabkan alergi pada manusia karena mengandung serin protease vakuolar dan alkalin. Secara industri, *P. notatum* dimanfaatkan untuk membuat penicillin, xanthocillin X, poliamin oksidase, fosfoglukonat dehidrogenase, glukosa oksidase.

Tabel 5. Klasifikasi *Penicillium notatum*

Kingdom	Fungi
Filum	Ascomycota
Kelas	Eurotiomycetes
Sub-kelas	Eurotiomycetidae
Ordo	Eurotiales
Familia	Trichocomaceae
Genus	<i>Penicillium</i>
Spesies	<i>Penicillium notatum</i>



Gambar 3. *Penicillium*

Sumber: en.wikipedia.org/wiki/Penicillium_chrysogenum

2.7 Sintesis FOS

Pembuatan FOS dimulai sebelum tahun 1990 karena FOS merupakan salah satu makanan fungsional. Berbagai penelitian tentang FOS sudah mulai dilakukan sebelum dan setelah waktu tersebut. Pada 1965, Poonawalla *et al.*, sudah menemukan invertase (yang merupakan enzim untuk mensintesis FOS) dari *Penicillium chrysogenum*. Medium yang digunakan antara lain: sukrosa, ekstrak jagung, sodium nitrat, potasium dihidrogen fosfat, magnesium sulfat heptahidrat, kalsium karbonat. Sedangkan medium pertumbuhan yang digunakan: *malt extract*, *yeast extract*, potasium dihidrogen fosfat, agar dengan pH 5,5 pada temperatur 28°C. Dari percobaan ini, berhasil memperoleh total invertase sebanyak: 39 U pada 48 jam, 24 U pada 72 jam, 30 U pada 96 jam, dan 55 U pada 120 jam.

Pada tahun 1995, Kurakake *et al.*, mempelajari pengaruh pH terhadap aktivitas transfruktosilasi enzim β-fruktofuranosidase (suatu enzim yang dimiliki mikroorganisme tertentu untuk dapat menghasilkan FOS). Sebanyak 0.9 dan 1.76 U/mL β-fruktofuranosidase dari *Aspergillus oryzae* yang sudah dibeli lalu diinkubasi pada 30% w/v larutan sukrosa pada pH 5 dan 8; temperatur 40°C selama 24 jam untuk kemudian dianalisis produk oligosakarida yang dihasilkannya dengan HPLC. TLC dapat digunakan untuk mengidentifikasi FOS dari sukrosa, fruktosa, dan glukosa. Tri- dan tetraoligosakarida yang diisolasi kemudian diidentifikasi sebagai 1-kestose dan nystose berdasarkan spektrum ¹³C-NMR. Dari percobaan ini disimpulkan bahwa pada pH 8, aktivitas transfruktosilasi akan lebih besar dibandingkan reaksi hidrolisis; dengan rasio 10,9.

Tahun 2010, Prata *et al.*, dapat menghasilkan frukto-oligosakarida dari *Penicillium expansum* dengan sukrosa sebagai substratnya. Mikroorganisme ini ditumbuhkan pada potato/dextrose/agar (PDA) dan Czapek-Dox agar (CZ) pada 22 dan 27°C dalam cawan petri. Kemudian produksi FOS dilakukan dalam erlenmeyer 500 mL yang berisi 100 mL campuran: sukrosa 20%, *yeast extract*, NaNO₃, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O, KCl, diinkubasi selama 25°C pada shaker 160 rpm selama 48 jam. Biomassa diukur berdasarkan pengeringan setelah 105°C. Kelimpahan FOS diukur dengan membandingkan jumlah FOS total yang terbentuk dengan konsentrasi sukrosa awal dan jumlah sukrosa yang dikonsumsi.

Produktifitas FOS dihitung berdasarkan perbandingan total FOS terhadap waktu fermentasi. Berdasarkan ini, diketahui bahwa media PDA lebih baik daripada CZ sedangkan suhu optimal pertumbuhan adalah pada 22-25°C. *Penicillium expansum* ternyata dapat menghasilkan FOS dalam jumlah yang baik (kelimpahan= 0,61 g/g substrat; produktivitas= 3,25 g/L h)

Dalam skala industri, produksi FOS dapat dibagi menjadi 2 jenis: *batch system* dengan menggunakan enzim terlarut atau *continuous system* dengan enzim yang diimobilisasi/ keseluruhan sel mikroba. The Meiji Seika Co., yang pertama memproduksi FOS, menggunakan proses kontinu dengan sel *Aspergillus niger* terimobilisasi dalam gel kalsium alginat. Kemudian Cheil Foods & Chemicals Co. (Seoul) juga mengembangkan proses ini dengan sel *Aspergillus pollulans* terimobilisasi dalam gel kalsium alginat. Sel dengan luas 1 m³ ini memiliki kestabilan selama 3 bulan pada temperatur 50°C. Sebanyak 600-800 g/L sukrosa digunakan sebagai substrat untuk menghasilkan produksi optimal, yaitu mencapai 800 g/L sirup FOS (Yun, 1996).

Beberapa perusahaan tertentu telah dapat menghasilkan produk FOS murni (seperti: Meiji Seika Co.). Sebagian besar peneliti menggunakan kolom karbon celite dan eluen etanol untuk memisahkan FOS. Hidataka *et al.*, memurnikan GF₂ dan GF₃ dengan kolom karbon teraktivasi, sedangkan GF₄ dimurnikan dengan HPLC. Gross dapat mengisolasi 1-kestosa dan neokestosa dengan kolom karbon celite dan 6-kestosa akan diperoleh melalui kolom selulosa. Kemudian dengan kromatografi kertas dan penguapan, maka kristal murni akan diperoleh.

Yun (1996), menyatakan bahwa sukrosa merupakan sumber karbon yang paling baik untuk pertumbuhan sel dan aktifitas enzim β-fruktofuranosidase. Menjaga kondisi pH diatas 5,5 dan suhu optimum 30°C juga menjadi faktor yang penting untuk dapat menghasilkan enzim pembentuk FOS. Dinyatakan juga bahwa saat jumlah sukrosa sudah mencapai batas minimum, maka FOS akan digunakan kembali sebagai sumber karbon.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Alat & Bahan

Dalam penelitian ini, peralatan yang digunakan antara lain: HPLC Shimadzu Prominence 20 (kolom: Shim-pack SCR-101C, detektor: indeks refraktif RID-10A, pompa: LC-20AB), corong biasa, beaker glass, labu erlenmeyer, autoklaf, cawan petri, shaker inkubator, jarum ose, pipet ukur, pipet tetes, neraca analitik, water bath, sentrifuge, batang pengaduk, tabung reaksi, pH meter, penyaring (kertas saring nitroselulose nitrat dan kertas saring whatman), bulb, timer.

Sedangkan bahan yang digunakan terdiri dari beberapa jenis, yaitu

1. Mikroorganisme yang digunakan: *Penicillium notatum* (IPBCC.07.555)
2. Media kultur/pertumbuhan: potato-dextrose-agar
3. Media fermentasi: sukrosa, *yeast extract*, NaNO₃, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O, KCl
4. Analisis FOS: resin penukar ion, aquabidest.

3.2 Prosedur Kerja

Untuk setiap alat-alat yang akan digunakan, terlebih dahulu dilakukan sterilisasi dengan memanaskan alat tersebut dalam oven pada suhu 160^oC selama ± 1 jam. Sementara untuk medium fermentasi ataupun agar, dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121^oC selama 15 menit.

3.2.1 Kultur mikroorganisme

a. Persiapan mikroorganisme

Mikroba yang akan digunakan untuk menghasilkan FOS adalah *Penicillium notatum*. Kapang ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Institut Pertanian Bogor (IPBCC).

b. Pembuatan media kultur

Media pertumbuhan menggunakan PDA (potato-dextrose-agar) dalam wadah cawan petri. Untuk meremajakan atau membuat *stock culture*, dilakukan dengan cara menggores spora *Penicillium notatum* pada media agar miring. Kultur *Penicillium notatum* diinkubasi pada suhu 22-27°C selama 3-7 hari.

c. Pembuatan media fermentasi

Fermentasi dilakukan dalam fase cair. Komposisi media antara lain (% w/v): sukrosa (20), *yeast extract* (2,75), NaNO₃ (0,2), K₂HPO₄ (0,5), MgSO₄.7H₂O (0,05), KCl (0,05). Semua bahan dicampurkan dan dilarutkan dalam aquades. Media tersebut diisi sebanyak 50 mL ke dalam labu erlenmeyer 250 mL yang kemudian disterilkan dengan autoklaf (Prata et al., 2010).

3.2.2 Pembuatan FOS

Erlenmeyer yang berisi media fermentasi diinokulasi dengan 0,5 mL suspensi spora *Penicillium notatum* yang berumur 7 hari pada temperatur 30°C dalam shaker 110 rpm selama 7 hari dan 3 hari. Sampel diambil pada interval waktu tertentu secara berkala (24 jam dan 12 jam) dan disaring dengan kertas saring whatman 41.

Variasi dilakukan terhadap waktu fermentasi, yaitu: 7 hari (interval 24 jam) dan 3 hari (interval 12 jam).

3.2.3 Analisis

a. Pertumbuhan mikroorganisme

Pertumbuhan *Penicillium notatum* diukur setelah 3 hari. Sporulasi dapat ditentukan dengan menghitung jumlah spora dalam PDA cawan petri (metode *Total Plate Count*) menggunakan pengenceran 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵.

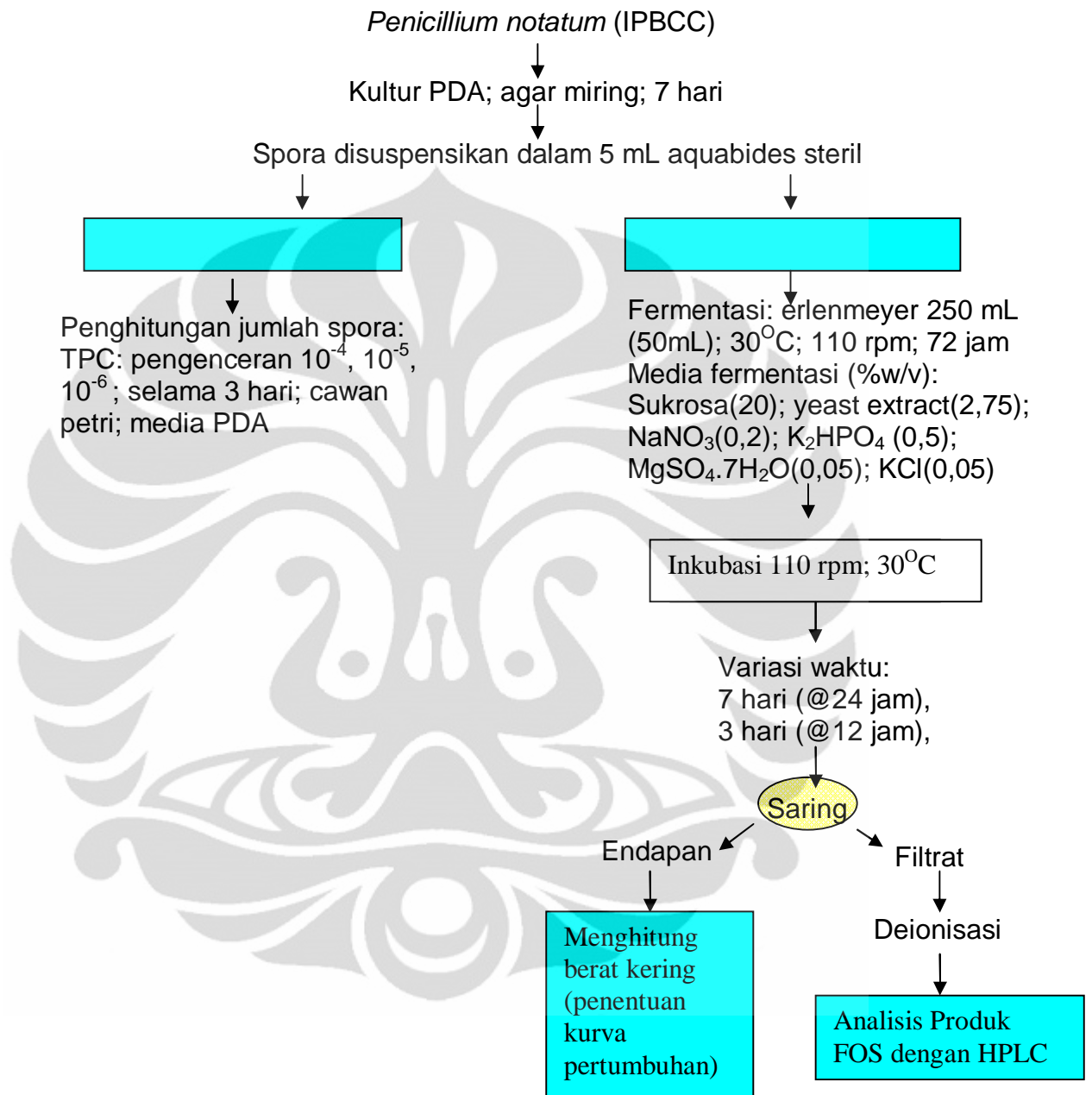
b. Penentuan kurva pertumbuhan

Mikroorganisme dibiakkan dalam media fermentasi cair dan kemudian didiamkan pada suhu sekitar 30°C selama variasi waktu yang digunakan (pastikan kondisi lingkungan yang steril). Jumlah spora, yang berupa suspensi pada tabung erlenmeyer, dihitung berdasarkan variasi waktunya untuk mengetahui kurva pertumbuhan dari *Penicillium notatum* tersebut selama fermentasi. Dengan mengukur berat endapan yang tersaring, maka kurva pertumbuhan dapat dibentuk. Sedangkan filtrat digunakan untuk menganalisis FOS.

c. Penentuan produk

Produk FOS dan gula residu lainnya ditentukan menggunakan instrumentasi HPLC (Mussatto et al. 2009). Kolom yang digunakan adalah Shim-pack SCR-101C (yang merupakan kolom penukar ligan; terdiri dari kalsium dengan kopolimer stiren divinilbenzena), temperatur kolom dijaga pada 80°C, dan menggunakan detektor indeks refraktif RID-10A. Aqua bidest digunakan sebagai fasa geraknya dengan menggunakan laju alir 1 mL/menit, sampel yang diinjeksikan ke dalam HPLC adalah sebanyak 20 µL. Sebelum injeksi, sampel disaring dengan kertas saring whatman 41, filtrat kemudian dideionisasi dengan resin penukar ion. Konsentrasi FOS dapat ditentukan berdasarkan luas area puncak FOS pada kromatogram HPLC. Sukrosa dan oligomer dapat dipisahkan (terelusi) berdasarkan derajat polimerisasinya. Glukosa dan fruktosa akan menjadi komponen yang terakhir terelusi, sedangkan pentasakarida (1-β-fruktofuranosil nistose) akan memiliki waktu retensi yang lebih kecil. Sampel produk diambil setiap 24 jam selama 1 minggu untuk menentukan waktu *Penicillium notatum* yang menghasilkan FOS secara optimal.

3.3 Bagan Kerja



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

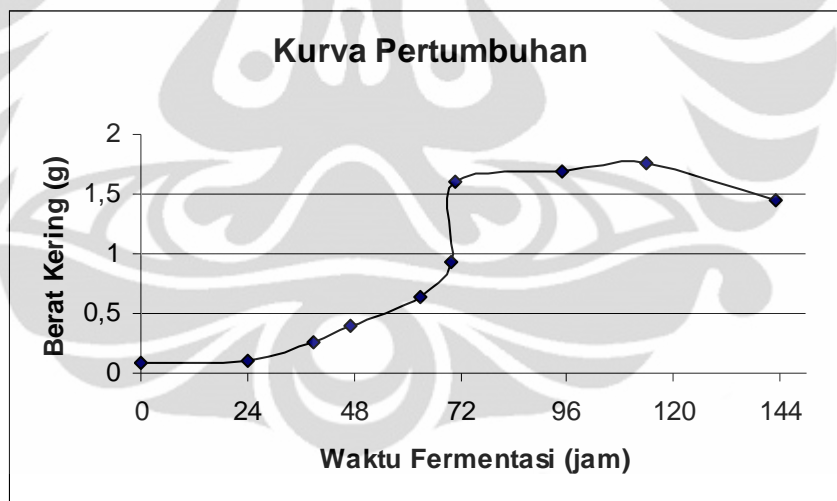
Prinsip penelitian ini adalah menentukan waktu fermentasi yang optimal untuk *Penicillium notatum* dalam menghasilkan FOS dengan menggunakan substrat sukrosa sebanyak 20% (w/v).

4.1 Penentuan kurva pertumbuhan

Kurva pertumbuhan *Penicillium notatum* dalam media fermentasi dibentuk dengan cara menghitung berat kering pada setiap pengambilan data. Fermentasi dilakukan dalam *shaker-inkubator* dengan temperatur 30°C dan 110 rpm. Penggunaan temperatur 30°C dalam fermentasi karena enzim β -fruktofuranosidase dapat bekerja dengan baik pada suhu tersebut. *Penicillium notatum* juga dapat berkembang dengan baik pada temperatur yang sama. Fermentasi dilakukan dalam *shaker* 110 rpm yang bertujuan untuk menghasilkan reaksi yang berjalan sempurna. Prata *et al.* (2010) menggunakan *shaker* 160 rpm karena wadah yang digunakan adalah erlenmeyer 500 mL yang berisi 100 mL media fermentasi. Oleh karena itu, dalam penelitian ini hanya menggunakan *shaker* 110 rpm saja, mengingat wadah fermentasi adalah erlenmeyer 250 mL yang berisi 50 mL media. Penggunaan sukrosa sebanyak 20% (w/v) juga berdasarkan referensi yang sama, yaitu Prata *et al.* (2010). Menurut Chen (1996), sukrosa merupakan sumber karbon terbaik untuk pertumbuhan dan aktifitas enzim pada mikroorganisme.

Selama fermentasi berlangsung, terlihat bahwa semakin lama waktu fermentasi terbentuk suatu padatan putih pada sekeliling dinding tabung erlenmeyer. Padatan ini merupakan miselium *Penicillium notatum* yang tumbuh sampai pada waktu tertentu dan kemudian mencapai suatu kondisi yang konstan, artinya jumlah miselium tidak bertambah sekalipun waktu fermentasi bertambah. Untuk setiap pengambilan data, miselium yang terbentuk pada dinding tabung harus disaring terlebih dahulu dengan menggunakan kertas saring whatman 41. Penggunaan kertas saring ini

dianggap cukup karena miselium yang dihasilkan memiliki ukuran yang lebih besar dibandingkan dengan pori kertas saring sehingga pemisahan berlangsung dengan baik. Hal ini terlihat dengan baik, bahwa pada filtrat sudah tidak terdapat padatan yang masih tertinggal. Kemudian juga dihitung berat kering dari variabel kontrol sehingga setiap data pengukuran berat yang diperoleh mewakili berat miselium saja. Yang dimaksud dengan variabel kontrol adalah media fermentasi dengan komposisi yang sama dengan sampel, namun tidak ditambahkan spora *Penicillium notatum* ke dalamnya sehingga tidak terdapat perubahan pada setiap senyawa yang ada di dalamnya. Kontrol juga digunakan sebagai pembanding dalam penentuan kurva pertumbuhan, maupun dalam perubahan sukrosa, glukosa, fruktosa, dan FOS selama fermentasi berlangsung. Gambar 4 merupakan kurva pertumbuhan *Penicillium notatum* dalam media fermentasi yang digunakan.



Gambar 4. Kurva pertumbuhan *Penicillium notatum*

4.2 Penentuan kurva standar fruktosa, sukrosa, dan glukosa

Kurva standar dibentuk dengan menggunakan luas puncak kromatogram HPLC untuk setiap konsentrasi standar glukosa, fruktosa, dan sukrosa yang telah diketahui. Luas area puncak pada HPLC untuk setiap konsentrasi dan jenis substrat akan memiliki waktu retensi yang khas, bergantung pada ikatannya dengan fase diam (kolom karbohidrat

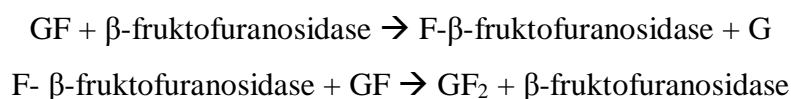
pada HPLC). Biasanya akan terbentuk satu puncak pada setiap standar yang digunakan sehingga dapat langsung diketahui bahwa puncak tersebut merupakan senyawa yang kita deteksi. Cara lain untuk mengidentifikasi puncak adalah dengan membandingkan luas area puncak dengan waktu retensi tertentu. Saat menganalisis standar dengan variasi konsentrasi yang telah diketahui, maka terdapat area puncak kromatogram yang luasnya bervariasi dan sesuai dengan konsentrasi. Sebagai contoh, jika dianalisis glukosa dengan konsentrasi x dan $2x$, maka akan terbentuk puncak dengan perbandingan luas area sebesar 1:2 (seperti halnya pada konsentrasi). Ini dapat digunakan juga untuk mengidentifikasi puncak kromatogram yang terbentuk. Untuk setiap analisis yang dilakukan dengan HPLC, fasa gerak yang digunakan adalah aquabides. Pemilihan fase gerak didasarkan oleh karakteristik kolom HPLC yang digunakan. Shim Pack SCR-101C hanya membutuhkan aquabides dalam analisisnya. Berdasarkan data yang diperoleh (lampiran 2), puncak glukosa terletak pada waktu retensi 6,1-6,6 menit, sukrosa terletak pada waktu retensi 5,1-5,5 menit, sedangkan fruktosa akan berada pada waktu 8,1-8,5 menit. Untuk beberapa kromatogram, diperoleh *baseline* yang kurang stabil. *Baseline* merupakan garis lurus yang berada di bawah puncak-puncak kromatogram. Garis ini terbentuk dari serapan fasa gerak yang digunakan dan merupakan pembanding antara sampel yang dimasukkan ke dalam kolom terhadap fase gerak, dalam hal ini fase gerak akan berfungsi sebagai acuan nilai nol pada detektor. Hal ini dapat terjadi karena faktor dari instrumen HPLC yang kurang baik. Telah diketahui bahwa sukrosa, yang merupakan disakarida, akan memiliki kekuatan ikatan yang lebih rendah terhadap fasa diam dibandingkan dengan monosakarida. Glukosa dan fruktosa, yang merupakan monosakarida, dapat membentuk ikatan yang lebih stabil sehingga melewati kolom lebih lama dan menyebabkan waktu retensi yang lebih besar dibandingkan sukrosa. Secara umum, dapat dikatakan bahwa semakin banyak cincin monosakarida yang membentuk suatu senyawa, maka waktu retensi yang terbentuk akan semakin rendah (waktu retensi untuk sakarida: poli- < oligo- < di- < mono-). Hal ini juga dibuktikan

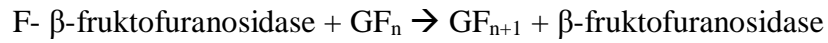
berdasarkan kromatogram standar sukrosa, fruktosa, dan glukosa. Dengan menggunakan persamaan yang dibentuk kurva standar, maka perbedaan konsentrasi glukosa, sukrosa, dan fruktosa selama fermentasi dapat diketahui.

4.3 Penentuan Produksi FOS

Karena FOS yang akan dianalisis dengan HPLC masih terlarut dalam media fermentasinya, maka setelah pemisahan dengan padatan (miselium), filtrat dideionisasi dengan menggunakan resin penukar ion (anion dan kation). Pada penelitian ini, urutan deionisasi adalah menukarkan anion terlebih dahulu, lalu dilakukan penukaran kation. Hal ini dilakukan untuk mencegah kondisi asam, yang dapat merusak FOS yang dihasilkan jika dilakukan penukaran kation terlebih dahulu. Deionisasi sendiri dilakukan agar nantinya kolom yang digunakan tidak mudah rusak oleh ion-ion pengganggu yang ada pada sampel karena kolom HPLC yang digunakan adalah berupa ion kalsium. Sebagai tambahan, pH awal media fermentasi juga diukur mengingat reaksi sintesis FOS juga dipengaruhi oleh pH lingkungan. Berdasarkan hal ini, diketahui bahwa pH media berkisar antar 6-7, sedangkan produksi FOS dapat terjadi antara pH 6-8 (Yun, 1996). Dengan ini, maka pH lingkungan sudah mendukung untuk pembentukan FOS.

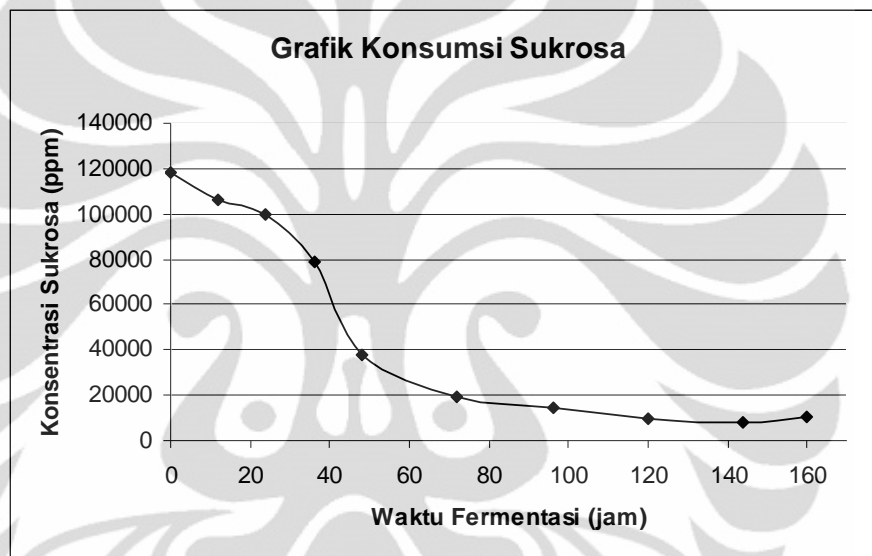
Terdapat beberapa aspek yang akan dianalisis dalam penelitian kali ini, yaitu pembentukan FOS, konsumsi sukrosa oleh *Penicillium notatum*, serta perubahan jumlah glukosa dan fruktosa selama waktu fermentasi. Pengurangan jumlah sukrosa terjadi karena sukrosa sebagai sumber nutrisi mikroorganisme dan juga sebagai substrat untuk membentuk FOS. Dalam pembentukan produk ini, maka langkah awal adalah hidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Fruktosa berikatan dengan enzim β -fruktofuranosidase dan terjadi transfer gugus fruktosil terhadap sukrosa seperti reaksi berikut.



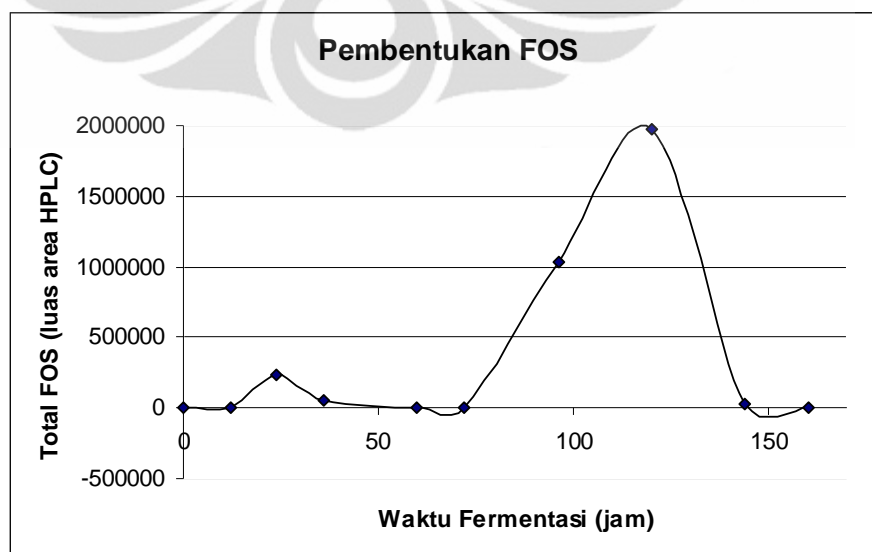


(G = glukosa, F = fruktosa, GF = sukrosa)

Secara umum dapat dikatakan bahwa fruktosa dan/atau molekul glukosa digunakan sebagai bahan untuk pembentukan FOS. Jumlah monomer pada FOS pun dapat bertambah karena adanya reaksi pemanjangan rantai/ transfer gugus fruktosil kembali pada FOS yang telah terbentuk.



Gambar 5. Perbedaan konsumsi sukrosa

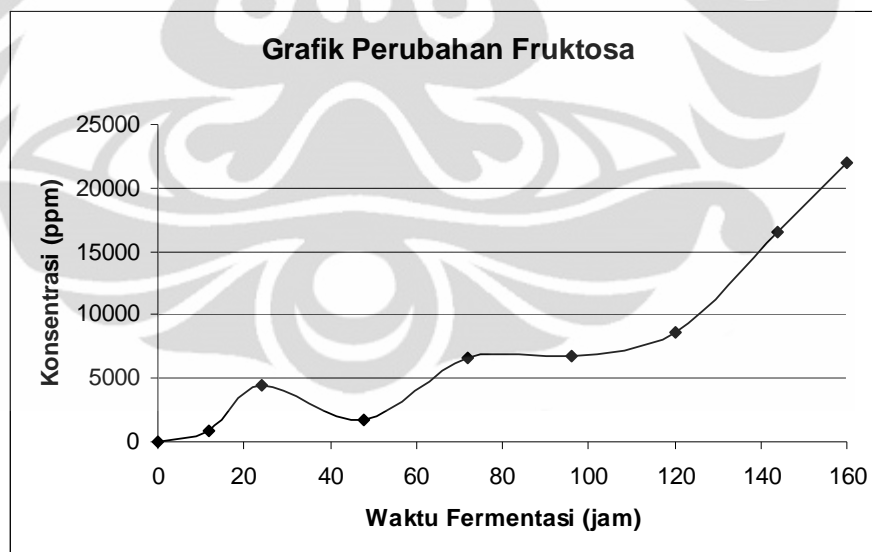


Gambar 6. Produksi FOS

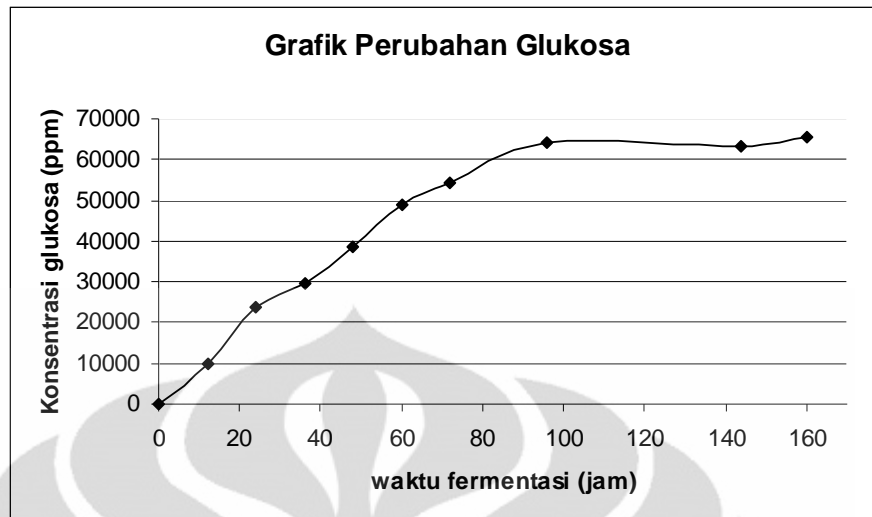
FOS yang terbentuk diukur berdasarkan luas area puncak-puncak yang terbentuk pada HPLC. Karena menggunakan kolom karbohidrat dengan prinsip *ligand exchange*, maka puncak FOS akan berada pada waktu retensi 3,7 menit atau kurang dari waktu tersebut (lampiran 3). Perbedaan waktu retensi FOS bergantung pada jumlah monomer yang terbentuk. Semakin panjang rantai fruktosa pada FOS yang dibentuk, maka akan terlihat puncak dengan waktu retensi yang semakin rendah akibat kekuatan ikatan dengan fasa diam yang semakin lemah. Untuk penelitian ini, hanya total FOS saja yang diukur karena belum terdapat standar FOS untuk mengetahui jenis dan jumlah FOS secara tepat. Karakterisasi terhadap jenis-jenis FOS yang dihasilkan selama fermentasi juga tidak dapat dilakukan. Kurva Pembentukan FOS didasarkan pada luas area puncak kromatogram, disebabkan karena standar FOS yang belum tersedia. Selama fermentasi, jumlah FOS seharusnya akan terus meningkat dan diiringi dengan penurunan jumlah sukrosa karena FOS merupakan metabolit primer yang disekresikan oleh *Penicillium notatum*, sehingga FOS dapat diketahui perubahannya selama fermentasi berlangsung. *Penicillium notatum* menghasilkan FOS karena sifatnya sebagai eksopolisakarida yang digunakan untuk menjaga sel dari kekeringan ataupun kondisi yang tidak menguntungkan lainnya. Metabolit ini sudah terbentuk sejak waktu fermentasi 12 jam, namun jumlahnya belum mencapai optimal. FOS terbentuk dalam jumlah besar pada waktu fermentasi 120 jam (gambar 6). Hal ini sesuai dengan penelitian Poonawalla *et al.* di tahun 1965 tentang invertase pada *Pencillium chrysogenum* yang menyatakan bahwa enzim invertase memiliki aktifitas terbesar pada waktu 120 jam.

Pada lampiran 3, kromatogram untuk waktu fermentasi 96-120 jam juga dilakukan pada waktu retensi yang kurang dari 4 menit. Hal ini dilakukan agar dapat memperoleh luas area yang lebih terlihat. Pada lampiran 3 untuk kromatogram *zoom in*, terbentuk puncak yang melebar. Hal ini terjadi karena kolom HPLC yang digunakan sudah kurang baik, namun hasil yang terbentuk itu masih dapat digunakan sebagai referensi

bahwa puncak tersebut merupakan produk FOS yang diinginkan. Waktu fermentasi setelah 120 jam memiliki jumlah FOS yang semakin menurun karena dalam hal ini sukrosa telah habis dan FOS akan dihidrolisis kembali untuk digunakan sebagai nutrisi *Penicillium notatum* untuk hidup. Jumlah glukosa yang terus meningkat akan menghambat enzim β -fruktofuranosidase sehingga reaksi transfer gugus fruktosil tidak terjadi, dan reaksi akan cenderung menjadi hidrolisis. Bagi *Penicillium notatum*, FOS merupakan suatu eksopolisakarida (EPS). Yang dimaksud dengan EPS adalah suatu senyawa karbohidrat rantai sedang sampai panjang yang disekresikan oleh sel dan berfungsi untuk melindungi sel dari kondisi lingkungan tertentu (contohnya untuk melindungi sel dari kekeringan). Sekalipun dikatakan bahwa FOS merupakan eksopolisakarida yang berfungsi sebagai pelindung sel bagi *Penicillium notatum*, namun FOS juga merupakan jenis karbohidrat yang dapat digunakan jika substrat utama/sukrosa telah habis.



Gambar 7. Perbedaan konsentrasi fruktosa



Gambar 8. Perbedaan konsentrasi glukosa

Bersamaan dengan penurunan jumlah sukrosa (gambar 5), konsentrasi glukosa akan cenderung bertambah (gambar 8). Fruktosa pun akan mengalami perubahan (gambar 7). Hal ini disebabkan karena fruktosa digunakan untuk membentuk FOS, tetapi juga bertambah oleh karena hidrolisis sukrosa. Hidrolisis juga meningkatkan konsentrasi glukosa pada sampel. Antara waktu fermentasi 72-120 jam, terlihat konsentrasi fruktosa memiliki kecenderungan konstan, lalu setelah 120 jam jumlah fruktosa akan meningkat. Hal ini terjadi karena fruktosa hasil hidrolisis dibentuk menjadi FOS sehingga jumlahnya tidak bertambah ataupun berkurang secara signifikan. Sedangkan setelah 120 jam, produk FOS sudah tidak terbentuk lagi sehingga hidrolisis saja yang terjadi dan fruktosa akan cenderung mengalami peningkatan.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Pada penelitian ini, *Penicillium notatum* (IPBCC.07.555) menghasilkan senyawa frukto-oligosakarida dengan menggunakan sukrosa 20% (w/v) sebagai substratnya. Senyawa FOS terbentuk pada waktu 96-120 jam, sekalipun pada waktu 24 jam terdapat senyawa tersebut, namun masih belum mencapai jumlah yang optimal. Hal ini sesuai dengan kurva pertumbuhan *Penicillium notatum* dalam media fermentasi yang digunakan, karena dimulai dari waktu 72 jam, kurva pertumbuhan sudah menunjukkan nilai yang konstan. Terdapat pengurangan jumlah sukrosa yang bersamaan dengan penambahan jumlah glukosa seiring bertambahnya waktu fermentasi, dan ini menandakan bahwa sukrosa dipecah menjadi komponennya (glukosa dan fruktosa) kemudian fruktosa dan/atau glukosa digunakan untuk menyusun senyawa FOS. Dikarenakan standar FOS belum diperoleh, maka jumlah FOS dianggap setara dengan luas area puncak HPLC di waktu retensi 3,7 atau kurang dari itu dan konsentrasi FOS hasil fermentasi belum dapat ditentukan secara tepat. Identifikasi senyawa FOS yang dihasilkan juga belum dapat dilakukan oleh karena standar FOS belum dapat diperoleh.

Saran

Masih ada beberapa hal yang dapat dikembangkan lebih lanjut dari penelitian ini. Melakukan variasi konsentrasi dan menggunakan jenis substrat lainnya untuk mengetahui pengaruh konsentrasi substrat terhadap kurva pertumbuhan *Penicillium notatum* serta produksi FOS merupakan salah satu hal tersebut. Kemudian dapat pula menggunakan kapang jenis lainnya seperti golongan *Aspergillus* atau *Penicillium* lain. Tidak menutup kemungkinan terdapat mikroorganisme selain kapang yang dapat membentuk FOS, seperti *althrobacter*, *cryptococcus*, *rhodotorula*. Penggunaan standar FOS perlu dilakukan agar dapat

mengidentifikasi hasil FOS yang diperoleh dan untuk mengetahui jumlahnya secara lebih rinci. Variasi terhadap pH media fermentasi juga menjadi suatu pengembangan lain mengingat reaksi transfruktosilasi, yang merupakan reaksi pembentukan FOS, juga dipengaruhi oleh pH lingkungan. Dalam melakukan beberapa variasi tersebut, harus diperhatikan enzim yang terdapat pada mikroorganisme yang digunakan karena enzim yang berbeda akan menghasilkan produk yang berbeda dalam kondisi lingkungan yang berbeda pula.



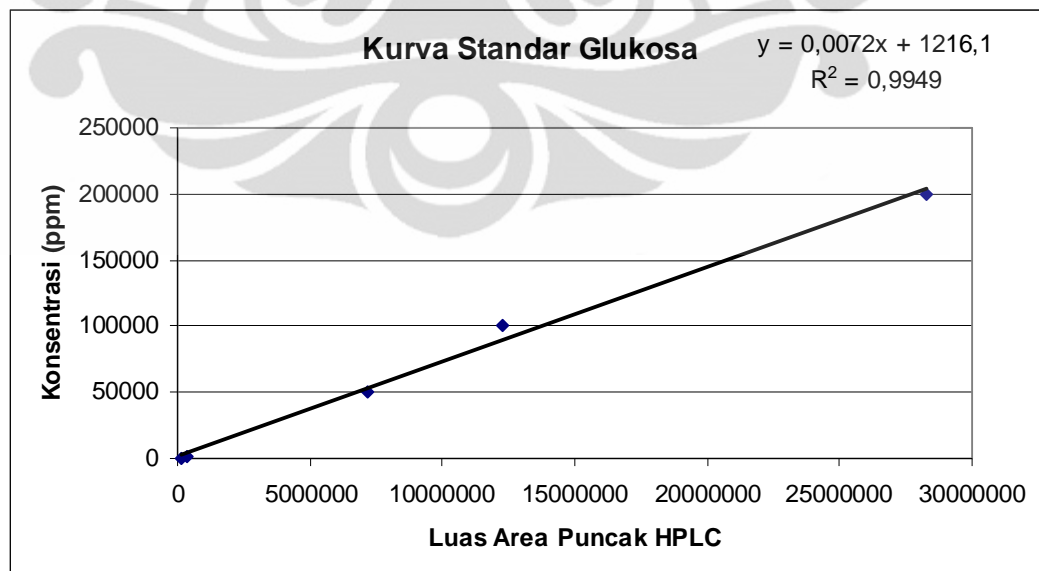
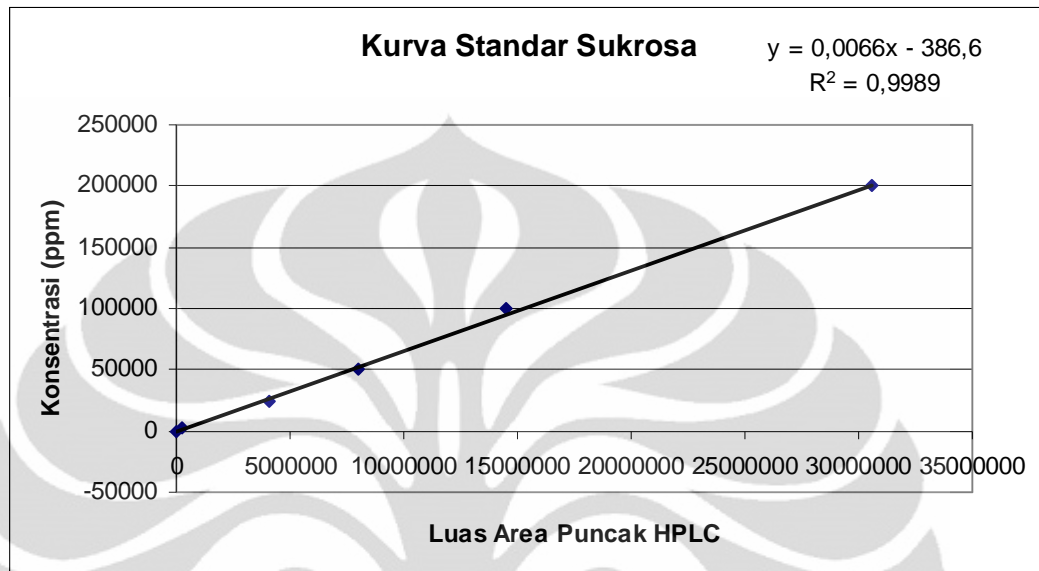
DAFTAR PUSTAKA

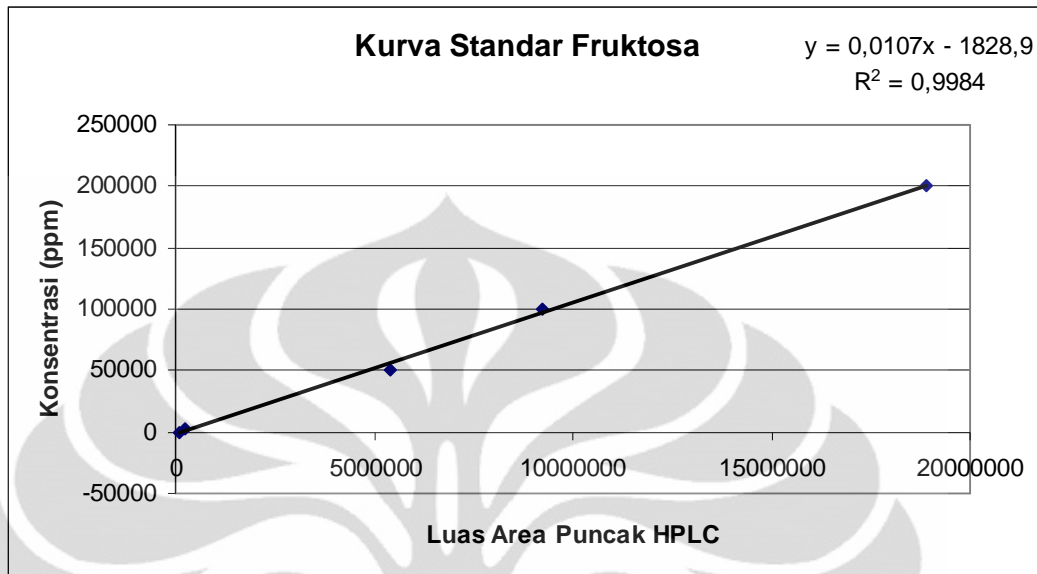
- Chen, WC., Liu, CH (1996). *Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus**. *Enzyme Microb Tech* 18:153–160
- FAO Technical Meeting on Prebiotics. (2007). FAO: United Nations.
- Gibson, Glenn R. (2007). *Functional Foods: probiotics and prebiotics*. Oxoid vol 28. University of Reading: UK
- Gross, D. (1962). *Nonreducing oligosaccharides*. In: *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Vol. 1 (Whistler, R. L. And Wolfrom, M. L. Eds). New York: Academic Press. 360-364
- Hidataka, H., Hirayama, and Sumi. (1988). *A Fructo-oligosaccharide producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611*. *Agric. Biol. Chem.* p 52, 1181-1187
- Hogarath, A., et al., (2000). *Ion Chromatographic Determination of Three Fructooligosaccharide Oligomers in Prepared and Preserved Foods*. Ohio: Journal of Agriculture 48, 5326-5330.
- <http://en.wikipedia.org>
- ISAPP. (2009). *Prebiotics: A Consumer Guide for Making Smart Choices*.
- Jung, K.H., et al., (1989). *Mathematical Model for Enzymatic Production of Fructooligosaccharides from Sucrose*. *Enzyme Microb. Technol.* 11-491-494.
- Kurakake, M., Onoue, Komaki. (1995). *Effect of pH on transfructosylation and hydrolysis by β -fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae**. *Appl Microbiol Biotechnol* 45:236-239
- Lee, J.H., and Shinohara. (2001). *Reaction Route for Enzymatic Production of Neofructo-oligosaccharides from Sucrose Using *Penicillium Citrinum* Cells*. Korea: Journal of Microbiology.
- Material Safety Data Sheet of Fructo-Oligosaccharide*. (2001). Megazyme International Ireland Ltd.
- McCartney, A.L. and Gibson. (1998) *The application of prebiotics in human health and nutrition, In: Proceeding Lactic 97. Which Strains? For Which Products? Adria Normandie*, pp. 59-73.

- Mussatto, S.I., Aguilar, et al., (2009). *Fructooligosaccharides and β -fructofuranosidase production by Aspergillus japonicus immobilized on lignocellulosic materials*. J Mol Catal B-Enzym 59:76-81
- Poonawalla F. M., Patel, and Iyengar. (1965). *Invertase Production by Penicillium chrysogenum and other fungi in submerged fermentation*. Appl Microbiol Vol 13.
- Prata M.B., Mussatto, et al., (2010). *Fructooligosaccharide production by Penicillium expansum*. Biotechnol Lett 32: 837-840
- Sangeetha, P. T. Ramesh, and Prapulla. (2005). *Recent trends in microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides*. Food Science and Technology, v. 16, n. 10, p. 442-457
- Yun, Jong Won. (1996). *Fructooligosaccharides-Occurrence, preparations, and applications*. Elsevier Science Inc.

Lampiran 1

Kurva Standar Sukrosa, Glukosa, dan Fruktosa

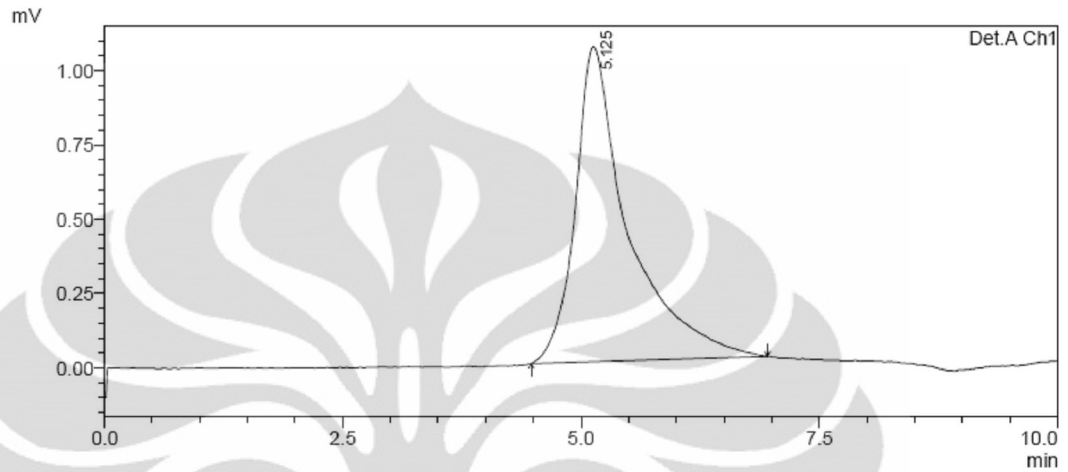




Lampiran 2

Kromatogram standar Sukrosa, Glukosa, dan Fruktosa

1) Sukrosa 200 ppm



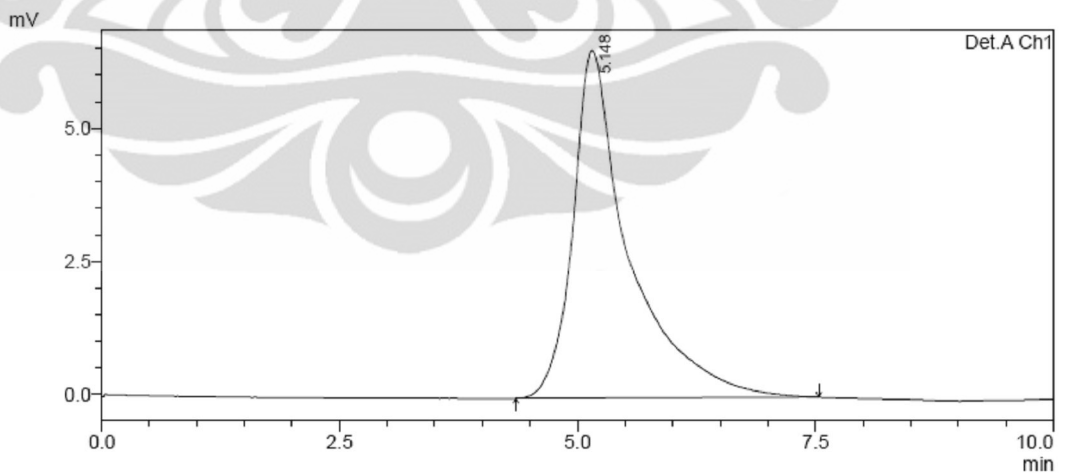
1 Det.A Ch1/

PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	5.125	40981	1059	100.000	100.000
Total		40981	1059	100.000	100.000

2) Sukrosa 2000 ppm



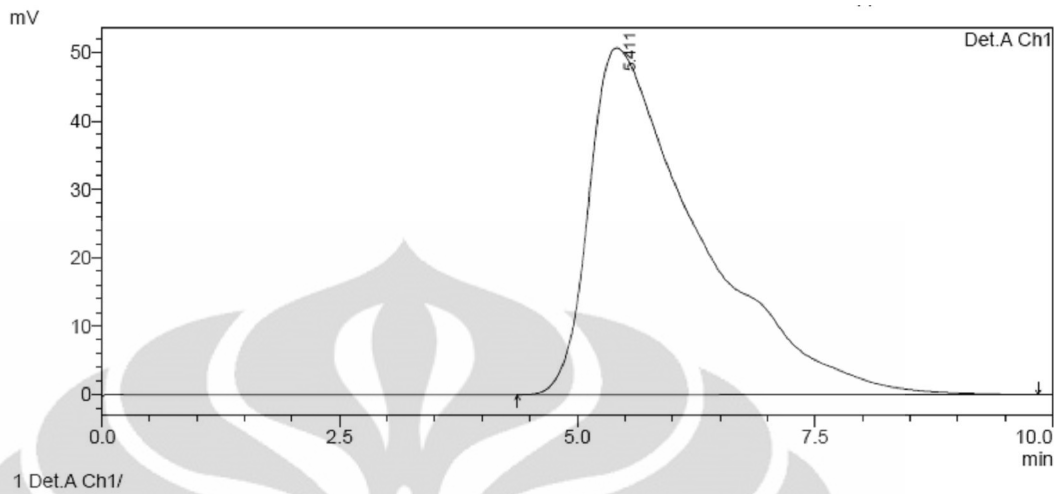
1 Det.A Ch1/

PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	5.148	268501	6534	100.000	100.000
Total		268501	6534	100.000	100.000

3) Sukrosa 25000 ppm

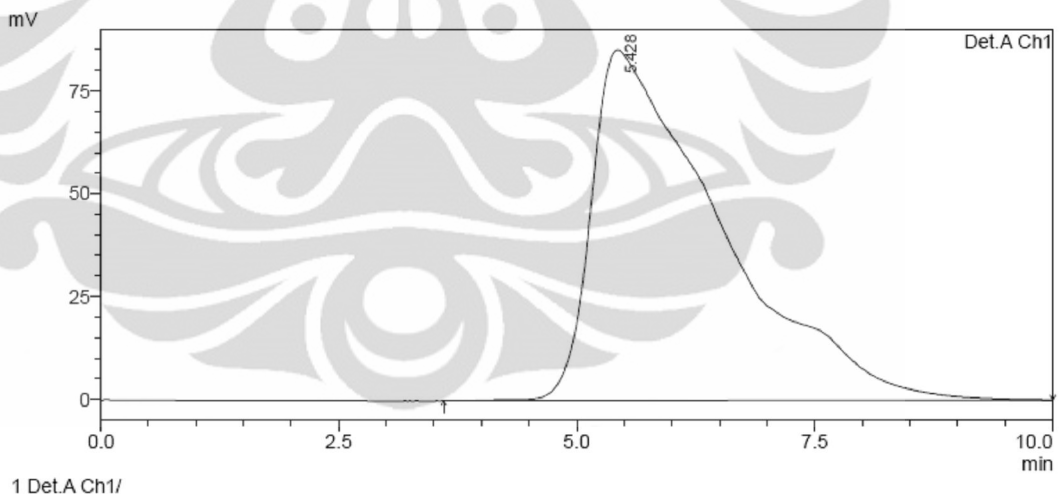


PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	5.411	4087614	50638	100.000	100.000
Total		4087614	50638	100.000	100.000

4) Sukrosa 50000 ppm

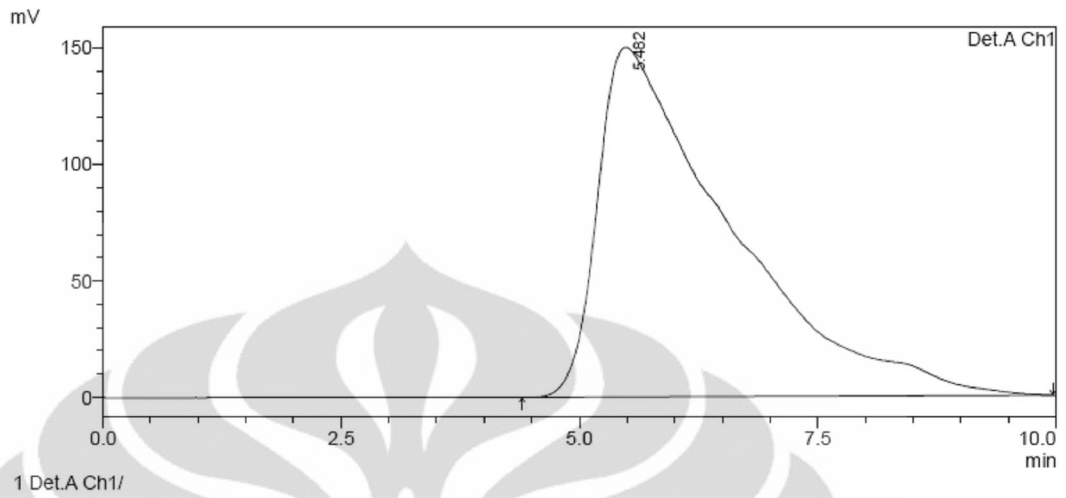


PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	5.428	8021067	85095	100.000	100.000
Total		8021067	85095	100.000	100.000

5) Sukrosa 100000 ppm

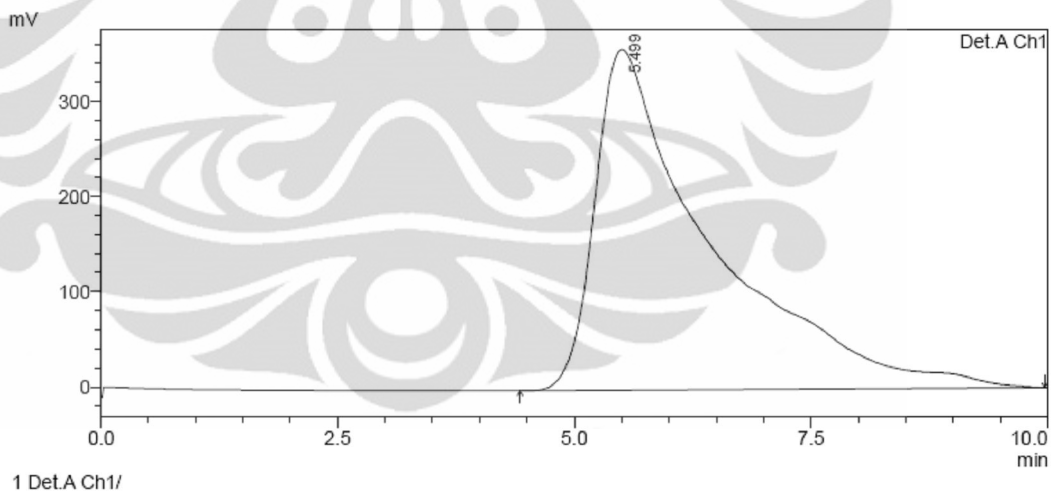


PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	5.482	14526536	149797	100.000	100.000
Total		14526536	149797	100.000	100.000

6) Sukrosa 200000 ppm

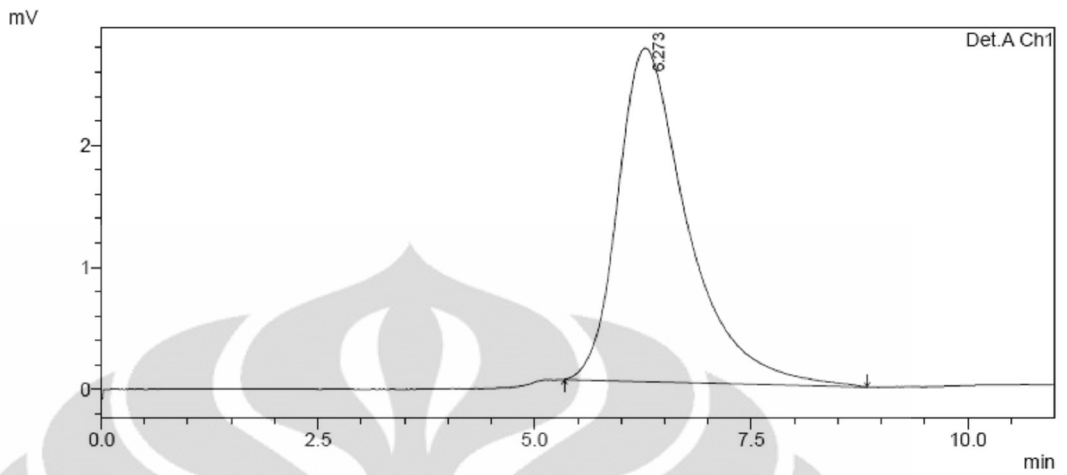


PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	5.499	30543338	357833	100.000	100.000
Total		30543338	357833	100.000	100.000

7) Glukosa 200 ppm



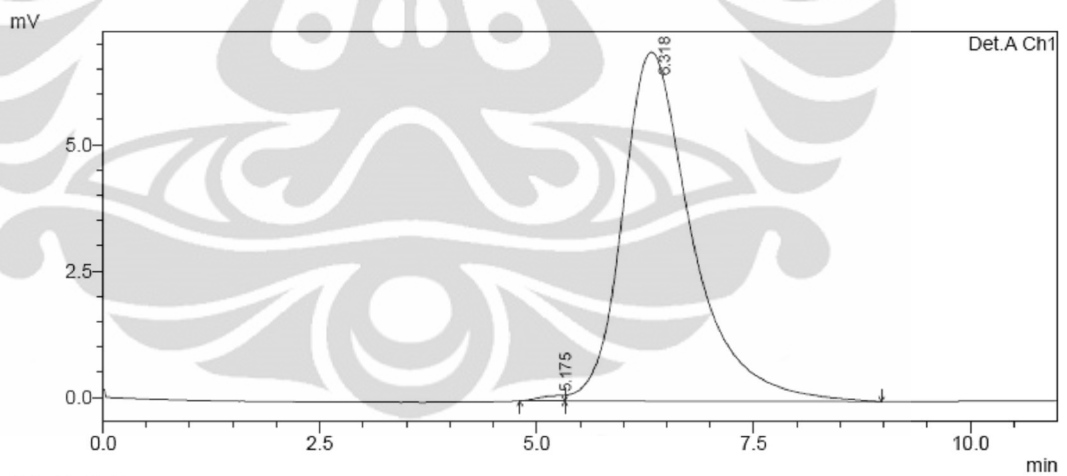
1 Det.A Ch1/

PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	6.273	153098	2735	100.000	100.000
Total		153098	2735	100.000	100.000

8) Glukosa 2000 ppm



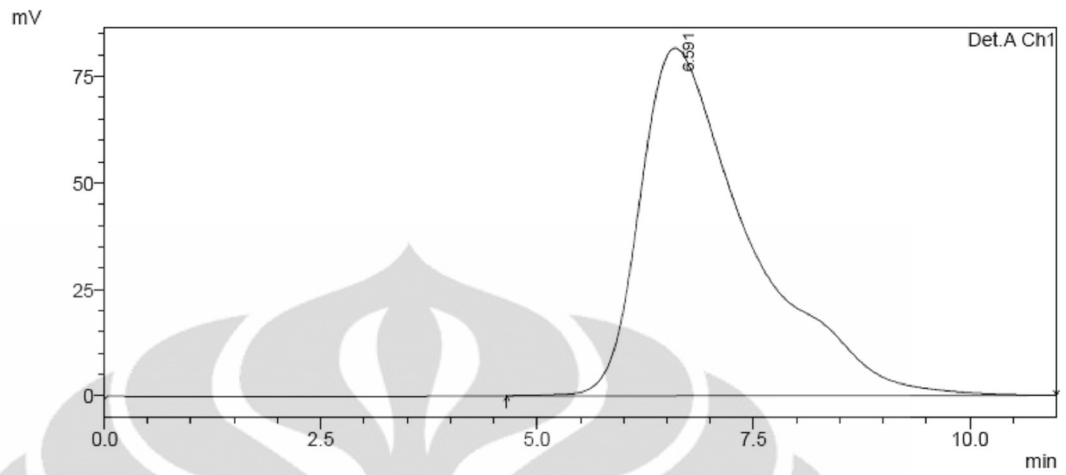
1 Det.A Ch1/

PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	5.175	2007	97	0.519	1.382
2	6.318	385115	6911	99.481	98.618
Total		387122	7008	100.000	100.000

9) Glukosa 50000 ppm



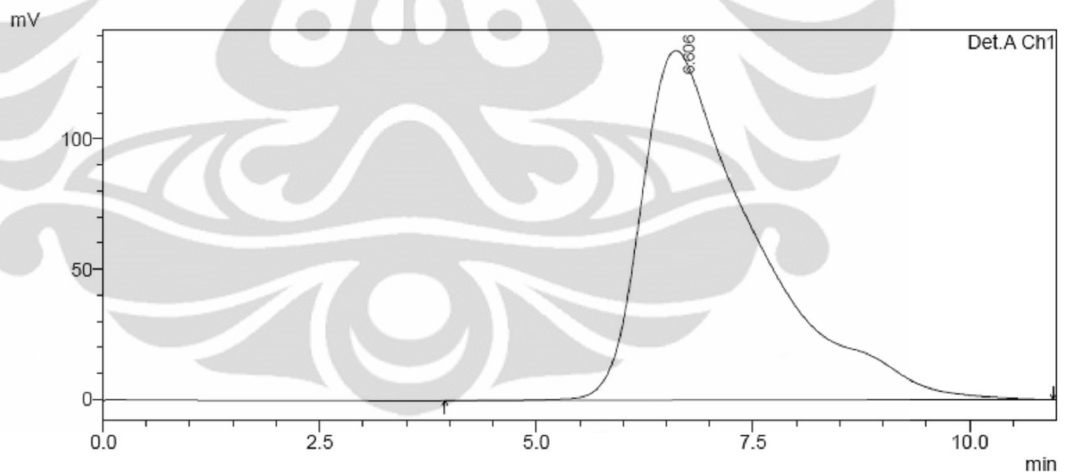
1 Det.A Ch1/

PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	6.591	7162483	81535	100.000	100.000
Total		7162483	81535	100.000	100.000

10) Glukosa 100000 ppm



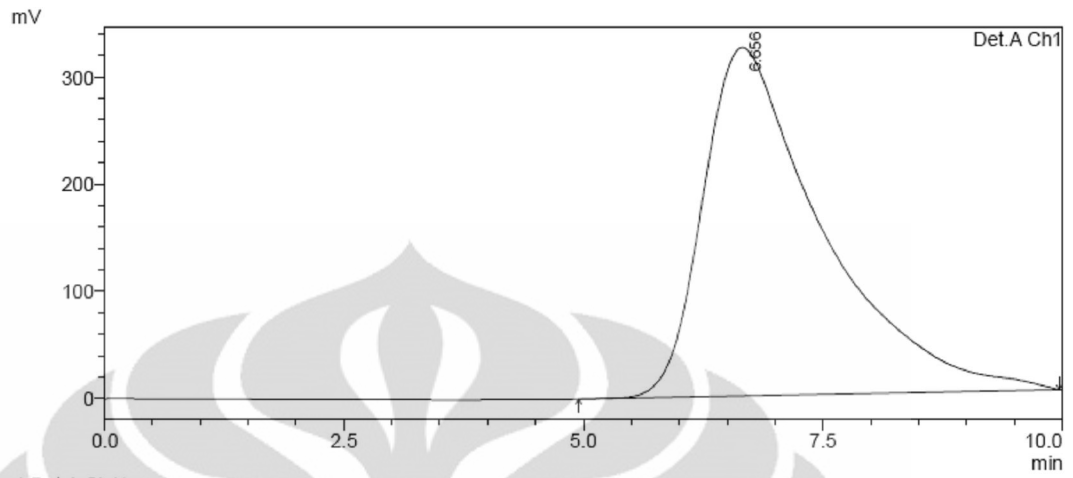
1 Det.A Ch1/

PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	6.606	12303544	134519	100.000	100.000
Total		12303544	134519	100.000	100.000

11) Glukosa 200000 ppm



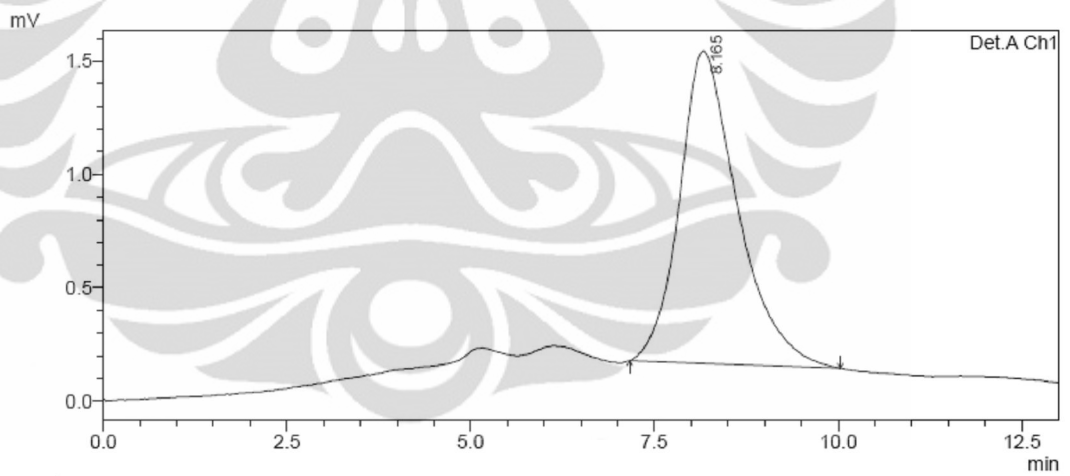
1 Det.A Ch1/

PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	6.656	28271173	325045	100.000	100.000
Total		28271173	325045	100.000	100.000

12) Fruktosa 200 ppm



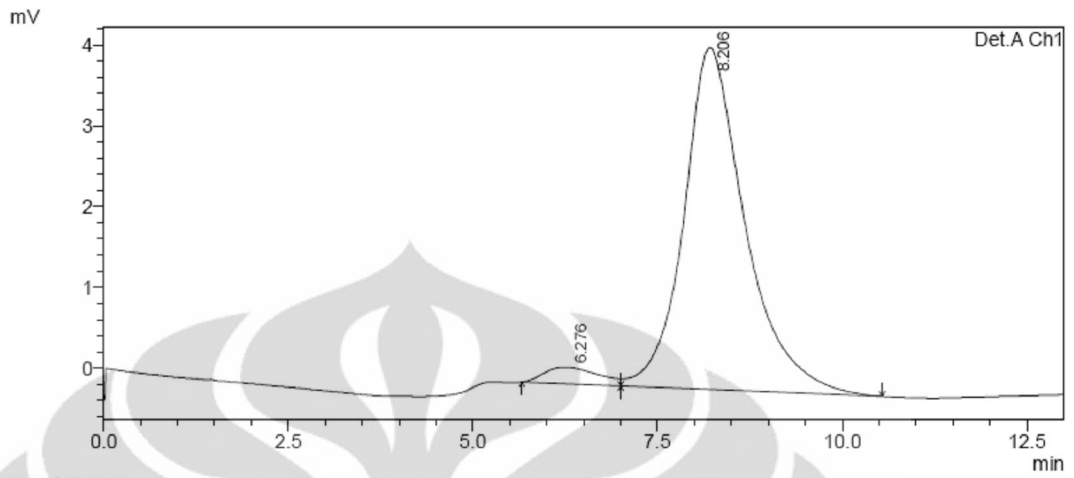
1 Det.A Ch1/

PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.165	76180	1379	100.000	100.000
Total		76180	1379	100.000	100.000

13) Fruktosa 2000 ppm



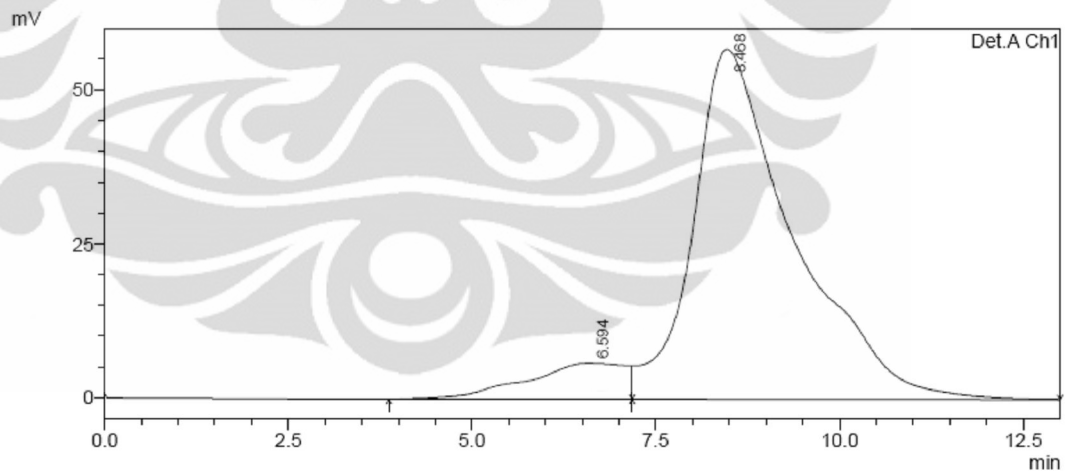
1 Det.A Ch1/

PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	6.276	10422	206	4.086	4.639
2	8.206	244614	4226	95.914	95.361
Total		255035	4432	100.000	100.000

14) Fruktosa 50000 ppm



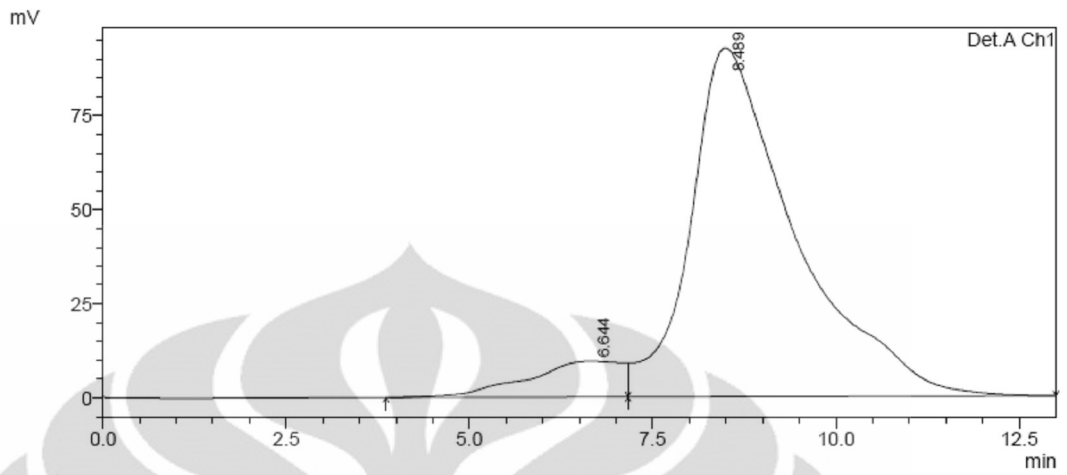
1 Det.A Ch1/

PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	6.594	553276	5867	9.314	9.365
2	8.468	5386728	56781	90.686	90.635
Total		5940004	62648	100.000	100.000

15) Fruktosa 100000 ppm



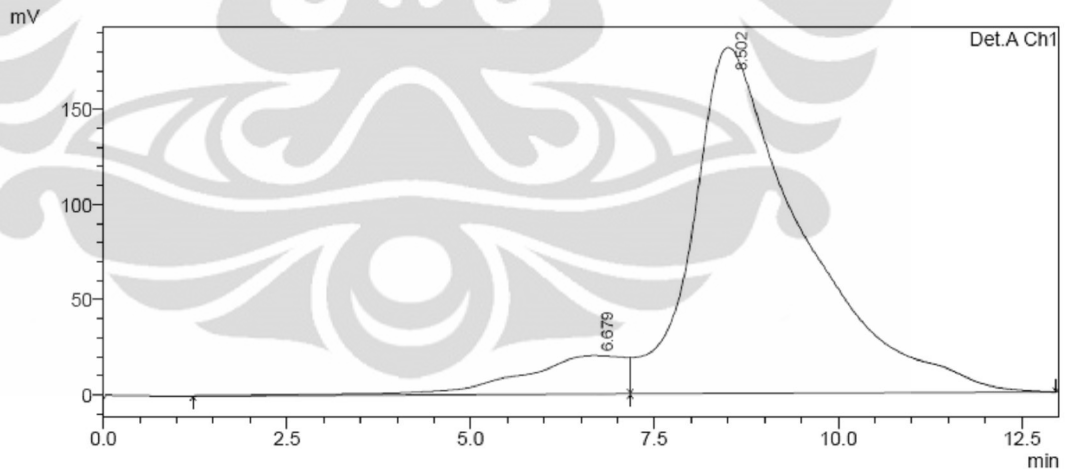
1 Det.A Ch1/

PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	6.644	861108	9535	8.521	9.336
2	8.489	9245086	92595	91.479	90.664
Total		10106194	102130	100.000	100.000

16) Fruktosa 200000 ppm



1 Det.A Ch1/

PeakTable

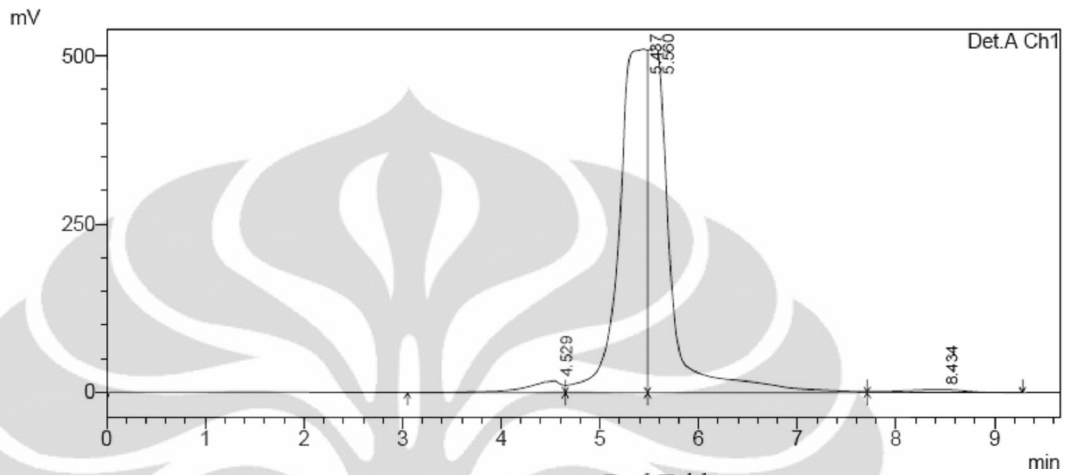
Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	6.679	1990086	20186	9.521	9.997
2	8.502	18911863	181736	90.479	90.003
Total		20901949	201922	100.000	100.000

Lampiran 3

Kromatogram sampel fermentasi

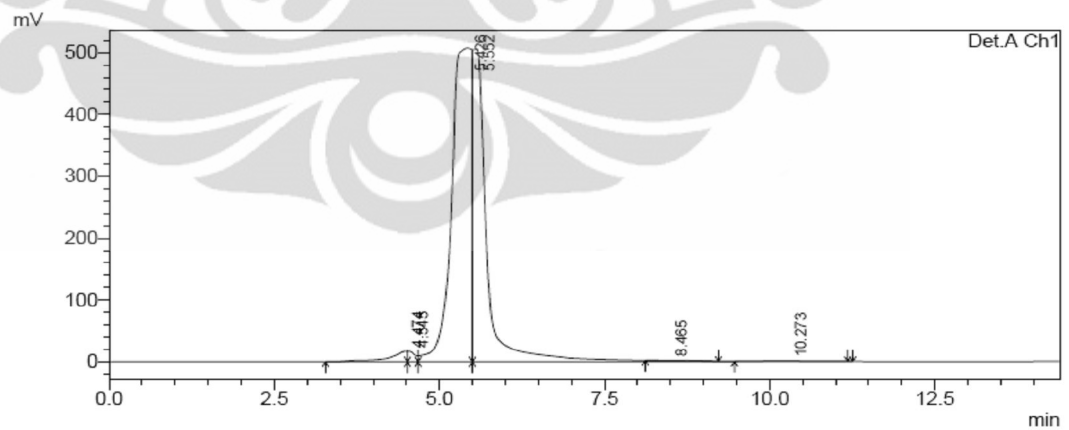
1) Kontrol



Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	4.529	445746	17409	2.416	1.669
2	5.437	9810056	510826	53.181	48.961
3	5.560	7992647	511043	43.329	48.982
4	8.434	198123	4055	1.074	0.389
Total		18446572	1043333	100.000	100.000

2) 0 jam

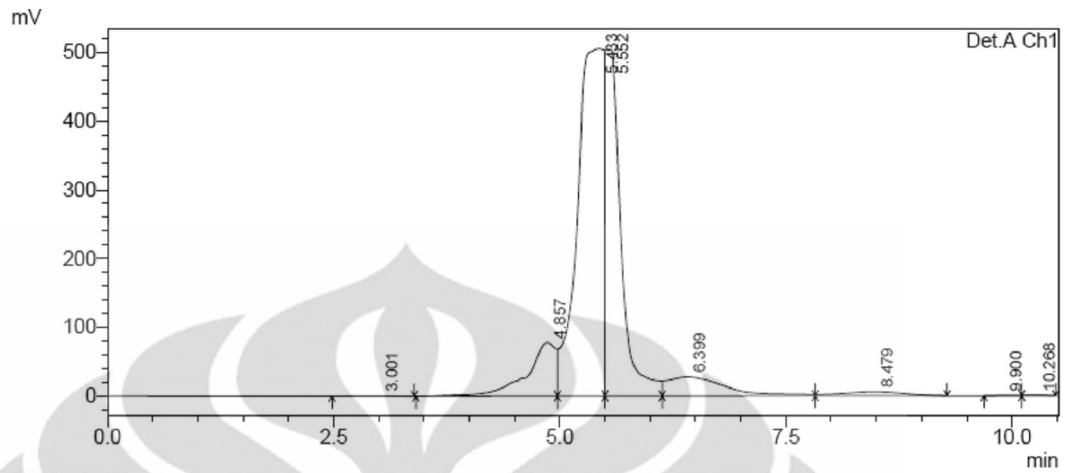


1Det.A Ch1/

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	4.474	328842	16916	1.776	1.616
2	4.545	127933	17131	0.691	1.636
3	5.426	10640438	506760	57.456	48.410
4	5.552	7366746	504507	39.779	48.195
5	8.465	30063	649	0.162	0.062
6	10.273	25183	850	0.136	0.081
Total		18519206	1046814	100.000	100.000

3) 12 jam



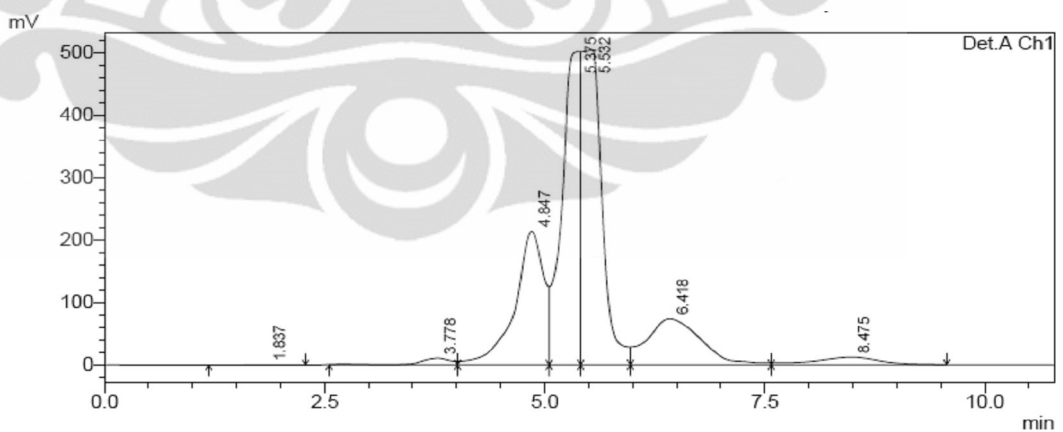
1Det.A Ch1/

PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	3.001	5590	228	0.029	0.020
2	4.857	1739432	77517	8.953	6.921
3	5.433	10270560	505409	52.861	45.123
4	5.552	5932082	503661	30.531	44.966
5	6.399	1222826	27455	6.294	2.451
6	8.479	255188	5571	1.313	0.497
7	9.900	1301	65	0.007	0.006
8	10.268	2505	175	0.013	0.016
Total		19429483	1120080	100.000	100.000

4) 24 jam



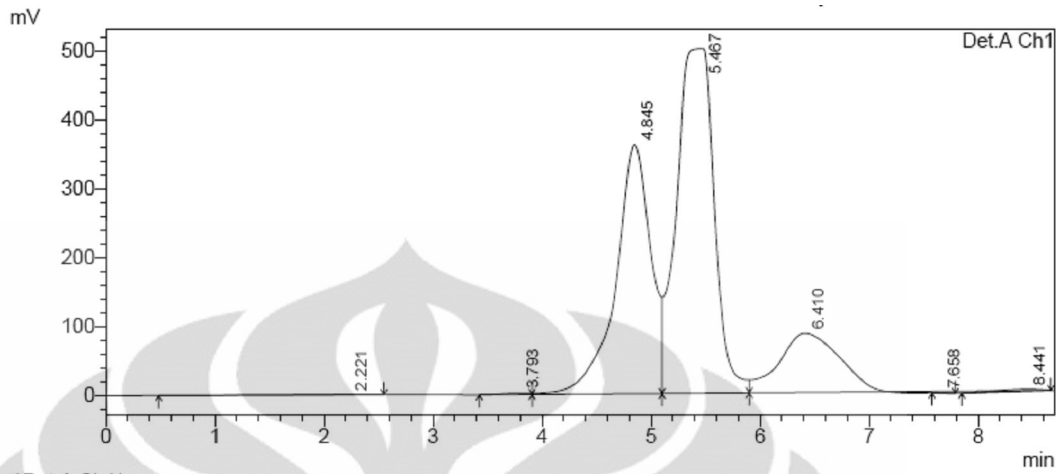
1Det.A Ch1/

PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.837	4154	120	0.017	0.009
2	3.778	235367	10566	0.978	0.804
3	4.847	4908633	214065	20.397	16.289
4	5.375	7205560	500826	29.942	38.109
5	5.532	8010982	502871	33.289	38.264
6	6.418	3112332	73781	12.933	5.614
7	8.475	587881	11979	2.443	0.911
Total		24064910	1314207	100.000	100.000

5) 36 jam



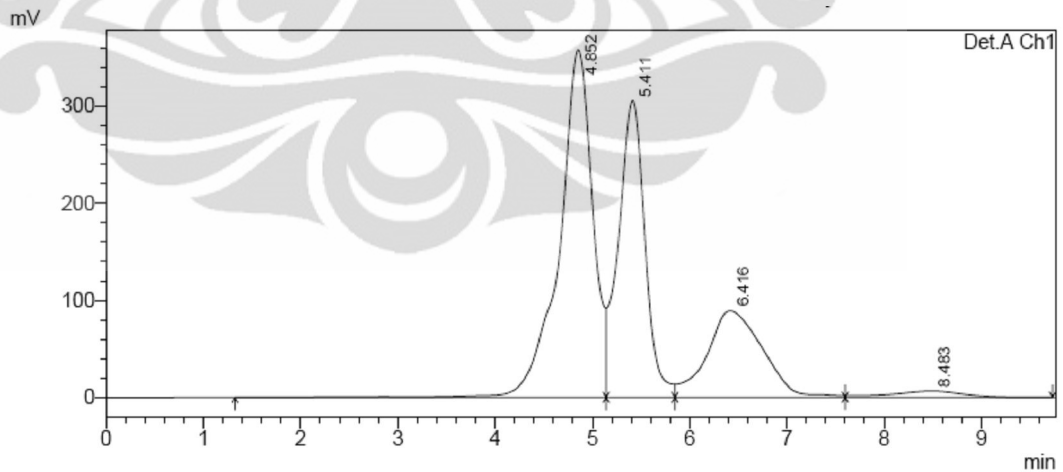
1Det.A Ch1/

PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.221	15398	247	0.066	0.026
2	3.793	34346	1933	0.147	0.203
3	4.845	8068223	361035	34.621	37.922
4	5.467	11973957	499782	51.381	52.496
5	6.410	3125492	85787	13.412	9.011
6	7.658	1120	139	0.005	0.015
7	8.441	85726	3115	0.368	0.327
Total		23304263	952037	100.000	100.000

6) 48 jam



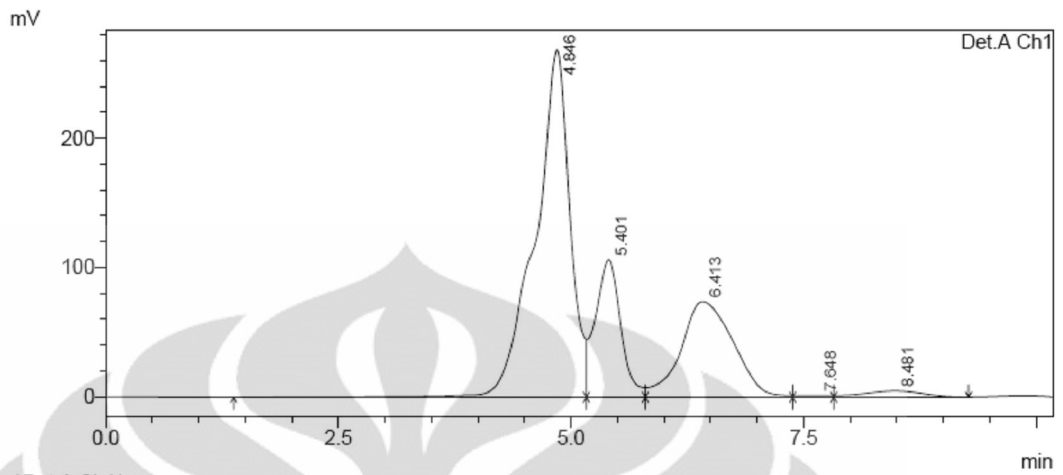
1Det.A Ch1/

PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	4.852	8519766	357823	46.890	47.152
2	5.411	5792019	305492	31.878	40.256
3	6.416	3531705	89122	19.437	11.744
4	8.483	326077	6440	1.795	0.849
Total		18169568	758877	100.000	100.000

7) 60 jam

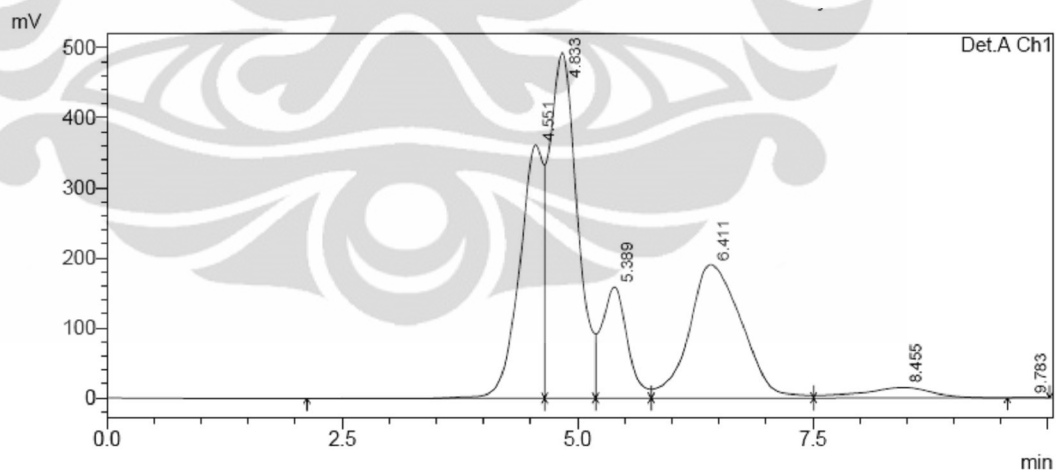


1Det.A Ch1/

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	4.846	6950458	268400	57.508	59.052
2	5.401	2010196	106101	16.632	23.344
3	6.413	2882470	73884	23.850	16.256
4	7.648	33128	1285	0.274	0.283
5	8.481	209826	4844	1.736	1.066
Total		12086078	454514	100.000	100.000

8) 72 jam

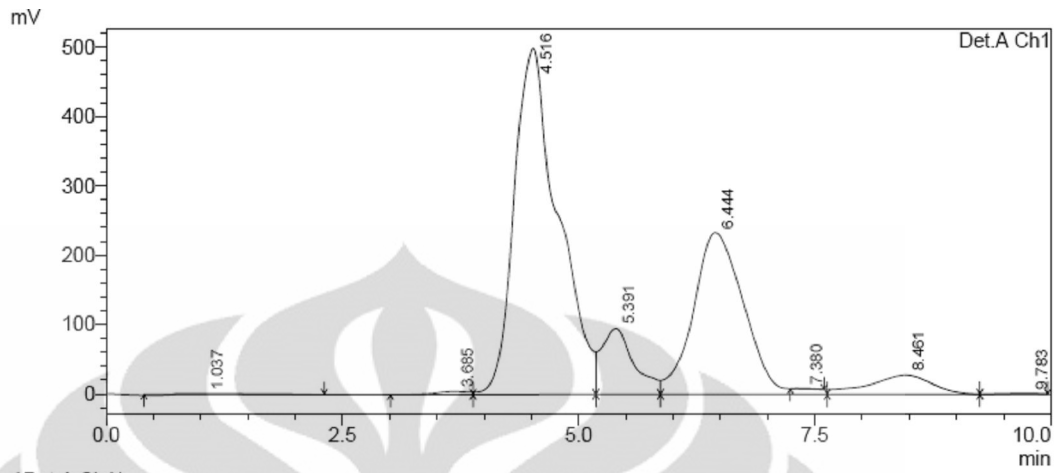


1Det.A Ch1/

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	4.551	6384997	361497	23.051	29.652
2	4.833	10150704	492896	36.647	40.430
3	5.389	3005936	158901	10.852	13.034
4	6.411	7369521	190452	26.606	15.622
5	8.455	783010	15061	2.827	1.235
6	9.783	4729	322	0.017	0.026
Total		27698897	1219129	100.000	100.000

9) 96 jam (*Full scan*)

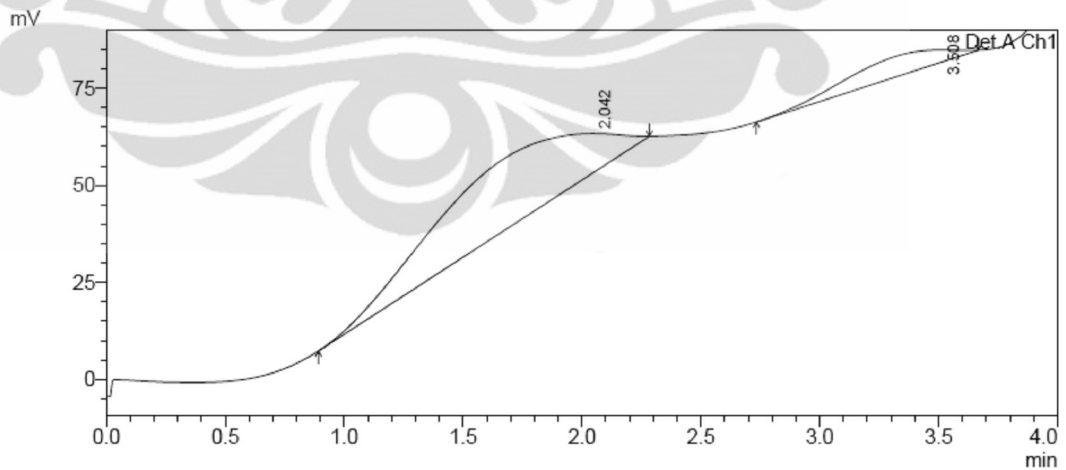


PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.037	22310	356	0.078	0.041
2	3.685	98478	4186	0.345	0.486
3	4.516	16086443	498715	56.407	57.945
4	5.391	2272904	94925	7.970	11.029
5	6.444	8736907	232945	30.636	27.065
6	7.380	11320	959	0.040	0.111
7	8.461	1268860	27666	4.449	3.214
8	9.783	21158	920	0.074	0.107
Total		28518380	860673	100.000	100.000

10) 96 jam (*Zoom in waktu retensi 4 menit*)

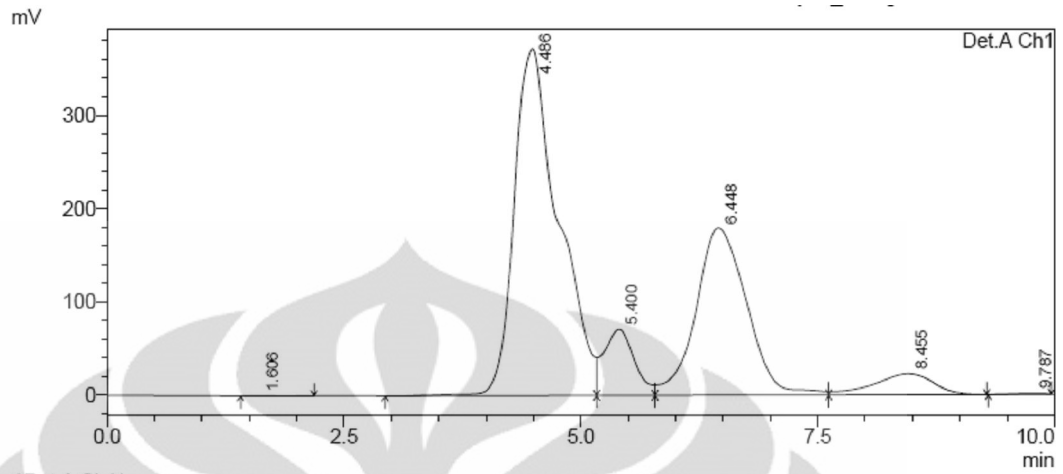


PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.042	871147	10288	84.648	76.199
2	3.508	157998	3213	15.352	23.801
Total		1029145	13501	100.000	100.000

11) 120 jam (*Full Scan*)



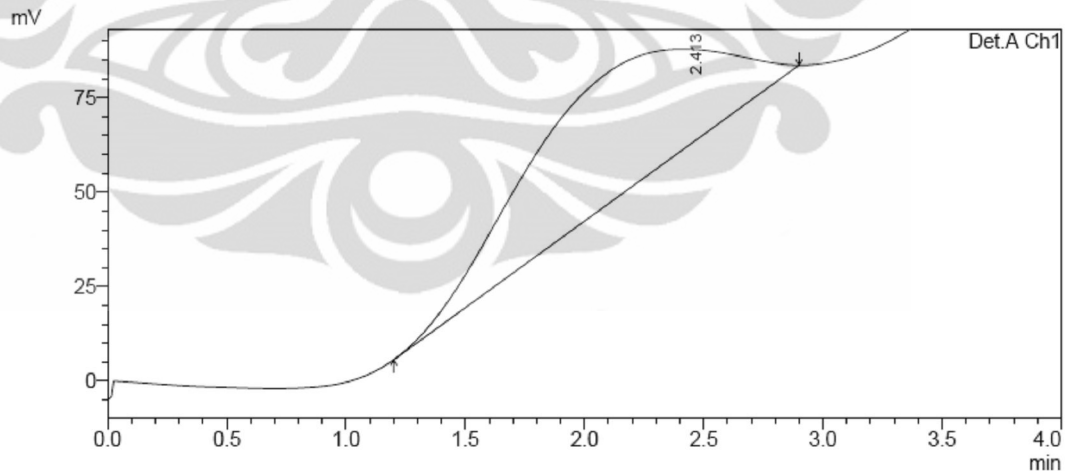
1Det.A Ch1/

PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.606	1819	69	0.009	0.011
2	4.486	12061936	371814	56.614	57.627
3	5.400	1580782	70842	7.420	10.980
4	6.448	6667239	178963	31.293	27.737
5	8.455	975596	22538	4.579	3.493
6	9.787	18195	987	0.085	0.153
Total		21305566	645214	100.000	100.000

12) 120 jam (*Zoom in waktu retensi 4 menit*)

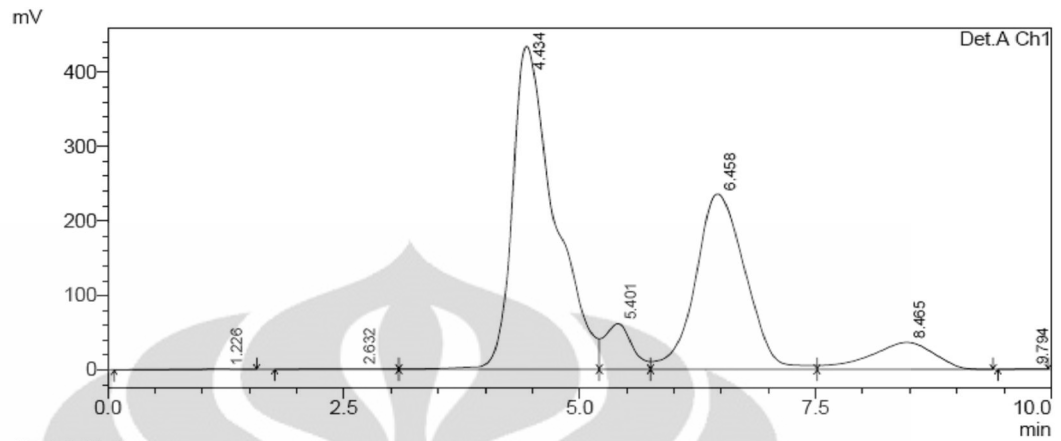


PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.413	1972052	26621	100.000	100.000
Total		1972052	26621	100.000	100.000

13) 144 jam



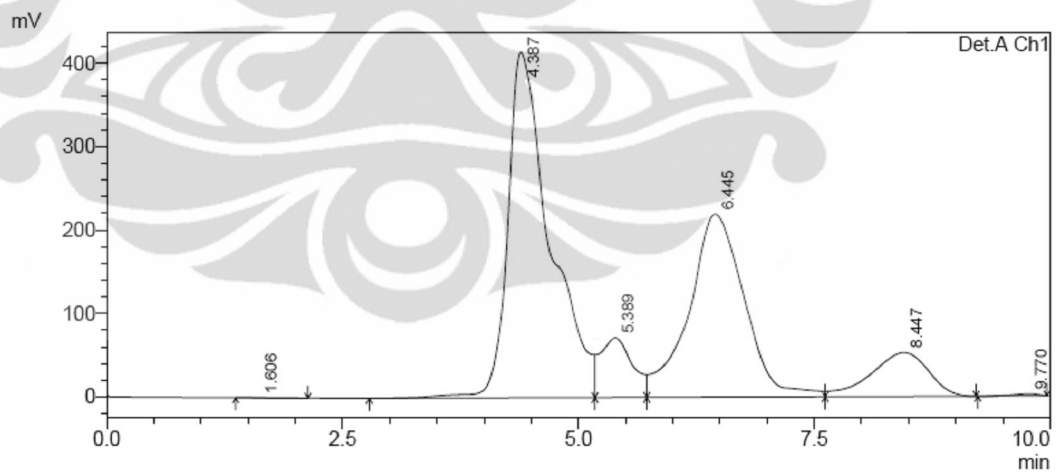
1Det.A Ch1/

PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.226	16919	295	0.067	0.038
2	2.632	16921	407	0.067	0.053
3	4.434	13474639	434067	53.638	56.515
4	5.401	1244061	61474	4.952	8.004
5	6.458	8641309	235094	34.398	30.609
6	8.465	1720524	36267	6.849	4.722
7	9.794	7136	448	0.028	0.058
Total		25121509	768051	100.000	100.000

14) 160 jam



1Det.A Ch1/

PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.606	6730	239	0.026	0.031
2	4.387	12777216	414099	49.739	54.477
3	5.389	1690053	71452	6.579	9.400
4	6.445	8938428	219130	34.795	28.828
5	8.447	2225475	52717	8.663	6.935
6	9.770	50769	2500	0.198	0.329
Total		25688672	760137	100.000	100.000